

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001027-01

일반과제

과제번호 108074-03

인삼 진세노사이드 대사체의 지방산 에스터 화합물을
함유하는 기능성 화장품의 개발
(Development of functional cosmetics using fatty acid esters
of ginsenoside metabolites)

한밭대학교

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “인삼 진세노사이드 대사체의 지방산 에스터 화합물을 함유하는 기능성 화장품의 개발” 과제(세부과제 “진세노사이드 대사체의 지방산 에스터 화합물의 개발”, 세부과제 “진세노사이드 지방산 에스터의 정제 및 구조 규명”, 협동과제 “진세노사이드 지방산 에스터의 피부활성효능 규명 및 기능성 화장품의 개발”)의 보고서로 제출합니다.

2011년 6월 24일

주관연구기관명 : 한밭대학교

주관연구책임자 : 김 창 섭

세부연구책임자 : 최 병 욱

연 구 원 : 이 봉 호

협동연구기관명 : (주)오비엠랩

협동연구책임자 : 노 석 선

요 약 문

I. 제 목

인삼 진세노사이드 대사체의 지방산 에스터 화합물을 함유하는 기능성 화장품의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

섭취한 인삼 천연 진세노사이드들은 장내미생물에 의한 당분해 대사 작용으로 일부만이 생체내로 흡수될 수 있는 형태로 전환이 됨. Compound K가 주요 생체 흡수 대사체의 형태이지만 여전히 생체 흡수율은 높지 않고, 간에서 compound K의 지방산 에스터 구조 변환체로 전환된 후에야 생체 내에 오래 잔존하게 되며 우수한 약리활성을 보이게 됨. 본 연구에서는 생체 흡수도, 생체 내 안정성, 약리활성이 우수한 compound K 지방산 에스터 화합물을 고정화 lipase를 이용한 효소전환기술을 활용하여 제조하여, 피부생리활성 및 안전성 평가를 통하여 주름개선 기능성 화장품의 소재로 개발하고자 함.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. Compound K를 비롯한 진세노사이드 대사체의 지방산 에스터 화합물의 개발
2. 지방산 에스터화 진세노사이드의 정제 및 구조 규명
3. 진세노사이드 대사체의 지방산 에스터 화합물의 대량생산
4. 주름억제효능 등의 기능성화장품 소재 개발 및 효능 및 안전성자료 확보
5. 피부생리활성 기능성 및 생체내 안정성이 우수한 지방산 에스터화 진세노사이드를 주름개선 기능성 화장품의 소재로 개발 (시제품 제작)

IV. 연구개발 결과

본 연구는 유기용매 내에서 lipase를 이용하여 지방산인 oleic acid, octanoic acid와 ginsenoside Rb1, compound K와의 에스터 화합물을 제조하여, 진세노사이드와 이들의 대사체의 지방산 에스터 화합물 (ginsenoside fatty acyl ester)을 주름개선 기능성 화장품의 소재로 개발하기 위하여 수행되었다.

(주)제노포커스로부터 제공받은 lipase 효소는 물이 있는 상태에서는 분해가 일어나고 물이 없는 상태에서는 주로 합성 반응을 매개한다. 그래서 유기용매인 2-methyl-2-butanol을 반응 매질로 desiccator의 vacuum 상태에서 7일 동안 충분한 수분 제거 후 실험을 수행하였다. 반응은 50℃, 200rpm의 조건의 shaking incubator에서 수행하고 반응 진행 경과를 24시간마다 sampling을 하여 TLC로 분석하였다. 그 결과 새로운 에스터 화합물이 생성되는 것을 확인할 수 있었다. 유기용매 tertiary-amyl alcohol (2-methyl-2-butanol), 지방산의 종류와 첨가량 (oleic acid, 0.5-3% (v/v)), 반응 방법 (shaking incubator), 효소의 사용량 (0.4%, w/v), 반응 온도 (50℃) 등의 인자들을 각각 유기용매 (isooctane:DMSO (31.25:1)), 지방산 종류와

첨가량 (octanoic acid, 6.4% (v/v)), 반응 방법 (stirring), 효소의 사용량 (4%, w/v), 반응 온도 (65°C)로 대체하면서 반응 시간이 10-13일에 비해 6-9일정도 빠른 5일 후에 높은 전환율을 보는 최적의 조건을 결정하였다. 사용한 기질의 몰비는 compound K(0.2%, w/v):octanoic acid(6.4%, v/v) (1:125)이었다. 최적 효소 반응 조건에서 compound K 지방산 에스터 화합물의 대량 반응을 진행하여 HPLC를 이용하여 분석한 결과, 9분대 이후에 새로운 화합물들이 용출됨을 확인하였다. HPLC를 이용하여 13-17분 분획(EK-001)과, 17-26분 분획(EK-002)으로 더 나누어 분리 정제한 시료를 LC-MS, MS/MS, ¹H-NMR 스펙트럼을 통하여 분석하였다. EK-001의 LC-MS TIC에서 19.63분 peak는 compound K로부터 크게 변형된 구조로 정확한 구조를 예상할 수 없었고, 22.15분의 peak는 합성된 에스터 화합물이 일부 변형된 형태로 반응이 진행 되었다고 추정할 수 있었다. EK-002시료의 TIC에서 23.22분 peak는 compound K와 한 분자의 octanoic acid가 에스터 결합을 통하여 생성된 화합물에 해당하는 것으로, 예상하는 에스터 화합물 생성 반응이 정상적으로 진행되었음을 추정할 수 있었다. 하지만 ¹H-NMR 분석 결과 1-2ppm 이외에 compound K에 해당하는 peak들이 상대적으로 매우 작게 나타나는 것으로 보아 EK-002는 반응하지 않은 octanoic acid를 과량 함유하고 있는 혼합물일 수도 있을 가능성을 배제할 수 없었다. 이에 따라 EK-002로부터 완전한 단일물질의 정제와 체계적인 분광학적 분석을 통한 생성물에 대한 정확한 구조에 대하여서는 보다 추가적인 연구가 필요하다.

새로운 화합물이 있을 것으로 추정되는 9분대 이후에 용리되는 시료를 모두 합쳐 분리 정제한 시료인 Octanoyl Esterified Compound K (OECK)가 피부 주름과 탄력 조절에 핵심적인 역할을 담당하는 피부세포의 활성화에 미치는 영향과 안전성을 종합 평가한 결과, OECK는 [³H]thymidine uptake 실험결과 사람의 피부섬유아세포의 성장을 촉진시키고, ELISA와 Western blotting 평가에서 collagen 합성을 촉진시켰다. 이 과정에서 OECK는 p42/44 ERK, p38 MAPK, AKT 및 CREB 등의 세포신호전달체제를 활성화시키는 것으로 평가되어 주름개선 화장품 소재로서의 가능성을 보였다. 안전성 (Safety) 평가에서도 OECK는 안자극성과 피부자극성이 거의 없는 것으로 평가되어 화장품에 사용하기 적합한 수준의 안전한 소재인 것으로 평가되었다.

V. 연구성과 활용 계획

Compound K 지방산(octanoic acid) 에스터 화합물은 compound K 자체보다 훨씬 우수한 생체 흡수율을 가질 것으로 추정되나, 피부 흡수 DDS 실험 자료를 통한 검증이 필요함. 또한 효소 반응조건의 최적화를 통한 전환율의 개선, compound K 지방산 에스터 화합물의 대량 분리정제 방법의 개발, 그리고 반응 기질인 compound K를 고순도로 절감된 단가로 생산할 수 있는 기술을 가진 새로운 구입처 모색 등을 통하여 경제성을 확보하는 것이 사업화를 위한 전제 조건이 될 것으로 판단됨. 크림, 로션, 에센스, 스킨, 부스터, Wrinkle filler 등의 주름개선 기능성화장품 제품군으로 하나의 브랜드화 해야 할 것으로 사료됨. 이후 의약품 소재로도 활용할 수 있을 것으로 기대됨.

SUMMARY

The esterification reactions of a ginsenoside, compound K, with fatty acids, such as oleic acid and octanoic acid, were carried out using the enzyme lipase GF. In the optimized condition the esterification was carried out using lipase GF(4%, w/v), with compound K(0.2%, w/v) and octanoic acid(6.4%, v/v)(molar ratio, 1:125) in an organic solvent medium (isooctane:DMSO(31.25:1)), stirred at 1,150rpm at 65°C for 5 days in the presence of 4Å molecular sieves. The reaction mixtures were analyzed by both TLC and HPLC. The reaction products were isolated with preparative HPLC into two major fractions (EK-001 and EK-002) and analyzed by LC-MS, MS/MS and ¹H-NMR. One product of compound K octanoyl ester was proved as a compound with molecular weight of 748, probably esterified with a single molecule of octanoic acid. And the other product with a molecular weight of 738 was also proved to be 10 smaller than expected, yet probably modified during enzymatic esterification reaction. The chemical structures of these products needs to be confirmed by further analysis.

The absorption of ginsenosides themselves into body has been found to be poor in the range of 0.1-3.7%. However, the most of residual forms of these ginsenosides in the body of mice fed with ginsenosides were found as esterified with fatty acids. The fraction containing products through enzymatic esterification reaction, Octanoyl Esterified Compound K (OECK), accelerated the growth of dermal fibroblasts, which contribute to the maintenance of connective tissue integrity, in a dose-dependent manner. OECK also increased the production of type 1 collagen, major component of ECM. In line with these results, the phosphorylations of p42/44 ERK and p38 mitogen-activated protein kinase, AKT and CREB were markedly increased by OECK, suggesting that the enhancement of collagen production may be linked to the activation of multiple intracellular signaling cascades. In addition, OECK has been demonstrated safe as a cosmetics ingredients by OECD guidelines of eye and skin irritation assay.

CONTENTS

Chapter 1	Outline of the Research Project -----	6
Section 1	Necessity -----	6
Section 2	Objectives and Scope -----	12
Chapter 2	Overview of Current Developments of Related Research -----	13
Chapter 3	Contents and Results of the Research and Development -----	15
Section 1	Outline of Methods and Contents -----	15
Section 2	Details of Methods and Results -----	17
1.	Methods -----	17
2.	Results -----	36
Chapter 4	Achievement in the Research Objectives and Contribution to the Related Research Area -----	85
Section 1	Achievement Assessment in the Research Objectives by Year -----	85
Section 2	Contribution to the Technical Development in the Related Research -----	86
Chapter 5	Achievements in the Research and their Applicable Planning -----	87
Chapter 6	Related Scientific and Technical Information Obtained During Research -----	88
Section 1	Patents -----	88
Section 2	Research Articles -----	88
Chapter 7	References -----	89

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 -----	6
제 1 절	연구개발의 필요성 -----	6
제 2 절	연구개발의 목적 및 범위 -----	12
제 2 장	국내외 기술개발 현황 -----	13
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과 -----	15
제 1 절	연구 수행 방법 및 연구 내용 -----	15
제 2 절	세부 연구 방법 및 연구 결과 -----	17
1.	연구 방법 -----	17
2.	연구 결과 -----	36
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	85
제 1 절	연도별 연구개발 목표의 달성도 -----	85
제 2 절	관련분야의 기술발전 등에의 기여도 -----	86
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획 -----	87
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술정보 -----	88
제 1 절	특허 기술 -----	88
제 2 절	논문 -----	88
제 7 장	참고문헌 -----	89

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

시중에서 유통되는 인삼제품 (백삼, 홍삼)의 경우 진세노사이드의 함량이 2-5% 정도로 매우 미량이며, 경작지, 경작 연수, 제품 부위, 가공 상태 등에 따라 성분함량의 편차가 커 합리적 약리활성의 기대가 매우 힘든 현실이다. 또한 대부분의 진세노사이드 관련제품들은 훈증, 엑기스, 열처리 제품과 같은 단순 가공된 혼합물 형태로 출시되어 과학적이고 정량적인 자료를 세계시장에 제시하지 못했다. 최근 들어 (주)비티진을 비롯한 국내 일부 기업에서 인삼 및 홍삼에 존재하는 진세노사이드 뿐만 아니라 성분이 전환된 진세노사이드 유도체를 단일성분으로 분리할 수 있는 기술이 개발되었고, 이들의 제품화가 가능해졌으며 또한 정량적인 약리효능 입증에 많이 이루어지고 있다.

국내 및 국외시장 분석결과 인삼과 홍삼의 단순 추출물을 첨가한 다양한 인삼화장품의 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 잔류 농약과 복합성분의 함유로 인한 부작용 유발 등의 문제로 그 판매가 정체되고 있다. 최근 들어 일부 국내 화장품회사를 중심으로 단일 진세노사이드를 함유하는 화장품을 개발하고 있으나, 독자적인 특허기술로 인정받지 못할 뿐만 아니라 낮은 피부 흡수율로 인하여 그 약리효능을 제대로 기대할 수 없는 실정이다

사포닌의 화학구조를 간단히 정의하면 당부분인 sugar (glycone)와 비당부분인 non-sugar (aglycone)로 구성되어있는 배당체다. 특히 사포닌의 비당부분을 sapogenin이라 부른다. 사포닌은 비당부분의 골격 구조에 따라 triterpenoid 계 사포닌과 steroid 계 사포닌, 2가지로 크게 분류된다. Triterpenoid 계 사포닌은 oleanane 계 사포닌이 대부분을 차지하고 있고, 진해, 거담의 목적으로 사용되고 있는 생약인 길경(도라지), 遠志등에 함유되어있는 사포닌이 여기에 속한다. 그러나 인삼사포닌은 거의 triterpenoid 계의 dammarane 계 사포닌으로서 인삼(*Panaxa*) 속의 식물에만 존재하는 특유의 사포닌이다. 따라서 인삼 사포닌은 특수한 화학구조를 가지고 있고, 비당부분에 따라 4環性의 dammarane 사포닌 (거의 대부분임)과 5환성의 oleanane 사포닌 (gisenoside Ro)의 2종류로 대별된다. Dammarane 계 사포닌은 다시 비당부분에 붙어있는 -OH 기의 수에 따라 2개(3, 12번 탄소)인 경우 protopanaxadiol 계 사포닌, 3개인 경우(3, 6, 12번 탄소) protopanaxatriol 계 사포닌으로 나누어진다.¹⁻³⁾

천연의 진세노사이드는 Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rg1등이 주성분으로 있으며, 그 외 홍삼 등의 가공삼에 Rg2, Rg3, Rh1등이 미량 존재한다.¹⁻³⁾ 이들 성분은 생체내로 투여되면 위액 등의 각종 소화액과 장내미생물의 활동으로 Rb1, Rb2, Rc등의 diol계 사포닌이 각각 단계적으로 compound K로 분해된다(또는 Rb1, Rb2, Rc, Rd→Rg3→Rh2→compound K→PPD로 분해).⁴⁾ 그러나 문제는 모든 diol계의 천연 진세노사이드들이 완전하게 compound K로 전환되는 것이 아니고, 생체의 건강상태에 따라 그 분해정도가 달라질 수 있으며, 주로 compound K의 형태로 대장에서 체내로 흡수되게 된다는 것이다. 중간대사물질인 다른 구조이성질체들은 흡수가 잘 되지 않는 것으로 알려졌다. 진세노사이드의 분해는 일반적으로 배당체중 당성분 (sugar)이 분해되는 과정을 의미하며 이때 몇몇의 구조이성질체가 생성될

수도 있다. 생체내의 흡수는 일반적으로 당의 수가 적을수록 흡수가 빠르며 체내에서의 존재 시간도 길며 약리활성 또한 강한 것으로 알려져 있다.

천연 진세노사이드 성분들 중 Rb1, Rb2, Rc, Rd 등의 diol계 진세노사이드는 생체 내로 투여된 후 장내미생물들의 작용으로 Rb1→[M10(Rd)→M5(F2) 또는 M9→M13]→M1, Rb2→M6→M2→M1, 그리고 Rc→M7→M3→M1 과 같은 일련의 분해과정을 거치게 된다.⁴⁾ 그러나 문제는 모든 diol계의 천연 진세노사이드들이 완전하게 M1으로 전환되는 것이 아니고, 생체의 건강상태에 따라 그 분해정도가 달라질 수 있으며, 주로 M1의 형태로 대장에서 체내로 흡수되게 된다는 것이다 (Figure 1).⁴⁾ 중간대사물질인 다른 구조이성질체들은 흡수가 잘 되지 않는 것으로 알려졌다. M1은 anti-metastatic effect 및 anti-carcinogenic effect 등의 항암활성을 갖는데⁵⁻⁹⁾ 이는 진세노사이드 Rb1, Rb2, Rc, Rd 등의 물질이 항암효과를 나타내는 것에 대해서도 설명이 가능한 부분이다. M1은 관용명으로,^{10,11)} compound K,¹²⁾ IH901¹³⁾로도 불리며 20-O-β-D-Glucopyranosyl 20 (S)-protopanaxadiol로 명명된다.¹⁴⁻¹⁷⁾

또한 대장을 통해 혈액으로 흡수된 compound K는 선택적으로 그 일부만이 간(liver)에 축적되고 대부분은 담즙(bile)의 형태로 배출되게 된다. 그러나 약간의 compound K는 stearic oleic, palmitic acid, oleic acid 등의 여러 가지 종류의 지방산(fatty acid)과 주로 mono-ester (일부 di-ester)를 이루게 된다 (24 mol% in mouse). 이러한 에스터화된 compound K의 구조변환 유도체들은 compound K 자체와는 다르게 담즙으로 쉽게 배출되지 않으며, 따라서 간에 상대적으로 오래 잔존하는 것으로 최근 보고 되었다.⁴⁾ 체내로 흡수된 compound K로부터 생성된 compound K 구조변환 유도체의 약리활성은 B16-F10 melanoma 세포에서 세포독성 (cytotoxicity)이 compound K에 비해 상대적으로 약했지만 tumor growth 억제능력은 더 강력했다 (in vivo). 이런 결과를 종합해보면 생체에 흡수된 진세노사이드의 실질적인 주요 약리활성 성분은 compound K의 지방산 에스터 구조변환 유도체라고 보고되고 있다.

한편 Re, Rg1 등의 triol 계 진세노사이드는 장내미생물들의 작용으로 Re→Rg1, Rg2→M11 (F1) 또는 M8 (Rh1)→M4 으로의 전환 과정을 거치게 되는데, 그중에서 주로 M4의 형태로 소장에서 흡수되어 혈액으로 이동하는 것으로 보인다. 장간막 림프(mesenteric lymph)로 이동한 대부분의 M4는 에스터화된 구조 유도체로 변환되어, 간과 허파와 같은 조직에 축적되었다가 담즙으로 배출된다. 천연 진세노사이드 성분들의 약리효능은 장내미생물들의 당 분해 작용 (deglycosylation) 정도, 대장에서의 흡수, 간 또는 장간막 림프에서의 지방산의 에스터화, 체내 잔류 정도 (간에서 담즙으로의 배출 정도) 등에 의존하게 됨을 알 수 있다.⁴⁾

화장품은 지금까지 청결과 아름다움, 즉 미용효과에 치중되어 왔다. 그러나 최근 의학 및 첨단 기술의 발전과 더불어 화장품의 영역 개념이 확장되어, 기존의 미용 효과에 첨단 의학, 약학, 분자생물학적 개념이 가미된 즉 생리적 활성효능을 가지는 cosmeceuticals이라는 개념의 기능성 화장품으로 발전되었다. 기능성 화장품은 말 그대로 특별한 기능을 가진 화장품으로 생리활성효능을 지닌 특정 성분을 포함하여 일반 화장품에 비해 생리활성이 현저하고, 통계적으로 그 효능이 입증된 화장품을 뜻한다. 즉, 기존 화장품들이 단지 미용 효과를 가지는데 그치는 반면, 기능성 화장품은 여기에 특정 증상의 치료나 예방 효과를 더한 화장품이다.

국내에서도 기능성 화장품법이 도입된 이후 미백, 주름개선, 자외선 차단 등과 같은 실질적인 효능을 추구하게 되면서 기능성 화장품은 거대시장을 형성하고 가파른 성장세를 거듭하고 있다. 특히 웰빙 붐과 함께 바디 슬리밍 제품과 여드름, 아토피, 안티 셀룰라이트 혹은 슬리밍모 등의 제품 관련 제품들에 대한 소비자 니즈가 크게 높아짐에 따라 치유·치료의 개념이 강화된 기능성 화장품의 범주가 점차 확대해 가고 있다. 미국 등 해외의 경우 기능성 화장품의 범주를 특별히 규정하지 않고 있으나, 국내에서는 화장품 법에 근거하여 기능성 화장품을 자외선 차단제, 미백제, 주름개선제 등의 세 가지 종류로 한정하고 있다. 그러나 이러한 기능성 화장품 범위는 기능성 화장품을 요구하는 소비자들의 기대와 세계 화장품의 개발 경향을 고려할 때 향후 확대될 것으로 예상되며, 이에 따라 국제적인 경쟁력을 가질 수 있는 기능성 화장품을 개발하기 위해서는 새로운 카테고리의 기능성 신소재의 개발이 절실한 상황이다. 특히 최근에 일고 있는 웰빙의 열풍과 함께 천연소재를 활용한 기능성화장품은 무한경쟁시대에 다국적 화장품회사와 경쟁할 수 있는 우리가 가진 강점이라고 할 수 있다. 따라서 우리나라가 갖고 있는 천연소재를 고부가가치 소재로 개발하는 것은 인적 자원이 우수하고 부존자원이 부족한 우리나라에서 지식기반 산업의 하나인 화장품 산업을 육성하기 위해 필수적이라 할 수 있다. 현재 우리나라의 많은 화장품에서 인삼과 홍삼을 사용하고 있으나, 거의 모든 제품에서 단순 추출물을 첨가하는 형식으로 제품을 생산하고 있어 약재가 지니는 가치를 충분히 평가받지 못하고 있는 현실이다. 또한 진세노사이드(ginsenoside), 특히 진세노사이드의 활성형에 대한 기초대사 연구와 피부활성에 미치는 영향 등에 대한 연구는 아직까지 미미한 실정이다.

세계적으로 5조원 이상의 시장을 형성하고 있는 인삼제품은 그 사용 역사와 연구자료 그리고 뛰어난 약리활성에 비해 전문의약품이나 기능성식품으로의 개발이 매우 빈약한 상태이다. 이는 핵심 약리성분인 진세노사이드의 구조전환 기술 및 대량생산 기술의 부재와 그에 따른 진세노사이드 유도체 개발의 부재로 인한 것이다. 지금까지의 인삼제품은 대부분이 단순 가공품으로 약리활성이 검증된 핵심 진세노사이드 (compound K, Rg3, Rh2 등)의 함량이 미비하여, 합리적이고 재현성 있는 약리활성이 우수한 제품으로 한국 및 세계시장을 과학적으로 공략하는데 어려움을 겪고 있다. 인삼의 합리적 약리활성효과를 위해서는 약리활성이 뛰어난 특정 진세노사이드의 대량생산이 가능해야하며, 이를 토대로 다양한 진세노사이드 유도체를 개발하여 생체 흡수도 증가, 약리활성 증강, 생체내 안정성증강을 통한 새로운 약리활성물질 개발하는 것이 시급하다 하겠다. 이러한 시점에서 인삼제품의 합리화, 전문화, 다각화를 위해 효소라는 차별화된 기술을 접목시켜, 유효성분 강화 및 신물질의 창출에 따른 기능성 건강식품, 화장품 및 의약품을 개발을 위한 연구가 필요하다. 인삼의 종주국으로서 세계시장을 맞이하는 계기가 될 것이며, 내수 시장은 물론 해외 수출에도 큰 기여를 할 것이라 기대된다.

(주)비티진으로부터 고순도의 compound K를 비롯한 다양한 진세노사이드 대사체들을 구입하여, 주관연구기관이 고정화 lipase 효소를 이용한 전환기술을 이용하여 다양한 진세노사이드의 지방산 에스터 구조 변환체를 확보할 수가 있다. 확보된 구조 변환체는 참여기업인 (주)오비엠랩과 협력으로 피부생리활성과 항염, 항알레르기, 피부미용증진효능 등을 *in vitro* 및 *in vivo* 평가법을 활용해 체계적으로 규명함으로써, 생리활성이 우수한 compound

K 등의 구조변환 유도체를 선별 대량생산을 통하여 새로운 신기능성 한방화장품을 제조하고자 하였다. 장기적으로는 이러한 개발된 신규 진세노사이드 구조변 환체는 건강기능식품과 의약품 소재로도 활용할 수 있을 것으로 기대하고 있으며, 고부가가치 소재로서 소재 자체의 수출도 가능할 것으로 기대하고 있다.

본 연구과제에서는 진세노사이드 대사체의 지방산 에스터 화합물을 고정화 lipase 효소를 사용한 생물전환기술을 이용하여 약리활성이 뛰어난 신규 기능성 생물소재를 개발하고자 하였다. 즉, 약리활성증가와 체내 안정성증가를 목적으로 한 진세노사이드의 지방산 에스터 화합물의 효소적 합성하여, 우선적으로는 기능성 화장품으로 개발하고, 추후 농림산물을 원료로 하는 고부가가치 기능성 식품 및 의약품의 개발을 시도할 계획이다.

장내미생물에 의한 당분해작용

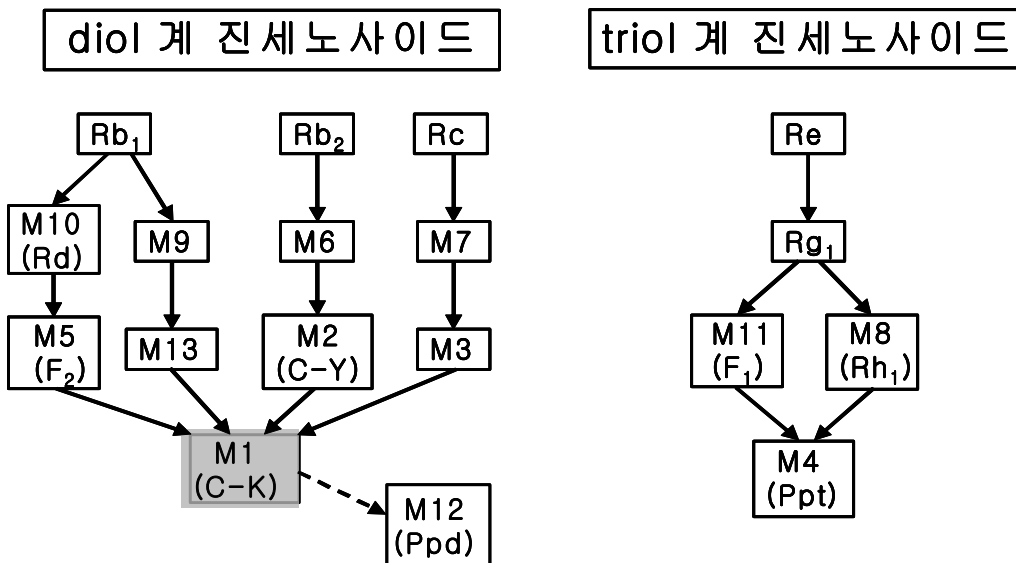
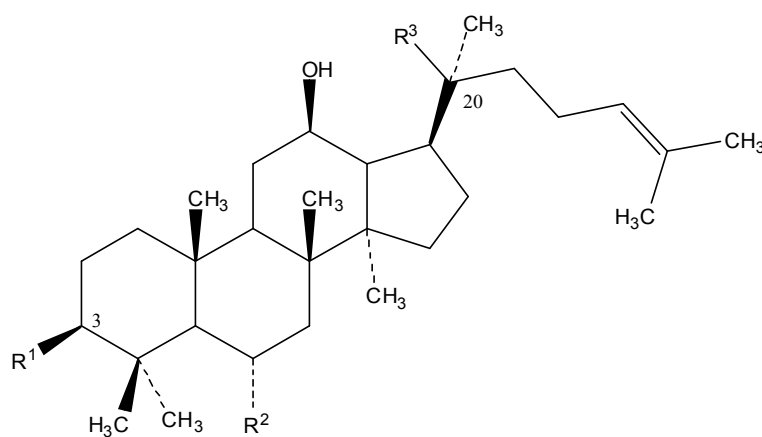


Figure 1. Putative metabolic pathways of ginsenosides in the body after oral administration.
Ppd; Protopanaxadiol aglycone, Ppt; Protopanaxatriol aglycone

Table 1. Chemical structures of ginsenosides and their metabolites formed by intestinal bacteria.⁴⁾



Ginsenosides			
Major ginsenosides			
20S-Protopanaxadiol type: Ppd	R ¹	R ²	R ³
Rb ₁	O-Glc ²⁻¹ Glc	H	O-Glc ⁶⁻¹ Glc
Rb ₂	O-Glc ²⁻¹ Glc	H	O-Glc ⁶⁻¹ Arap
Rc	O-Glc ²⁻¹ Glc	H	O-Glc ⁶⁻¹ Araf
Rd	O-Glc ²⁻¹ Glc	H	O-Glc
20S-Protopanaxatriol type: Ppt	R ¹	R ²	R ³
Re	OH	O-Glc ⁶⁻¹ Rha	O-Glc
Rg ₁	OH	O-Glc	O-Glc
Intestinal bacterial metabolites			
20S-Protopanaxadiol type: Ppd	R ¹	R ²	R ³
M10 (Rd)	O-Glc ²⁻¹ Glc	H	O-Glc
M9 (Gp-XVII)	O-Glc	H	O-Glc ⁶⁻¹ Glc
M7 (Mb)	O-Glc	H	O-Glc ⁶⁻¹ Araf
M6	O-Glc	H	O-Glc ⁶⁻¹ Arap
M13 (Gp-LXXV)	OH	H	O-Glc ⁶⁻¹ Glc
M5 (F ₂)	O-Glc	H	O-Glc
M3 (Mc)	OH	H	O-Glc ⁶⁻¹ Araf
M2 (C-Y)	OH	H	O-Glc ⁶⁻¹ Arap
M1 (C-K)	OH	H	O-Glc
M12 (aglycone)	OH	H	OH
20S-Protopanaxatriol type: Ppt	R ¹	R ²	R ³
M8 (Rh ₁)	OH	O-Glc	OH
M11 (Fi)	OH	OH	O-Glc
M4 (aglycone)	OH	OH	OH

제 2 절 연구개발의 목적 및 범위

1. Compound K를 비롯한 진세노사이드 대사체의 지방산 에스터 화합물의 개발
2. 지방산 에스터화 진세노사이드의 정제 및 구조 규명
3. 진세노사이드 대사체의 지방산 에스터 화합물의 대량생산
4. 주름억제효능 등의 기능성화장품 소재 개발 및 효능 및 안전성자료 확보
5. 피부생리활성 기능성 입증, 생체 흡수율, 생체 잔류기간 및 생체내 안정성이 우수한 지방산 에스터화 진세노사이드를 함유하는 기능성 화장품의 개발

제 2 장 국내외 기술개발 현황

대부분의 회사들은 단순 가공을 거쳐 비정제된 인삼제품 (엑기스 및 차, 인삼분말 캡슐, 홍삼 뿌리, 인삼첨가 드링크제)을 생산하고 있으나, 유효 인삼사포닌의 변형을 통한 대량생산을 할 수 있는 기술이 없다. 최근 들어 (주)아모레퍼시픽에서 EGCG와 함께 진세노사이드를 첨가한 화장품 개발을 추진하고 있는 등 유효 인삼사포닌 강화 제품들이 등장하고 있지만, 몇몇 성분의 소량 증가만을 유도하는 인삼을 단순 가공한 비정제된 제품들이 대부분인 실정이다.

최근 일부 국내 화장품연구소 (소망화장품, 코리아나)를 중심으로 ginsenoside Rg2, Rg3 등을 함유하는 화장품이 개발되어 생산되고 있고 (특히, KIPPIS 검색시스템), (주)아모레퍼시픽에서는 ginsenoside F1 또는 compound K를 함유하는 피부 외용제 개발하고 이들을 포함하는 화장품을 개발하고 있다는 언론 보도가 206년도 초에 있었다. 하지만 아직까지는 ginsenoside, 특히 활성형 ginsenoside 대사체에 대한 기초 대사연구와 피부활성에 미치는 영향 등에 대한 연구가 아직까지 미미한 실정이다. Compound K의 경우 다른 진세노사이드에 비하여 피부 흡수율이 4배가 높은 것으로 보고되고 있으나, 여전히 효율적으로 생체내로 흡수되기는 어려운 화학구조를 가지고 있어, 피부흡수율을 증대하기 위한 보조제를 화장품에 첨가하고 있는 실정이다

Ginsenoside는 우리나라에서 가장 활발히 연구되고 활용되고 있지만 최근 Proctor and Gamble (P&G)의 경우 ginsenoside-Rb1, Rb3, Rc, Rd, Re에 대한 특허 (IB2006052293, 2006.07.06)를 제출하는 등 해외에서도 ginsenoside를 기능성 식품 등으로 활용하기 위한 전문가들의 연구뿐만 아니라 일반인들의 인삼 관련 제품에 대한 관심이 조금씩 관찰되고 있는 상황임. 그러나 해외 시장에서는 중국의 한의학에 대한 인식, 일본과 한국과의 혼동 등의 이유로 인삼이 한국 고유의 브랜드로서 인정받지 못하고 있어 국내 인삼제품의 해외 시장 공략에 많은 어려움이 있다. 우리나라만의 독창적인 인삼을 활용할 수 있는 기술의 개발이 시급하다고 하겠다.

