

발간등록번호

11-1541000-000877-01

보안과제(○), 일반과제()

생물전환 기법을 이용한 쑥추출잔사물의 유용물질 개발과
아토피 제품화에 관한 연구

(Development of valuable material and Atopy products with
fermentation from *Artemisia princeps*)

(주) 파인엠

농림수산식품자료실



0020438

농림수산식품부

7
19
11-115

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “생물전환 기법을 이용한 썩추출잔사물의 유용물질 개발과 아토피 제품화에 관한 연구” 과제(세부과제 “썩 부산물의 생물전환을 통한 신소재 개발 및 생리활성 평가에 관한 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2011 년 4 월 8 일

주관연구기관명 : (주)파인엠
주관연구책임자 : 박 형 석
연 구 원 : 조 연 희
연 구 원 : 김 동 희
연 구 원 : 이 왕 진
협동연구기관명 : 경희대학교
협동연구책임자 : 김 동 현
연 구 원 : 이 인 아
연 구 원 : 최 종 열
연 구 원 : 조 은 하

요 약 문

I. 제 목

생물전환 기법을 이용한 쑥추출 잔사물의 유용물질 개발과 아토피 제품화

Development of valuable material and Atopy products with fermentation from *Artemisia princeps*

II. 연구개발의 목적 및 필요성

○ 강화 약쑥은 한방에서 지혈, 진통, 강장제로서 냉(冷)에 의한 자궁출혈, 생리불순, 생리통, 염증, 세균감염 등의 치료에 쓰여 왔으며, 민간에서는 생잎을 베인 상처나 타박상, 복통, 백선(白癬) 등에 외용하거나 내복하고 있다. 강화 사자발쑥에 대한 연구는 생리활성에 대한 연구와 플라보노이드 성분인 유파틸린(eupatilin)과 자세오시딘(jaceosidin)에 대한 당뇨, 항암 등에 대한 약리작용과 동물 실험 등이 있었으나 피부 보호효과 및 기능성에 대한 연구는 미미한 실정이다. 그러므로 강화약쑥의 향균, 항염, 면역력 증가등의 작용이 우수한 사자발쑥 추출물을 이용하여 고부가가치 창출을 위한 한방 원료 개발과 이들의 효능을 이용한 기능성 화장품의 개발이 필요하다.

○ 현재까지 쑥에서 에센셜 오일을 추출하고 난 후 부산물은 특별한 활용 없이 모두 버려졌다. 하루에 나오는 부산물이 약 700~800kg으로 그 양도 많지만 신속하게 처리하지 못하면 썩어서 불쾌한 향취와 해충들이 번식하고 환경을 오염시키는 원인이 되기도 하였다. 이렇게 버려지는 부산물을 재활용하여 고기능성으로 부가가치화한다면 친환경적 소재 구축과 기업의 생산성 및 이익에도 큰 효과를 줄 수 있다.

○ 쑥은 그 향취가 강하여 자체로는 생물전환이 어렵지만 쑥 에센셜 오일을 추출한 뒤 남은 부산물은 생물전환이 용이하다. 우리나라 발효식품으로부터 잔사를 발효시킬 수 있는 발효 균주를 선별하여 발효 가능 유익균들 중에서 쑥 함유 phytochemical들을 생물 전환하여 유익한 반응생성물을 생산하고, 쑥의 효능을 증대시켜 피부 보호작용, 소양증, 보습, 항염증, 아나필락시스 저해 활성등을 높여 아토피 질환과 같은 피부질환 치료효과를 극대화시킬 수 있는 유산균을 선별하여 다량 생산할 수 있는 방법 개발이 필요하다.

○ 한방은 200년 이상 처방되어 온 부작용이 없는 약물의 후보라는 점에서 부작용이 심한 스

테로이드의 대체요법으로 각광을 받고 있다. 환경오염 및 급속한 산업화가 진행되면서 일생 생활 중 특히 스트레스와 마찰등의 자극, 알콜, 강한 자외선, 발한등에 의해 쉽게 아토피성 피부염이 유발된다. 현재 국민의 약 10%가 아토피 질환을 앓고 있으며 독성성분인 thujone이 없는 강화 사자발쑥 부산물을 Probiotics를 활용하여 생물전환 물질을 제조하였다. 생물전환된 강화 약쑥 물질에 새로운 신물질이 생산된 것을 확인하였으며 이물질은 항균력이 강하고 항염증효과가 있으며 항알러지에 효능이 있는 것으로 사료되었다. 이렇게 생산된 유익한 생물 전환체로 피부질환 치료 효능이 뛰어난 화장품 및 기능성 피부 개선용 제품을 개발한다.

○ 애완견등은 피부병이 매우 많이 발생하므로 항균과 항염에 효과적이며 유산균이 풍부한 쑥 부산물 사료에 적용한다면 수입에 의존하는 사료를 대체할 수 있으며 생물전환하여 반응물을 생산한 뒤 또다시 남은 쑥 찌꺼기에는 다량의 유산균이 남아 있으므로 이것을 애완견 및 가금류등의 사료로 개발할 수 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

강화약쑥의 생물전환기법을 통해 피부질환을 개선할 수 있는 기능성 화장품인 아토피 제품의 개발과 함께, 그 잔사를 동물정장제로 개발하려고 한다.

- 생쑥과 건쑥의 생물 전환 조건 확립
- 오일 추출된 부산물의 활용을 위한 최적 처리 조건 확립
- 부산물의 유효 농축액 추출 및 유효 성분 분석
- 피부질환에 유익한 미생물 자원인 최적의 유산균주 선별
- 강화약쑥의 기능성을 높일 수 있는 생물전환체를 생산하는 균주를 선별
- 약쑥의 대량 생물전환조건을 확립
- 강화약쑥추출 잔사물과 그 생물전환체의 소양증, 건선, 피부 아낙필락시스 반응, 미백, 항산화 효과 등의 측정을 통한 생리활성 평가
- 알러지질환 개선 효능 분석
 - 피부 자극성 - 제모한 마우스의 등에서 Draize법으로 피부독성 측정
 - 소양증 - 생쥐에 histamine, compound 48/80으로 소양을 유도한 모델 동물 효능평가
 - 항산화효과 - DPPH 라디칼 소거효과
 - 피부수동성 아낙필락시스 반응 - 실험동물 생쥐에 IgE로 유도한 피부 아낙필락시스 반응의 저해활성 측정
 - 항염증효과 - 생쥐 귀에 TPA 법으로 유도한 염증반응을 이용하여 저해활성 평가
- 쑥 유효 성분의 향장 원료화를 위한 각 추출물별 향장원료 적용
- eupatilin과 jaceosidin의 향장품 적용 적정 유효 농도 확립
- 약쑥의 대량 생물전환 조건 확립
- 쑥 발효물의 안정도 평가를 통한 향장품 적용
- 항알러지 기능성 향장품의 시제품 개발
- 관능검사와 제품 생산 기준의 설정

- 추출물 및 제품별 scale up 및 pilot test
- 쑥 추출물이 주성분인 기능성 향장품 개발 및 제품화
- 쑥 부산물의 생물전환후 남은 잔사의 사료 제품화 토대
- 정장사료로 개발하기 위한 효능 분석
 - 변비개선효과 - 생쥐에서 대장 및 소장 수송능 개선효과 측정
 - 사하개선 효과 - castor oil로 유도한 설사모델 동물에서 항산화효능 평가

IV. 연구개발결과

○ 강화 사자발쑥의 오일 추출 조건 확립

수증기 증류로 추출시 압력을 주었을 때(110℃)와 압력이 없을 때(100℃)의 에센셜 오일의 GC/MS 분석결과 100℃와 110℃에서 1,8-cineole의 함량은 약 66%에서 약 36%로 함량이 감소되었으며 borneol 은 3.2%에서 5.4%로 증가하였고 eugenol 0.3%에서 2.2%로 증가하였다. 사자발쑥 에센셜 오일 추출결과 증기압이 있는 상태에서 추출된 에센셜 오일이 항균력이 더욱 커서 에센셜 오일의 추출은 110℃에서 추출하는 것이 효과적이었다.

○ 생쑥과 건쑥의 생물 전환 조건 확립

대량생산의 생물전환 조건을 확립하기 위하여 다양한 조건에서 발효를 진행하였으며 그중 생쑥을 수증기 증류한 후 부산물에 그대로 생물전환한 것이 소양모델쥐에서 항소양효과를 측정 한결과 51%저해로 우수한 항소양효과가 있었다. 건쑥의 경우 에센셜 오일 추출후 남은 부산물의 경우 수분함류량이 너무 적어 건쑥 부산물 kg당 1리터의 증류수를 넣은후 생물전환하였을 때 45%의 항소양효과가 측정되었다.

○ 부산물의 유효성분 분석

강화약쑥의 추출물에서의 jaceosidin의 함량은 주정 추출물의 경우 수증기증류 처리한 것과 처리하지 않은 부산물의 추출물이 0.15% 내외로 유사한 것으로 판단되며, 물 추출물에서는 0.008%와 0.02%로 매우 적은 것으로 사료되며 추출량은 서로 유사하였다. 이를 기초로 인체에 유효한 농도는 자세오시딘 0.005%, 유파틸린 0.01%로 제시하였다.

○ 사자발쑥 추출물의 유해균에 대한 항균성 평가

사자발쑥 추출물과 에센셜 오일의 항균성 평가에서 일반적인 항균제인 글루콘산클로르헥시딘액은 일반적인 대장균, 포도상구균과 같은 유해균에 항균성이 컸으며 특히, 글루콘산클로르헥시딘액은 젖산균이나 유산균까지 모두 항균력이 크지만 사자발쑥 에센셜 오일은 일반적인 유해균에는 항균성이 큰데 비하여 젖산균과 유산균과 같은 유익균에 대해 항균성이 없어 선택적 살균을 하는 것을 알 수 있었다. 그러므로 사자발쑥 에센셜 오일은 아토피에 2차 감염을 일으키는 유해균들은 없애주고 유익균을 살려두어 피부를 건강하게 할 수 있다고 판단되었다. 그러나 일반적인 사자발쑥 주정 추출물은 항균력이 거의 없었다.

○ 쑥정유 분획의 알러지 저해 효과 평가

쑥에서 추출한 정유분획 특히 boreol 및 eucalyptol 과 피톨은 azelastine과 비교할 만큼 강한

히스타민으로 유도한 소양모델 동물에서 강한 알러지 저해 효과를 보였으며 쑥정유와 피톨은 histamine에 의해 유도된 소양모델 생쥐에서 IL-4와 TNF- α 생산을 억제하였으며, TNF- α 의 발현을 조절하는 p-p65 및 IL-4의 발현을 조절하는 p-c-jun가 억제되었다. 또한 히스타민으로 유도된 쥐의 피부조직을 헤마톡실린-에오신으로 염색 한 결과에서도 쑥 정유 성분, 피톨 성분 모두 우수하게 부종을 억제하였다.

○ 피부질환에 유익한 최적의 유산균주 선별

강화약쑥의 기능성을 높일수 있는 생물전환체를 생산하는 균주로 발효식품 중 김치에서 분리한 유산균인 *Lactobacillus brevis* K-1 균주가 쑥의 유효성분을 발효시켰으며 생물전환을 일으킨 균주는 *Lactobacillus brevis* K-1 (KCCM10968P 기탁균주) 였다.

○ 발효에 의해 유효성분인 Phytol 성분의 함량 변화는 없었으나 diterpenoid가 새로운 대사체로 분리되었다.

○ 발효에 의해 eupatilin, jaceosidin, scopoletin의 추출율이 증가하였다. 쑥 추출물의 총분획량은 5.70%, 물분획 5.27%, ethylacetate extract 0.43%이었으며 K-1 생물전환 쑥 추출물은 총분획량 5.71%, 물추출물 5.0%, ethyl acetate extract 0.71%이었다.

○ 항산화 효과

정유를 추출하고 남은 사자발쑥과 이를 발효한 쑥의 물추출물은 항산화 효과를 보였으나 유의한 차이는 없었다.

○ 알러지 질환 개선 효능 분석

- 쑥 물추출물 및 발효쑥 물추출물은 IgE로 유도한 RBL 2H3 cell 탈과립은 아주 낮았으며, 발효에 따른 차이는 없었다.
- 염증유발물질인 carrageenan 유도 염증모델 생쥐에서의 항염증 효과는 유도된 air pouch의 exudate volume, cell number 및 단백질양은 쑥물추출과 발효쑥 물추출물은 모두 억제하였으며 발효쑥이 더 우수한 효과를 보였다.
- 생쥐 carrageenan에 의해 유도된 air pouch에 air pouch의 PGE2 함량을 쑥물추출과 발효쑥 물추출물 모두 억제하였으며 발효쑥이 더 우수한 효과를 보였다.
- 생쥐 carrageenan에 의해 유도된 air pouch에 염증성 사이토카인 TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2, iNOS의 발현 및 이들의 전사인자인 NF- κ B의 활성화를 쑥물추출과 발효쑥물추출물은 모두 억제하였으며 발효쑥이 더 우수한 효과를 보였다.
- 쑥추출물과 발효추출물 모두 IgE로 유도한 수동형피부 아나필락시스 반응을 억제하였으나, 발효쑥 추출물이 효과가 우수하였다.
- 생쥐에 compound 48/80 또는 histamine으로 유도한 소양모델 동물에서 정유추출잔사 쑥물추출과 발효쑥물추출물 모두 억제하였으며, 발효쑥 물추출물이 효과가 우수하였다.
- LPS로 자극한 RAW264.7 cell에서 정유추출잔사 쑥물추출과 발효쑥 물추출물을 모두 염증성사이토카인 TNF- α , IL1 β , IL-6, iNOS, COX-2 발현 및 NF- κ B 활성화를 억제하였으

며, 발효쑥 물추출물이 효과가 우수하였다.

- TPA유도 귀부종에 대한 쑥추출물 및 발효쑥추출물 모두 저해효과를 보였으며, 발효쑥추출물이 더 우수한 효과를 보였다.
- TPA유도 귀부종에 대한 쑥추출물 및 발효쑥추출물 모두 염증성 사이토카인인 TNF-a, IL1b, IL-6의 발현증가를 억제하였으며 COX-2, iNOS 발현 및 이들의 전사인자인 NF-kB의 활성화를 억제하였다.
- in vitro에서 항염증 효과를 확인하기 위해 생쥐 복강 마크로파지를 분리하여 LPS로 염증을 유도하고 쑥물추출과 발효쑥물추출물을 효과를 측정하였을 때도 염증성사이토카인인 TNF-a, IL1-1b, IL6을 저해하였으며, COX-2, iNOS 및 이들의 전사인자인 NF-kB의 활성화를 억제하였다.

○ 쑥물추출 잔사물과 발효쑥 추출 잔사물의 항균력은 차이가 없었다.

○ 급성독성 및 Draize 법에 의한 피부 독성 실험에서는 독성이 없었다.

○ 생물전환 신물질을 이용한 기능성 향장품 원료화

쑥 부산물을 생물전환한 추출액을 화장품에 사용할 수 있도록 원료 specification 검사 결과 향장원료로 적합하였다.

○ 시제품의 안정도 평가

쑥 생물전환 추출물의 향장품 적용을 위해 크림과 토너의 pH측정 결과 가혹조건 후 pH 변화는 편차가 크지 않았으며 토너와 크림 모두 정상범위에 해당하는 수치로 가혹조건하에서도 안정적이었다. 또한 점도 측정에서도 분리가 되는 과정인 크림링, 응집 및 합일과 같은 현상이 관찰되지 않았고 가혹조건하에서도 안정적이었다. 쑥 발효물은 2~5%로 향장품에 적용한다.

○ 예민 피부 개선 임상 간이 평가

쑥을 생물전환 시킨 물질을 함유한 크림과 토너로 알러지 부위에 간이 임상을 20명에게 실시한 결과 10명은 알러지가 거의 완화되어 피부가 건강하게 되어 상태가 아주 많이 개선되었고 7명은 피부에 보습과 진정작용을 주어 피부 각질화 현상과 소양증을 완화시켜 상태가 호전되었다. 나머지 2명은 상태가 호전되지 않았으며 더 악화된 경우도 있었다. 향과 쑥추출물 대한 알러지 반응으로 사료된다. 알러지 임상한 전체인원의 90%가 상태가 좋아졌으며 제품에 대해 긍정적이었다.

○ 생물전환의 대량생산을 위한 체제 구축

쑥 부산물의 생물전환시 가장 효율적인 방법으로 부산물을 압착하여 추출액을 얻은 시료에 K-1균주로 생물전환했을 때 소양모델 생쥐에서 항소양효과를 측정한 결과 55% 저해하여 가장 우수하였다. 정유를 추출하고 남은 쑥을 압착추출하거나, 그대로 담귀서 유산균 K-1 균주로 생물전환하고, 그 발효한 검체를 동결건조하는 것이 가장 항알러지 효능을 높이는 이상적 조건이었다.

○ 정장사료로 개발하기 위한 효능 분석

○ 변비 개선 효과

생쥐에게 썩물추출 잔사물은 투여농도가 높을수록 대장수송능은 억제하였으나, 발효썩추출 잔사물은 대장 수송능에 영향을 미치지 않았다. 썩물추출 잔사물과 발효썩추출 잔사물은 소장 수송능에 큰 영향을 미치지 않았지만, 썩물추출 물잔사물은 소장운동을 억제하였으며, 발효썩물추출 잔사물은 큰 영향을 미치지 않았다.

○ 사하 개선 효과

썩물추출 잔사물과 발효썩추출 잔사물은 castor oil로 유도한 설사모델동물에서 분변의 수분함량을 억제하였으며 설사를 개선하는 효과가 있었고, 발효썩물추출 잔사물은 분변의 수분 함량 억제효과는 약하지만 사하개선 효과는 우수하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

○ 강화약썩을 발효시켜 항알러지 효능이 우수한 강화약썩 발효제품을 만들 수 있었음

○ 김치로부터 약썩을 발효시킬 수 있는 *Lactobacillus brevis* K-1 균주를 확보할 수 있었음

○ 국내 특허 및 해외 특허 진행 -2건

○ 썩을 탄소원으로 생육가능한 미생물 및 그 용도

○ 알러지성 피부질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물

○ 학술논문 2편 발표, 1편 작성중

○ 강화약썩 집중적 구매를 통한 농가 수익 창출 및 안정화

○ 상품화 - 제품 출시 예정

○ 2011년: 썩 발효 생물전환으로 효능을 수십배 향상시킨 보습 및 항알러지 아토피 기초 4종 클렌저, 로션, 크림, 오일 출시

○ 부가적 적용 상품

○ 향장품 한방 원료(기초화장품, 팩등의 진정, 항염 원료)

○ 의약외품의 기능성 부성분 (치약, 구강용품, 여성 생리용품등)

○ 식품첨가제 (음료, 제과, 캔디, 껌등)

○ 사료 개발

○ 마케팅 활성화를 통한 수출 및 내수 증대

SUMMARY

(영문요약문)

We isolated *Lactobacillus brevis* K-1 as a probiotic fermentable for *Artemisia princeps* var *Ssajuarissuk* (AP) from cabbage Kimchi.

Essential oil-excluded *Artemisia princeps* var *Ssajuarissuk* (AP) was fermented with *Lactobacillus brevis* K-1 and the anti-inflammatory effects of AP and fermented AP (FAP) on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory response in peritoneal macrophages were investigated. AP and FAP inhibited LPS-induced TNF- α , IL-1 β , COX-2, iNOS and COX-2 expression, as well as NF- κ B activation. AP and FAP also reduced ear thickness, inflammatory cytokine (TNF- α , IL-1 β and IL-6) expression and NF- κ B activation with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) induced dermatitis in mice. Furthermore, AP and FAP also reduced exudate volume, cell number, protein amount, inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-6) expression and NF- κ B activation in carrageenan-induced air pouch inflammation in mice. The inhibitory effects of FAP were more potent than those of non-fermented AP. Based on these findings, we propose that FAP can improve inflammatory diseases, such as dermatitis, by inhibiting the NF- κ B pathway.

AP and FAP also inhibited IgE-induced passive cutaneous anaphylaxis (PCA) reaction as well as compound 48/80- or histamine-induced scratching behavior in mice. AP and FAP also inhibited proinflammatory cytokines, IL-1 β , IL-6 and TNF- α in lipopolysaccharide-induced RAW264.7 cells as well as COX-2 and iNOS expression. These agents also inhibited NF- κ B activation. The inhibitory effects of FAP were more potent than those of AP.

The anti-scratching behavioral effect of essential oil and phytol isolated from *Artemisia princeps* Pamp (AP, family Asteraceae), which is widely used in traditional medicine for inflammatory diseases, was investigated in vivo. Treatment of mice with AP essential oil (APEO) and phytol inhibited histamine- and compound 48/80-induced scratching behaviors. The antiscratching behavioral effects of APEO and phytol are in proportion to their vascular permeability-inhibitory effects. These agents also inhibited the level of allergic cytokines, IL-4 and TNF- α , and the activation of transcription factors, NF- κ B and c-jun (AP-1), in histamine-treated skin tissues. Based on these results, APEO and phytol may improve scratching behavior in skin by inhibiting the expression of allergic cytokines via the regulation of NF- κ B and AP-1 activation.

Based on these findings, FAP may improve allergic diseases.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Development of valuable material and Atopy products with fermentation from *Artemisia princeps*

Chapter 1. Outline of research	13
Chapter 2. Research Status	17
Part 1. Situation of international research	17
Part 2. Situation of national research	18
Part 3. The results from the domestic and international position of technical development	
Chapter 3. Contents and results of research achievement	21
Part 1. The ultimate goal of research and development	21
Part 2. The contents and results of research and development	22
1. Establishment of oil extraction method of <i>Artemisia princeps</i> in Ganghwa	22
2. Establishment of pre-treatment with fermentation from fresh and dried of <i>Artemisia princeps</i> in Ganghwa	25
3. Analysis of the active ingredient of residual products	26
4. Antimicrobial activity evaluation of pathogens of <i>Artemisia princeps</i> extract	33
5. Antiallergic effect from disjunct of <i>Artemisia princeps</i> essential oil	36
6. The best selection of optimum Mugwort-fermentable lactic acid bacteria in skin diseases	39
7. Separation of the new metabolite from Mugwort-fermentable	42
8. Alteration of the active ingredient after fermentation of residual products	43
9. Antioxidant effect of residual products	43
10. Antiallergic effect of mugwort water extract with and without fermentation	44
11. Skin toxicity by Draize method	54
12. Acute toxicity evaluation of mugwort water extract with and without fermentation	
13. Antidiarrheal and gastrointestinal transpotation effect of mugwort residues with and without fermentation	58
14. Development of functional cosmetics ingredient from Mugwort-fermentable	60
15. Application of functional cosmetics from Mugwort-fermentable	61
16. Evaluation of stability test to build a prototype	64

17. A clinical trial of sensitive skin -----	65
18. Construction for the mass production system of Mugwort-fermentable -----	67
19. Development Planning of new product -----	68
Chapter 4. Ratio of achievement ratio and contribution related to research -----	70
Chapter 5. Achievement of research and its application plan -----	73
Part 1. Planning of commercialization, industrialize -----	73
Part 2. Achievement of research -----	73
1. Patent -----	73
2. Thesis -----	73
3. Application plan -----	74
4. over·achieve -----	74
5. development of human resources -----	75
Chapter 6. Information of international biotechnology collected during the present research	76
Chapter 7. References -----	77

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 -----	13
제 2 장	국내·외 기술개발 현황 -----	17
제 1 절	국외기술개발 현황 -----	17
제 2 절	국내기술개발 현황 -----	18
제 3 절	본 연구결과가 국내·외 기술개발 현황에서 차지하는 위치 -----	19
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 -----	21
제 1 절	연구개발의 최종 목표 -----	21
제 2 절	연구개발의 내용 및 결과 -----	22
1.	강화 사자발쑈의 오일 추출 조건 확립 -----	22
2.	생쑈과 건쑈의 생물전환 전처리 조건 확립 -----	25
3.	부산물의 유효성분 분석 -----	26
4.	사자발쑈 추출물의 유해균에 대한 항균성 평가 -----	33
5.	쑈정유 분획의 알러지 저해 효과 평가 -----	36
6.	피부질환에 유익한 최적의 유산균주 선별 -----	39
7.	쑈 생물전환체의 새로운 대사체 분리 -----	42
8.	쑈 부산물의 생물전환후 유효성분 변화 -----	43
9.	쑈 부산물의 향산화 효과 -----	43
10.	쑈 추출물과 생물전환된 쑈 추출물의 항알러지 질환 개선 효능 분석 -----	44
11.	Draize법에 의한 피부 독성 -----	54
12.	쑈 추출물과 생물전환된 쑈추출물의 급성독성 평가 -----	56
13.	생물전환된 쑈 잔사의 정장사료로 개발하기위한 효능분석 -----	58
14.	생물전환 신물질을 이용한 기능성 향장품 원료화 -----	60
15.	사자발쑈 생물전환 물질의 향장품 적용 -----	61
16.	시제품의 안정도 평가 -----	64
17.	예민피부 간이임상 -----	65
18.	생물 전환의 대량생산을 위한 체제 구축 -----	67
19.	신제품 개발 기획 -----	68
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	70
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획 -----	73
제 1 절	실용화·산업화 계획 -----	73

제 2 절 연구개발 결과의 성과 -----	73
1. 특허 -----	73
2. 논문 -----	74
3. 활용방안 -----	74
4. 기대성과 -----	74
5. 인력양성 성과 -----	75
 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보-----	 76
 제 7 장 참고문헌 -----	 77

제 1 장 연구개발과제의 개요

쑥을 수증기 증류법으로 에센셜 오일을 추출한 뒤 그 부산물에 생물전환을 통해 개발된 신물질을 이용해 새로운 기능성 코스메틱 원료로 개발하여 이 물질을 함유하여 보습이 뛰어나며 소양증을 완화시키고 아낙필락시스 저해활성등을 높여주고 쑥의 지표물질인 플라보노이드 유효성분이 함유된 아토피용 기능성 향장품을 개발하고자 하였다. 또한 생물 전환 후 남은 부산물은 다시 동물사료로 개발하여 피부병과 소화기관에 효능이 좋은 제품을 개발할 수 있는 토대를 마련하여 남은 잔사를 활용함으로써 남은 부산물이 전혀 없게 되어 자원을 100% 활용하고자 하였다.

