

발간등록번호
--------

11-1543000-001019-01
----------------------

전통주 발효 부산물을 이용한 기능성 향장 소재 및  
향비만 고부가가치 소재 개발 연구

(Screening and development of bio-active compounds  
from by-products of traditional alcohol beverages)

안동대학교 산학협력단

농림축산식품부



# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “전통주 발효 부산물을 이용한 기능성 향장 소재 및 항비만 고부가가치 소재 개발 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015 년 9 월 일

주관연구기관명 : 안동대학교

주관연구책임자 : 손 호 용

제1세부연구책임자 : 손 호 용

제2세부연구책임자 : 김 종 식

연 구 원 : 김 미 선

연 구 원 : 이 예 슬

연 구 원 : 이 승 훈

연 구 원 : 권 민 정

협동연구기관명 : (주) 국순당

협동연구책임자 : 신 우 창

연 구 원 : 권 희 숙

연 구 원 : 박 선 영

연 구 원 : 이 수 민

연 구 원 : 백 상 훈

연 구 원 : 권 이 영



## 요 약 문

### I. 제 목

[전통주 발효 부산물을 이용한 기능성 향장 소재 및 항비만 고부가가치 소재 개발 연구]

### II. 연구성과 목표 대비 실적

본 연구개발의 초기 연구성과 목표 및 연구성과 활용목표는 다음과 같다.

표. 연구성과 목표 (2012년 제출당시 양식)

(단위 : 건수)

구분	(예시)특허		(예시)신제품				(예시)유전자원 등록	(예시)논문		기타
	출원	등록	제품명 명칭등록	생산 수입판매 신고	제품보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도							1	1		
2차년도	1						2	3		
3차년도	1						2	3		
계	2						5	7		

표. 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	2	2			5	

이에 따른 성과목표 대비 실적 (2015년 양식)은 다음과 같다.

성과목표	사업화지표							연구기반지표									
	지식 재산권		기술이전	사업화				기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용-홍보		기타 (타구 연용 등)	
	출원	등록		제품화	기술창업	매출창출	고용창출		투자유치	논문				학술발표	정책 활용		홍보 전시
										SCI	비 SCI						
최종목표	2		2	2					5	7							
연구기간 내 달성실적	8	2	-	4				2	1	14	32		6			1	
달성율(%)	400		-	200				원료 등록 2건	20	200	초과 달성		초과 달성			미세 먼지 대응 제품	
연구기간 후 달성예정		8	2						4	3							

\* 화장품 원료 등록 2건: 리조푸스/쌀발효추출여과물, 리조푸스/쌀발효물

### III. 연구개발의 목적 및 필요성

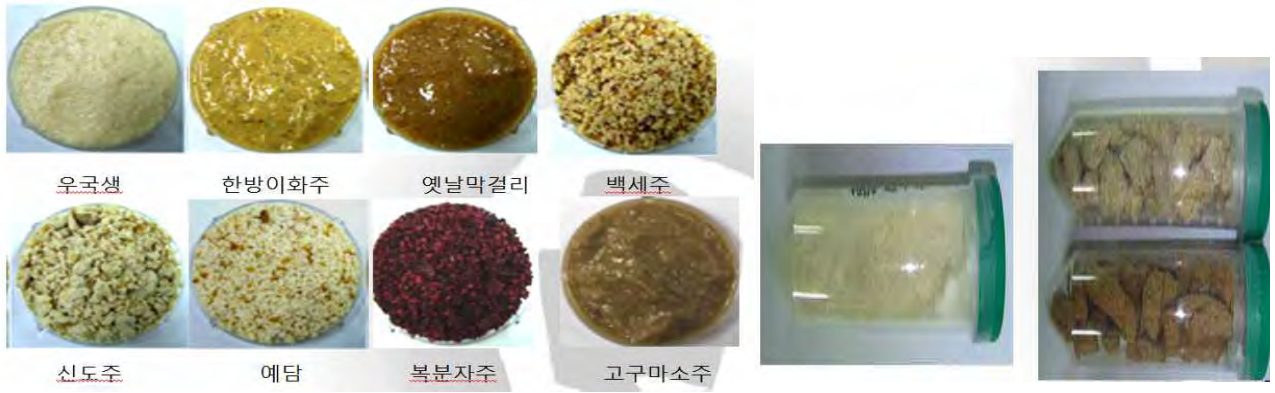
본 연구개발의 목적은 대량으로 산업체에서 생산되면서도, 별도의 용도가 없이 대부분 폐기되고 있는 전통주 제조후의 주박을 이용하여 고부가가치 화장품 소재로 개발하는 것이다. 즉 상업적 시설에서 제조 후 폐기되고 있는 주박의 다양한 유용 생리활성을 검증하고, 이에 따른 유효 활성 물질들을 분리 동정하며, 이에 기반한 유용생리활성의 기작 검토와 최종적으로는 과학적으로 검증된 기능성, 안정성이 확보된 향장관련 제품을 개발하는 것이다.

본 연구개발의 최종목표는 전통주 발효 부산물인 주박으로부터 각종 추출물을 분리 및 동정하고, 이러한 추출물에 의한 다양한 생리활성 효과와 작용기전을 이해하고, 최종적으로 이를 이용한 시제품을 개발하는 것으로, 1차년도의 목표는 주박에서 여러 분획물을 제조하고, 분획별 항산화, 항혈전, 항균, 항비만, 항염증 활성 및 피부 미백효과와 주름 개선 활성 효과를 연구하는 것이다. 2차년도의 목표는 생리기능 활성별 유효성분 및 핵심물질을 분리하고, 유효성분별 항비만 활성 및 항염증 활성의 작용기전을 규명하고, 피부 미백 및 주름개선 활성작용 기전을 규명하는 것이다. 3차년도의 목표는 유효성분별 항산화, 항혈전, 항균 활성 작용의 기전을 규명하고, *in vivo* 모델을 이용하여 항비만 활성과 화장품 유효성 평가를 수행하며, 향장관련 시제품 4종을 개발하는 것이다.

주박을 활용한 새로운 건강(기능성)식품 및 기능성화장품의 고부가가치 소재 개발은 산업폐기물인 주박을 재활용하는 매력적인 전략이 될 수 있으며, 육상 폐기물의 해양투기 원칙적 금지 조항 (2016년 육상 폐기물 해양투기 전면 금지, 수산인 신문, 2013년 12월 6일: 음식물 쓰레기 및 발효 주박 포함) 등을 고려한다면, 산업 폐기물 주박의 효율적인 처리 공정 개발 및 이를 이용한 고부가가치 제품 개발 연구가 반드시 필요하다.

### IV. 연구개발 내용 및 범위

참여기업인 (주)국순당에서 상업적 규모로 생산하고 있는 8종의 전통주 주박 및 3종의 상업적 관련 누룩을 대상으로 다양한 추출물을 조제하였으며, 총 110종의 다양한 추출물 및 이의 분획물을 조제하여 주름개선, 미백, 항염증, 다양한 유용 생리활성을 평가하였다. 사용된 8종 주박, 3종 누룩 및 전체 연구개발 내용과 범위는 다음과 같다.



V. 연구개발결과

본 연구개발사업에서는 3개의 세부과제로 구분하여 진행하였으며, 제 1세부(안동대학교)에서는 다양한 주박 추출물의 제조 (총 110 종 추출물 제조) 및 이의 *in-vitro* 항혈전 활성, 항균, 항산화, 전분분해효소 억제활성을 평가하고, 최종적으로 생리활성 기반 유효조성물 제조 및 key molecule 의 구조분석을 담당하였으며, 제 2세부(안동대학교)에서는 제 1세부로부터 제공된 다양한 시료들을 이용하여 항염증, 항비만, 암세포 성장억제 활성을 평가하였다. 제 1 협동기관인 (주)국순당에서는 제 1세부에서 제공된 시료들을 대상으로 미백활성, 주름개선 및 광노화 억제 활성 등을 검증하였으며, 최종적으로 2종의 화장품원료(리조푸스/쌀발효추출여과물, 리조푸스/쌀발효물)를 신규 등록하고, 상업화를 위한 4종의 향장제품을 생산하였다. 현재 생산제품들은 [수불](물속의 불이란 뜻으로 술의 고어임) 이라는 브랜드로 상업화 대기 중에 있다.

제 1세부과제에서는 3종 탁주, 3종 약주, 1종 과일주, 1종 증류주, 3종의 국순당의 상업적 시설에서 사용하고 있는 누룩을 포함한 총 11종 시료에 대한 에탄올 추출물, 열수 추출물을 조제하였으며, 이들 추출물을 대상으로 순차적 유기용매 분획물을 조제하여, 제1 세부 실험에 사용함은 물론, 제 2세부 및 제 1협동기관에 제공하였다. 구체적으로 옛날막걸리 주박, 우국생 주박, 한방이화주 주박, 백세주 주박, 신도주 주박, 예담 주박, 명작복분자 주박, 고구마소주 주박 및 쌀로 만든 한방이화주 누룩, 옛날 막걸리 누룩 (2종 누룩 혼합제품), 국순당 누룩 (R4 누룩)을 대상으로 110종의 추출물 및 활성 분획물을 시료로 사용하였다. 각각의 주박에 대한 용매 추출 효율은 사용 용매에 따라 상이하였으며, 열수 추출물의 경우 옛날 막걸리, 신도주 주박에서 높은 추출효율을 나타내었으며, 에탄올 추출의 경우에는 한방이화주, 옛날 막걸리, 우국생 순으로 높은 추출효율을 나타내었다. 분획물의 경우, 열수 추출물은 헥센 분획물이 매우 미미하였으며, 에틸아세테이트 분획물은 한방이화주, 고구마 소주, 우국생 주박에서 높게 나타났다. 부탄올 분획물은 명작 복분자주, 고구마 소주, 백세주, 신도주, 예담 순으로 높게 나타났다. 열수 추출물의 대부분은 물 잔류물로 이행되었다. 11종 주박 및 누룩의 pH, brix, 색차, 알코올 함량, 영양성 등의 이화학적 특성 이후, 110종의 시료를 대상으로 유용성분(total flavonoid, total polyphenol, total sugar, reducing sugar)을 평가하였으며, 그 결과, 열수 추출물의 경우, 국순당 누룩의 에틸아세테이트 분획에서 가장 높은 polyphenol 함량이 나타났으며, total flavonoid의 경우, 명작복분자의 추출물, 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물, 또한 국순당 누룩의 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물에서 높은 함량을 나타내었다. 전체적으로 각각의 열수 추출물의 에틸아세테이트 분획물에서 다른 분획물보다 상대적으로 높은 total polyphenol 함량 및 total flavonoid 함량을 나타내었다. 한편 총당 및 환원당 함량 평가결과 물 잔류물로 거의 이행됨을 확인하였다. 한편 에탄올 추출물의 경우, 백세주 주박, 우국생 주박, 한방 이화주 주박의 에틸아세테이트 분획에서 가장 높은 polyphenol 함량이 나타났으며, 고구마 소주 주박의 에틸아세테이트 분획에서도 높은 polyphenol 함량을 나타내었다. 반면, total flavonoid의 경우, 한방이화주, 백셧 및 명작복분자의 에틸아세테이트 분획물에서 탁월한 함량을 나타내었으며, 전체적으로 각각의 에탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물에서 다른 분획물보다 상대적으로 높은 total polyphenol 함량 및 total flavonoid 함량을 나타내었다. 한편 항산화능 (DPPH 음이온 소거능, ABTS 양이온 소거능, 환원력 평가), nitrite 소거능 평가결과, 전체적으로 55종 열수 추출물 및 분획물 중, 높은 항산화 활성은 백세주, 명작 복분자, 고구마 소주 주박에서 나타났으며, 국순당 누룩, 옛날 막걸리 누룩, 한방이화주 누룩에서 나타나 누룩에 의한 생리활성이 나타남을 추측할 수 있었다. 에탄올 추출물의 경우, 열수 추출물보다 높은 항산화능을 나타내고 있으며, 55종 추출물 및 분획물 중 높은 항산화 활성은, 한방이화주, 백세주, 명작 복분자, 고구마 소주 주박에서 나타났으며, 국순당 누룩, 옛날 막걸리 누룩, 한방이화



주 누룩의 에틸아세테이트 분획에서도 우수한 항산화 활성이 나타났다.

항혈전 활성의 경우, 열수 추출물 및 에탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획에서 강력한 항응고 활성이 나타났으며, 특히 옛날막걸리, 명작복분자, 고구마 소주 및 한방이화주 누룩의 에틸아세테이트 분획은 15배 이상 혈전 생성을 지연시켜 상업적으로 사용되는 아스피린보다 우수함을 확인하였다. 또한 에탄올 추출물의 경우 상기의 활성 분획물 이외에도, 우국생, 한방이화주, 백세주, 신도주 등 모든 전통주 주박의 에탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획은 강력한 항응고 활성을 나타냄을 확인하였다. 한편, 110종 시료의 인간 혈소판 응집저해 활성 평가 결과, 열수 추출물의 경우 우국생 주박, 신도주 주박, 명작복분자 주박, 고구마 소주 주박 및 3종 누룩에서 높은 응집저해 활성을 나타내었으며, 가장 높은 활성은 우국생 주박의 헥센 분획물에서 나타났다. 따라서 향후 우국생 주박은 신규의 항혈소판 제제로 개발 가능하리라 판단되며, 국순당 누룩의 에틸아세테이트 분획물에서도 강력한 활성이 나타났다. 그러나 한방이화주 누룩의 에틸아세테이트 분획물처럼 일부는 혈소판 응집 촉진 활성을 나타내기도 하였다. 110종 주박 추출물 및 분획물의 항혈전제로의 실제적 가능성 탐색의 일환으로 시료들의 인간 적혈구 용혈활성을 평가하였으며, 그 결과, 3종 누룩의 에탄올 추출물에서는 인간 적혈구 용혈 활성이 나타남을 확인하였다. 따라서 향후 주박 추출물 및 활성분획물의 경우, 에탄올 추출물보다는 열수 추출물 사용이 바람직함을 알 수 있었다. 또한 상업적으로 추출물 및 활성 분획물을 조제 시에도 열수 추출이 에탄올 추출보다 안전성, 경제성, 간편성에서 보다 효율적이므로, 향후 향장소재 개발시에도 열수 추출물 사용이 바람직하다.

110종 주박 추출물 및 분획물을 대상으로 4종의 그람양성 세균 및 4종의 그람음성 세균을 대상으로 항세균 활성을 평가하였으며, 그 결과, 한방이화주, 복분자주, 고구마 소주 및 국순당 누룩에서 우수한 항균력을 나타냄을 확인하였다. 항세균 활성은 향후 화장품 향장소재 개발시 참고자료로 활용될 것이다. 110종 주박 추출물 및 분획물의 *in-vitro* 전분분해효소 억제 활성을 평가하였으며, 그 결과 백세주 및 명작 복분자주 주박에서 양호한 활성이 나타났으며, 옛날막걸리 주박의 에탄올 추출물의 부탄올 분획물에서 가장 강력한 glucoamylase 저해활성이, 백세주 주박의 에탄올 추출물의 물 잔류물에서 가장 강력한  $\alpha$ -amylase 저해활성이 확인되었다. 이러한 결과는 다양한 주박 추출물 및 활성분획물이 전분분해효소 억제제로 개발 가능성을 제시하고 있다.

최종적으로 다양한 활성들을 수치화하여 clustering한 결과, 명작복분자, 옛날 막걸리, 우국생 및 백세주 주박의 에탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물을 선정하였으며, 20~50 kg의 해당 주박을 대상으로 에탄올 추출물을 대량 제조하였다. 이후 순차적 유기용매 분획을 실시하여 에틸아세테이트 분획을 대량 회수하였으며, 이를 대상으로 silica-gel chromatography, Preparative HP-TLC를 수행하고, 활성물질들을 HPLC-MS, GC-MS를 사용하여 분석하였다.

현재까지 확인된 물질들은 우국생 주박에서 1,4:3,6-Dianhydro-D-mannitol, Oxalic acid di-(2-phenylehtyl) ester, 백세주 주박 유래의 Hesperdin, Quercetin, 명작복분자 주박 유래의 Oxalic acid di-(2-phenylehtyl) ester, Quercetin 등이 다량 확인되었으며, 상기 3종의 주박 모두에서 항산화 활성 및 항혈전 활성이 우수한 phenolic compound 및 pyridoxine 등 19종의 물질들을 분리, 확인하였다. 확보 물질로는 gentisic acid, caffeic acid, ferulic acid, cinnamic acid, chlorogenic acid,, syringic acid, coumaric acid, salicylic acid, 4-hydroxybenzoic acid, folic acid, ascorbic acid, kojic acid, vanillic acid, sinapic acid, catechin, pyridoxine, genistein, daidzein이다. 현재 이들의 항혈전 (혈액응고저해 및 인간 혈소판 응집저해) 및 항산화 활성이 우수함을 확인하고 인간적혈구 용혈활성이 없음을 확인하여, 향장제품 소재로 주박 추출물 및 활성 분획물이 적합함을 확인하였다. 특히 sinapic acid, hesperitin 등은 본 사업을 통해 최초로 항혈전 활성이 확인된 물질이다. 향후 사업 종료된 이후에도 (주)국순당과 함께, 지속적으로 이들 순수물질들의 향장제품 소재이용성 및 제품화 연구를 진행할 예정이다.

제2 세부과제에서는 1차년도에는 총 5 종의 주박과 누룩 추출물 및 이들의 유기용매 분획물에 의한 지방세포형성억제, 항염증 및 암세포 항성장 활성 등의 다양한 생리활성을 연구하였다. 처리한 추출물 중 W-Ju 주박의 ethyl acetate 분획물인 WPAc가 가장 높은 지방세포형성 억제활성을 보였다. 이는 oil Red O 염색과 pro-adipogenic 유전자의 발현 억제를 통해 확인하였다. 항염증 활성의 경우 B-Ju 주박의 ethyl acetate 분획물인 PAc 처리시 가장 높은 활성을 보여 주었다. 또한, PAc는 대장암 세포주인 HCT116의 생존율을 가장 많이 감소시켰으며, 항암 유전자인 *NAG-1* 과 *ATF3* 유전자의 발현을 증가 시킬 수 있음을 확인하였다. 이러한 연구결과는 전통주 제조시 사용되는 누룩과 부산물로 발생하는 주박 추출물 및 유기용매 분획물이 지방세포형성억제활성, 항염증 및 암세포 성장 억제활성을 가지고 있음을 시사한다.

2차년도에는 제1세부 과제로부터 제공받은 주박 및 누룩 시료 총 85종에 의한 항염증 활성을 연구하였다. 85종의 분획물 중 선별한 세 가지의 분획물 (KSD-E1-3, KSD-E2-3, KSD-E4-3)에 의해서 LPS에 의해 염증이 유도된 RAW 264.7 세포주에서 nitric oxide 생산이 현저히 감소됨을 확인하였다. 또한, 세가지 분획물에 의해 염증유발 유전자인 *COX-2*, *TNF-alpha*, 그리고 *iNOS* 유전자의 발현이 감소되었다. 세 가지 분획물 중 KSD-E4-3에 의한 항염증 활성의 작용기전을 이해하기 위하여 oligo DNA microarray를 수행하였다. 마이크로어레이 결과 발현이 감소된 유전자 중 염증과 관련된 유전자 6개를 (*IL-1F6*, *iNOS*, *IL-10*, *Fabp4*, *IL-1RN*, *CSF2*)를 선택하여, RT-PCR과 정량적 real-time PCR을 수행하였다. 그 결과, 모든 유전자의 발현이 감소됨을 확인하였다. 또한, 동일한 85종의 시료를 이용하여 대장암 세포주 모델에서 항성장 활성 연구와 활성기전을 연구하였다. 이들 중 세포생존율 연구결과에 따라 3가지 종류의 분획물(KSD-E1-3, KSD-E2-3, KSD-E4-3)을 선별하였다. 이 중 가장 활성이 높은

KSD-E1-3 분획물에 의한 유전체 수준에서의 유전자 발현변화를 확인하기 위하여 oligo DNA microarray 실험을 수행하였다. 그 결과, 2배 이상 발현이 증가된 유전자들 가운데 항암 유전자인 *NAG-1*, *ATF3*, *DDIT3* 그리고 *p21*을 선별하여 추가 실험을 진행하였다. 세포생존율 결과에 따라 선별된 3가지 종류의 분획물(KSD-E1-3, KSD-E2-3 그리고 KSD-E4-3)에 의한 4가지 종류의 유전자의 발현을 확인한 결과, KSD-E1-3에 의하여 모든 유전자의 발현이 높게 증가되었다. KSD-E1-3에 의한 유전자의 발현이 전사조절인자 *p53*에 의존적인지 확인하고자 *p53* null HCT116 세포주를 이용하여 RT-PCR한 결과, *NAG-1*, *ATF3*, 그리고 *DDIT3* 유전자 *p53*에 비의존적이었으며, 반면 *p21* 유전자는 *p53*에 의해서만 발현이 증가되는 것을 확인하였다.

3차년도에는 고구마 소주로부터 획득한 에탄올 추출물 및 순차적 유기용매 분획물을 제조하고, 이들 시료가 LPS로 활성화된 마우스 대식세포 RAW 264.7 세포주에서 nitric oxide (NO) 생산과 세포생존율에 미치는 영향을 연구하였다. 처리한 시료 중 ethylacetate 분획물 (KSD-E8-3) 처리군에서 LPS로 염증 유도된 RAW 264.7 세포주의 생존율에는 영향 없이 NO 생성을 현저하게 감소시킴을 확인하였다. 또한 분획물 KSD-E8-3 처리에 의해서 염증 매개 인자인 *COX-2*, *iNOS* 그리고 *TNF-alpha*의 유전자의 발현이 감소되었으며, iNOS 단백질의 발현이 현저히 감소됨을 Western blot으로 확인하였다. 또한, 분획물 KSD-E8-3 처리에 의해 세포내 대표적인 신호 전달 단백질인 3가지의 MAPK 단백질(p38, JNK, ERK1/2)의 인산화가 모두 억제됨을 확인하였다. 또한, 한방 이화주의 주박으로부터 ethanol 추출물과 그것의 순차적인 유기용매 분획물을 획득하고, 이들 시료들이 인간 대장암 세포인 HCT116 세포주의 cell viability와 pro-apoptotic 유전자인 *ATF-3*와 *NAG-1*의 발현에 미치는 영향을 연구하였다. 처리된 유기용매 시료 가운데 KSD-E3-2 분획물(hexane 분획물)과 KSD-E3-3 분획물(ethylacetate 분획물)의 처리에 의해 현저하게 세포생존율이 감소하였으며, 두 분획물에 의해 농도의존적으로 세포 생존율이 감소하였다. 또한, 두 분획물의 처리에 의해 pro-apoptotic 유전자인 *NAG-1* 과 *ATF-3* 의 유전자와 단백질의 발현이 증가함을 확인하였다. 특히, KSD-E3-3 분획물 0.1 mg/ml의 처리에 의해 *NAG-1* 단백질의 발현이 현저하게 증가하였으며, 또한 apoptosis의 지표인 PARP cleavage가 관찰되었다. 이러한 KSD-E3-3 분획물에 의해 유도된 apoptosis는 *NAG-1* siRNA transfection에 의해 회복됨을 확인하였다. 따라서, KSD-E3-3 분획물에 의한 *NAG-1* 단백질의 발현증가와 apoptosis 간의 직접적인 관련성이 있음을 시사한다. 마지막으로, 1세부과제부터 제공받은 순수물질 11종에 대한 항염증 연구를 수행하였다. 그 중 hesperetin에 NO 생성이 현저히 감소됨을 확인하였고, 이러한 NO 생성의 저해는 p38 MAPK를 통해 이루어진다는 것을 증명하였다.