피부노화를 방지하고, 피부건강과 미용에 탁월한 효능을 지닌 소재를 함유한 제품의 경우 고가임에도 소비자들의 큰 관심을 받고 있어, 향후에도 이러한 시장은 지속적으로 발전할 것으로 전망되고 있음을 고려할 때, 인삼 ginsenoside 중 생체에서 활성을 지니고 흡수율이 강화된 고부가가치의 신규 활성형 유도체를 개발한다면 기능성 화장품의 새로운 시장을 개척할 것으로 기대할 수 있다. 또한 우리나라 인삼제품에 대한 세계적인 인식의 제고와 소비의 증가는 국내 인삼 재배농가의 소득증대는 물론 국민 건강 증진에도 많은 기여를 할 수 있을 것이다. 그러나 현재까지 국내외에서 진행된 피부생리관련 연구결과로는 compound K가 transformed human keratinocyte cell 에서 hyaluronan synthase 2 gene의 발현을 증가시킨다는 보고와 ginsenoside Rb1이 nitric oxide 형성을 억제하고, 가려움 동물모델에서 가려움을 완화효능이 있다는 결과만이 최근에 보고되고 있을 뿐으로, 점차 ginsenoside의 약리활성을 가지는 생체 내 대사체와 그 효능에 대한 관심이 점차 증가되기 시작되고 있는

상황이다.

국내는 물론 세계적으로도 단일 진세노사이드를 대량으로 생산하는 회사는 거의 없는 실정이다. 또한 compound K의 경우 국내 및 일본의 몇몇 연구소에서 생산이 가능하나 대량생산이 힘든 상황이다. 그러나 (주)비티진의 경우 본 연구책임자를 비롯한 여러 연구진과의 산학협력 등을 통하여 자체적으로 compound K를 비롯한 다양한 진세노사이드 대사체들을 대량 생산하여 정제할 수 있는 기술을 개발하였다. 그러나 경제성과 기능성이 더욱 향상된 다양한 신규의 진세노사이드 구조변환체를 개발할 수 있다면 세계적으로 독자적인 기술적 우위를 점유할 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 연구 수행 방법 및 연구 내용

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	연구 내용
고정화 lipase를 이용한 compound K의 지방산 에스터 화합물 합성 방법의 개발	유기용매에서 고정화 lipase를 이용한 에스터화 반응 (효소전환기술)	<ul style="list-style-type: none"> - Compound K와 oleic acid의 에스터화 반응 - Compound K와 palmitic acid의 에스터화 반응 - Compound K와 methyl palmitate의 에스터화 반응 - Compound K와 vinyl stearate의 에스터화 반응
고정화 lipase를 이용한 compound K와 lipoic acid의 에스터화 반응	유기용매에서 고정화 lipase를 이용한 에스터화 반응 (효소전환기술)	<ul style="list-style-type: none"> - Compound K와 lipoic acid의 에스터화 반응
새로운 반응 조건 탐색 및 다른 진세노사이드의 에스터 화합물의 개발	새로운 반응 조건 탐색 ginsenoside Rb1의 에스터화 반응 수행 (소량 반응)	<ul style="list-style-type: none"> - Ethyl acetate 유기용매에서 고정화 lipase GF를 이용한 compound K (1%)와 oleic acid의 에스터화 반응 - 2-methyl-2-butanol 유기용매에서 고정화 lipase GF를 이용한 Ginsenoside Rb1과 oleic acid의 에스터화 반응
고정화 lipase를 이용한 compound K의 지방산 에스터 화합물 생산을 위한 효소 반응의 최적화	유기용매에서 고정화 lipase를 이용한 에스터화 반응의 최적화 (전환율 및 반응 속도 증대): 소량 반응(효소전환기술)	<ul style="list-style-type: none"> - 최적의 지방산 종류와 첨가량 (octanoic acid, 6.4%(v/v)), 반응방법(stirring), 효소의 사용량(4%, w/v), 반응온도(65℃) 결정 - 최적 반응 유기용매의 선정: iso-octane:DMSO (31.25:1)
Compound K 지방산 에스터 화합물의 대량 생산	최적 효소반응 조건에서 고정화 lipase를 이용한 유기용매에서의 에스터화 반응(대량 생산)	<ul style="list-style-type: none"> - Iso-octane:DMSO (31.25:1) 유기용매에서 고정화 lipase GF를 이용한 compound K의 octanoic acid 에스터 화합물의 대량 생산
화학적 합성을 통한 진세노사이드 지방산 에스터 화합물 합성 방법의 개발	지방산과 EDC·HCl의 반응을 통해서 oleic acid에 좋은 leaving group 형성을 통한 coupling esterification	<ul style="list-style-type: none"> - Compound K와 oleic acid의 coupling 화학합성을 통한 에스터화 반응
Compound K와 에스터 화합물의 분석, 소량 정제법 확립	TLC, HPLC, LC-MS	<ul style="list-style-type: none"> - 효소 반응 및 화학합성 반응물의 분석 및 소량 정제
반응 생성물의 분리 정제 및 구조 분석 방법 확립	Solvent Extraction, TLC, HPLC, LC-MS, ¹ H-NMR, MALDI-MS	<ul style="list-style-type: none"> - 분리 정제 방법: Solvent Extraction, Prep TLC, Prep HPLC - 분석 방법: TLC, HPLC, LC-MS, ¹H-NMR, MALDI-MS - 반응 후 남은 Compound K 회수 방법 결정

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	연구 내용
<p>다양한 진세노사이드의 피부대사 활성화 평가: Compound K와 지방산 에스터 유도체의 피부 효능 비교실험</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 피부노화방지효능 평가 : 인체피부섬유아세포와 각질형성세포의 세포증식활성화 효능 평가 - 모발 성장 촉진 효과 평가 - 항염, 항알레르기 평가 	<ul style="list-style-type: none"> - Human fibroblasts (피부진피세포) 성장촉진 작용 평가 : collagen, elastin, TGF-β1 합성촉진 효과 파악 - Collagenase, elastinase활성억제력 평가 : 항산화 효능 평가 - Human dermal papilla (모유두세포) 활성화 평가 : 성장촉진 효능 평가 : 모발성장인자 조절제 연구 - Nitric oxide 형성 억제력 평가 - 쥐 대식세포에서 COX-2 활성억제력 평가 - 염증성 cytokine작용 억제력 - TNF-α, IL-8 등 알레르기 관련 인자 작용 조절능 평가
<p>진세노사이드 및 유도체의 피부대사 활성화 등 피부효능 평가 (타깃 기능성 화장품 설정을 통한 연구): <i>in vitro</i> assay 및 동물 실험을 통한 효능 검증</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Compound K 유도체의 피부생리 약리 활성 조사 : Mod. ComK_Up과 Down의 피부활성 효능평가를 통한 유효성분 규명 - 피부활성화제 및 피부재생촉진제 (상처치유제) 소재 후보 선정 연구 - 피부 미백효능 평가 연구 - 기존 Compound K와의 효능 비교를 통해 품질 개선 여부 조사 → 피부의 강화제, 주름억제제로 활용 가능 - 양모효능 평가 - 항염효능 평가 - 독성 감소효능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> - 사람피부섬유아세포활성화 평가 - Collagen 합성 촉진 및 분해 억제력 평가 - Extracellular matrix 강화 효능 평가 - TGF-β, fibronectin 합성 촉진 효과 평가 - Cell migration 촉진 효과 평가 - 멜라닌 생성억제 효능 평가 - 모유두세포 활성화 평가 - 모발 성장인자 (growth factors)에 미치는 영향 평가 - Nitric oxide 생성 억제력 평가 - OX-II 활성 억제능 평가 - 염증성 cytokine 유전자 발현 조절능 평가 - 세포독성평가 (MTT assay)
<p>Octanoyl Esterified Compound K (Compound K_Up 유도물질)의 피부생리활성 효능 및 안전성 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Octanoyl Esterified Compound K의 피부생리활성 효능 평가 - 화장품 소재로서의 안전성평가 (Safety) - 기능성화장품 제형 연구 	<ul style="list-style-type: none"> - 사람피부섬유아세포의 성장 촉진 효능 평가 - collagen 합성 촉진 효능 평가 (ELSIA, Western Blotting) - 세포내 intracellular signal transduction 작용 규명 - 안전성(Safety) 평가 : Eye irritation 평가 : Skin irritation 평가 : Cytotoxicity 평가 - 기초화장품(크림) 제형 개발

제 2 절 세부 연구 방법 및 연구 결과

1. 연구 방법

가. 시약 및 기기

진세노사이드인 compound K와 ginsenoside Rb1은 (주)비티진에서 구입 하였으며, 고정화 lipase 효소는 유기용매 내에서 안정성이 확인된 효소로서, lipase GF (CALB; *Candida antarctica* lipase B)는 (주)제노포커스로부터 제공받았고, Novozym 435 (*Candida antarctica* lipase B)는 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. 그리고 반응 기질인 지방산 octanoic acid, oleic acid와 유기용매인 tertiary-amyl alcohol (2-methyl-2-butanol), isooctane, hexane, acetone, DMSO(dimethyl sulfoxide), [BMIM]-[BF₄](1-butyl-4-methylimidazolium tetrafluoroborate)는 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. TLC는 MERCK사의 25 Cromatofolios AL TLC 20×20cm silica gel 60 F₂₅₄와 20 PLC plates 20×20cm silica gel 60 F₂₅₄ 0.5mm를 사용하였고, HPLC는 (주)휴텍스 제품을 사용하였고, ELSD detector는 AllTech 제품을 사용하였다. HPLC의 column은 Shodex사의 ES 50 4E 5 μ column를 사용하였다.

나. Lipases

Lipase는 1849년부터 알려져 온 효소로서,¹⁸⁾ 지질과 물의 현탁액의 상태에서 triglyceride의 ester 결합을 가수분해하여 glycerol과 지방산을 생성하는 효소를 총칭한다.¹⁹⁾ 이 효소는 동물의 췌액에서 처음으로 발견된 이래, 동물의 폐, 신장, 부신, 지방 조직, 태반 등과 밀이나 아주까리, 콩 등의 식물종자 내에 존재함이 밝혀졌으며, 곰팡이, 효모, 세균 등에 존재하는 미생물 lipase도 발견되어져 생물계 전반에 lipase가 널리 분포되어 있음이 확인되었다.²⁰⁾ Lipase는 화학적으로 제조된 라세미 에스터화 입체 선택적 가수분해 반응이나 유기용매 상에서 입체 선택적 에스터화 반응에 사용된다.²¹⁾ 이 중, 미생물성 lipase는 racemic 혼합물의 가수분해나 에스테르와 펩타이드의 합성, 지방산의 생산과 가수분해, 식품이나 세제 첨가제 등 응용범위가 매우 다양하여 미생물성 lipase의 공업적 이용에 관한 연구들이 활발한 진행중에 있으며, 현재 *Rhizopus delemar* lipase, *Candida cylindracea* lipase, *Candida parlipolytica* lipase 등은 공업적으로 생산되어지고 있다.²²⁾

Figure 2는 본 실험에서 사용한 lipase GF(CALB; *Candida antarctica* lipase B)의 활성부위를 나타내는 모델이다. 활성부위를 구성하는 아미노산 중 Histidine, Serine, Tryptophan이 효소의 촉매작용에 관여하는 것으로 알려져 있다(Figure 3).

다. 유기용매 내에서 lipase를 이용한 진세노사이드와 지방산의 에스터화 반응

효소를 촉매로 하는 반응은 화학적 반응에 비해 온화한 조건에서 특정 반응만을 유도할 수 있는 이점이 있다.²³⁾ 전통적으로 효소 반응은 주로 생체내의 환경과 비슷한 수용액에서 이루어졌으나, 최근 물이 거의 없는 유기용매 내에서도 효소의 촉매활성(catalytic activity)이 있는 것이 발견되면서 다양한 응용 가능성이 있어 최근 활발히 연구되고 있는 분야이다.

유기용매 내에서 효소 반응을 수행할 경우 반응 속도에 영향을 미치는 인자로는 반응 혼합물에 포함된 수분의 양,²⁴⁾ 반응의 매질로 쓰이는 유기용매,²⁵⁾ 그리고 담체 및 첨가제의

영향²⁶⁾ 등을 들 수 있다. 특히 수분의 양은 중요한 인자로서 효소활성을 위해서는 수분이 필수적이다. 그러나 필수적인 미량의 수분이 유기용매 내에 현탁된 효소 입자들을 서로 엉겨 붙게 만드는 효소 응집(enzyme aggregation)을 유도한다는 사실이 여러 논문에서 보고되고 있다.^{27,28)} 효소 응집은 유기용매 내에서의 효소 반응에서 소량의 수분에 의해 쉽게 일어날 수 있으며, 효소 입자의 표면적을 감소시켜 반응 속도를 떨어뜨린다.

본 연구는 유기용매 상에서 진세노사이드와 다양한 지방산의 lipase를 이용한 에스터화 반응을 주로 연구하였다. 최적의 반응을 위하여 에스터화 반응 조건의 변수 즉, 수분의 양, 반응의 매질로 쓰이는 유기용매의 종류, 반응 온도, 효소의 양 등에 관하여 연구하였다. 또한 화학합성 방법을 이용한 에스터화 반응도 시도하였다. Figure 3은 효소에 의한 compound K와 지방산의 예상 메커니즘을 나타낸 것이고 Figure 4는 반응 후 예상되는 생성물의 구조를 나타낸 것이다.

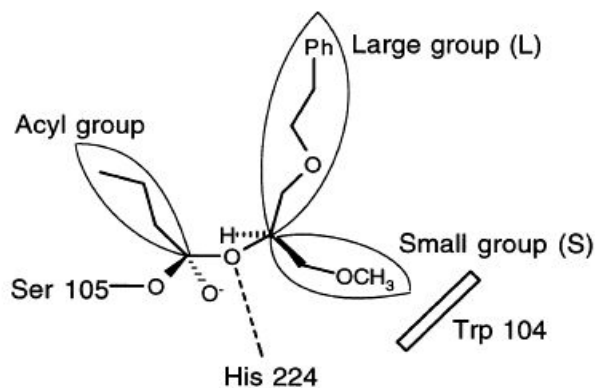


Figure 2. Model of the active site cleft of CALB.

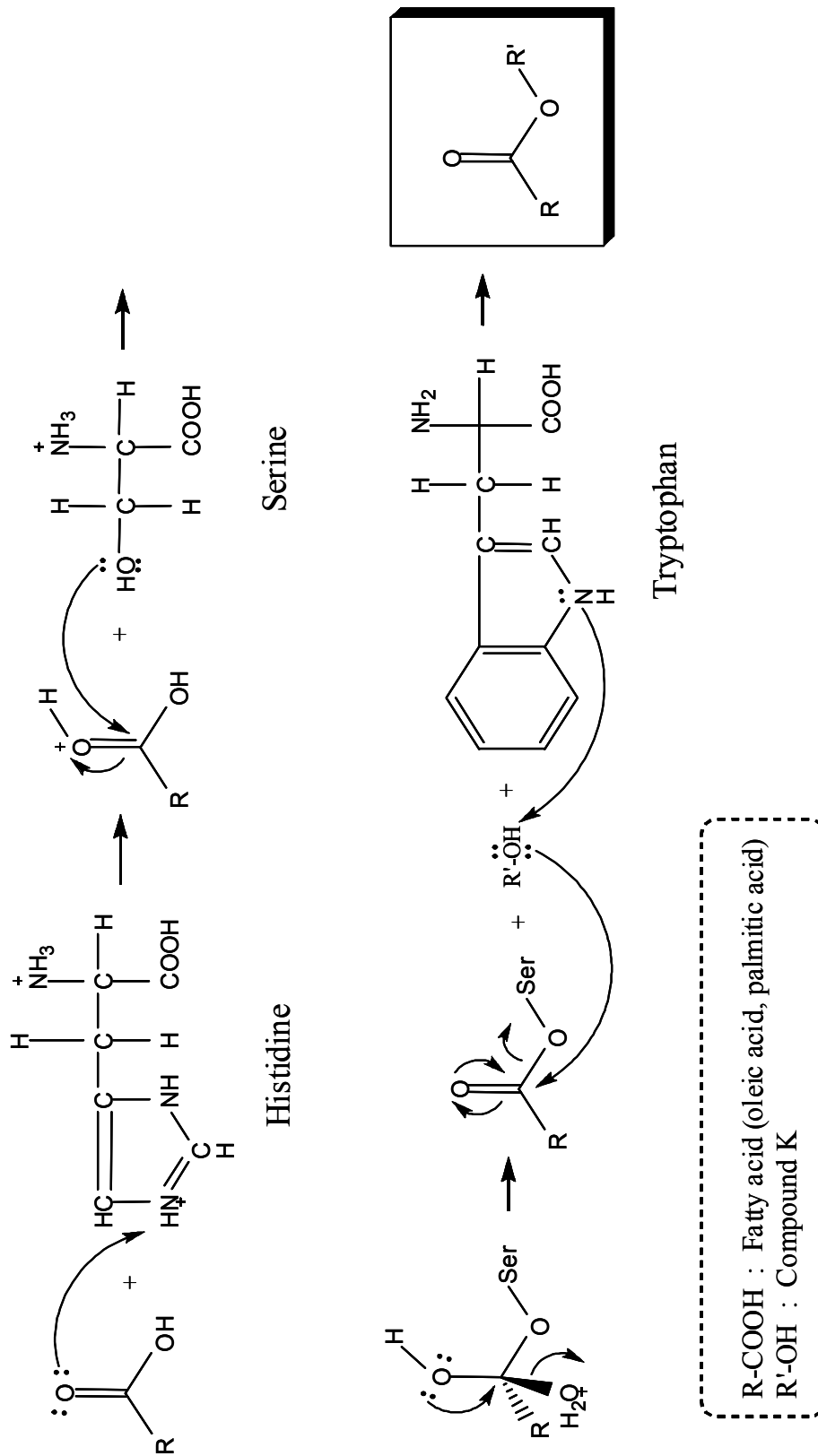


Figure 3. Putative mechanism of esterification using lipase.

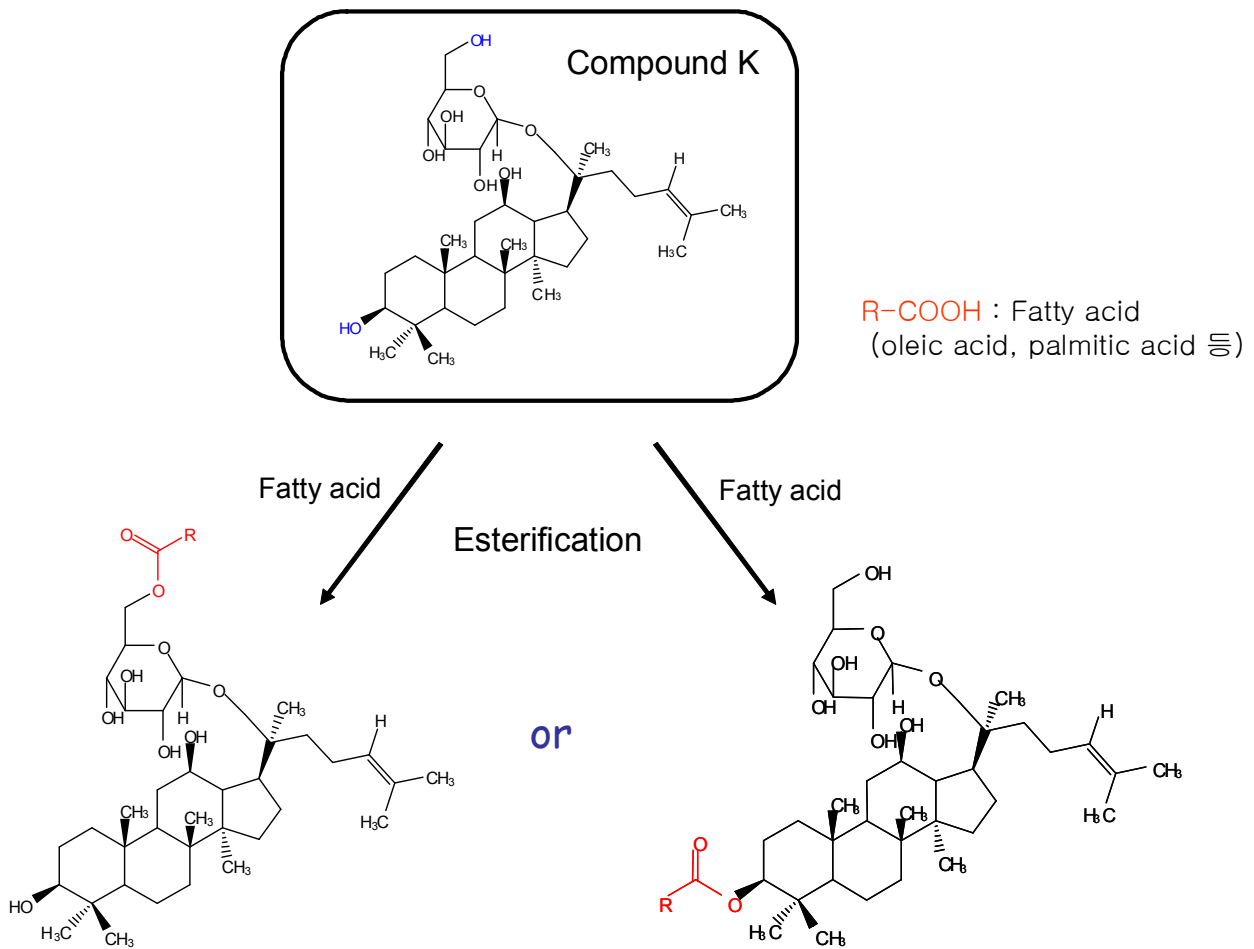


Figure 4. Expected chemical structures after esterification.

라. 실험방법

(1) 효소를 이용한 진세노사이드의 지방산 에스터 화합물 합성

(가) 기질의 종류 및 함량

진세노사이드인 compound K가 고가이기 때문에 반응을 시킬 때의 양을 0.2% (w/v)로 반응을 시켰다. Ginsenoside Rb1의 경우도 동일한 양을 사용하였다. TLC 분석은 문제가 없지만 HPLC로 분석을 할 때 농도가 너무 높으면 희석을 하여 HPLC 분석을 해야 하는데, 희석을 하면서 발생하는 오차를 줄이기 위해 농도가 높지 않은 0.2% (w/v)로 반응을 진행하였다.

(나) 반응 용매 선별

지방산과 compound K가 잘 용해될 뿐만 아니라, 지방산과 용매와의 에스터화 반응이 일어나지 않는 유기 용매인 tertiary-amyl alcohol (2-methyl-2-butanol)를 선택하였다.

(다) 효소의 종류 및 사용량

효소는 lipase CCL(lipase from *Candida cylindracea*), lipase GF [GF CalB(immobilized) (*Candida antarctica* lipase B)], lipase L2 [CHIRAZYME L2 carrier fixed(*Candida antarctica* lipase B)], lipase L9[CHIRAZYME L2 carrier fixed(*Mucor michei* lipase)] 중 최적의 용매로 선택한 2-methyl-2-butanol에서 예비 실험을 통하여 새로운 화합물 생성 정도가 용이한 (주)제노포커스로부터 제공 받은 lipase GF를 선택하여 사용하였다. 효소량은 새로운 화합물이 생기는 속도와 생성물의 양이 충분히 빠르고 많도록 20mg으로 정하여 사용하였다.

(라) 반응 혼합물 (기질, 효소 및 용매)의 전 처리

반응 기질인 compound K와 지방산, 그리고 효소는, 2일 동안 100°C 이상의 oven에서 건조시킨 silica를 바닥에 깔은 desiccator 안에서 진공 상태로 7일 동안 건조시켰다. 반응 매질인 유기용매에 존재하는 수분을 최대한 제거하기 위하여, 150°C drying oven에서 24시간 이상 활성화시킨 4Å molecular sieve를 용매 1ℓ 당 100g의 비율로 용매에 넣어준 후 실온에서 5일 이상 처리하였다.

(마) 2-methyl-2-butanol에서 compound K와 oleic acid (1.5%, v/v)의 에스터화 반응

(소량 반응)

20ml 들이 갈색의 screw-top glass vial 안에서 2-methyl-2-butanol 5ml에 compound K 10mg(0.2%, w/v)을 첨가하여 녹이고, oleic acid 75μl(1.5%, v/v)를 첨가하여 용해시킨 후 control로 사용하기 위하여 혼합용액 50μl를 sampling 하였다. 그 후 lipase GF 20mg(0.4%, w/v)을 첨가하여 50°C에서 200rpm의 조건으로 shaking incubator에서 교반시키며 반응시켰다. 반응 중 생성되는 수분을 최대한 제거하여 초기 반응을 촉진하기 위하여 반응을 시작한 지 24시간이 되었을 때 반응 혼합물에 4Å molecular sieve 100g/ℓ를 넣어주었다. 반응 진행 경과를 24시간 마다 glass pipette을 이용하여 반응 혼합물을 채취하여 TLC로 분석하였다. TLC의 전개 용매는 hexane:ethyl acetate (20:1)를 사용하였고, 10% H₂SO₄에 담근 후 약 250°C에서 가열하여 발색시켰다. 반응 혼합물을 원심분리한 후 여과하여 고정화 lipase 효소를 완전히 제거함으로써 반응을 종결시키고, rotary evaporator에서 반응 용매를 최대한 제거하여 보관하였다.

(바) 2-methyl-2-butanol에서 compound K와 oleic acid (3.0%, v/v)의 에스터화 반응

(소량 반응)

1.5% (v/v) oleic acid를 사용한 에스터화 반응과 동일하게 모든 반응 혼합물 (기질, 효소 및 용매)에 포함된 수분의 양을 최소화시켜 주기 위한 전처리를 수행하였다. 20ml 들이 갈색의 screw-top glass vial 안에서 2-methyl-2-butanol 5ml에 compound K 10mg(0.2%, w/v)을 첨가하여 용해시키고, oleic acid 150μl(3.0%, v/v)를 첨가하여 용해시킨 후 control로 50μl를 sampling 하였다. 그 후 lipase GF 20mg(0.4%, w/v)을 첨가하여 50°C, 200rpm의 조건으로

shaking incubator에서 교반시키며 반응시켰다. 반응을 시작한지 24시간이 되었을 때 반응 혼합물에 4Å molecular sieve 100g/ℓ를 넣어주었다. 반응 진행 과정은 24시간 마다 sampling을 하여 동일한 분석 조건에서 TLC로 분석하였다.

(사) 2-methyl-2-butanol에서 ginsenoside Rb1과 oleic acid의 에스터화 반응 (소량 반응)

20ml 들이 갈색의 screw-top glass vial 안에서 2-methyl-2-butanol 2.5ml에 ginsenoside Rb1 5mg(0.2%, w/v)을 첨가하여 60℃ 이상에서 2시간 정도 중탕시켜 녹이고, oleic acid 360μl(14.4%, v/v)를 첨가하여 용해시킨 후 control로 사용하기 위하여 혼합용액 50μl를 sampling 하였다 (ginsenoside Rb1:oleic acid (1:250 몰비 사용)). 그 후 lipase GF 100mg(4%, w/v)을 첨가하여 50℃에서 200rpm의 조건으로 shaking incubator에서 교반시키며 반응시켰다. 반응 중 생성되는 수분을 최대한 제거하여 초기 반응을 촉진하기 위하여 반응을 시작한지 24시간이 되었을 때 반응 혼합물에 4Å molecular sieve 100g/ℓ를 넣어주었다. 반응 진행 과정은 24시간 마다 glass pipette을 이용하여 반응 혼합물을 채취하여 TLC로 분석하였다. TLC의 전개 용매는 hexane:ethyl acetate (20:1)를 사용하였고, 10% H₂SO₄에 담근 후 약 250℃에서 가열하여 발색시켰다.

(아) 2-methyl-2-butanol에서 compound K와 lipoic acid (0.5%)의 에스터화 반응: Carboxylic acid group을 갖는 비타민류의 compound K 에스터 화합물 합성 (소량 반응)

Oleic acid를 사용한 에스터화 반응과 동일하게 모든 반응혼합물 (기질, 효소 및 용매)에 포함된 수분의 양을 최소화시켜 주기 위한 전처리를 수행하였다. 20ml 들이 갈색의 screw-top glass vial 안에서 2-methyl-2-butanol 5ml에 compound K 10mg (0.2%)을 첨가하여 용해시키고, lipoic acid 10mg (0.5%, w/v)를 첨가하여 용해시킨 후 control로 50μl를 sampling 하였다. 그 후 lipase GF 20mg (0.4%)을 첨가하여 50℃, 200rpm의 조건으로 shaking incubator에서 교반시키며 10일 동안 반응시켰다. 반응을 시작한지 24시간이 되었을 때 반응 혼합물에 4Å molecular sieve 100g/ℓ를 넣어주었다. 반응진행 과정은 24시간 마다 sampling을 하여 TLC로 분석하였다. TLC의 전개용매는 CHCl₃:CH₃OH:H₂O (10:2:0.3), CHCl₃:CH₃OH:H₂O (11:2:0.3), CHCl₃:CH₃OH:H₂O (13:2:0.3)을 사용하였다.

(2) 화학적 합성을 통한 진세노사이드 지방산 에스터 화합물 합성 방법의 개발: Compound K와 oleic acid의 coupling 화학합성을 통한 에스터화 반응

25ml 이구 등근플라스크를 Ar기체를 이용하여 fuzzy를 시킨 후 syringe를 이용하여 상온에서 methylene chloride에 녹인 oleic acid (5.2μl, 0.0163mmol)와 EDC·HCl (22mg, 0.114mmol)의 반응을 진행하였다 (Figure 5, 6). 10시간 후 syringe를 통해 반응혼합물 소량을 sampling 하여 evaporator로 농축한 후 1-2방울의 methylene chloride에 녹여 고농도의 반응혼합물을 TLC (silica gel 60 F₂₅₄ plate)로 분석하였다. TLC의 전개용매는 CHCl₃ (100%) 을 사용하였고, 10% H₂SO₄에 담근 후 약 250℃에서 가열하여 발색시켰다. TLC 분석을 통해 oleic acid 와 EDC·HCl 의 반응을 통해서 oleic acid의 대부분이 leaving group이 생성되었음을 확인한 후, compound K (2mg, 0.000328mmol), DMAP(0.3mg, 0.0025mmol) 를 넣어 상온에서 10일 동안 반응을 진행 하였다. 10일 동안 반응 후 TLC (silica gel 60 F₂₅₄ plate)를 통해 새로운 에스터 화합물 생성여부를 분석하였다. TLC의 전개용매는 hexane:ethyl acetate (15:1)

을 사용하였고, 10% H₂SO₄에 담근 후 약 250℃에서 가열하여 발색시켰다.