환경오염과 스트레스가 증가하고 식생활이 변함에 따라 알레르기성 환자들이 매년 증가하고 있으며 1980년 알레르기 환자가 1%미만이었으나 2000년대에는 5% 이상으로 급증하고 있으며 현재 잠재적인 환자까지 10%가 넘는 것으로 추정된다.. 아토피(Atopy)는 그리스어인 a-topos 가 어원으로 ‘특이한’, ‘부적당한’ 또는 ‘비정상적인 반응’등의 뜻을 가지고 있으며 알레르기 반응을 일으키게 하는 면역물질(Ig E, immunoglobulin E)을 쉽게 형성함으로써 천식, 초고열, 알레르기성비염, 아토피 피부염등을 잘 일으키는 유전적 경향을 이르며 아토피 피부염의 발병 원인은 확실히 밝혀져 있지 않으나 유전적, 면역학적, 환경적 요인들이 관여한다고 보고되고 있다. 특히 면역학적 관점에서 많은 연구가 이뤄지고 있는 실정이다. 아토피 피부염의 임상적 특징은 크게 소양증(국한성 또는 전신성 가려움), 발진, 만성적 재발등을 들 수 있고 혈청내 IgE 수치 향상, Eosinophilia, 호염기구의 자발적인 히스타민 분비 증가, CD23발현증가, CD8 Suppressor 감소, Th2에 의한 IL-4,IL-5 분비 증가 등의 현상을 동반하기도 한다. 아토피 피부염 발병 주기: 가려움--> 긁기 --> 더가려움으로 피부를 손상시키고 심지어 사회생활을 어렵게 하기도 하는 질병이다. 급격한 산업화와 서구화 등의 영향으로 국내에서도 피부 면역질환 발병률은 매년 증가하고 있으며 2004년 기준 아토피 피부염으로 병원을 방문한 사람은 120여 만명이며 이중 유아(1~4세)는 52만 7천여명으로 유아의 18% 정도가 아토피 피부염에 시달리고 있다. 또한 대한피부과학회 보고에 의하면 '06년 아토피 피부염으로 전국 43개 종합병원 피부과를 방문한 환자는 총 31,466명으로 '96년 11,324명에 비해 2.7배 급증하였다. (참고자료: 대한 피부과학회 2007.5) 대다수의 환자들에서 호발연령이 어린 나이에 시작되며 일상생활 중 특히 스트레스와 마찰등의 자극, 알콜, 강한 자외선, 발한등에 의해 쉽게 피부염이 유발될 수 있으며 환경오염 및 급속한 산업화와도 밀접한 관계가 있으며 아토피 피부염 환자는 타인과 어울리기 싫어하는 대인 기피증과 사회와 학교생활에서의 부적응증을 갖기 쉬우며 우울증, 소외감, 불안증, 수면장애등 심각한 정신적·사회적·육체적 장애를 유발하기도 한다.

알레르기 반응으로 아낙필락시스, 천식, 염증, 아토피 등과 같은 증상이 나타나며 이를 개선하기 위하여 약물요법을 사용하는데 부신피질 호르몬제로 스테로이드는 피부 위축, 혈관확장, 탈색, 자반등의 부작용을 초래할 수 있고 항히스타민제는 졸음이 올수 있으며 효과가 일과성으로 제한되며 면역억제제는 신부전등의 부작용이 발생하기 쉽위 지속적인 사용은 어렵다. 치료제들의 단점인 부작용을 최소화하며 아토피 초기 증상 ‘가려움’ 단계에서 작용할 수 있는 제품이 필요하다.

한방은 200년 이상 처방되어 온 부작용이 없는 약물의 후보라는 점에서 부작용이 심한 스테로이드의 대체요법으로 각광을 받고 있으며 쑥도 한방에서 피부염, 소양증완화 등에 쓰여져 왔으므로 생물 유래물질의 아토피 개선제로 효과적이다. 근래에 화장품은 피부를 단순히 보호하고자 하는 목적 외에 외부의 환경에 대해 피부의 상태를 적극적으로 개선시키려는 목적으로 사용하고 있어 기능성 화장품 개발은 국내 시장뿐 아니라 세계 시장에서도 요구되고 있다. 또한 천연 소재에 대한 선호도 증가로 천연 향료 및 기능성 천연 향장 원료에 대한 요구가 매우 높다. 바이오 기술을 통해 천연물인 약쑥에서 항염증 효과가 뛰어난 유파틸린(eupatilin)과 면역력 증강에 효과가 우수한 자세오시딘(jaceosidin)을 함유한 향장 원료를 개발하고 항균작용이 뛰어난 천연 에센셜 오일인 쑥향과 쑥을 생물전환하여 발효물질이 함유된 제품 개발로 획기적인 약물의 한계를 뛰어넘는 고기능성 천연 아토피 제품이 필요하다.

강화 약쑥은 한방에서 지혈, 진통, 강장제로서 냉(冷)에 의한 자궁출혈, 생리불순, 생리통, 염증, 세균감염 등의 치료에 쓰여 왔으며, 민간에서는 생일을 베인 상처나 타박상, 복통, 백선(白癬) 등에 외용하거나 내복하고 있다. 쑥은 여러 약리작용으로 효과가 매우 우수한 것으로 알려지고 있으나 강화 약쑥을 제외한 대부분의 쑥은 재배되지 않으므로 수요를 맞출 수가 없어 매년 중국에서 다량 수입되고 있는 실정이다. 안전성이 확보된 천연물을 원료로 제품을 개발함으로써 중국산 쑥의 수입량을 줄일 수 있으며 소비자들에게 만족을 주어 시장규모를 확대시키고 농가의 안정적인 소득증대와 선진농업을 구현할 수 있다.

강화 사자발쑥에 대한 연구는 생리활성에 대한 연구와 플라보노이드 성분인 유파틸린(eupatilin)과 자세오시딘(jaceosidin)에 대한 당뇨, 항암 등에 대한 약리작용과 동물 실험 등이 있었으나 피부 보호효과 및 기능성에 대한 연구는 미미한 실정이다. 천연 부존자원이 부족한 국내 여건상 고부가가치의 신원료나 신소재를 활용한 국산화장품 원료 개발이 절실하게 요구되고 있다. 또한 사자발쑥은 쑥 중에서도 그 효능이 다른 쑥에 비해 더 뛰어난 것으로 알려져 있으므로 생리활성이 우수한 사자발쑥을 이용하여 고부가가치 창출을 위한 한방 원료 개발과 이들의 효능을 이용한 고기능성 화장품의 개발이 필요하다.

강화도에서는 약쑥을 밭에서 경작하고 있으며 (주)과인엠은 수년간 강화약쑥 에센셜 오일을 추출하여 천연방부시스템에 적용하고 향장품 및 생활용품을 제작하여 유기농시장, 병원, 피부관리실등의 전문시장에 유통하고 있다. 현재까지 쑥에서 에센셜 오일을 추출하고 난 후 부산물은 특별한 활용 없이 그대로 폐기하거나 농가에서 소의 여물로 사용하거나 밭에 퇴비로 활용하였다. 하루에 나오는 부산물이 약 700~800kg으로 그 양도 많지만 신속하게 처리하지 못하면 썩어서 불쾌한 향취와 해충들이 번식하고 환경을 오염시키는 원인이 되기도 하였다. 또한 정유추출하고 남은 잔사 쑥에도 유효성분이 많을 것으로 추정하고 있으나 부산물의 활용법이 체계화되지 못하고 있었다. 이렇게 버려지는 부산물을 재활용하여 고기능성으로 부가가치화한다면 친환경적 소재 구축과 기업의 생산성 및 이익에도 큰 효과를 줄 수 있다.

쑥을 포함한 한약은 사람의 입을 통해서 섭취하게 되면 비극성이 높은 알카로이드 등 일부는 위에서 흡수되나 대부분의 플라보노이드, 다당체, 사포닌 등은 흡수되지 않는다. 그러므로 소화관내에 서식하고 있던 세균들이 이 성분들과 접하게 되고 이 세균들은 쉽게 이용할 수 있는

당 부분을 이용하고 나머지는 소화관에 버리며, 세균이 먹고 남은 부분이 혈액 내로 흡수되어 우리 몸속에서 약효를 발휘하게 된다. 이렇게 장내세균이 만들어낸 것들을 장내세균 전환체 또는 대사체라고 부른다. 이런 전환체(또는 대사체)들은 원래 한약이나 천연물에 함유하고 있던 성분들보다 대부분이 약효가 상당히 증가된 성분들인 경우가 많다. 예를 들면 인삼 중에 가장 많이 함유하고 있는 사포닌은 ginsenoside Rb1이다. 이 성분은 위나 소장에서 쉽게 흡수되지 않은 성분이다. 그러므로 사람이나 동물에게 투여를 하면 흡수가 되지 않고, 소장이나 대장으로 이동하게 되고 여기에 서식하는 세균들과 만나게 되어 장내세균의 대사를 받아 compound K라는 성분으로 바뀌며, 이 바뀐 성분은 혈액 중으로 흡수되고 항암, 항염증 효과를 나타낸다.

천연물(한약포함)에 함유되어 있는 성분들이 장내세균에 의해 전환하는 능력은 사람에 따라 차이가 있어 사람마다 효능에 차이가 있다. 그러므로 발효와 같은 생물전환반응을 시켜서 사용하면 효능을 극대화할 수 있다. 발효는 유산균과 같은 탄수화물을 이용하여 유해한 반응을 일으키지 않고 젖산, 초산 등과 같은 반응생성물을 생성하는 과정을 말한다. 이 식용가능 유산균 중 일부는 채소와 같은 소재를 발효시켜 김치를 만드는 등의 반응을 촉매한다. 이 과정에서 천연물 소재에 함유하고 있는 phytochemical들이 유산균에 의해 생물전환하여 유익한 반응생성물을 생산한다. 이런 반응을 촉매할 수 있는 유산균을 이차대사산물을 다량 생산하는 쪽에 적용하여 새로운 자원으로 발굴할 필요가 있다.

쪽은 강한 항균력 때문에 자체로는 생물전환이 쉽지 않으나, 쪽 에센셜 오일을 추출한 뒤 남은 부산물은 생물전환이 용이할 것으로 추정되어 쪽 부산물을 생물전환시켜 새로운 기능성 신자원으로 활용하고자 하였다. 우리나라 발효식품으로부터 잔사를 발효시킬 수 있는 발효 균주를 선별하여 발효 가능 유익균들 중에서 쪽 함유 phytochemical들을 생물 전환하여 유익한 반응생성물을 생산하고, 쪽의 효능을 증대시켜 피부 보호작용, 소양증, 보습, 항염증, 아나필락시스 저해 활성등을 높여 아토피 질환과 같은 피부질환 치료효과를 극대화시킬 수 있는 유산균을 선별하여 다량 생산할 수 있는 방법 개발이 필요하다.

애완견등은 피부병이 매우 많이 발생하므로 항균과 항염에 효과적이며 유산균이 풍부한 쪽 부산물 사료에 적용한다면 수입에 의존하는 사료를 대체할 수 있으며 생물전환하여 반응물을 생산한 뒤 또다시 남은 쪽 찌꺼기에는 다량의 유산균이 남아 있으므로 이것을 애완견 및 가금류 등의 사료로 개발할 수 있다.

강화 사자발쪽은 쪽 중에서도 그 효능이 다른 쪽에 비해 더 뛰어난 것으로 알려져 있으나 아직까지 향장용 원료로는 (주)파인엠 외에는 연구되어진 바가 거의 전무한 상태이다. 특히 유럽에서는 mugwort라고 쪽 에센셜 오일이 있으나 독성(thujone) 때문에 거의 사용하고 있지 않다. 그러나 강화 사자발쪽에는 독성 성분으로 세포에 돌연변이를 일으켜 암을 유발시킬 수 있는 thujone이 없다. 이에 따라 항균, 항염, 면역력 증가등의 작용이 우수한 사자발쪽 추출물을 이용하여 고부가가치 창출을 위한 한방 원료 개발과 이들의 효능을 이용한 기능성 화장품의 개발이 필요하다.

본 연구는 첫째, 쪽의 플라보노이드 유효성분으로 항염작용에 효능이 있는 유파틸린(eupatilin)

과 항암 및 면역력 향상에 유효한 자세오시딘(jaceosidin)의 향장원료 지표를 구축하고 썩의 효능을 강화하기 위하여 생물전환인 발효를 통해 소양증, 보습, 항염증, 아낙필락시스 저해 활성 등의 효과를 증대시킨다. 이렇게 개발된 원료를 제품에 적용하여 항알러지 제품개발에 원료로 사용하고, 아토피에 효과가 있는 기능성 향장제품을 개발하고자 한다. 이렇게 개발된 향료 및 향장원료는 아토피 신약의 기초가 될 것이며 식품 및 향장품에 사용 할 수 있어 수입대체 효과와 수출을 통한 국위 선양 및 농가 소득을 증대하는데 목적이 있다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국외기술개발 현황

미국, 일본등 선진국을 중심으로 아토피 피부염의 치료를 위한 치료제 개발이 활발히 진행되고 있으며 신규 고효능의 합성 또는 생물 유래 물질의 개발 및 응용연구에 집중하고 있으며 아토피 피부염의 발병 메카니즘 규명을 위한 많은 연구개발이 추진중에 있다. 미국, 일본, 프랑스, 독일, 영국, 스페인, 이태리의 아토피 피부염 환자의 연령별 발병률을 분석한 결과 0~4세 소아에게서 21%의 높은 발병률을 보이고 있다.(참고: 생명공학정책연구센터 2007.3.)

아토피 피부질환 발병률은 매년 증가하고 있으며 대기오염 및 기타 유발 요인 등으로 증가 추세는 지속될 것으로 전망되고 있다. 현재 사용되고 있는 아토피 피부염 치료제는 스테로이드제, 항히스타민제, 항생제, 면역억제제등이며, 인체에 심각한 부작용을 초래할 수 있어 지속적인 사용은 어렵다. 또한 정유추출하고 남은 부산물쪽에 대한 재활용 연구는 없는 실정이다.

- 스위스 - 스위스라인(SWISSLINE)은 메디컬 화장품으로 캡슐을 사용하여 피부 보호막 형성한 아토피 화장품 개발
- 이탈리아 - 치코(CHICCO)사는 피부 각질층의 피부장벽을 강화시키는 조성물 개발
- 2002년 미국 여러대학의 공동연구로 아토피 피부염 환자에서 천연 항균 펩타이드의 함량이 감소하는 현상 발견하고 항균 펩타이드는 포도상구균의 사멸을 유도하는 기능을 수행하고 있어 항균 펩타이드의 감소원인을 규명하여 이를 보충하는 방법으로 아토피를 개선
- 2002년 일본 히로사키대 의학부 부속병원 피부과 나카노 하지메 조교수 연구팀은 인공 DNA를 이용한 아토피성 피부염 치료제 개발
- 2005년 미국 스티펠사의 아토피성 피부염 치료제 미믹스크림(MimyX Cream)이 비스테로이드 치료제로 FDA에서 승인
- 2005년 일본 기린 맥주사는 알레르기 증상을 강력히 완화하는 유산균(Lactobacillus paracasei)를 발견하여 제품화
- 국외 제품생산 및 시장 현황

구 분	현재의 시장규모 (2006년)	출처
화장품	100조	대한화장품협회(2007)
아토피/알러지	1100억달러	약업신문(2007)

회사	브랜드	주요성분	매출액(2007)
노바티스(미국)	노바티스	치료제	100억달러
존슨 & 존슨(미국)	아토 마일드	치료제	90억달러
로레알코리아(프랑스)	라로슈포제	쉬어버터	
유한양행	아더마	귀리추출물	
마이마이코리아(호주)	마이마이	스쿠알렌	

제 2 절 국내기술개발 현황

국내 아토피 화장품 시장규모는 5백억원 규모로 추정되고 있다. 지난 2000년만해도 1백억원대 시장을 형성했던 아토피 화장품 시장규모는 점차 커져 4백50억원을 넘어서 5백억원 규모에 이르고 있고 2007년 1,200억원대 시장을 형성하고 있다.

현재 사용되고 있는 아토피 치료제는 주로 증상을 완화시키기 위한 치료제들이 개발되어 있는 실정으로 근본적인 치료제 개발이 절실하다. 일반적으로 아토피 피부염 치료는 약물 투여 타입에 따라 외용방법, 내복방법, 면역치료 및 기타 방법으로 구분할 수 있으며 사용하는 약물에 따라 스테로이드제, 항히스타민제, 면역억제제, 항생제등으로 구분할 수 있으며 현재 사용되고 있는 치료제는 스테로이드제와 항히스타민제가 주를 이루며 극심한 환자의 경우 면역억제제를 사용하기도 한다.

기 개발된 치료제들의 단점인 부작용을 최소화하며 아토피 증상초기 ‘가려움’ 단계에서 작용할 수 있으며 효능이 뛰어난 새로운 약물(면역조절물질)을 개발하기 위한 다양한 노력들이 국내뿐만 아니라 전 세계적으로 활발히 추진중이다.

- 보령메디앙스 - 국내 아토피 시장 중 가장 높은 점유율을 차지하고 있으며 피부 자극을 최소화한 제품 개발, 5無라고 할 수 있을 정도로 방부제와 색상, 계면활성제, 단백질, 향료 등을 최대한 배제한 제품 개발.
- 바이오스펙트럼 - 특히 출원중인 BSASM 성분을 사용해 리포솜 제형기술을 적용해 제품을 개발
- 네오팜 - MLE 제형을 사용해 피부를 보호하는 동시에 라멜라 구조를 회복시키고 장벽을 강화하는 제품 개발

○ 국내 강화 약쑥 연구 현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
동화약품	쑥의 항염작용을 이용한 위염치료제 개발	스틸렌 - 의약품 개발되어 시판중
경희대 약대	약쑥의 약리 활성 성분 분리 및 동정	약리 성분의 의약품, 식품등의 원료로 보건 증진에 기여할것으로 기대
서울대 의대	약쑥의 항암 활성 신소재 탐색 및 개발	항암 효과가 있어 암 예방 기능성 물질로 기대

○ 국내 제품생산 및 시장 현황

구 분	현재의 시장규모 (2006년)	출처
화장품	8조	대한화장품협회(2007)
향료	향료:1,300억원	향료공업협회(2007)
아토피/알러지	1,200억원	약업신문(2007)

회사	브랜드	주요성분	매출액(2007)
(주)네오팜	아토팜	세라미드	300억
보령메디앙스	닥터 아토피스	마치현 추출물	100억
동성제약	아토클리어	부펙사막	30억원
바이오스펙트럼	노스테	BSASM	20억원
두산바이오텍BU	아토타터	에피더말-리피드 콤플렉스	18억원

대한화장품협회(2007) 제공

제 3 절 본 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

국내 및 국외시장 분석결과 아토피 치료제 분야는 막대한 시장성과 함께 아직 정복되지 않은 미개척 분야로 국내를 비롯한 미국, 일본등 선진국을 중심으로 다양함 시도와 많은 연구개발이 진행되고 있으며 현재까지 아토피의 발병기전은 밝혀지지 않았으며 획기적인 치료제가 개발된 것도 아니다. 아토피제품은 치료제의 경우 부작용이 너무 많아 사용을 오래할 수 없으며 아토피

피용 화장품이 다양하게 생산되고 있으나 효능이 떨어지므로, 본 연구과제 결과 천연물 한방유래 치료적 효과를 가진 아토피 제품개발로 향후 아토피 제품으로 독보적인 영향력이 있을 것이며 국민 보건 증진에 기여할 것이다.

기존 특허는 아토피 시장에서 SOD 발현 방법 및 균주 발현 분야와 화합물 개발에 치중되어 있으며 한방 발효물질에서 발효 균주를 제한적으로 사용했으나 본 과제에서는 다양한 균주에서의 생물전환 효능이 뛰어난 신물질을 개발하여 향장원료나 식품원료로 이용할수 있도록 국내에는 이미 특허를 출원(알러지성 피부질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물)한 상태로 본 연구결과는 국내·외에서 차지하는 위치는 독보적이라 할 수 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 연구개발의 최종목표

국내 화장품 원료의 약 70%는 수입에 의존하고 있으며 천연 부존자원이 부족한 국내 여건상 고부가가치의 신원료나 신소재를 활용한 한방 원료 및 국산 향장품 원료 개발이 절실하게 요구되고 있다. 국내에 자생하는 약용 식물 중 강화 사자발쑥은 다년생 초본으로 쑥 중에서도 그 효능이 다른 쑥에 비해 더 뛰어난 것으로 알려져 있으며 단오에 약효가 가장 뛰어나다. 예로부터 피부 질환, 여성 질환, 염증 질환 등에 사용되어 왔던 강화약쑥의 항알러지 효과도 기대되었다.

세계적으로나 국내 소비자의 천연 소재에 대한 선호도로 천연 향료 및 기능성 천연 향장 원료에 대한 요구가 증대되고 있다. 바이오 기술을 통해 천연물인 강화 약쑥의 플라보노이드 성분에는 항염 효과가 있는 유파틸린(eupatilin)과 면역력을 증가시켜주는 자세오시딘(jaceosidin)을 지표로 사용할 수 있도록 향장원료로서의 적정 유효 농도를 확립하여 기능성 제품에 적용하고 항균작용이 뛰어난 천연 쑥향과 생물전환된 발효 물질이 아토피 원료로서의 유효성을 판정하여 기능성 원료로 입증하고 이 물질이 함유된 향알레르기, 보습, 피부보호 및 예민피부를 개선시키는 cosmeceutical용 아토피 제품을 개발하고자 하였다.

(주)파인엠은 수년간 강화 약쑥 에센셜 오일을 추출하여 천연방부시스템에 적용하고 향장품 및 생활용품을 제작하여 유기농 시장과 병원, 관리실등의 전문시장에 유통하고 있다. 그러나 에센셜 오일을 추출하고 남은 쑥의 활용처를 찾지 못하여 그대로 폐기하거나 아니면 농가에서 소의 여물로 사용하거나 밭에 퇴비로 사용하는 것이 전부였다. 쑥의 부산물에 좋은 유효 성분이 많다는 것을 알고 있었지만 대량으로 나오는 부산물의 활용방법이 체계화 되지 못하여 그대로 방치되었고 이것은 기업에 많은 손실을 가져오게 되었다.

쑥의 강한 항균력 때문에 생물전환이 쉽지 않았으나 자사의 경우 쑥에서 수증기 증류법으로 에센셜 오일을 추출하여 남은 쑥 부산물에는 향취가 거의 남아있지 않은 상태이므로 쑥 잔사의 생물전환이 용이하게 될 수 있었다. 결국 쑥에서 에센셜 오일을 추출하고 남은 부산물에 다양한 균주로 생물전환을 하였으며 생물전환이 효과적으로 이루어진 새로운 기능성 신물질을 탐색하게 되었다. 이 물질은 항알러지에 효과적이라 연구 되었으며 아토피 피부 질환에 효과적인 원료로 아토피 관련 제품을 개발하게 되었다. 이렇게 생물전환된 부산물에서 일차적으로 효능성분을 추출한 뒤 또다시 남은 부산물 찌꺼기를 동물의 발효 정장 사료의 효과를 모색하였다. 결국 쑥에서 천연 향료인 아로마 에센셜 오일을 추출한 뒤 남은 부산물을 생물전환하여 기능성 신물질을 개발하고 또다시 남은 잔사를 활용함으로써 남은 부산물이 전혀 없게 되어 자원을 100% 활용하고자 하였다.

제 2 절 연구개발의 내용 및 결과

1. 강화 사자발쑤의 오일 추출 조건 확립

강화 사자발쑤를 수증기 증류법으로 오일과 워터를 추출할 때 압력을 줄때와 압력을 주지 않을 때 오일의 성분함량의 차이를 분석하여 더욱 효과적인 오일 추출조건을 확립하고자 하였다. 추출기는 파인엠 공장의 1.2톤 수증기 증류 추출기를 사용하였다.



Fig. 1. 파인엠 1.2톤 정유추출기

정유 성분의 분석은 GC-MS를 이용하여 분석하였다. GC는 Varian GC3800, MS Saturn 1200으로 Column은 정유성분 분리에 유효한 VF-5MS를 사용하였으며 oven 온도는 70℃에서 1분간 유지시킨 다음 250℃까지 분당 10℃의 속도로 올린 후 6분간 유지시켰으며 Injection volume은 2 μ l, injector 온도는 200℃로 하였다. split ratio는 1:50으로 하였다.