참여기업인 (주)국순당에서는 주박의 화장품 소재로서의 기능을 확인하기 위하여 1세부로부터

터 주박 추출물 시료를 받아 미백과 주름예방 효과를 확인하였다. 시료는 옛날막걸리 주박, 우국생 주박, 한방이화주 주박, 백세주 주박, 신도주 주박, 예담 주박, 명작 복분자 주박, 고구마 소주 주박 및 쌀로 만든 한방이화주 누룩, 옛날 막걸리 누룩 (2종 누룩 혼합제품), 국순당 누룩 (R4 누룩)을 대상으로 110종의 추출물 및 활성 분획물을 사용하였다. 미백활성을 스크리닝하기 위하여 in vitro tyrosinase 활성 저해력과 멜라닌 세포의 멜라닌생성 저해력을 확인하였으며 옛날 막걸리주박과 우국생 주박, 백세주 주박 에틸아세테이트 추출물에서 그 효과가 좋음을 확인하였다. 이러한 미백활성은 멜라닌을 형성하는데 핵심 효소인 tyrosinase와 이와 관련된 단백질인 TRP-1,2의 발현을 저해하여 나타나는 효과로 tyrosinase의 발현에 관련되는 cAMP-PKA-CREB-MITF의 기전 저해를 통하여 이러한 미백효과를 나타냄을 확인하였다. 또한 대표적인 기능성인 주름개선효과를 확인하기 위하여 시료를 처리하여 MMPs의 발현을 확인하였으며 옛날 막걸리 주박, 백세주 주박 에틸아세테이트 추출물, 누룩 추출물이 농도별로 MMPs의 활성을 저해하고 이러한 효과는 ERK, p38과 같은 mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 인산화에 영향을 주고 NF- $\kappa$ B DNA-binding activity를 감소시킴으로서 MMP-9의 발현을 억제하여 주름예방 효과를 보임을 확인하였다. 건조 막걸리 주박의 중금속 제거력을 확인하여 이 새로운 기능을 바탕으로 미세먼지와 중금속 제거용 화장품 소재로 특허 출원하였으며, 최종 선정 물질인 우국생 에틸아세테이트 추출물의 *S. aureus*에 대한 항균활성과 사람 피부에 대한 자극 완화 활성을 확인하여 기존의 막걸리 추출물과는 다른 차별화를 바탕으로 시제품 4종을 개발하고 안정성 및 사용성을 평가하였다. 또한 백세주 추출물을 이용하여 원료화하고 시제품화 함으로써 소재 및 제품의 확장을 준비하고 있다.

## VI. 연구성과 및 성과활용 계획

본 사업 기간 동안 탁주, 약주, 과일주 및 증류주를 포함하는 국내 전통주와 이화누룩(쌀누룩), 밀 누룩, 국순당 누룩 등 국내 전통누룩에 대해, 광범위하면서도 체계적인 이화학적 특성 분석, 유용성분 분석, 이에 따른 다양한 유용생리활성 (항혈전 활성, 항균, 항산화, 전분분해효소 억제 활성, 항염증, 항비만, 암세포 성장억제 활성, 미백활성, 주름개선 및 광노화 억제 활성)등을 검증하였으며, 최종적으로 19종의 주박 공통의 활성 key molecule을 확인하여, 이에 기반한 4종의 향장제품(수블 자연발효 클렌징 폼, 수블 자연발효 입욕제, 수블 발효 크림 및 수블 발효 앰플)을 개발하여 상업화 준비중에 있다.

상기 연구동안, 10건의 국내 특허를 출원하였으며 (이중 2건 특허등록), 15건의 국내외 전문 학술지 논문 게재, 32건의 국내외 학술발표, 6명의 발효주 주박 관련 석사, 박사 인력을 양성하였다. 또한 연구사업 진행동 안, 사회적으로 큰 이슈가 된 미세먼지에 대한 이너뷰티 화장품 개념을 확립하였으며, 주박을 이용한 미세먼지, 중금속 제거용 이너뷰티 제품개발을 2015년 후

반기~2016년 전반기에 시작할 예정에 있다. 현재 개발된 4종 제품은 (주) 국순당 내부 신사업 팀이 발족하여 시장을 분석 중에 있으며 과제의 연구 성과를 바탕으로 사내벤처를 통한 자체 사업화와 업체인수를 통한 향장 사업화를 검토 중에 있다. 본 참여기업 국순당은 신사업팀 STP 전략분석에서와 같이, 국내외의 1) 천연소재 선호자, 2) 저자극 선호자, 3) 기능성 선호자를 대상으로 발효기능성 화장품을 확장하며, 특히 기존의 [이미지 기반]이 아닌, [기술기반, 효능기반, 안전기반]의 발효주박 화장품을 선점하며, 주류에서 화장품 회사로 발전할 계획에 있으며, 이와 더불어 2017년에는 마시는 이너뷰티 화장품으로 사업을 확장할 계획이다.

## SUMMARY

### (영문요약문)

In this study, to develop bio-active cosmoceutical compounds and fermentation-based cosmetics from the lees of Korean traditional fermentation wine, we have prepared 110 solvent extracts and their subsequent organic solvent fractions from 8 traditional wine lees (Yetnal makgeoli, wookukseng, Hanbang Ehwa-ju, Baekse-ju, Sindo-ju, Yedam, Bokbunja-ju, Sweet potato distilled lees), and 3 Korean nuruks (Ehwa nuruk, Yetnal makgeoli nuruk, Kooksungdang nuruk-R4). The prepared samples were analyzed their physicochemical properties, content of useful compounds (total polyphenol, total flavonoids etc), and different bio-activity, such as anti-inflammation, anti-proliferative, whitening, anti-wrinkle, anti-thrombosis, anti-oxidant, anti-diabetes, anti-microbial activities. Based on the bio-activity and active compounds correlation analysis using clustering and treeview program, finally, the lees of wookukseng, the lees of baekse-ju, and the lees of bokbunja-ju were selected for potent commercial source of bio-active cosmoceutical compounds and fermentation-based cosmetics. Now, we have enrolled two cosmetic ingredients (Rhizopus/Rice Fermented Extract-Filtrate, Rhizopus/Rice Fermented) and developed 4 different cosmetics named as 1) Soobul natural fermentation Cleansing Foam, 2) Soobul natural fermentation bath powder, 3) Soobul natural fermentation Cream, and 4) Soobul natural fermentation anti-aging, antioxidant ampoule which are ready to commercialization. The details research results are as follows.

Research team 1 : We have prepared 110 solvent extracts and their subsequent organic solvent fractions from 8 traditional wine lees, and 3 Korean nuruks for 3 years. The physicochemical properties of different lees and nuruk, the content of useful compounds were analyzed, and the anti-thrombosis, anti-oxidant, anti-diabetes, anti-microbial activities were systematically evaluated, The big data from 3 years analysis were commeced and the bio-activity and active compounds correlation analysis using clustering and treeview program were conducted, Based on commercial availability and activity, finally, the lees of wookukseng, the lees of baekse-ju, and the lees of bokbunja-ju were selected for potent commercial source of bio-active cosmoceutical compounds and fermentation-based cosmetics. The large scale ethanol extraction (20-50kg) of the above mentioned lees and subsequent ethylacetate fraction, silica-gel chromatography, Preparative HP-TLC lead to

identification of active key molecules. Using HPLC-MS and GC-Mass, we have identified different phenolic compounds such as, gentisic acid, caffeic acid, ferulic acid, cinnamic acid, chlorogenic acid, syringic acid, coumaric acid, salicylic acid,, 4-hydroxybenzoic acid, folic acid,, ascorbic acid, kojic acid, vanillic acid, sinapic acid and catechin, pyridoxine, genistein, daidzein. The purified compounds did not show hemolysis activity against human red blood cell and showed strong anti-coagulation activity, human platelet aggregation inhibition activity, and anti-oxidant activity. Therefore, those active compounds could be applied to bio-active cosmeceutical compounds and fermentation-based cosmetics. Especially, in this study, the strong anti-thrombosis activity of sinapic acid and hesperitin were identified. To date, this is first report of in-vitro anti-thrombosis activity and these compounds could be developed as a promising anti-thrombosis agent.

Research team 2: In the first year, the study examined extracts from five different kinds of lees and nuruk and their organic solvent fractions in terms of several biological functions, such as anti-adipogenic, anti-inflammatory, and anti-proliferative activities. The anti-adipogenic activity was investigated by treating mouse pre-adipocyte 3T3-L1 cells with one extract (YE) and four organic solvent fractions (YAc, PAc, RAc, and WPAc) during adipogenesis. Among the treated samples, the ethyl acetate fraction of W-Ju lees (WPAc) showed the strongest anti-adipogenic effect, which was confirmed with oil red O staining and down-regulation of pro-adipogenic genes such as *PPAR-gamma* and *SCD-1*. Treatment with WPAc also reduced the expression of *PPAR-gamma* in a time-dependent manner. The effects of five different extracts were examined on nitric oxide (NO) production in mouse RAW 264.7 cells to determine anti-inflammatory activity. The ethyl acetate fraction of B-Ju lees (PAc) significantly decreased NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells and it also inhibited NO production in a dose-dependent manner. The PAc fraction also dramatically decreased the viability of human colorectal cancer HCT116 cells in a dose-dependent manner. In addition, PAc increased the expression of *NAG-1* and *ATF3* genes in a dose dependent manner. Overall, these results indicate that lees and nuruk have several biological functions, including anti-adipogenic, anti-inflammatory, and anti-proliferative activities. In the second year, we prepared eighty-five different kinds of solvent fractions of rice wine lees and nuruk extracts and investigated their effect on cell viability and nitric oxide (NO) production in mouse RAW 264.7 cells. Among the treated solvent fractions, only three solvent fractions (KSD-E1-3,

KSD-E2-3 and KSD-E4-3) significantly decreased NO production in LPS-activated RAW 264.7 cells without affecting cell viability. And, they also reduced the expression of pro-inflammatory genes such as *COX-2*, *TNF-alpha* and *iNOS*. To understand the molecular mechanisms involved in the inhibition of inflammation in (KSD-E4-3)-treated RAW 264.7 cells, we carried out oligo DNA microarray analysis using Agilent Mouse microarray. To confirm microarray data, 6 genes (*IL-1F6*, *iNOS*, *IL-10*, *Fabp4*, *IL-1RN* and *CSF2*) were selected and performed RT-PCR and quantitative real-time PCR analysis with gene specific primers. The results of RT-PCR and real-time PCR agreed with microarray data. Overall, our results suggest that rice wine lees can be a novel resource for the development of foods and drugs which possess anti-inflammatory activity. And, also, we investigated their anti-proliferative activities against human colorectal cancer HCT116 cells. HCT116 cells were treated with eighty-five solvent fractions of lees extracts and then the cell viability was measured by using MTS assay. Among the treated solvent fractions, three solvent fractions (KSD-E1-3, KSD-E2-3 and KSD-E4-3) were selected based on cell viability assay. In addition, we performed oligo DNA microarray analysis to analyze gene expression changes by treatment of KSD-E1-3 in HCT116 cells. Among the up-regulated genes, we selected 4 genes (*NAG-1*, *ATF3*, *p21*, and *DDIT3*) and performed RT-PCR using gene specific primers. Among treated solvent fractions, KSD-E1-3 dramatically induced expression of four selected genes. In addition, we investigated whether up-regulation of those genes were dependent on transcription factor *p53* presence or not using *p53* null HCT116 cells. The results indicate that up-regulation of *NAG-1*, *ATF3*, and *DDIT3* is not dependent on *p53* presence, whereas *p21* is dependent on *p53* presence. These findings may help to understand the molecular mechanisms of anti-proliferative activity mediated by rice wine lees in human colorectal cancer cell. In the third year, we prepared ethanol extracts and their subsequent organic solvent fractions from lees of sweet potato soju and investigated their effects on cell viability and nitric oxide production in mouse macrophage RAW 264.7 cells. Among the organic solvent fractions, the ethyl acetate fraction of lees extracts significantly decreased nitric oxide production in LPS-activated RAW 264.7 cells without affecting cell viabilities. The ethyl acetate fraction reduced the expression of pro-inflammatory genes such as *COX-2*, *iNOS* and *TNF-alpha* and also decreased protein expression of COX-2 and iNOS. In addition, the treatment of the ethyl acetate fraction did inhibit p-ERK1/2 protein expression indicating that the ethyl acetate



fraction regulates LPS-induced inflammatory response via suppressing ERK1/2 signaling pathway. Overall, these results may contribute to understand the molecular mechanism of anti-inflammatory activity by lees extracts of sweet potato soju. And also, we prepared ethanol extracts and their subsequent organic solvent fractions from lees of Ehwa Makgeolli containing oriental herbs, one of commercialized Korean traditional rice wines. We investigated their effects on cell viability and on the expression of pro-apoptotic NAG-1 and ATF3 genes in human colorectal HCT116 cells. Among the organic solvent fractions, the hexane fraction and the ethyl acetate fraction of lees extracts significantly reduced cell viability and these two fractions decreased cell viability in a dose dependent manner. And also, they induced expression of pro-apoptotic NAG-1 and ATF-3 genes. Especially, PARP cleavage was detected by the treatment of the ethyl acetate fraction and the PARP cleavage was recovered by transfection of NAG-1 small interfering RNA. These results indicate that NAG-1 is one of the genes responsible for apoptosis by the ethyl acetate fraction of lees extracts. Overall, our findings may help to understand the molecular mechanisms of anti-proliferative and pro-apoptotic activities mediated by lees of Ehwa Makgeolli. Finally, we purified eleven kinds of pure compounds from lees of Korean traditional rice wines and their effects on nitric oxide (NO) production in mouse macrophage RAW 264.7 cells were investigated. Among the pure compounds, hesperetin and naringenin significantly reduced NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells without affecting cell viabilities. They also dramatically reduced the expression of pro-inflammatory genes such as *COX-2*, *iNOS* and *TNF-alpha* in a dose-dependent manner. In addition, hesperetin did inhibit phosphorylation of p38 MAP kinase indicating that hesperetin regulates LPS-induced inflammatory response via suppressing p38 MAP kinase signaling. Overall, the results may contribute to understand the molecular mechanism of the anti-inflammatory effects mediated by hesperetin purified from lees of Korean traditional rice wines.

Participation company 1: Korean traditional alcoholic beverage that uses Nuruk and grains, oriental herbs or fruits for fermentation. The purpose of this study was to develop cosmetic ingredients using Jubak, which is a by-product of alcoholic fermentation of traditional liquor. To investigate whitening, and anti-aging effects of Jubak, we prepared extract of Jubak and its solvent fractions. Ethyl acetate fraction of Makgeolli(KSD E1-3, KSD E2-3), Oriental herbal liquor (KSD E4-3) significantly inhibited *in vitro* mushroom

tyrosinase activity and reduced the melanin contents in mouse melanoma melanocyte, B16F10 cells. In the studies on signaling pathways for skin whitening, Jubak extracts treated cells resulted in a decrease in the expression of tyrosinase, tyrosine-related protein (TRP-1, TRP-2), and microphthalmia-associated transcription factor (MITF). Treatment of cells with Jubak extracts attenuated the phosphorylation of protein kinase A (PKA) and dephosphorylated cAMP-responsive element binding protein (CREB). These results suggest that Jubak extracts suppresses melanogenesis through the inhibition of cAMP-PKA-CREB-mediated MITF and tyrosinase expression and could be a great potential candidate as cosmeceutical ingredients for skin whitening.

For anti-aging effects, inhibition of matrix metallo-proteinase (MMPs) expression was evaluated using human keratinocyte, HaCaT cells. Treatment of HaCaT cells with KSD E4-3 reduced expression of MMP-1, -2, -9 and inhibited proteolytic activities of MMP-2, -9. These results suggest that KSD E4-3 induces down-regulation of cellular melanogenesis and protects against photo-aging induced by UVB-induced damage. Thus KSD E4-3 could potentially be a valuable cosmetic ingredient. Jubak extracts reduced sodium lauryl sulfate-induced irritation in the human skin. We determined detoxication activities of Jubak powder. The effects of Jubak powder on removal of Pb and Cd were increased proportionally to the contents of Jubak powder. It means that Jubak powder could be a valuable cosmetic ingredient for removing heavy metal and particulate matter. Based on the results, we developed three cosmetic ingredients and also we made four types of cosmetic products.

# CONTENTS

Chapter 1. Overview and the Object of the Current Research -----	19
Section 1. Purpose, necessities, and scope of the Current Research -----	19
1. Purpose of the Current Research -----	19
2. Necessities of the Current Research -----	19
3. Scope of the Current Research -----	21
Section 2. Research Object versus Research Achievement -----	22
Chapter 2. Current Technology Advances in Domestic and Worldwide-----	30
Section 1. Current Technology Advances in Lees Industry -----	30
1. Current Technology Advances in Domestic -----	30
2. Current Technology Advances in Worldwide -----	31
Section 2. The current research level and status against in Domestic and Worldwide technology advances -----	32
Chapter 3. Research Results -----	34
Section 1. Research Results from Research Team 1 -----	36
Section 2. Research Results from Research Team 2 -----	71
Section 3. Research Results from Participation Company 1 -----	107
Chapter 4. Object Achievement and Contribution in fermentation-based cosmetic industry and Lees company -----	141
Section 1. Object Achievement and Contribution from 1st-year Research -----	141
Section 2. Object Achievement and Contribution from 2nd-year Research -----	142
Section 3. Object Achievement and Contribution from 3rd-year Research -----	143
Section 4. Contribution of Technology advancement by the Current Research -	144
Chapter 5. Outcome of the Current Research and its Utilization Plan -----	145
Section 1. Commercialization Plan (Practical application) -----	145
Section 2. Plan for Education, Guidance, Advertisement -----	148
Section 3. Plan for patent achievement, paper and other intellectual property --	148
Section 4. Plan for following new Research and other linked independent research -----	148
Chapter 6. Scientific Technology Information from Abroad during the Research-	149
Section 1. Scientific Technology Information from Abroad -----	149
Chapter 7. New Facilities and Equipment in the Current Research -----	150
Chapter 8. Safety Management for Experimental Lab. -----	151
Section 1. Plan and Do for Safety Management of the Lab. -----	151
Section 2. Actual, Recorded Safety Management in the Lab. -----	153
Chapter 9. References -----	157
APPENDIX -----	168

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 및 성과목표 -----	19
제 1 절	연구개발의 목적, 필요성 및 범위 -----	19
1.	연구개발의 목적 -----	19
2.	연구개발의 필요성 -----	19
3.	연구개발의 범위 -----	21
제 2 절	연구성과 목표 대비 실적 -----	22
제 2 장	국내외 기술개발 현황 -----	30
제 1 절	국내외 관련분야 기술개발 현황 -----	30
1.	관련분야 국외 기술개발 현황 -----	30
2.	관련분야 국내 기술개발 현황 -----	31
제 2 절	연구결과가 국내외 기술개발 현황에서 차지하는 위치 -----	32
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 -----	34
제 1 절	1세부과제 연구개발수행 내용 및 결과 -----	36
제 2 절	2세부과제 연구개발수행 내용 및 결과 -----	71
제 3 절	협동과제 연구개발수행 내용 및 결과 -----	107
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	141
제 1 절	1차년도 연구목표에 입각한 연구개발 목표 달성도 -----	141
제 2 절	2차년도 연구목표에 입각한 연구개발 목표 달성도 -----	142
제 3 절	3차년도 연구목표에 입각한 연구개발 목표 달성도 -----	143
제 4 절	연구수행에 따른 관련분야 기술발전 기여도 -----	144
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획 -----	145
제 1 절	실용화·산업화 계획(기술실시 등) -----	145
제 2 절	교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등 -----	148
제 3 절	특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등 -----	148
제 4 절	추가연구, 타연구에 활용 계획 등 -----	148
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	149
제 1 절	관련분야 해외과학기술 정보 -----	149
제 7 장	연구시설·장비 현황 -----	150
제 8 장	연구실 안전관리 이행실적 -----	151
제 1 절	연구실 안전점검 체계 및 실시 -----	151
제 2 절	연구실 안전점검 이행실적 -----	153
제 9 장	참고문헌 -----	157
<첨부>	특허, 논문 및 시장분석 보고서 -----	168

# 제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

## 제 1 절 연구개발의 목적, 필요성 및 범위

### 1. 연구개발의 목적

본 연구개발의 목적은 대량으로 산업체에서 생산되면서도, 별도의 용도가 없이 대부분 폐기되고 있는 전통주 제조후의 주박을 이용하여 고부가가치 화장품 소재로 개발하는 것이다. 즉 상업적 시설에서 제조 후 폐기되고 있는 주박의 다양한 유용 생리활성을 검증하고, 이에 따른 유효 활성 물질들을 분리 동정하며, 이에 기반한 유용생리활성의 기작 검토와 최종적으로는 과학적으로 검증된 기능성, 안정성이 확보된 향장관련 제품을 개발하는 것이다.

본 연구개발의 최종목표는 전통주 발효 부산물인 주박으로부터 각종 추출물을 분리 및 동정하고, 이러한 추출물에 의한 다양한 생리활성 효과와 작용기전을 이해하고, 최종적으로 이를 이용한 시제품을 개발하는 것으로, 1차년도의 목표는 주박에서 여러 분획물들을 제조하고, 분획별 항산화, 항혈전, 항균, 항비만, 항염증 활성 및 피부 미백효과와 주름 개선 활성 효과를 연구하는 것이었으며, 2차년도의 목표는 생리기능 활성별 유효성분 및 핵심물질을 분리하고, 유효성분별 항비만 활성 및 항염증 활성의 작용기전을 규명하고, 피부 미백 및 주름개선 활성작용 기전을 규명하는 것이었다. 3차년도의 목표는 유효성분별 항산화, 항혈전, 항균 활성 작용의 기전을 규명하고, *in vivo* 모델을 이용하여 항비만 활성과 화장품 유효성 평가를 수행하며, 향장관련 시제품 3종을 개발하는 것이다.