	M.W.	eq	
Oleic acid	282.47g/mol	1	0.0046g (5.2μl)
EDC · HCl	191.70g/mol	7	22mg
Compound K	610.23 g/mol	0.1 - 1	1mg - 10mg
DMAP	122.17 g/mol	0.15	0.298mg (=0.3mg)

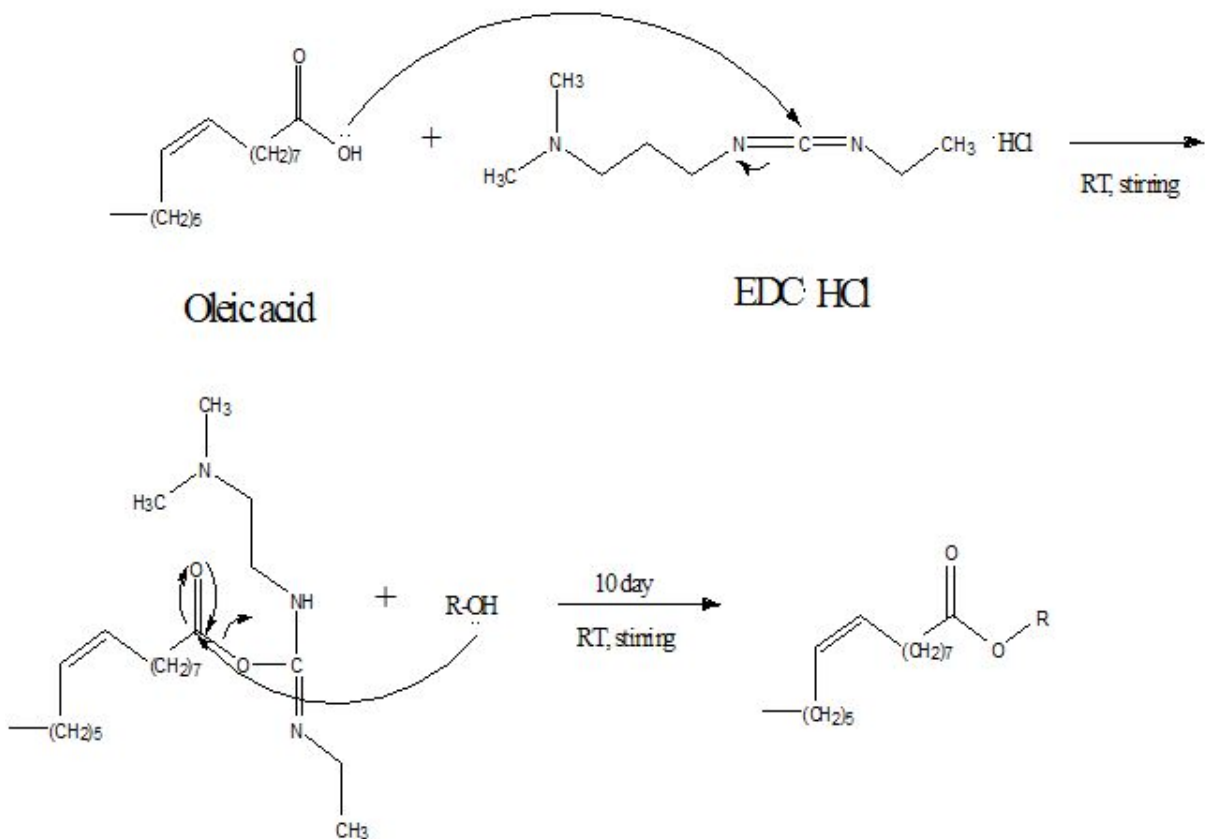


Figure 5. Putative mechanism of chemical esterification reaction between compound K and oleic acid.



Figure 6. Chemical reactor for esterification reaction between compound K and oleic acid.

(3) 효소를 이용한 진세노사이드의 지방산 에스터 화합물 합성 방법 최적화

(가) 기질의 종류 및 함량

Compound K는 다른 진세노사이드에 비해 용해도가 우수하며, 앞의 실험 진행 결과 지방산과의 에스터화 반응이 잘 진행되었기 때문에 지금 실험에서도 compound K를 주로 사용하여 효소 반응을 진행하였다. Compound K는 고가이기 때문에 반응을 시킬 때의 함량을 앞의 실험과 같이 0.2% (w/v)로 소량을 사용하였다. 그리고 compound K와 반응하는 지방산은 앞선 실험에서 선택한 지방산 (oleic acid)과 이중결합이 없으면서 체인 길이가 짧은 구조적 특성을 가지는 지방산인 octanoic acid를 선택하여 반응을 비교하였다. 지방산의 양은 앞의 실험 (0.5-3%, v/v)에 비해 상대적으로 많은 양 (6.4%, v/v)을 첨가 하였다.

(나) 반응 용매 선별

앞의 실험에서 진행한 유기용매 tertiary-amyl alcohol(2-methyl-2-butanol)에서 compound K의 지방산 에스터 화합물 합성 전환율을 더 높이기 위하여 유기용매를 [BMIM]-[BF₄]:acetone (1:1), hexane:DMSO (31.25:1), acetone, isooctane:DMSO (31.25:1)로 대체 하여 비교 하였다. 각각의 유기용매들은 지방산과의 에스터화 반응이 일어나지 않는다. 기질 중 하나인 compound K는 acetone에 잘 용해되지만, [BMIM]-[BF₄], hexane, isooctane에는 용해되지 않아 [BMIM]-[BF₄]에는 acetone을 hexane과 isooctane에는 DMSO를 각각 소량 섞어주었다. 넣어준 DMSO의 양은 유기용매의 3.2% (v/v)로 고정화 효소 lipase의 활성을 저해하지 않는 최소한의 양을 첨가하였다.

* [BMIM]-[BF₄](1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate): ionic liquid의 일종

(다) 효소의 종류 및 사용량

앞의 실험에서 최적의 효소로 선택한 lipase GF를 주로 사용하고, 전환율 개선을 위해서 Novozym 435를 추가 선택하여 비교 하였다. 앞의 실험에서 사용한 lipase GF의 첨가량 (0.4%, w/v)에 비해 10배 많은 lipase GF 4% (w/v)를 사용하였고, 추가로 구입하여 사용한 Novozym 435의 경우도 또한 4% (w/v)를 사용하였다.

(라) 반응 방법

앞의 실험에서는 shaking incubator에서 교반시키며 반응을 진행하였으나, 유기용매에서의 효소 반응 효율성 개선을 위하여 stirring을 이용하여 교반시키는 방법을 선택하여 비교하였다.

(마) 반응 온도

반응 온도는 효소활성을 고려하여 lipase GF의 경우에는 앞의 실험에서 진행한 반응 온도 50℃에서 65℃까지 올려 반응하였고, Novozym 435의 경우는 55℃에서 반응하였다.

(바) 반응 시간

Compound K가 상대적으로 충분한 양의 지방산과 반응하여 새로운 화합물이 형성되면서 줄어들기 때문에 compound K의 줄어드는 양이 현저히 관찰되는 마지막 시점인 4-5일 후 반응을 종결 하였다.



Figure 7. Stirred Enzyme reactor with immobilized lipase.

(사) [BMIM]-[BF₄]:acetone(1:1)에서 compound K와 octanoic acid의 에스터화 반응 (소량 반응)
4ml 들이 갈색의 screw-top glass vial 안에서, ionic liquid의 일종인 [BMIM]-[BF₄]의 용매 효과 (solvent effect)를 검토하였다. [BMIM]- [BF₄]:acetone (1:1) 0.5ml에 compound K 1mg (0.2%, w/v)을 첨가하여 녹이고, octanoic acid 32 μ l(6.4%, v/v)를 첨가하여 용해시킨 후 control로 사용하기 위하여 혼합용액 10 μ l를 sampling 하였다. 그 후 lipase GF 20mg (4%, w/v)을 첨가하여 65 $^{\circ}$ C에서 800rpm의 조건으로 stirring을 통해 교반시키며 반응시켰다 (Figure 7). 반응 중 생성되는 수분을 최대한 제거하여 초기 반응을 촉진하기위하여 반응을 시작할 때 반응 혼합물에 4 \AA molecular sieve 100g/ l 를 넣어주었다. 반응 진행 경과를 glass pipette을 이용하여 반응 혼합물을 채취하여 TLC로 분석하였다. TLC의 전개 용매는 hexane:ethyl acetate (30:1)를 사용하였고, 10% H₂SO₄에 담근 후 약 250 $^{\circ}$ C에서 가열하여 발색시켰다.

(아) Hexane:DMSO (31.25:1)에서 compound K와 octanoic acid의 에스터화 반응 (소량 반응)
4ml 들이 갈색의 screw-top glass vial 안에서 hexane:DMSO (31.25:1) 0.5ml에 compound K 1mg(0.2%, w/v)을 첨가하여 녹이고, octanoic acid 32 μ l(6.4%, v/v)를 첨가하여 용해시킨 후 control로 사용하기위하여 혼합용액 10 μ l를 sampling 하였다. 그 후 lipase GF 20mg(4%, w/v)을 첨가하여 65 $^{\circ}$ C에서 800rpm의 조건으로 stirring을 통해 교반시키며 반응시켰다. 반응 중 생성되는 수분을 최대한 제거하여 초기 반응을 촉진하기위하여 반응을 시작할 때 반응 혼합물에 4 \AA molecular sieve 100g/ l 를 넣어주었다. 반응 진행 경과를 glass pipette을

이용하여 반응 혼합물을 채취하여 TLC로 분석하였다. TLC의 전개 용매는 hexane:ethyl acetate (30:1)를 사용하였고, 10% H₂SO₄에 담근 후 약 250℃에서 가열하여 발색시켰다.

(자) Acetone에서 compound K와 octanoic acid의 에스터화 반응 (소량 반응)

4ml 들이 갈색의 screw-top glass vial 안에서 acetone 0.5ml에 compound K 1mg(0.2%, w/v)을 첨가하여 녹이고, octanoic acid 32 μ l (6.4%, v/v)를 첨가하여 용해시킨 후 control로 사용하기위하여 혼합용액 10 μ l를 sampling 하였다. 그 후 lipase GF 20mg(4%, w/v)을 첨가하여 65℃에서 800rpm의 조건으로 stirring을 통해 교반시키며 반응시켰다. 반응 중 생성되는 수분을 최대한 제거하여 초기 반응을 촉진하기위하여 반응을 시작할 때 반응 혼합물에 4Å molecular sieve 100g/l를 넣어주었다. 반응 진행 경과를 glass pipette을 이용하여 반응 혼합물을 채취하여 TLC로 분석하였다. TLC의 전개 용매는 hexane:ethyl acetate (30:1)를 사용하였고, 10% H₂SO₄에 담근 후 약 250℃에서 가열하여 발색시켰다.

(차) Isooctane:DMSO (31.25:1)에서 고정화 Novozym 435를 이용한 compound K와 octanoic acid의 에스터화 반응 (소량 반응)

4ml 들이 갈색의 screw-top glass vial 안에서 isooctane:DMSO (31.25:1) 0.5ml에 compound K 1mg(0.2%, w/v)을 첨가하여 녹이고, octanoic acid 32 μ l(6.4%, v/v)를 첨가하여 용해시킨 후 control로 사용하기위하여 혼합용액 10 μ l를 sampling 하였다. 그 후 Novozym 435 20mg(4%, v/v)을 첨가하여 50℃에서 800rpm의 조건으로 stirring을 통해 교반시키며 반응시켰다. 반응 중 생성되는 수분을 최대한 제거하여 초기 반응을 촉진하기위하여 반응을 시작할 때 반응 혼합물에 4Å molecular sieve 100g/l를 넣어주었다. 반응 진행 경과를 glass pipette을 이용하여 반응 혼합물을 채취하여 TLC로 분석하였다. TLC의 전개 용매는 hexane:ethyl acetate (30:1)를 사용하였고, 10% H₂SO₄에 담근 후 약 250℃에서 가열하여 발색시켰다.

(카) Isooctane:DMSO (31.25:1)에서 고정화 lipase GF를 이용한 compound K와 octanoic acid의 에스터화 반응 (소량 반응)

4ml 들이 갈색의 screw-top glass vial 안에서 isooctane:DMSO (31.25:1) 0.5ml에 compound K 1mg(0.2%, w/v)을 첨가하여 녹이고, octanoic acid 32 μ l(6.4%, v/v)를 첨가하여 용해시킨 후 control로 사용하기위하여 혼합용액 10 μ l를 sampling 하였다. 그 후 lipase GF 20mg(4%, v/v)을 첨가하여 65℃에서 800rpm의 조건으로 stirring을 통해 교반시키며 반응시켰다. 반응 중 생성되는 수분을 최대한 제거하여 초기 반응을 촉진하기위하여 반응을 시작할 때 반응 혼합물에 4Å molecular sieve 100g/l를 넣어주었다. 반응 진행 경과를 glass pipette을 이용하여 반응 혼합물을 채취하여 TLC로 분석하였다. TLC의 전개 용매는 hexane:ethyl acetate (30:1)를 사용하였고, 10% H₂SO₄에 담근 후 약 250℃에서 가열하여 발색시켰다.

(타) Isooctane:DMSO (31.25:1)에서 compound K와 octanoic acid의 에스터화 반응 (대량 반응)

앞의 실험에서 진행한 반응의 유기용매 tertiary-amyl alcohol (2-methyl-2-butanol), 지방산의 종류와 첨가량 (oleic acid, 1.5-3% (v/v)), 반응 방법 (shaking incubator), 효소의 사용량 (0.4%, w/v), 반응 온도 (50℃) 등의 인자들을 각각 유기용매 (isooctane:DMSO (31.25:1)), 지방산 종류와 첨가량 (octanoic acid, 6.4% (v/v)), 반응 방법 (stirring), 효소의

사용량 (4%, w/v), 반응 온도 (65°C)로 대체하여 다음과 같은 반응을 진행하였다. 사용한 기질의 몰 비는 compound K(0.2%, w/v):octanoic acid(6.4%, v/v) (1:125)이었다.

① Compound K와 octanoic acid의 에스터화 반응

8ml 들이 갈색의 screw-top glass vial 안에서 isoctane:DMSO (31.25:1) 2.5ml에 compound K 5mg(0.2%, w/v)을 첨가하여 녹이고, octanoic acid 160 μ l(6.4%, v/v)를 첨가하여 용해시켰다. 그 후 lipase GF 100mg(4%, v/v)을 첨가하여 65°C에서 1,150rpm의 조건으로 stirring을 통해 교반시키며 반응시켰다. 반응 중 생성되는 수분을 최대한 제거하여 초기 반응을 촉진하기위하여 반응을 시작할 때 반응 혼합물에 4Å molecular sieve 100g/l를 넣어주었다. 같은 조성 및 scale의 반응을 동시에 4개씩 2회 진행 하여 대량화 하였다. 반응 진행 과정은 glass pipette을 이용하여 반응 혼합물을 채취하여 TLC로 분석하였다. TLC의 전개 용매는 hexane:ethyl acetate (30:1)를 사용하였고, 10% H₂SO₄에 담근 후 약 250°C에서 가열하여 발색시켰다.

② Compound K 지방산 에스터 화합물의 분리 및 정제방법

반응물을 원심분리한 후 여과하여 고정화 lipase 효소를 완전히 제거함으로써 반응을 종결 시킨 혼합물에 methanol:iso-octane (1:1) 이 되도록 methanol을 첨가 하였다. 그리고 5-10분 동안 vortex를 한 후, 용액에 methanol : water (5:1) 이 되도록 water를 첨가하여 30-40분 동안 충분히 다시 vortex를 하였다 (Figure 8. 참조). 그 후 혼합용액에 생성된 두층을 원심 분리기를 이용해 분리하고 prep TLC를 통해 새로운 화합물을 정제하였다. TLC는 Merck 사의 25 Chromatofolios AL TLC 20×20cm silica gel 60 F₂₅₄ 0.5mm를 사용하였다. 그리고 prep한 물질을 iso-octane에 녹여 거름종이로 2-3회 반복하여 silica를 제거한 후 실린지 필터(PTFE 0.45 μ m)를 사용하여 정제 하였다. 정제된 용액은 고속감압 건조기로 용매를 최대한 제거하였다.

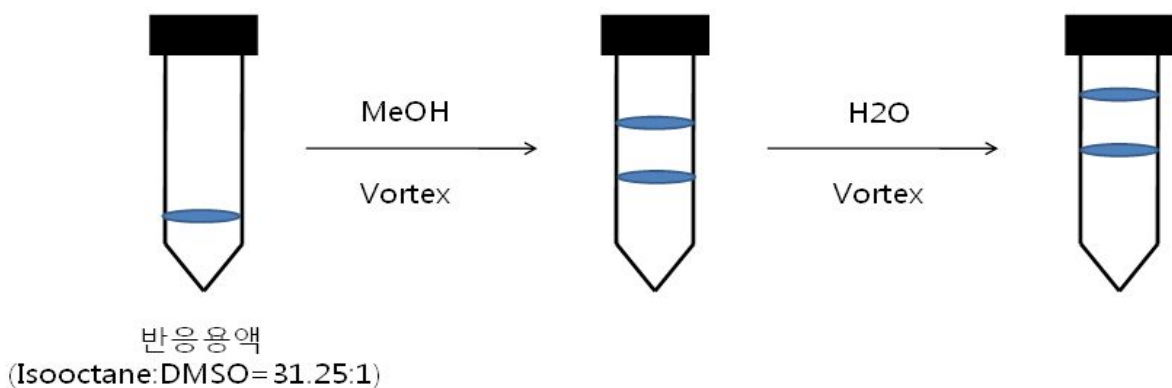


Figure 8. Solvent extraction method for fatty acyl compound K ester compounds produced by immobilized lipase.

③ 반응 후 남은 Compound K 회수 방법

반응 종결 시킨 혼합물을 rotary evaporator에서 반응 용매를 최대한 제거하여 methanol: iso-octane (1:1)을 첨가 하였다. 그리고 5-10분 동안 vortex를 한 후, 용액에 methanol:water (5:1)이 되도록 water를 첨가하여 30-40분 동안 충분히 다시 vortex를 하였다. 그 후 혼합용액에 생성된 두층을 원심 분리기를 이용해 분리하고 TLC prep을 통해 compound K를 고 순도화 하였다. TLC는 Merck 사의 25 Chromatofolios AL TLC 20×20cm silica gel 60 F₂₅₄ 0.25mm를 사용하였고, 전개용매를 CHCl₃:CH₃OH:H₂O (13:2:0.3)을 사용하여 전개하였다. 그리고 prep한 물질을 methanol에 녹여 거름종이로 2-3회 반복하여 silica를 제거한 후 실린지 필터 (PTFE 0.45μm)를 사용하여 정제 하였다. 정제된 용액은 고속감압 건조기로 용매를 최대한 제거하였다.

④ HPLC를 이용한 에스터 화합물의 분리 및 정제

반응물을 원심분리한 후 실린지 필터 (PTFE 0.45μm)를 이용하여 정제하여 고정화 lipase 효소를 완전히 제거함으로써 반응을 종결 시킨 혼합물을 HPLC를 이용하여 분리, 정제하였다. 1차적으로 새로운 에스터 화합물로 추정된 2가지 형태를 모두 합쳐 분리 정제 하였고, 이들의 일부를 이용하여 다시 두 가지 분획으로 나누어 분리 정제하였다. HPLC는 (주)휴텍스 제품 (NS-3000i)을 사용하여 다음 조건으로 분석하였다.

㉠ Column: Shodex Carbohydrate ES 50 4E 5μ

㉡ Mobile phase (A: Acetonitrile, B: water)

㉢ Detector: UV(203nm), ELSD (gas: 2.2 l /min, Temperature: 92°C, gain:1)

㉣ Condition of HPLC analysis

Time(min)	Flow rate	%A	%B
Initial	0.8	75.0	25.0
30.00	0.8	75.0	25.0

⑤ 분리한 에스터 화합물의 LC-MS, MS/MS, ¹H-NMR 분석

HPLC를 통하여 분리 정제한 두 개의 분획에 포함된 화합물을 한밭대학교 공동실험실습관에 LC-MS 및 MS/MS를 의뢰하여 Waters의 액체 크로마토그래피 탄뎀 질량분석기 (Micromass quattro premier XE)를 이용해 아래 조건으로 분석하였다. 그리고 생성물의 구조는 대전 바이오 벤처타운 제품 (inova 600)의 ¹H-NMR spectrum Varian Mercury 400Hz를 사용하여 확인하였다.

㉠ Column: Waters Acquity uplc C18 1.7μl (2.1mm * 100mm)

㉡ Mobile phase

A: 5mmol Ammonium acetate

B: 100% Acetonitrile

㉢ MS mode: ESI positive mode

㉣ Time of HPLC-MS analysis: 30min

㉤ Injection volume: 2μl

㉥ Gradient condition of LC-MS analysis

Time(min)	Flow rate	%A	%B
Initial	0.3	80.0	20.0
0.10	0.3	80.0	20.0
24.00	0.3	5.0	95.0
25.00	0.3	0.0	100.0
25.10	0.3	80.0	20.0
30.00	0.3	80.0	20.0

(4) 실험물질의 피부, 모발 활성화 평가

(가) 피부 주름억제, ECM강화, 미백, 모발 성장 촉진 효능 평가

① 실험농도 설정을 위한 세포독성 평가

Human skin fibroblast cell을 이용해 세포독성을 평가하였다. 10% Fetal bovine serum (FBS)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM)으로 전 배양한 세포를 96 well plate에 10^5 cells/ml의 농도로 가하고 CO₂ incubator에서 18시간 배양하였다. 배지를 제거하고 FBS가 첨가되지 않은 배지에 희석한 시료를 가하고 24시간 배양시킨 후, 3-(4,5-dimethylthiazol)-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 용액을 $1\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 가하여 37°C에서 3시간 반응시켰다. 미반응된 MTT를 제거하고 DMSO $100\mu\text{l}$ 를 가해 형성된 반응물을 용해시키고, ELISA reader로 540nm에서의 흡광도를 측정해 평가하였다.

② 세포성장 촉진 효능 평가

[³H]Thymidine uptake 시험법을 이용해 평가하였다. 10% FBS가 첨된 DMEM으로 전 배양한 human fibroblast cell (혹은 dermal papilla cell)을 6 well plate에 10^4 cells/ml의 농도로 seeding하고, CO₂ incubator에서 18시간 배양하였다. 배지를 제거하고 FBS가 첨가되지 않은 배지 희석한 시료와 [³H]thymidine를 첨가하고 48시간 배양시킨 후 세포성장 촉진 정도를 scintillation counter를 이용해 평가하였다.

③ Collagen, Elastin 합성 촉진 효능 평가 (Western blot)

10% FBS가 첨가된 DMEM으로 전 배양한 human fibroblast cell을 60mm tissue culture dish에 2×10^4 cells/ml의 농도로 seeding하고 CO₂ incubator에서 18시간 배양하였다. 배지를 제거하고, FBS가 첨가되지 않은 배지를 첨가한 후 24시간 starvation 시킨 후, FBS가 첨가되지 않은 배지에 희석한 시료를 첨가하고 30분 혹은 48시간 배양하였다. Proprep을 가해 세포를 용해시킨 후 SDS-PAGE 전기영동, PVDF membrane transfer를 실시하였다. Collagen type 1 α 1과 2, elastin antibody (Santa Cruz Biotechnologies, 미국), Total-p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), phospho-p38 MAPK, total-p42/44 extracellular signal-regulated kinase (ERK), phospho-p42/44 ERK, total-AKT, Phospho-AKT, total-cAMP response element-binding (CREB) and Phospho-CREB antibody (Cell Signaling Technology, 미국)을

가하여 4°C에서 18시간 반응, peroxidase-conjugated secondary antibody와 반응 등을 통해 최종적인 실험결과물을 얻었다.

④ Collagen 합성 촉진 효능 평가 (ELSIA)

10% FBS가 첨된 DMEM으로 전 배양한 사람의 피부 섬유아세포(human fibroblast cell)를 24 well plate에 2×10^4 cells/ml의 농도로 seeding하고 CO₂ incubator (37°C, 5% CO₂)에서 18시간 배양하였다. 배지를 제거하고, FBS가 첨가되지 않은 배지에 희석한 시료를 첨가하여 48시간 배양시킨 후, 배양액을 취해 collagen 정량 분석을 실시하였다. Collagen 합성 촉진 효능 평가는 Procollagen type 1 EIA kit (TakaRa, 일본)를 사용하였다.

⑤ Wnt/ β -catenin signaling cascade

모유두세포가 80%정도 성장했을 때 TCF-binding consensus sequence을 지닌 pTOPFLASH-luc reporter adenovirus을 가하고 8시간 배양한 후, 24well plate에 seeding하여 overnight하였다. FBS가 들어가지 않은 배지에 희석한 시료를 가하고 24hr후 상층액을 취하여 luciferase activities를 ELISA (Promega, 미국) 법으로 실시하였다.

⑥ Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

전 배양한 피부섬유아세포를 100mm tissue culture dish에 2×10^4 cell/ml의 농도로 분주하여 24시간 배양한 후, 성장배지를 제거하고 유지배지에 실험물질을 첨가하여 18시간 배양하였다. Easy blue (Intron, 한국)를 사용해 total RNA를 분리하고 M-MLV reverse transcriptase (Promega, 미국)를 활용한 역전사 (reverse-transcription) 과정을 통해 cDNA을 제조한 후, polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. PCR에 사용한 primer의 조성은 FGF-1 forward (5'→3') AGCCACAGAGC CTGAATTT, reverse (5'→3') CAGGAAGGACAAAAGG GAGC; KGF forward(5'→3') ACACA CAACGGAGGGGAAAT, reverse (5'→3') GCCATAGG AAGAAAGTG GGC; TGF- β 1 forward (5'→3') CATCAACGGGTTCACTACCG, reverse(5'→3') CCACGTAGTACACGATGGGC; G3PDH forward (5'→3') AACTGGAACGGTGAAGGTG, reverse (5'→3') CTCAAGTTGGGG GACAAAAA 등 이었다.

⑦ Collagenase 활성억제력 평가

EnzCheck Gelatinase/Collagenase assay kit (Invitrogen E12055)를 사용하였으며, substrate로는 DQTM collagen, type 1 from bovine skin, fluorescein conjugate을 이용하여 측정하였다. 즉, 96well plate에 reaction buffer 150 μ l, 시료 20 μ l, collagenase (10units/ml) 20 μ l, 그리고 collagen type 1 (100 μ g/ml) 10 μ l를 가하여 잘 섞어준 후, 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 실험결과는 fluorescence microplate reader를 이용해 495/515nm 에서 측정하였으며, 양성 대조군으로는 1,10-phenanthroline, monohydrate을 사용하였다.

⑧ Elastase 활성억제력 평가

EnzCheck Elastase assay kit (In Vitrogen E12056)를 사용하였으며, substrate로는 DQTM elastin, from bovine neck ligament, fluorescein conjugate을 이용해 평가하였다. 즉 96well plate에 reaction buffer를 110 μ l, 시료 20 μ l, elastase (1units/ml) 50 μ l, 그리고 elastin

(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 30 μl 을 가하여 잘 섞어준 후, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간동안 반응시키고, fluorescence microplate reader를 활용해 505/515nm에서 실험결과를 측정하였다. 양성대조군으로는 N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val- chloromethylketone을 사용하였다.

⑨ TGF- β 1, fibronectin 활성화 효능 평가

10% FBS가 첨된 DMEM으로 전 배양한 사람의 피부 섬유아세포(human fibroblast cell)를 24 well plate에 2X10⁴cells/ml의 농도로 seeding하고 CO₂ incubator (37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂)에서 18시간 배양하였다. 배지를 제거하고, FBS가 첨가되지 않은 배지에 희석한 시료를 첨가하여 48시간 배양시킨 후, 배양액을 취해 EIA kit (TakaRa, 일본) TGF- β 1, fibronectin 정량 분석을 실시하였다.

⑩ 항산화력 평가

항산화력은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hyrazyl)법을 이용해 평가하였다. 무수에탄올로 희석한 실험물질 1ml에 0.1mM DPPH용액 1ml을 가하고, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 반응시킨 후, 반응물의 흡광도를 spectrophotometer를 이용해 516nm에서 측정하였다. 양성대조군으로는 butylated hydroxytoluene (BHT)을, 음성대조군으로는 무수에탄올을 사용하였다.

(나) 염증 및 알레르기 억제물질 평가

① Nitric oxide (NO) 형성 억제력 평가

RAW 264.7 세포주 (ATCC number: CRL-2278)를 이용한 GRIESS 법으로 NO 형성억제력 실험을 실시하였다. 10% FCS가 첨가된 DMEM으로 전 배양한 RAW 264.7 cell을 24 well plate에 1X10⁵cells/ml의 농도로 seeding하여 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배지를 제거하고 인산염완충용액으로 2회 세척한 후, phenol red가 첨가되지 않은 DMEM 배지에 희석한 실험물질을 가하여 1시간 동안 처리하였다. Lipopolysaccharide를 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 가하여 24시간 배양한 후, 상층액을 100 μl 씩 취해 96 well plate에 옮기고, GRIESS reagent를 100 μl 씩 가해 상온에서 5분간 반응시키고, ELISA reader로 540nm에서의 흡광도를 측정하였다.

② 피부염증성인자 유전자 발현 억제력 평가

RAW 264.7 세포를 1X10⁵ cells/ml의 농도로 60mm 세포배양용기에 넣어 80% 정도까지 성장할 때까지 배양한 후, Phenol red가 첨가되지 않은 DMEM에 희석한 실험물질을 가하여 3시간동안 처리하였다. 이때 대조군으로는 70% ethanol을 사용하였다. Trisol을 사용해 total RNA 분리한 후, 분리한 total RNA 4 μg 를 eppendorf tube에 넣고 random hexamer (10pmol/20 μl)를 첨가하여 65 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 반응시킨 후 얼음물에 넣어 RNA의 이차구조를 풀어주었다. 여기에 반응액 (1X buffer, 100 μM dNTPs, 200unit RTase)을 가하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 반응시킨 후, 65 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 처리하여 reverse transcription 반응을 종료시켰다. Polymerase chain reaction은 PCR tube에 상기한 RT반응액과 PCR반응액 (PCR buffer, 200 μM dNTPs, primer 20pmol, Taq polymerase 2.5 units)을 가하여 PCR machine에서 94 $^{\circ}\text{C}$ 30초,

60℃ 1분, 72℃ 1분의 조건으로 30회씩 증폭하였다. 이때 PCR반응에 사용된 primer들의 염기서열은 IL-1 β sense TCTTTGAAGTTGACGGACCC, anti-sense AGGCCACAGGTATT TTGTCG; IL-6 sense CCGGAGAGGAGACTTCACAG, anti-sense TGGTCT TGGTCCTTAGC CAC; TNF- α sense AGTTCTATGGCCCAGACCCT, anti-sense CGGACTCCGCAAAGTCTAAG 이었다. RT-PCR 결과는 1.5% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색한 후, UV illuminator 위에서 polaroid camera를 이용해 사진 촬영하였으며, 그 결과는 densitometer를 이용해 판정하였다.

③ COX-II 활성억제력 평가

96 well plate에 RAW 264.7 세포주를 10⁵ cell/well의 농도로 seeding하고 37℃, 5% CO₂ incubator에서 4시간 배양하여 부착시켰다. 배양액을 제거하고, PBS로 세척한 후, 대식세포를 활성화시키는 lipopolysaccharide(1 μ g/ml)와 실험물질을 첨가하고 37℃, 5% CO₂ incubator에서 18시간 배양한 후, 상층액을 취해 ELISA Kit를 이용해 prostaglandin E2를 정량하였다.

(다) OECK의 안전성 (Safety) 평가

① 안자극성 (Eye Irritation) 평가

OECD guideline for testing of chemicals 중에서 "Acute Eye Irritation/Corrosion" 에 준하여 실시하였다. 즉 시험물질에 대하여 3마리의 토끼(New Zealand White Rabbit, 2-3kg)를 사용하였으며, 시험개시 24시간 전에 안검사를 통해 안점막에 자극이 없는 동물을 사용하였다. 제품에 사용되는 OECK의 최대농도가 0.05%인 점을 고려하여 20배 수준인 1%를 실험농도를 설정하였으며, 화장품에 적용할 소재이므로 화장품처방에서 널리 사용되는 용매인 1,3-butylene glycol에 실험물질을 용해시켜 사용하였다. 본 실험에서 시험물질을 토끼의 우측 눈에 개체 당 0.1ml 씩 점안하였다. 이때 각 동물의 아래 눈꺼풀을 안구로 부터 멀리 당겨 컵모양을 형성시키고, 이 결막낭(conjunctival sac)에 시료 0.1ml 점안하고 약 1초간 눈을 감은 상태로 유지시켜 검체의 손실을 방지하였다. 3마리 모두 세안하지 않고 그대로 방치하였다. 시험물질을 투여하지 않은 좌측 눈을 대조측으로 하여 시험물질 투여 후 1, 24, 48, 72시간에 임상증상 및 안구에 나타나는 반응을 평가표 (첨부 1, 2)에 따라 관찰/평가 하였다.