가. 쑥의 수증기 증류법 추출시 압력을 주지 않았을 때

Table 1. 사자발쑥 오일의 GC/MS (용매 물: 100℃)

No.	Rt.	components	quantity(%)	
			1차	2차
1	10.34	alpha-pinene	0.40	0.70
2	10.48	alpha-thujene	0.13	0.32
3	11.89	camphene	0.36	0.52
4	13.61	beta-pinene	0.52	0.79
5	14.20	sabinene	0.17	0.64
6	16.87	alpha-terpinene	0.53	0.43
7	17.77	limonene	0.01(tr.)	0.01(tr.)
8	18.21	beta-phellandrene	0.01(tr.)	0.01(tr.)
9	18.48	1,8-cineole	70.00	62.60
10	19.97	gamma-terpinene	0.97	0.98
11	21.08	para-cymene	2.44	1.81
12	21.72	alpha-terpinolene	0.18	0.16
13	29.20	1-octen-3-ol	0.55	1.46
14	30.00	trans-sabinene hydrate	6.97	12.41
15	32.26	camphor	0.13	0.16
16	33.55	cis-sabinenehydrate	3.65	4.31
17	34.13	cis-p-menthen-1-ol	0.51	0.30
18	34.87	bornyl acetate	0.01(tr.)	0.15
19	35.62	beta-caryophyllene	0.01(tr.)	0.19
20	35.72	terpinene-4-ol	3.37	2.26
21	36.73	cis-p-2-menthen-1-ol	0.25	0.01(tr.)
22	37.83	cis-verbenol	0.27	0.39
23	38.43	delta-terpineol	0.42	0.48
24	38.75	trans-verbenol	0.73	0.79
25	38.93	bisabolene	0.18	0.29
26	39.38	alpha-terpineol	2.70	3.74
27	39.63	borneol	3.32	3.05
28	40.40	valencene	0.52	0.42
29	49.89	caryophylleneoxide	0.46	0.13
30	55.32	eugenol	0.24	0.42
others			0.03	0.10
TOTAL			100	100

나. 쑥의 수증기 증류법 추출시 압력을 주었을 때(110℃)

Table 2. 사자발쑥 오일의 GC/MS (용매 물: 110℃)

No.	Rt.	components	quantity(%)	
			1차	2차
1	10.36	alpha-pinene	1.23	1.20
2	10.51	alpha-thujene	0.48	0.53
3	12.03	camphene	0.86	0.82
4	13.75	beta-pinene	1.14	1.13
5	14.30	sabinene	0.01(tr.)	0.88
6	14.47	verbenene	0.01(tr.)	0.14
7	14.71	2,4(10)-thujadien	0.01(tr.)	0.01(tr.)
8	16.15	myrcene	0.01(tr.)	0.01(tr.)
9	16.96	alpha-terpinene	1.92	1.94
10	16.28	phellandrene	0.01(tr.)	0.01
11	17.85	limonene	0.01(tr.)	0.01
12	18.67	1,8-cineole	37.19	34.90
13	19.28	2-pentylfuran	0.01(tr.)	0.01(tr.)
14	20.05	gamma-terpinene	3.13	3.20
15	20.22	ocimene	0.01(tr.)	0.01(tr.)
16	20.40	amylethylketone	0.01(tr.)	0.01(tr.)
17	21.15	para-cymene	3.99	2.92
18	21.75	alpha-terpinolene	0.75	0.73
19	23.26	cis-3-hexenyl acetate	0.01(tr.)	0.01(tr.)
20	26.98	yomogialcohol	0.22	0.13
21	28.61	p-alpha-dimethylstyrene	0.01(tr.)	0.01(tr.)
22	28.85	filifolone	0.01(tr.)	0.01(tr.)
23	29.22	1-octen-3-ol	0.82	1.27
24	30.03	trans-sabinene hydrate	2.86	6.22
25	31.26	alpha-copaene	0.24	0.17
26	31.62	artemisiaalcohol	0.23	0.54
27	31.82	chrysanthenone	0.37	0.65
28	32.27	camphor	0.17	0.17
29	32.39	beta-bourbonene	0.01(tr.)	0.01(tr.)
30	33.58	cis-sabinene hydrate	2.06	3.08
31	34.15	cis-p-menthen-1-ol	0.64	0.71
32	34.88	bornyl acetate	0.44	0.38
33	35.71	beta-caryophyllene	3.00	2.06
34	35.78	terpinene-4-ol	4.10	5.10
35	36.75	cis-p-2-menthen-1-ol	0.50	0.45
36	37.84	cis-verbenol	0.48	0.67
37	38.06	trans-betafarnesene	0.64	0.35
38	38.46	delta-terpineol	1.16	0.99
39	38.49	alpha-humulene	0.01(tr.)	0.01(tr.)
40	38.98	bisabolene	0.86	0.84
41	39.45	alpha-terpineol	4.58	5.34
42	39.69	borneol	5.11	5.61
43	40.03	germacrene D	2.36	0.92
44	40.47	valencene	1.65	1.70

45	40.92	bicyclogermacrene	0.19	0.01(tr.)
46	41.24	trans-p-Menth-1-en-3-ol	0.4	0.32
47	41.71	delta-cadinene	0.15	0.01
48	44.34	l-carveol	0.17	0.18
49	49.92	caryophlleneoxide	2.76	3.16
50	54.24	(+)spathulenol	0.51	0.52
51	55.33	eugenol	1.72	2.56
52	56.67	carvacrol	0.2	0.17
others			10.72	7.32
TOTAL			100	100

수증기 증류로 추출시 압력을 주었을 때(110℃)와 압력이 없을 때(100℃)의 에센셜 오일의 GC/MS 분석결과 100℃와 110℃에서 1,8-cineole의 함량은 약 66%에서 약 36%로 함량이 감소되었으며 borneol 은 3.2%에서 5.4%로 증가하였고 eugenol 0.3%에서 2.2%로 증가하였다. 또한 압력이 있을 때 추출되는 물질도 약 20가지가 더 분석되었다. 쑥의 상태와 재배 환경에 따라 추출되는 오일의 양은 약 0.05~0.25%로 차이가 많았으며 추출되는 에센셜 오일의 양은 압력과 거의 무관하여 비슷하게 추출되었다. 사자발쑥 에센셜 오일 추출결과 증기압이 있는 상태에서 추출된 에센셜 오일이 항균력이 더욱 커서 에센셜 오일의 추출은 110℃에서 추출하는 것이 효과적이었다.

2. 생쑥과 건쑥의 생물 전환 전처리 조건 확립

가. 생쑥의 생물 전환 전 처리

강화 사자발쑥 생쑥을 110℃에서 2시간 30분동안 수증기 증류로 에센셜 오일을 추출한 후 20갤론 알루미늄 통에 부산물 20kg을 넣고 유산균 K-1 균주를 4g 넣어 5일간 발효시키고, 그 발효된 김체를 동결건조하여 소양모델 생쥐에서 항소양효과를 측정하였다.

(1) A: 쑥 부산물 20kg + 유산균 K-1 균주 4g

(2) B: 쑥 부산물 20kg + 증류수 12리터 + 유산균 K-1 균주 4g

(3) C: 쑥 부산물 20kg + 증류수 25리터 + 유산균 K-1 균주 4g

(4) D: 강화 사자발쑥 생쑥을 110℃에서 2시간 30분동안 수증기 증류로 에센셜 오일을 추출한 후 부산물을 그대로 압착하여 나온 추출액 2L에 유산균 K-1 균주 1g 넣은 후 발효

(5) E: 강화 사자발쑥 생쑥을 110℃에서 2시간 30분동안 수증기 증류로 에센셜 오일을 추출한 후 부산물에 증류수를 넣고 분쇄한후 찌꺼기를 걸러낸 추출액 2L에 유산균 K-1 균주 1g 넣은 후 발효

나. 건쑥의 생물 전환 전 처리

강화 사자발쑥을 1년간 건조시킨 건쑥을 110℃에서 2시간 동안 수증기 증류로 에센셜 오일을 추출한 후 부산물 3kg에 증류수 2L를 넣고 K-1 균주 1g 넣은 후 5일간 발효시키고, 그 발효된 김체를 동결건조하여 소양모델 생쥐에서 항소양효과를 측정하였다.

(1) F: 쑥 부산물 3kg + 증류수 3L + K-1 균주 1g

Table 3. Inhibitory effect of fermented *Artemisia princeps* on histamine - induced scratching behavior in mice

Agents	Dose (mg/kg)	Inhibition (%)
Normal control (vehicle alone)	-	-
Control	-	-
A	50	15.2±3.3
B	50	18.8±6.1
C	50	38.1±6.5
D	20	30.0±5.8
	50	51.2±14.7
E	20	-
	50	32.7±7.0
F	20	28.5±7.0
	50	54.6±12.2
Azelastine	10	81.8±7.1

대량생산의 생물전환 조건을 확립하기 위하여 다양한 조건에서 발효를 진행하였으며 그중 생축을 110°C에서 2시간 30분동안 수증기 증류로 에센셜 오일을 추출한 후 부산물을 그대로 압착하여 나온 추출액 2L에 유산균 K-1 균주 1g 넣은 후 발효한 것(D)이 소양모델쥐에서 항소양효과를 측정할결과 51%저해로 우수한 항소양효과가 있었다. 건축의 경우 에센셜 오일 추출 후 남은 부산물의 경우 수분함류량이 너무 적어 건축 부산물 kg당 1리터의 증류수를 넣은후 생물전환하였을 때 55%의 항소양효과가 측정되었다. 그러므로 생축 부산물의 생물전환을 위한 전처리 조건은 부산물을 그대로 압착하여 나온 추출액에 발효균주를 처리한것이였다. 건축 부산물의 생물전환을 위한 전처리 조건은 부산물에 증류수를 넣고 발효시킨 것이였다.

3. 부산물의 유효성분 분석

강화 약축의 수증기 증류 후 잔사 추출물의 에탄올과 물의 유파틸린과 자세오시딘의 함량을 정확히 파악하고자 아래와 같은 조건으로 HPLC분석을 실시하였다. LC-MS/MS는 Agilent Technologies의 Agilent 6410B(Agilent Technologies, USA, Santa Clara CA)을 이용하여 측정하였다.

가. 분석조건

- LC condition

- Machine : Agilent Technologies 6410B
- Column = Elip C18 (0.0 m x 250 um x 4.5 um)
- Flow rate = 0.8 ml/min

- Injection Volume = 2 uL
- Solvent : Water - 0.1 % F.A + ACN - 0.1 % F.A
- MS condition
 - Ion Source : ESI(+) mode
 - Fragmentor : 150
 - SRM Mode : 345.1 (eupatilin), 331 (jaceosidin)
 - MRM Mode : eupatilin ($m/z = 329.8, 313.8, 286.8$)
jaceosidin ($m/z = 315.8, 272.8, 245$)
 - Gas Temp. : 320°C
 - Gas Flow : 12 L/min
 - Capillary Volt. : 4000 V

나. 강화사자발쑥 추출방법 별 eupatilin 과 jaceosidin의 함량분석

강화약쑥 시료 4종인 쑥 물추출, 쑥 70%에탄올추출, 수증기증류후 쑥잔사 물추출, 쑥잔사 70%에탄올 추출을 각각 EtOH + pyrdin 0.1 uL 녹인 후 1000 ppm을 만들어 분석에 사용하였다. 4개의 시료에 대한 추출물의 추출물량은 table 4와 같다.

Table 4. 강화 사자발쑥 추출방법에 따른 추출물의 양

시료명	추출물량 (g)
70 - EtOH	44
H ₂ O	28
SD 70-EtOH	41
SD - H ₂ O	25.9

다. LC-MS/MS을 이용한 eupatilin과 jaceosidin의 MRM 조건 탐색.

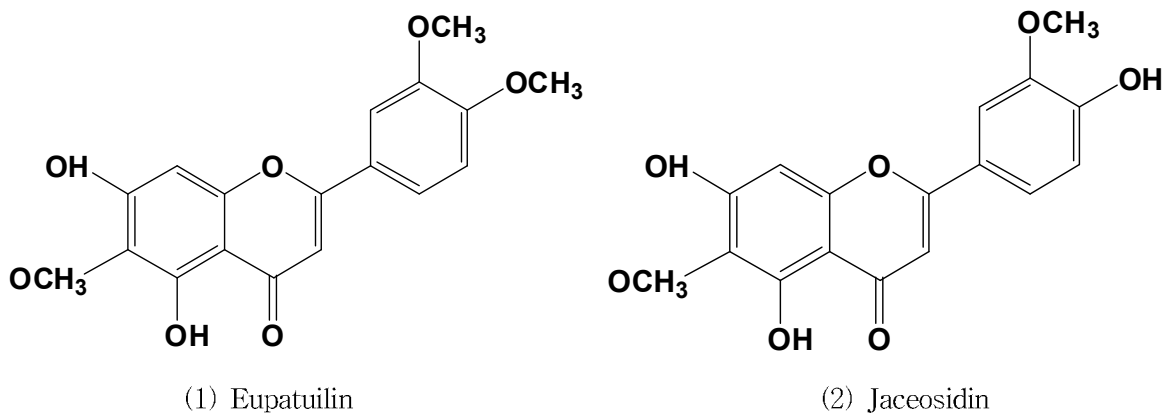


Fig. 2. eupatilin(1)과 jaceosidin(2)의 구조식.

Eupatoinin과 jaceosidin의 구조식은 Fig. 2과 같으며, flavone 골격의 구조를 보이는 화합물이다. 따라서, [M+H]⁺로 측정되는 EIS(+) mode로 측정하였다.

라. Eupatilin의 Product ion확인 및 MRM조건 확인

LC-MS/MS로 측정된 결과 *m/z*가 345.1인 eupatilin을 product ion을 측정하여 MRM 조건을 확립하였으며, MRM을 측정된 결과 fig. 2와 같이 chromatogram을 얻을 수 있었다.

실험방법은 수증기 증류법으로 에센셜 오일을 추출한뒤 건조시킨 사자발쑥 500g 을 증류수 5000ml 에 침지한 뒤 4시간 동안 추출(Heating) 한뒤 냉침하고 냉침 후 감압 여과기로 여과한다. 여과후 농축을 실시하였다.

강화약쑥의 플라보노이드 성분에는 항염 효과가 있는 유파틸린(eupatilin)과 면역력을 증가시켜 주는 자세오시딘(jaceosidin)이 주성분으로 알려져 있다. 이 유효성분을 향장 원료로 사용하고 자 강화약쑥 생쑥과 강화약쑥에서 수증기 증류법으로 에센셜 오일과 워터를 추출한뒤 쑥 잔사를 향장 원료 추출방법에 따라 추출하였다. 생쑥과 쑥잔사의 유효 성분의 함량 차이점을 분석하였다.

마. 시료의 조제

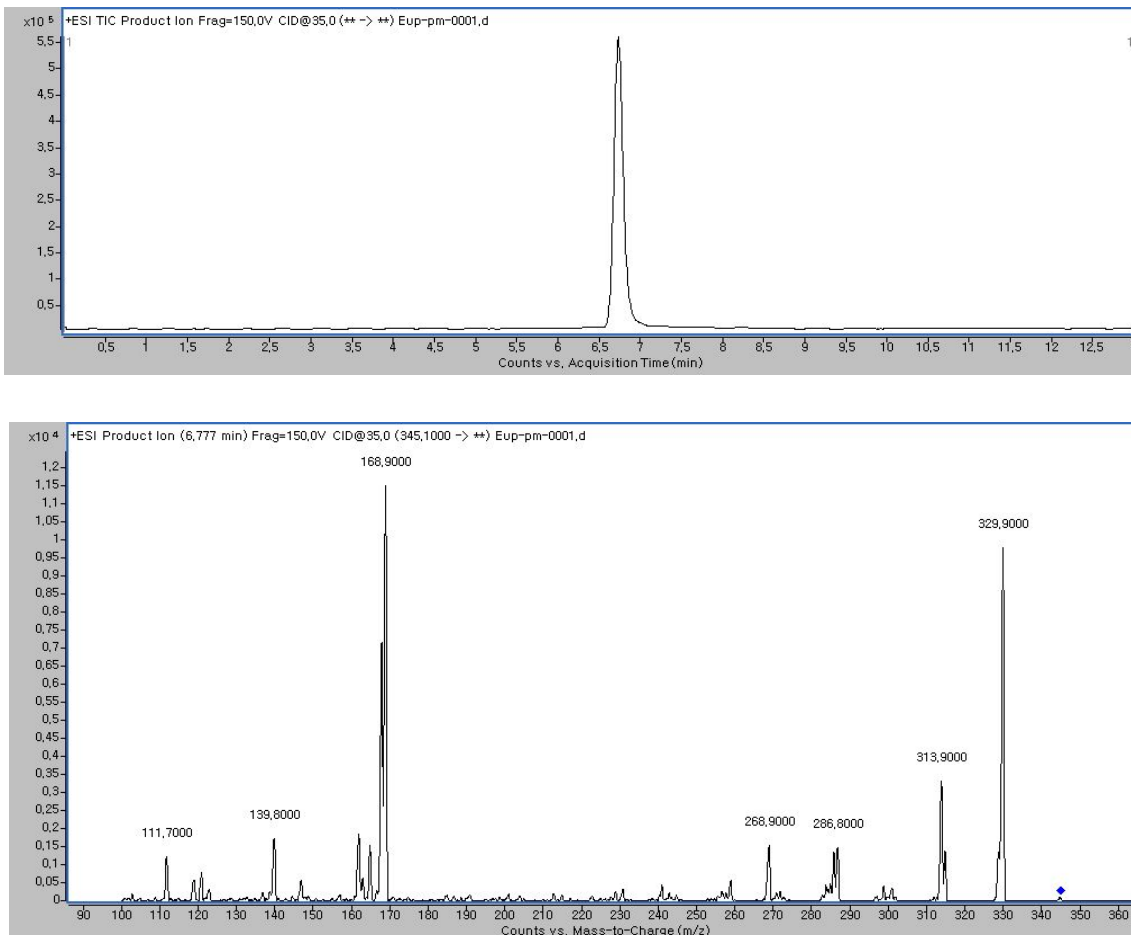


Fig. 3. Eupatilin의 chromatogram과 Product ions.

바. Jaceosidin의 Product ion확인 및 MRM조건 확인

LC-MS/MS로 측정된 결과 m/z 가 331.0인 jaceosidin을 product ion을 측정하여 MRM 조건을 잡아 MRM을 측정하여 fig. 4과 같이 chromatogram을 얻을 수 있었다.

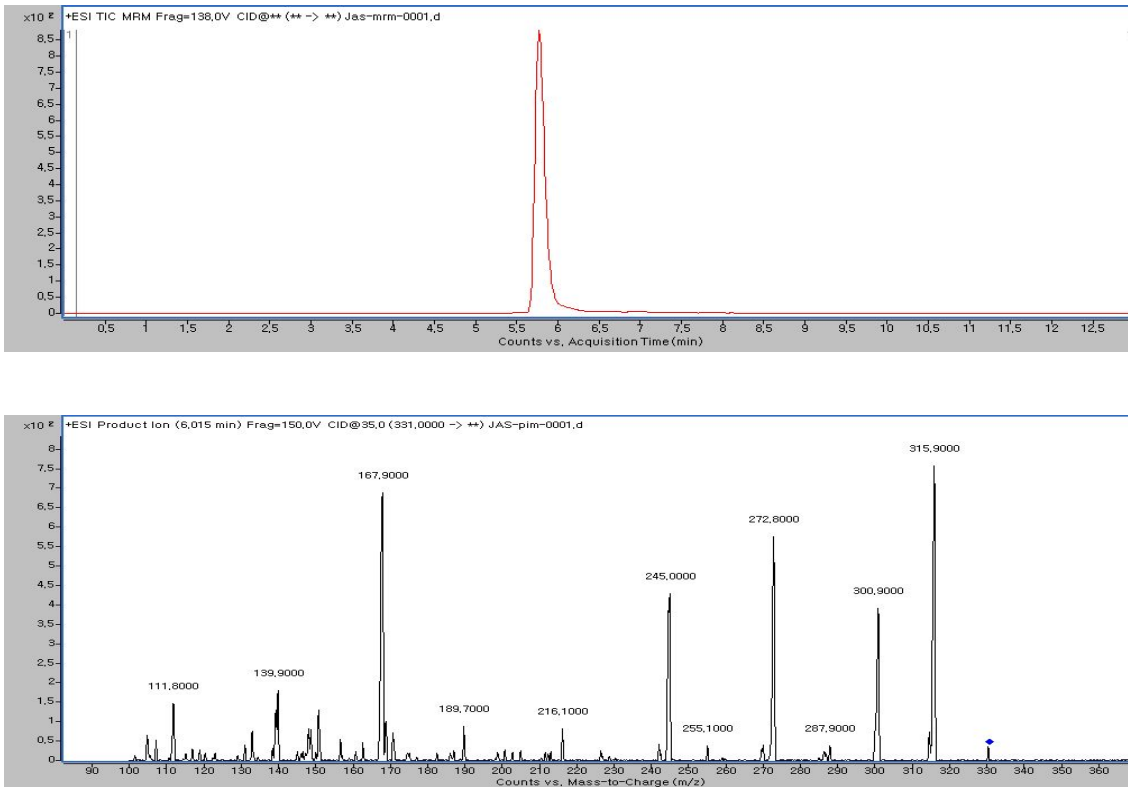


Fig. 4. Jaceosidin의 chromatogram과 Product ions.

Table 4. Eupatilin의 각 추출방법별 함량비교

시료명	화합물명	Eupatilin
70-EtOH	peak area	18341
	추출물 1mg 당 함량	0.94 %
H2O	peak area	452
	추출물 1mg 당 함량	0.01 %
SD 70-EtOH	peak area	19453
	추출물 1mg 당 함량	1.00 %
SD 70-H2O	peak area	1698
	추출물 1mg 당 함량	0.07 %

분석 결과 강화약썩의 추출물에서의 eupatilin의 함량은 주정 추출물의 경우 SD처리한 것과 처리하지 않은 추출물과 1% 내외로 유사한 것으로 판단되며, 물 추출물에서는 0.01 %와 0.07 %로 매우 적은 것으로 사료된다. 하지만 물 추출물일 경우 SD 처리하여 추출 할 때 다소 많은 량의 eupatilin이 추출된 것을 확인 할 수 있었다.

Table 5. Jaceosidin의 각 추출방법별 함량비교

시료명	화합물명	Jaceosidin
70-EtOH	peak area	3791
	추출물 1mg 당 함량	0.13 %
H2O	peak area	170
	추출물 1mg 당 함량	0.008 %
SD 70-EtOH	peak area	4505
	추출물 1mg 당 함량	0.16 %
SD 70-H2O	peak area	417
	추출물 1mg 당 함량	0.02 %

분석 결과 강화약썩의 추출물에서의 jaceosidin의 함량은 주정 추출물의 경우 SD 처리한 것과 처리하지 않은 추출물과 0.15 % 내외로 유사한 것으로 판단되며, 물 추출물에서는 0.008 %와 0.02 %로 매우 적은 것으로 사료되며 추출량은 서로 유사하였다.

사. 강화 사자발쑥의 HPLC 분석

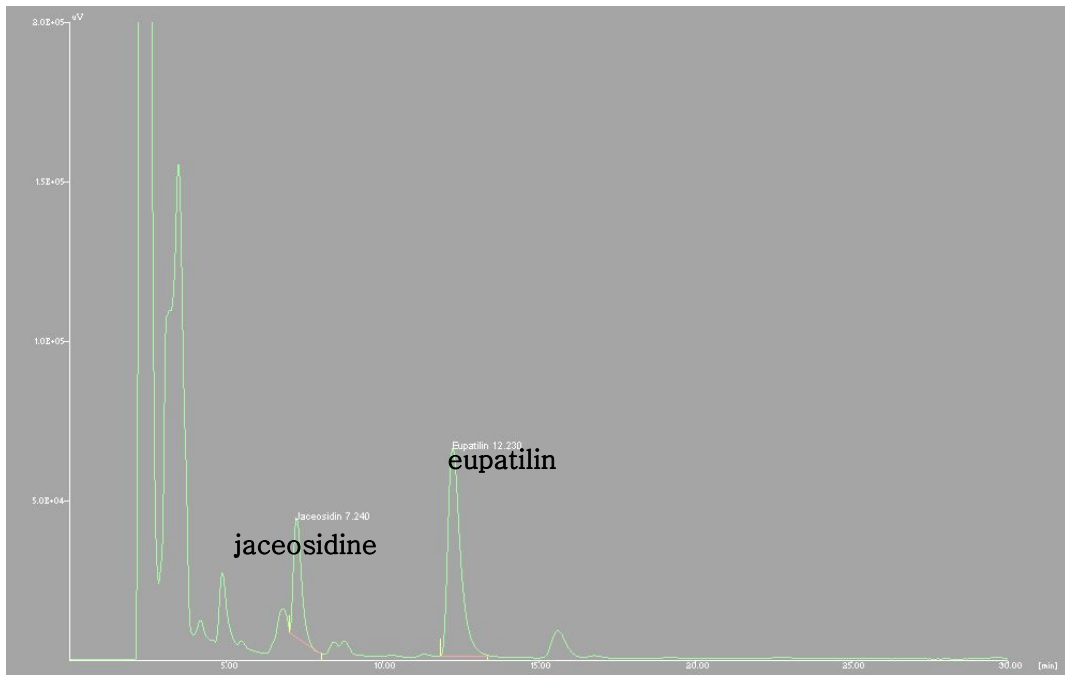


Fig. 7. 에탄올추출물-95% (65Brix)

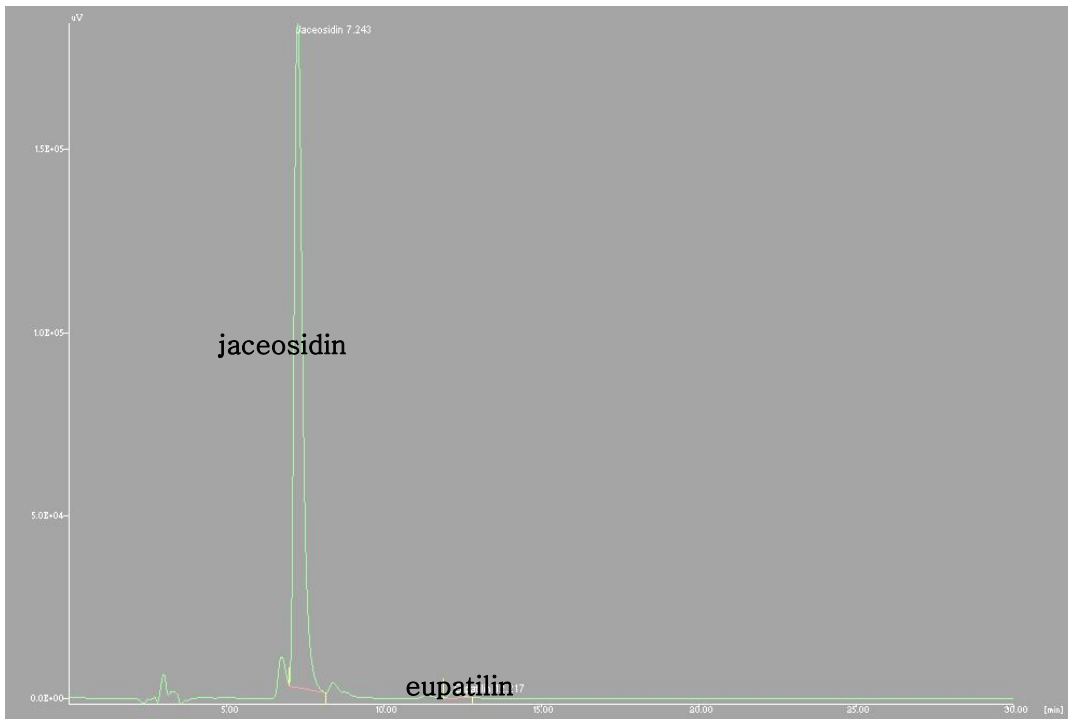


Fig. 8. 물 추출물(51Brix)

Table 5. 강화 사자발쑥 추출방법에 따른 추출물의 양

품 명	jaceosidin(%)	eupatilin(%)
에탄올추출물-95% (65Brix)	0.36%	0.44%

물 추출물(51Brix)	0.01%	0.11%
-----------------	-------	-------

분석 결과: Jaceosidin 과 Eupatilin 성분의 분석 결과 Et-OH(95%) 추출물이 높다는 것을 알 수가 있었다.