### 2. 연구개발의 필요성

국내의 전통주 산업은 전체 주류시장 (약 8.6조원/년)의 8%를 차지하는 것으로 알려져 있으며, 산업 규모는 6,900 억원에 이르고 있다. 최근 정부의 막걸리 산업의 지원사업과 함께 사회적 웰빙 분위기에 따라 전통주 시장은 지속적으로 성장하리라 예상된다. 실제 최근의 전통주는 백미를 주재료로 하고 있으나, 다양한 약용식물, 한방약재를 포함하는 다양한 기능성 약용주가 주로 개발되고 있다. 또한 지구온난화에 따른 한반도 기온 증가에 따라 고도주 보다는 저도주가 인기가 있으며, 전통주는 소주, 양주와 달리 낮은 도수와 건강지향성으로 시장이 증가되고 있다.

전통주 제조 과정에서 발생하는 부산물인 주박은 산업폐기물로 처리되고 있다. 현재 전통주 산업

에서 가장 큰 문제는 “이러한 부산물(주박)을 효율적으로 처리할 수 있는냐?, 주박의 효율적 처리에 의해 전통주 발효산업이 경제성 있게 지속발전 가능할 것인가?”이다. 특히 국내 전통주의 대부분을 차지하고 있는 막걸리의 경우 주박 및 부산물이 다른 주류 산업군에 비해 대량으로 발생하는 문제점이 있으며, 이에 대한 주박 처리방안은 극히 제한된 범위 내에서 사료 및 퇴비로 이용되는 실정이다. 현재 전통주 업계에서는 연간 10,000톤 이상의 주박이 발생하고 있으며, 대부분은 자체 생산 회사가 아닌, 폐기물 처리시설로 보내져 처리되고 있다.

따라서, 주박을 활용한 새로운 건강(기능성)식품 및 기능성화장품의 고부가가치 소재 개발은 산업 폐기물인 주박을 재활용하는 매력적인 전략이 될 수 있으며, 특히 해양 오염을 막기 위해, 2006년 3월 산업폐기물 해양투기 금지협약의 발효 및 2012년 가축분뇨, 하수슬러지 해양투기 전면금지에 이어, 최근의 육상 폐기물의 해양투기 원칙적 금지 조항 (2016년 육상 폐기물 해양투기 전면 금지, 수산인 신문, 2013년 12월 6일: 음식물 쓰레기 및 발효 주박 포함) 등을 고려한다면, 산업 폐기물 주박의 효율적인 처리 공정 개발 및 이를 이용한 고부가가치 제품 개발 연구가 필수적이다.

또한 일반 주류 제조와 달리, 전통주의 제조의 경우 자연에서 생산된 곡물, 약용작물을 이용하여 제조되므로, 이에 따른 전통주의 부산물을 활용한 신개념의 recycling process를 개발하여 친환경적인 고부가가치소재를 발굴할 필요가 있다. 즉 일반 주류산업의 주박과는 달리, 전통주의 주박은 그 가치가 다르다고 할 수 있다.

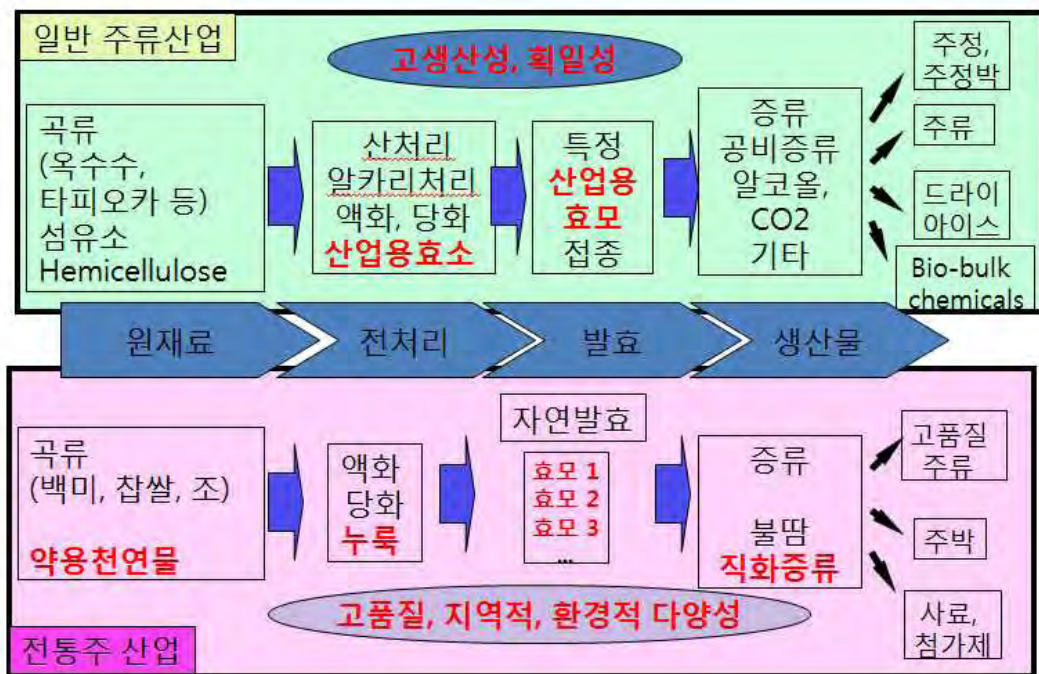


그림 1-1. 일반 주류산업과 전통주 산업의 비교

### 3. 연구개발의 범위

본 연구개발에서 사용하는 주박 및 누룩은 국내외 수백종의 전통주의 주박과 누룩 중에서, 참여기업인 (주) 국순당에서 상업적 규모로 생산하고 있는 주박 및 누룩을 사용하였다. 이는 실제적 적용 가능성과 즉효적 상업화, 참여기업의 사업화 용이성을 위한 것으로, 본 연구에서는 8종의 전통주 주박과 3종의 관련 누룩을 대상으로 하였다.

표 1-1. 본 연구개발사업에서 사용한 주박

주박의 제품명	구분/특징
우국생	탁주
한방이화주	
옛날막걸리	
백세주	약주
신도주	
예담	
명작 복분자	과일주
고구마 소주	증류주

표1-2. 본 연구개발사업에 사용한 누룩

누룩	특징
한방이화주누룩	한방이화주 제조 누룩
옛날 막걸리	옛날 막걸리 제조 누룩
국순당 누룩	기타 국순당 제품 제조 누룩

또한 주박의 유용기능성, 유용성분을 이용한 다양한 제품 개발이 가능하나, 본 연구개발 사업의 목표에 맞게 향장 제품 개발에 한하여 연구개발사업을 진행하였다. 대표적인 주류 및 주박의 고부가가치 소재로는 resveratrol과 같은 포도주의 폴리페놀성 화합물 및 피테라와 같은 일본 청주 등의 기능성 화장품 소재들이며, 본 연구개발 사업에서는 한국의 전통주 주박으로부터 한국판 피테라 (Phytochemical Therapy의 약자)인 막테라(Makgeolli Therapy)를 개발하고자 하였다.

**포도주 (Wine)**  
 : Polyphenol성 화합물 (flavonol, anthocyanin, hydroxy benzoic acid)

**일본청주, 입국, 주박**  
 : 기능성화장품 소재 (피테라 : SK-II, Kojic acid, ferulic acid 등)  
 : ACE inhibitor, Urokinase activator, 심혈관 질환 예방제 등  
 : 콜레스테롤 저하효과, 동맥경화 예방



**Resveratrol**  
Red wine (적포도주)



**일본 청주/ 청주 주박**  
**피테라 (SK-II),  
 $\alpha$ -ethylglucoside, 코직산,  
 펩타이드**  
 (혈전 생성 억제, 관상동맥질환 억제 등)

그림 1-2. 포도주와 일본 청주의 유용성 및 활용성

## 제 2 절 연구성과 목표 대비 실적

본 연구개발의 초기 연구성과 목표 및 연구성과 활용목표는 다음과 같다.

표 1-3. 연구성과 목표 (2012년 제출당시 양식)

(단위 : 건수)

구분	(예시)특허		(예시)신품종				(예시)유전자원 등록	(예시)논문		기타
	출원	등록	품종명칭 등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도							1	1		
2차년도	1						2	3		
3차년도	1						2	3		
4차년도										
5차년도										
계	2						5	7		

표 1-4. 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	2	2			5	

이에 따른 성과목표 대비 실적은 다음과 같다.

표 1-5. 성과목표 대비 실적 사항

성과목표	사업화지표								연구기반지표								
	지식 재산권		기술이전	사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	출원	등록		제품화	기술창업	매출창업	고용창업	투자유치		논문		학술발표			정책 활용	홍보 전시	
										SCI	비 SCI						
최종목표	2		2	2					5	7							
연구기간 내 달성실적	8	2	-	4					1	14	32		6				1
달성율(%)	400			200					20	200	초과 달성		초과 달성				미세 먼지 대응 제품
연구기간 후 달성예정		8	2						4	3							



구체적인 연구실적은 다음의 표에 나타내었다.

표 1-6. 특허출원 및 등록 실적 (출원 : 8건, 등록 : 2건)

출원 연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2012	주박 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품	손호용, 김종식 신우창, 김미선 이상진	한국	10-2012-0110958
2012	현미약주를 포함하는 미용조성물 및 그 제조방법 (등록: 10-1453852)	신우창, 송숙희 권희숙, 조성원	한국	10-2012-0110314
2012	이화누룩 약주를 포함하는 미용조성물 및 그 제조방법 (등록 10-1429161)	신우창, 송숙희 권희숙, 조성원	한국	10-2012-0110313
2013	주박 추출물을 유효 성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능 식품	김종식, 손호용 신우창, 박미정 손정빈	한국	10-2013-0091216
2013	주박 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강 기능 식품	김종식, 손호용 신우창, 손정빈 박미정	한국	10-2013-0091213
2014	이화누룩 추출물의 유기용매 분획물을 유효성분으로 함유하는 혈전증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품	손호용, 김종식 신우창, 김미선	한국	10-2014-0063733
2014	한방이화주 주박 추출물의 유기용매 분획물을 유효성분으로 함유하는 혈전증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품	손호용, 김종식 신우창, 김미선	한국	10-2014-0063744
2014	주박을 포함하는 중금속 및 미세먼지 제거용 화장료조성물	신우창 이수민 백상훈 손호용 김종식	한국	10-2014-0078216
2014	주박추출물의 유기용매 분획물을 유효성분으로 함유하는 대장암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물	김종식, 손호용 신우창, 강형택 이승훈	한국	10-2014-0099176
2015	시나픽산을 유효성분으로 함유하는 혈전증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품	손호용, 신우창, 김미선, 이수민	한국	10-2015-0095863

표 1-7. 논문 게재 실적 (15건)

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2014	전통주 주박의 항혈전 활성 평가	김미선	손호용	이예슬, 김종식, 신우창	J. Life Sci	24(8): 865-872	국내	x
2014	Anti-microbial and Anti-thrombosis Activity of Lees of Sweet Potato Soju	김미선	손호용	이예슬, 김종식, 신우창	Korean J. Microbiol. Biotechnol.	42(3): 258-266	국내	x
2014	In-vitro Anti-thrombosis Activity of Ehwa Nuruk	김미선	손호용	이예슬, 김종식, 신우창	Korean J. Microbiol. Biotechnol.	42(3): 302-306	국내	x
2015	Evaluation of in-vitro Anti-thrombosis and Anti-oxidation Activity of Lees of Takju (Wookukseng)	김미선	손호용	이예슬, 김종식, 신우창	J. Life Sci	25(4): 425-432	국내	x
2015	<i>Rhizopus oryzae</i> KSD-815를 이용하여 제조된 R4누룩의 항혈전 활성	김미선	손호용	이예슬, 김종식, 신우창	Korean J. Microbiol. Biotechnol.	43(2): 169-174	국내	x
2015	Application of the Lees of Domestic Traditional Wine and its Useful Biological Activity	Kim MS	Sohn, HY	신우창	J. Life Sci. (Review)	25(9): 1072-1079	국내	x
2015	Anti-microbial, antioxidant and anti-thrombosis activity of the Lees of bokbunja wine ( <i>Rubus coreanus</i> Miquel)	Kim MS	Sohn, HY	Shin WC, Kang DK	J. Life Sci.	25(7): 757-764	국내	x
2015	Anti-thrombosis Activity of Sinapic Acid Isolated from the Lees of Bokbunja Wine	Kim MS	Sohn, HY	Shin WC, Kang DK	J. Microbiol. Biotechnol.	In press	국내	o
2014	전통주 주박 추출물 및 분획물의 항염증 활성	박미정	김종식	강형택, 김미선, 신우창, 손호용,	J. Life Sci	24(8): 843-850	국내	x
2014	대장암 세포주에서 주박 추출물의 유기용매 분획물에 의한 항성장 활성	강형택	김종식	이승훈, 김미선, 신우창, 손호용	J. Life Sci	24(9): 967-972	국내	x
2015	주박과 누룩의 추출물에 의한 지방세포형성억제, 항염증 및 항성장 활성	손정빈	김종식	이승훈, 손호용, 신우창	J. Life Sci.	25(7): 773-779	국내	x
2015	고구마 소주 주박 추출물에 의한 RAW264.7 세포주에서 lipopolysaccharide로 유도된 염증 반응의 억제효과	이승훈	김종식	권민정, 김순영, 손호용, 신우창	J. Life Sci.	in press	국내	x
2015	한방이화주 주박 추출물에 의한 암세포 항성장 및 세포사멸 활성	권민정	김종식	이승훈, 정정옥, 손호용, 신우창	J. Life Sci.	in press	국내	x
2013	한방 이화주의 미백 및 피부 주름 개선 효과	이상진, 권이영	신우창	조성원, 권희숙	J. Korean Soc Food Sci Nutr	42(4): 550-555	국내	x
2014	한방 발효주주박 추출물의 미백 및 피부 주름 개선 효과	이수민, 이상진	신우창	권이영, 백상훈, 김종식, 손호용	J. Korean Soc Food SciNutr	43(11): 1695-1700	국내	x

표 1-8. 학회발표 실적 (총 32건)

제1 세부 12건

발표연도	발표제목	저자	학회명/발표일시	발표장소	국내외구분
		주저자			
2012	Invitro anticoagulation activity of lees of Korean rice wine	김미선 외	한국생명과학회 2012. 10. 26	경북대학교 글로벌프라자	국내
2012	Anti-oxidant and antimicrobial activity of lees of takju	김미선 외	한국생명과학회 2012. 10. 26	경북대학교 글로벌프라자	국내
2013	Antioxidant, antimicrobial and anticoagulation activity of the lees of fruit wine from Rubus coreanusMiquel.	김미선 외	한국미생물 생명공학회 2013. 2. 22	경주 The K호텔	국내
2013	Comparison of antimicrobial and antioxidant activity between the Elhwa nuruk and its fermented byproducts(lees)	김미선 외	한국미생물 생명공학회 2013. 2. 22	경주 The K호텔	국내
2013	고구마주박 추출물의 항산화 및 혈행개선 활성	이예슬 외	동아시아식 생활학회 2013. 4. 27	대구카톨릭 대학교	국내
2013	고구마소주 주박을 이용한 기능성식빵 제조	김미선 외	동아시아식 생활학회 2013. 4. 27	대구카톨릭 대학교	국내
2013	In-vitro Antithrombosis Activity of Lees of Korean Traditional Wine	김미선 외	한국미생물 생명공학회 2013. 7. 4	평창 알펜시아	국내
2014	Anti-thrombosis, Anti-oxidation and Anti-microbial Activities of Ehwa Nuruk	김미선 외	한국미생물 생명공학회 2015. 6. 24	부산 BEXCO	국내
2015	Anti-thrombosis and Anti-oxidation Activity of Lees of Wookukseng	김미선 외	한국미생물 생명공학회 (영남지부) 2015. 2. 27	경주 코오롱호텔	국내
2015	Anti-oxidant, Anti-microbial, and Anti-thrombosis Activities of R4-Nuruk made from Rhizopus oryzae KSD-815	김미선 외	한국미생물 생명공학회 (영남지부) 2015. 2. 27	경주 코오롱호텔	국내
2015	Evaluation of In-vitro Anti-thrombosis and Anti-oxidation Activity of Lees of Sindoju	김미선 외	한국미생물 생명공학회 2015. 6. 24	경주	국내
2015	Evaluation of In-vitro Anti-thrombosis and Anti-oxidation Activity of Lees of Bekseju	김미선 외	한국미생물 생명공학회 2015. 6. 24	경주	국내

제2 세부 16건

발표연도	발표제목	저자	학회명/발표일시	발표장소	국내외 구분
		주저자			
2012	Anti-obesity, Anti-oxidation, Anti-inflammation and Pro-apoptotic Activities of Rice Wine Jubak Extracts	손정빈 외	한국생명과학회 2012. 10. 26	경북대학교 글로벌프라자	국내
2013	Suppressive effects of solvent fractions of rice wine lees on adipogenesis in pre-adipocyte 3T3-L1	김수정 외	한국미생물 생명공학회 2013. 07. 03	평창 알펜시아	국내
2013	Anti-inflammatory activities of solvent fractions of rice wine lees in RAW264.7 cells	박미정 외	한국미생물 생명공학회 2013. 07. 04	평창 알펜시아	국내
2013	Anti-proliferative Activities of Solvent Fractions of Lees extracts on Human Colorectal HCT116 cells	강형택 외	한국미생물 생명공학회 2013. 07. 04	평창 알펜시아	국내
2013	Effects of solvent fractions of rice wine lees on cell viability and inflammation in RAW264.7 cells	박미정 외	한국생명과학회 2013. 10. 17	사천 LIG 인재니움	국내
2013	Effects of solvent fractions of lees extracts on cell viability and gene expression in human colorectal HCT116 cells	강형택 외	한국생명과학회 2013. 10. 17	사천 LIG 인재니움	국내
2014	Anti-inflammatory, anti-microbial, anti-oxidative activities of solvent fractions of lees extract	강형택 외	한국미생물 생명공학회 2014. 06. 25	부산 BEXCO	국내
2014	Anti-proliferative Activities of Solvent Fractions of Lees Extracts on Human Colorectal HCT116 cells	강형택 외	한국미생물 생명공학회 2014. 06. 25	부산 BEXCO	국내
2014	Effects of solvent fractions of rice wine lees on nitric oxide production in mouse macrophage RAW264.7 cells	강형택 외	한국생명과학회 2014. 08. 28	부산 해운대 아르피나	국내
2014	Anti-proliferative and anti-inflammatory activities of solvent fractions of lees extracts	강형택 외	한국미생물학회 연합 국제학술대회 2014. 08. 29	일산 KINTEX	국내
2015	Anti-inflammatory activities of organic solvent fractions of lees extracts from sweet potato rice wine in RAW264.7 cells	이승훈 외	한국미생물 생명공학회 (영남지부) 2015. 02. 27	경주 코오롱 호텔	국내
2015	Anti-proliferative activities of organic solvent fractions from lees extracts of Oriental Ehwa-Ju in human colorectal HCT116 cells	이승훈 외	한국미생물 생명공학회 (영남지부) 2015. 02. 27	경주 코오롱 호텔	국내
2015	Anti-proliferative and pro-apoptotic effects by lees extracts of Ehwa Makgeolli containing oriental herbs	이승훈 외	한국미생물 생명공학회 2015. 06. 24	경주	국내
2015	Suppressive effects of lees extracts of sweet potato soju on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells	이승훈 외	한국미생물 생명공학회 2015. 06. 24	경주	국내
2015	Anti-proliferative and pro-apoptotic effects by hesperetin purified from lees of korean traditional rice wines	권민정 외	한국생명과학회 2015. 08. 28	창원	국내

2015	Hesperetin suppresses LPS-stimulated pro-inflammatory response via p38 MAPK signaling in mouse macrophage RAW 264.7 cells	이승훈 외	한국생명과학회 2015. 08. 28	창원	국내
------	---	-------	-------------------------	----	----


제1 협동: 4건

발표연도	발표제목	저자	학회명/발표일시	발표장소	국내외구분
		주저자			
2012	Effect of ethylacetate extracts from jubak on skin aging induced UV-irradiation and melanogenesis	조성원 외	한국응용생명화학회 2012. 11. 10	대전 컨벤션센터	국내
2012	Effect of commercial yakju on anti-oxidant activity	조성원 외	한국식품과학회 2012. 6. 14	대전 컨벤션센터	국내
2013	Lees of Traditional Makgeolli attenuate of melanogenesis through inhibition of protein kinase A dependent pathway	이상진 외	한국응용생명화학회 2013년 6월	부산 그랜드호텔	국내
2013	Rhizopusoryzae KSD-815 from Korean traditional Nuruk inhibits UV-induced photoaging	이상진 외	한국응용생명화학회 2013년 6월	부산 그랜드호텔	국내

표 1-9. 제품화 실적 (BI 1건 및 4종 제품)

이미지	제품 특징
	<p>브랜드 수블 :                      수블은 좋은 술과 발효를 연구해온 국순당이 만든 라이프스타일 브랜드입니다.                      발효에 담긴 기다림의 정성과 좋은 술을 빚어온 올곧은 신념으로 만든 정직한 제품들을 수블의 이름으로 선보입니다.</p>
	<p>제품명 : 수블 자연발효 클렌징 폼                      특 징 : 쌀발효물 7% 함유                      쌀발효물의 발효 영양                      쌀의 정화력에 발효의 힘이 더해져 미세먼지와 각종 노폐물을 제거하고, 잔여감 없이 산뜻하게 마무리                      (특허출원: 10-2014-0078216)                      천연 스크럽                      촉촉한 발효 보습막</p>
	<p>제품명 : 수블 자연발효 입욕제                      특 징 : 쌀발효물 18% 함유                      발효 에너지 공급                      피부 가려움 진정                      피부 건조 개선 및 부드러움                      집에서 즐기는 홈스파</p>
	<p>제품명 : 수블 발효 크림                      특 징 : 쌀발효추출여과물 1.5% 함유                      쌀의 영양에 발효의 힘이 더해져 피부에 에너지 공급                      피부 진정                      발효 보습막                      피부 부드러움</p>
	<p>제품명 : 수블 발효 앰플                      특 징 : 백세 추출물 2% 함유                      한방 발효 앰플(12가지 약재)                      항노화, 항산화, 항염효과의 고농축 앰플</p>

표 1-10. 기타실적 (기술이전, 인력양성 및 타 연구활용 등)