[첨부1] 안구병변 등급표

(1) 각 막

(A) 혼탁 : 안구의 농후한 정도 (가장 농후한 지점을 관찰함)

- 화농이나 혼탁이 없음 0
- 혼탁이 분산 혹은 밀집되어 있음 (정상적인 투명성이 약간 둔화된 것과는 다름)
 홍채의 말단이 명확히 관찰됨 1
- 반투명한 부분이 쉽게 관측됨, 홍채의 말단이 약간 불명확함 2
- 진주 색깔을 나타냄, 홍채의 말단이 관찰 안됨,
 동공의 크기가 가까스로 관측됨 3
- 각막이 불투명, 혼탁 때문에 홍채가 관찰 안됨 4

(B) 혼탁된 각막의 범위

- 1/4 이하 (그러나 0은 아니다) 1
 - 1/4 이상 1/2 미만 2
 - 1/2 이상 3/4 미만 3
 - 1/4 이상 1까지 4
- A×B×5, 최대치= 80

(2) 홍 채

(A) 반응치

- 정상 0
 - 현저한 주름의 형성, 충혈, 종창, 각막 주위에 중등도의 충혈, 이상과 같은 단독
 혹은 혼합, 홍채는 빛에 대해 반응함 (둔한 반응은 양성) 1
 - 빛에 대해 반응 없음. 출혈, 대부분 파괴
 (이상과 같은 증상의 일부 혹은 전부) 2
- A×5, 최대치=10

(3) 결 막

(A) 발적 (안검결막, 안구결막에 한함. 각막, 홍채 제외)

- 혈관은 정상 0
- 몇몇 혈관은 명확히 충혈 1
- 넓은 심홍색 색조, 각각의 혈관은 쉽게 관찰 안됨 2
- 얇은 선홍색 3

(B) 결막 부종

- 부풀지 않음 0
- 정상보다 약간 종창 (순막 포함) 1
- 안검의 부분적 외전을 동반한 현저한 종창 2
- 눈이 반쯤 감길 정도의 안검의 종창 3
- 눈이 반 이상 감길 정도의 안검의 종창 4

(C) 배출물

- 배출물 없음 1
 - 약간의 배출물 (정상동물의 내부 눈꼬리에서 관찰되는 작은 양 제외) 2
 - 속눈썹과 눈꺼풀을 적시는 배출물 3
 - 눈주위의 상당 부위와 속눈썹과 눈꺼풀을 적시는 배출물 4
- 점수 (A+B+C)×2 최대치=20
-

[첨부2] 안점막 자극 판정표

평가점수	Tentative Ocular irritation rating
0 ~ 5	무자극물
5 ~ 15	경도자극물
15 ~ 30	자극물
30 ~ 60	중등도자극물
60 ~ 80	중강도자극물
80 ~ 110	강도자극물

② OECK의 피부자극성 평가

㉠ 시험목적

시험물질 Octanoyl Esterified Compound K가 화장품 소재로 활용되기 위해 요구되는 피부자극성 평가를 위해 실시하였다.

㉡ 시험방법

본 시험은 OECD guideline for testing of chemicals 중에서 "Acute Dermal Irritation/Corrosion" 에 준하여 실시하였다. 즉 시험물질에 대하여 3마리의 토끼(New Zealand White Rabbit, 2-3kg)를 사용하였으며, 시험개시 24시간 전에 시험개시 24시간 전에 등의 털을 깎았다. 제품에 사용되는 OECK의 최대농도가 0.05%인 점을 고려하여 20배 수준인 1%를 실험농도를 설정하였으며, 화장품에 적용할 소재이므로 화장품처방에서 널리 사용되는 용매인 1,3-butylene glycol에 시험물질을 용해시켜 사용하였다. 시험 당일 토끼의 등을 좌/우로 나누어 대조구획(1,3-butylene glycol 투여)과 시험구획(OECK 1% in 1,3-butylene glycol)으로 구분하였다. 가로x세로, 각각 2.5X2.5cm의 구획을 그린 후 시험물질을 0.5ml씩 도포한 후, 1, 24, 48, 72시간 후에 홍반 및 가피 형성, 부종의 유무를 관찰하였다 (첨부 3).

[첨부 3] 피부 반응의 평가

(1) 홍반과 가피형성

홍반이 전혀 없음	0
아주 가벼운 홍반(육안으로 겨우 식별할 정도)	1
분명한 홍반.....	2
약간 심한 홍반.....	3
심한 홍반(홍당무색의 발적)과 가벼운 정도의 가피.....	4
총 가능한 홍반 점수 : 4점	

(2) 부종 형성

부종이 전혀 없음.....	0
아주 가벼운 부종(육안으로 겨우 식별할 정도)	1

가벼운 부종(뚜렷하게 부어올라서 변연부가 분명히 구별될 경우)	2
보통의 부종(약 1mm정도 부어올랐을 경우)	3
심한 부종(1mm이상 부어오르고 노출부위 밖에까지 확장된 상태)	4
총 가능한 부종 점수 : 4점	

[첨부 4] 피부 자극 판정표

평가점수	Tentative Ocular irritation rating
0 ~ 2	약한 자극물
3 ~ 5	중등도의 자극 물질
6 ~ 8	강한 자극물

2. 연구 결과

가. 효소를 이용한 진세노사이드의 지방산 에스터 화합물 합성 (소량 반응)

(1) 2-methyl-2-butanol에서 compound K와 oleic acid (1.5%, v/v)의 에스터화 반응

13일 동안 반응을 수행하면서 1일 간격으로 sampling한 반응 혼합물을 control과 함께 전개 용매를 hexane:ethyl acetate (20:1)을 사용하여 TLC를 전개하였고, 10% H₂SO₄에 담근 후 약 250℃에서 가열하여 발색시켰다(Figure 9). 새로운 에스터 화합물 spot은 반응 후 1일부터 관찰되기 시작하여 반응 후 216시간부터는 생성된 에스터 화합물의 양이 늘어나면서 3개 정도의 spot이 관찰되었다. 이는 반응이 진행됨에 따라 2차 알코올 작용기에도 에스터화 반응이 일어난 화합물이 형성된 결과로 추정된다.

(2) 2-methyl-2-butanol에서 compound K와 oleic acid (3.0%, v/v)의 에스터화 반응

11일 동안 반응을 수행하면서 1일 간격으로 sampling한 반응 혼합물을 control과 함께 동일한 분석 조건에서 TLC로 분석하였다(Figure 10). 새로운 에스터 화합물로 추정되는 spot은 반응 후 1일부터 관찰되었고 oleic acid (1.5%, v/v)의 1일 반응 양보다 많은 양의 에스터 화합물이 생성되었음을 알 수 있다. 96시간부터는 생성된 에스터 화합물의 양이 현저히 늘어나지는 않았지만, 2개 정도의 spot이 관찰 되었다. 이는 반응이 진행됨에 따라 2차 알코올 작용기에도 에스터화 반응이 일어난 화합물이 형성된 결과로 추정된다.

(3) 2-methyl-2-butanol에서 ginsenoside Rb1 과 oleic acid의 에스터화 반응

기질의 사용 비는 ginsenoside Rb1:oleic acid (몰 비, 1:250)이었다. 4일 동안 반응을

수행하면서 1일 간격으로 sampling한 반응 혼합물을 control과 함께 전개 용매를 hexane:ethyl acetate (20:1)을 사용하여 TLC를 전개하였고, 10% H₂SO₄에 담근 후 약 250℃에서 가열하여 발색시켰다(Figure 11). 새로운 에스터 화합물 spot은 반응 후 1일부터 관찰되기 시작하여 4일 후까지 관찰되었으나 반응이 진행됨에 따라 남아있는 지방산의 양이 줄어드는 양이 현저하게 관찰되지는 않았다. 형성된 새로운 에스터 화합물은 지방산의 바로 위에 조그만 단일 spot으로 추정되고 TLC 분석으로 전환율을 정확히 추정 할 수는 없지만 반응 시간이 길어짐에 따라 뚜렷이 더 많은 양이 형성되지는 않았다. 그리고 ginsenoside Rb1이 compound K에 비해 용해도가 더 낮은 문제 또한 고려해볼 필요성이 있었다.

(4) 고정화 lipase를 이용한 compound K와 lipoic acid (0.5%, w/v)의 에스터화 반응

연구개발계획서에는 제시하지 않은 내용이나, carboxylic acid 를 갖고 있는 비타민류 (lipoic acid, biotin, pantothenic acid, niacin) 중에서 항산화 활성 등 유용한 생리활성이 보고되고 있는 lipoic acid를 우선 선정하여, 고정화 lipase를 이용한 compound K와 lipoic acid (0.5%, w/v)의 에스터화 반응을 수행하였다. 반응생성물의 spot을 front line에서 내리기 위하여, 아래와 같이 전개용매의 극성을 변화시켜 주면서 TLC 분석을 수행하였다. CHCl₃:CH₃OH:H₂O (10:2:0.3)의 전개용매 조건에서 새로운 에스터 화합물 spot이 반응 후 48시간부터 관찰되기 시작하여 반응 후 192시간까지 생성된 에스터 화합물의 양은 점차 늘어나는 것이 관찰되었다 (Figure 12. 참조). CHCl₃:CH₃OH:H₂O (11:2:0.3)의 전개용매조건에서 192시간, 240시간의 새로운 에스터 화합물 spot을 보여주고, 앞의 전개용매 조건보다 R_f 값이 높은 spot의 형태를 보여 준다. CHCl₃:CH₃OH:H₂O (13:2:0.3)의 전개용매조건에는 48시간, 168시간에서 새로운 에스터 화합물 spot을 보여주고 이는 R_f 값이 더 높아지는 결과를 얻을 수 있었다.

나. 화학적 합성을 통한 진세노사이드 지방산 에스터 화합물 합성 방법의 개발

Coupling 화학합성을 이용하여 compound K와 oleic acid의 에스터화 반응을 아래와 같이 수행하였다. Lipase 효소를 이용한 생물전환 기술과의 효율성 비교와 함께, 다양한 조합의 진세노사이드 지방산 에스터 화합물을 개발하기위한 새로운 방법의 도입을 시도하였다. 또한 다른 연구자에 의한 본 연구 그룹이 출원한 lipase 효소를 이용한 생물전환과 관련한 특허기술을 회피하는 것을 미리 차단하기 위해서도 coupling 화학합성 방법을 확립하기위한 실험이 요구되었다. Figure 5에 Compound K와 oleic acid의 coupling 화학합성을 통한 에스터화 반응 기작을 제시하였다. Oleic acid 와 EDC·HCl 의 반응을 통해서 oleic acid에 좋은 leaving group을 붙여줌으로써 compound K와의 에스터화 반응이 쉽게 일어날 수 있게 하였다. Figure 6는 본 실험을 위하여 제작한 화학합성 반응장치를 보여주고 있다. TLC 분석을 통하여 대부분의 oleic acid에 좋은 leaving group이 형성되었음을 확인한 후 (Figure 13), compound K (2mg)과 DMAP (0.3mg)를 넣어 상온에서 10일 동안 추가 반응을 진행하여, 새로운 에스터 화합물이 생성되었음을 TLC 분석을 통하여 확인하였다 (Figure 14).

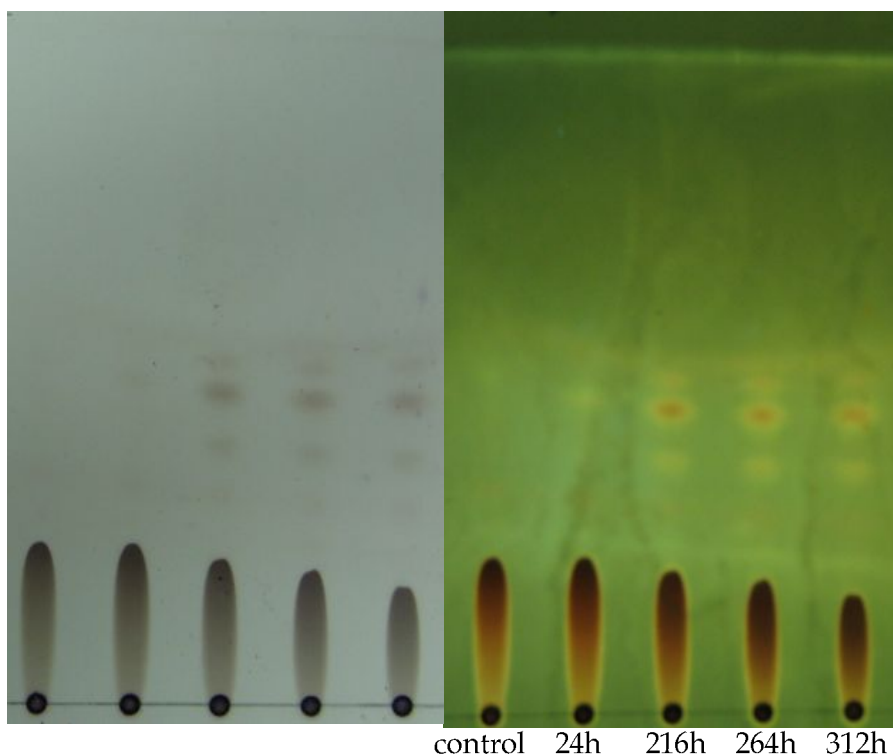


Figure 9. TLC analysis of esterification reaction of compound K (0.2%, w/v) with oleic acid (1.5%, v/v) in 2-methyl-2-butanol for 13 days (with a developing solvent of hexane:EA (20:1)).

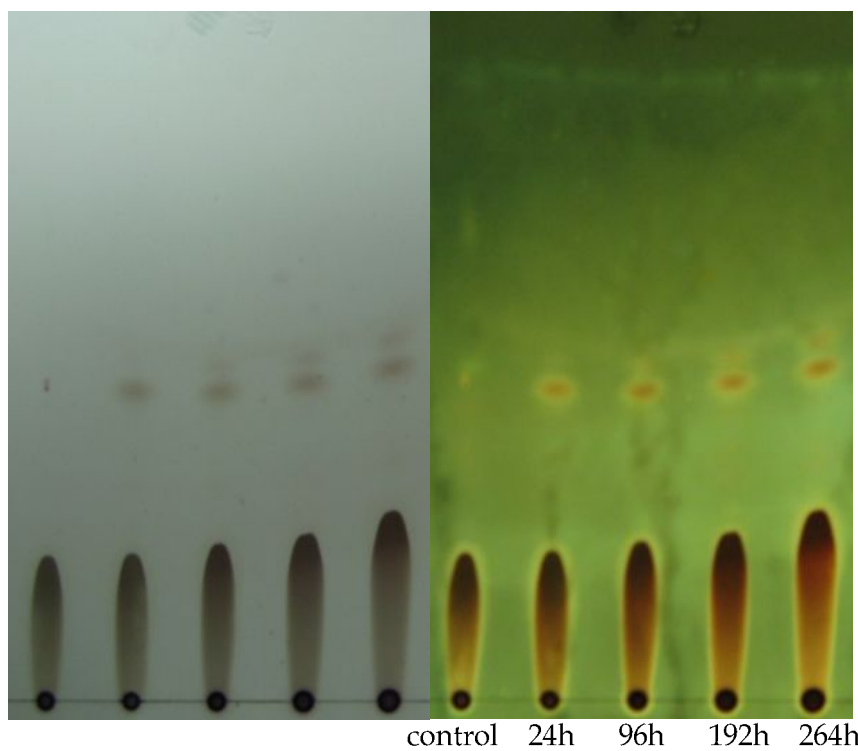


Figure 10. TLC analysis of esterification reaction of compound K (0.2%, w/v) with oleic acid (3.0%, v/v) in 2-methyl-2-butanol for 11 days (with a developing solvent of hexane:EA (20:1)).

control 24h 48h 96h

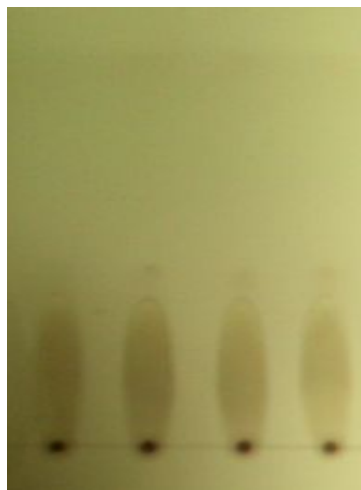


Figure 11. TLC analysis of esterification reaction of ginsenoside Rb1 (0.2%, w/v) with oleic acid (14.5%, v/v) in 2-methyl-2-butanol (with a developing solvent of hexane:EA (20:1)).

Developing solvent:

$\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (10:2:0.3)



24h 48h 122h 192h

$\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (13:2:0.3)



24h 48h 168h

Figure 12. TLC analysis of esterification reaction of compound K (0.2%, w/v) with lipoic acid (0.5%, w/v) in 2-methyl-2-butanol (with a developing solvent of $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$).

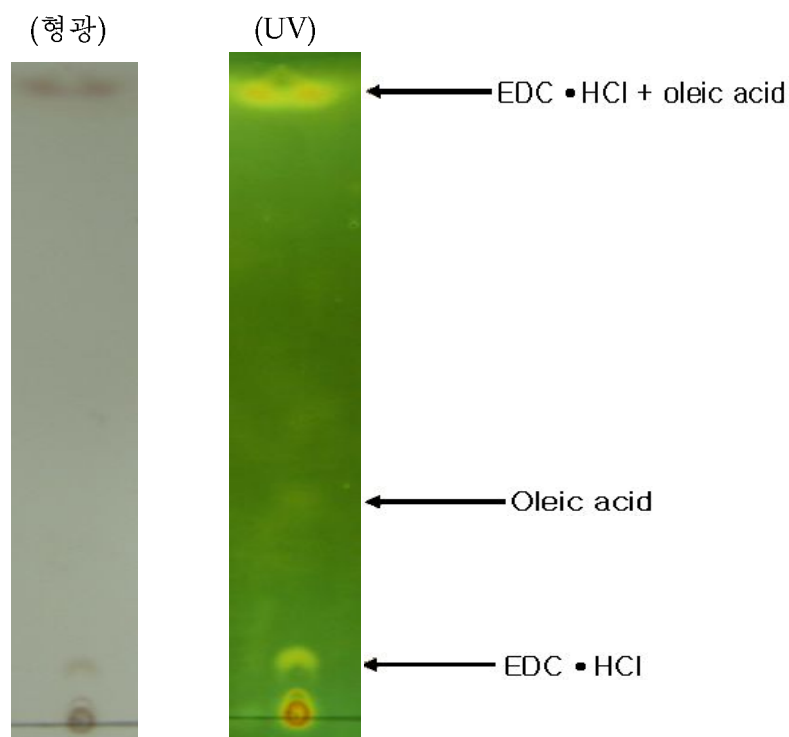


Figure 13. TLC analysis to confirm the leaving group formed by reaction after 10hrs between oleic acid and EDC · HCl (with a developing solvent of CHCl_3 , 100%).

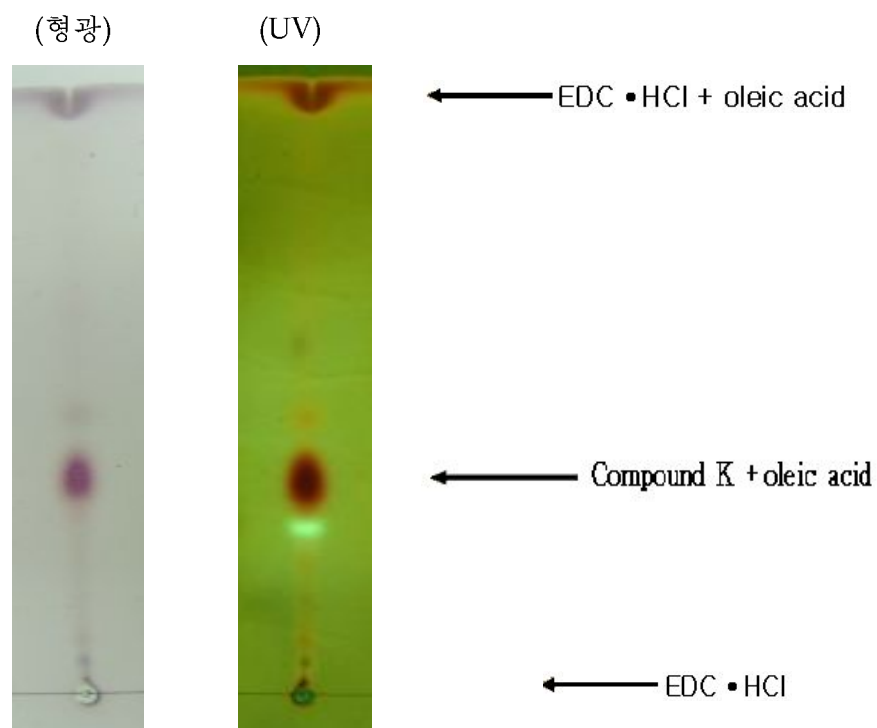


Figure 14. TLC analysis of esterification in methylene chloride by chemical method (with a developing solvent of hexane:ethyl acetate (15:1)).

다. 효소를 이용한 진세노사이드의 지방산 에스터 화합물 합성 방법 최적화

(1) [BMIM]-[BF₄]:Acetone (1:1), hexane:DMSO (31.25:1), acetone, isooctane:DMSO (31.25:1)에서 compound K와 octanoic acid의 에스터화 반응 (소량 반응)

고정화 lipase GF를 이용하여 각 유기용매에서 4일 동안 반응을 수행하여 종결시킨 반응 혼합물을 전개 용매를 hexane:ethyl acetate (30:1)을 사용하여 TLC를 전개하였고, 10% H₂SO₄에 담근 후 약 250℃에서 가열하여 발색시켰다(Figure 15). 새로운 에스터 화합물 spot은 유기용매 [BMIM]-[BF₄]:acetone (1:1)에서의 반응을 제외한 다른 유기용매들내 반응에서 모두 관찰되었다. TLC 분석으로 전환율을 정확히 추정할 수는 없지만 하단 부분의 반응 후 남은 compound K의 양이 현저히 감소한 유기용매 isooctane:DMSO (31.25:1)에서의 반응 전환율이 가장 좋음을 예상할 수 있었다. 효소 반응의 기질 전환율은 isooctane:DMSO (31.25:1) > hexane:DMSO (31.25:1) > acetone > BF₄:acetone (1:1)의 순서였다. 하지만 순수한 DMSO는 상단의 TLC 분석과 같은 전개 용매 조건으로 전개 시 TLC plate 하단 부분에 하얗게 관찰되어 반응 후 남은 compound K가 관찰되는 위치와 겹쳐 compound K의 남은 양이 관찰되지 않을 수 있었다(Figure 16). 그래서 Figure 16에서 유기용매 isooctane에서의 반응 전, 후 혼합물을 TLC를 통해 비교 분석하였다. 반응 전의 compound K의 양이 DMSO에 영향을 받지 않고 뚜렷이 관찰되었기 때문에 반응 후 compound K는 대부분 에스터 화합물로 전환됨을 확인하였다. 따라서 compound K의 지방산 에스터 화합물 합성 반응의 매질로서 유기용매 (isooctane:DMSO (31.25:1))가 최적임을 알 수 있었다. Figure 17에서 유기용매 isooctane:DMSO (31.25:1)에서 효소를 lipase GF, Novozym 435를 이용하여 합성한 혼합물을 비교 분석하였다. TLC plate 하단 부분에 남은 compound K의 양과 새로운 에스터 화합물의 양을 고려해 보면, lipase GF의 효소활성이 더 우수함을 알 수 있었다.

이로써 앞선 실험에서 진행한 반응의 유기용매 tertiary-amyl alcohol (2-methyl-2-butanol), 지방산의 종류와 첨가량 (oleic acid, 0.5-3% (v/v)), 반응 방법 (shaking incubator), 효소의 사용량 (0.4%, w/v), 반응 온도 (50℃) 등의 인자들을 각각 유기용매 (isooctane:DMSO (31.25:1)), 지방산 종류와 첨가량 (octanoic acid, 6.4% (v/v)), 반응 방법(stirring), 효소의 사용량 (4%, w/v), 반응 온도 (65℃)로 대체하면서 반응 시간이 앞선 실험의 10-13일에 비해 6-9일 정도 빠른 5일 후에 높은 전환율을 보이는 최적의 조건을 결정할 수 있었다. 사용한 compound K와 octanoic acid의 몰 비는 1:125였다.

(2) Isooctane:DMSO (31.25:1)에서 compound K와 octanoic acid의 에스터화 반응 (대량 반응)

같은 조성 및 scale의 반응 혼합물 4개를 5일 동안 반응을 진행하여 (2회 반복 수행) TLC로 분석하였다. TLC의 전개 용매는 hexane:ethyl acetate (30:1)를 사용하였고, 10% H₂SO₄에 담근 후 약 250℃에서 가열하여 발색시켰다(Figure 18). 새로운 에스터 화합물 spot은 모두 같은 형태와 위치에서 관찰되었고, TLC plate 하단에 관찰되는 남은 compound K의 양은 희미할 정도로 높은 전환율을 보였다. 새로운 에스터 화합물의 spot이 길게 띠 형태로 관찰되는 점은 primary, secondary alcohol site 에 지방산 에스터화 반응이 일어났을 것이라고 추정된다.

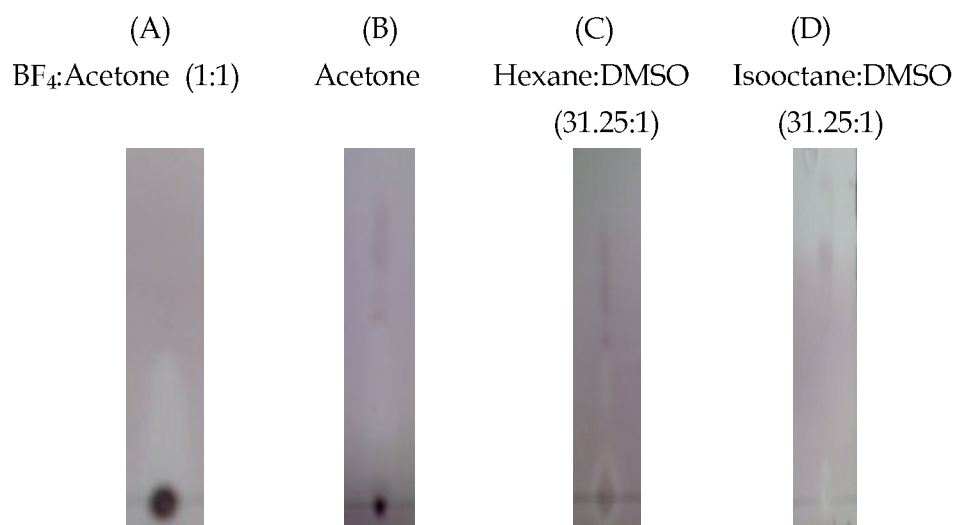


Figure 15. TLC analysis of esterification reactions of compound K (0.2%, w/v) with octanoic acid (6.4%, v/v) at 96 hrs in different organic solvents (with a developing solvent of hexane:EA (30:1)); (A)BF₄:Acetone (1:1), (B)Acetone, (C)Hexane:DMSO (31.25:1), (D)Isooctane:DMSO (31.25:1).

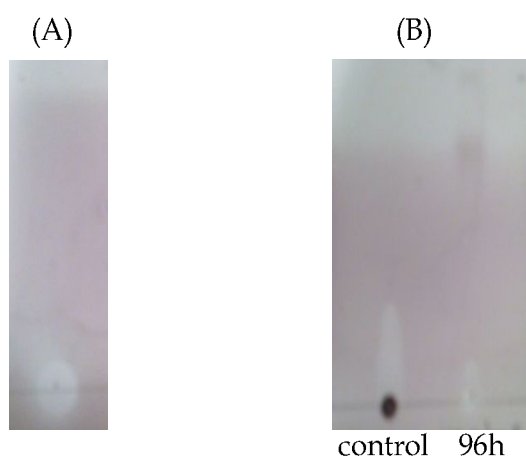


Figure 16. TLC analysis of esterification reaction of compound K (0.2%, w/v) with octanoic acid (6.4%, v/v) in isooctane:DMSO (31.25:1) (with a developing solvent of hexane:EA (30:1)); (A)DMSO, (B)Reaction mixture.



Figure 17. TLC analysis of esterification reactions of compound K (0.2%, w/v) with octanoic acid (6.4%, v/v) in isooctane:DMSO (31.25:1) at 96hrs using two different lipases (with a developing solvent of hexane:EA (30:1)); (A) Novozym 435, (B) Lipase GF.

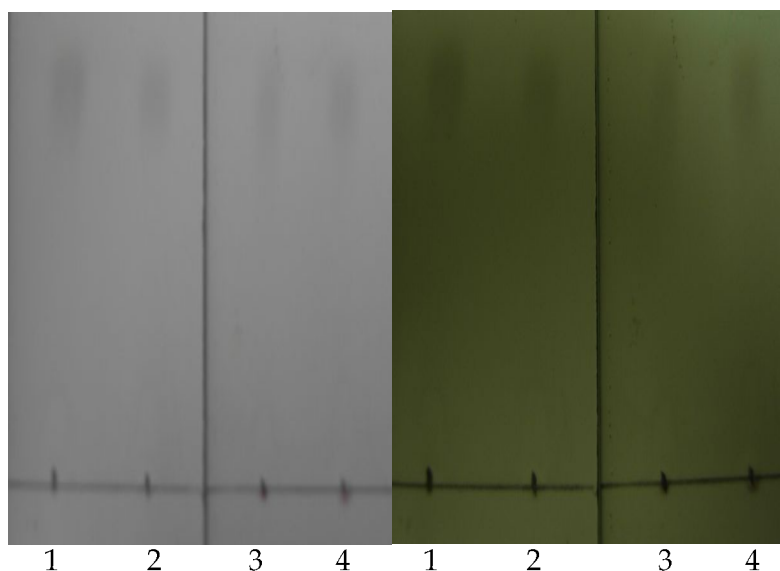


Figure 18. TLC analysis of esterification (scaled-up) reaction of compound K (0.2%, w/v) with octanoic acid (6.4%, v/v) in isooctane:DMSO (31.25:1) (with a developing solvent of hexane:EA (30:1)); (1,2,3,4) same scale samples.

라. Compound K 지방산 에스터 화합물 분리, 정제 및 구조분석

(1) 용매 추출법을 이용한 compound K 지방산 에스터 화합물의 분리 및 정제

반응을 종결 시킨 혼합물에 methanol:iso-octane (1:1)이 되도록 methanol을 첨가 하여 5-10분 동안 vortex를 하면 methanol과 iso-octane의 극성도 차이에 의해 두개의 층으로 분리되었다. 하층은 순수한 methanol 층이며, 상층은 첨가한 methanol 양의 1/2이 iso-octane과 섞이면서 methanol과 iso-octane의 혼합 층을 형성하였다. 그리고 methanol:water (5:1)이 되도록 water를 첨가하여 30-40분 동안 충분히 다시 vortex를 하면 상층의 혼합액 중 methanol 용액이 첨가한 water와 섞이면서 하층으로 내려온다.(Figure 19. 참조) 그 후 생성된 두층을 원심 분리기를 이용해 분리하여 각각의 층을 동시에 전개용매를 hexane:ethyl acetate (30:1)를 사용하여 TLC를 전개하였고, 10% H₂SO₄에 담근 후 약 250℃에서 가열하여 발색시켰다.(Figure 20. 참조) 하층의 methanol, water 혼합 층에는 반응 후 남은 compound K와 소량의 지방산이 관찰되었고 상층의 iso-octane 단일 층에는 새로운 에스터 화합물과 반응 후 남은 지방산의 대부분이 관찰되었다. 새로운 에스터 화합물은 TLC plate 상단의 긴 띠 형태와 하단부분의 작은 spot 형태로 관찰되었고 하단의 작은 spot형태는 상단에 비해 상대적으로 희미하게 관찰되었다.

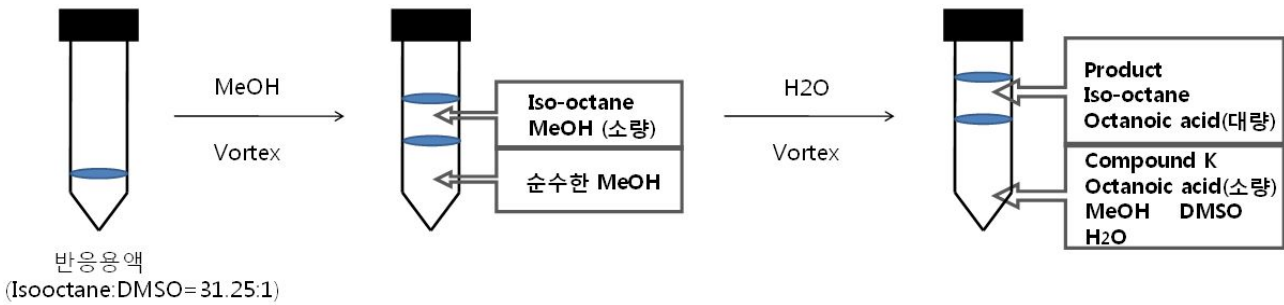


Figure 19. Solvent extraction for fatty acyl compound K ester compounds produced by immobilized lipase.