아. 강화 약쑥 추출물의 유효농도

강화약쑥의 유효 성분을 지표로 사용할 수 있도록 향장원료로 적정 유효 농도를 확립하였다. 강화약쑥 추출물의 유효농도는 다음과 같다.

종류	유효농도(%)
JACEOSIDIN	0.005
EUPATILIN	0.01

Table 6. 강화약쑥 추출물의 유효농도

이 유효농도의 기준은 생쥐에 20mg/kg을 투여하였을 때보다 50mg/kg 즉, 0.02%를 투여하였을 때보다 0.05%를 투여하였을 때 더 높은 효과를 나타냈음이 보고된바 있다.(Shin et al., SCI 학술지 Effect of Fermented Lactic Acid Bacteria on Antiallergic Effect of Artemisia princeps Pamp..Journal of Microbiology and Biotechnnology,2006.) 강화약쑥의 추출물에서의 jaceosidin의 함량은 주정 추출물의 경우 수증기증류 처리한 것과 처리하지 않은 부산물의 추출물이 0.15% 내외로 유사한 것으로 판단되며, 물 추출물에서는 0.008%와 0.02%로 매우 적은 것으로 사료되며 추출량은 서로 유사하였다. 이를 기초로 인체에 유효한 농도는 자세오시딘 0.005%, 유파틸린 0.01%로 제시하였다.

4. 사자발쑥 추출물의 유해균에 대한 항균성 평가

가. 사자발쑥 에센셜 오일의 발효균주에 대한 항균 작용

사자발쑥 정유의 세균에 대한 항균력을 측정하였다. 시험균주는 *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium breve*이다. 시험방법은 시험균주를 고체 배지(Muller-Hinton for *S. aureus* and *E. coli*, GAM for *L. acidophilus* and *B. breve*)에 호기적(MH 배지) 또는 혐기적(GAM 배지)으로 1~3일 배양하여 평가하였다.

(1) 대장균(*Escherichia coli*)에 대한 항균 효과

사자발쑥 워터와 95% 알콜 추출분획은 대장균에 대해 항균력을 나타내지 못했다. 그러나, 일반적인 항균제인 글루콘산 클로르헥시딘액 0.05g/100g과 사자발쑥 정유분획은 좋은 항균력을 나타냈다. 그러나 사자발쑥좌육제와 사자발쑥 정유분획 모두 원액을 10배 희석한 경우에는 거의 효과가 없었다.

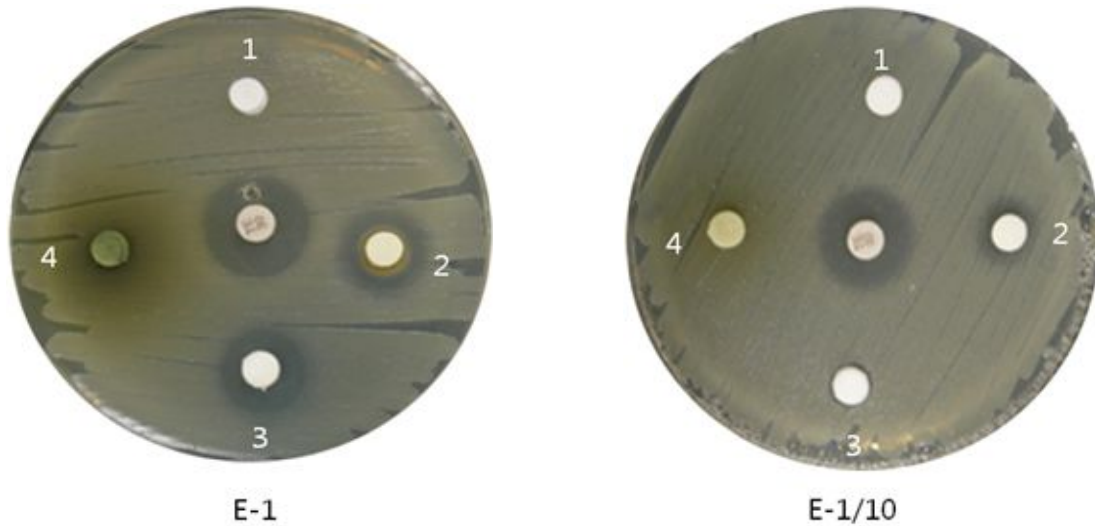


Fig. 8. Antimicrobial activity of essential oil *Artemisia* sp against *Escherchia coli*. E-1, original solution; E-1/10, 10-fold diluted solution. 1, Water of *Artemisia* sp; 2, *Artemisia* sp containing agent for Chlorhexidine Gluconate 0.05%; 3, Essential oil fraction of *Artemisia* sp; 4. 95% Ethanol fraction of *Artemisia* sp.

(2) 포도상구균(*Staphylococcus aureus*)에 대한 항균 효과
 사자발쑥 워터와 95% 알콜추출분획은 포도상구균에 대해 항균력을 나타내지 못했다. 그러나, 일반적인 항균제인 글루콘산 클로르헥시딘액 0.05g/100g과 사자발쑥 정유분획은 좋은 항균력을 나타냈다. 그러나, 일반적인 항균제인 글루콘산 클로르헥시딘액 0.05g/100g와 사자발쑥 정유분획 모두 원액을 10배 희석한 경우에는 거의 효과가 없었다.

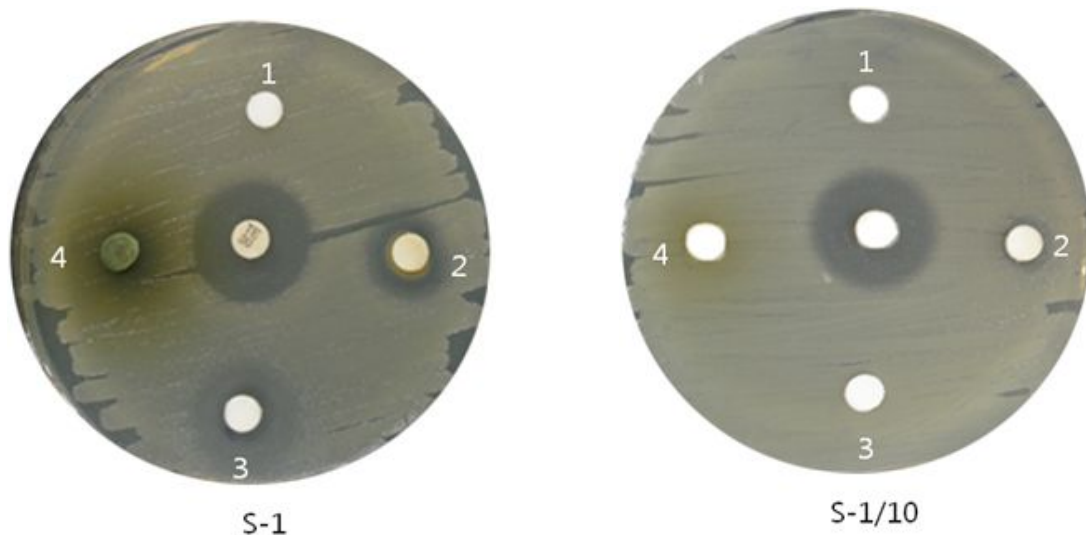


Fig. 9. Antimicrobial activity of essential oil *Artemisia* sp against *Staphylococcus aureus*. E-1, original solution; E-1/10, 10-fold diluted solution. 1, Water of *Artemisia* sp; 2, *Artemisia* sp containing agent for Chlorhexidine Gluconate 0.05% ; 3, Essential oil fraction of *Artemisia* sp; 4. 95% Ethanol fraction of *Artemisia* sp.

(3) 젖산균(*Lactobacillus acidophilus*)에 대한 항균 효과
 사자발쑥 워터와 95% 알콜추출분획은 젖산균에 대해 항균력을 나타내지 못했다. 그러나, 사자

발췌추출제와 사자발췌 정유분획의 원액음 모두 항균력을 나타냈다. 사자발췌 추출제보다는 정유분획이 낮은 항균력을 보였다. 사자발췌추출제는 10배 희석에서도 항균력을 보였으나, 정유분획 10배 희석에서 항균력이 없었다.

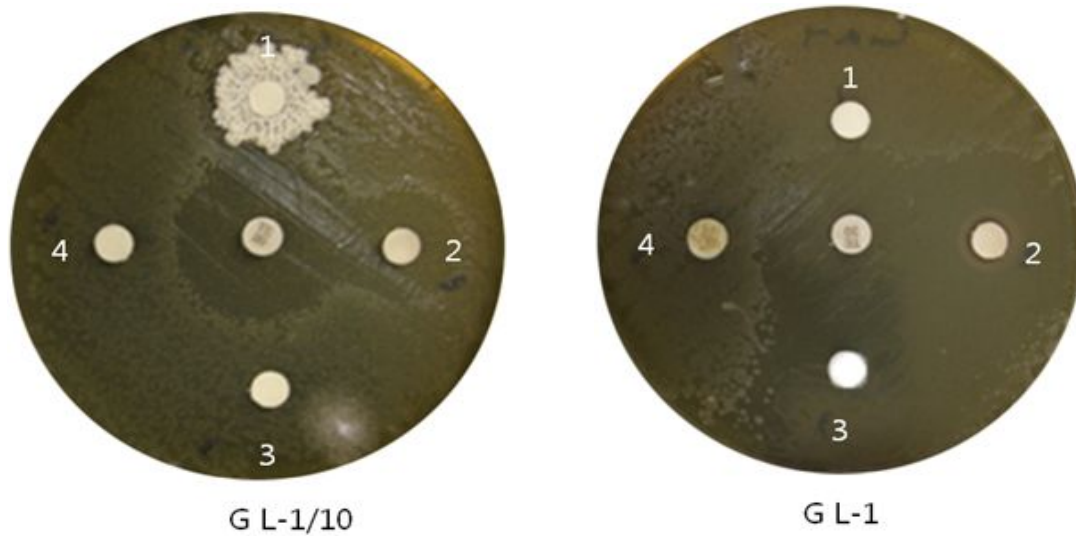


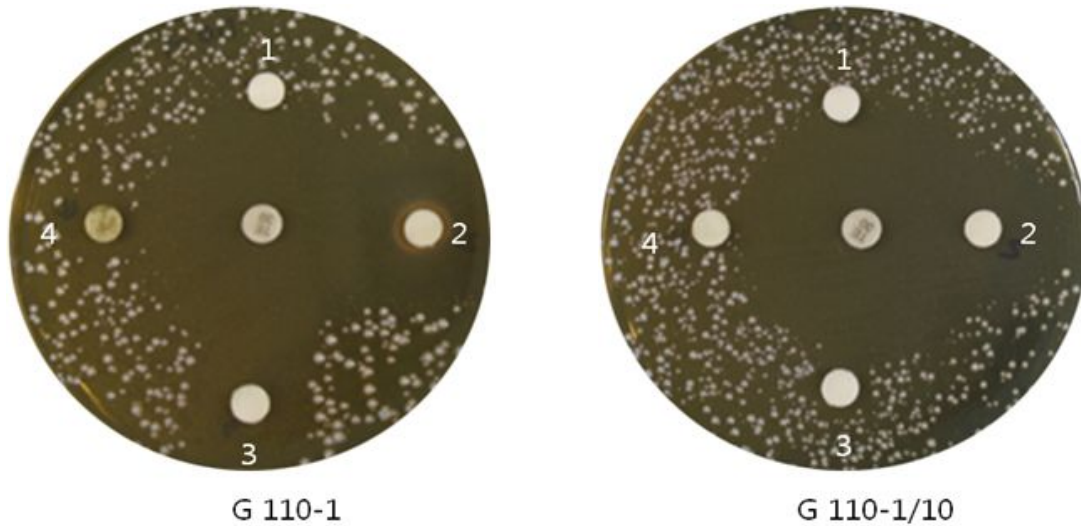
Fig. 10. Antimicrobial activity of essential oil *Artemisia* sp against *Lactobacillus acidophilus*. E-1, original solution; E-1/10, 10-fold diluted solution. 1, Water of *Artemisia* sp; 2, *Artemisia* sp containing agent for Chlorhexidine Gluconate 0.05% ; 3, Essential oil fraction of *Artemisia* sp; 4. 95% Ethanol fraction of *Artemisia* sp; 4. 95% Ethanol fraction of *Artemisia* sp.

(4) 유산균(*Bifidobacterium breve*)에 대한 항균 효과

사자발췌 워터와 95% 알콜추출분획은 *Lactobacillus acidophilus*에 대해 항균력을 나타내지 못했다. 그러나, 사자발췌추출제와 사자발췌 정유분획은 항균력을 나타냈다. 그러나, 사자발췌추출제의 경우에는 원액과 10배 희석에서 강한 항균력을 나타냈다. 그러나, 사자발췌 정유분획은 원액에서 약한 항균력을 10배 희석액에서는 항균력이 없었다.

Fig. 11. Antimicrobial activity of essential oil *Artemisia* sp against *Bifidobacterium breve*. E-1, original solution; E-1/10, 10-fold diluted solution. 1, Water of *Artemisia* sp; 2, *Artemisia* sp containing agent for Chlorhexidine Gluconate 0.05% ; 3, Essential oil fraction of *Artemisia* sp; 4. 95% Ethanol fraction of *Artemisia* sp; 4. 95% Ethanol fraction of *Artemisia* sp.

사자발췌 추출물과 에센셜 오일의 항균성 평가에서 일반적인 항균제인 글루콘산클로르헥시딘 액은 일반적인 대장균, 포도상구균과 같은 유해균에 항균성이 컸으며 특히, 글루콘산클로르헥



시딘액은 젖산균이나 유산균까지 모두 항균력이 크지만 사자발쑥 에센셜 오일은 일반적인 유해균에는 항균성이 큰데 비하여 젖산균과 유산균과 같은 유익균에 대해 항균성이 없어 선택적 살균을 하는 것을 알 수 있었다. 그러므로 사자발쑥 에센셜 오일은 아토피에 2차 감염을 일으키는 유해균들은 없애주고 유익균을 살려두어 피부를 건강하게 할 수 있다고 판단되었다. 그러나 일반적인 사자발쑥 주정 추출물은 항균력이 거의 없었다.

5. 쑥정유 분획의 알러지 저해 효과 평가

가. 약쑥 추출물과 약쑥에서 분리한 eupatilin 과 jaceosidin의 항알러지 효과

Table 7. Inhibitory effects of eupatilin and jaceosidin on the passive cutaneous anaphylaxis reaction induced in mice by IgE.

Agent	Dose (mg/kg)	Inhibition (%)	
		<i>p.o.</i>	<i>i.p.</i>
Eupatilin	5		48 ± 7 a
	10	26 ± 8 ^a	69 ± 12 ^b
	50	43 ± 7 ^b	e
Jaceosidin	5		50 ± 12 ^a
	10	41 ± 8 ^b	67 ± 7 b
	50	59 ± 9 ^c	
Azelastine	10	76 ± 6 ^d	87 ± 8 ^c

^{a,b,c,d} Items with the same letters in each column were not significantly different.

^e) Not determined.

The passive cutaneous anaphylaxis reaction in mice was induced by an intradermal injection of anti-DNP-HSA. Tested agents were orally or intraperitoneally administered 60 minutes prior to the challenge with DNP-HSA antigen.

The amounts of extravasated Evan blue in the dorsal skin (1 x 1 cm) of the control stimulated with the IgE-antigen complex and vehicle-treated groups were 25 ± 3 and 11 ± 2 μ g, respectively.

Values are expressed as the means \pm S.D. (n=5).

약쑥 추출물 및 약쑥에서 분리한 eupatilin 과 jaceosidin이 탈과립 및 NF-kB의 활성화를 억제하였고, 항아낙필락시스효과를 비롯한 다양한 항알러지 효과가 있다.

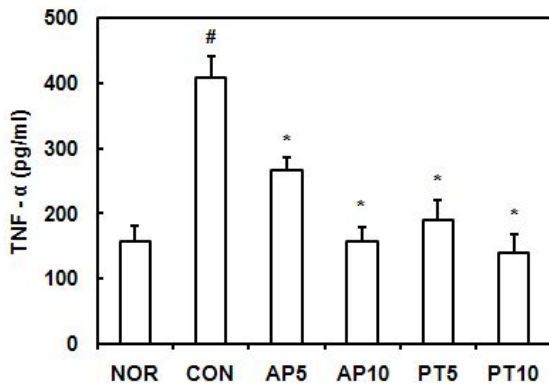
나. 쑥 정유 및 피톨의 항알러지 효과

Table 8. Inhibitory effect of *Artemisia princeps* essential oil (APEO) and phytol on histamine-induced scratching behavior and vascular permeability in mice.

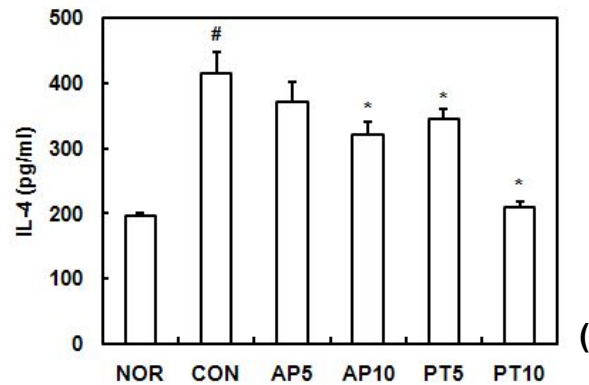
Agent	Dose (mg/kg)	Inhibition (%)	
		Scratching behavior	Vascular permeability
APEO (essential oil)	5	54 \pm 11	34 \pm 15
	10	60 \pm 12	56 \pm 10
Phytol	5	51 \pm 8	42 \pm 7
	10	69 \pm 7	62 \pm 15
Azelastine	10	88 \pm 4	73 \pm 11

쑥에서 추출한 정유분획과 피톨은 azelastine과 비교할 만큼 강한 히스타민으로 유도한 소양모델 동물에서 강한 알러지 저해 효과를 보였다.

(A)



(B)



(C)

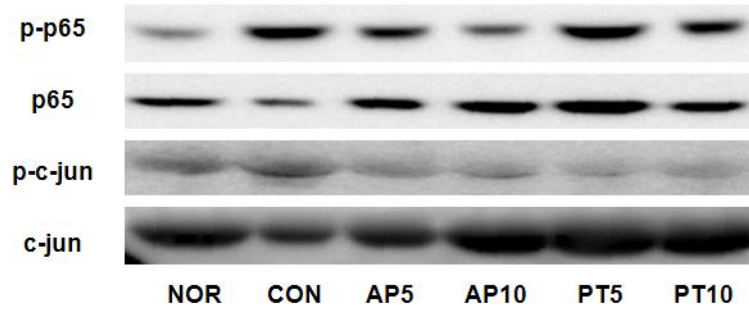


Fig. 12. Inhibitory effects of AP and phytol on the protein expressions of TNF- α (a) and IL-4 (b) and their transcription factors NF- κ B and c-Jun (c) in histamine-induced mouse skin tissues. TNF- α and IL-4 were assayed by ELISA and NF- κ B and c-Jun by immunoblot analysis. AP, phytol and azelastine were orally administered to mice: NOR, normal group; CON, control treated with histamine alone; AP5, 5 mg/kg APEO with histamine; AP10, 10 mg/kg APEO with histamine; P5, 5 mg/kg phytol with histamine; P10, 10 mg/kg phytol with histamine; AZ10, 10 mg/kg azelastine with histamine. Mean \pm SD (n=6). * Items with the same letter were not significantly different ($p < 0.05$).

쑥정유와 피톨은 histamine에 의해 유도된 소양모델 생쥐에서 IL-4와 TNF- α 생산을 억제하였으며, TNF- α 의 발현을 조절하는 p-p65 및 IL-4의 발현을 조절하는 p-c-jun가 억제되었다.

다. 사자발쑥 정유분획인 Phytol, Borneol, Eucaliptol의 항알러지 효과

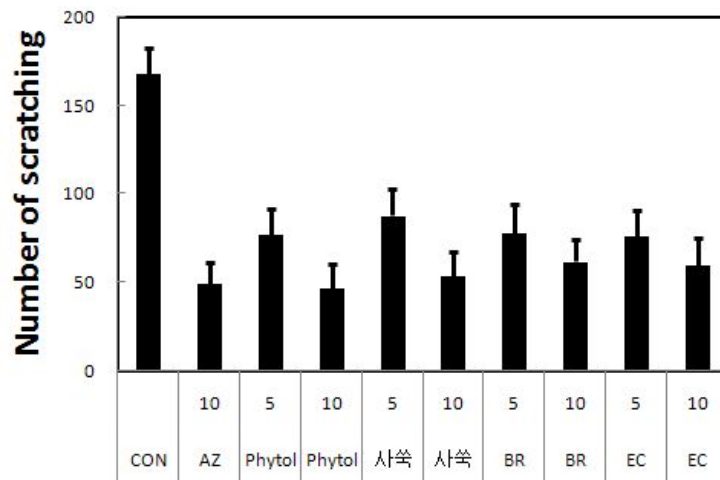
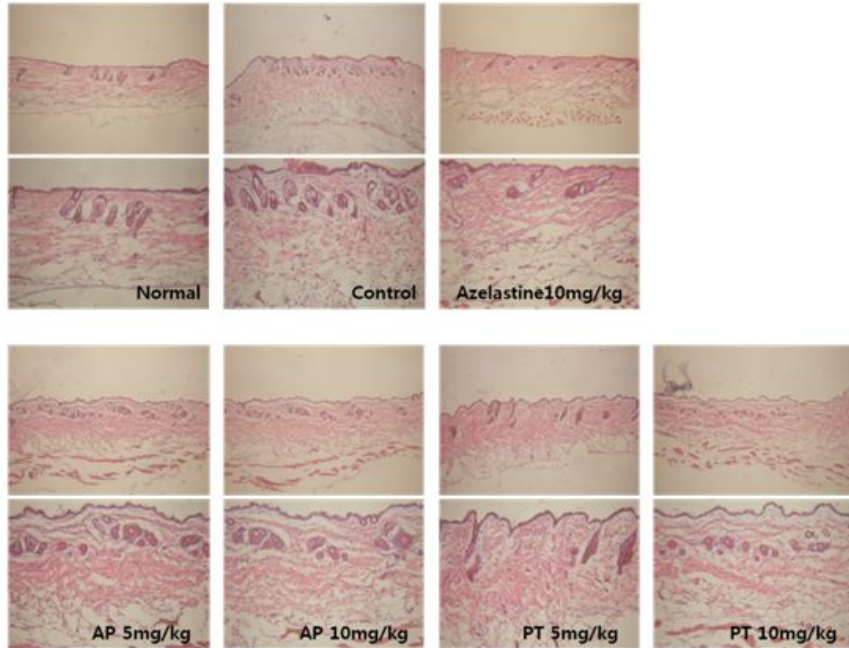


Fig. 13. Inhibitory effect of *Artemisia princeps* essential oil (사자발쑥), phytol, borneol (BR)

and eucalyptol (EC) on compound 48/80-induced scratching behavior in mice.

Compound 48/80으로 유도한 소양 모델 생쥐에서 피톨, 사자발쭉 정유분획, Boreol, eucalyptol 은 항알러지에 대하여 우수한 저해효과를 보였다.

라. 쭉 정유성분과 피톨의 부종 억제 효과



Photomicrographs (Hematoxyline-eosin stain) of the mouse skin induced by histamine.

Artemisia princeps (AP) essential oil (AP) and phytol (PT)

Fig. 14. Anti-allergic effect of AP essential oil and phytol.