구분	내용	비고
기술이전	<p>제1 세부과제 모든 특허출원 및 학술논문발표에 참여기업 국순당이 함께 저작권을 확보하여 별도의 기술이전 필요 없이 제품 상업화 가능</p>	4건의 국내특허 및 8건의 학술논문
	<p>제2 세부과제 모든 특허출원 및 학술논문발표에 참여기업 국순당이 함께 저작권을 확보하여 별도의 기술이전 필요없이 제품 상업화 가능</p>	3건의 국내특허 및 5건의 학술논문 (1건은 수정중, 1건은 심사중)
인력양성	<p>제 1 세부과제 박사과정 : 김미선 (다양한 주박의 생리활성 연구주제로 박사학위 취득 예정 : 2016. 2)</p>	2012~2015년까지 8편의 국내외 논문의 두기저자 및 12편의 학술논문 발표 (3회의 우수발표자, 우수 포스터상 수상)
	<p>제 2 세부과제 - 손정민, 박미정, 강형택 학생이 주박의 생리활성 연구로 석사학위 취득 - 이승훈, 권민정 학생이 주박의 생리활성 연구로 석사학위 과정 중</p>	2012~2015년 현재까지 학생 1인이 두기저자로 1편의 논문을 게재하였으며, 이승훈 학생과 권민정 학생은 현재 논문 게재 확정된 상태임.
타 연구 활용	<p>주박 관련 활성분획 및 활성물질들을 이용한 미세먼지 대응 제품 개발 (중금속 흡착능, 미세먼지 제거능이 우수한 향장제품 개발)</p>	<p>2015년 12월경부터 진행될 [발효기반 기능성소재 R&amp;D 혁신거점 구축]사업에 국순당과 안동대학교가 포함되어 있음. (자료 첨부 - 경상북도 대외비)</p> 

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내외 관련분야 기술개발 현황

#### 1. 관련분야 국외 기술개발 현황

- 서양의 와인은 90년대 초반, French paradox라는 현상을 규명하기 위해 생리기능 활성화에 대한 연구가 시작되어 현재, 심도 깊은 연구가 전 세계적으로 수행되고 있음
  - 와인의 생리 기능활성 물질인 폴리페놀성 화합물에 대한 유효 성분을 분리·동정
  - 폴리페놀 화합물 중 flavonol, anthocyanine hydroxybenzoic acid 등에서 라디칼 스캐빈저, NO 억제 등 항산화 활성 작용 기전이 규명
  - 레드 와인의 폴리페놀성 화합물의 LDL 산화방지, 활성산소 스트레스 제거, 지방 및 지질 단백질 생합성 조절 등 관상 동맥성 질환 개선 효과 및 그 작용 기전이 확립
- 와인에 대한 생리 기능 활성화 연구 성과로 인하여 전 세계적 와인의 매출이 폭발적으로 증대 되었고 와인의 원료인 포도에 대한 많은 연구로 국가 정책적으로 포도 및 와인 산업을 육성하여 많은 경제적 이익을 창출하였음.
- 이런 주목의 유효성분을 이용한 건강식품과 기능성식품을 개발하려는 연구가 지속적으로 진행되고 있음.
- 일본의 경우, 일본주, 입국 (Koji) 및 주박에 대한 생리 기능 활성화에 대한 다양한 연구가 진행 중임
  - 일본주 및 주박 (술지게미)에서 펩타이드를 분리하여 ① 안지오텐신 전환 효소 저해 활성, ② 유로키나제 활성 증가, ③ 혈전 생성 억제 효과 및 ④ 관상 동맥성 질환 억제 활성 규명
  - 일본주 주박 (술지게미)에서 기능성화장품 소재를 발굴하여 제품화 성공 (ex. SK-II)
  - 일본주 주박 및 입국에서  $\alpha$ -ethylglucoside, kojic acid 등 분리·정제하여 기능성화장품 소재 (피부 항산화, 미백 및 주름개선) 발굴하여 그 작용 기전 규명
  - 청주에서 항산화 작용이 높은 ferulic acid을 동정하였으며 이는 와인의 hydroxycinnamic acid와 유사한 작용기전을 가지고 있음이 확인됨
- 이런 일본주 (주박 포함) 연구를 기반으로 유효 생리 기능활성 물질을 대량으로 생산 가능한 방법이 확립하여 다수의 특허를 출원하였으며, 기능성화장품, 펩타이드 치료제 등 고부가가치 소재로 개발하여 제품화하였음.
- 주박에 대한 연구개발 수준이 이 가장 앞서 있는 일본의 청주 (사케) 주박에 대한 연구 결과,
  - 당뇨, 고혈압, 골다공증에 효과 확인



- 뇌경색, 심근경색 및 동맥경화를 예방
- 알레르기 체질을 개선
- 청주 주박 섭취는 혈중 콜레스테롤 저하, 부작용 없이 지질대사 개선, 알코올성 간질환 개선 효과 확인
- 청주 주박에서 angiotensin I converting enzyme 저해 펩타이드 개발
- 미백효과 확인에 따른 화장품 개발 등
- 주박이 함유하고 있는 다양한 기능성분에 대한 분석·동정하였으며, 일본의 경우 이런 주박의 유효성분을 이용한 건강식품과 기능성식품을 개발하려는 연구가 지속적으로 진행되고 있다.

## 2. 관련분야 국내 기술개발 현황

- 현재 우리나라는 주박이 산업폐기물로 지정된 상황임.
- 일부 축산업자에 의해 전통주 (약주 및 막걸리) 제조 과정에서 생산된 부산물인 주박은 사료로 소비되고 있으며 그 일부는 비료용도로 사용되고 있음.
- 하지만, 현재 생산되는 대부분의 주박은 막대한 추가 비용을 지불하면서 폐기되고 있는 실정임.  
(특히 국내의 경우 2016년부터 해양투기 전면 금지에 따라, 주박의 폐기물 처리비용이 급증할 것으로 예상되며, 이는 전통주 생산기업의 경영악화 및 자금난으로 이어져, 상당수 기업이 폐업할 것으로 예상되고 있음)
- 국내 연구 현황 : 국내에서는 거의 모든 연구가 탁주 (막걸리) 주박에 대해 집중되어 있으며, 탁주 주박의 경우에도 이를 이용한 가공식품 제조시의 부재료로 사용을 주로 연구하고 있음,
  - 탁주 분말 또는 탁주 주박을 이용한 제빵 특성 및 제빵 개량제의 제조
  - 청주박을 이용한 저식염 고추장의 양조
  - 청주 주박 단백질 농축물을 이용한 가식성 필름의 제조
  - 막걸리내의 파넬롤, 스쿠알렌과 같은 항암성분 확인(한국식품연구원)
  - 주박을 효모 성장 배지로 사용하기 위한 연구가 진행되고 있으며 생리 기능 활성화에 대한 연구는 매우 미진한 실정임.

## 제 2 절 연구결과가 국내외 기술개발 현황에서 차지하는 위치

본 연구에서는 다양한 전통주 주박의 유용 생리활성들을 검토, 발굴하였으며, 특히 탁주 이외에 약주, 과실주, 상업화된 누룩에서도 향산화, 항염증, 항암, 전분분해효소 억제, 항혈전, 항주름 및 미백 활성 등 다양한 유용 생리활성을 확인하였다.

현재까지 국내에서 탁주 및 탁주 주박에 대한 생리활성 연구가 부분적으로 이루어진 적은 있으나, 다양한 누룩 및 다양한 탁주, 약주, 과실주의 주박에 대한 전반적인 생리활성 검토 및 유용물질 발굴, 이에 기초한 향장 제품 개발은 이루어진 바 없다.

실제, 전 세계적으로 와인에 대한 다양한 생리기능 활성 연구 성과로 인하여, 포도주의 전 세계적으로 매출이 폭발적으로 증대되었고, 국내에서도 와인 및 와인의 원료인 포도에 대한 많은 연구가 진행되었으며, 이에 국가 정책적으로 포도 및 와인 산업을 육성하여 많은 경제적 이익을 창출하고 있다. 또 일본의 경우처럼, 청주, 국균(Koji) 및 술지게미에 대한 생리 기능 활성 등 다양한 연구가 진행되면서 주박을 고부가가치화한 성공사례가 세계적으로 보고되고 있다.

그러나, 우리나라의 다양한 전통주의 주박을 활용한 연구는 미흡한 상태로 상업화가 거의 이루어져 있지 않다. 본 연구를 통해 전통주 주박의 영양적 우수성 (고구마 주박), 주박의 항혈전 및 향산화, 항염증 활성 물질 확인(백세주 주박, 우국생 주박, 복분자주 주박) 및 주박의 미세먼지 제거력 및 진정효과(우국생 주박)라는 새로운 기능을 확인하였고, 미백, 주름개선, 항염 효과의 기전을 확인하였고 향산화, 항비만, 항균, 항암 등에 효과가 있는 물질을 분리 정제하여 주박 연구에 대한 깊이를 보여주었으며 이는 국제적 개발 수준과 어깨를 나란히 할 수 있었다.

특히 제2세부 과제에서는 다양한 주박과 누룩으로부터 추출물 및 이들의 순차적 유기용매 분획물, 조분획물, 그리고 주박유래 11종의 순수물질을 제1세부과제로부터 제공받아 지방세포 억제활성, 항염증 활성, 및 항암 활성 및 이들의 작용기전에 대해서 연구하였다. 주박에 의한 다양한 생리 활성에 대한 보고는 주로 국내 연구진에 의해 보고되었다. 그러나, Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)에서 관련 분야의 논문을 검색하면 매우 미미한 상황이다. 따라서, 본 과제의 지속적인 수행과 특히, 최종 동정된 순수물질에 대한 연구가 지속된다면, 국제적인 논문을 추가 출판할 수 있을 것으로 판단된다.

부가적으로, 최근 웰빙 열풍으로 안전한 천연 소재에 대한 관심이 증가하고 있어 먹을 수 있는 원료에서 유래한 주박은 화장품, 식품, 더 나아가 의약품으로 그 관심이 증가될 것으로 생각되며, 이를 이용한 향장 제품 4종을 개발함으로써 주박을 이용한 고부가가치 제품 개발의 가능성을 열게 되었다. 한편 최근 나고야 협정 이후 국산 소재에 대한 관심이 증가하고 있어 전통주 주박은 그에 대한 대안으로 발효 신소재로 각광받을 것이라 생각되며 본 연구를 통해서 자원의 재활용뿐만 아니라 전통주 산업을 육성하고 더불어 경제적 이익을 창출하는 효과를 나타낼 것으로 사료된다.

### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

본 연구개발사업에서는 3개의 세부과제로 구분하여 진행하였으며, 제 1세부(안동대학교)에서는 다양한 주박 추출물의 제조 (총 110 종 추출물 제조) 및 이의 *in-vitro* 항혈전 활성, 항균, 항산화, 전분분해효소 억제 활성을 평가하고, 최종적으로 생리활성 기반 유효조성물 제조 및 key molecule 의 구조분석을 담당하였으며, 제 2세부(안동대학교)에서는 제 1세부로부터 제공된 다양한 시료들을 이용하여 항염증, 항비만, 암세포 성장억제 활성을 평가하였다. 제 1 협동기관인 (주)국순당에서는 제 1세부에서 제공된 시료들을 대상으로 미백활성, 주름개선 및 광노화 억제, 진정 활성 등을 검증하였으며, 최종적으로 상업화를 위한 4종의 향장제품을 생산하였다. 현재 생산제품들은 [수블]이라는 브랜드로 상업화 대기중에 있다.

초기 전체 연구모식도와 전체 사업 진행도, 세부연구별 결과물은 다음과 같다.

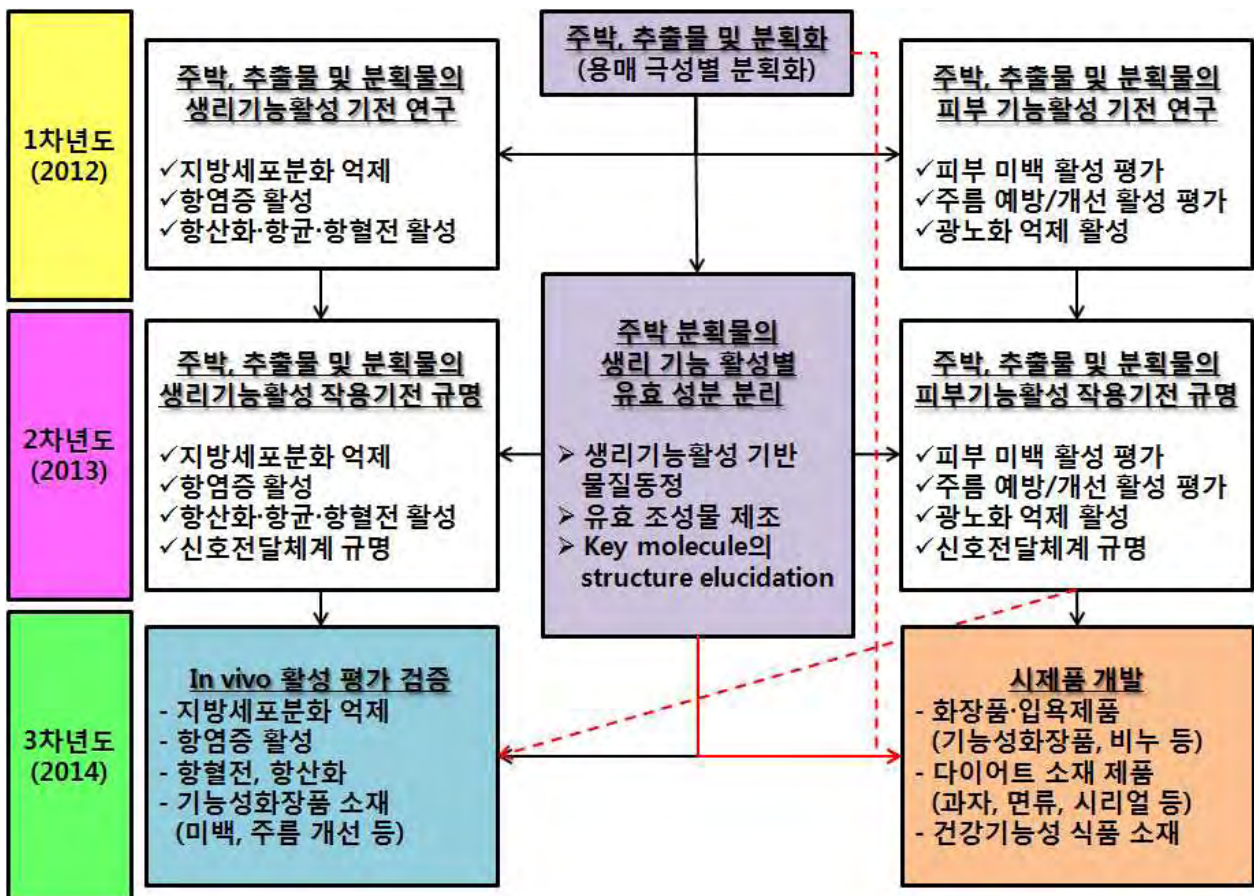



그림 3-a. 초기 전체 연구모식도



그림 3-b. 전체 사업진행도

표 3-c. 세부사업별 연구 결과물

구분	특허출원	학술논문	비고 (상업화)
제 1세부	4건	8건	
제 2세부	3건	5건 (2건 심사중)	
제 3세부	3건 (등록 2건)	2건	 제품 4종 개발 상업화 준비 중

## 제 1 절 1세부과제 연구개발수행 내용 및 결과

### 1. 제1세부 과제 년차별 연구개발 목표 및 내용

연구개발의 목표		연구개발의 내용
1차년도	주박, 물질 추출 및 분획	○주박을 이용한 다양한 용매 추출물 조제 ○추출물에 대한 용매 극성을 이용한 분획물 조제
	주박 분획별, 향산화, 항혈전, 항균 활성 작용 기전 규명	○다양한 추출물, 분획물의 유용 생리기능 평가 및 활성 분획물 대량 확보 ○유용 활성의 작용기전 규명 ○활성분획의 안전성 및 안정성 평가
2차년도	생리 기능활성별 유효 성분/핵심물질 분리 · 동정	○ 활성성분의 분리, 정제 ○ 활성성분의 구조 규명
3차년도	유효성분(핵심물질)별 향산화, 항혈전, 항균 활성 작용 기전 규명	○ 분리 핵심물질의 생리활성 평가 및 작용기전 규명 ○ 활성분획 및 분리 핵심물질의 제제화 기초 자료 확보

### 2. 제1세부 과제 시료 및 조제 방법

#### 가. 주박

실험에 사용된 주박은 탁주 3종, 약주 3종, 과일주 1종, 증류주 1종의 총 8종의 주박이다. 주박은 쌀, 물, 누룩, 효모, 곰팡이, 유산균 등을 이용하여 술을 제조한 후, 술을 걸러내는 과정에서 만들어지는 부산물로, 술지게미, 재강 또는 아래기 등으로 불리며, 특히, 쌀을 주원료로 하는 탁주 및 약주의 주박은 식량이 부족하던 시기에는 구황식품으로 이용되었다. 일반적으로 탁주 및 약주 제조시 원료 쌀의 도정 → 세미 → 침미 → 수절 → 증자 및 냉각 → 입국제조 → 주모(밑술)제조 → 1차 발효 → 2차 발효 → 숙성 → 제성으로 이루어지며, 이중 가장 중요한 공정인 발효공정은 누룩, 물 및 쌀 전분의 다양한 물리적, 화학적, 생물학적 반응을 통해 완성된다. 제성과정 중 걸러진 찌꺼기인 주박은 상당량의 영양성분과 유용 생리활성 성분을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며, 발효주와 마찬가지로 사용 원료기질 및 첨가물, 사용 누룩, 발효방법에 따라 그 성상과 생산량이 달라지게 된다.

표 3-1-1. 연구에 사용된 주박 정보

제품명	구분	원료	누룩	pH	brix	Alcohol content (%)	Water content (%)
우국생	탁주	쌀 100%	국순당 누룩	3.94	13.0	1.8	80.3
한방이화주		쌀, 약재 4종(감초, 구기자, 삼백초, 상백피)	이화누룩	4.16	27.0	1.5	59.8
옛날막걸리		쌀 100%	전통누룩	4.03	20.0	3.0	74.2
백세주	약주	설갱미, 전분 약재 12종 (홍삼, 오미자, 구기자, 산수유, 산사자, 백문동, 진피, 백수오, 감초, 건강, 고수, 수국)	국순당 누룩	4.19	10.0	1.0	46.0
신도주		쌀, 밀가루	국순당 누룩	3.90	5.0	1.6	51.6
예담		쌀, 전분, 과당	국순당 누룩	4.29	7.0	1.4	36.7
명작 복분자	과일주	복분자 56%, 주정, 과당	-	3.96	2.0	0.0	51.0
고구마 소주	증류주	쌀, 고구마	국순당 누룩	4.22	3.4	3.4	92.9



그림 3-1-1. 연구에 사용된 주박의 사진

Sample	제품명	주종	원료	누룩	비고
주박	옛날막걸리	탁주	쌀 100%	전통누룩	
	우국생		쌀 100%	국순당 누룩	
	한방이화주		쌀 100%	이화누룩	약재 4종(감초, 구기자, 삼백초, 상백피)
	백세주	약주	설경미, 전분	국순당 누룩	약재 12종 (홍삼, 오미자, 구기자, 산수유, 산사자, 백문동, 진피, 백수오, 감초, 건강, 고수, 수국)
	신도주		쌀, 밀가루	국순당 누룩	
	예담		쌀, 전분, 과당	국순당 누룩	
	명작 복분자	과일주	복분자 56%, 주정, 과당	-	
	고구마 소주	증류주	쌀, 고구마	국순당 누룩	



그림 3-1-2. 상기 제품사진

나. 누룩

실험에 사용된 누룩은 현재 국순당에서 사용 중인 3종의 누룩을 사용하였으며, 전통주의 생리활성 및 품질을 좌우하는 가장 중요한 인자이므로, 이에 대한 이화학적 특성 및 생리활성 등을 검토하였다.

표 3-1-2. 연구에 사용된 누룩 정보

시료		pH	brix	Alcohol content (%)	Water content (%)
한방이화주	누룩	4.37	1	-	13.6
	주박	4.16	27.0	1.5	59.8
옛날 막걸리	누룩	6.13/5.67 (2중: 5.94)	1.0/1.2 (1.1)	-	7.4
국순당 누룩	기업보안사항으로 비공개.				



그림 3-1-3. 누룩 및 이를 이용하여 제조된 전통주의 주박 사진



다. 상기의 11종 시료 (8종 주박 및 3종 누룩)의 활성 추출물 조제 및 이의 순차적 유기용매 분획물 조제

1세부과제에서는 상기의 11종 시료에 대한 에탄올 추출물, 열수 추출물을 조제하였으며, 이들 추출물을 대상으로 순차적 유기용매 분획물을 조제하여, 제1 세부 실험에 사용함은 물론, 제 2세부 및 제 1협동기관에 제공하였다.