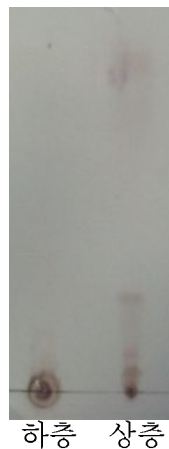


Figure 20. TLC analysis of fatty acyl compound K ester compounds separated by solvent extraction (with a developing solvent of hexane:EA (30:1)).

그리고 상층의 새로운 에스터 화합물은 prep TLC를 통해 상, 하단으로 나눠 지방산과 분리하였다. 분리한 새로운 에스터 화합물 상, 하단을 각각 정제하고 고속 감압 건조기로 완전히 용매를 제거하여 상단은 21.9mg, 하단은 17.4mg을 얻었다. 얻어진 상, 하단의 새로운 에스터 화합물은 모두 oilic한 상태였다. 이들을 위의 prep전 TLC 전개용매 조건으로 동시에 전개하여 분석하였다.(Figure 21. 참조) 상, 하단의 새로운 에스터 화합물은 모두 상단에 띠 형태로 관찰되었고 정확한 분석을 위해 LC-MS를 의뢰하였다.



Figure 21. TLC analysis of fatty acyl compound K ester compounds separated by Prep TLC after solvent extraction (with a developing solvent of hexane:EA (30:1)).

(2) 반응 후 남은 compound K 회수 방법 개발

반응 종결 시킨 혼합물을 rotary evaporator에서 반응 용매를 최대한 제거한 후 methanol: iso-octane (1:1)을 첨가 하여 5-10분 동안 vortex를 하면 methanol과 iso-octane의 극성도 차이에 의해 두개의 층으로 분리되었다. 하층은 순수한 methanol 층이며, 상층은 첨가한 methanol 양의 1/2이 iso-octane과 섞이면서 methanol과 iso-octane의 혼합 층을 형성하였다. 그리고 methanol:water (5:1)이 되도록 water를 첨가하여 30-40분 동안 충분히 다시 vortex를 하면 상층의 혼합액 중 methanol 용액이 첨가한 water와 섞이면서 하층으로 내려온다. 하층인 methanol, water 혼합 층에 용해되어있는 반응 후 남은 compound K와 소량의 지방산을 prep TLC를 통해 분리하였다. TLC 전개용매는 지방산과 compound K가 분리되는 $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (13:2:0.3)을 사용하여 전개 하였다.(Figure 22. 참조)

그리고 prep한 물질을 methanol로 정제하여 회수한 compound K의 순도를 확인하기위해 TLC를 이용해 위의 전개용매 조건에서 분석하였다.(Figure 23. 참조) TLC plate의 하단부분의 붉은 spot은 회수된 compound K의 spot이며 뚜렷이 관찰되었다. compound K spot 밑으로도 다른 색을 띄는 spot이 상대적으로 희미하게 보이는 것이 관찰되어 다른 진세노사이드가 소량 포함되어 있다고 판단된다.

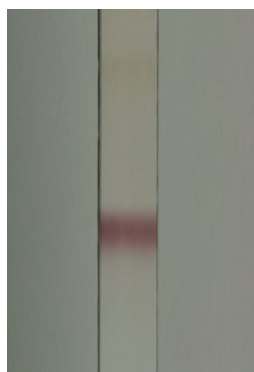


Figure 22. Prep TLC for recovery of compound K unreacted after enzymatic esterification with lipase (with a developing solvent of $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (13:2:0.3)).



Figure 23. TLC analysis of compound K recovered by Prep TLC after enzymatic esterification with lipase (with a developing solvent of $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (13:2:0.3)).

(3) HPLC를 이용한 compound K 지방산 에스터 화합물의 분리 및 정제

반응 전, 반응 후 시료들을 HPLC로 각각 분석하였다. 반응 전 시료에서 6분 이전에 broad한 형태의 peak들이 관찰되면서 compound K와 지방산 (octanoic acid)이 과량 존재함을 알 수 있었다(Figure 24). 반응 후 시료에서는 반응 전 시료 분석 결과와 비교하여 6분 이전의 peak들의 area 값이 줄어들고, ELSD 검출기를 통해 13.5분, 23.2분의 새로운 peak를 관찰하였다. 이들은 새로운 에스터 화합물로 추정 된다(Figure 25). 추정된 새로운 화합물의 양을 고려해 HPLC를 통해 새로운 화합물이 있을 것으로 추정되는 9분대 이후에 용리되는 시료를 모두 합쳐 분리 정제하였으며, 이들은 다시 13-17분 분획 (EK-001; OECK-1)과, 17-26분 분획(EK-002; OECK-2) 두 가지로 더 나누어 분리 정제 하였다. Figure 26은 새로운 화합물이 있을 것으로 추정되는 9분대 이후에 용리되는 시료를 모두 합쳐 분리 정제 한 후 HPLC를 통해 분석한 그림이다.

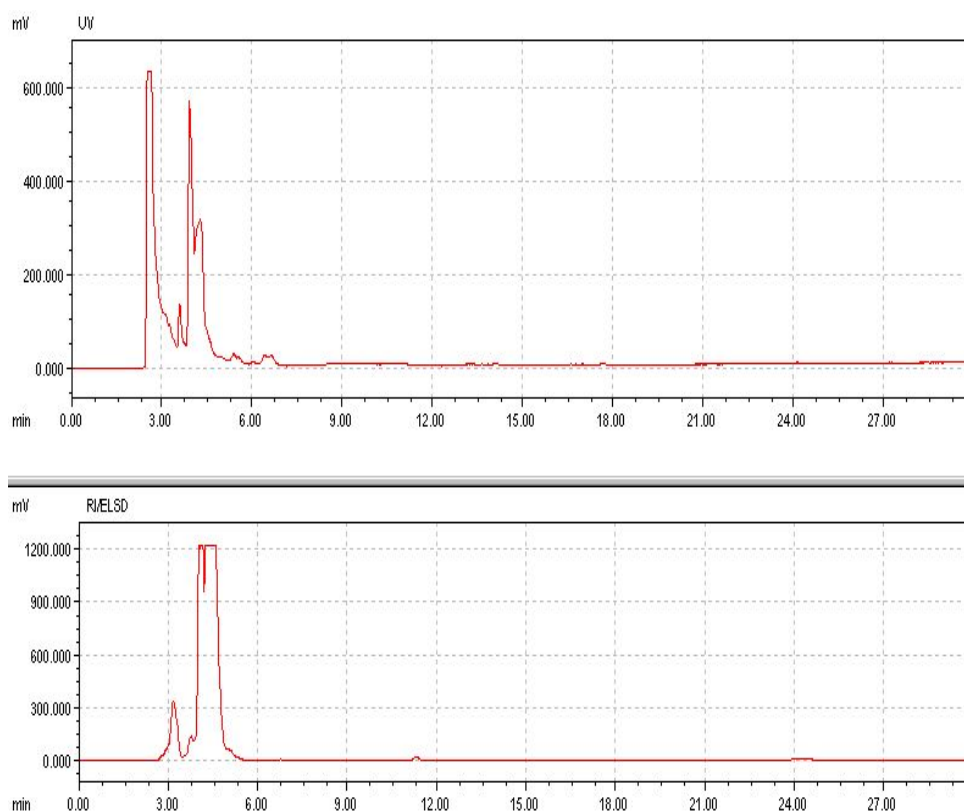


Figure 24. HPLC analysis of reaction mixture of compound K (0.2%, w/v) with octanoic acid (6.4%, v/v) in isooctane:DMSO (31.25:1) before reaction started. (Top) UV, (Bottom) ELSD detectors, respectively.

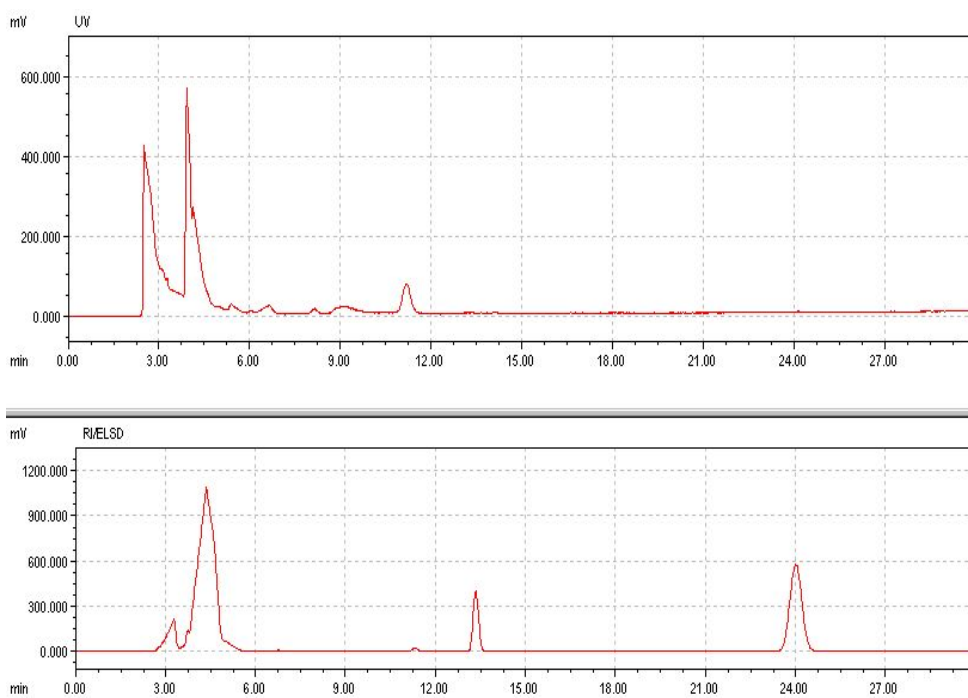


Figure 25. HPLC analysis of esterification reaction of compound K (0.2%, w/v) with octanoic acid (6.4%, v/v) in isooctane:DMSO (31.25:1). (Top) UV, (Bottom) ELSD detectors, respectively.

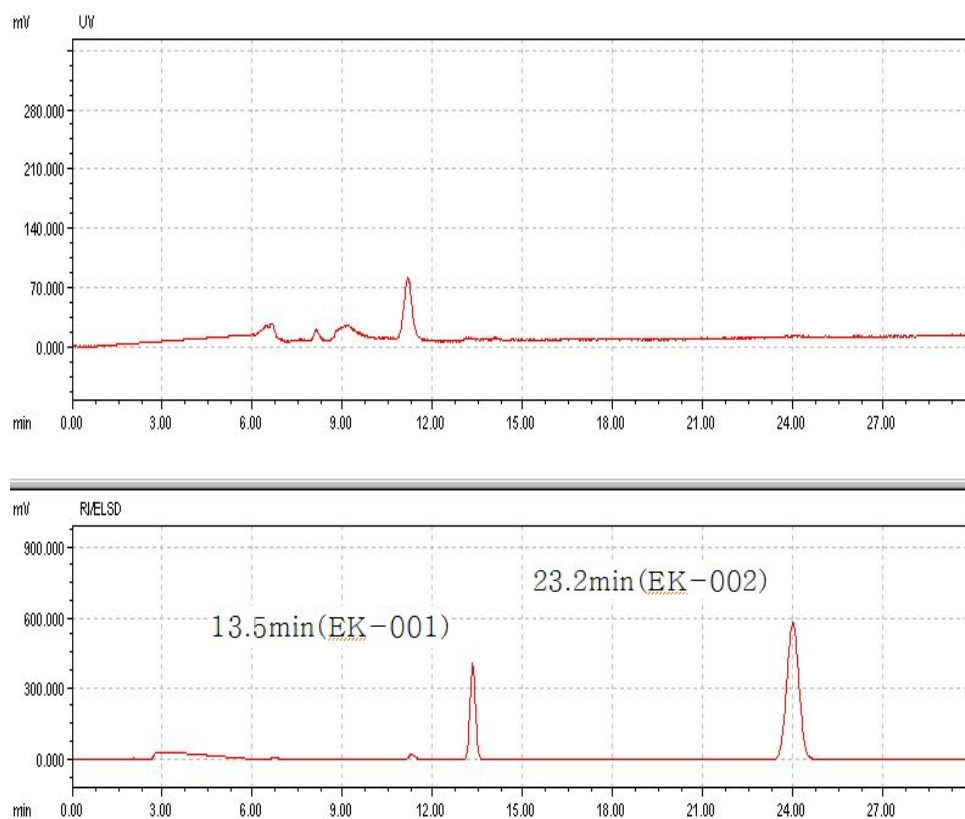


Figure 26. HPLC analysis of a fraction of reaction products separated by preparative HPLC. (Top) UV, (Bottom) ELSD detectors, respectively.

(4) 분리한 에스터 화합물의 LC-MS, MS/MS, ¹H-NMR 분석

추정된 새로운 에스터 화합물 각각의 정성, 정량 분석을 위해 HPLC를 통하여 분리 정제한 두 개의 분획 (EK-001, EK-002)에 포함된 화합물을 LC-MS, MS/MS, ¹H-NMR를 통해 분석하였다. HPLC를 통하여 분리한 시료 EK-001의 LC-MS total ion chromatogram(TIC)에서 19.63분과 22.15분에서 두 개의 큰 peak와 이후에 작은 몇 개의 peak들이 나타나는 것으로 보아 EK-001은 최소한 2개의 주 화합물을 포함하는 혼합물임을 알 수 있었다(Figure 27).

19.63분의 peak는 LC-MS 분석 결과 (M+H)⁺로 추정할 수 있는 peak가 683.4 또는 699.8로 나타났으며(Figure 28), 이는 compound K 보다 약 60 또는 76의 분자량이 증가된 화합물로 예상할 수 있으나 정확한 구조를 예상할 수 없다. 또한 683.4 peak에 대한 MS/MS 분석 결과를 살펴보면(Figure 29) compound K에 해당하는 peak가 전혀 나타나지 않은 것을 알 수 있고 이에 따라 본 화합물의 구조는 compound K로부터 크게 변형된 구조이거나 반응 기질로 사용한 compound K에 포함된 다른 진세노사이드와의 반응 생성물일 것으로 추정된다.

22.15분에 해당하는 peak는 LC-MS 분석 결과 739.5에서 (M+H)⁺로 추정되는 peak를 볼 수 있었으며(Figure 30), compound K에 octanoic acid 1분자가 붙은 에스터 화합물의 분자량인 748보다 분자량이 10이 적은 미지의 물질로서 예상할 수 있다. 그러나 이 739.5 peak에 대한 MS/MS 스펙트럼 분석 결과 compound K (M.W. 622), octanoic acid (M.W. 144)에 해당하는 peak들이 관찰되고(Figure 31), ¹H-NMR 분석 결과 octanoic acid에 해당하는 peak들이 존재 (1-2ppm)하는 점으로 보아 반응이 진행되었지만 합성된 에스터 화합물이 일부 변형되어진 것으로 추정된다(Figure 32).

EK-002시료의 TIC를 살펴보면(Figure 33) 23.22분에서 상대적으로 큰 peak를 관찰할 수 있었다. TIC에서 23.22분에 해당하는 peak에 대한 LC-MS 질량스펙트럼 분석 결과 (M+H)⁺로 추정되는 749.4를 확인할 수 있었다(Figure 34). 이는 compound K와 한 분자의 octanoic acid가 에스터 결합을 통하여 생성된 화합물에 해당하는 것으로 예상하는 에스터 화합물 생성 반응이 정상적으로 진행되었음을 추정할 수 있다. 아울러 749.4 peak에 대한 MS/MS 스펙트럼 분석 결과 compound K (M.W. 622)에 해당하는 peak가 관찰되고(Figure 35), ¹H-NMR 분석 결과 octanoic acid peak (1-2ppm)가 존재하는 점으로 보아 EK-002는 compound K에 octanoic acid 1분자가 붙은 에스터 화합물을 주생성물로 함유하는 것으로 추정된다. 하지만 ¹H-NMR 분석 결과 1-2ppm 이외에 compound K에 해당하는 peak들이 상대적으로 매우 작게 나타나는 것으로 보아 EK-002는 반응하지 않은 octanoic acid를 과량 함유하고 있는 혼합물일 수도 있을 가능성을 배제할 수 없다(Figure 36). 이에 따라 EK-002로부터 완전한 단일물질의 정제와 체계적인 분광학 기기를 이용한 생성물에 대한 정확한 구조에 대하여서는 보다 추가적인 분석이 필요하다.

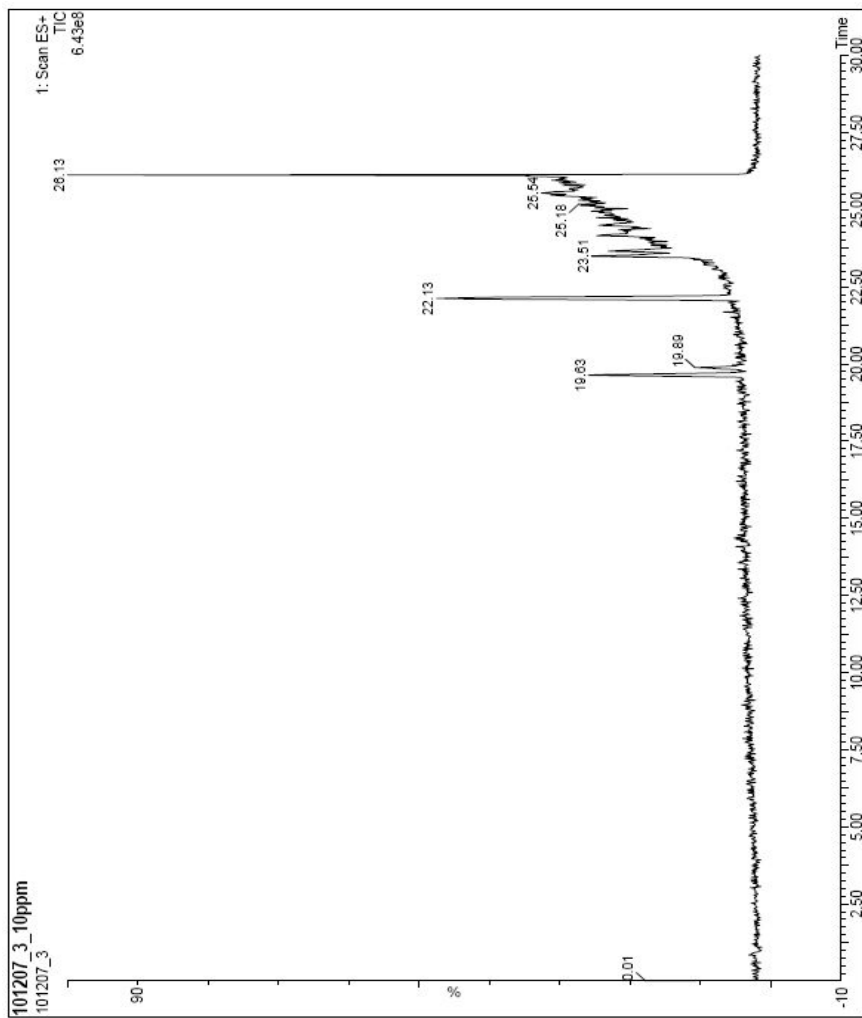


Figure 27. LC-MS total ion chromatogram of EK-001 fraction of reaction products separated by preparative HPLC.

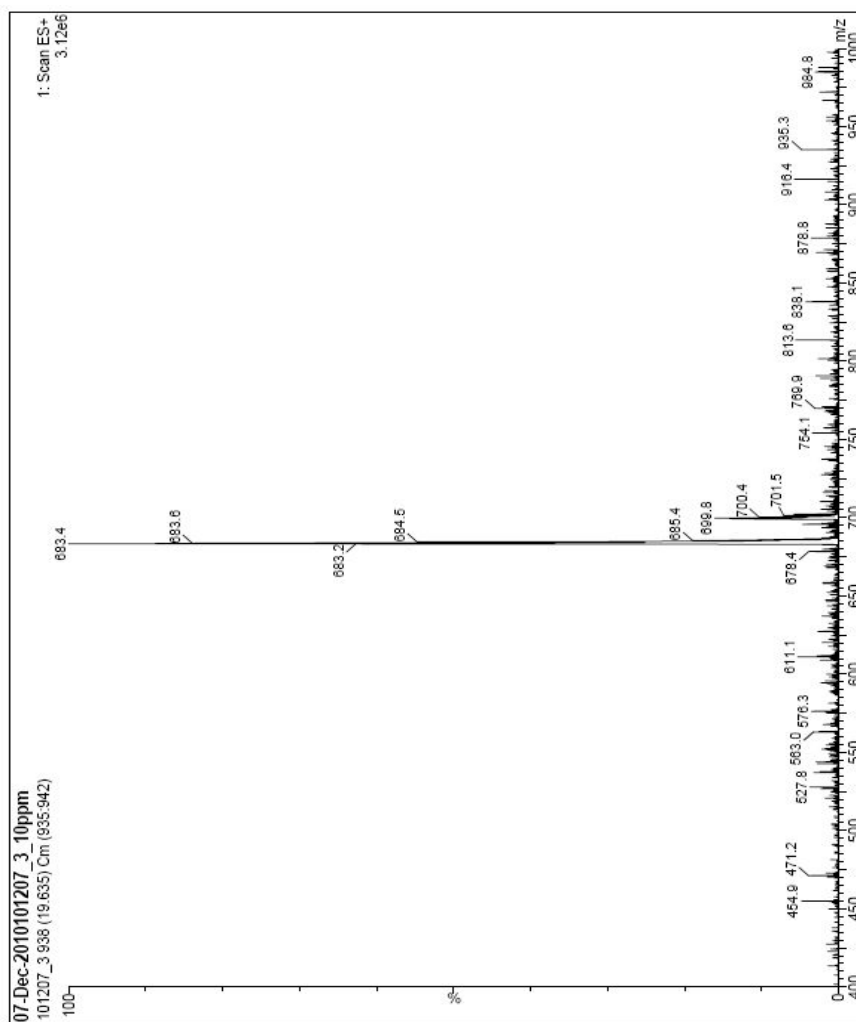


Figure 28. MS spectrum of 19.63min peak on LC-MS total ion chromatogram of EK-001 fraction of reaction products.

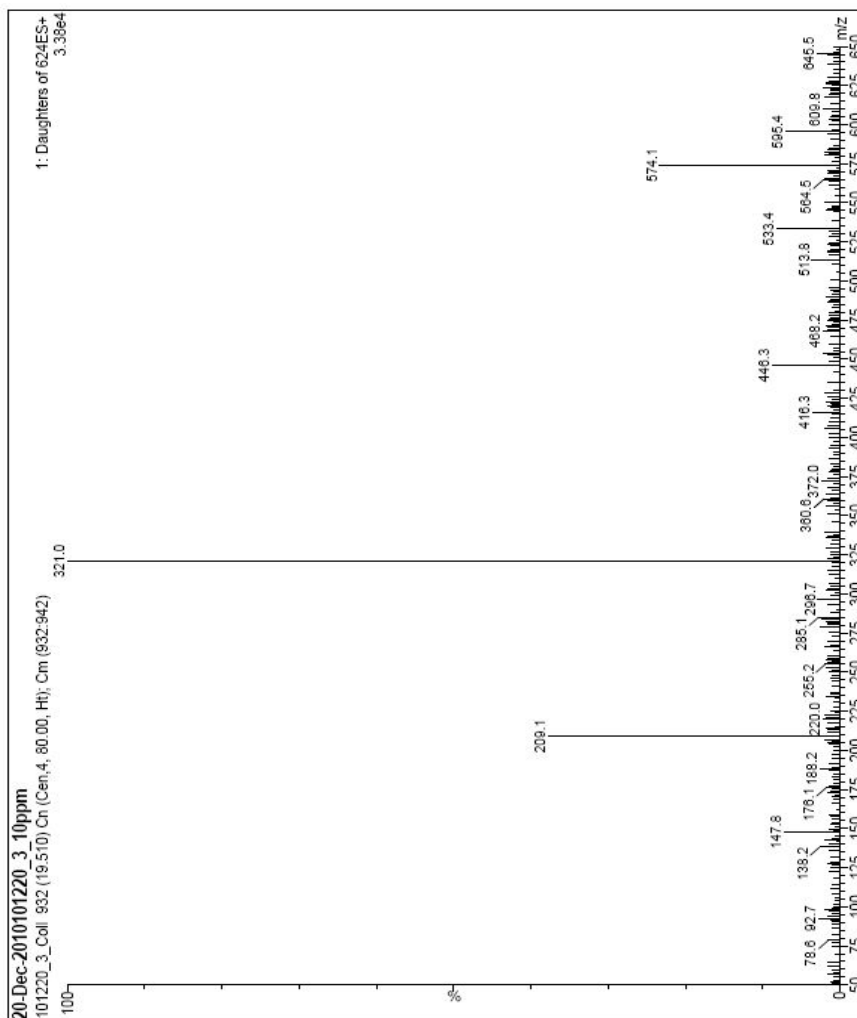


Figure 29. MS/MS spectrum of 19.63min peak on LC-MS total ion chromatogram of EK-001 fraction of reaction products.

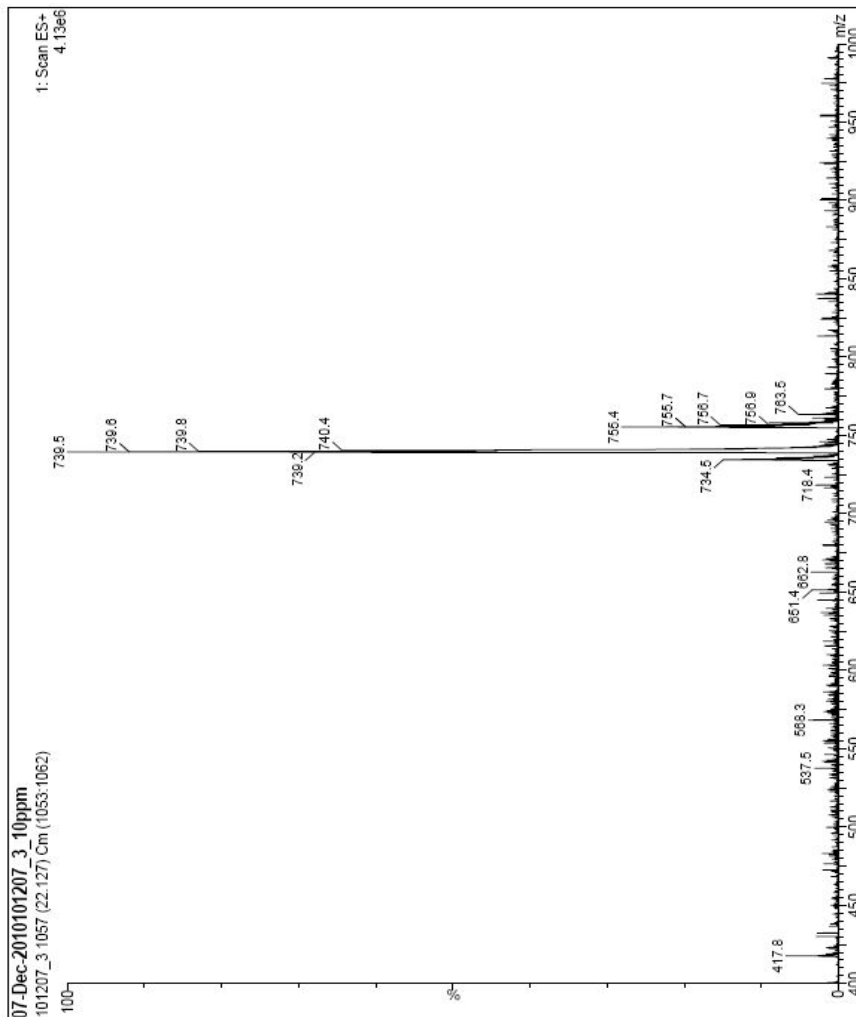


Figure 30. MS spectrum of 22.13min peak on LC-MS total ion chromatogram of EK-001 fraction of reaction products.

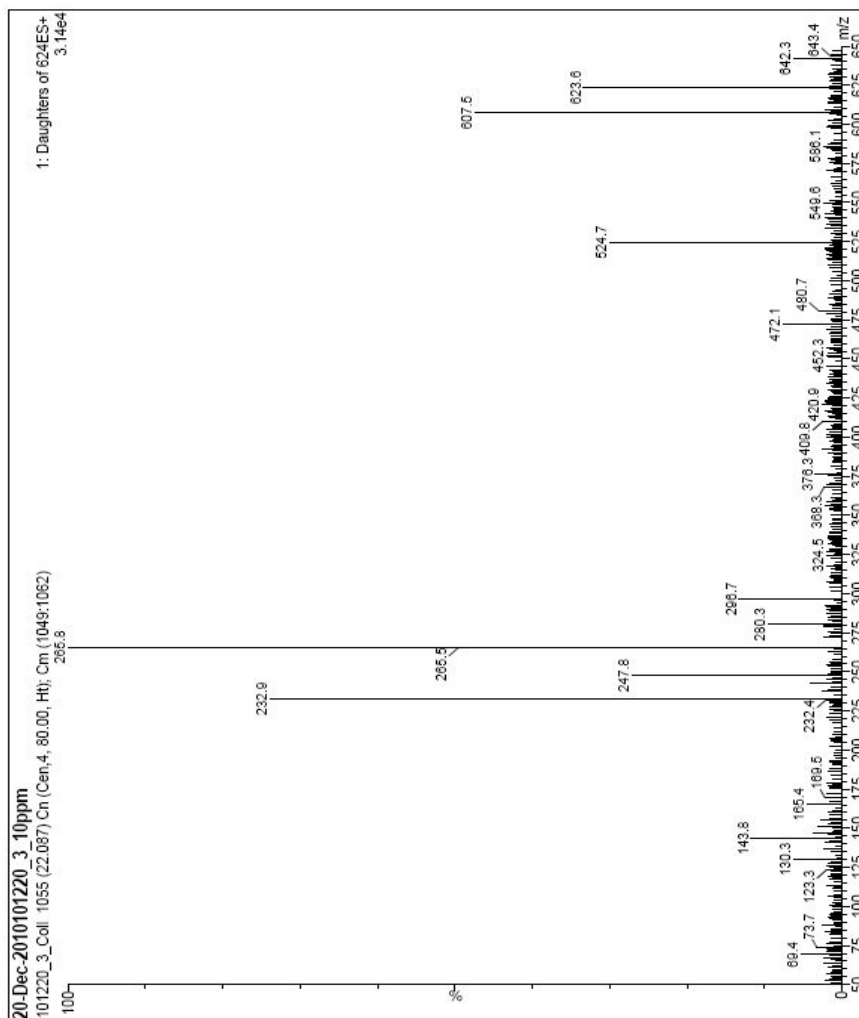


Figure 31. MS/MS spectrum of 22.13min peak on LC-MS total ion chromatogram of EK-001 fraction of reaction products.

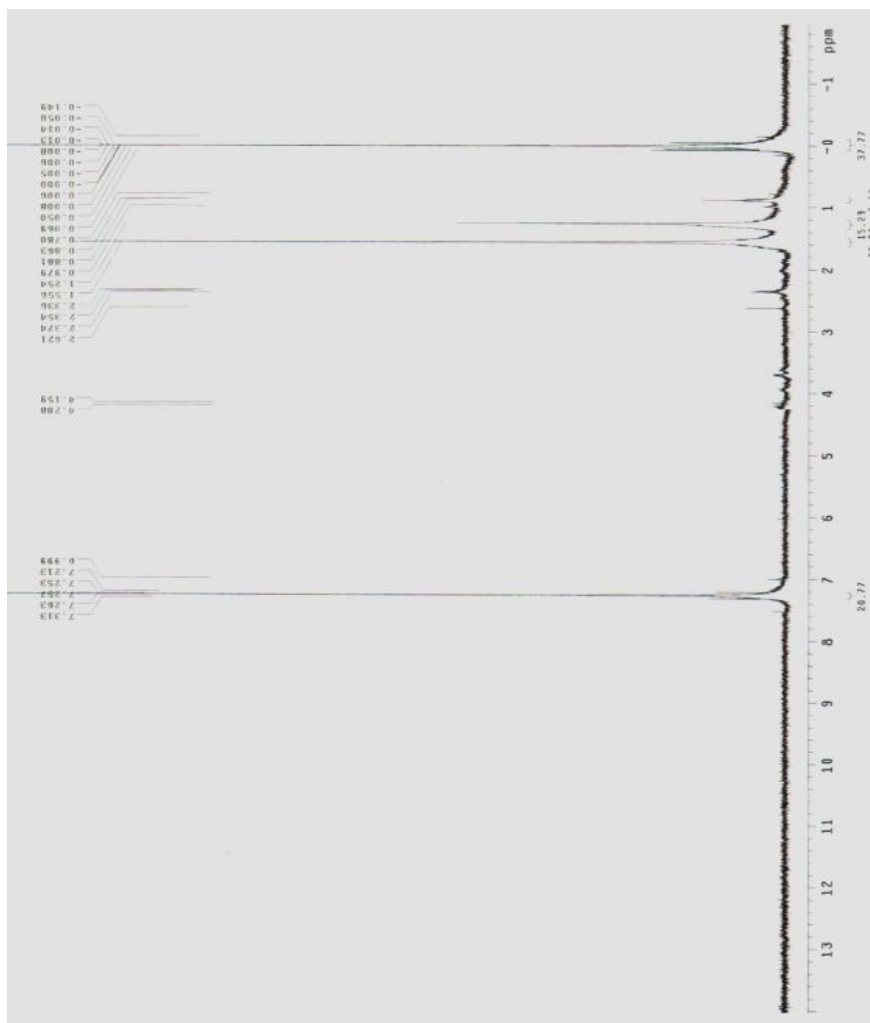


Figure 32. 400MHz ¹H-NMR in CDCl₃ of EK-001 fraction of reaction products separated by preparative HPLC.