히스타민으로 유도된 쥐의 피부조직을 헤마톡실린-에오신으로 염색 한 결과에서도 쭉정유성분, 피톨 성분 모두 우수한 부종을 억제하였다.

쭉에서 추출한 정유분획 특히 boreol 및 eucalyptol 과 피톨은 azelastine과 비교할 만큼 강한 히스타민으로 유도한 소양모델 동물에서 강한 알러지 저해 효과를 보였으며 쭉정유와 피톨은 histamine에 의해 유도된 소양모델 생쥐에서 IL-4와 TNF- α 생산을 억제하였으며, TNF- α 의 발현을 조절하는 p-p65 및 IL-4의 발현을 조절하는 p-c-jun가 억제되었다. 또한 히스타민으로 유도된 쥐의 피부조직을 헤마톡실린-에오신으로 염색 한 결과에서도 쭉 정유 성분, 피톨 성분 모두 우수하게 부종을 억제하였다.

6. 피부질환에 유익한 최적의 유산균주 선별

가. 유산균의 확보 및 배양

김치, 된장, 고추장을 혐기성 peptone 희석배지로 희석하여 GAM 또는 MRS 한천배지에 이식하여 37도에서 2-3일간 호기적 및 혐기적으로 배양한다. 자라나온 균주를 다시 BL 배지에 이식하여 분리한다. 이어서 자라나온 균주를 쭉 발효에 대한 starter로 사용한다.

나. 발효균주의 선별

김치를 스토마커에서 2분간 잘 갈아서 TSB(tryptic soy broth)에 현탁시키고, 상등액을 MRS 배지에 이식한 다음 48시간 동안 37℃에서 혐기적으로 배양하여 자라나온 콜로니들을 다시 MRS 액체배지에 이식하여 24시간 배양하고 정유추출 잔사썩을 적당히 자른 다음 물에 적셔 멸균하고 여기에 이식한다. 72-120시간 배양하고, 물을 넣어 추출하여 생물전환체를 분석한다. 된장은 멸균수에 1,000배 희석하여 상등액을 MRS 배지에 이식한 다음 48시간 동안 37℃에서 혐기적으로 배양하여 자라나온 콜로니들을 다시 MRS 액체배지에 이식하여 24시간 배양하고 정유추출 잔사썩을 적당히 자른 다음 물에 적셔 멸균하고 여기에 이식한다. 72-120시간 배양하고, 물을 넣어 추출하여 생물전환체를 분석한다.

고추장은 멸균수에 1,000배 희석하여 상등액을 MRS 배지에 이식한 다음 48시간 동안 37℃에서 혐기적으로 배양하여 자라나온 콜로니들을 다시 MRS 액체배지에 이식하여 24시간 배양하고 정유추출 잔사썩을 적당히 자른 다음 물에 적셔 멸균하고 여기에 이식한다. 72-120시간 배양하고, 물을 넣어 추출하여 생물전환체를 분석한다.

(1) 김치로부터 유산균의 분리 - MRS broth 배지로 10^{3-7} 까지 희석하여 MRS agar 배지에 이식하여 자라나온 균주를 콜로니의 모양에 따라 20종 선별함

(2) 된장으로부터 유산균의 분리 - MRS broth 및 Bacillus 선택배지로 10^{3-7} 까지 희석하여 MRS 및 Bacillus agar 배지에 이식하여 자라나온 균주를 콜로니 모양에 따라 10종을 선별함

(3) 고추장으로부터 유산균의 분리 - MRS broth 및 Bacillus 선택배지로 10^{3-7} 까지 희석하여 MRS 및 Bacillus agar 배지에 이식하여 자라나온 균주를 콜로니의 모양에 따라 10종 선별함

다. 썩 발효 유산균의 선별

발효식품 중 김치에서 분리한 유산균인 *Lactobacillus brevis* K-1 균주가 썩의 유효성분을 발효시켰다. 생물전환을 일으킨 균주는 *Lactobacillus brevis* K-1 (KCCM10968P 기탁균주) 였다.

라. 발효 균주의 동정

생물전환체를 생산하는 유익세균(유산균)을 분리하고, 그람염색, 당이용성분석 및 16S rDNA를 조사하고 유산균과 호몰로지를 분석한다. 분리균주의 gDNA를 Wizard genomic DNA purification kit (Promega, USA)를 이용하여 분리하고, 프라이머[정방향: 5'-TCA CCA AGG CRA CGA TGC G-3'(서열번호 2), 역방향: 5'-CGT ATT CAC CGC GGC ATG-3'(서열번호 3)]를 사용하여 PCR [94 °C에서 5 분; 이후, 94 °C에서 30 초(denaturation), 54 °C에서 40 초(annealing), 및 72 °C에서 90 초(extension)의 30 사이클]을 수행하여 1100 bp의 PCR 산물을 얻고 이를 T-easy 벡터 (Promega 사, 미국)에 집합(ligation)시킨 후 JM 109 (Promega 사)에 형질전환(transformation)하였다. Positive clone에서 플라스미드를 다시 분리해 내어 T7, SP6 프라이머를 이용하여 서열분석한다. GenBank homology search Blast system에서 얻은 분리균주의 16S rDNA의 서열과 기준의 분석한 결과를 비교하여 분리균주를 동정한다.

(1) *Lactobacillus brevis* K-1 균주의 동정

그람염색, 당이용성 및 16S rRNA 유전자 염기서열분석을 통한 *Lactobacillus brevis* K-1 (KCCM10968P) 균주로 동정하였다.

(가) 그람 양성 간균, 내산성균,

Glucose, fructose, xylose, arabinose, maltose, lactose을 이용하여 젖산 생성

(나) 16S rDNA 분석 - DNA purification kit 를 이용하여 균주로부터 DNA 를 추출하여, 16S rRNA 분자의 양끝에 존재하는 보존성이 높은 염기서열 영역을 표적으로 삼아 PCR primer를 제작하여 PCR 하여 전 영역 대비 약 67% 에 해당하는 크기의 PCR product 를 얻을 수 있었다. PCR product 의 검출은 일반적인 agarose gel 전기영동을 사용하였다. 이로부터 목적 밴드를 잘라내어 용출한 후 새로 제작한 sequencing 용 primer를 이용하여 sequencing 하였다. 이후 온라인상에서 서열 데이터를 분석하는 프로그램인 BLAST 프로그램을 사용하여 상동성을 검색하였다.

① PCR 용 세포 추출액의 조제

Promega 사의 Wizard DNA Purification Kit 를 사용

② PCR amplification

Proofreading 기능이 있는 TaKaRa 사의 Ex taq polymerase system과 Table 9의 primer를 이용하여 PCR amplification 을 수행

실험 조건 - 94°C, 5min; 94°C, 30 sec; 50°C, 30sec; 72°C 2min (total 25cycles); 72°C, 8 min; 4°C, store

③ Agarose gel elution

Qiagen 사의 Qiaquick gel extraction .kit 를 사용하여 PCR 산물을 용출, 정제함

④ Sequencing

Table 10의 primer 를 이용하여 sequencing 함

Table 9. 16s rRNA 증폭용 PCR primer

primer	염기서열
27f	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
1525R	5'-AAAGGAGGTGATCCAGCC-3'

Table 10. 16s rRNA sequencing 용 primer

primer	염기서열
r4L	5'-ACGGGCGGTGTGTACAAG-3'
f2L	5'-CCAGCAGCCGCGGTAATAG-3'

(다) 결과 - 889 bp 가 sequencing 됨

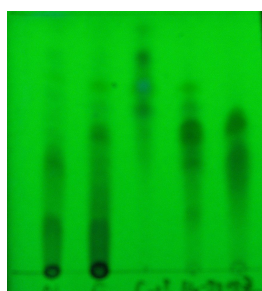
CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAG
 CGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTG
 CATCGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGG
 TGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTAGTCTGTA
 ACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
 ATGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCT
 AACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATT
 GACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCTACGCGAAGAAC
 CTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAATCTTAGAGATAAGACGTTCCCTTCGGGGAC
 AGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGTAAAG
 TCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTGGT
 GAGACTGCCGTTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCT
 TATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTAGCGAAGTCGTGA
 GGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCATCTCGCCTA
 CATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCG
 GGCCTTGTACACACCGCCCGT

: 미국 NIH BLAST search 결과 - *Lactobacillus brevis* 와의 identity-99.8%

강화약썩의 기능성을 높일수 있는 생물전환체를 생산하는 균주로 발효식품 중 김치에서 분리
 한 유산균인 *Lactobacillus brevis* K-1 균주가 썩의 유효성분을 발효시켰으며 생물전환을 일으
 킨 균주는 *Lactobacillus brevis* K-1 (KCCM10968P 기탁균주) 였다.

7. 썩 생물전환체의 새로운 대사체 분리

가. 생물전환된 썩 부산물의 신물질



새로운 대사체

Fig. 15. TLC of the residue of *Artemisia princeps* and its biotransformed one. (1: before biotransformed, 2~5: after biotransformed)

나. *Lactobacillus brevis* K-1(KCCM10968P 기탁균주)에 의해 생물전환되어 diterpenoid가 새로
 운 대사체로 분리됨

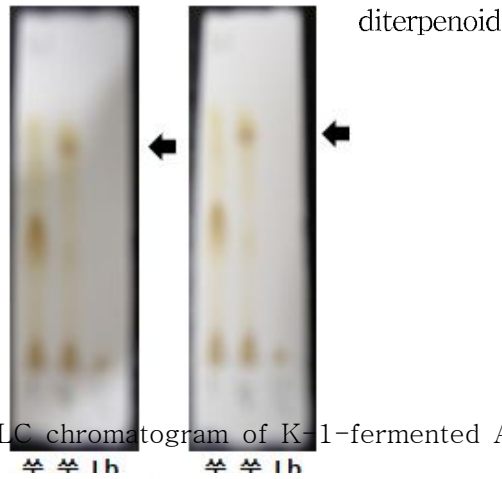


Fig. 16. TLC chromatogram of K-1-fermented AP

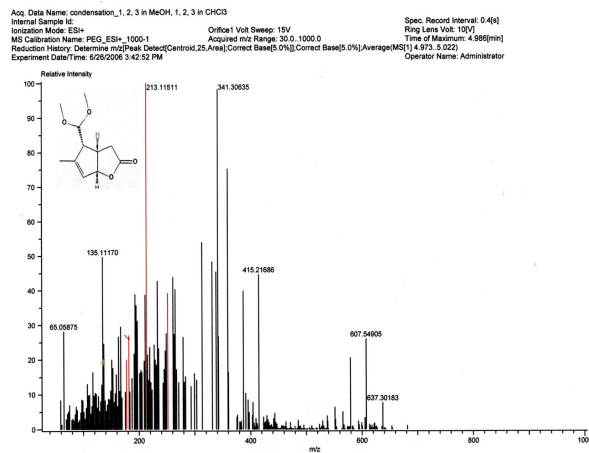


Fig. 17. MS spectrum of biotransformants, diterpenoid isolated from K-1-fermented AP.

K-1 균주의 발효에 의해 유효성분인 Phytol 성분의 함량 변화는 없었으나 새로운 대사체가 확인 되었으며 (Fig. 16), 대사체는 MS 분석에 의해 diterpenoid로 확인되었다 (Fig. 17).

8. 썬 부산물의 생물전환 후 유효성분 변화

발효에 의해 항염증에 효과적인 유파틸린(eupatilin), 면역력증강에 효능이 뛰어난 자세오시딘(jaceosidin), 항혈전에 효과적인 스코플레틴(scopoletin)의 추출율이 증가하였다. 썬 추출물의 총분획량은 5.70%, 물분획 5.27%, ethylacetate extract 0.43%이었으며 *Lactobacillus brevis* K-1 생물전환 썬 추출물은 총분획량 5.71%, 물추출물 5.0%, ethylacetate extract 0.71%이었다. 다음은 유파틸린(eupatilin), 자세오시딘(jaceosidin), 스코플레틴(scopoletin)의 함량이다.

Table 8. Content of scopoletin, jaceosidin and eupatilin in AP and F-AP.

Treatment	Yield (%)	Content (ug/mg)		
		Scopoletin	Eupatilin	Jaceosidin
<i>Artemisia princeps</i> (AP)	5.70±0.9	6.20±0.52	0.68±0.18	0.69±0.50
Fermented <i>Artemisia princeps</i> (F-AP)	5.71±0.6	6.39±0.22	0.92±0.39	0.96±0.31

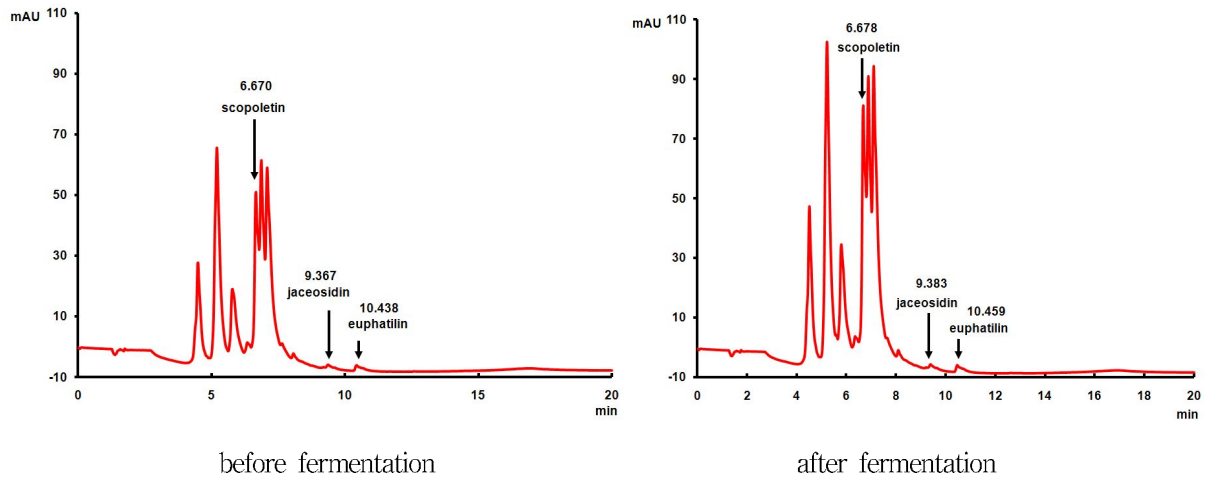


Fig. 17. HPLC chromatogram of AP and F-AP

쑥부산물과 생물전환된 쑥부산물의 유효성분은 유파틸린이 0.68 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 에서 0.92 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 로 자세오시딘은 0.69 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 에서 0.96으로 스코플레틴은 6.20 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 에서 6.39 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 로 증가하였다.

9. 쑥 부산물의 항산화 효과

정유를 추출하고 남은 사자발쑥 부산물과 이를 발효한 부산물 쑥의 물추출물은 항산화 효과를 보였으나 유의한 차이는 없었다.

Table 8. DPPH radical scavenging effect of fermented *Artemisia princeps*

Treatment	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
<i>Artemisia princeps</i> (AP)	41.5
Fermented <i>Artemisia princeps</i> (F-AP)	38.2

10. 쑥 추출물과 생물전환된 쑥추출물의 항알러지 질환 개선 효능 분석

가. 탈과립 억제효과

(1) 연구 방법

RBL 2H3 세포를 이용한 항알러지 활성 측정 - RBL-2H3 세포(Rat mast cell line)를 1% fetal bovine serum과 L-glutamine을 포함하는 Dubeccos' modified Eagle's medium (DMEM)을 이용하여 37°C, 수분이 있는 5% CO₂ incubator에서 배양하며, 고착성을 갖는 세포를 trypsin-EDTA 용액을 사용하여 부유시키며 이를 분리, 회수하여 실험에 사용한다. RBL-2H3

세포를 24 well에 각각 5×10^5 cell/well씩 분주한 후 monoclonal IgE $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 를 넣어 12시간 incubator에서 배양시키면서 자극하였다. 세포를 0.5ml 의 siraganian buffer (119mM NaCl, 5mM KCl, 0.4mM MgCl_2 , 25mM PIPES, 40mM NaOH, pH7.2)로 씻어준 후 0.16ml siraganian buffer (5.6mM glucose, 1mM CaCl_2 , 0.1% BSA를 첨가)를 넣은 다음 37°C 에서 10분간 incubator에서 배양하고, 시료 0.04ml 를 가한 다음 20분 경과한 후에 0.02ml 의 antigen DNP-BSA(dinitrophenol-bovine serum albumin) $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 37°C 에서 10분간 세포를 활성화 시킨 다음 2000rpm에서 10분간 원심 분리하여, 0.025ml 의 상등액을 96 well로 옮겨 여기에 0.1M citrate buffer (pH 4.5)에 1mM p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide 0.025ml 를 가한 후 37°C 에서 60분간 배양시킨 다음 0.1M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 0.2ml 를 가하여 반응을 정지시킨 후 405nm 에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하여 저해활성을 계산하였다.

(2) 연구 결과

쑥추출물 및 발효쑥추출물은 IgE로 유도한 RBL 2H3 cell 탈과립은 아주 낮았으며, 발효에 따른 차이는 없었다.

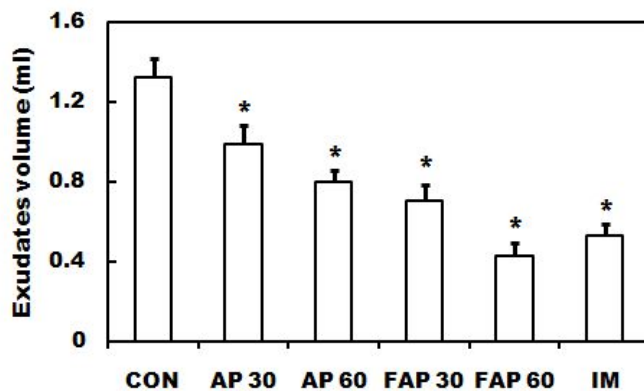
Table 9. Inhibitory effect of fermented *Artemisia princeps* water extract on degranulation of RBL-2H3 cells induced by IgE (Final concn, $50 \mu\text{g}/\text{ml}$)

Treatment	저해율(%)
Saline	0
<i>Artemisia princeps</i> (AP)	24 ± 2
Fermented <i>Artemisia princeps</i> (F-AP)	22 ± 3
Azelastine	84 ± 5

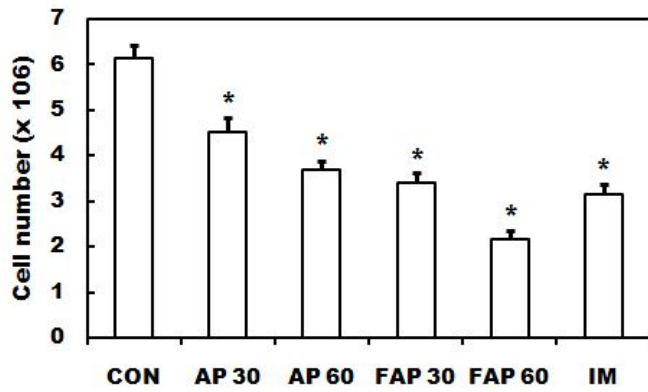
나. carrageenan 유도 염증모델 생쥐에서의 항염증효과

(1) 염증유발물질인 carrageenan 유도 염증모델 생쥐에서의 항염증 효과는 유도된 air pouch 의 exudate volume, cell number 및 단백질양은 쑥물추출과 발효쑥 물추출물은 모두 억제하였으나, 발효쑥추출물이 쑥추출물에 비해 더 우수한 효과를 보였다.

(A)



(B)



(C)

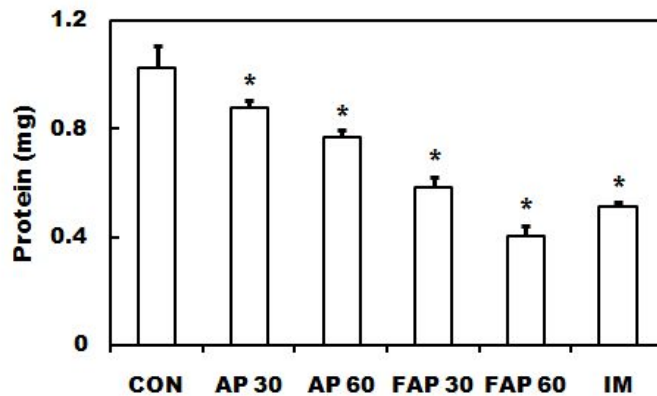


Fig. 18. Effect of AP and FAP on volume (A), cell number (B) and protein content (C) in exudates from the air pouches treated with carrageenan. The control group (CON) received only vehicle before carrageenan injection. The samples (AP30, 30 mg/kg AP; AP60, 60 mg/kg AP; FAP30, 30 mg/kg FAP; FAP60, 60 mg/kg FAP and IM, 10 mg/kg indomethacin) were orally administered 1 h before the carrageenan injection. The animals were sacrificed 12 h later, and exudates from each air pouch were collected. The volume, the number of cells and protein amount in the exudates were assessed. Each value is expressed as the mean \pm S.D. (n=6). * $P < 0.05$ vs. carrageenan-treated control.

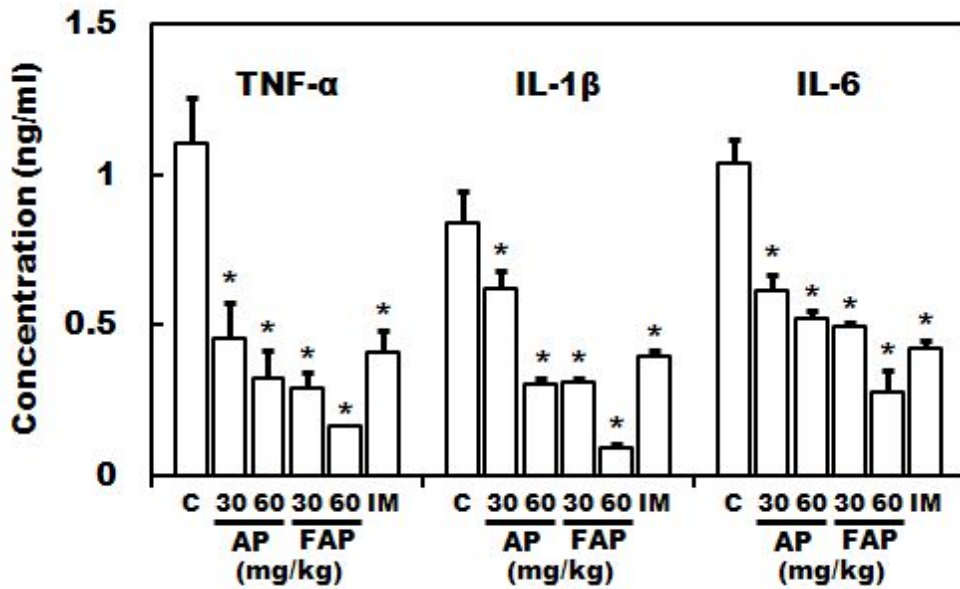
(2) carrageenan 유도 염증모델 생쥐에서의 염증성 사이토카인 TNF-a와 PGE2 항염증효과 생쥐 carrageenan에 의해 유도된 air pouch에 염증성 사이토카인 TNF-a와 PGE2을 쑥물추출과 발효쑥물추출물은 모두 억제하였으나, 발효쑥물추출물이 쑥물추출물에 비해 더 우수한 효과를 보였다.

Table 10. Effect of AP water extract and fermented AP water extracts on the Cell Count, PGE2 and TNF-a in Exudates from the Air Pouches induced by carrageenan. AP, F-AP.

Treatment	Cell count ($\times 10^6$)	PGE2 (ng/ml)	TNF- α (ng/ml)
Saline	3.2 \pm 0.5	29 \pm 8	3.1 \pm
<i>Artemisia princeps</i> (AP)	2.4 \pm 0.6	21 \pm 6	2.2 \pm
Fermented <i>Artemisia princeps</i> (F-AP)	2.2 \pm 0.3	18 \pm 5	1.9 \pm
Indomethasin	1.6 \pm 0.3	6 \pm 7	2.8 \pm

(3) 생쥐 carrageenan에 의해 유도된 air pouch에 염증성 싸이토카인 TNF-a, IL-1beta, IL-6, COX-2, iNOS의 발현 및 이들의 전사인자인 NF-kB의 활성화를 쑥물추출과 발효쑥물 추출물은 모두 억제하였으나, 발효쑥추출물이 쑥추출물에 비해 더 우수한 효과를 보였다.