표 3-1-3. 실험에 사용된 주박의 추출물 및 분획물 제조

주박/누룩		추출물 및 분획물	열수 추출물	에탄올 추출물
1	옛날 막걸리	Extract	KSD-W1-1	KSD-E1-1
		H fr.	KSD-W1-2	KSD-E1-2
		EA fr.	KSD-W1-3	KSD-E1-3
		B fr.	KSD-W1-4	KSD-E1-4
		W res.	KSD-W1-5	KSD-E1-5
2	우국생	Extract	KSD-W2-1	KSD-E2-1
		H fr.	KSD-W2-2	KSD-E2-2
		EA fr.	KSD-W2-3	KSD-E2-3
		B fr.	KSD-W2-4	KSD-E2-4
		W res.	KSD-W2-5	KSD-E2-5
3	한방 이화주	Extract	KSD-W3-1	KSD-E3-1
		H fr.	KSD-W3-2	KSD-E3-2
		EA fr.	KSD-W3-3	KSD-E3-3
		B fr.	KSD-W3-4	KSD-E3-4
		W res.	KSD-W3-5	KSD-E3-5
4	백세주	Extract	KSD-W4-1	KSD-E4-1
		H fr.	KSD-W4-2	KSD-E4-2
		EA fr.	KSD-W4-3	KSD-E4-3
		B fr.	KSD-W4-4	KSD-E4-4
		W res.	KSD-W4-5	KSD-E4-5
5	신도주	Extract	KSD-W5-1	KSD-E5-1
		H fr.	KSD-W5-2	KSD-E5-2
		EA fr.	KSD-W5-3	KSD-E5-3
		B fr.	KSD-W5-4	KSD-E5-4
		W res.	KSD-W5-5	KSD-E5-5
6	예담	Extract	KSD-W6-1	KSD-E6-1
		H fr.	KSD-W6-2	KSD-E6-2
		EA fr.	KSD-W6-3	KSD-E6-3
		B fr.	KSD-W6-4	KSD-E6-4
		W res.	KSD-W6-5	KSD-E6-5
7	명작 복분자	Extract	KSD-W7-1	KSD-E7-1
		H fr.	KSD-W7-2	KSD-E7-2
		EA fr.	KSD-W7-3	KSD-E7-3
		B fr.	KSD-W7-4	KSD-E7-4
		W res.	KSD-W7-5	KSD-E7-5
8	고구마 소주	Extract	KSD-W8-1	KSD-E8-1
		H fr.	KSD-W8-2	KSD-E8-2
		EA fr.	KSD-W8-3	KSD-E8-3

		B fr.	KSD-W8-4	KSD-E8-4
		W res.	KSD-W8-5	KSD-E8-5
9	국순당(R4) 누룩	Extract	KSD-W9-1	KSD-E9-1
		H fr.	KSD-W9-2	KSD-E9-2
		EA fr.	KSD-W9-3	KSD-E9-3
		B fr.	KSD-W9-4	KSD-E9-4
		W res.	KSD-W9-5	KSD-E9-5
10	옛날 막걸리 누룩	Extract	KSD-W10-1	KSD-E10-1
		H fr.	KSD-W10-2	KSD-E10-2
		EA fr.	KSD-W10-3	KSD-E10-3
		B fr.	KSD-W10-4	KSD-E10-4
		W res.	KSD-W10-5	KSD-E10-5
11	한방 이화주 누룩	Extract	KSD-W11-1	KSD-E11-1
		H fr.	KSD-W11-2	KSD-E11-2
		EA fr.	KSD-W11-3	KSD-E11-3
		B fr.	KSD-W11-4	KSD-E11-4
		W res.	KSD-W11-5	KSD-E11-5

상기의 11종 시료에 대한 에탄올 추출물, 열수 추출물의 추출효율 및 순차적 유기용매 추출물 조제시의 분획 효율은 다음의 그림으로 나타내었다.

그림 3-1-4. 11종 시료에 대한 에탄올 추출물, 열수 추출물의 추출효율(열수, 에탄올 추출 순)

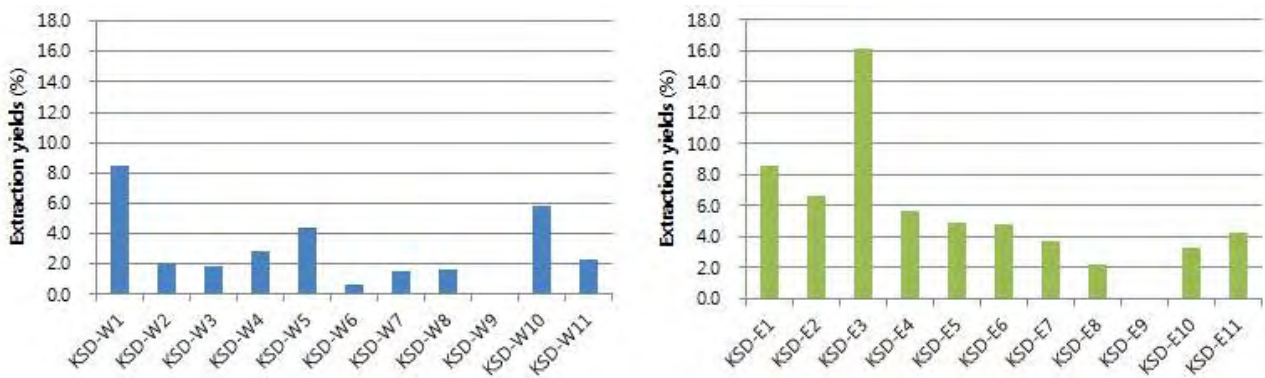
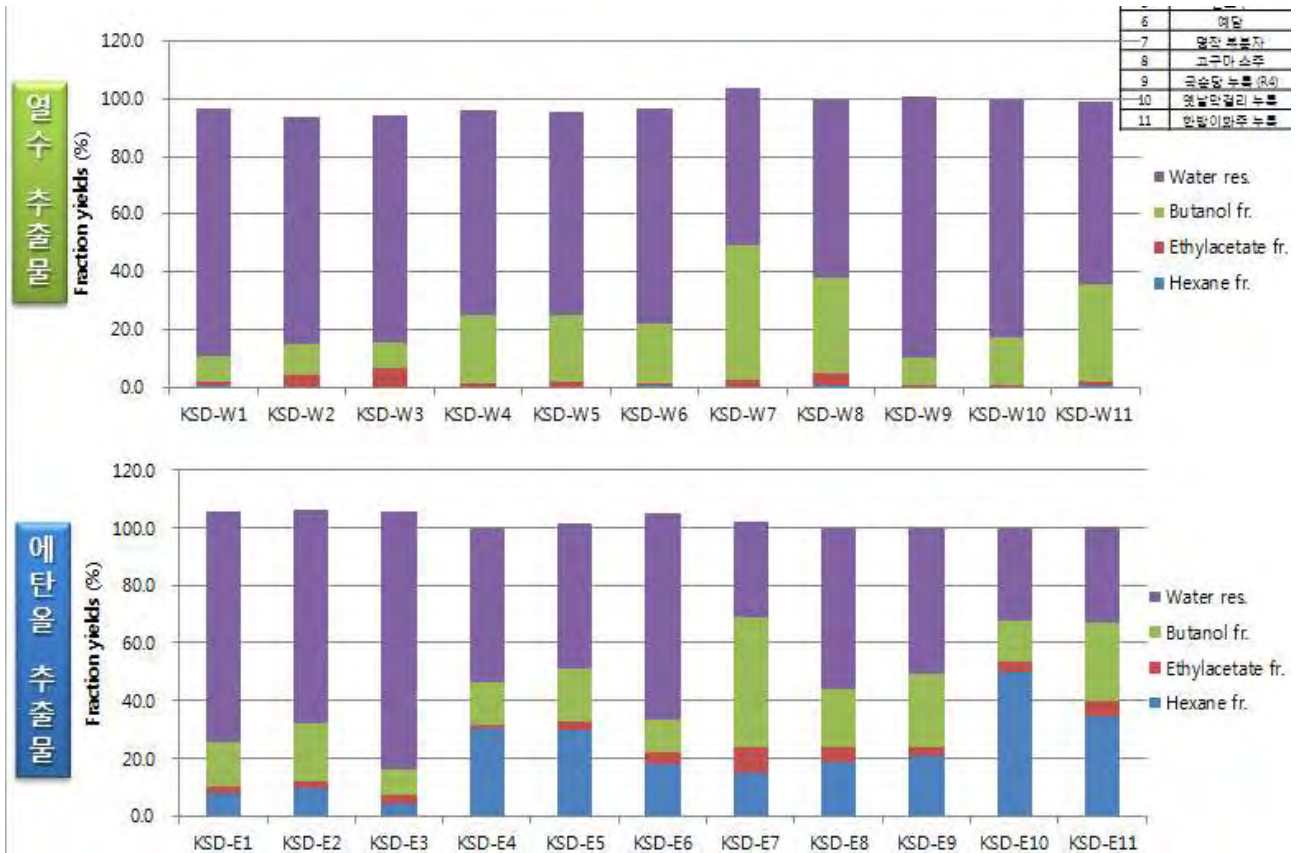


그림 3-1-5. 11종 시료에 대한 순차적 유기용매 분획물 조제시의 분획수율



이상의 결과에서처럼, 각각의 주박에 대한 용매 추출 효율은 사용 용매에 따라, 상이하였으며, 열수 추출물의 경우 옛날 막걸리, 신도주 주박에서 높은 추출효율을 나타내었으며, 에탄올 추출의 경우에는 한방이화주, 옛날 막걸리, 우국생 주박순으로 높은 추출효율을 나타내었다. 분획물의 경우, 열수 추출물은 헥센 분획물이 매우 미미하였으며, 에틸아세테이트 분획물은 한방이화주, 고구마 소주, 우국생 주박에서 높게 나타났다. 부탄올 분획물은 명작 복분자주, 고구마 소주, 백세주, 신도주, 예담 순으로 높게 나타났다. 열수 추출물의 대부분은 물 잔류물로 이행되었다.

한편, 상기 110종 시료들의 활성성분 함량을 분석하였으며, 활성성분으로 먼저 total polyphenol 함량, total flavonoid 함량을 평가하였으며, 부가적으로 총당 및 환원당 함량을 평가하였다. 그 결과 아래 그림에 제시한 바와 같이, 열수 추출물의 경우, 국순당 누룩의 에틸아세테이트 분획에서 가장 높은 polyphenol 함량이 나타났으며, total flavonoid의 경우, 명작복분자의 추출물, 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물, 또한 국순당 누룩의 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물에서 높은 함량을 나타내었다. 전체적으로 각각의 열수 추출물의 에틸아세테이트 분획물에서 다른 분획물보다 상대적으로 높은 total polyphenol 함량 및 total flavonoid 함량을 나타내었다. 한편 총당 및 환원당 함량 평가결과 물 잔류물로 거의 이행됨을 확인하였다. 추출물중 총당 및 환원당 함량이 높은 경우는 옛날 막걸리이였으며, 한방 이화주 및 옛날 막걸리 누룩에서도 높은 당 함량을 확인하였다.

한편 에탄올 추출물의 경우, 백세주 주박, 우국생 주박, 한방 이화주 주박의 에틸아세테이트

분획에서 가장 높은 polyphenol 함량이 나타났으며, 고구마 소주 주박의 에틸아세테이트 분획에서도 높은 polyphenol 함량을 나타내었다. 반면, total flavonoid의 경우, 한방이화주, 백세주 및 명작복분자의 에틸아세테이트 분획물에서 탁월한 함량을 나타내었으며, 전체적으로 각각의 에탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물에서 다른 분획물 보다 상대적으로 높은 total polyphenol 함량 및 total flavonoid 함량을 나타내었다. 한편 총당 및 환원당 함량 평가결과, 물 잔류물 및 부탄올 분획물로 거의 이행됨을 확인하였다. 추출물중 총당 및 환원당 함량이 높은 경우는 백세주, 신도주, 예담 주박이었으며, 우국생 및 명작복분자 주박에서도 높은 당 함량을 확인하였다.

그림 3-1-6. 11종 시료의 열수 추출물 및 이의 분획물의 total polyphenol 함량

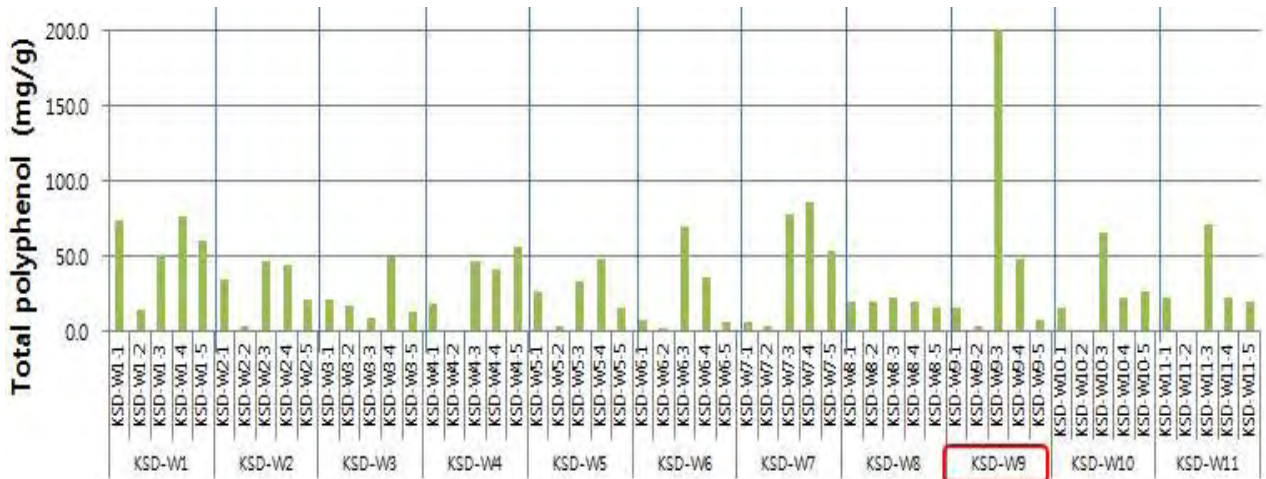


그림 3-1-7. 11종 시료의 열수 추출물 및 이의 분획물의 total flavonoid 함량

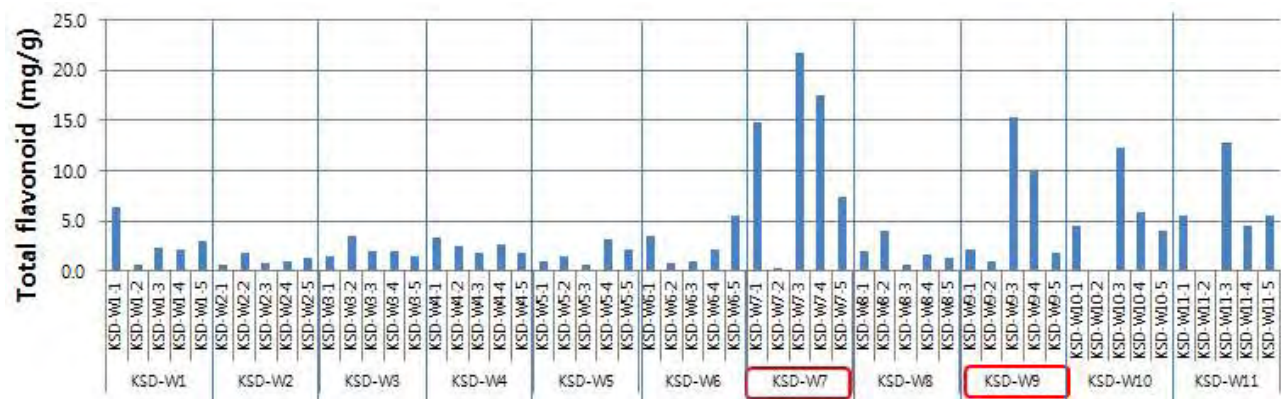


그림 3-1-8. 11종 시료의 열수 추출물 및 이의 분획물의 total sugar 함량

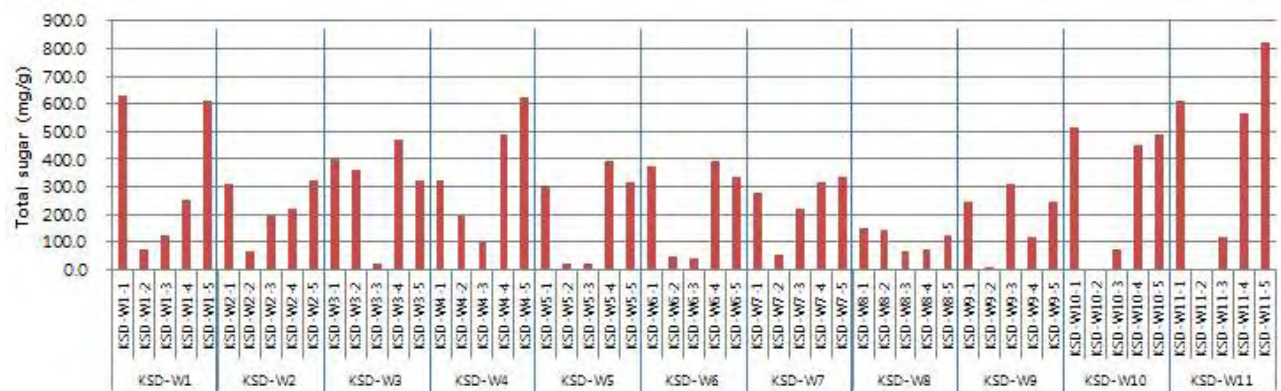


그림 3-1-9. 11종 시료의 열수 추출물 및 이의 분획물의 reducing sugar 함량

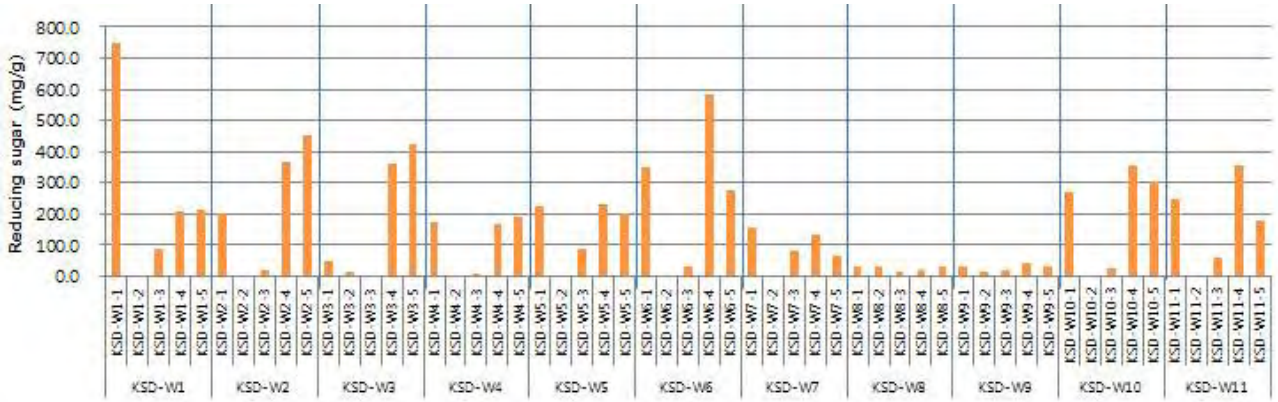


그림 3-1-10. 11종 시료의 에탄올 추출물 및 이의 분획물의 total polyphenol 함량

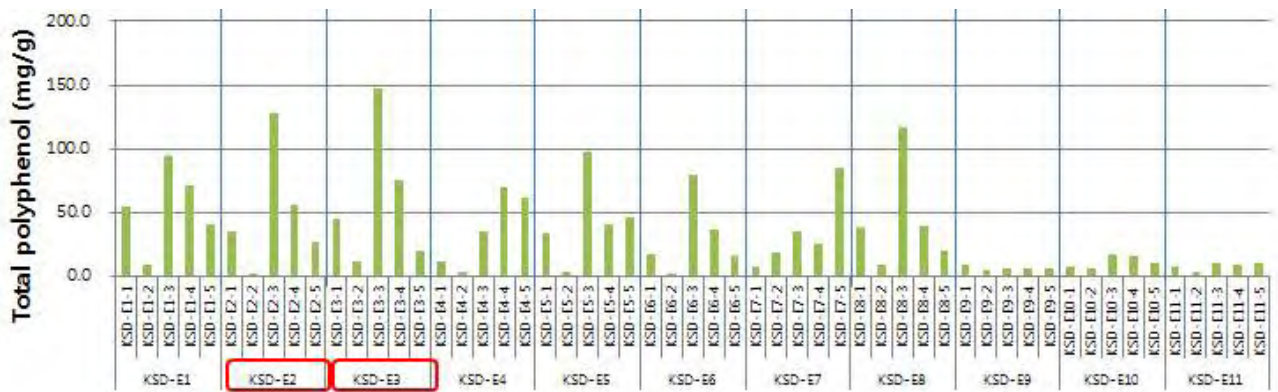


그림 3-1-11 . 11종 시료의 에탄올 추출물 및 이의 분획물의 total flavonoid 함량

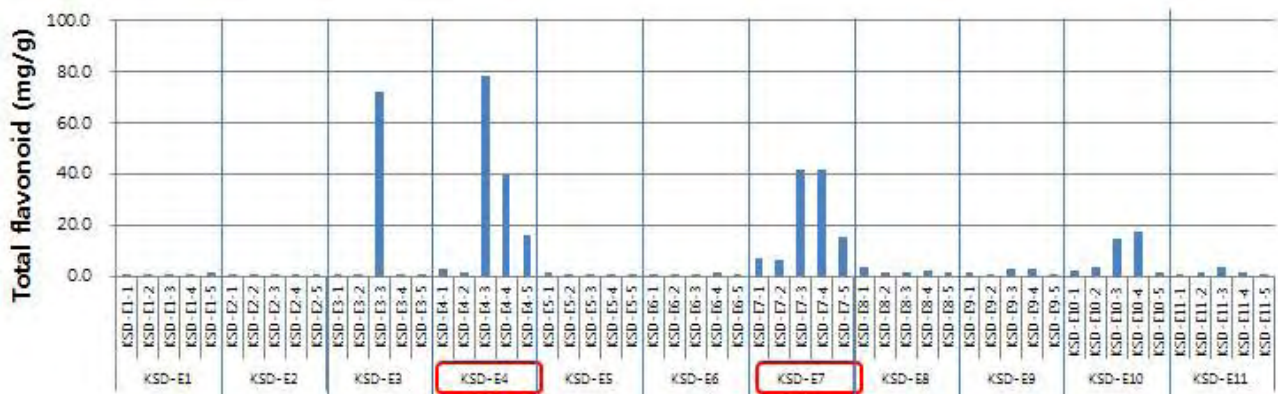


그림 3-1-12. 11종 시료의 에탄올 추출물 및 이의 분획물의 total sugar 함량

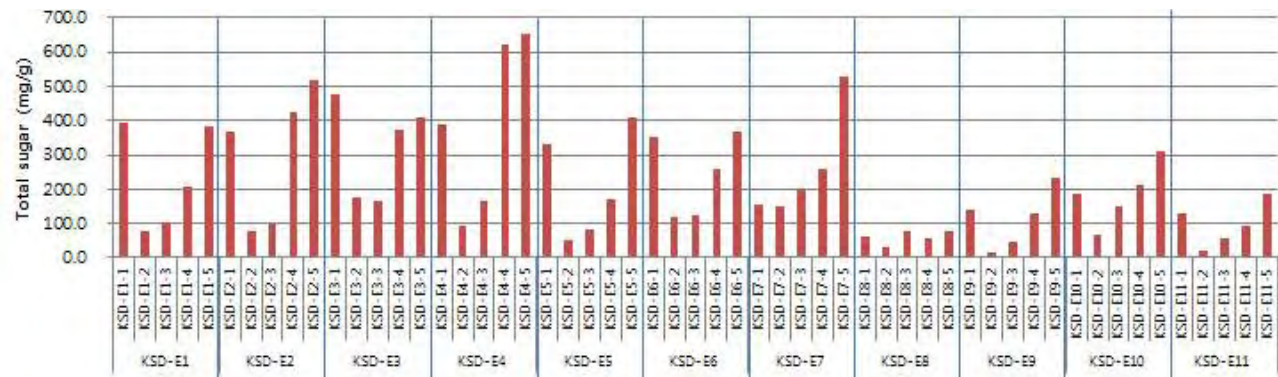
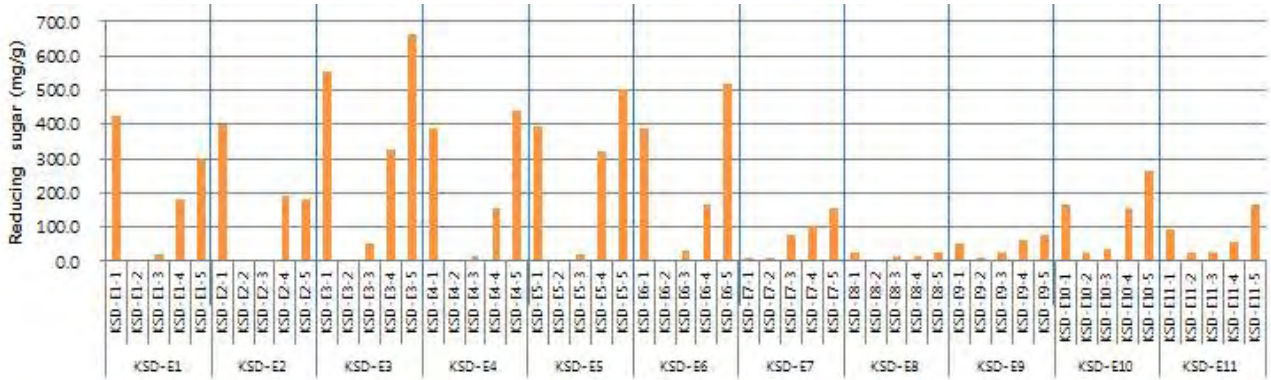