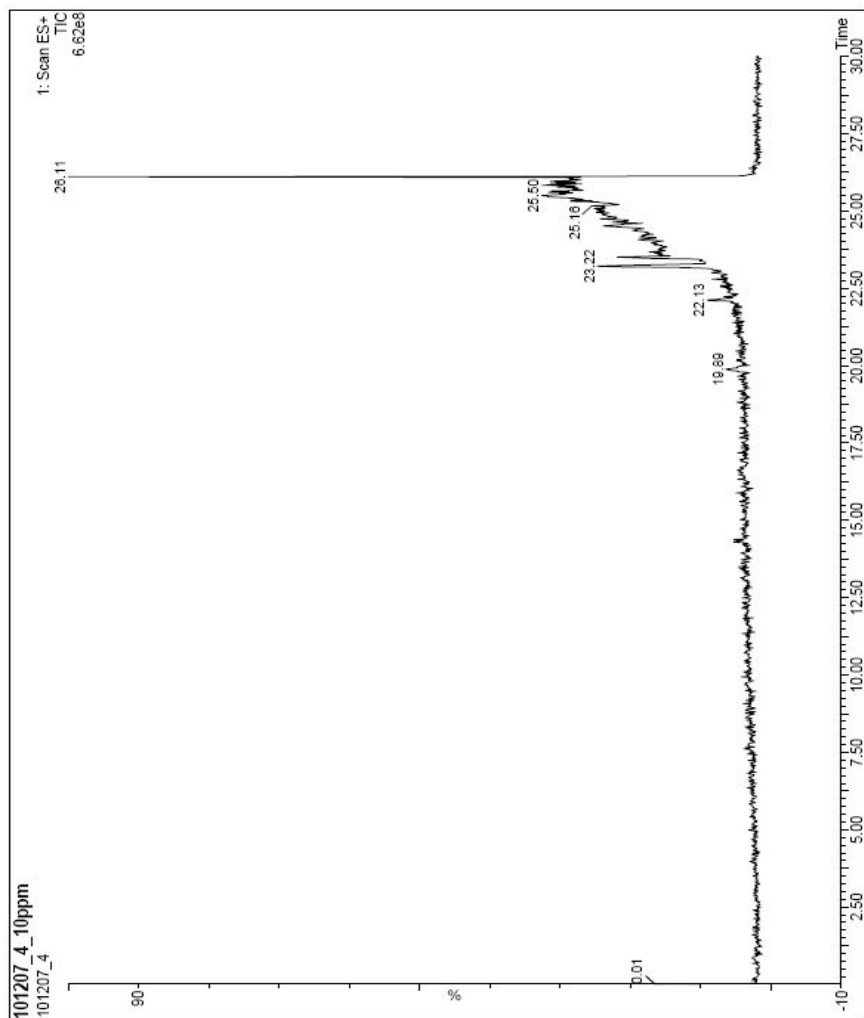


Figure 33. LC-MS total ion chromatogram of EK-002 fraction of reaction products separated by preparative HPLC.

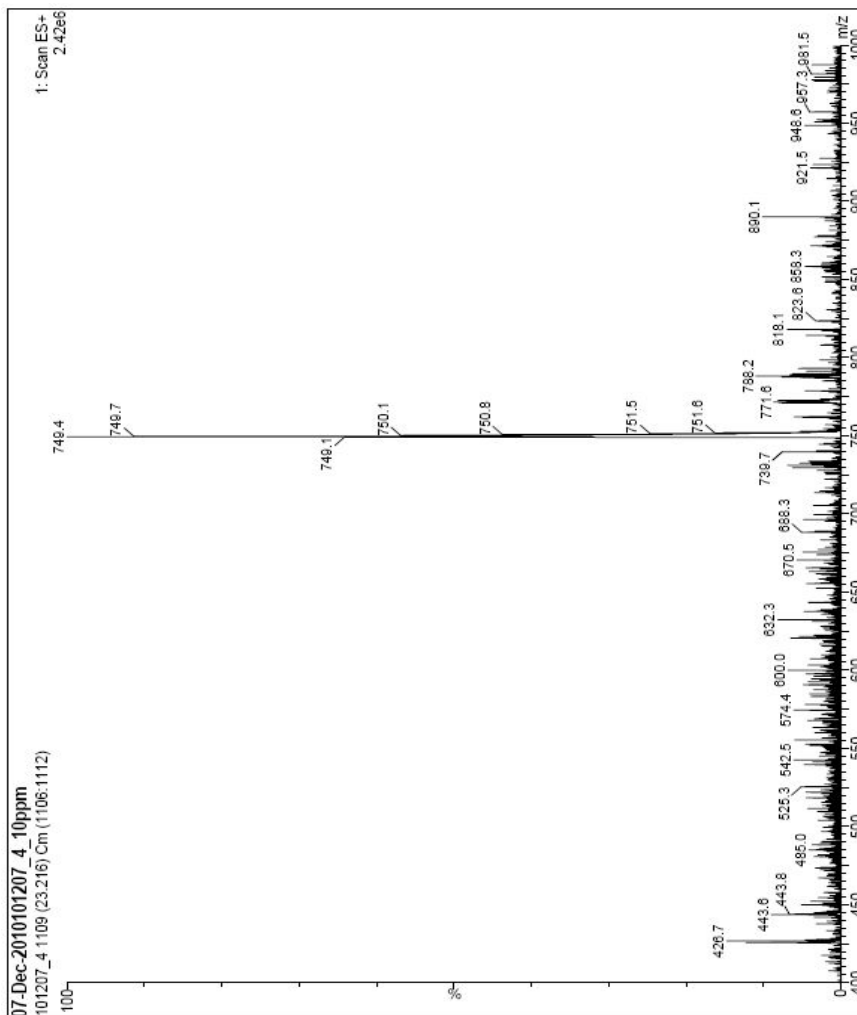


Figure 34. MS spectrum of 23.22min peak on LC-MS total ion chromatogram of EK-002 fraction of reaction products.

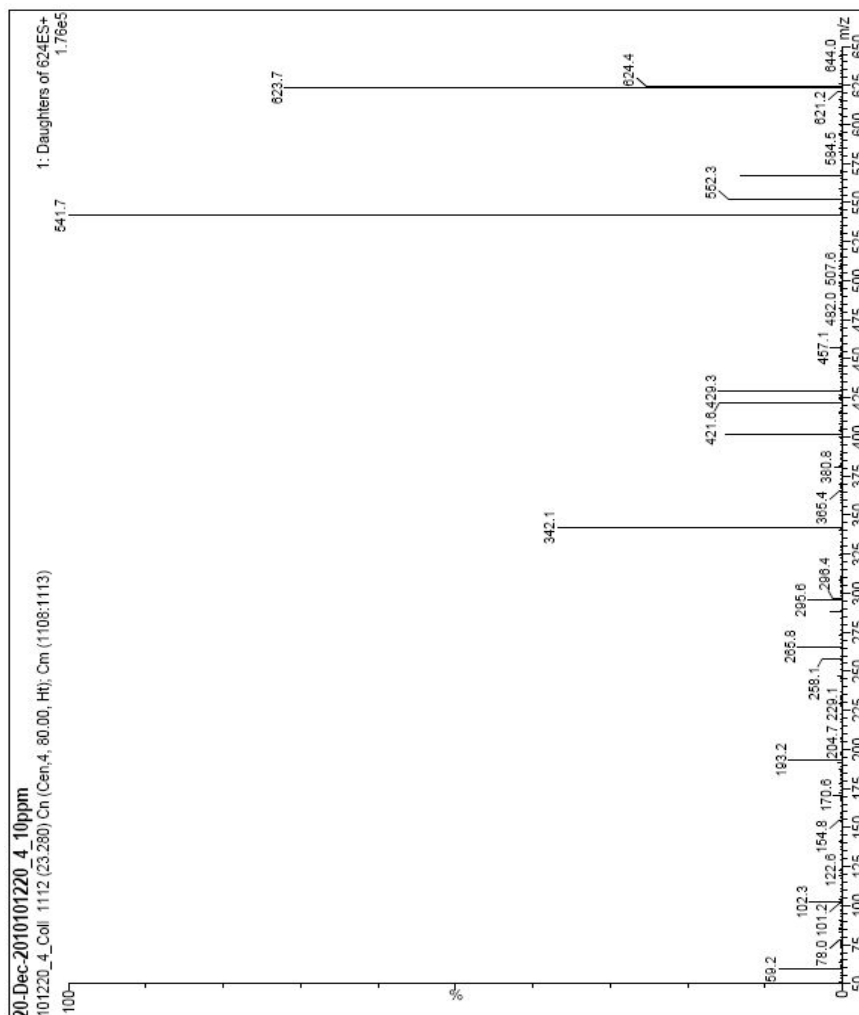


Figure 35. MS/MS spectrum of 23.22min peak on LC-MS total ion chromatogram of EK-002 fraction of reaction products.

마. 피부생리활성 및 안전성 평가

(1) 1차년도 실험 결과: Compound K와 주요 ginsenoside의 피부 효능 비교실험

(가) 항산화 (Anti-oxidation)

Compound K를 비롯한 모든 ginsenosides는 항산화효능이 없었다.

시료	농도(ppm)	N1	N2	N3	평균	억제율(%)
control	-	0.285	0.280	0.285	0.283	-0.1
홍삼 EtOH	5	0.286	0.286	0.286	0.286	-1.1
	1	0.293	0.290	0.283	0.289	-2.0
	0.5	0.292	0.287	0.283	0.287	-1.5
Rb1	50	0.283	0.280	0.286	0.283	0.0
	25	0.279	0.278	0.287	0.281	0.6
	10	0.285	0.278	0.288	0.284	-0.2
Rd	50	0.287	0.280	0.285	0.284	-0.4
	25	0.281	0.282	0.282	0.282	0.5
	10	0.284	0.282	0.283	0.283	0.0
K	1	0.286	0.287	0.285	0.286	-1.1
	0.5	0.283	0.285	0.282	0.283	-0.1
	0.1	0.288	0.280	0.286	0.285	-0.6
Rg1	50	0.290	0.287	0.289	0.289	-2.0
	25	0.287	0.289	0.285	0.287	-1.4
	10	0.286	0.287	0.288	0.287	-1.4
Rg3	25	0.285	0.289	0.288	0.287	-1.5
	10	0.288	0.289	0.286	0.288	-1.6
	1	0.285	0.279	0.293	0.286	-0.9

(나) 항염효능 평가

① Nitric oxide 형성억제력 평가

홍삼추출물은 50-10ppm 수준에서는 nitric oxide 생성억제력을 보였으나, 1ppm수준에서는 효과가 미미하였다. Compound K역시 1ppm 수준에서 효과가 미미하였으며, Rg3만이 10ppm에서 약간의 nitric oxide형성 억제능을 보였다.

시료	농도(ppm)	N1	N2	N3	평균	NO(%)	NO생성억제율 (%)
con	-	0.083	0.075	0.070	0.076	15.4	
LPS	500ng/ml	0.421	0.475	0.590	0.495	100.1	
홍삼 EtOH	50	0.082	0.070	0.074	0.075	15.2	100.2
	25	0.104	0.088	0.071	0.088	17.7	97.2
	10	0.197	0.153	0.173	0.174	35.2	76.5
con	-	0.108	0.086	0.085	0.093	15.4	
LPS	500ng/ml	0.585	0.604	0.627	0.605	100.1	
홍삼 EtOH	5	0.611	0.487	0.468	0.522	86.3	16.2
	1	0.563	0.568	0.573	0.568	93.9	7.2
	0.5	0.586	0.587	0.600	0.591	97.7	2.7
con	-	0.086	0.070	0.077	0.078	17.0	
LPS	500ng/ml	0.473	0.459	0.442	0.458	100.0	
Com K	1	0.459	0.456	0.449	0.455	99.3	0.9
	0.5	0.450	0.441	0.428	0.440	96.0	4.8
	0.1	0.487	0.471	0.464	0.474	103.5	-4.2

시료	농도(ppm)	N1	N2	N3	평균	NO(%)	억제율(%)
con	-	0.108	0.083	0.084	0.092	19.1	
LPS	500ng/ml	0.481	0.475	0.487	0.481	100.0	0.0
Rb1	50	0.476	0.458	0.459	0.464	96.5	4.3
	25	0.475	0.453	0.447	0.458	95.3	5.8
	10	0.459	0.462	0.475	0.465	96.7	4.0
Rd	50	0.435	0.388	0.408	0.410	85.3	18.2
	25	0.434	0.433	0.458	0.442	91.8	10.1
	10	0.469	0.47	0.470	0.470	97.6	2.9
con	-	0.091	0.081	0.077	0.083	19.5	
LPS	500ng/ml	0.418	0.417	0.443	0.426	100.0	0.0
Com K	50	0.080	0.078	0.075	0.078	18.2	독성
	25	0.075	0.074	0.073	0.074	17.4	독성
	10	0.073	0.074	0.075	0.074	17.4	독성
Rg1	50	0.404	0.404	0.427	0.412	96.6	4.2
	25	0.410	0.399	0.417	0.409	95.9	5.1
	10	0.432	0.431	0.431	0.431	101.3	-1.6
con	-	0.091	0.083	0.089	0.088	18.2	
LPS	500ng/ml	0.479	0.481	0.484	0.481	100.1	-0.1
Rg2	50	0.455	0.462	0.481	0.466	96.9	3.8
	25	0.454	0.455	0.473	0.461	95.8	5.2
	10	0.451	0.446	0.447	0.448	93.1	8.4
Rg3	50	0.094	0.089	0.094	0.092	19.2	독성
	25	0.100	0.107	0.118	0.108	22.5	94.8
	10	0.235	0.255	0.288	0.259	53.9	56.4

② Cyclooxygenase II (COX-II) 활성 억제능

Ginsenoside Rb1와 Rg1은 COX-II 활성 억제능을 보였으나 Compound K는 효과가 없었다.

시료	농도(ppm)	N1	N2	평균	%B/B0	pg/ml	억제율(%)
Con		0.237	0.244	0.241	46.503	62.2	-
LPS		0.093	0.086	0.090	9.700	346.2	-
홍삼 EtOH	25	0.068	0.066	0.067	4.216	447.1	-35.6
	10	0.094	0.096	0.095	11.041	325.2	7.3
	5	0.139	0.149	0.144	22.983	186.3	56.2
Con		0.195	0.213	0.204	37.607	94.2	-
LPS	500ng/ml	0.065	0.064	0.065	3.607	460.0	-
Rg2	50	0.073	0.079	0.076	6.410	403.6	15.2
	25	0.081	0.082	0.082	7.750	379.2	21.9
	10	0.074	0.078	0.076	6.410	403.6	15.2
Con		0.227	0.240	0.234	44.796	67.4	-
LPS	500ng/ml	0.095	0.088	0.092	10.188	338.4	-
Rg1	50	0.187	0.202	0.195	35.291	104.9	86.0
	25	0.144	0.162	0.153	25.177	168.2	62.7
	10	0.131	0.133	0.132	20.058	213.6	45.9
Rg3	10	0.146	0.148	0.147	23.714	180.1	58.3
	5	0.132	0.109	0.121	17.256	243.4	34.9
	1	0.111	0.105	0.108	14.209	280.5	21.2
Con		0.243	0.239	0.241	46.624	61.9	-
LPS		0.098	0.098	0.098	11.772	314.3	-

Rb1	50	0.185	0.193	0.189	33.951	111.7	80.0
	25	0.149	0.147	0.148	23.958	178.0	53.7
	10	0.119	0.111	0.115	15.915	259.1	21.7
Rd	50	0.177	0.154	0.166	28.223	145.9	66.4
	25	0.172	0.166	0.169	29.076	140.2	68.7
	10	0.146	0.130	0.138	21.521	199.5	45.3
Com K	1	0.091	0.089	0.090	9.822	344.2	-12.0
	0.5	0.099	0.095	0.097	11.528	317.9	-1.5
	0.1	0.094	0.094	0.094	10.797	328.9	-5.9

③ 염증성 cytokine (TNF-a) 활성 억제능

Compound K를 비롯한 모든 ginsenosides가 TNF-a 억제능이 없었다.

시료	농도(ppm)	N1	N2	N3	평균	(pg/ml)	억제율(%)
con	-	0.051	0.047	0.051	0.050	211	
LPS	500ng/ml	0.302	0.284	0.280	0.289	16144	
홍삼 EtOH	5	0.197	0.222	0.241	0.220	11567	28.7
	1	0.230	0.233	0.233	0.232	12367	23.7
	0.5	0.278	0.260	0.242	0.260	14233	12.0
Rb1	50	0.287	0.331	0.321	0.313	17767	-10.2
	25	0.333	0.337	0.277	0.316	17944	-11.3
	10	0.344	0.345	0.288	0.326	18611	-15.5
Rd	50	0.329	0.275	0.278	0.294	16500	-2.2
	25	0.286	0.271	0.255	0.271	14944	7.5
	10	0.268	0.292	0.255	0.272	15011	7.1
K	1	0.242	0.210	0.192	0.215	9744	12.3
	0.5	0.220	0.184	0.190	0.198	8633	23.2
	0.1	0.203	0.186	0.162	0.184	7678	32.6
Rg1	50	0.322	0.296	0.221	0.280	15544	3.8
	25	0.319	0.369	0.222	0.303	17122	-6.1
	10	0.290	0.265	0.214	0.256	13989	13.5
Rg2	50	0.206	0.195	0.057	0.153	7078	56.9
	25	0.216	0.207	0.105	0.176	8633	47.1
	10	0.220	0.203	0.172	0.198	10122	37.8
Rg3	50	0.064	0.073	0.280	0.139	6167	독성
	25	0.090	0.107	0.302	0.166	7989	51.2
	10	0.187	0.205	0.278	0.223	11789	27.3

이상에서와 같이 염증억제력의 평가에 널리 사용되는 nitric oxide형성억제능과 COX-II활성 억제능 등의 평가법을 활용해 평가한 결과 Compound K를 비롯한 거의 모든 ginsenosides는 항염효과가 거의 없는 것으로 평가되었다.

(다) 피부 주름억제, ECM강화, 모발세포 활성화 평가

① 피부 세포 활성화 효능 평가

㉔ 피부섬유아세포 성장 촉진 효과

MTT법으로 측정된 피부세포 성장 촉진 효능 평가에서 홍삼추출물은 피부세포 성장효능을 보였지만 Compound K를 비롯한 모든 ginsenoside는 피부섬유아세포 활성화에 영향을 미치지 못하는 것으로 평가되었다.

시 료	농도($\mu\text{g}/\text{ml}$)	N1	N2	N3	평 균	증가율 (%)
홍삼 EtOH	Con	1542	1681	1998	1740.3	
	50	2033	2624	2342	2333.0	134.1
Gin Rg1	Con	2714	2354	2492	2520.0	
	50	2611	1900	2391	2300.7	91.3
Rg3	Con	1893	1949	2169	2003.7	
	10	1516	1514	1677	1569.0	78.3
Rb1	Con	1714	2613	2813	2380.0	
	50	2875	2485	2402	2587.3	108.7
Rd	Con	2735	3024	2723	2827.3	
	50	1169	1209	1064	1147.3	40.6
Com K	Con	2692	2366	2600	2552.7	
	1	2601	2363	2453	2472.3	96.9

㉕ Elastase 활성억제력 평가

Compound K를 비롯한 모든 ginsenoside가 elastase 효소 활성억제력이 없었다.

시료	농도	N1	N2	평균	억제율(%)
only 기질		8.1	9.2	8.6	
기질+효소		187.0	190.0	188.5	
inhibitor	0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	15.8	14.9	15.4	96.2
inhibitor	0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$	167.2	165.5	166.4	12.1
홍삼(EtOH)	100	194.4	192.1	193.3	(2.9)
	50	199.2	208.4	203.8	(8.8)
	25	198.9	196.8	197.9	(5.5)
	10	192.0	195.2	193.6	(3.1)
	5	181.2	184.2	182.7	3.0
Rb1	100	188.2	185.5	186.9	0.6
	50	185.9	186.2	186.1	1.1
	25	182.1	184.3	183.2	2.7
	10	196.4	194.3	195.4	(4.1)
Rd	100	185.2	186.0	185.6	1.3
	50	186.1	185.1	185.6	1.3
	25	186.0	184.8	185.4	1.4
	10	189.2	187.6	188.4	(0.2)
Com K	100	163.3	172.8	168.1	11.1
	50	168.2	170.8	169.5	10.3
	25	168.0	182.3	175.2	7.2
	10	190.8	188.2	189.5	(0.8)
	5	195.4	194.8	195.1	(4.0)
	1	186.7	187.9	187.3	0.4
Rg1	100	187.4	182.9	185.2	1.6
	50	186.1	182.6	184.4	2.0
	25	182.5	184.4	183.5	2.5
	10	179.0	176.7	177.9	5.7
Rg2	100	181.1	180.9	181.0	3.9
	50	181.2	178.1	179.7	4.7

	25	186.4	185.5	186.0	1.1
	10	183.3	181.1	182.2	3.2
Rg3	100	180.5	184.3	182.4	3.1
	50	181.8	179.0	180.4	4.2
	25	180.5	179.8	180.2	4.4
	10	186.8	189.0	187.9	0.1
	5	187.5	193.9	190.7	(1.5)
	1	180.2	181.3	180.8	4.0

② 모유두세포 활성화 평가

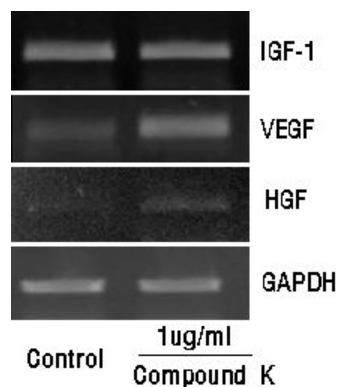
㉞ 모발세포 성장 촉진 효능 평가

Compound K를 비롯한 대부분의 ginsenoside는 사람의 모유두 세포 활성화 효능을 보였다.

시 료	농도	cpm 1	cpm 2	cpm 3	Average	St.Dev	증가율(%)	T Test
Control		4270	4308	4196	4258	57		
홍삼 EtOH	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	9299	11061	9354	9905	1002	232.6	0.0101
Control		4503	3886	3766	4052	395		
Compound K	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8159	11390	5827	8459	2794	208.8	0.1091
Control		3471	3818	3603	3631	175		
Ginsenoside Rb1	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4005	4574	7910	5496	2110	151.4	0.2648
Control		3441	3912	4100	3818	339		
Ginsenoside Rd	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	5260	7245	7749	6751	1316	176.8	0.0532
Control		3693	4106	4176	3992	261		
Ginsenoside Rg 1	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	7777	8593	9460	8610	842	215.7	0.0067
Control		3398	4858	4823	4360	833		
Ginsenoside Rg3	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8175	10384	6071	8210	2157	188.3	0.0757

㉟ 모발성장인자 유전자 발현 촉진 효과 평가

Compound K는 모발성장과 관련있는 VEGF와 HGF 유전자 발현 촉진 효능을 보였다.



이상의 결과를 1차년도 실험결과를 요약하면 Compound K는 모발성장 조절 효과를 보였으나, 항산화, 항염 및 피부세포 활성화 효능은 미미한 수준인 것으로 평가되었다.

(1) 2차년도 실험 결과: 용매 추출법으로 분리 정제한 compound K 지방산 유도체의 피부 대사 활성화 등 피부효능 평가 (Compound K를 대조군으로 비교 평가)

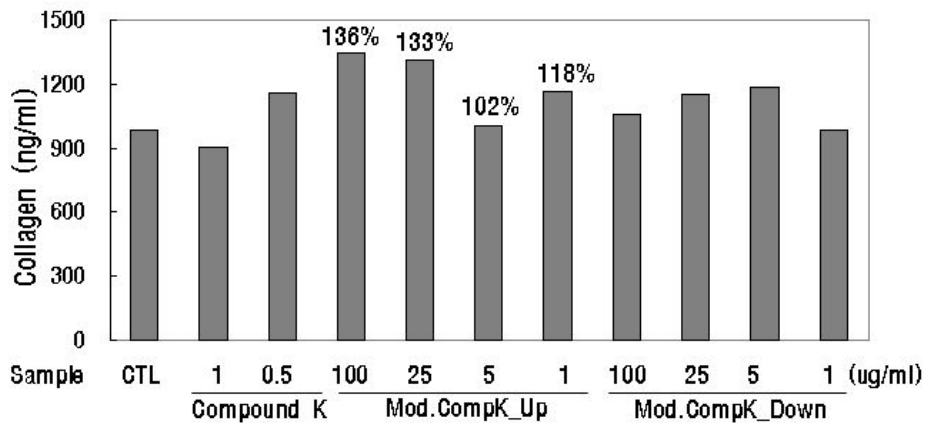
Compound K유도체들을 대상으로 화장품에서 필요로 하는 효능들을 평가하여 화장품 소재화 가능성 여부를 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다

(가) Extracellular Matrix(ECM) 강화 : 피부탄력 (주름억제)

① Collagen 합성 촉진 효과 (ELISA)

Compound K 유도체인 Mod. ComK_Up (상층)은 피부 주요 구성성분인 collagen 합성 촉진능력을 보였다.

시 료	농 도	N1	N2	평균	ng/ml	증가율(%)
Control	-	0.432	0.417	0.425	985.3	100
Compound K	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.392	0.408	0.400	903.7	91.7%
	0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.487	0.466	0.477	1158.7	117.6%
Mod.ComK_Up	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.549	0.517	0.533	1347.0	136.7%
	25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.555	0.489	0.522	1310.3	133.0%
	5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.435	0.426	0.431	1005.3	102.0%
	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.454	0.502	0.478	1163.7	118.1%
Mod.ComK_Down	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.449	0.446	0.448	1062.0	107.8%
	25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.482	0.466	0.474	1150.3	116.7%
	5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.484	0.486	0.485	1187.0	120.5%
	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.388	0.463	0.426	988.7	100.3%

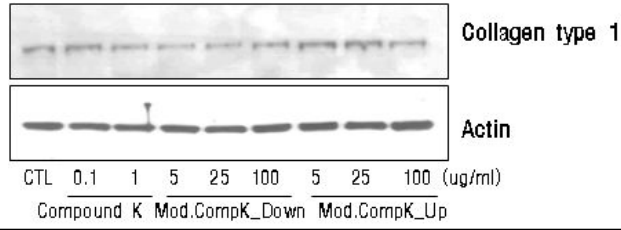


② Collagen 합성 촉진 효과 (Western Blotting)

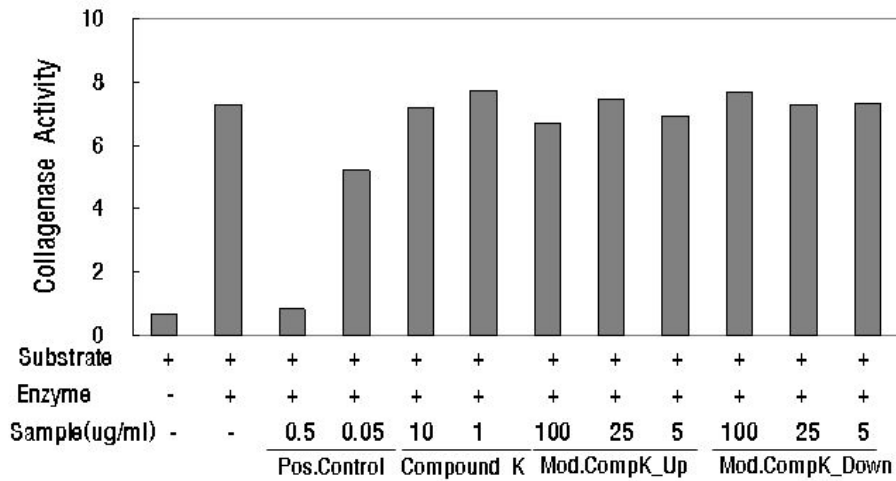
Compound K 유도체인 Mod.ComK_Up은 피부 주요 구성성분인 collagen의 합성을 약간 촉진시켰다.

③ Collagenase 활성 억제력

Compound K 및 그 유도체 2종 모두 collagenase 활성억제력은 없었다.



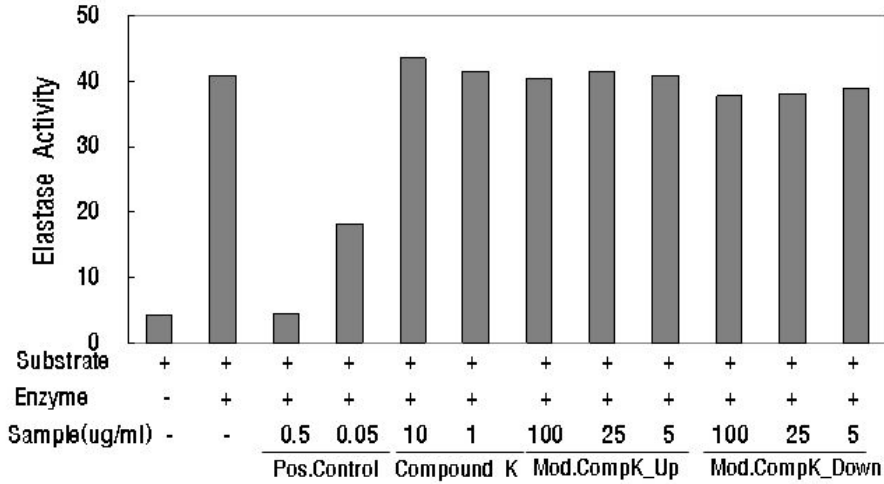
	농도	N1	N2	평균	억제율(%)
Substrate	-	0.662	0.690	0.676	-
Substrate+Enzyme	-	7.850	6.731	7.291	-
inhibitor	0.5 $\mu\text{g/ml}$	0.814	0.890	0.852	97.2
	0.05 $\mu\text{g/ml}$	5.301	5.134	5.218	31.3
Compound K	10 $\mu\text{g/ml}$	7.212	7.191	7.202	1.3
	1 $\mu\text{g/ml}$	7.757	7.711	7.734	(6.7)
Mod.ComK_Up	100 $\mu\text{g/ml}$	6.788	6.601	6.695	9.0
	25 $\mu\text{g/ml}$	7.577	7.319	7.448	(2.4)
	5 $\mu\text{g/ml}$	7.059	6.801	6.930	5.4
Mod.ComK_Down	100 $\mu\text{g/ml}$	7.782	7.625	7.704	(6.2)
	25 $\mu\text{g/ml}$	7.341	7.221	7.281	0.1
	5 $\mu\text{g/ml}$	7.362	7.332	7.347	(0.9)



④ Elastase 활성 억제력

Compound K 및 그 유도체 2종 모두 collagenase 활성억제력은 없었다.