(A)



(B)

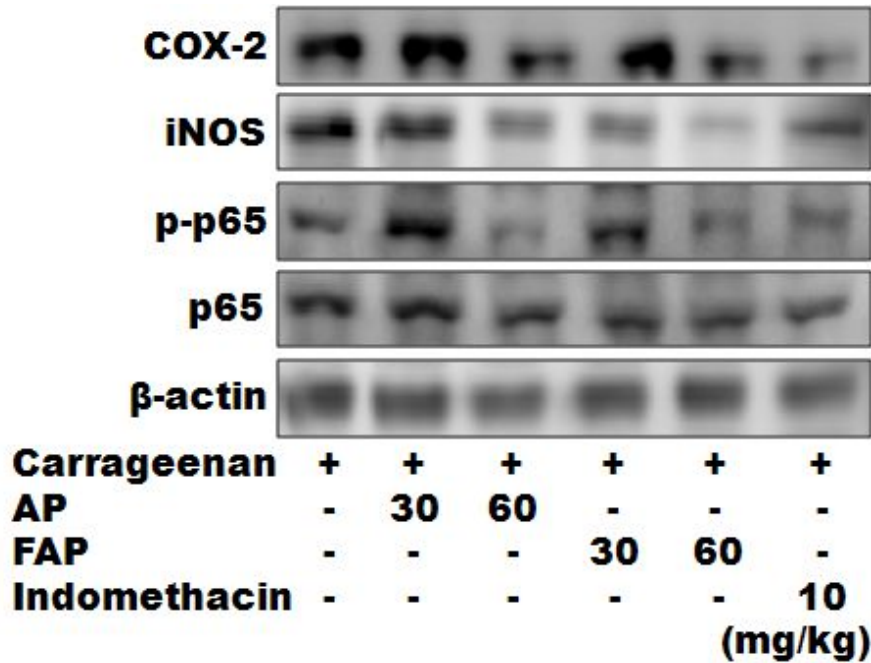
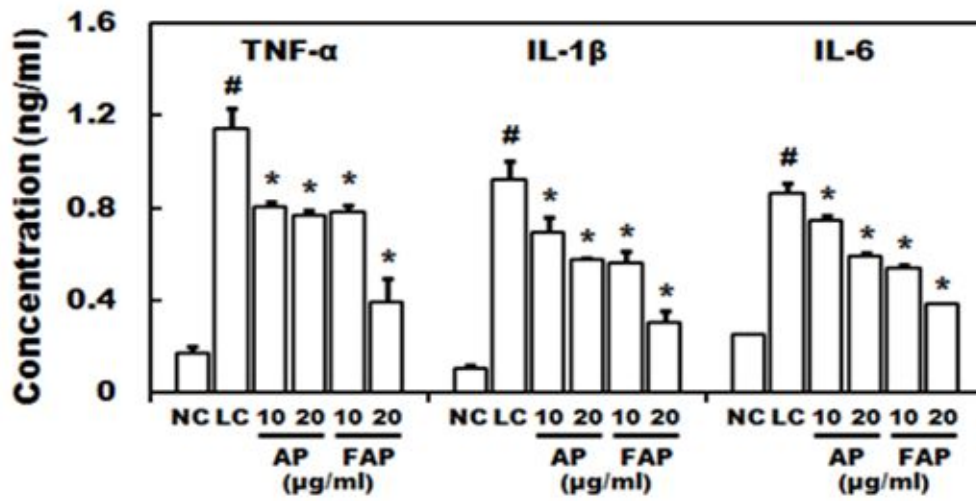


Fig. 19. Effect of AP and FAP on inflammatory mediators in exudates from air pouches treated with carrageenan. The samples (IM, 10 mg/kg indomethacin) were orally administered before the carrageenan injection. The carrageenan-treated control group (Co) received only vehicle instead of samples. The animals were sacrificed 24 h later, and exudates from each air pouch were collected. (A) The levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in ear tissues were measured by ELISA analysis. (B) The expression levels of COX-2, iNOS, p-p65, p65 and β -actin were by immunoblot analysis. Each value is expressed as the mean \pm S.D. (n=6). * $P < 0.05$ compared with the control.

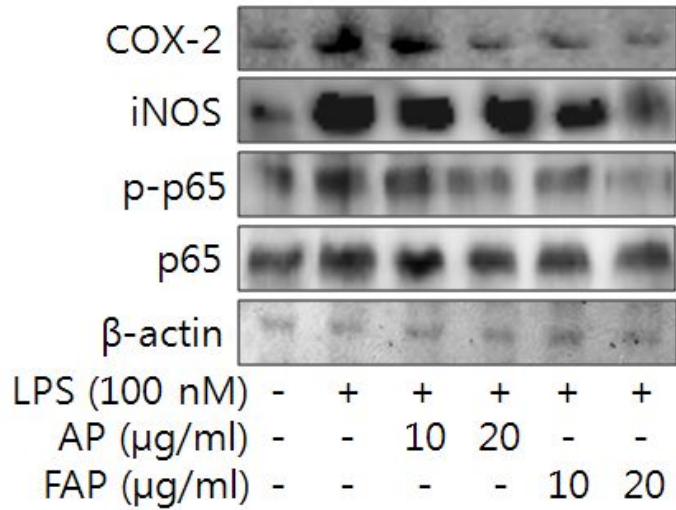
(4) LPS로 자극한 RAW264.7 cell의 항염증효과

in vitro에서 항염증 효과를 확인하기 위해 생쥐 복강마크로파지를 분리하여 LPS로 염증을 유도하고 LPS로 자극한 RAW264.7 cell에서 정유추출잔사 썬물추출과 발효썬물추출물을 모두 염증성사이토카인 TNF- α , IL1beta, IL-6를 억제하였으며, 발효썬물추출물이 효과가 우수하였다. LPS로 자극한 RAW264.7 cell에서 정유추출잔사 썬물추출과 발효썬물추출물을 모두 iNOS, COX-2의 발현 및 이들의 전사인자인 NF- κ B의 활성화를 억제하였으며, 발효썬물추출물이 효과가 우수하였다. 그러나, 이 추출물들은 RAW264.7 cell에 대해 cytotoxicity는 나타내지 않았다.

(A)



(B)



(C)

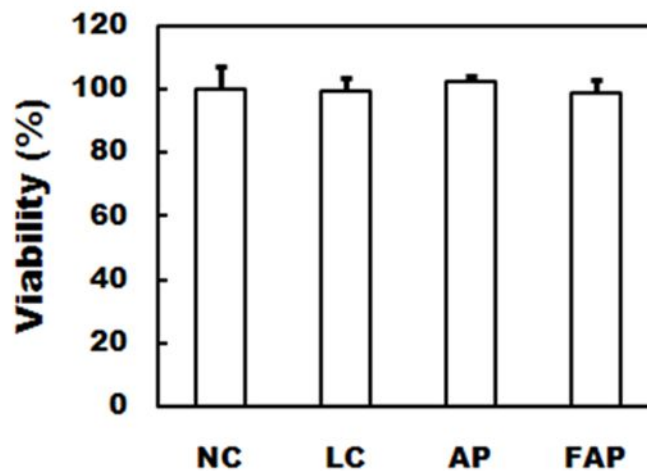
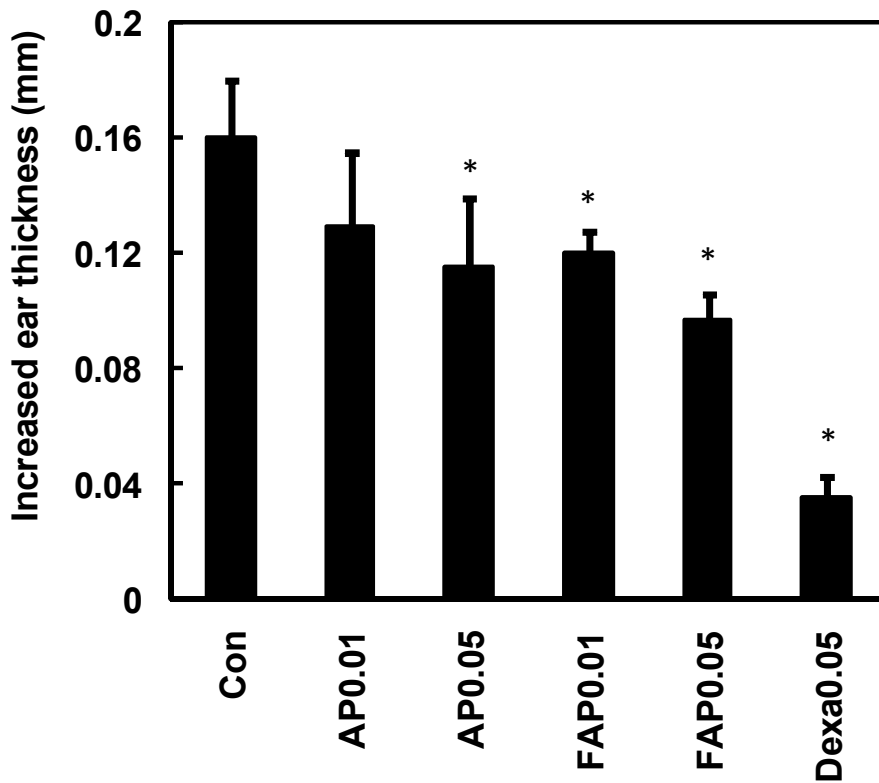


Fig. 20. Effects of AP and FAP on the inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW264.7 cells. LPS-treated group (LC) received the vehicle alone instead of test agents.

Normal control group (NC) received the vehicle alone instead of LPS and test agents. (A) Effect on proinflammatory cytokines expression. After 20-h incubation with LPS in absence or presence of AP or FAP (10 and 20 μ M), TNF- α , IL-1 β and IL-6 in the culture medium was measured using ELISA kit. (B) Effect on COX-2 and iNOS expression and NF- κ B activation. These were measured by immunoblot analysis after incubation with LPS in absence or presence of AP or FAP (10 and 20 μ g/ml) for 20 h. Cytotoxicity of AP and FAP (20 μ g/ml) in the presence of LPS (100 ng/ml). (C) Cytotoxicity. Cell viability was measured with crystal violet. Each value is expressed as the mean \pm S.D. (n=6). * P < 0.05 compared with the control.

(5) TPA로 유도한 생쥐의 귀부종(염증)에 쑥 추출물 및 발효쑥추출물의 억제효과
 TPA유도 귀부종에 대한 쑥추출물 및 발효쑥추출물 모두 저해효과를 보였으며, 발효쑥 추출물이 더 우수한 효과를 보였다. 생쥐의 염증에 의한 귀부종의 두께 감소는 쑥 추출물과 생물전환된 발효쑥 추출물 모두 부종의 두께가 감소하였으며 특히 발효쑥 추출물이 더 우수하게 염증 효과가 있어 귀부종의 두께감소가 더 컸다. HE 염색에서도 두께의 감소와 함께 면역세포들의 작용을 억제함을 관찰할 수 있었으나, 발효쑥추출물이 쑥추출물에 비해 더 우수한 효과를 보였다.

(A)



(B)

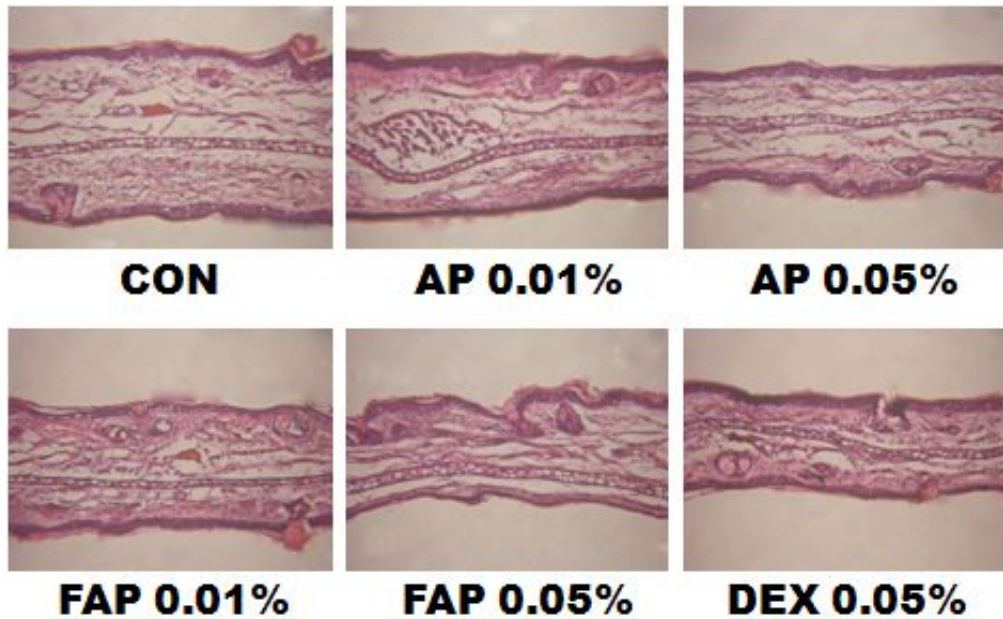
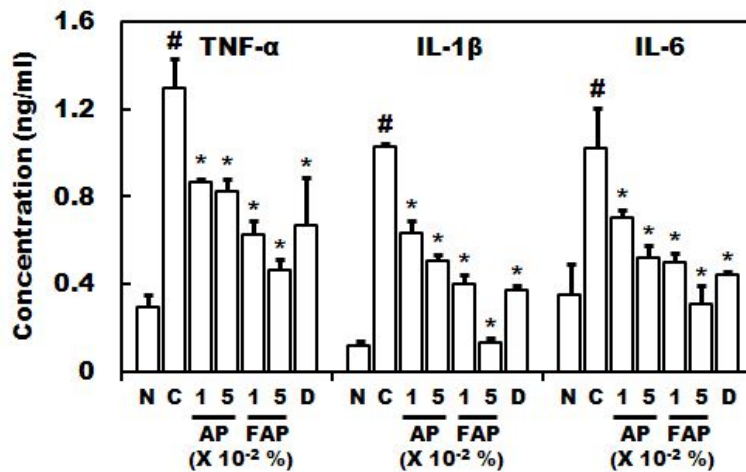


Fig. 21. Effect of AP and FAP against TPA-induced ear dermatitis in mice. (A) The increased ear thicknesses. It was measured 3 h after the final treatment with test compounds (AP 0.01, 0.01% AP; AP0.05, 0.05% AP; FAP0.01, 0.01% FAP; FAP0.05, 0.05% FAP and Dexa0.05, 0.05% dexamethasone). The normal control group (N) received the vehicle alone. The TPA-treated control group (Con) received TPA and the vehicle. (B) Histopathological photograph. Mouse ears were excised after the measurement of ear thickness and stained with hematoxylin-eosin. All values are means \pm S.D. (n=2). * $P < 0.05$ vs. TPA-treated control.

(6) TPA 유도 염증성 사이토카인에 대한 항염증효과

TPA유도 귀부종에 대한 쑥추출물 및 발효쑥추출물 모두 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL1 β , IL-6의 발현증가를 억제하였으며 COX-2, iNOS 발현 및 이들의 전사인자인 NF- κ B의 활성화를 억제하였다. 특히 발효쑥 추출물이 쑥 추출물에 비해 염증성 사이토카인에 대한 항염증효과가 더 우수하였다.

(A)



(B)

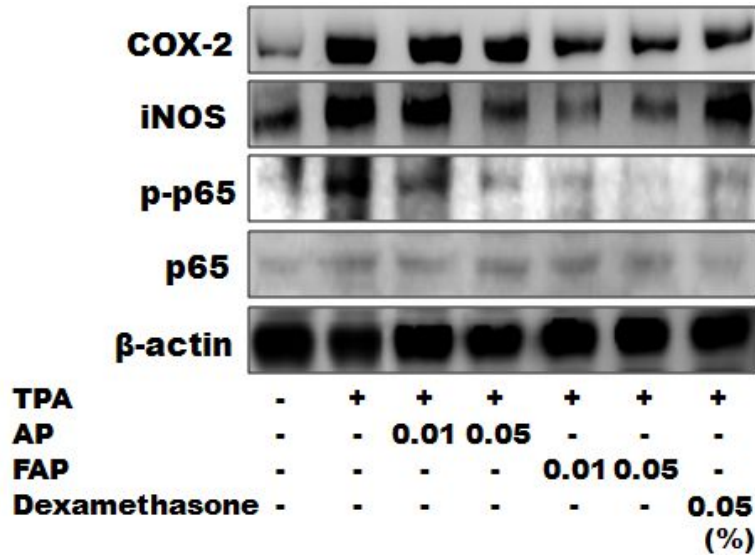


Fig. 22. Effect of AP and FAP on inflammatory mediators in TPA-induced ear dermatitis mice.

(A) The levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in ear tissues were measured by ELISA analysis. (B) The expression levels of COX-2, iNOS, p-p65, p65 and β -actin were by immunoblot analysis. Mouse ears were excised 3 h after the last application of test compounds (AP1, 0.01% AP; AP5, 0.05% AP; FAP1, 0.01% FAP; FAP5, 0.05% FAP and D, 0.05% dexamethasone), homogenized and centrifuged. The supernatant was separated by SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane, and immunoblotted. The normal control group (N) received the vehicle alone. The TPA-treated control group (C) received TPA and the vehicle. Each value is expressed as the mean \pm S.D. (n=6). [#]*P* < 0.05 normal control group. **P* < 0.05 TPA-treated control group.

다. 피부 수동성 아나필락시스 반응 평가

(1) 연구 방법

Passive Cutaneous Anaphylaxis Reaction 시험 - Dinitrophenol-bovine serum albumin (DNP-BSA)에 대한 IgE 혈청을 생리식염수로 희석한 10 μ g를 에테르로 마취시킨 생쥐의 등에 주사하고 수동감작시키고 48시간 후 DNP-HSA 0.2mg과 evans blue을 포함한 생리식염수 0.2ml를 꼬리정맥에 주사하고 30분후 경부탈골로 치사시켜 등에 누출된 evans blue 색소량을 측정한다. 생쥐의 등의 일정부위를 잘라 시험관에 넣고 1N-KOH 0.7 ml을 넣고 37도에서 하룻밤 동안 배양하고, 이 시험관에 0.6N 인산.아세톤 혼액 (5:13) 4ml를 가한 다음 진탕하고 여과하여 추출된 색소를 620nm에서 비색정량 하였다. 썬추출물 및 생물전환 썬추출물은 생리식염수에 용해 또는 현탁하여 경구로 항원투여 한시간 전에 투여하였다.

(2) 연구 결과

썬추출물과 발효추출물 모두 IgE로 유도한 수동형피부 아나필락시스 반응을 억제하였으나, 발효썬추출물이 썬추출물에 비해 더 우수한 효과를 보였다.

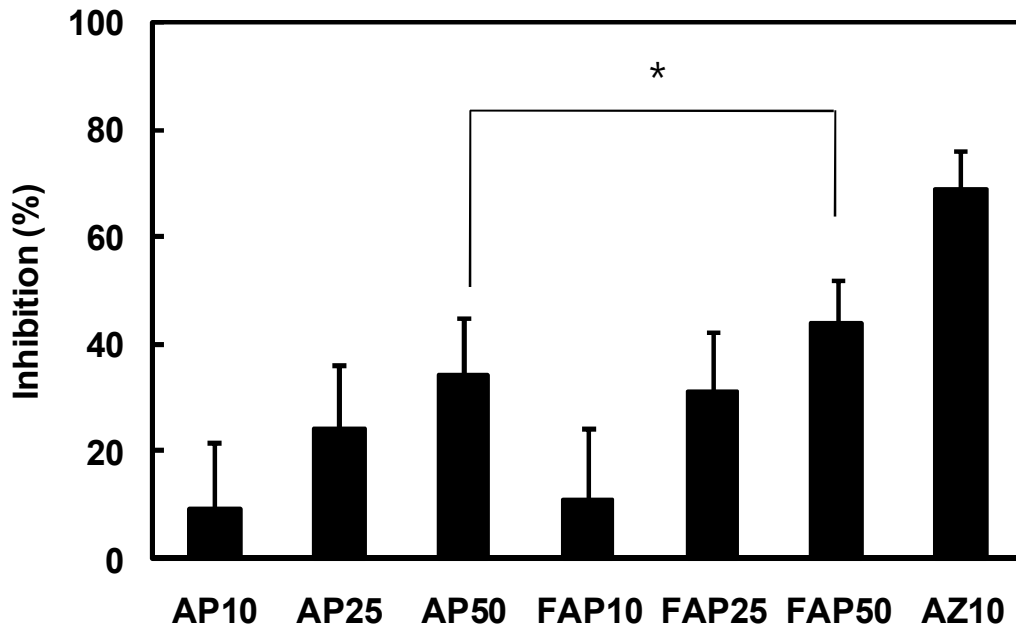


Fig. 23. Inhibitory effect of AP and FAP on IgE-induced passive cutaneous anaphylaxis reaction in mice. AP was fermented with *Lactobacillus brevis* K-1, and the supernatant concentrated. The positive agent was orally administered 10 mg/kg of azelastine (AZ). Each extract (AP10, 10 mg/kg of AP; AP25, 25 mg/kg of AP; AP50, 50 mg/kg of AP; FAP10, 10 mg/kg of FAP; FAP25, 25 mg/kg of FAP; FAP50, 50 mg./kg of FAP) was orally administered 1 h prior to DNP-HSA injection. Normal group was treated with vehicle alone instead of test agents. All values are means \pm S.D. (n=5). *Significantly different (p<0.05).

Table 11. Inhibitory effect of fermented AP water extract on IgE-induced PCA reaction in mice

Treatment	Dose (mg/kg)	Inhibition (%)
Saline	-	0
<i>Artemisia princeps</i> (AP)	20	19 \pm 5
	50	43 \pm 11
Fermented <i>Artemisia princeps</i> (F-AP)	20	21 \pm 6
	50	48 \pm 9
Azelastine	10	76 \pm 12

라. 소양반응 억제효과

(1) 연구 방법

소양행동 측정 - 시료를 경구 투여한 1시간 후에 체중 20g 전후의 BALB/c 마우스를 각각 아크릴 관찰 상자(22×22×24cm)에 10분간 두어 환경에 순화시킨 뒤 목뒤의 등털을 제거하고 compound 48/80 50µg/µL를 피하주사한 뒤 즉시 관찰 상자에 넣고 1시간 동안 무인조건에서 소양행동을 비디오카메라로 녹화하여 관찰하였다. 소양행동은 생쥐의 뒷발로 목뒤를 긁는 행동을 1회로 간주하며 연속적인 긁는 행위를 할 때에는 1초를 넘기면 1회 추가한 것으로 간주하며, 귀나 머리를 긁거나 앞발을 핥는 등의 행동은 소양행위로 간주하지 않았다.

(2) 연구 결과

(가) 생쥐에 compound 48/80 으로 유도한 소양모델 동물에서의 소양반응 억제 효과

생쥐에 compound 48/80 으로 유도한 소양모델 동물에서 정유추출잔사 쑥물추출과 발효쑥물추출물 모두 억제하였으며, 발효쑥추출물이 쑥추출물에 비해 더 우수한 효과를 보였다.

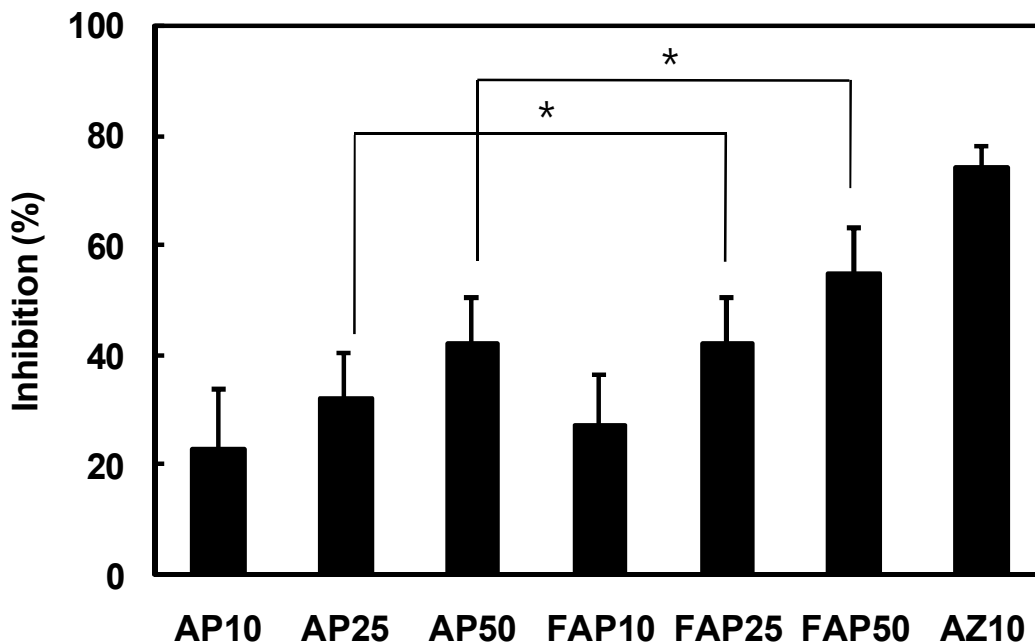


Fig. 24. Inhibitory effect of AP and FAP on compound 48/80-induced scratching behavior in mice. The positive agent was orally administered 10 mg/kg of azelastine (AZ). The scratching agent compound 48/80 (50 ug/50 ul) for each mouse was intradermally injected 1 h after the administration of test agent(AP10, 10 mg/kg of AP; AP25, 25 mg/kg of AP; AP50, 50 mg/kg of AP; FAP10, 10 mg/kg of FAP; FAP25, 25 mg/kg of FAP; FAP50, 50 mg./kg of FAP) . Normal group was treated with vehicle (saline) alone and control group was with compound 48/80 and vehicle. All values are means \pm S.D. (n=5). *Significantly different (*p<0.05)

(나) 생쥐에 histamine으로 유도한 소양모델 동물에서의 소양반응 억제 효과

생쥐에 histamine으로 유도한 소양모델 동물에서 정유추출잔사 쑥물추출과 발효쑥물추출물 모두 억제하였으나, 발효쑥추출물이 쑥추출물에 비해 더 우수한 효과를 보였다.