그림 3-1-13. 11종 시료의 에탄올 추출물 및 이의 분획물의 reducing sugar 함량

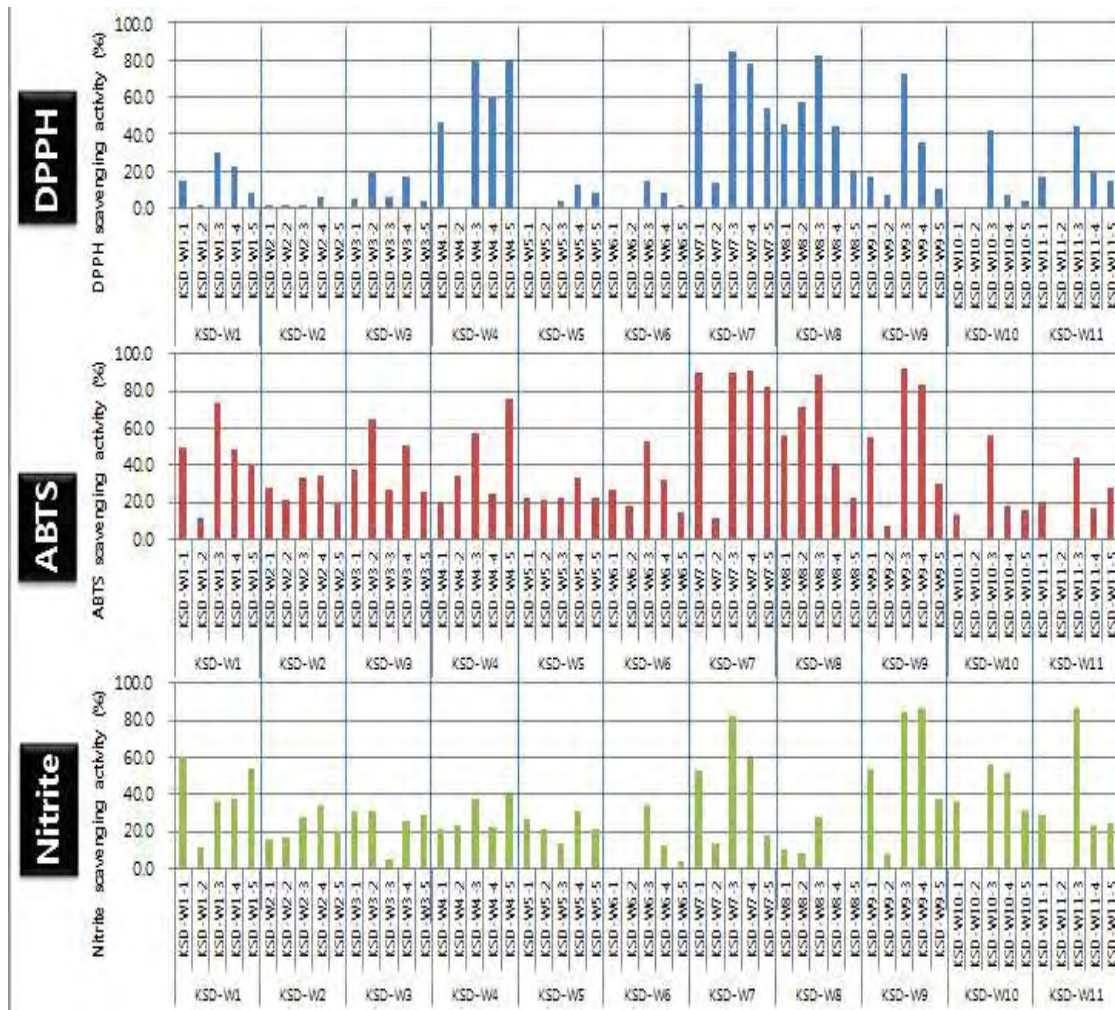


### 3. 제1세부과제 연구결과(다양한 주박 추출물 및 분획물의 생리활성 평가)

#### 가. 항산화 활성

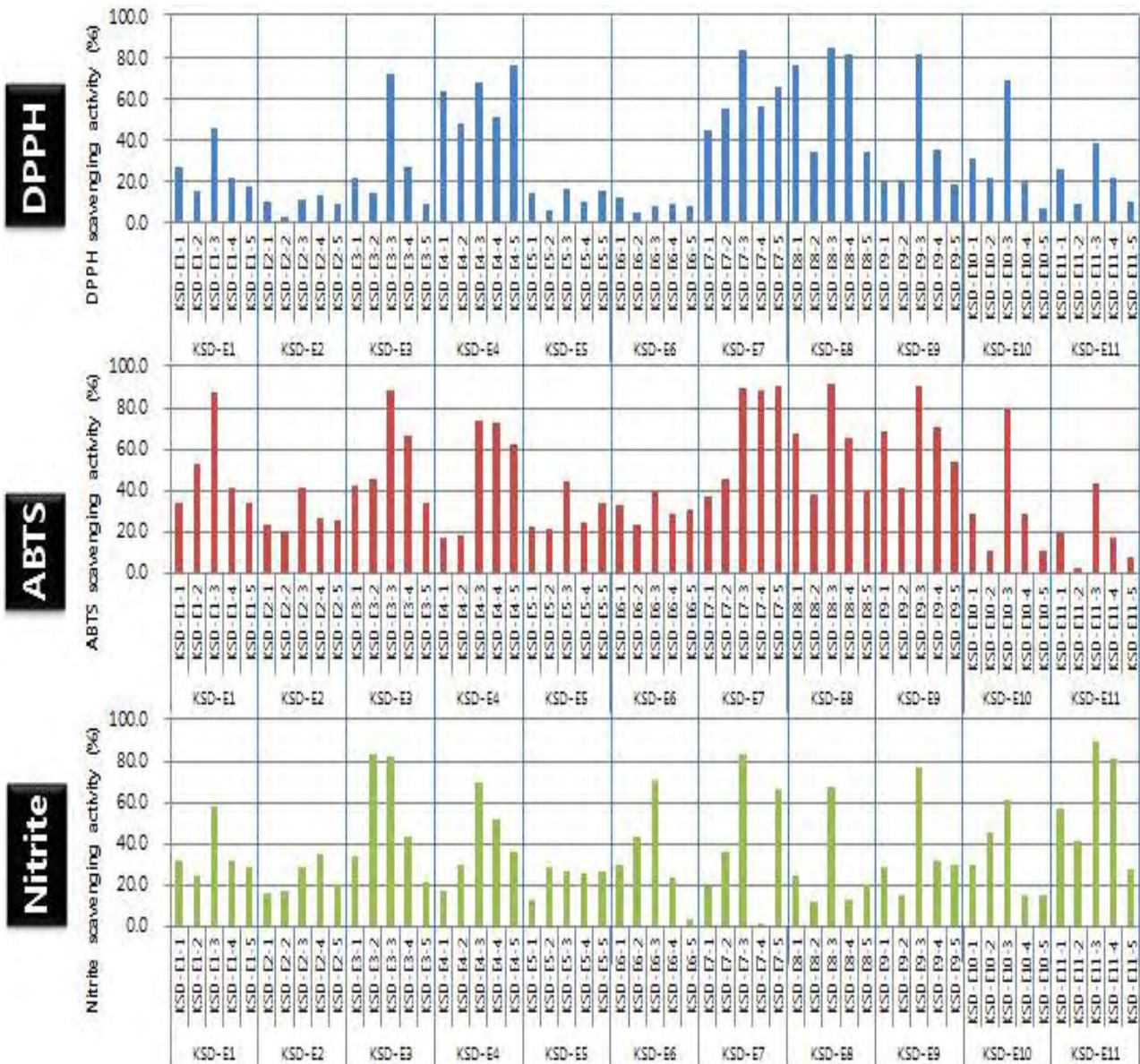
항산화 활성은 DPPH 음이온 소거능, ABTS 양이온 소거능, nitrite 소거능을 평가하였다. 각각의 평가 결과는 다음의 그림과 같다.

그림 3-1-14. 11종 시료의 열수 추출물 및 이의 분획물의 항산화 활성



전체적으로 55종 열수 추출물 및 분획물 중, 높은 항산화 활성은 백세주, 명작 복분자, 고구마 소주 주박에서 나타났으며, 국순당 누룩, 옛날 막걸리 누룩, 한방이화주 누룩에서 나타나 누룩에 의한 생리활성이 나타남을 추측할 수 있었다.

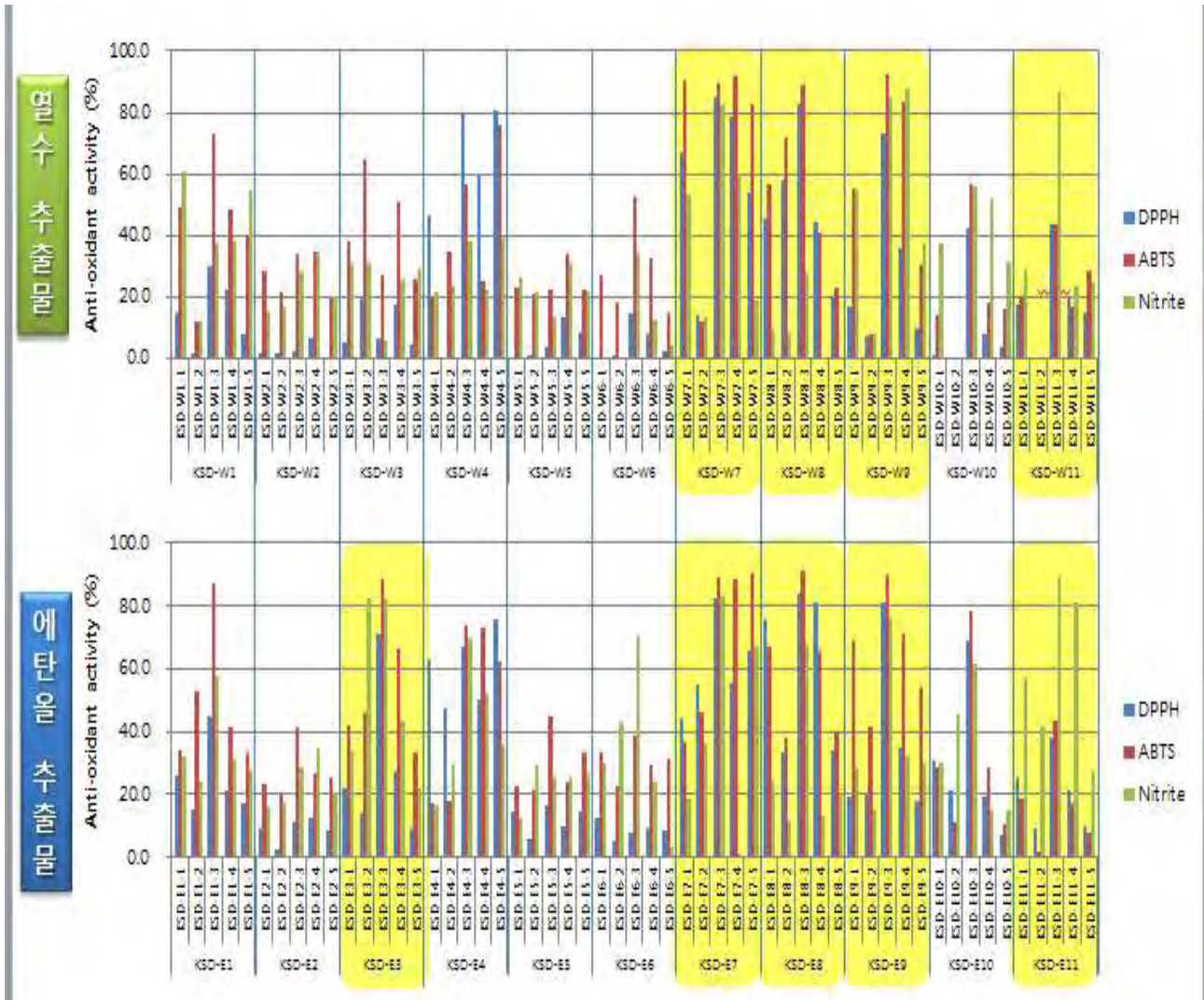
그림 3-1-15. 11종 시료의 에탄올 추출물 및 이의 분획물의 항산화 활성



전체적으로 에탄올 추출물의 경우, 열수 추출물보다 높은 항산화능을 나타내고 있으며, 55종 추출물 및 분획물 중 높은 항산화 활성은, 한방이화주, 백세주, 명작 복분자, 고구마 소주 주박에서 나타났으며, 국순당 누룩, 옛날 막걸리 누룩, 한방이화주 누룩의 에틸아세테이트 분획에서도 우수한 항산화 활성이 나타났다.

향장 제품 개발에 사용할 주박의 선정 및 활성 분획물을 선정하기 위해 항산화 활성을 전체적으로 평가하였으며, 그 결과 열수 추출물의 경우 명작복분자, 고구마 소주, 국순당 누룩 및 한방이화주 누룩의 추출물 및 분획물이 적합함을 확인하였으며, 에탄올 추출물의 경우, 한방이화주, 명작복분자, 고구마 소주, 국순당 누룩 및 한방이화주 누룩의 추출물 및 분획물이 적합함을 확인하였다.

그림 3-1-16. 향장 제품 개발에 사용할 주박의 선정 및 활성 분획물 선정 : 항산화 활성



나. 항혈전 활성

110 종 주박 추출물 및 분획물의 항혈전 활성은 트롬빈 타임, 프로트롬빈 타임, aPTT 및 인간 혈소판 응집저해 활성을 측정하여 평가하였다. 먼저 열수 추출물 및 에탄올 추출물의 항응고 활성을 평가한 결과는 다음과 같다.

열수 추출물 및 에탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획에서 강력한 항응고 활성이 나타났으며, 특히 옛날막걸리, 명작 복분자, 고구마 소주 및 한방이화주 누룩의 에틸아세테이트 분획은 15배 이상 혈전 생성을 지연시켜 상업적으로 사용되는 아스피린보다 우수함을 확인하였다. 또한 에탄올 추출물의 경우 상기의 활성 분획물 이외에도, 우국생, 한방이화주, 백세주, 신도주 등 모든 전통주 주박의 에탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획은 강력한 항응고 활성을 나타냄을 확인하였다. 특히 트롬빈 저해, 프로트롬빈 저해, 혈액응고 인자 저해 등의 저해 기작에 각기 다르게 나타나, 주박의 활성 분획물 및 활성물질은 향후 혈전성 질환 치료 및 혈전 생성 기작 연구에 중요한 소재로 이용될 수 있음을 확인하였다.



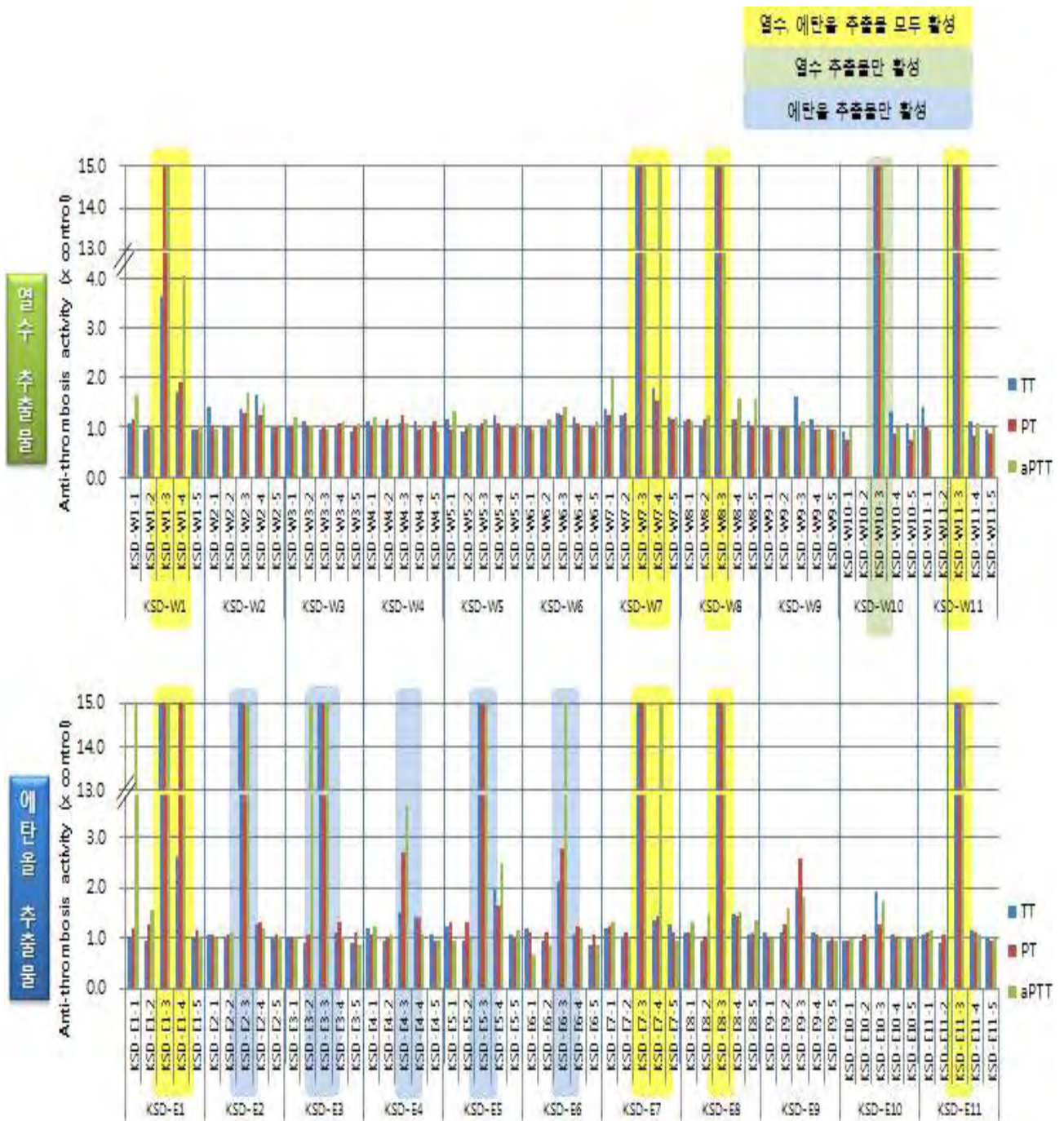
그림 3-1-17. 11종 시료의 열수 추출물 및 이의 분획물의 항응고 활성



그림 3-1-18. 11종 시료의 에탄올 추출물 및 이의 분획물의 항응고 활성



그림 3-1-19. 110종 시료의 항응고 활성 (트롬빈 타임, 프로트롬빈 타임, aPTT)



한편 110종 시료의 인간 혈소판 응집저해 활성 평가 결과는 다음과 같다. 열수 추출물의 경우 우국생 주박, 신도주 주박, 명작 복분자 주박, 고구마 소주 주박 및 3종 누룩에서 높은 응집저해 활성을 나타내었으며, 가장 높은 활성은 우국생 주박의 헥센 분획물에서 나타났다. 따라서 향후 우국생 주박은 신규의 항혈소판 제제로 개발 가능하리라 판단되며, 국순당 누룩의 에틸아세테이트 분획물에서도 강력한 활성이 나타났다. 그러나 한방이화주 누룩의 에틸아세테이트 분획물처럼 일부는 혈소판 응집 촉진 활성을 나타내기도 하였다.