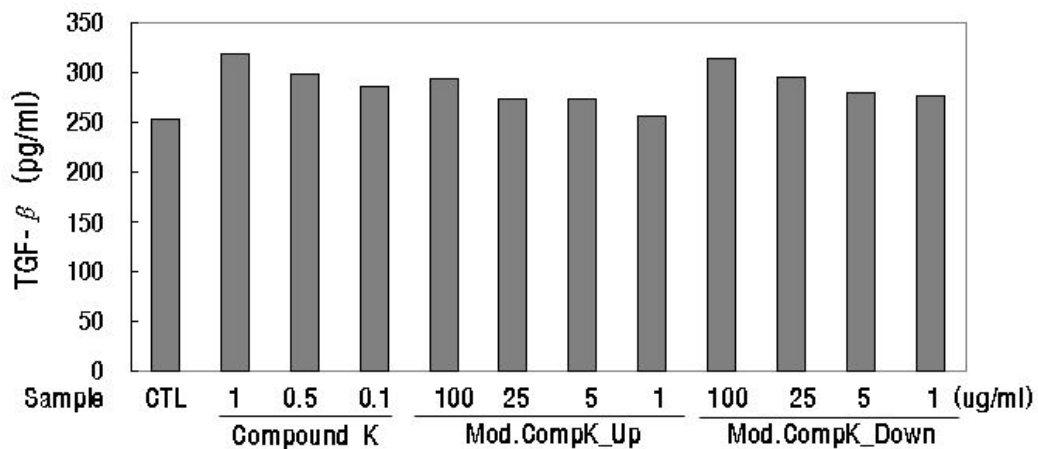
	농도	N1	N2	평균	억제율(%)
Substrate	-	4.203	4.375	4.29	
Substrate+Enzyme	-	41.25	40.44	40.85	
inhibitor	0.5 $\mu\text{g/ml}$	4.649	4.381	4.52	99.38
	0.05 $\mu\text{g/ml}$	18.33	18.32	18.33	61.61
Compound K	10 $\mu\text{g/ml}$	43.24	43.69	43.47	-7.15
	1 $\mu\text{g/ml}$	40.89	42.34	41.62	-2.09
Mod.ComK_Up	100 $\mu\text{g/ml}$	40.87	39.98	40.43	1.16
	25 $\mu\text{g/ml}$	41.24	41.9	41.57	-1.97
	5 $\mu\text{g/ml}$	40.34	41.52	40.93	-0.22
Mod.ComK_Down	100 $\mu\text{g/ml}$	37.35	38.4	37.88	8.14
	25 $\mu\text{g/ml}$	37.16	38.78	37.97	7.88
	5 $\mu\text{g/ml}$	44.83	32.87	38.85	5.47



⑤ TGF-β 합성 촉진 효과 (ELISA)

Compound K와 Mod. ComK_Down는 유사한 수준의 TGF-β 합성 촉진 효능을 보였다.

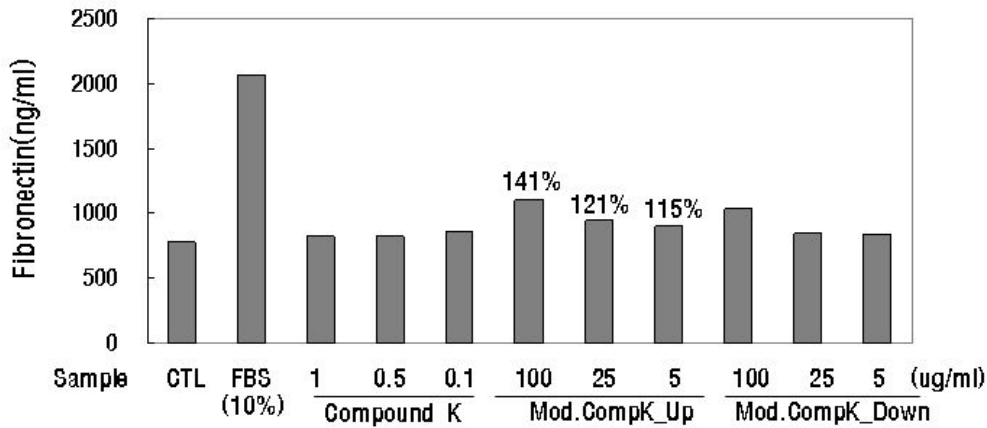
시 료	농 도	N1	N2	N3	평 균	정량(pg/m)	촉진율(%)
Control	-	0.214	0.211	0.216	0.214	253.9	100
Compound K	1μg/ml	0.235	0.231	0.234	0.233	319.4	126
	0.5μg/ml	0.235	0.221	0.225	0.227	298.3	118
	0.1μg/ml	0.224	0.226	0.220	0.223	286.1	113
Mod.ComK_Up	100μg/ml	0.229	0.220	0.228	0.226	293.9	116
	25μg/ml	0.217	0.229	0.213	0.220	273.9	108
	5μg/ml	0.218	0.226	0.215	0.220	273.9	108
	1μg/ml	0.214	0.218	0.212	0.215	257.2	101
Mod.ComK_Down	100μg/ml	0.229	0.228	0.238	0.232	313.9	124
	25μg/ml	0.216	0.231	0.232	0.226	296.1	117
	5μg/ml	0.220	0.221	0.223	0.221	279.4	110
	1μg/ml	0.210	0.212	0.239	0.220	276.1	109



⑥ Fibronectin 합성 촉진 효과 (ELISA)

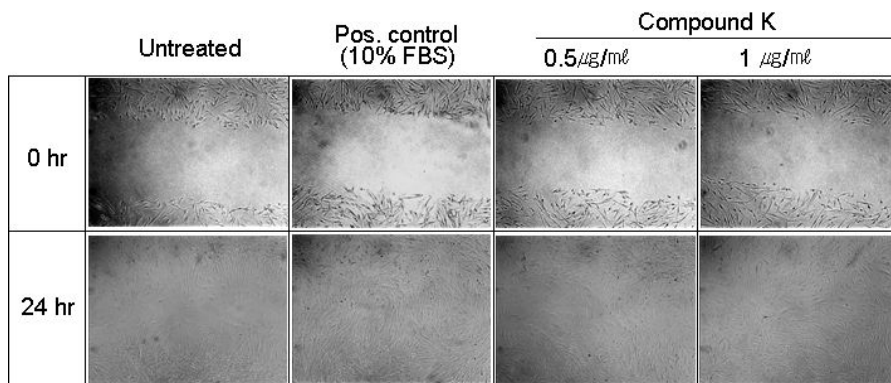
Mod. ComK_Up은 Compound K보다 우수한 fibronectin 합성 촉진 효과를 보였다.

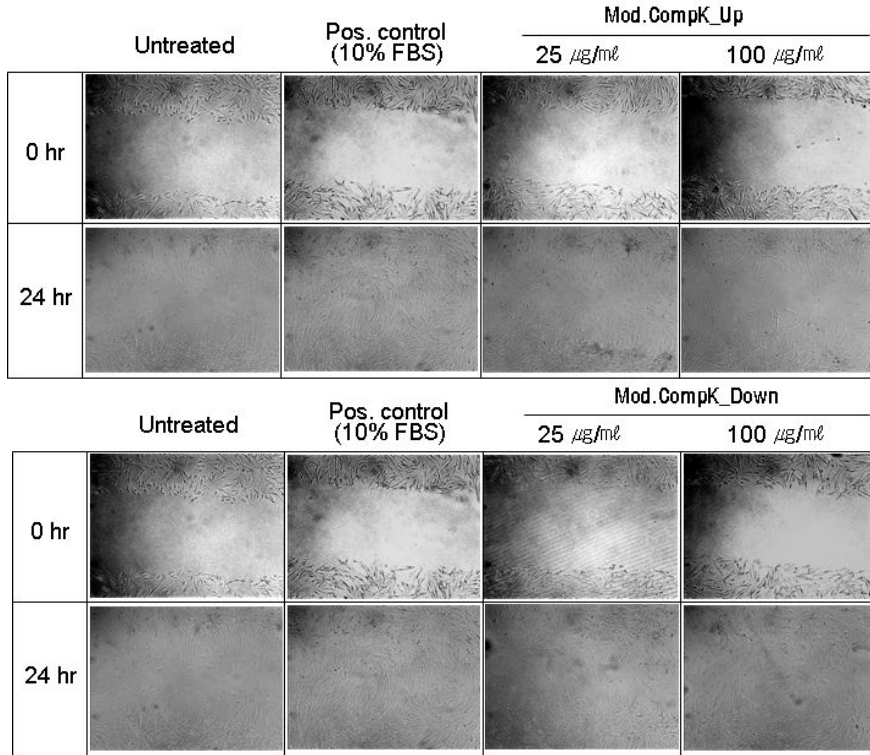
	농도	N1	N2	평균	정량(ng/ml)	촉진율 (%)
Control	-	0.136	0.143	0.140	780.7	100.0
Positive control	-	0.310	0.328	0.319	2062.9	264.2
Compound K	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.144	0.147	0.146	823.6	105.5
	0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.149	0.141	0.145	820.0	105.0
	0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.154	0.146	0.150	855.7	109.6
Mod.ComK_Up	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.181	0.188	0.185	1102.1	141.2
	25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.162	0.164	0.163	948.6	121.5
	5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.157	0.155	0.156	898.6	115.1
Mod.ComK_Down	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.181	0.169	0.175	1034.3	132.5
	25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.15	0.147	0.149	845.0	108.2
	5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.153	0.141	0.147	834.3	106.9



⑦ Cell Migration 촉진 효과

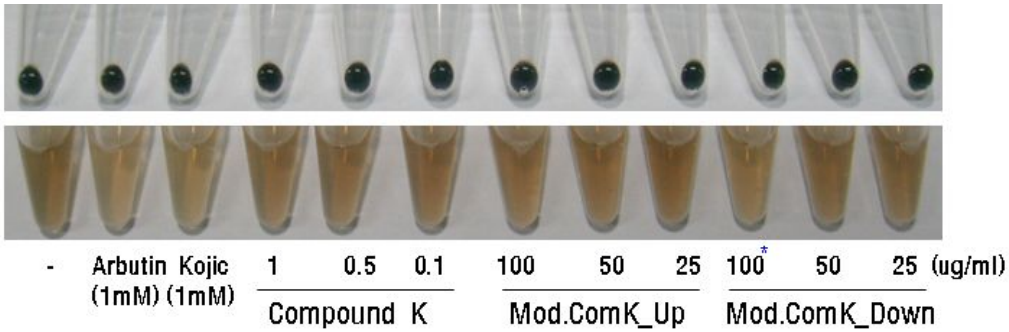
Compound K 및 그 유도체인 Mod. ComK_Down은 유사한 수준의 cell migration 촉진 효능을 보였다.





(나) 미백 효과

Compound K 및 그 유도체 2종 모두 피부 미백 효능이 없었다.

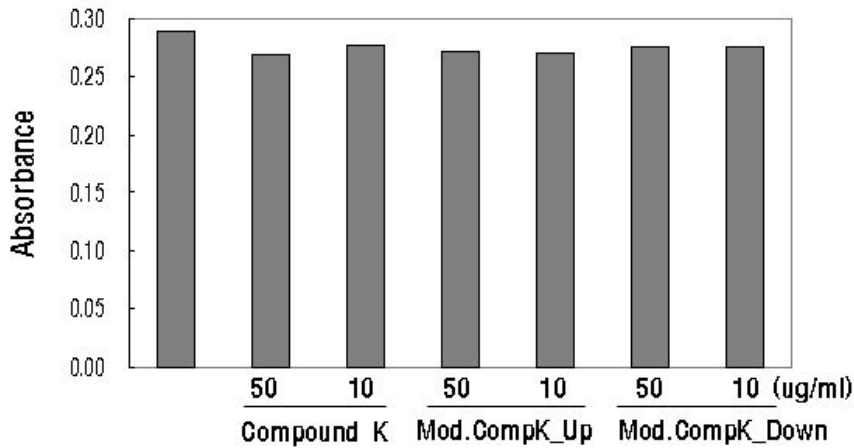


* : 약간의 세포독성으로 세암이 적어 실험결과 배제

(다) 항산화 효능 평가 (Radical scavenging activity)

Compound K 및 그 유도체 2종 모두 항산화효능이 없었다. .

시 료	농도	N1	N2	N3	Average	억제율(%)
Control	-	0.290	0.291	0.289	0.2900	-
Compound K	50ppm	0.260	0.273	0.277	0.2700	6.9
	10ppm	0.276	0.275	0.282	0.2777	4.3
Mod.ComK_Up	50ppm	0.276	0.275	0.265	0.2720	6.2
	10ppm	0.271	0.274	0.267	0.2707	6.7
Mod.ComK_Down	50ppm	0.276	0.274	0.277	0.2757	4.9
	10ppm	0.276	0.274	0.277	0.2757	4.9

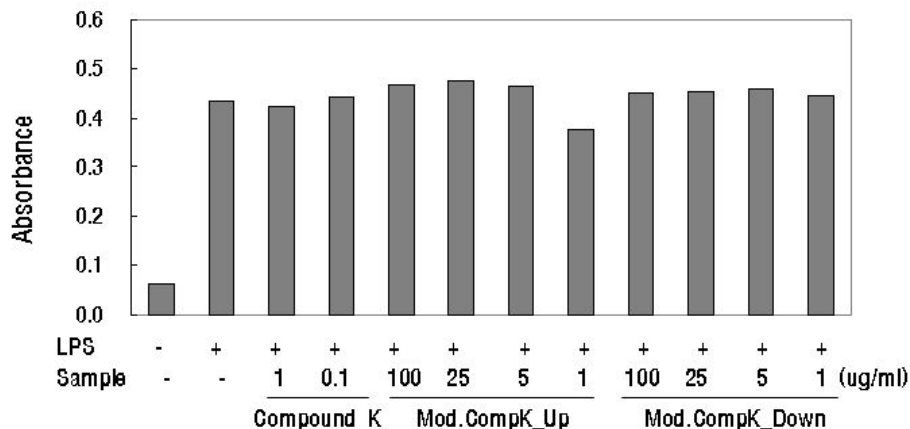


(라) 항염효능 평가

① Nitric oxide 생성억제능 평가

Compound K 및 그 유도체 2종 모두 LPS에 의해 대식세포에서 생산되는 nitric oxide 생성억제능이 없었다.

시 료	농도(ppm)	N1	N2	N3	평 균	NO억제력(%)
con	-	0.068	0.059	0.059	0.062	-
LPS	-	0.440	0.434	0.429	0.434	-
com K	1	0.423	0.436	0.419	0.426	2.2%
	0.1	0.436	0.447	0.450	0.444	-5.0%
Mod.ComK_Up	100	0.468	0.476	0.459	0.468	-6.1%
	25	0.481	0.489	0.459	0.476	-2.1%
	5	0.470	0.473	0.458	0.467	2.3%
	1	0.399	0.366	0.371	0.379	21.8%
Mod.ComK_Down	100	0.455	0.450	0.449	0.451	-22.9%
	25	0.465	0.455	0.444	0.455	-0.9%
	5	0.463	0.463	0.453	0.460	-1.3%
	1	0.440	0.446	0.454	0.447	3.3%

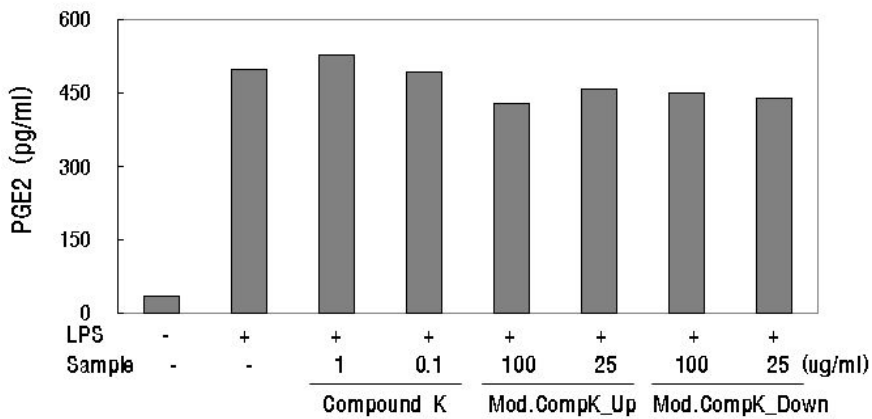


② Cyclooxygenase II (COX-II) 활성 억제능

Compound K 및 그 유도체 2종 모두 LPS에 의해 대식세포에서 유도되는 COX-2

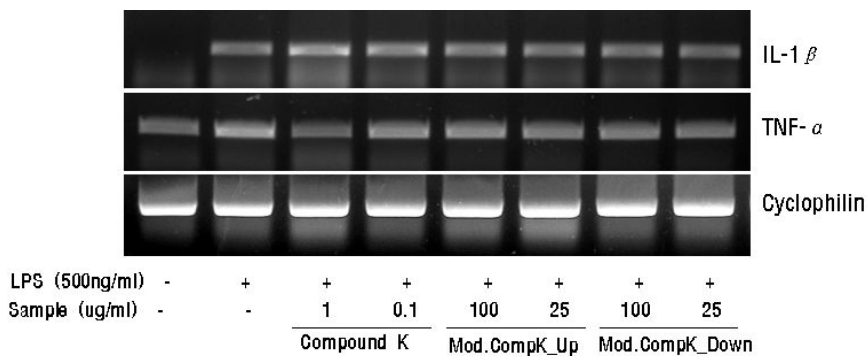
활성억제에 효과가 없었다.

시료	농도(ppm)	N1	N2	N3	평균	%B/B0	pg/ml	억제율(%)
CTL	-	0.297	0.292	0.292	0.294	59.359	34.2	-
LPS	500ng/ml	0.058	0.057	0.057	0.057	1.857	499.1	-
Compound K	1	0.050	0.054	0.053	0.052	0.641	528.2	(6.3)
	0.1	0.058	0.058	0.059	0.058	2.101	493.5	1.2
Mod.ComK_Up	100	0.070	0.071	0.071	0.071	5.101	429.0	15.0
	25	0.067	0.063	0.064	0.065	3.642	459.2	8.5
Mod.ComK_Down	100	0.066	0.065	0.068	0.066	4.047	450.6	10.4
	25	0.068	0.070	0.068	0.069	4.615	438.9	12.9



③ 염증성 cytokine (TNF- α) 생성 억제능 (RT-PCR)

Compound K 및 그 유도체 2종 모두 LPS에 의해 대식세포에서 유도되는 염증성 cytokines의 유전자 발현을 억제에 큰 효과가 없었다.



이상의 2차년도 실험결과를 요약하면 Compound K 유도체인 Mod. ComK_Up은 피부의 주요 구성성분인 collagen을 비롯하여 TGF- β 1 및 fibroectin의 합성을 촉진시키고 cell migration을 개선시키는 효능을 보여, ECM 강화 및 피부손상회복(wound healing) 소재 및 주름억제용 화장품 소재로 개발될 수 있을 것으로 평가되었다.

(1) 3차년도 실험 결과: HPLC로 분리 정제한 compound K 지방산 유도체 (Octanoyl Esterified Compound K; OECK)의 피부생리활성 효능 및 안전성 평가

(가) 서 론

피부 진피(dermis)를 구성하는 대표적인 세포인 피부섬유아세포는 피부를 지탱하고 피부탄력을 유지시키는 핵심적인 구성요소로 알려져 있다. 이들 섬유아세포는 collagen을 비롯하여 elastin, glycoproteins, proteoglycans 등 피부장벽을 구성하는 extracellular matrix (ECM)을 구성하는 물질을 합성하는 역할을 담당함으로써 피부 주름억제와 노화억제에 핵심적인 역할을 담당하고 있다. 피부섬유아세포에서 이들 ECM 물질들의 합성은 세포내에서 extracellular signal-regulated kinases (ERKs) 등 신호전달체제 (intracellular signaling cascades)의 작용에 의한 것으로 알려져 있다. 그러나 피부가 여러 환경변화에 따라 노화과정이 진행되면 피부세포들의 성장이 감소되면서, 피부섬유아세포들의 ECM 합성능이 점차 낮아지고 결국 주름과 피부탄력저하 등의 전형적인 피부노화 현상들이 발생하게 된다. 따라서 피부 노화억제 및 주름방지 화장품 개발을 위해서는 피부세포를 젊고 활발한 상태로 유지시키고, 그 활성을 증가시키는 약제의 개발이 핵심 key word로 인식되고 있으며, 이러한 효능을 지닌 물질을 개발코자 하는 노력이 활발히 진행되고 있다.

본 연구에서도 효소 전환기술로 제조하여 HPLC로 분리 정제한 Octanoyl Esterified Compound K (이하 OECK라 약함)가 피부 주름억제 효능을 지닌 화장품소재로 활용 가능한지의 여부를 평가하기 위하여 사람의 피부에서 분리 배양한 섬유아세포를 활용해 국제적으로 널리 활용되고 있는 평가법들을 이용해서 피부활성증진 효능과 화장품소재에 요구되는 기본적인 안전성 평가를 실시하여 긍정적인 결과를 얻었다.

(나) 실험물질의 세포독성 평가

섬유아세포는 최대 실험농도 (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서도 90% 이상 생존하는 것으로 평가되어 반수치사농도 (MIC₅₀)이 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상인 안전한 물질인 것으로 평가되었다 (Figure 37).

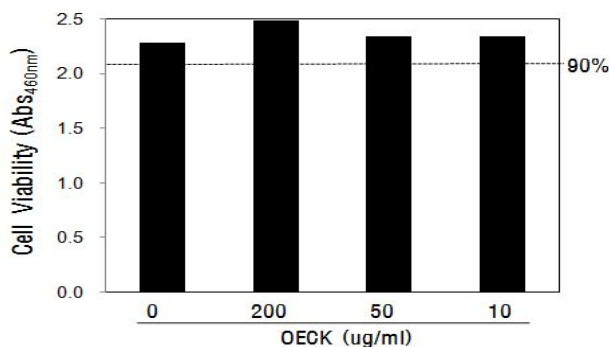


Figure 37. Cytotoxicity of Octanoyl Esterified Compound K (OECK) in dermal fibroblasts determined by MTT assay.

(다) 피부섬유아세포 (Dermal fibroblasts Cells) 성장 촉진 효과

OECK가 피부의 피부섬유아세포의 활성 증진에 미치는 효능을 평가하기 위하여 일차적으로 [³H]thymidine uptake assay를 통해 실험물질이 세포의 증식활성에 미치는 영향을 평가하였다.

평가 결과 OECK는 피부섬유아세포의 [³H]thymidine uptake을 농도 의존적으로 증가시켜 섬유아세포 성장 촉진 효능에 유효한 물질임을 확인하였다 (Table 2, Figure 38).

Table 2. Effect of Octanoyl Esterified Compound K (OECK) on the growth of human dermal fibroblasts.

	Samples	Ave.±St.Dev.	Results
Exp. 1	Control	1,914± 49	280.0%*
	OECK (200ppm)	5,360±107	
Exp. 2	Control	2,220±310	164.6%*
	OECK (50ppm)	3,653±513	
Exp. 3	Control	1,949±231	102.3%
	OECK (10ppm)	1,993±292	

* p < 0.05 vs. control, n=3; n=3(*p<0.05).

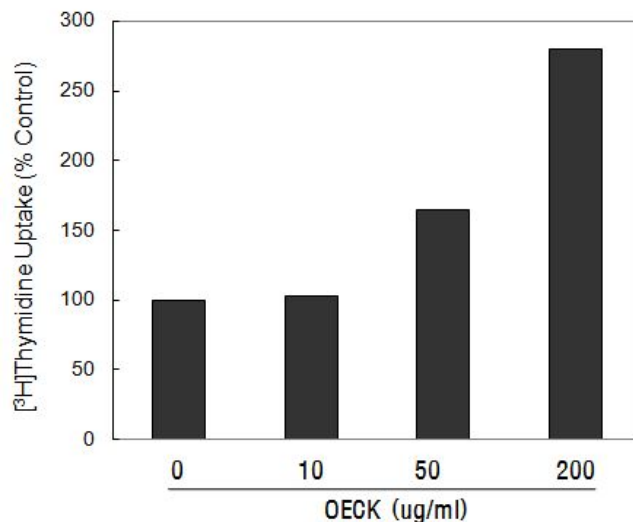


Figure 38. Effect of Octanoyl Esterified Compound K (OECK) on the growth of human dermal fibroblasts cultured *in vitro*. The dermal fibroblast cells were treated with OECK at the indicated concentrations for 2 d in the presence of [³H]thymidine. The dermal fibroblasts were lysed with 0.1 N NaOH and the amount of radioactivity was measured by a liquid scintillation counter.

(라) 세포외기질 (Extracellular matrix) 강화 효과

피부세포의 성장을 촉진 효능을 지닌 약효물질은 피부를 구성하며 피부장벽(skin barrier)으로 작용하는 extracellular matrix의 합성을 강화시키는 효능을 지니는 경우가 많다. ECM은 조직 내 또는 세포외의 공간을 채우고 있는 생체고분자의 복잡한 집합체로, 피부조직의 지지와 결합과 탄성 등의 물리적 지지와 피부 주름 발생 및 탄력에 중요한 역할을 한다. 이에 본 연구에서는 피부섬유아세포 성장촉진 효과가 확인된 OECK가 ECM 구성요소의

핵심이며 피부주름과 일차적인 관련성을 지닌 콜라겐의 합성 촉진 효능이 있는지의 여부를 평가하였다. 콜라겐 합성 촉진 평가는 국제적으로 널리 활용되고 있는 ELISA 평가법과 Western blotting 평가법 등 두 가지 평가법을 활용해 실시하였다.

① Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

OECK는 피부섬유아세포에서 pro-collagen 합성을 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 35.1%, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 51.6% 증가시키는 것으로 평가되어 농도 의존적인 콜라겐합성 촉진효과를 보였다 (Table 3, Figure 39).

Table 3. Effect of Octanoyl Esterified Compound K (OECK) on the pro-collagen synthesis in dermal fibroblasts by ELISA.

	Samples	Ave.±St.Dev.	Results
Exp. 1	Control	140.4±28.0	111.9%
	OECK (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	157.1±37.6	
Exp. 2	Control	128.0± 8.8	135.1%*
	OECK (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	172.9±17.8	
Exp. 3	Control	152.4±14.7	151.6%*
	OECK (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	231.1±24.4	

* $p < 0.05$; $n=3$

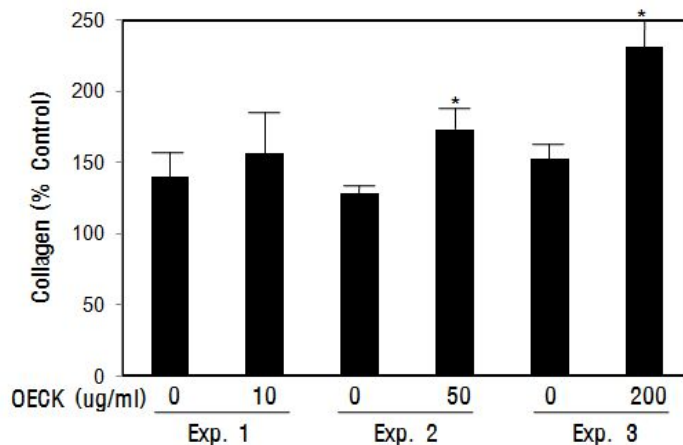


Figure 39. Effect of Octanoyl Esterified Compound K (OECK) on the pro-collagen synthesis in dermal fibroblasts by ELISA. The cells were treated with OECK at the indicated concentrations for 2 days. The conditioned medium was collected, and the secreted procollagen type was measured by ELISA kit. The results are shown as percentage of the control±standard deviation (SD) (* $p < 0.05$ vs. control).

② Western Blotting

OECK는 Western blotting에서도 농도 의존적으로 피부를 구성하는 핵심 단백질인 collagen

type 1 α 1과 2, 그리고 elastin 단백질의 합성을 증가시켜, ELSIA와 실험결과와 일치하였다 (Figure 40).

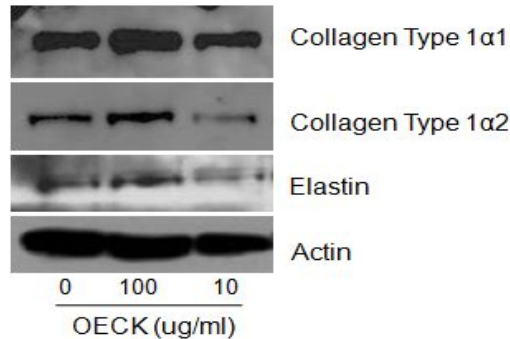


Figure 40. Effect of Octanoyl Esterified Compound K (OECK) on intracellular signaling pathway. The cells were treated with OECK for the indicated time points. The cellular proteins were prepared and the phosphorylations of collagen type 1 α 1 & 2 and elastin were determined by Western blot analysis.

③ Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

OECK가 피부섬유아세포에서 피부장벽 강화를 위해 필수적인 ECM 생산과 관련된 유전자의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 평가 결과 OECK는 피부를 구성하는 대표적인 세포인 fibroblasts와 keratinocytes의 합성에 관여하는 fibroblast growth factor receptor-1 (FGF-1)와 keratinocyte growth factor (KGF) 유전자 발현을 증가시켰다. 이 결과는 앞선 실험결과와 함께 OECK가 피부조직 강화에 도움이 됨을 확인시켜주는 결과라 할 수 있다 (Figure 41).

(마) Wnt/ β -catenin signaling cascade

Wnt/ β -catenin signaling이 피부의 발생학적으로 모발과 피부형성, 그리고 자외선 등에 의해 유발되는 피부손상의 회복에 주요 인자로 작용하는 것은 이미 잘 알려져 있다. 따라서 본 연구에서도 앞선 실험에서 collagen 합성 촉진 효능을 보인 OECK가 모발성장의 핵심세포인 모유두세포에서 Wnt/ β -catenin signaling에 작용하는지의 여부를 평가하였다. 실험결과 OECK는 Wnt/ β -catenin signaling을 활성화시키는 것으로 평가되었다. 즉 OECK는 50 μ g/ml의 농도에서 60.9%, 10 μ g/ml에서 52.5%, 1 μ g/ml에서 12.7% β -catenin 합성을 촉진시켰다 (Table 4, Figure 42).

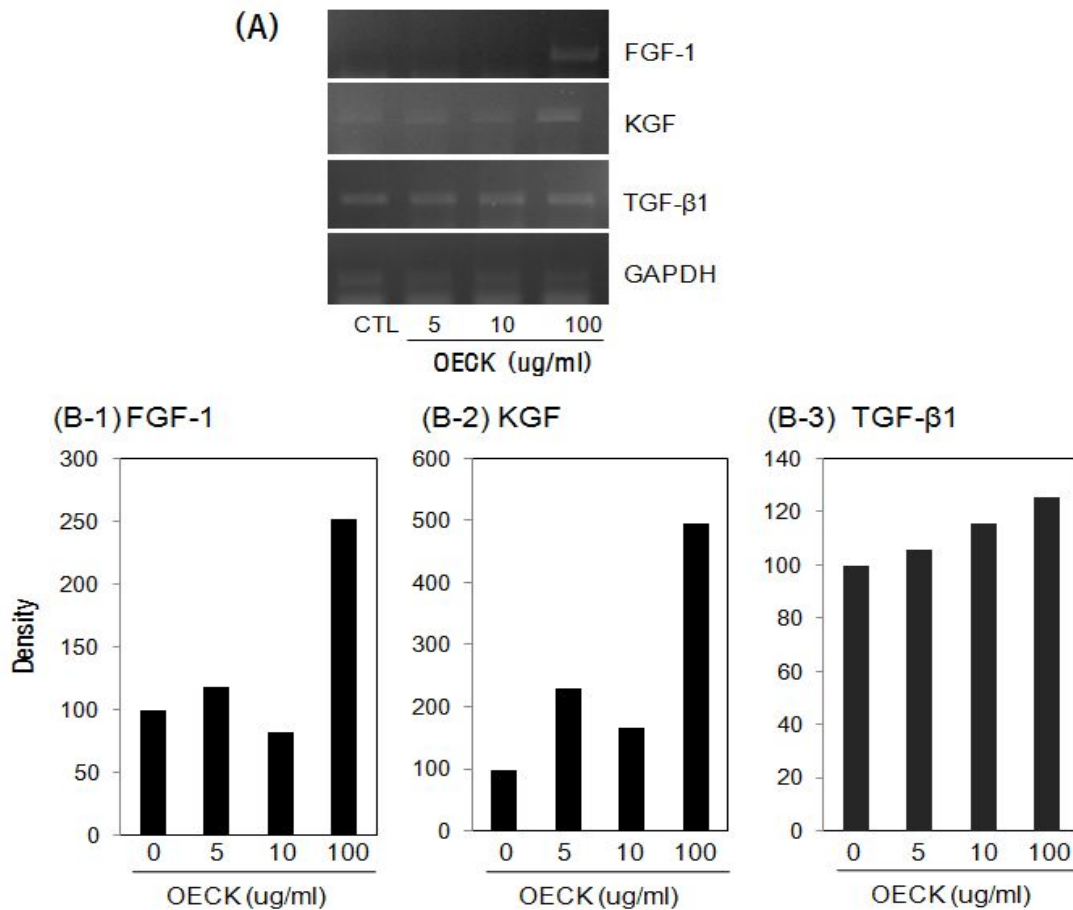


Figure 41. Effect of Octanoyl Esterified Compound K (OECK) on the mRNA level of growth factors in dermal fibroblasts by semi-quantitative RT-PCR analysis. The dermal fibroblasts were cultured with OECK as indicated concentrations for 18 h. (A) Total RNA was isolated from control fibroblast cells and cells treated with adenosine, reverse-transcribed, and polymerase chain reaction was performed. (B) Quantification of RT-PCR products for each growth factors using densitometer. The amount of RT-PCR products for each growth factors was corrected according to the quantity of G3PDH and expressed as a percentage of control. Fibroblast growth factor receptor-1 (FGF-1), Keratinocyte growth factor (KGF), TGF-β1, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH).