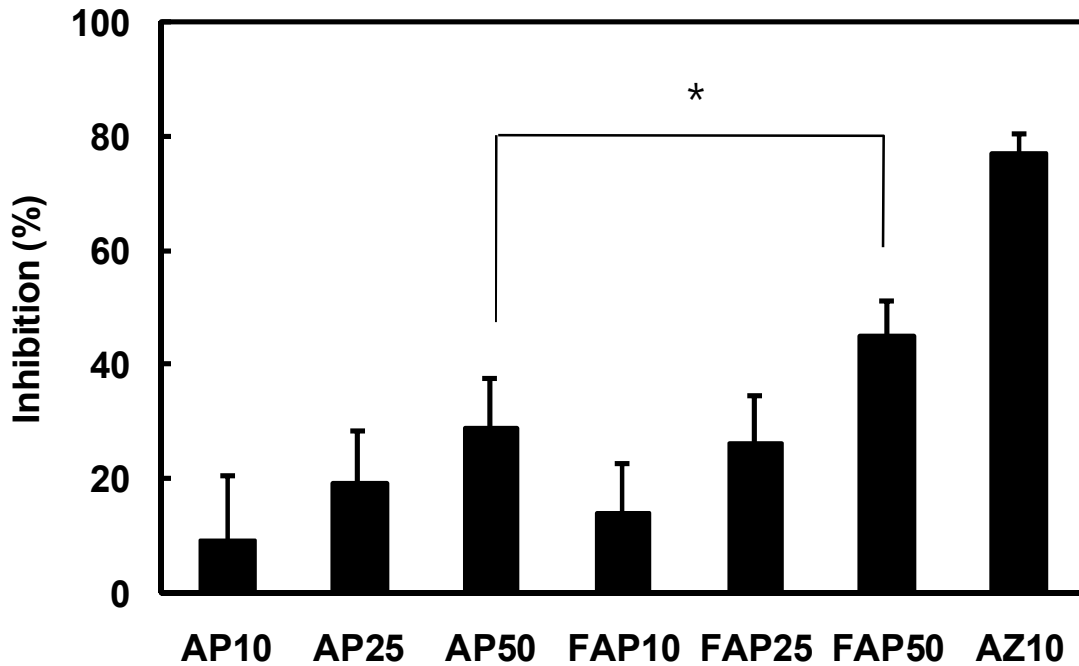


Fig. 25. Inhibitory effect of AP and FAP on histamine-induced scratching behavior in mice. The positive agent was orally administered 10 mg/kg of azelastine (AZ). The scratching agent histamine (300 ug/50 ul) for each mouse was intradermally injected 1 h after the administration of test agent(AP10, 10 mg/kg of AP; AP25, 25 mg/kg of AP; AP50, 50 mg/kg of AP; FAP10, 10 mg/kg of FAP; FAP25, 25 mg/kg of FAP; FAP50, 50 mg./kg of FAP) . Normal group was treated with vehicle (saline) alone and control group was with histamine and vehicle. All values are means \pm S.D. (n=5). *Significantly different (*p<0.05)

11. Draize 법에 의한 피부독성

가. Draize법에 의한 피부독성 측정

등 부위에 털을 깎고, 고정기에 고정하고, 등 부위의 두 곳에 시험물질을 적용한다. 한곳은 주사침으로 #형의 상처를 만들고(상처 있는 피부), 다른 한곳은 그대로(상처 없는 피부)하고, 0.05 ml[0.05g (low) 또는 0.1g (high)]의 시험물질을 0.5 cm× 0.5 cm 부위에 바르고, 천을 이용하여 시험부위에 부착하고 반창고로 고정하고, Patch 제거 후 60분과 24, 48, 72시간 후 홍반과 부종의 피부반응에 대하여 판정하였다.(피부자극의 채점은 Draize채점표에 따라 측정함:Erythema formation (홍반의 형성): No Erythema , 0; Very slight erythema (barely perceptible) , 1; Well defined erythema, 2; Moderate to severe erythema, 3; Severe erythema (beet redness) to slight eschar formation (injuries in depth), 4. Edema formation (부종의 형성): No Edema, 0; very slight edema (barely perceptible), 1; Well defined edema, 2; moderate edema (about 1 mm). 3; Severe edema (raise more than 1 mm and extending beyond area of exposure), 4.)

나. 피부독성 측정 결과

Draize법에 의한 피부독성 측정 결과 부종이나 홍반 등의 부작용은 발생하지 않았다.

Table 12. Acute skin toxicity of *Artemisia princeps*(AP) and Fermented *Artemisia princeps* (F-AP) by Draize Test.

Treatment		primary irritation Index			
		1 h	24 h	48 h	72 h
None	Erythema	0	0	0	0
	Edema	0	0	0	0
AP 0.05g	Erythema	0	0	0	0
	Edema	0	0	0	0
AP 0.10g	Erythema	0	0	0	0
	Edema	0	0	0	0
F-AP 0.05g	Erythema	0	0	0	0
	Edema	0	0	0	0
F-AP 0.10g	Erythema	0	0	0	0
	Edema	0	0	0	0

The guideline of primary irritation Index was as follows:

Erythema formation (홍반의 형성): No Erythema , 0; Very slight erythema (barely perceptible) , 1; Well defined erythema, 2; Moderate to severe erythema, 3; Severe erythema (beet redness) to slight eschar formation (injuries in depth), 4.

Edema formation (부종의 형성): No Edema, 0; very slight edema (barely perceptible), 1; Well defined edema, 2; moderate edema (about 1 mm). 3; Severe edema (raise more than 1 mm and extending beyond area of exposure), 4.

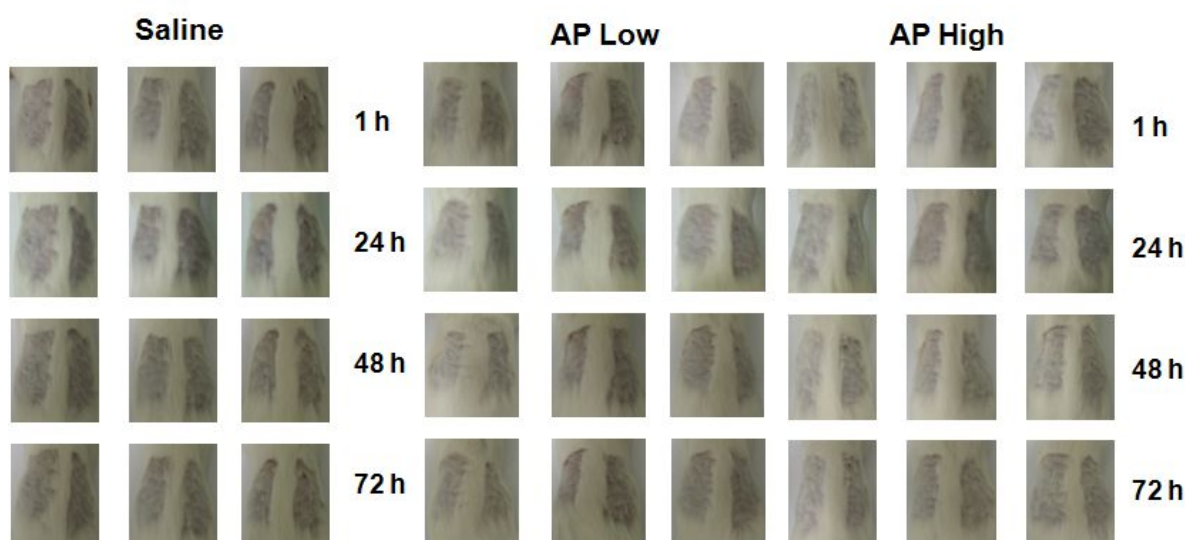


Fig. 26. Acute Skin Toxicity of *Artemisia princeps*(AP) by Draize Test.

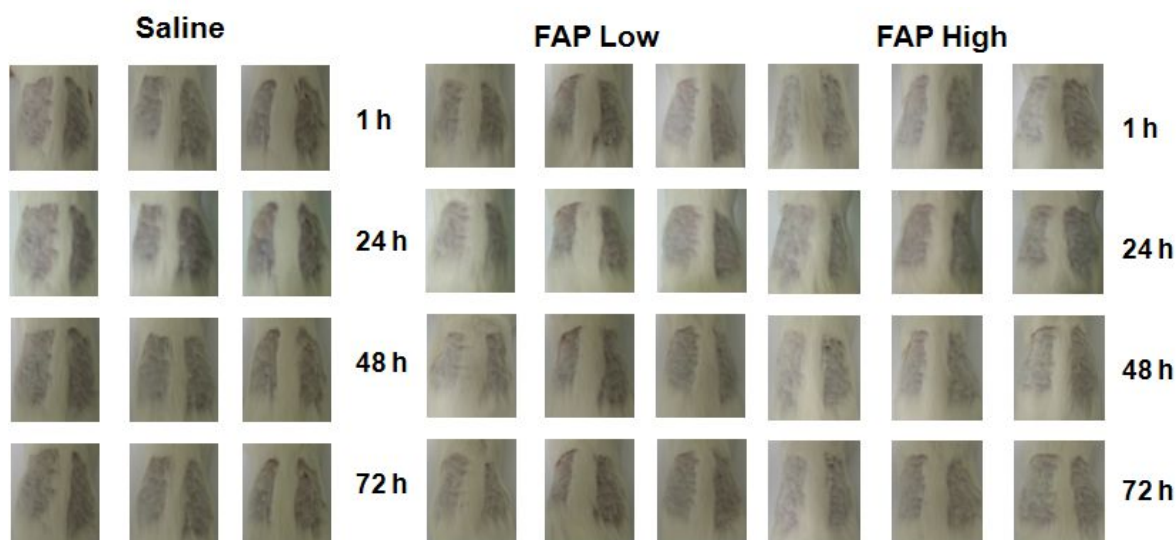


Fig. 27. Acute Skin Toxicity of Fermented *Artemisia princeps*(F-AP) by Draize Test.

12. 쑥추출물과 생물전환된 쑥추출물의 급성 독성 평가

쑥추출물과 생물전환된 쑥추출물의 급성 독성을 평가하기 위하여 한군을 생쥐 5마리로 하여 급성독성을 측정하였다. 정유추출 후 쑥 부산물 추출물 및 생물전환된 쑥추출물은 생쥐의 사망, 체중, 장기무게, 장기이상, 특이한 이상 행동 등에 영향을 주지않았다.

Table 13. Mortality of mice orally treated with *Artemisia princeps* (AP) and Fermented *Artemisia princeps* (F-AP) (n=5)

Treatment	Dose (g/kg)	Days after treatment					Final mortality
		0	4	8	12	14	
Control	-	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
AP treatment	1.3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	2	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
F-AP treatment	1.3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	2	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	3	0/5	0/5	0/50	0/5	0/5	0/5

Value are expressed as dead number/total number of animals.

Table 14. Clinical signs in mice orally treated with AP and F-AP (n=5)

Group	Dose (g/kg)	Hours after treatment						Days after treatment				
		1	2	3	4	5	6	0	4	8	12	14
Control	-	a)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AP treatment	1.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F-AP treatment	1.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

a) no abnormality detected

Table 15. Body weight of mice orally treated with AP and F-AP (n=5)

Group	Dose (g/kg)	Days after treatment				
		0	4	8	12	14
Control	0	34.3±1.7	35.3±1.7	36.3±1.0	38.3±1.6	39.2±0.9
AP treatment	1.3	34.8±1.7	36.2±1.3	37.4±2.0	38.4±1.8	39.4±1.3
	2	35.4±2.3	36.2±1.8	37.5±1.3	38.4±1.0	38.8±1.1
	3	34.0±1.5	35.4±1.0	36.7±1.5	38.0±0.7	38.6±1.0
F-AP treatment	1.3	35.7±0.7	35.9±1.3	36.9±0.8	37.7±2.0	38.3±1.7
	2	35.6±1.9	36.7±1.4	37.9±1.7	38.6±1.3	38.7±1.4
	3	35.6±1.7	36.0±1.0	36.9±1.1	37.8±1.1	38.6±1.1

Table 16. Gross findings of necropsy in mice orally treated with AP and F-AP (n=5)3

Group	Dose(g/kg)	Observation	Frequency
Control	-	N.G.L ^{a)}	5/5 ^{b)}
AP treatment	1.3	N.G.L	5/5
	2	N.G.L	5/5
	3	N.G.L	5/5
F-AP treatment	1.3	N.G.L	5/5
	2	N.G.L	5/5
	3	N.G.L	5/5

^{a)}No gross lesion

^{b)}Values are expressed as animal numbers

13. 생물전환된 쑥 잔사의 정장사료로 개발하기 위한 효능 분석

가. 쑥물추출 잔사물과 발효쑥 추출 잔사물의 소화관 수송능 및 변비 개선 효과

생쥐에게 쑥물추출 잔사물은 투여농도가 높을수록 대장수송능은 억제하였으나, 발효쑥추출잔사물은 대장 수송능에 영향을 미치지않았다.

Table 17. Effect of *Artemisia princeps*(AP) and *Artemisia princeps*(F-AP) on transport of barium sulfate in the large intestine of mice. (n=6)

Treatment	Dose (mg/day)	Mobility (min)
Normal control	-	125±6.3
Loperamide	0.25	>3h
<i>Artemisia princeps</i> (AP) treatment	100	137±9.2
	250	167±20.1
	500	180±21.2
<i>Artemisia princeps</i> (F-AP) treatment	100	142±17.2
	250	149±20.6
	500	141±20.3

Table 18. Effect of *Artemisia princeps*(AP) and *Artemisia princeps*(F-AP) on transport of barium sulfate in the small intestine of mice. (n=6)

Treatment	Dose (mg/day)	Mobility (min)
Normal control	-	69.5±3.3
Loperamide	0.25	28.6±4.2
<i>Artemisia princeps</i> (AP) treatment	100	67.8±4.5
	250	66.2±2.5
	500	61.1±3.6
	100	67.8±3.2
<i>Artemisia princeps</i> (F-AP) treatment	250	68.9±6.6
	500	70.2±3.9

나. 사하개선 효과

쑥물추출 잔사물과 발효쑥 추출 잔사물은 castor oil로 유도한 설사모델동물에서 분변의 수분함량을 억제하였으며, 설사를 개선하는 효과가 있었고 발효쑥 물추출 잔사물의 억제효과가 약하지만 우수하였다. 쑥물추출 잔사물과 발효쑥 추출 잔사물의 항균력은 차이가 없었다.

Table 19. Effect of *Artemisia princeps*(AP) and *Artemisia princeps*(F-AP) on fecal water contents of castor oil-induced diarrheal mice. (n=6)

Treatment	Dose (mg/day)	Mobility (min)
Normal control	-	5.3±2.2
Caster oil-treated control	-	21.9±3.8
Loperamide	0.25	3.16±1.3
<i>Artemisia princeps</i> (AP) treatment	100	21.9±4.1
	250	18.8±2.8
	500	16.8±3.2
	100	21.5±2.1
<i>Artemisia princeps</i> (F-AP) treatment	250	18.4±2.1
	500	15.6±2.6

14. 생물전환 신물질을 이용한 기능성 향장품 원료화
 숙 부산물을 생물전환한 추출액을 화장품에 사용할 수 있도록 원료 specification 검사 결과
 향장원료로 적합하였다.



SPECIFICATION

Analytical Tests	Specifications	Results
INCI Name	Artemisia Princeps - fermentable	-
Description	Transparent - Light Yellow Liquid	-
Odour	Typical	-
Refractive index(20 °C)	1.320 - 1.360	1.340
pH	4.5 - 6.5	5.3
Specific Gravity(d20/20)	0.875 - 0.915	0.894
Heavy Metals	≤ 10 ppm	Pass
Arsenic	≤ 2 ppm	pass
Microbes	≤ 100 cfu/ml	Pass

Approved by : H.S. Park

15. 사자발쑥 생물전환 물질의 향장품 적용
가. 아토피 크림 시제품 개발 성분표

Table 20. 아토피 크림 성분표

종 류	성분	함량 (Wt%)	비고
수상	WATER	71.95	ICID
	GLYCERIN	8.00	ICID
	TREHALOSE	1.00	ICID
	ALGIN	0.30	ICID
	DISODIUM EDTA	0.03	ICID
	ALLANTOIN	0.10	ICID
	DIPOTASSIUM GLYCYRRHIZATE	0.1	ICID
	METHYLPARABEN	0.20	ICID
유상	BUTYROSPERMUM PARKII(SHEA BUTTER)	1.00	ICID
	SQUALANE	5.00	ICID
	TOCOPHERYL ACETATE	0.50	ICID
	HELIANTHUS ANNUUS(SUNFLOWER)SEED OIL	3.00	ICID
	LIMNANTHES ALBA (MEADOWFOAM) SEED OIL	3.00	ICID
	PEG-4 OLIVATE	2.00	ICID
	POLYGLYCERYL -3 METHYLGLUCOSE DISTEARATE	1.70	ICID
	PROPYLPARABEN	0.10	ICID
첨가제	CETEARYL ALCOHOL	0.50	ICID
	PHYTOL	0.01	ICID
	사자발쑥 워터	1.00	-
	사자발쑥 오일	0.01	-
	사자발쑥 발효물	2.00	-

○ 제조 방법

1. 수상과 유상을 각각 계량하고 각각을 75℃까지 가온 용해한다.
2. 수상을 유회기를 이용하여 고르게 혼합한 후 유상을 가하여 유회한다.
3. 유회기의 속도를 감속하여 40℃까지 냉각한다
4. 첨가제를 계량하여 3회에 투입한 후 균일하게 혼합한다.
5. 감압조건에서 탈포를 시키고 약 3일간 실온에서 숙성시킨다.

나. 아토피 토너 시제품 개발 성분표

Table 21. 아토피 토너 성분표

종 류	성분	함량 (Wt%)	비고
수상	WATER	83.56	ICID
	GLYCERIN	5.00	ICID
	DIPOTASSIUM GLYCYRRHIZATE	0.10	ICID
	BETAINE	2.00	ICID
	TREHALOSE	1.00	ICID
	PANTHENOL	0.20	ICID
	SODIUM PCA	1.00	ICID
	DISODIUM EDTA	0.02	ICID
	ALLANTOIN	0.10	ICID
	PANTHENOL	0.20	ICID
유상	BUTYLENE GLYCOL	5.00	ICID
	METHYLPARABEN	0.20	ICID
	TOCOPHERYL ACETATE	0.10	ICID
첨가제	PHYTOL	0.01	ICID
	사자발쑀 워터	1.00	-
	사자발쑀 오일	0.01	-
	사자발쑀 발효물	2.00	-

○ 제조 방법

1. 수상을 계량하여 실온에서 용해한다.
2. 가용 파트를 계량하여 60℃까지 가온하여 용해한다.
3. 1번을 교반기를 이용하여 강하게 교반하면서 2번을 서서히 투입한다.
4. 첨가제를 계량하여 3번에 투입한 후 균일하게 혼합한다.
5. 약 3일간 실온에서 숙성시킨 후 여과한다.

다. 아토피 클렌저 시제품 개발 성분표

Table 22. 아토피 클렌저 성분표

종 류	성분	함량 (Wt%)	비고
수상	Water	52.68	ICID
	Butylene Glycol	15.00	ICID
	Sodium Myristoyl Glutamate	9.00	ICID
	Potassium Cocoyl Glycinate	5.00	ICID
	TEA-Cocoyl Glutamate	5.00	ICID
	Methylparaben	0.20	ICID
유상	Lauramide DEA	4.00	ICID
	PEG-32	3.00	ICID
	Lauric Acid	1.00	ICID
	Myristic Acid	1.00	ICID
	PEG-40 Hydrogenated Castor Oil PCA Isostearate	1.00	ICID
	PEG-150 Distearate	0.80	ICID
	PEG-120 Methyl Glucose Dioleate	0.80	ICID
	PHYTOL	0.01	ICID
첨가제	사자발쑃 워터	1.00	-
	사자발쑃 오일	0.01	-
	사자발쑃 발효물	2.00	-

○ 제조 방법

1. 수상과 유상을 각각 계량한다.
2. 수상을 Disper를 이용하여 천천히 고르게 교반한다.
3. 유상을 별도의 Disper로 고르게 교반한다.
4. 수상에 유상을 천천히 가하면서 모두 투여 후 30분간 천천히 교반한다.
5. 3일간 실온에서 숙성시킨다.

16. 시제품의 안정도 평가

썩 생물전환 추출물의 향장품 적용을 위해 크림과 토너의 pH측정 결과 가혹조건 후 pH 변화는 편차가 크지 않았으며 토너와 크림 모두 정상범위에 해당하는 수치로 가혹조건하에서도 안정적이었다. 또한 점도 측정에서도 분리가 되는 과정인 크림링, 응집 및 합일과 같은 현상이 관찰되지 않았고 가혹조건하에서도 안정적이었다.

가. 시제품의 안정도 평가

썩 유효 성분 추출물을 향장품 원료로 적용하였으며 클렌저와 토너 및 크림에 유효성분으로 넣어 온도 및 기간에 따른 안정도를 실험하였다. 클렌저와 크림의 가혹조건 50℃에서 3일간 방치하고 -20℃에서 3일간 방치한 뒤 가용화 제형인 클렌저와 유화 제형인 크림에서의 물성을 pH와 점도로 측정하였다.

(1) pH 측정법

pH 측정은 가혹조건 50℃에서 3일간 방치하고 -20℃에서 3일간 방치한 후 1g을 취하여 증류수로 15ml 채운 후 sonicator로 1시간동안 sonication 시킨 후 pH를 측정하였다.

Table 23. pH 측정

가혹조건	Control	50℃	-20℃
크림 pH	6.53	6.20	6.04
토너 pH	6.20	6.05	6.01
클렌저 pH	6.82	6.01	5.98

pH측정 결과 가혹조건 후 pH 변화는 편차가 크지 않았으며 크림과 클렌저의 정상범위에 해당하는 수치로 가혹조건하에서도 안정적이었다.

(2) 점도 측정법

크림은 유동적 점성 액체이므로 T-bar spindle을 이용하여 Brookfield 점도계로 점도를 측정한다. 크림을 일정한 가속도로 회전하는 spindle에 움직이는 크림의 점성 저항 torque값을 측정하여 점도변화를 측정하였다.

Table 24. 점도 측정

가혹조건	Control	50℃	-20℃
크림 점도	5,800	5,230	4,950
클렌저 점도	4,300	3,920	3,800

점도 측정 결과 크림과 클렌저 모두 분리가 되는 과정인 크리밍, 응집 및 합일과 같은 현상이 관찰되지 않았고 가혹조건하에서도 안정적이라 할 수 있다.

17. 예민 피부 간이 임상

가. 예민 피부 개선 효과 평가

예민 피부의 개선 효과를 평가하기 위해, 시험 시료중 바디 클렌저로 전신을 샤워한 뒤 크림을 전신에 도포하되, 가능한 한 시험시료의 효과에 영향을 미칠 수 있는 다른 보습제의 사용은 금지한다. 시험 시료를 도포한 지 2, 4주 후의 효과를 스코래드 (SCORAD:SCORing Atopic Dermatitis) 측정법으로 평가하였으며 그 결과는 다음과 같다.

예민 피부 개선 효과를 평가하기 위해 피부에 알러지 증상과 피부트러블이 국소 또는 전신에 있는 남아 10명, 여아 10명으로 총 20명의 10세 미만의 유아 및 어린이를 대상으로 실시하였다.

Table 25. 예민 피부 개선 평가 피험자 정보

No.	성명	성별	약칭	연령	임상결과
1	김은혜	여	KEH	8	4
2	이재윤	남	LJY	2	1
3	양진욱	남	YJW	3	5
4	엄규원	남	UGW	3	4
5	김사랑	여	KSR	2	3
6	조윤화	여	CYW	2	5
7	김동완	남	KGW	7	5
8	조성훈	남	CSH	2	5
9	이서진	남	LSJ	8	4
10	김서연	여	KSY	5	5
11	이준	남	LJ	9	3
12	강현우	남	KHW	3	4
13	엄규훈	남	UKH	2	4
14	김지우	여	KGW	2	4
15	박서진	여	PSJ	2	5
16	박다미	여	PDM	2	4

17	오원재	남	OWJ	7	3
18	박혜림	여	PHR	10	4
19	박세현	여	PSH	9	3
20	정예린	여	JYR	7	2

* 임상결과에 대한 수치

1: 상태 매우 악화 2: 약간 악화 3: 보통, 약간 개선 4: 상태 호전 5: 상태 매우 호전

(1) 나이: 24개월

성별: 남아

주거형태: 아파트

사용기간: 4주

사용제품: 강화약쑥 유효성분 함유 제품

사용방법: 강화약쑥 유효성분이 함유된 클렌저로 목욕 후 간단히 물기를 제거한 후 강화약쑥 추출물이 적용된 크림을 매일 아침, 저녁 4주간 도포하였다.



- 치료전 -



- 치료후 -

Fig 28. 제품의 예민 피부 간이 임상

(2) 나이: 36개월

성별: 여아

주거형태: 아파트

사용기간: 4주

사용제품: 강화약쑥 유효성분 함유 제품

사용방법: 강화약쑥 유효성분이 함유된 클렌저로 목욕 후 간단히 물기를 제거한 후 강화약쑥 추출물이 적용된 크림을 매일 아침, 저녁 4주간 도포하였다.



- 치료전 -



- 치료후 -

Fig 29. 제품의 예민 피부 간이 임상

강화약쑥 유효성분 함유 클렌저와 크림으로 알러지 부위에 간이 임상을 20명에게 실시한 결과 6명은 알러지가 거의 완화되어 피부가 건강하게 되어 상태가 아주 많이 개선되었고 12명은 피부에 보습과 진정작용을 주어 피부 각질화 현상과 소양증을 완화시켜 상태가 호전되었다. 나머지 2명은 상태가 호전되지 않았으며 더 악화된 경우도 있었다. 향과 쑥추출물 대한 알러지 반응으로 사료된다. 알러지 임상한 전체인원의 90%가 상태가 좋아졌으며 제품에 대해 긍정적이었다.

18. 생물전환의 대량생산을 위한 체제 구축

쑥 부산물의 생물전환시 가장 효율적인 방법으로 부산물을 압착하여 추출액을 얻은 시료에 K-1균주로 생물전환했을 때 소양모델 생쥐에서 항소양효과를 측정 한 결과 55% 저해하여 가장 우수하였다. 정유를 추출하고 남은 쑥을 압착추출하거나, 그대로 담귀서 유산균 K-1 균주로 생물전환하고, 그 발효한 검체를 동결 건조하는 것이 가장 항알러지 효능을 높이는 이상적 조건이었다.