그림 3-1-20. 11종 시료의 열수 추출물 및 이의 분획물의 인간 혈소판 응집 저해 활성

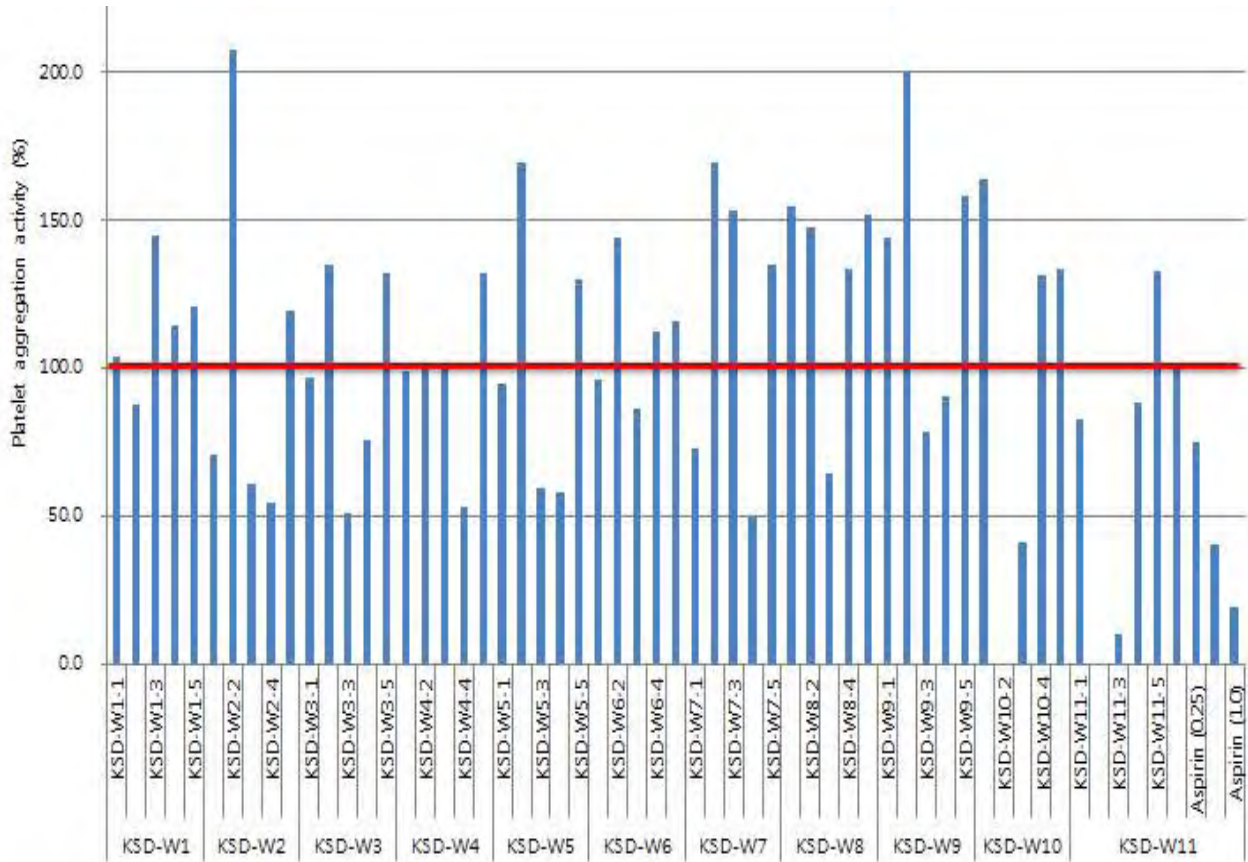
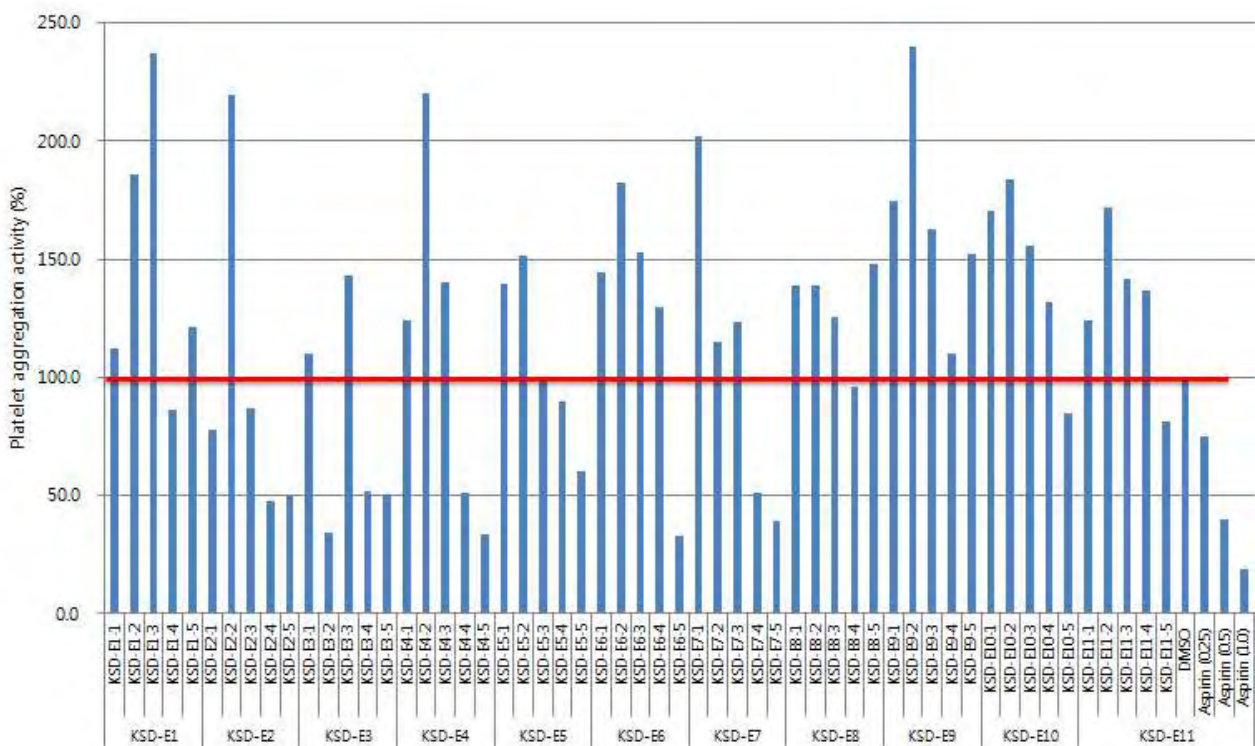


그림3-1-21. 11종 시료의 에탄올 추출물 및 이의 분획물의 인간 혈소판 응집 저해 활성

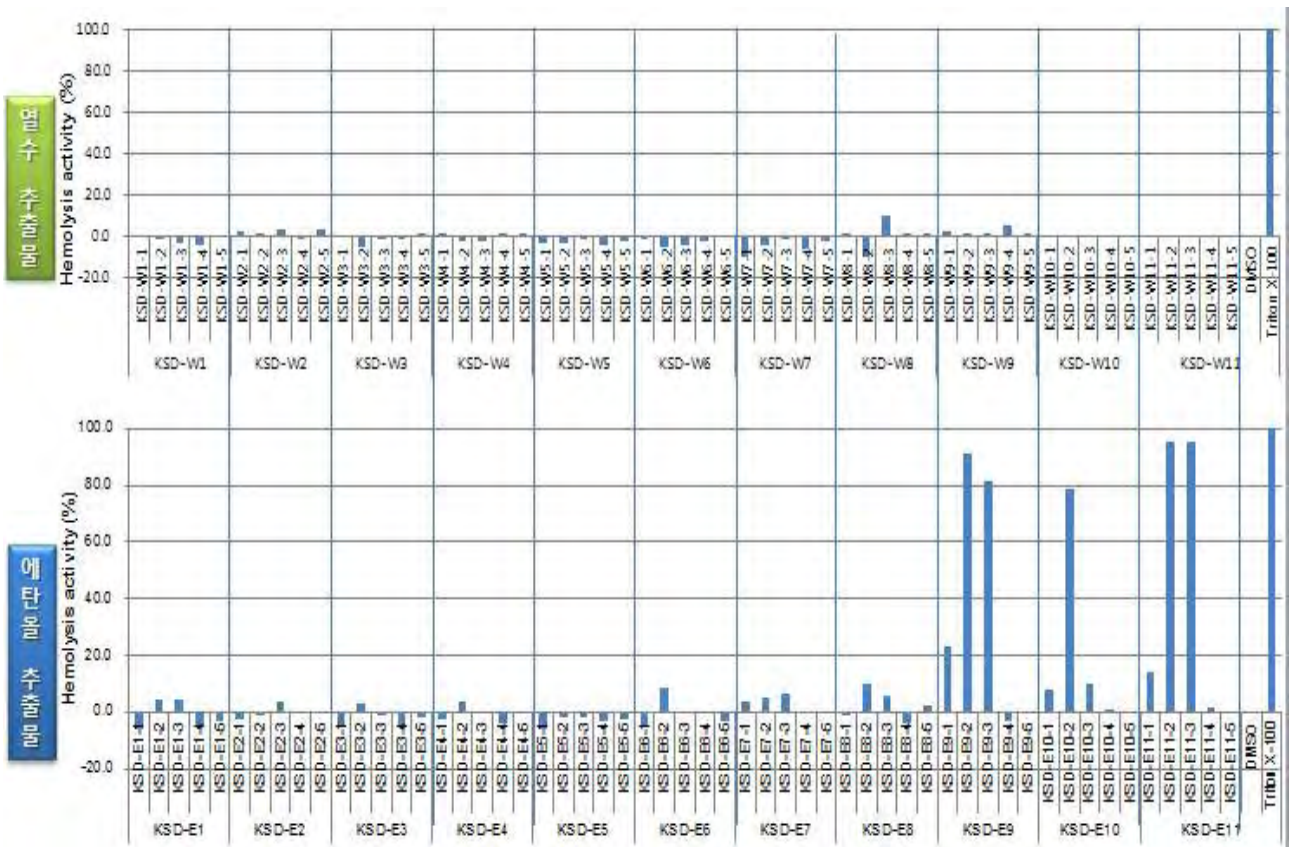


반면, 에탄올 추출물의 경우 옛날 막걸리 주박, 우국생 주박, 백세주 주박, 신도주 주박, 예담 주박 및 명작 복분자 주박, 고구마 소주 주박 등 거의 모든 시료에서 높은 혈소판 응집저해 활성을 나타내었으며, 가장 높은 활성은 국순당 누룩의 핵센 분획물, 우국생 주박의 에틸아세테이트 분획물, 백세주의 핵센 분획물에서 나타났다. 따라서 다양한 전통주 주박은 신규의 항혈소판 제제로 개발 가능하리라 판단되며, 항응고 및 혈소판 응집저해 활성이 모두 우수한 국순당 누룩, 백세주 및 우국생 주박은 혈전 생성방지 및 혈류 개선용 소재로 이용 가능성을 확인하였다.

#### 다. 인간 적혈구 용혈 활성

110 종 주박 추출물 및 분획물의 항혈전제로의 실제적 가능성 탐색의 일환으로 시료들의 인간 적혈구 용혈활성을 평가하였다. 그 결과, 3종 누룩의 에탄올 추출물에서는 인간 적혈구 용혈 활성이 나타남을 확인하였다. 따라서 향후 주박 추출물 및 활성분획물의 경우, 에탄올 추출물보다는 열수 추출물 사용이 바람직함을 알 수 있었다. 또한 상업적으로 추출물 및 활성 분획물을 조제시에도 열수 추출이 에탄올 추출보다 안전성, 경제성, 간편성에서 보다 효율적이므로, 향후 향장소재 개발시에도 열수 추출물 사용이 바람직하다.

그림 3-1-22. 110종 시료의 인간 적혈구 용혈 활성



라. 항세균 및 항진균 활성

110 종 주박 추출물 및 분획물을 대상으로 4종의 그람양성 세균 및 4종의 그람음성 세균을 대상으로 항세균 활성을 평가하였으며, 그 결과, 한방이화주, 복분자주, 고구마 소주 및 국순당 누룩에서 우수한 항균력을 나타냄을 확인하였다. 항세균 활성은 향후 화장품 향장소재 개발시 참고자료로 활용될 것이다.

표 3-1-4. 110종 시료의 항세균 활성 (Disc diffusion)

Clear zone (mm) – Conc. 500ug/disc										Clear zone (mm) – Conc. 500ug/disc													
주박/누룩	분획	Gram positive					Gram negative					주박/누룩	분획	Gram positive					Gram negative				
		S.a	B.s	Lm	S.e	P.v	Ec	Pa	St	S.a	B.s			Lm	S.e	P.v	Ec	Pa	St				
옛날막걸리	Extract	-	-	-	-	-	-	-	-	-	복분자주	Extract	-	-	-	-	-	-	-	-			
	H fr.	-	-	-	-	-	-	-	-	H fr.		-	-	-	-	-	-	-	-				
	EA fr.	9	12	-	-	9	-	-	-	EA fr.		9.5	-	16.0	16.0	-	-	-	-				
	B fr.	-	9.5	-	-	-	-	-	-	B fr.		8.0	-	10.0	9.0	-	-	-	-				
	W res.	-	-	-	-	-	-	-	-	W res.		-	-	-	-	-	-	-	-				
우국생	Extract	-	-	-	-	-	-	-	-	고구마	Extract	-	-	-	-	-	-	-	-				
	H fr.	-	-	-	-	-	-	-	-		H fr.	-	8.0	-	-	-	-	-	-				
	EA fr.	-	-	-	-	-	-	-	-		EA fr.	9.0	10.0	10.0	-	14.0	-	11.0	7.0				
	B fr.	-	-	-	-	-	-	-	-		B fr.	-	-	-	-	-	-	-	-				
	W res.	-	-	-	-	-	-	-	-		W res.	-	-	-	-	-	-	-	-				
한방이화주	Extract	-	-	-	-	-	-	-	-	국순당누룩	Extract	-	13.5	9.0	-	-	-	-	-				
	H fr.	-	-	-	-	-	-	-	-		H fr.	-	14.0	13.0	8.0	-	-	-	-				
	EA fr.	10	10	20	11	-	-	-	-		EA fr.	-	15.0	10.5	10.0	12.0	-	-	-				
	B fr.	-	-	-	-	-	-	-	8		B fr.	-	12.0	-	-	9.5	-	-	-				
	W res.	-	-	-	-	-	-	-	8		W res.	-	7.0	-	-	-	-	-	-				
백세주	Extract	-	-	-	-	-	-	-	-	옛날막걸리	Extract	-	10.0	-	-	-	-	-	-				
	H fr.	-	-	-	-	-	-	-	-		H fr.	-	7.0	-	-	-	-	-	-				
	EA fr.	-	-	-	-	-	-	-	-		EA fr.	-	10.0	-	-	-	-	-	-				
	B fr.	-	-	-	-	-	-	-	-		B fr.	-	-	-	-	-	-	-	-				
	W res.	-	-	-	-	-	-	-	-		W res.	-	-	-	-	-	-	-	-				
신도주	Extract	-	-	-	-	-	-	-	-	한방이화주	Extract	-	7.0	-	-	-	-	-	-				
	H fr.	-	-	-	-	-	-	-	-		H fr.	-	-	-	-	-	-	-	-				
	EA fr.	-	12	-	-	-	-	9	-		EA fr.	-	9.0	-	-	-	-	-	-				
	B fr.	-	9	-	-	8	-	-	-		B fr.	-	-	-	-	-	-	-	-				
	W res.	-	-	-	-	-	-	-	-		W res.	-	-	-	-	-	-	-	-				
예담	Extract	-	-	-	-	-	-	-	-	Amp. (1ug/disc)	18.0	25.0	32.0	18.0	9.0	10.0	26.0	11.0					
	H fr.	-	-	-	-	-	-	-	-														
	EA fr.	9.0	11.0	-	-	-	-	-	-														
	B fr.	-	-	-	-	-	-	-	-														
	W res.	-	-	-	-	-	-	-	-														

한편 각각의 시료에 대한 Microbroth dilution 법을 이용하여 항균력의 정도를 평가하였으며, 그 결과, *Staphylococcus epidermidis* 및 *Proteus vulgaris* 와 같은 피부 상재균 및 알러지 관련균에 항균 활성이 우수함을 확인하였다.

표 3-1-5. 110종 시료의 항세균 활성 (Microbroth dilution)

사용 균주	Conc. 500 ug/ml	Relative growth (%)												
		80% EtOH ex.						Hot water ex.						
		예담	한방이화주	옛날막걸리	신도주	우국생	백세주	예담	한방이화주	옛날막걸리	신도주	우국생	백세주	
Gram (+)	S.a	Extract	89.8	168.3	295.6	81.0	182.9	136.5	134.0	143.2	131.1	147.0	149.9	99.4
		H fr.	263.5	286.8	216.7	273.1	271.4	109.8	326.1	200.4	134.0	180.8	358.2	173.7
		EA fr.	128.2	61.4	215.4	68.9	134.0	79.7	290.2	149.9	199.2	179.1	132.8	410.4
		B fr.	87.3	133.2	137.4	82.7	121.9	94.4	91.0	137.8	144.5	161.6	141.1	129.4
		W res.	140.3	142.4	107.7	113.2	138.6	110.6	148.2	156.2	186.6	160.3	117.3	129.4
		control	101.0	99.0	0.0	0.0	100.0							
	B.s	Extract	68.2	95.9	65.2	58.1	49.2	55.6	101.6	96.1	107.1	73.7	91.1	76.7
		H fr.	135.5	137.3	129.5	106.4	122.9	30.4	134.1	49.0	95.4	46.9	63.4	75.1
		EA fr.	79.4	40.5	67.5	95.0	55.6	87.6	47.1	98.6	84.4	89.5	89.0	75.7
		B fr.	51.5	109.6	109.2	78.0	73.9	90.4	68.6	111.7	100.9	83.5	111.9	81.2
		W res.	97.9	100.0	101.1	108.5	103.2	117.2	105.5	89.0	146.0	90.4	96.1	107.6
		control	102.1	96.6	101.4	0.0	100.0							
	S.e	Extract	86.4	128.4	88.3	76.9	89.6	82.0	128.1	138.5	128.4	128.7	121.1	134.7
		H fr.	53.4	58.2	58.5	67.0	69.0	68.3	53.4	56.9	88.0	71.2	56.6	105.2
		EA fr.	78.2	98.8	72.4	84.5	64.2	88.3	64.2	77.2	81.3	88.3	109.9	94.4
		B fr.	88.3	117.3	95.0	106.8	85.8	98.5	112.5	99.1	111.2	106.1	96.6	130.9
		W res.	124.6	133.1	116.3	115.0	123.0	104.5	125.2	140.1	150.0	103.0	164.9	137.6
		control	108.0	97.9	94.1	0.0	100.0							

Microbroth 100ul scale	500ug/ml	Relative growth (%)												
		80% EtOH ex.						Hot water ex.						
		예담	한방이화주	옛날막걸리	신도주	우국생	백세주	예담	한방이화주	옛날막걸리	신도주	우국생	백세주	
Gram (-)	P.v	Extract	0.3	115.8	109.7	110.3	79.0	88.6	32.0	41.6	123.0	115.5	117.0	105.2
		H fr.	13.6	84.7	97.4	94.4	98.9	111.5	81.1	63.6	122.4	65.1	64.2	73.6
		EA fr.	4.2	28.6	0.6	4.2	1.8	10.6	96.2	61.5	19.0	68.1	103.7	79.9
		B fr.	108.8	121.8	47.9	80.5	114.3	130.5	110.3	97.1	85.6	79.0	99.8	96.2
		W res.	111.2	122.4	83.2	93.2	110.3	98.0	108.8	110.6	120.0	102.8	114.6	59.4
		control	101.0	99.5	99.5	0.0	100.0							
	E.c	Extract	97.7	104.9	101.6	94.2	97.7	101.6	104.2	99.1	99.2	91.8	88.4	106.1
		H fr.	96.7	104.2	120.2	116.1	113.1	113.5	109.4	112.4	96.7	102.0	101.3	88.1
		EA fr.	125.0	114.0	109.9	108.0	107.1	87.4	110.7	99.1	106.8	102.5	87.2	107.5
		B fr.	100.9	109.2	106.1	98.2	109.4	108.5	102.0	103.9	105.2	101.8	91.5	102.8
		W res.	106.8	107.6	109.4	107.6	105.1	107.8	112.6	104.2	118.8	97.5	102.8	85.8
		control	98.0	102.0	0.0	0.0	100.0							
	P.a	Extract	111.4	90.2	88.6	94.6	89.3	98.9	84.7	87.1	79.2	83.5	94.4	109.0
		H fr.	121.6	107.6	122.8	116.0	116.9	119.2	96.8	102.0	88.1	97.7	105.9	79.0
		EA fr.	129.5	102.5	103.3	111.4	103.3	76.5	104.0	92.9	88.3	83.1	90.8	90.3
		B fr.	99.6	101.5	95.1	96.3	93.1	92.4	120.4	115.7	91.9	92.7	90.0	84.2
		W res.	96.2	101.3	102.3	97.0	102.1	98.7	135.0	147.3	123.4	102.7	127.1	117.0
		control	100.3	99.7	0.0	0.0	100.0							
	S.t	Extract	156.7	192.3	212.7	79.5	223.3	130.0	107.3	123.4	180.6	146.9	123.4	133.6
		H fr.	136.7	93.2	117.1	101.4	181.7	94.8	106.1	93.6	106.5	81.5	113.6	197.8
		EA fr.	125.7	90.5	82.6	89.3	90.1	76.0	70.9	92.0	179.8	93.2	101.8	158.2
		B fr.	84.6	106.5	230.3	74.8	84.2	158.2	76.4	106.5	129.7	150.8	83.0	119.5
		W res.	103.0	105.0	103.4	103.4	92.4	99.9	129.3	117.5	139.1	112.8	117.5	172.0
		control	117.9	91.3	90.9	2.7	100.0							

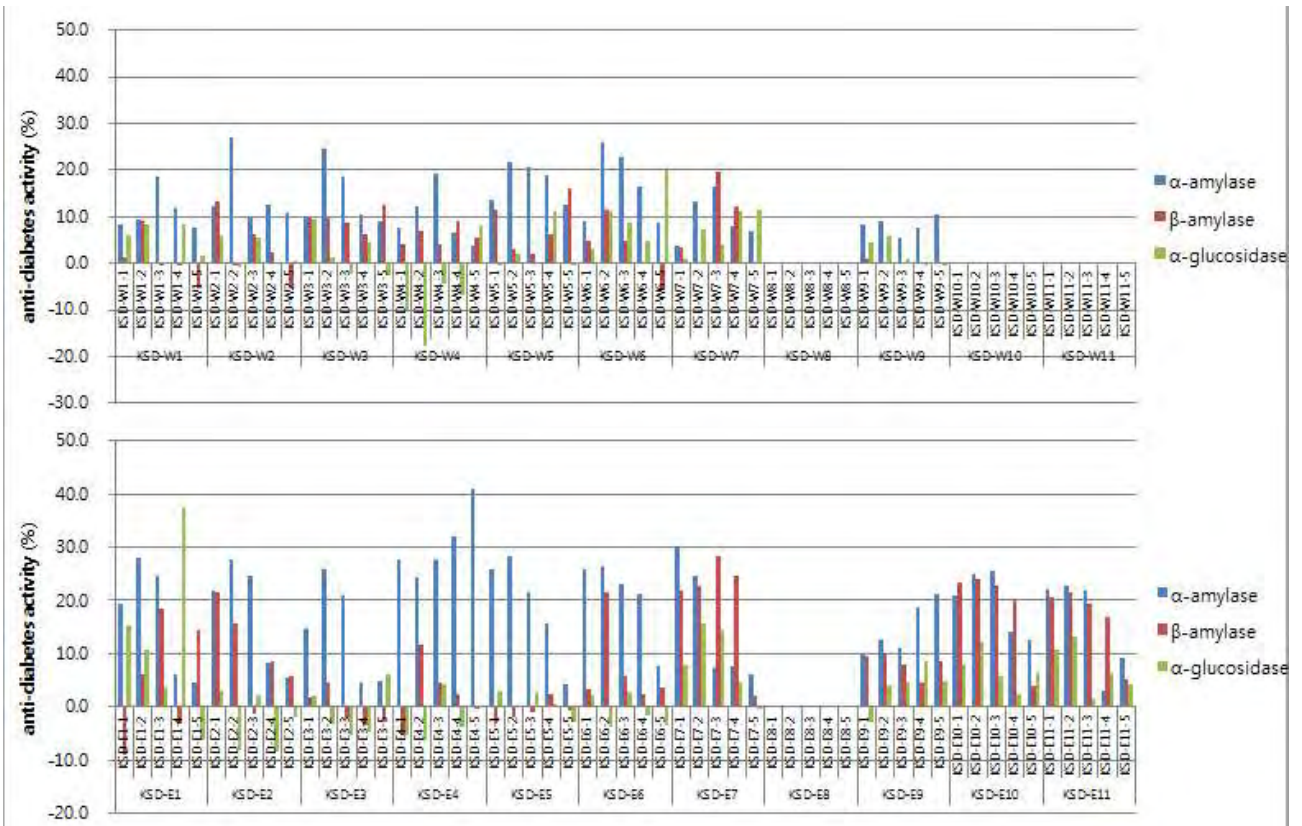
Microbroth 100ul scale	Conc. 500ug/ml	Relative growth (%)												
		80% EtOH ex.						Hot water ex.						
		예담	한방이화주	옛날막걸리	신도주	우국생	백세주	예담	한방이화주	옛날막걸리	신도주	우국생	백세주	
Yeast	S.c	Extract	121.3	66.8	32.0	96.5	72.0	116.9	99.9	117.1	55.5	79.8	101.2	129.6
		H fr.	121.5	104.1	116.0	136.1	98.8	95.3	134.9	57.2	71.4	72.9	115.0	102.6
		EA fr.	97.8	104.3	97.0	120.0	113.1	118.7	79.4	53.0	36.4	58.8	74.3	103.2
		B fr.	116.0	80.6	106.0	92.4	77.3	72.9	86.9	75.6	79.0	90.1	106.0	108.5
		W res.	74.8	72.3	94.9	80.0	97.0	89.4	104.9	109.7	94.7	116.2	87.7	86.9
		control	97.8	102.2	0.0	0.0	100.0							
	C.a	Extract	104.2	91.1	80.2	102.7	91.2	106.2	107.6	101.8	86.4	93.0	106.6	112.6
		H fr.	111.5	91.8	118.2	107.2	117.6	103.2	125.1	114.2	87.9	102.3	118.2	109.2
		EA fr.	105.7	88.4	82.5	82.5	78.7	104.8	100.9	63.8	98.4	98.2	79.0	95.6
		B fr.	90.0	95.6	93.8	97.3	96.5	80.3	106.4	86.6	73.1	98.8	103.9	103.5
		W res.	100.1	86.4	98.3	93.5	102.0	95.0	107.6	103.4	99.8	107.9	109.2	109.8
		control	98.0	102.0	0.0	0.0	100.0							

또한 항진균 활성을 나타내는 경우는 주로 한방이화주 주박, 옛날 막걸리 주박 및 신도주 주박에서 확인되었다.