Table 4. Effects of Octanoyl Esterified Compound K (OECK) on the transcriptional activity of β -catenin in dermal papilla cells.

Samples	Luciferase Activity (Aver \pm SD)	Results
Control	344,424 \pm 26,581	-
OECK (100 μ g/ml)	492,230 \pm 15,825	142.9 %
OECK (50 μ g/ml)	554,289 \pm 9,033	160.9 %
OECK (10 μ g/ml)	525,085 \pm 5567	152.5 %
OECK (1 μ g/ml)	388,258 \pm 11,270	112.7 %

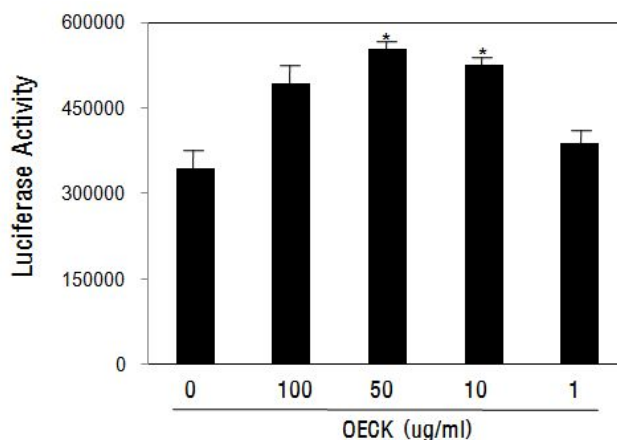


Figure 42. Effects of Octanoyl Esterified Compound K (OECK) on the transcriptional activity of β -catenin in the dermal papilla cells. SV-DP cells transduced with pTOPFLASH-luc reporter adenovirus were treated with OECK for 24h, and the cellular extracts were prepared. Transcriptional activities of β -catenin were determined using luciferase assay and expressed as percentage of control. (* P <0.05 vs. control).

(바) OECK가 intracellular signaling cascade에 미치는 영향

피부세포 내에는 외부 환경변화에 대응하는 다양한 신호전달체계가 존재하여, 이들의 작용이 피부세포에서 ECM 생산 조절에 중요한 역할을 담당함은 잘 알려진 사실이다. 자연노화나 광노화에 의해 유발되는 주름의 발생을 억제하는데 중요한 역할을 담당하는 collagen을 비롯한 ECM 성분들은 피부세포 내에서 다양한 신호전달체계에 의해 합성이 촉진되거나 억제된다. 이에 본 연구에서는 앞선 실험에서 피부섬유아세포 성장과 collagen 합성 촉진 효능이 우수한 것으로 확인된 OECK가 세포내 어떤 신호전달체계의 활성화에 의해 유발되는 지의 밝혀 OECK의 작용기전을 보다 체계적으로 입증코자 하였다.

실험결과 OECK는 흥미롭게도 p42/44 ERK, p38 MAPK, AKT 및 CREB 등의 transcription factor의 phosphorylation을 촉진시켜, OECK가 multiple intracellular signal transduction에 작용해 ECM 구성성분들의 발현에 영향을 미침을 추측케 하였다 (Figure 43).

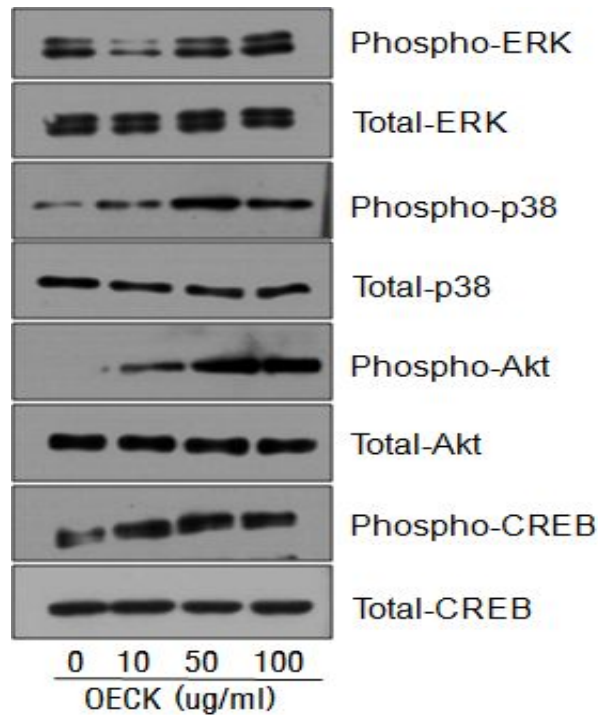


Figure 43. Effects of Octanoyl Esterified Compound K (OECK) on the phosphorylation of p42/44 ERK, p38 MAPK, CREB and AKT. The dermal fibroblast cells were lysed in Proprep solution after adenosine treatment at different concentrations for 30 min. Total proteins from cell lysates were analysed by using primary antibodies for total-p42/44 ERK, phospho-p42/44 ERK, total-p38 MAPK, phospho-p38 MAPK, total-AKT, Phospho-AKT, total-CREB, Phospho-CREB and β -actin.

(사) Collagenase와 elastase 활성 억제력 평가

피부 장벽강화를 위해서는 collagen과 elastin 등의 ECM 성분의 합성 촉진과 함께 분해를 억제하여 피부 ECM 함량을 증가시키는 것이 중요하다. 이에 본 연구에서는 ECM강화 효능을 보인 OECK가 collagen과 elastin을 분해하는 collagenase와 elastase 활성을 억제시키는 작용을 하는지의 여부를 *in vitro* enzyme assay를 통해 평가하였다.

① Collagenase 활성 억제력

EnzCheck Collagenase assay kit (invitrogen, 미국)를 이용한 평가 결과 OECK는 collagen을 분해하는 효소인 collagenase의 활성을 억제시키지 못했다 (Table 5, Figure 44)

Table 5. Effects of Octanoyl Esterified Compound K (OECK) on collagenase activity by *in vitro* enzyme assay.

Samples	Collagenase activity	Results
Substrate	0.533±0.023	-
Substrate+Enzyme	5.484±0.104	-
Pos.CTL (0.5 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$)	0.899±0.066	92.5 %
OECK (100 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$)	5.405±0.016	1.5 %
OECK (50 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$)	5.283±0.122	4.0 %
OECK (10 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$)	5.556±0.090	-1.5 %

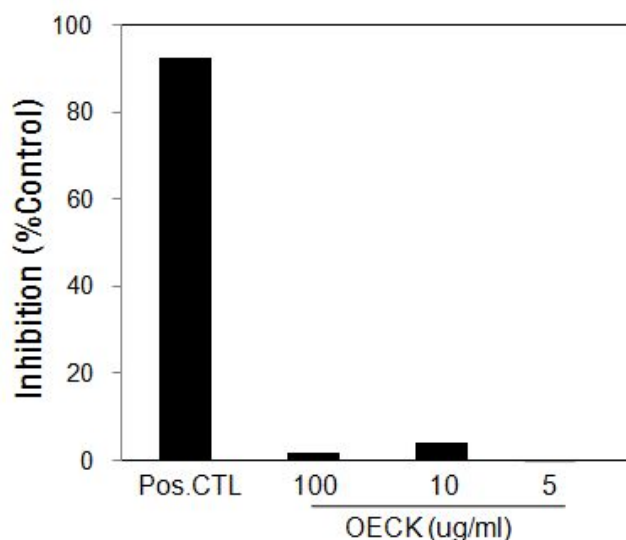


Figure 44. Effects of Octanoyl Esterified Compound K (OECK) on collagenase activity by *in vitro* enzyme assay.

Pos.CTL: 1,10-phenanthroline, monohydrate

② Elastase 활성 억제력

EnzCheck Elastase assay kit (In Vitrogen, 미국)를 이용한 평가 결과 OECK는 elastin을 분해하는 효소인 elastase의 활성을 억제시키지 못했다 (Table 6, Figure 45)

Table 6. Effects of Octanoyl Esterified Compound K (OECK) on elastase activity by *in vitro* enzyme assay.

Samples	Collagenase activity	Results
Substrate	9.24±0.11	-
Substrate+Enzyme	29.66±1.45	-
Pos.CTL (0.01mM)	9.40±0.23	99.2 %
OECK (100 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$)	28.55±0.41	5.6 %
OECK (50 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$)	28.62±0.57	5.3 %
OECK (10 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$)	28.91±0.26	3.9 %

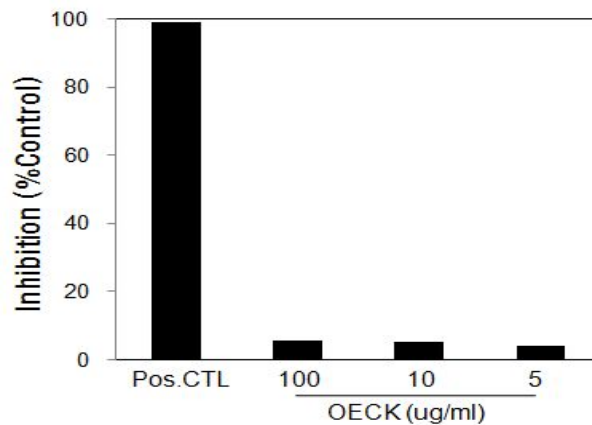


Figure 45. Effects of Octanoyl Esterified Compound K (OECK) on elastase activity by *in vitro* enzyme assay.

Pos.CTL: N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pto-Val- chloromethyl ketone

(아) OECK의 안자극성 평가

시험물질 Octanoyl Esterified Compound K가 화장품 소재로 활용되기 위해서 요구되는 안점막에 대한 자극성을 평가하기 위하여 실시하였다. 시험결과 (Table 7, Figure 46), 1% OECK (용제 1,3-butylene glycol)를 1회 투여 후 1, 24, 48, 및 72시간 후에 각막, 홍채 및 결막의 손상여부를 1,3-butylene glycol만 투여한 대조측과 비교해 관찰 했을 경우에 각막의 화농이나 혼탁 및 홍채의 충혈을 관찰 할 수 없었으며, 홍채의 빛에 대한 민감도도 정상범위였다. 또한 결막에서도 안검 및 안구의 발적이나 부종이 관찰 되지 않았다. 본 실험에 사용된 시험물질은 제품에 사용되는 농도보다 20배 수준인 점을 감안할 때 제품으로 사용될 농도의 OECK는 어떠한 안자극도 유발하지 않는 안전한 제제로 판단된다.

Table 7. Eye irritation of Octanoyl Esterified Compound K (OECK) by OECD guidelines.

	No	Cornea			Iris		Conjunctive				합계
		흔탁 (A)	흔탁 범위 (B)	AxB x5	반응 (A)	Ax5	발적 (A)	결막 부종 (B)	배출물 (C)	(A+B+C) x2	
1hr	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0		0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Average (합계/6)										0
24hr	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0		0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Average (합계/6)										0
48hr	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0		0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Average (합계/6)										0
72hr	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0		0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Average (합계/6)										0

(자) OECK의 피부자극성 평가

시험물질인 OECK를 화장품 소재로 활용하기 위해서 요구되는 피부자극성 평가를 실시하였다. 시험결과 (Table 8), OECK를 투여 한 후, 시료에 의한 것으로 인정되는 어떠한 피부 자극도 관찰되지 않았다. 이상의 시험결과를 요약해 볼 때 본 시험물질인 OECK는 피부에 접촉했을 때 어떠한 피부 자극도 유발하지 않는 안전한 제제로 판단된다.

Table 8. Skin irritation of Octanoyl Esterified Compound K (OECK) by OECD guidelines.

	No.	Erythema & Eschar Formation				Oedema Formation			
		1 hr	24 hr	48 hr	72 hr	1 hr	24 hr	48 hr	72 hr
Control Group	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Test Group	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0

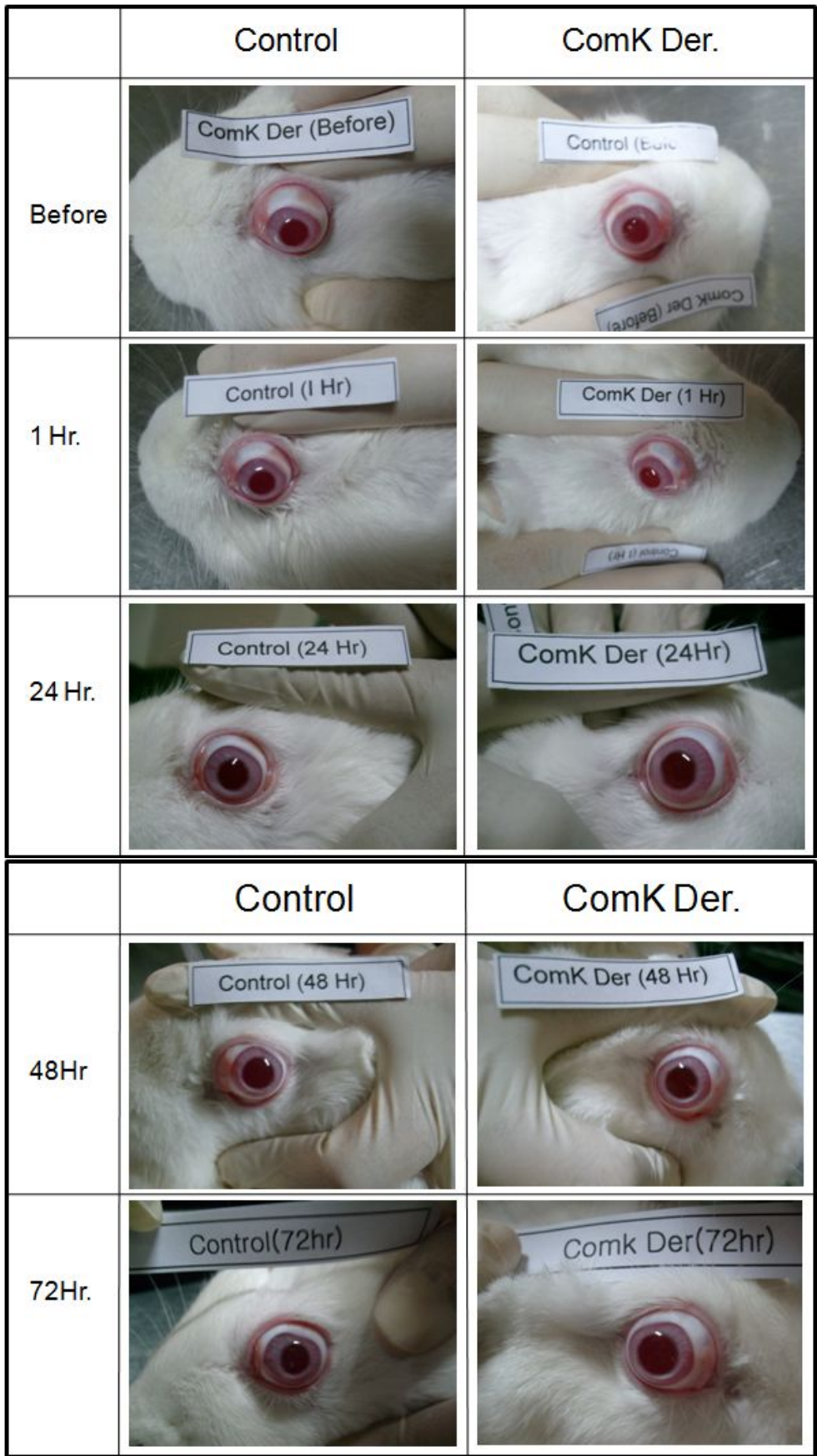


Figure 46. Eye irritation of Octanoyl Esterified Compound K (OECK) by OECD guidelines.

바. 기능성 화장품 처방 개발

Collagen 합성 촉진 효능을 지닌 주름개선 기능성 화장품을 전문연구개발 기업인 (주)피코스텍의 도움을 받아 개발하였다. 우선 화장품의 기초품질과 함께 피부 사용감 강화 및 피부 보습효과 강화를 위해 fatty acid, wax, polyol계 등 occlusive agent와 humectant를 이용하였으며, 피부장벽 강화를 위해 ceramide 등을 이용하여 기본 emulsion base 처방을 연구하였다. 제조된 최종 목표 화합물 OECK는 화장품에 널리 사용되는 용매인 1,3-buthylene glycol과 propylene glycol에 잘 용해되는 것으로 확인되어, OECK을 사용한 피부 효능 실험을 바탕으로 하여 화장품 처방의 기본 골격에 50 ppm 농도 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)인 0.05 % (w/v)의 OECK를 함유하는 주름개선 기능성 화장품의 시제품 처방을 개발하였으며, collagen 합성효능을 지닌 기능성소재인 OECK와 함께 collagen의 분해를 억제시키는 천연소재와 함께 피부장벽을 강화시키는 기능성 소재를 함께 적용하여 OECK와 주름억제 synergy 효과를 추구하는 처방을 개발 한 후 경시안전성이 유지되는 최적의 화장품 처방을 결정하였다.

이하의 제시한 처방은 주름개선 기능성 물질인 OECK를 함유하는 크림 처방만을 적시하였으나, 최종 제품화의 경우 크림, 로션, 에센스, 스킨, 부스터, Wrinkle filler 등의 주름 기능성화장품 제품군으로 하나의 브랜드화 해야 할 것으로 사료된다 (Table 9, Figure 47).

Table 9. Development of cream formulation containing Octanoyl Esterified Compound K.

용도	검토원료	검토합량 (wt%)
보습제	Glycerin, Propylene Glycol, 1,3 Butylene Glycol, Sorbitol, Sodium Lactate, PEG, PCA- Na	5 ~ 20
유성성분	Phenylmethicone, Cyclomethicone, Dimethiconol, Fatty Ester, She Butter Camellia Oil, Macademia Nut Oil, Jojoba Oil, Avocado Oil, Squalane	10 ~ 30
유화제	POE Alkyl Ether, Tween, Span POE Alkyl Ester, Glyceryl Eater, POE Glyceryl Ester	2 ~ 5
유화보조제	Cethyl Alcohol, Stearyl Alcohol	1 ~ 5
점증제	Carbopol, Xanthan Gum, Lubragel	0.2 ~ 2
피부장벽강화	천연추출물, Ceramide, Phytospingosine	0.0 ~0.5
유효성분 (주름기능성)	OECK	0.05
방부제	Paraben 등 (무방부 처방 적극 검토)	0.1 ~0.5
안정제	EDTA, Citrate	0.1 이하
용제	Deionized Water	Balanced to 100%



Figure 47. Development of cream formulation containing Octanoyl Esterified Compound K.

이상과 같이 3차년도에서 Octanoyl Esterified Compound K (OECK)가 피부 주름과 탄력 조절에 핵심적인 역할을 담당하는 피부섬유아세포의 활성화에 미치는 영향과 안전성을 종합 평가하면 다음과 같다.

- ① OECK는 피부섬유아세포에서 [³H]thymidine uptake을 농도 의존적으로 증진시켜 섬유아세포 성장 촉진 효능을 보였다.
- ② ELISA를 이용한 평가에서 OECK는 피부섬유아세포에서 collagen 합성을 촉진시켰다. Western blotting에서도 OECK의 collagen 합성 촉진효과가 입증되어, ELISA 실험결과와 일치하였다.
- ③ OECK는 피부섬유아세포에서 대표적인 피부 구성 세포인 fibroblast와 keratinocyte의 합성에 관여하는 fibroblast growth factor receptor-1 (FGF-1), keratinocyte growth factor (KGF) 유전자의 발현을 증가시켰다.
- ④ OECK는 피부섬유아세포에서 p42/44 ERK, p38 MAPK, AKT 및 CREB 등의 transcription factors의 인산화를 촉진시켰다. 이는 OECK가 multiple intracellular signal transduction에 작용해 collagen을 비롯한 ECM 구성성분들의 발현에 작용할 수 있음을 추측케 한다.
- ⑤ OECD guideline 등에 준하여 OECK의 자극성을 평가한 결과 OECK는 안자극성, 피부자극성 및 세포독성이 없는 안전한 물질인 것으로 평가하였다.
- ⑥ OECK를 주성분으로 하는 크림제형의 기초화장품 일차 처방을 개발하였다.

즉, OECK는 피부섬유아세포를 자극해 세포성장과 collagen 합성을 촉진하며, 이 과정에서 ERK, p38 MAPK, AKT, CREB 등 multiple intracellular signal transduction이 작용하는 것으로 사료되며, OECK는 화장품소재로 활용되기 위해 필수적으로 요구되는 안자극성, 피부자극성 평가에서 화장품에 사용하기 적합한 수준으로 안전한 소재인 것으로 평가되었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연도별 연구개발 목표의 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2008)	진세노사이드 대사체의 지방산 에스터 화합물의 개발	Palmitic acid 에스터화 compound K의 소량 제조	100	진세노사이드 유도체의 효소적 전환 진세노사이드 유도체의 화학합성
	진세노사이드 지방산 에스터의 정제 및 구조 규명	Palmitic acid 에스터화 compound K의 분석, 소량 분리 정제 및 구조분석	100	반응생성물의 분석 조건 확립 진세노사이드 유도체의 소량 정제법 확립
	진세노사이드 지방산 에스터의 피부활성 효능 규명 및 기능성 화장품의 개발	Compound K, 진세노사이드 및 지방산 에스터 유도체의 피부 효능 비교 평가	100	진세노사이드의 피부대사활성화 평가 우수 생리활성 진세노사이드의 선별

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 연도 (2009)	진세노사이드 대사체의 지방산 에스터 화합물의 개발	진세노사이드 에스터 화합물 제조방법의 전환수율 증대 및 대량 생산	100	최적 효소반응 조건 확립 compound K 지방산 에스터 화합물의 대량 생산 다양한 진세노사이드 지방산 에스터 유도체의 합성
	진세노사이드 지방산 에스터의 정제 및 구조 규명	다양한 지방산 에스터 진세노사이드 유도체의 분석, 소량 분리 정제, 구조분석	100	반응생성물의 분석 조건 및 구조분석 진세노사이드 유도체의 분리 정제법 확립
	진세노사이드 지방산 에스터의 피부활성 효능 규명 및 기능성 화장품의 개발	진세노사이드 유도체의 피부효능 평가	100	compound K 지방산 에스터 화합물의 피부대사 활성화 등 피부효능 평가를 통해 최종 후보물질 선정

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 연도 (2010)	진세노사이드 대사체의 지방산 에스터 화합물의 개발	진세노사이드 에스터 화합물 제조방법의 전환수율 증대 및 대량 생산	100	compound K 지방산 에스터 화합물의 대량 생산
	진세노사이드 지방산 에스터의 정제 및 구조 규명	진세노사이드 유도체의 분석, 분리 정제 및 구조분석, 원료 안정성 평가, DDS (피부흡수율) 평가	90	반응생성물의 분석 조건 및 구조분석 진세노사이드 유도체의 분리 정제법 확립
	진세노사이드 지방산 에스터의 피부활성 효능 규명 및 기능성 화장품의 개발	진세노사이드 유도체의 피부효능 규명, 안전성 평가, 기능성 화장품의 시제품 개발	100	진세노사이드 유도체의 주름억제효능 입증 : 피부세포 성장 촉진 효능 입증 : Collagen 등 extracellular matrix 강화를 통한 주름억제 효능 확인 : 주름억제효능을 유도하는 피부세포내 신호전달기전을 규명 안전성 평가자료 확보 : 안자극성 자료 : 피부자극성 자료 기능성 또는 일반화장품의 시제품 생산 : 주름 기능성 화장품

제 2 절 관련분야의 기술발전 등에의 기여도

1. 유기용매에서 고정화 lipase를 이용한 진세노사이드 지방산 에스터 유도체의 합성 기술 (에스터화 반응조건 등 효소전환 기술 개발)
2. 에스터화 효소반응으로 생성된 진세노사이드 지방산 에스터 유도체의 분리 정제 기술
3. 진세노사이드 및 지방산 에스터 화합물, 그리고 이를 함유하는 기능성 화장품의 시제품의 피부대사 활성화 등 피부효능 평가 기술
4. 진세노사이드 또는 이들의 대사체보다 더 우수한 생체 흡수율, 생체 잔류기간, 약리활성 및 생체내 안정성을 갖는 새로운 약리활성물질의 개발

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 실용화·산업화 계획(기술실시 등): 주름개선 기능성화장품 개발 계획

본 과제를 통하여 개발된 주름개선 기능성 화장품 소재인 진세노사이드 대사체의 지방산 에스터 화합물 (ginsenoside fatty acyl ester)과 이를 함유하는 시제품 처방 개발을 바탕으로, 주름개선 기능성화장품 개발을 위한 향후 추진 계획을 제시한다.

가. 소재 개발 기준 마련을 위한 추가 연구

- 제조된 최종 목표 화합물의 순수 분리정제 후 정확한 화합물의 구조 확인 (진행 중)
- 제조 과정의 표준화 및 효율성(전환율) 제고 (진행 중)
- 단순화된 대량 분리정제 방법의 개발 (진행 중)
- 피부 흡수능 시험 및 외부 임상실험 수행

나. 상품화를 위한 경제성 및 시장성 조사

- 반응 기질인 compound K를 고순도로 절감된 단가로 생산할 수 있는 기술을 가진 새로운 구입처 모색을 통하여 경제성 확보
- 효능 및 피부흡수율을 고려한 사용 함량 등의 소재 기준 마련
- 크림, 로션, 에센스, 스킨, 부스터, Wrinkle filler 등의 주름개선 기능성화장품 제품군으로 단일 브랜드화 추진
- 의약품 소재로의 상품화 가능성 모색

2. 교육·지도·홍보 등 기술 확산 계획

가. 고정화 lipase를 개발한 (주)제노포커스, 진세노사이드 대사체의 단일물질 제조 판매하는 (주)비티진, 그리고 한방화장품 소재를 제조하고 제품을 개발하는 본 과제 참여기업인 (주)오비엠랩과 같은 지역 중소기업의 상호 협력 및 산학협력을 통한 새로운 수익모델 창출 기여

나. 지역 중소기업과의 산학협력을 위한 기술 지도 및 관련 공동 연구개발에 활용

3. 특허, 논문 등 지식재산권 확보 계획

가. 특허: 1건 출원

- 지방산 에스터 화합물을 함유하는 기능성 화장품의 개발

나. 논문: 2건

4. 추가 연구, 타 연구에 활용 계획

가. 항산화 활성 등의 효능이 있는 lipoic acid 등의 다른 화합물을 진세노사이드에 coupling 시키는 등, 기능성이 강화된 새로운 약리활성물질의 개발 연구를 위한 유기용매에서 고정화 lipase를 이용한 에스터화 반응 기술 활용

나. 다른 효소를 이용한 새로운 화합물의 합성 또는 새로운 합성 방법을 통한 생산 단가 저감을 위한 연구 수행

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 특허 기술

1. 플라보노이드 에스터 화합물을 이용한 안전성 및 효율성 (피부 흡수율) 증대를 통한 화장품 개발: Flavonoide esters and their use notably in cosmetics, US 2002
2. 인삼 사포닌 성분을 이용한 화장품 조성: 진세노사이드 Rg3를 함유하는 화장료 조성물, 대한민국 2003
3. Proctor and Gamble (P&G)의 경우 ginsenoside Rb1, Rb3, Rc, Rd, Re에 대한 특허 (IB2006052293, 2006.07.06)를 제출함
4. 최근 일부 화장품연구소 (소망화장품, 코리아나)를 중심으로 ginsenoside Rg2, Rg3 등을 함유하는 화장품이 개발되어 생산되고 있고, (주)아모레퍼시픽에서는 ginsenoside F1 또는 compound K를 함유하는 피부 외용제를 개발하고 이들을 포함하는 화장품을 개발하고 있다는 언론 보도가 206년도 초에 있었음

제 2 절 논문

Lipase를 이용한 플라보노이드 에스터의 합성 연구

1. Duan Y, Du Z, Yao Y, Li R, Wu D, Effect of molecular sieves on lipase-catalyzed esterification of rutin with stearic acid, J Agric Food Chem, 2006
2. Ardhaoui M, Falcimaigne A, Ognier S, Engasser JM, Moussou P, Pauly G, Ghoul, Effect of acyl donor chain length and substitutions pattern on the enzymatic acylation of flavonoids, J Biotechnol, 2004
4. Gayot S, Santarelli X, Coulon D, Modification of flavonoid using lipase in non-conventional media: effect of the water content, J Biotechnol, 2003

제 7 장 참고문헌

1. Takino Y., *Yakugaku Zasshi*, **114**, 550–564(1994)
2. Tanizawa H., Karikuma M., Miyase T., Takino Y., Proc 6th Int Ginseng Symp. Seoul., 187–194(1993)
3. Xu QF., Fang XL., Chen DF., *J Ethnopharmacol.*, **84.**, 187–192(2003)
4. Hideo Hasegawa, *J. Pharmacol Sci.*, **95**, 153–157(2004)
5. Sakakibara K., Shibata Y., Higashi T., Sanada S., and Shoji J., *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 1009–1061(1975)
6. Shibata Y., Nozaki T., Higashi T., Sanada S., and Shoji J., *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 2818–2824(1976)
7. Toda S., Kimura M., and Ohnishi M., *J Ethnopharmacology.*, **30**, 315–318(1990)
8. Scaglione F., Ferrara F., Dugnani S., Falchi M., Santoro G., and Frascini F., *Drug Exp. Clin. Res.*, **16**, 537–542(1990)
9. Wu J. Y., Gardner B. H., Murphy C. I., Seals J. R., Kensil C. R., Recchia J., Beltz G. A., Newman G. W., and Newman M. J., *J.Immunol.*, **148**, 1519–1525(1992)
10. Hasegawa H., Sung J. H., Matsumiya S., Uchiyama M., *Planta Med.*, **62**, 453–457(1996)
11. Wakabayashi C., Hasegawa H., Murata J., Saiki I., *Oncol. Res.*, **9**, 411–417(1997)
12. Hasegawa H., Suzuki R., Wakabayashi C., Murata J., Tezuka Y., Saiki I., Kadota S., *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 513–516(1998)
13. Hasegawa H., Sung J. H., Huh J. D., *Arch. Pharm. Res.*, **20**, 539–544(1997)
14. Takino Y., *Yakugaku Zasshi*, **114**, 550–564(1994)
15. Karikura M., Miyase T., Tanizawa H., Takino Y., Taniyama T., Hayashi T., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 2859–2861(1990)
16. Karikura M., Miyase T., Tanizawa H., Taniyama T., Takino Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 2357–2361(1991)
17. Kanaoka M., Akao T., Kobashi K., *J. Tradit. Med.*, **11**, 241–245 (1994)
18. Daeseok Han, Dae Young Kwon, and Joon Shick Rhee, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**(3), 250–258(1998)
19. Myoung-Hoon Park, Hyun Jin Ryu, and Kyeong Keun Oh, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **19**(2), 148–153(2004)
20. Lee J. M., R. S. Kim, B. O. Kim, Y. D. Park, and I. N. Jin, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 161–168(1993)
21. J. K. Hong, K. J. Kim, W. W. So, S. J. Moon, and Y. T. Lee, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **17**(6), 543–548(2002)
22. Yang, F. and Russell, A. J. *Biotechnol. Bioeng.*, **47**, 60–70
23. K. Martineck and A. N. Semenov, *J. appl. Biochem.*, **3**, 93(1981)

24. H. Zaks K. Higuchi, and T. Yamashina, *J. Biotechnology*, **14**, 15(1990)
25. S. Riva, J. Choppineau, A. P. G. Kieboom and A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Sci.*, **110**, 584(1988)
26. M. Reslow, P. Adlercreutz, and B. Matiasson, *Eur. J. Biochem.*, **172**, 573(1988)
27. Yang, F. and Russell, A. J. *Biotechnol. Bioeng.*, **47**, 60–70
28. van Tol, J. B. A., Stevens, R. M. M., Veldhuizen, W. J., Jongejan, J. A. and Duine, J. A. *Biotechnol. Bioeng.*, **47**, 71–81(1995)

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.