19. 신제품 개발 기획

가. 신제품 개발

브랜드의 전문성을 나타낼 수 있는 이미지의 개발하고 향장품 전문 제조에 대한 기업의 노하우와 전문성 그리고 이를 통한 소비자의 신뢰를 강화하고 전달할 수 있는 이미지의 개발을 시도하였다.

(1) 친근함과 신뢰성을 나타낼 수 있는 이미지의 개발:

자연 친화성과 소비자의 기호에 맞춘 서비스하는 기업의 경영이념을 나타내고 지역의 브랜드를 함께 이미지화할 수 있는 측면을 기본으로 (주)파인엠의 전문기업으로써의 이미지와 기술력을 상징할 수 있는 시각커뮤니케이션을 시도하여 새롭게 변화하고 시대를 리드 할 수 있는 자신감을 표출할 수 있는 이미지를 개발

(2) 동종, 경쟁시장에서의 차별화된 이미지의 개발:

치열한 무한 경쟁 시대에서의 우수한 기술력과 전문성을 대내, 외에 알릴 수 있는 (주)파인엠만의 브랜드 이미지 확립을 통하여 차별화된 정체성 확립을 시도

(3) 다양한 시장 환경 변화와 국제화에 적극적이고 체계적으로 대응할 수 있는 이미지 개발: 앞으로 전개될 다양한 환경변화에 능동적인 대처를 필요로 하고 특히 지구촌시대의 무한 경쟁 시대에서 전문기업으로써 기업의 정체성을 확립할 수 있는 국제화에 걸맞는 이미지의 개발을 시도

나. 제품 개발 및 제품 디자인

기능적이고 심미적인 패키지(Package)의 개발은 디자인이 소비자의 제품선택 성향이 품질과 더불어 디자인과 브랜드도 함께 고려하는 소비추세의 변화에 따라 기존의 향토적 특산물 디자인이 아닌 세련되고 고급스러운 디자인을 가미하여 소비자의 구매 욕구를 자극해 제품의 부가 가치를 높이고, 고유이미지를 소비자에게 깊이 인식시켜 고객흡인력을 제고하고자 하며 소비자의 신뢰를 강화하고 전달할 수 있는 이미지의 개발을 시도하여 브랜드의 전문성을 나타낼 수 있고 친근함과 신뢰성을 나타낼 수 있으며 동종, 경쟁시장에서의 차별화되어 다양한 시장 환경 변화와 국제화에 적극적이고 체계적으로 대응할 수 있는 제품 디자인을 개발하고자 하였다.

다. 패키지 디자인 개발

브랜드 이미지 개발로 수립된 제품의 정체성을 확대하고 제품의 사용에 있어 효율적 기능성을 추구하는 색체계획, 라벨, 용기, 단상자 등 통합 패키지 개발





Fig. 30. 예민 피부용 제품 사진(출시 예정)

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

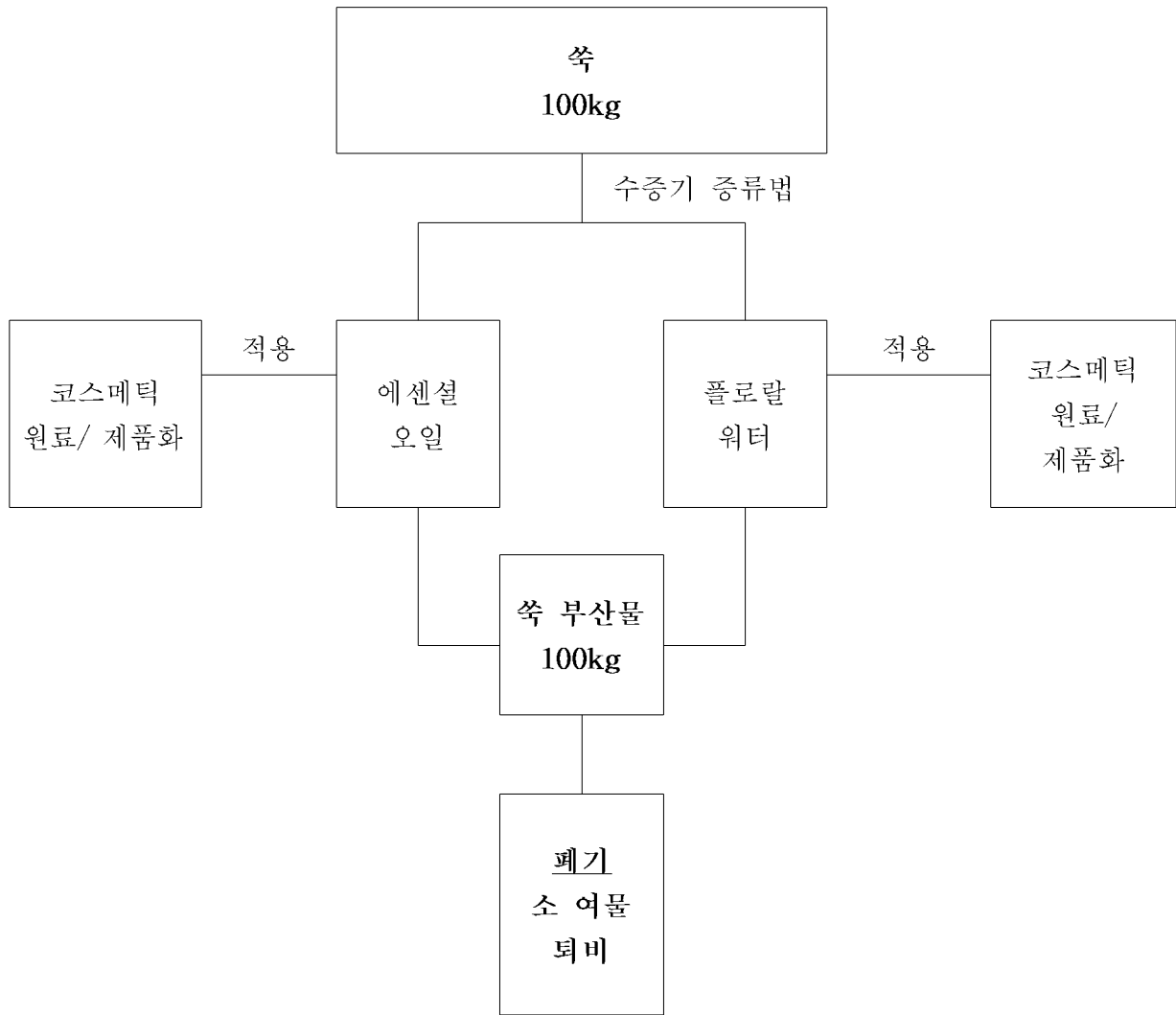
1. 주관: 쑥 부산물 유용 성분의 생물전환을 통한 신물질을 활용한 아토피 제품개발

연도	목표	평가착안점	달성도(%)
2009	생물전환 신물질을 이용한 기능성 향장품 원료화	부산물 유효 농축액 추출 - 유효 성분 분석	100
		eupatilin과 jaceosidin의 적정 유효 농도 확립 및 기능성 평가	100
		쑥 유효성분의 향장 원료화	100
		쑥 발효물질의 향장품 적용-안정도 실험	100
2010	쑥 추출성분의 특성화 및 생리활성에 따른 향장 원료화	쑥 추출물이 주성분인 기능성 향장품 개발	100
		제형의 물성 및 안정성 평가	100
		추출물 및 제품별 scale up 및 pilot test	100
		항알러지 향장품의 시제품 제조	100
		시제품의 간이 임상 테스트	100
		제품의 양산화를 위한 체제 구축	100

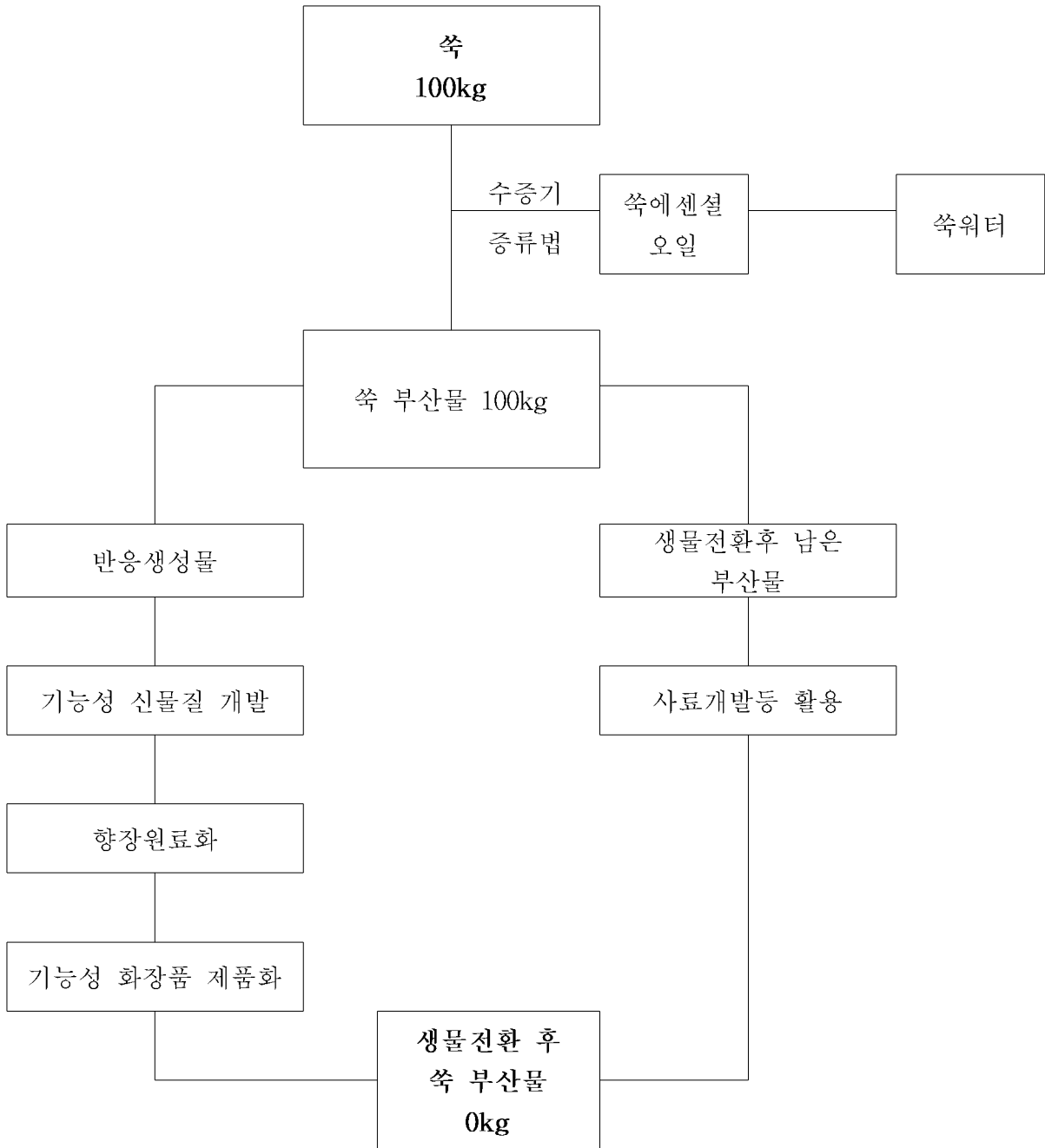
2. 제 2 세부과제 쑥 부산물의 생물전환을 통한 신소재 개발 및 생리활성 평가

연도	목표	평가착안점	달성도(%)
2009	쑥 발효 유산균 선별	쑥발효 유산균 선별 -된장, 김치, 고추장 유산균분리	100
	정유 및 발효쑥의 항알러지효과	쑥추출정유와 발효쑥 추출물의 항알러지효능 평가	100
	발효잔사쑥의 정장활성 평가	소장, 대장 수송능평가 설사모델동물에서의 효능평가	100
2010	쑥 발효균주의 동정	일반특성 및 16S rDNA 등의 분석	100
	발효쑥물추출물의 항알러지효과 (in vivo)	소양효과, 항염증효과	100
	항알러지 효과 (in vitro)	peritoneal macrophages 평가 RAW264.7 cells에서 평가	100
	발효공정 개선	반응조건 검토	100
	발효잔사쑥의 급성독성	간이 급성독성	100
	피부자극성시험	피부자극성시험	100
	항산화 효과	DPPH 등	100

<연구 개발 전>



<연구 개발 후>



제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제1절 실용화·산업화 계획

개발된 원료를 제품에 적용하여 항알러지 제품개발에 원료로 사용하고, 아토피에 효과가 있는 기능성 향장제품을 개발하고자 한다. 이렇게 개발된 향료 및 향장원료는 아토피 신약의 기초가 될 것이며 식품 및 향장품에 사용 할 수 있어 수입대체 효과와 수출을 통한 국위 선양 및 농가 소득을 증대하는데 목적이 있다.

1. 제품화

가. 항알러지 제품 개발 -> 내수 및 수출

특징: 소양증, 항염, 항균, 보습, 아나필락시스 저해 활성이 높은 아토피 제품

대상- 잠재적 아토피 환자를 포함한 예민피부 대상자- 한국 국민 20%

전세계적으로 아토피 환자는 약 10%이므로 외국인 포함

나. 부가적

(1) 천연 오리엔탈 향료 개발로 인한 식품, 향장품 적용으로 수입대체 효과 및 수출 기대

(2) 축향장 원료 개발로 한방 신원료 등재로 원료 판매

(3) 축발효물질 개발로 향장 원료 및 식품 원료로 사용 가능

제2절 연구개발결과의 성과

1. 특허

출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2009	썩을 탄소원으로 생육가능한 미생물 및 그 용도	파인엠	한국	10-2009-0085491
2009	알러지 피부질환의 예방 또는 치료용 약학조성물	파인엠	한국	10-2009-0085494
2010	미생물감염증 치료 또는 개선용조성물	경희대학교 산학협력단	한국	10-2010-0066270

2. 논문

계재연도	논문명	저자			학술지명	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자			
2011	Anti-scratching behavioral effect of essential oil and phytol isolated from <i>Artemisia princeps</i> in mice	류권렬	김동현	최종렬, 정선아	Planta Medica	국외	O
2010	Anti-Inflammatory Effect of Fermented <i>Artemisia princeps</i> Pamp in Mice	조은하	김동현	트리히엔쥬, 한명주	Biomolecules and Therapeutics	국내	O
2009	Antiallergic effect of fermented <i>Artemisia princeps</i> Pamp in mice	트리히엔쥬	김동현	조은하	Bull.KH Pharmacol. Sci.	국내	×

3. 활용방안

- 쑥 유효 성분의 향장 원료화로 기능성 코스메틱 원료로 사용
- 천연 쑥 향료는 화장품의 베이스취나 사용감의 만족도를 위하여 향료로 사용
- 천연 쑥향을 떡, 빵, 소스, 죽등 전통 식품에 활용
- 방향제, 실내정화 등 기능성을 살린 아로마테라피로 사용이 가능
- 쑥 가공제품 예를 들어 쑥향티슈, 쑥함유 우유 등에 인공향이 아닌 천연향을 함유시켜 일반 가공제품들과 차별화 될 수 있는 제품개발이 가능
- 개발된 제품의 시연이나 시식을 통한 지역 특산물 이미지 제고 및 홍보등에 활용가능
- 지역 축제인 강화 고인들축제, 진달래축제등 지역 특산물로서 관광 연계가 가능

4. 기대 성과

- 국내 자생 식물을 원료로한 향료원료 제조에 필요한 기술력 확보
- 기호성이 좋은 향료베이스와 향료를 제조하여 특산품의 품질을 향상시키고 독자적인 브랜드 상품을 제조하므로 경쟁력을 확보
- 생축의 소비처가 없는 농민들의 고충을 해결하고 강화 농민들의 큰 소득원이 됨
- 자생 한방소재의 개발로 화장품의 원료로 사용하며 친환경적인 향장 제품을 개발하여 소비자의 만족도 향상
- 개발을 통하여 습득한 기술을 활용하여 자생식물자원의 활용도 향상
- 상품의 개발을 통하여 안정적 농업기반 구축 및 농가소득의 향상
- 개발제품의 사업화를 통한 신규이윤 창출 효과 및 자사 가치의 증진효과
- 수입에 의존해온 향료시장에 국내 기술력으로 자생향료를 개발하며 국가 경쟁력 강화
- 국내 경제 산업적 생산성향상 및 경쟁력향상

- 새로운 시장에서의 선두시장 진출기업의 premium 유지
- 수입대체 및 수출유발 효과
- 소비자의 needs 충족에 따른 삶의 질 개선 및 의료비용 절감
- 강화약속을 이용한 기능성 소재 개발에 관련된 기술을 관련 업체에 이전하여 지역 경제 발전에 기여
- 항알러지 제품 개발로 국민 보건 건강에 이바지
- 아토피 신약개발의 발판 확보

5. 인력 양성 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
12	3	7	2	0	8	4	12	0	0

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

최근에는 다양한 분야에 대한 소재의 개발이 점점 더 발전하고있으며 연구가 진행되고 있다. biotechnology나 미생물, 유전자 조작 등을 이용한 계면활성제, 발효 소재, 콜라겐·엘라스틴 합성촉진제, elastase 활성저해제, 손상 DNA 복구용 소재, ATP 합성 촉진제, 면역력 증강제, 고도 불포화지방산 소재, 줄기세포와 관련된 소재 등이 개발되고 있으며, 펩타이드를 이용한 항균, 생리활성 조절, 주름 및 발모개선, 항노화, 저분자량, 호르몬·면역반응 조절 등 다양한 고기능성 펩타이드도 개발되고 있다.

paoniflorin은 ECM 조절 작용이, photolyase는 손상된 DNA의 치유 작용이 있다. MMP는 핵수용체인 PPARs의 발현으로 증가하며, L-carnitine, ursolic acid, dehydroepiandrosteron 등이 MMP-1(콜라겐분해효소)이나 MMP-2(젤라틴분해효소)의 활성억제 작용을 나타낸다. Amentoflavone이나 biflavonoid는 콜라겐과 엘라스틴의 분해를 촉진하는 MMP-1에 대한 효소 발현, 지질과산화 및 NF-kB의 활성을 억제하여 염증을 유발하는 COX-2의 발현을 감소시킴으로서 주름개선 소재, 항산화 소재로 활용되고 있다.

일본의 토요보(toyobo)사는 올리브유를 발효시킨 후 이를 다시 금속산화물에 부착시켜 보습 효과를 나타내는 우수한 소재를 개발했다. 또한 해외에선 세라마이드에 대한 특이적 저해를 나타내는 미역, 다시마 등의 조류 추출물을 주름개선제로 개발한 사례도 보고되고 있다.

mevalonic acid, niacinamide는 콜레스테롤 합성의 중요한 율속효소(rate limiting enzyme)인 HMG-CoA reductase의 활성을 증가시키고 노화가 진행되면서 감소하는 콜레스테롤의 양을 높여 표피분화를 촉진시켜 표피의 기능을 향상시켜주는 소재로 주목을 받고 있다.

최근에 개발되고 있는 미백 소재를 소개하면 manosamine, tunicamycin은 tyrosinase 합성저해, thyramine은 칼슘 신호전달을 차단하여 tyrosinase 합성을 저해하고, 미생물 유래의 terrein은 멜라닌 세포내에서 p-ERK의 활성을 촉진하여 MITF의 발현을 억제시킨다. 식물 유래의 selina는 tyrosinase, TRP1, TRP2의 mRNA 및 단백질 발현을 억제시킨다.

tyrosinase 저해활성제로 phenyl-2,2'-methylenebis(cyclohexane-1,3-dione) 유도체가 알려졌다. 이 물질은 QSAR 기법인 Ligand-based approach 방법으로 예측해 낸 물질로, 활성은 물론 발암성, 변이원성, 독성, 감작성, 피부침투성 등을 예측해 낸 후, 최적의 구조식을 Receptor-based approach 방법으로 tyrosinase에 도킹시켜 최종적으로 tyrosinase 저해활성이 우수한 비경쟁적 저해제임이 확인된 물질이다.

항노화 화장품의 개발동향은 DNA 활성화 또는 손상인자로부터 보호하거나 손상된 DNA를 복구하는 제품들, 피부성장인자(EGF), 인간성장호르몬(HGH), 줄기세포(Srem cell), 발효기술등이 주요 개발 경향이였다.

제 7 장 참고문헌

Bae E.A., Hyun Y.J., Choo M.K., Oh J.K., Ryu J.H., Kim D.H. (2004) Protective effect of fermented red ginseng on a transient focal ischemic rats. *Arch. Pharm. Res.* 27, 1136-1140.

Bae E.A., Min S.W., Lee B., Kim N.J., Baek N.I., Han E.J., Chung H.G., and Kim D.H. (2007) Antiasthmatic effect of fermented *Artemisia princeps* in asthmatic mice induced by ovalbumin. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 1554-7.

Bielory L. (2004) Complementary and alternative interventions in asthma, allergy, and immunology. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 93(2Suppl1), S45-54.

Friedman E.S., LaNatra N., and Stiller M.J. (2002) NSAIDs in dermatologic therapy: review and preview. *J. Cutan. Med. Surg.* 6, 449-59.

Hernandez G.L., Volpert O.V., Iniguez M.A., Lorenzo E., Martinez-Martinez S., Grau R., Fresno M., and Redondo J.M. (2001) Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. *J. Exp. Med.* 193, 607-620.

Joh E.H., Lee I.A., Han S.J., Chae S., and Kim D.H. (2010) Lincemaside A ameliorates colitis by inhibiting NF- κ B activation in TNBS-induced colitis mice. *Int. J. Colorectal Dis.* 25, 545-551.

Kim D.H. (2002) Herbal medicines are activated by intestinal microflora. *Nat. Prod. Sci.* 8, 35 - 43.

Kim S.H., Lee S.D., Kim W.B., Lee M.G., and Kim N.D., Determination of a new antiulcer agent, eupatilin, in rat plasma, bile, urine, liver homogenate by high performance liquid chromatography. *Res. Commun. Mol. Path. Pharmacol.* 97, 165-170.

Kobashi K., and Akao T. (1997) Relation of intestinal bacteria to pharmacological effects of glycosides. *Biosci. Microflora*, 16, 1 - 7.

Lee S.H., Shin Y.W., Bae E.A., Lee B., Min S., Baek N.I., Chung H.G., Kim N.J., and Kim D.H. (2006) Lactic acid bacteria increase antiallergic effect of *Artemisia princeps* Pampanini SS-1. *Arch. Pharm. Res.* 29, 752-756.

Lee J.Y., Shin J.W., Chun K.S., Park K.K., Chung W.Y., Bang Y.J., Sung J.H., and Surh Y.J. (2005) Antitumor promotional effects of a novel intestinal bacterial metabolite (IH-901)

derived from the protopanaxadiol-type ginsenosides in mouse skin. *Carcinogenesis* 26, 359-367.

Min S.W., Kim N.J., Baek N.I., and Kim D.H. (2009) Inhibitory effect of eupatilin and jaceosidin isolated from *Artemisia princeps* on carrageenan-induced inflammation in mice. *J. Ethnopharmacol.* 125, 497-500.

Park B.K., Heo M.Y., Pak H., and Kim H.P. (2001) Inhibition of TPA-induced cyclooxygenase-2 and skin inflammation in mice by wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*. *Eur. J. Pharmacol.* 425, 153-158.

Plaut M., Pierce J.H., Watson C., Hanley-Hyde J., Nordan R.P., and Paul W.E. (1989) Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc epsilonRI or to calcium ionophore. *Nature*, 339, 64-67.

Reynolds N.J., Voorhees J.J., and Fisher G.H. (1998) Cyclosporin A inhibits 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate-induced cutaneous inflammation in severe combined immunodeficient mice that lack functional lymphocytes. *Brit. J. Dermatol.* 139, 16-22.

Ryu S.N., Han S.S., Yang J.J., Jeong H.G., and Kang S.S. (2005) Variation of eupatilin and jaceosidin content of mugwort, *Korean. J. Crop Sci.*, 50, 204-207.

Sakuma S., Higashi Y., Sato N., Sasakawa T., Sengoku T., Ohkubo Y., Amaya T., and Goto T. (2001) Tacrolimus suppressed the production of cytokines involved in atopic dermatitis by direct stimulation of human PBMC system (Comparison with steroids). *Int. Immunopharmacol.* 1, 1219-1226.

Schafer-Korting M., Schmid M.H., and Korting H.C. (1996) Topical glucocorticoids with improved risk-benefit ratio. *Drug Safety* 14, 375-385.

Shin Y.W., Bae E.A., Lee B., Min S., Lee J.H., Baek N.I., Ryu S.N., Chung H.G., Kim N.J., and Kim N.J. (2006) Antiallergic effect of *Artemisia princeps* SJ-1 and SS-1 cultivated in Ganghwado, *Nat. Prod. Sci.* 12, 67-73.

Shin Y.W., Bae E.A., Kim S.S., Lee Y.C., Lee B.Y., and Kim D.H. (2006) The effects of ginsenoside Re and its metabolite, ginsenoside Rh1, on 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate- and oxazolone-induced mouse dermatitis models. *Planta Med.* 72, 376-378.

Simons F.E.R. (1992) The antiallergic effects of antihistamines (H1-receptor antagonists). *J. Allergy Clin. Immunol.* 90, 705-715.

Stevens R.L., and Austen K.F. (1989) Recent advances in the cellular and molecular biology of mast cells. *Immunol. Today* 10, 381-386.

Wuthrich B. (1989) Epidemiology of the allergic diseases: are they really on the increase? *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*90(suppl.1), 3-10.

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

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.