마. 전분분해효소 억제 활성

110 종 주박 추출물 및 분획물의 *in-vitro* 전분분해효소 억제 활성을 평가하였으며, 그 결과 백세주 및 명작 복분자주 주박에서 양호한 활성이 나타났으며, 옛날 막걸리 주박의 에탄올 추출물의 부탄올 분획물에서 가장 강력한 glucoamylase 저해활성이, 백세주 주박의 에탄올 추출물의 물 잔류물에서 가장 강력한  $\alpha$ -amylase 저해활성이 확인되었다. 이러한 결과는 다양한 주박 추출물 및 활성분획물이 전분분해효소 억제제로 개발 가능성을 제시하고 있다.

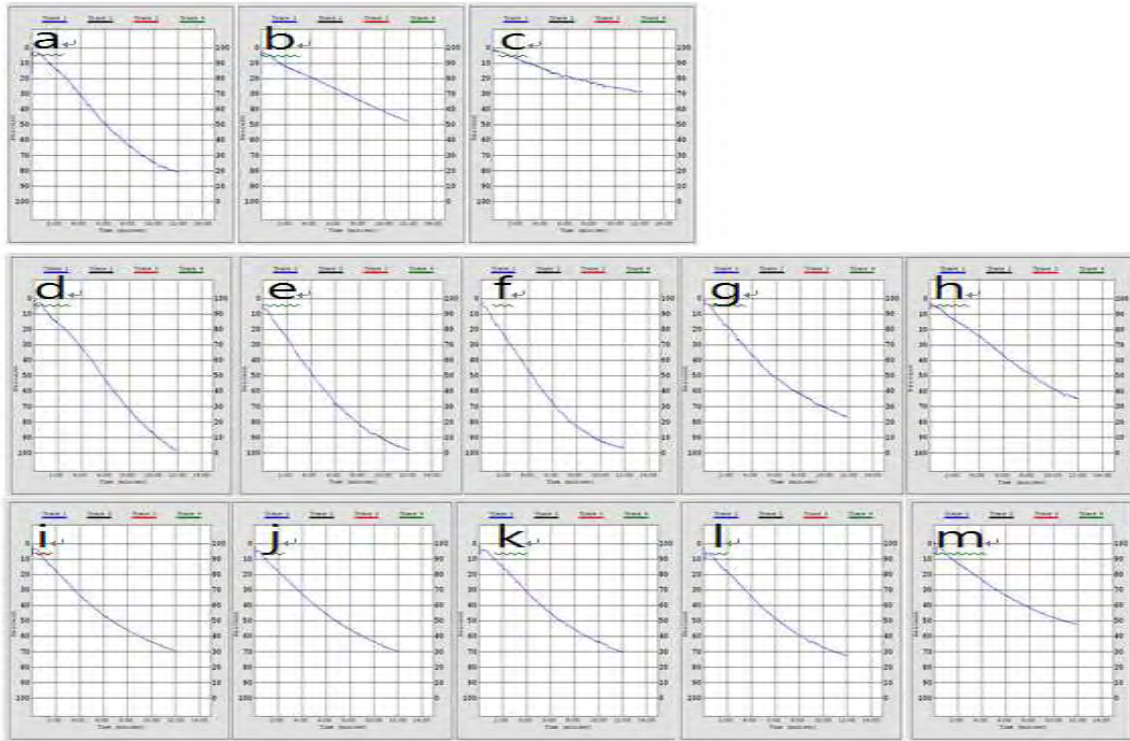
그림 3-1-23. 110종 시료의 *in-vitro* 전분분해효소 억제 활성



바. 다양한 주박으로부터 개별 활성 평가 및 주박 선정

추가로 제조된 주박 추출물을 이용한 항혈전 활성을 혈액응고저해, 혈소판 응집저해, 인간 적혈구 용혈 활성 등을 평가하였다. 그 결과 우국생 및 백세주 주박에서 양호한 항혈전 활성을 확인하였으며, 특히 우국생 주박에서 아스피린에 필적하는 혈소판 응집저해 활성을 확인하였다.

그림 3-1-24. Diagrams of impedance changes during platelet aggregation after addition of aspirin and the extracts prepared from 5 different lees of Korean traditional wine in whole blood aggregometer.



(a) DMSO, (b) aspirin (0.25 mg/ml), (c) aspirin (0.5 mg/ml), (d)~(h) ethanol extract of J-B, J-S, J-Y, J-H and J-W, and (i)~(m) hot water extract of J-B, J-S, J-Y, J-H and J-W, respectively. Platelet aggregation was induced by addition of 2.5  $\mu$ l of collagen (1 mg/ml) into cuvette containing 50  $\mu$ l of washed PRP and measured the impedance changes for 12 min.

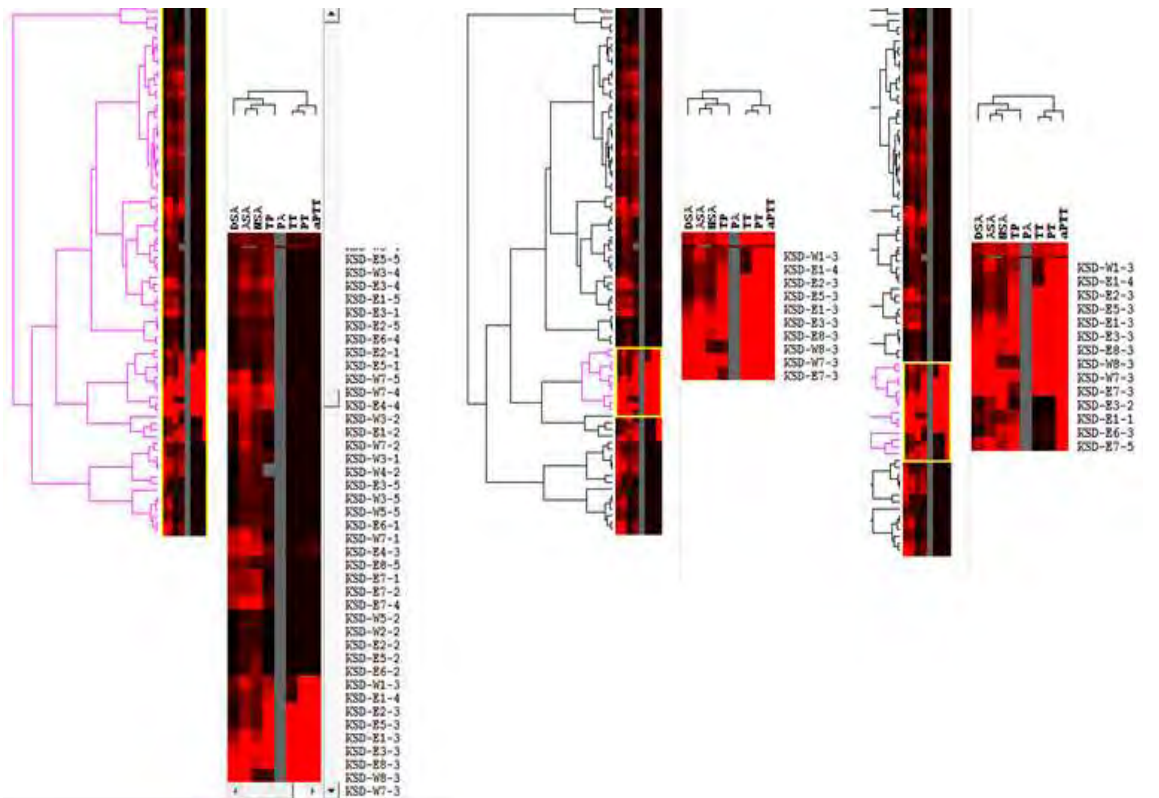
상기 연구결과는 다양한 약주 및 탁주 주박이 항혈전 활성을 가지고 있으며, 활성물질 정제를 통해 주박으로부터 항혈전제 개발이 가능함을 제시하고 있다. 이후 개별 주박 추출물의 활성 분획물을 대상으로 각각의 활성기전 및 핵심 활성물질을 탐색하였다.

#### 사. 주박 향장소재 개발을 위한 최종 선정

다양한 생리활성이 모두 우수하면서도, 향장제품 소재로 적합한 주박 및 이의 활성 분획물을 선정하고, 또한 관련 활성의 key molecule을 확인하기 위해, 기존의 결과에서의 다양한 생리활성을 수치화하고 이를 clustering 하여 최종적으로 명작 복분자, 옛날 막걸리, 우국생 및 백세주 주박의 에탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물을 선정하였다. 이 분석 결과는, treeview로 나타내었으며, 실제적 상업화를 위해 향산화와 항혈전 활성이 우수한 시료를 우선적으로 선정하였다(고구마 소주 주박의 대량 조제하였으나, 실제적 생산량이 미미하여 최종 key molecule 확인 단계에서는 제외함).



그림 3-1-25. 항산화 및 항혈전이 모두 우수한 시료



아. 주박 향장소재 개발을 위한 5종 주박의 활성 분획물 대량 조제

유용 생리활성의 Key molecule 분리 및 확인을 위해 하기 시료를 대량으로 제조함. 이때 시료는 20 ~ 50 kg의 주박을 사용하여, 에탄올 추출물을 조제하고, 이후 상기에서 설명한 활성분획물을 조제하고, 이를 silica-gel chromatography, Preparative HP-TLC를 수행하고, 활성물질들을 HPLC-MS, GC-MS를 사용하여 분석함.

표 3-1-6. 대량 추출 효율 및 최종 활성 분획물의 회수율

구분	에탄올 추출효율 (%)	Hexane 및 Ethylacetate 분획	분획효율 (%) Hexane/Ethyl acetate	최종 회수율 (g/100g)
옛날 막걸리	8.56	E1-2/E1-3	6.94 / 3.47	0.59 / 0.30
우국생	6.62	E2-2/E2-3	9.69 / 2.06	0.64 / 0.14
백세주	7.02	E4-2/E4-3	13.30 / 1.15	0.93 / 0.11
명작복분자주	3.70	E7-2/E7-3	15.1 / 8.7	0.56 / 0.32
고구마 소주	2.21	E8-2/E8-3	18.7 / 4.9	0.41 / 0.11

자. 주박으로부터 유용 핵심활성물질 탐색

(1) 우국생 ethanol 추출물의 ethylacetate의 조정제 및 활성분획 정제

Silica-gel chromatography: Silica-gel 60 (0.063-0.2 mm, 70-230 mesh) 200g을 open column에 packing 한 후, KSD-E2-3 시료 10 을 Loading 한 후, methylene chloride: methanol을 유출용매(10:0 ~ 0: 100)로 하여, 조정제 하였다.

그림 3-1-26. 우국생 ethanol 추출물의 ethylacetate의 조정제 및 활성분획 정제

구분	Elution (MC:M)	회수율 (%)
E2-3-1	10:0	6.8
E2-3-2	9:1	46.1
E2-3-3	8:2	9.0
E2-3-4	6:4	33.8
E2-3-5	4:6	4.2
E2-3-6	2:8	0.2

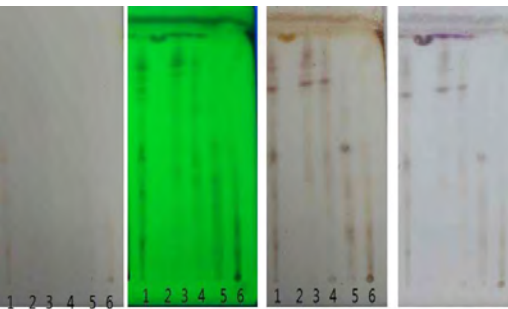


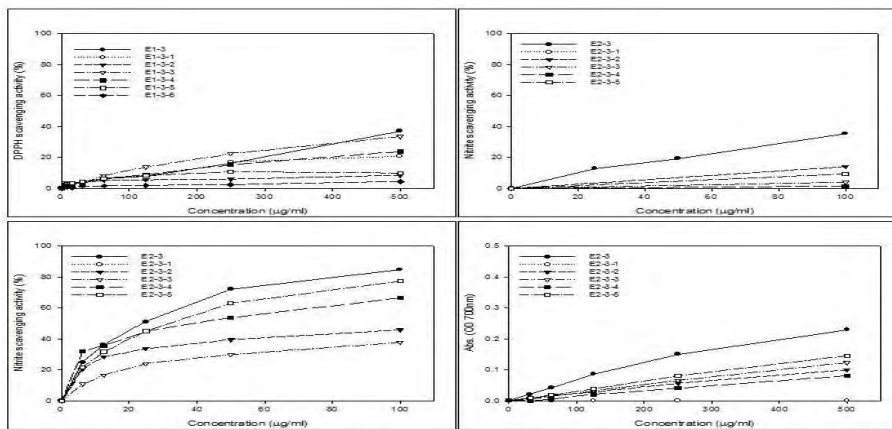
표 3-1-7. 우국생 활성 소분획의 항혈전 활성 평가

구분	Conc. (mg/ml)	Anti-thrombosis activity (x control)		
		TT	PT	aPTT
E2-3	5	>15.0	>15.0	>15.0
	2.5	3.1±0.1	>15.0	>15.0
	1.25	1.1±0.1	1.3±0.1	1.3±.1
E2-3-1	2.5	1.0±0.0	1.0±0.0	1.1±0.0
E2-3-2	2.5	1.2±0.0	1.2±0.1	1.1±0.0
E2-3-3	2.5	>15.0	>15.0	>15.0
	1.25	1.4±0.2	1.2±0.1	1.0±0.0
E2-3-4	2.5	1.1±0.1	1.1±0.1	1.2±0.0
E2-3-5	5	>15.0	-	-
	2.5	1.9±0.0	1.0±0.1	1.2±0.0
DMSO	-	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0
Aspirin	1.5	1.7±0.1	1.8±0.1	1.8±0.0

KSD-E2-3의 경우 최소 2종 이상의 항응고 활성물질(KSD-E2-3-3, KSD-E2-3-5)이 포함되어 있으며, KSD-E2-3-3의 경우 주요 핵심 활성물질을 포함하고 있는 것으로 확인되었다. 우국생의 KSD-3-3 활성분획을 이용한 항비만, 다이어트, 중금속 제거용 이너뷰티 제품을 생산하고자 계획하였다.

표 3-1-8. 우국생 활성 소분획의 항산화 활성 평가

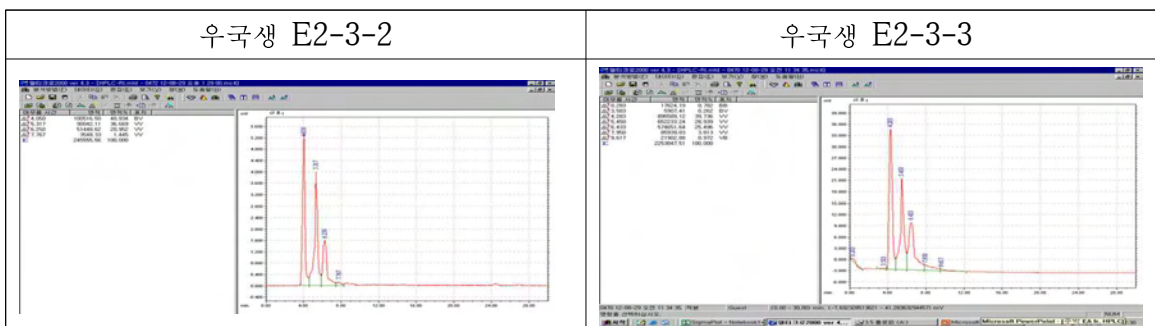
구분	항산화 활성			
	DPPH 소거능	ABTS 소거능	Nitrite 소거능	Reducing power(λ600nm)
E2-3	11.1	41.3	28.5	0.1220
E2-3-1	-1.5	-5.1	-6.8	0.0000
E2-3-2	12.4	45.9	14.1	0.1000
E2-3-3	15.0	37.8	4.1	0.1240
E2-3-4	15.4	66.5	1.5	0.0820
E2-3-5	13.7	77.4	9.4	0.1460
E1-3-6	5.5	16.5	3.5	0.0120

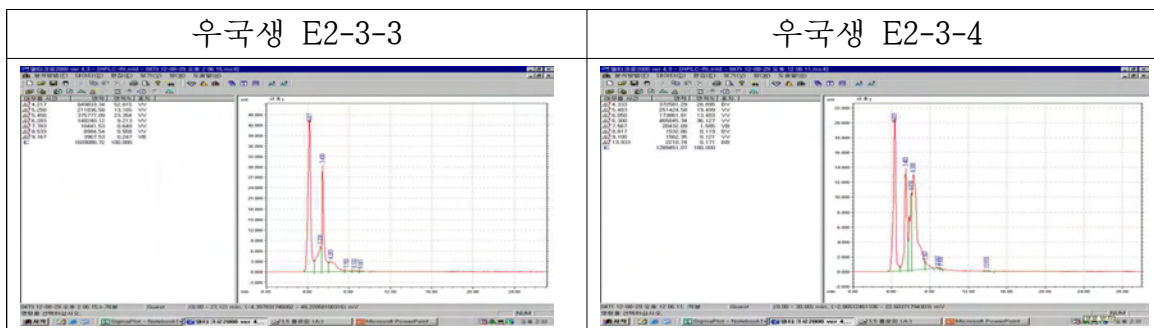


KSD-E2-3 분획의 경우, 항비만, 다이어트, 혈행 개선 활성은 주로 KSD-E2-3-3 분획에서 나타나며, 항산화 활성은 KSD-E2-3-4 및 KSD-E2-3-5 분획에서 가장 강력하다.

(2) HPLC분석에 의한 활성물질 정제

우국생 ethanol 추출물의 ethylacetate 분획의 Silica-gel chromatography 소분획의 HPLC분석결과 우국생 E2-3-4를 이용하여 추가 정제 실시키로 하였다 (HPLC 분석조건: Shimadzu Co., Dual Pump, 75% acetonitrile, Detector : UV 254 nm, flow : 0.5 ml/min, Column C18 chromosil. 30C).





(3) 옛날 막걸리 ethanol 추출물의 ethylacetate의 조정제 및 활성분획 정제

Silica-gel chromatography: Silica-gel 60 (0.063-0.2 mm, 70-230 mesh) 200g을 open column에 packing 한 후, E1-3 시료 10 을 Loading 한 후, methylene chloride: methanol을 유출용매(10:0 ~ 0: 100)로 하여, 조정제하였다.

그림3-1-27. 옛날 막걸리 ethanol 추출물의 ethylacetate의 조정제 및 활성분획 정제

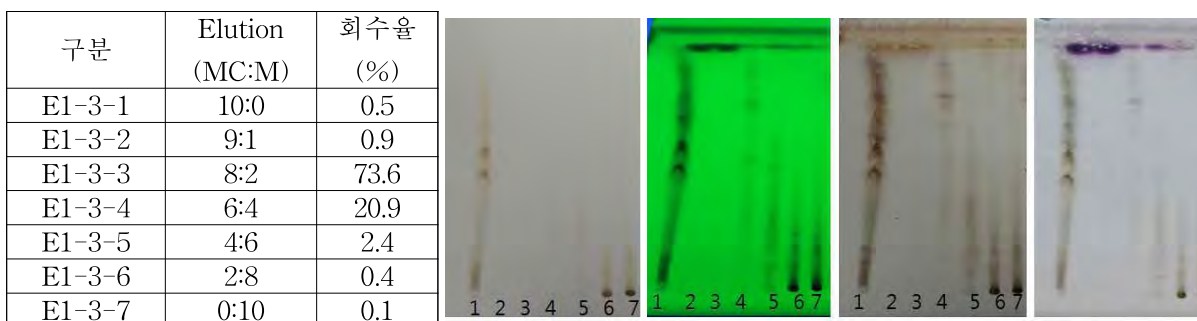


표 3-1-9. 옛날 막걸리 활성 소분획의 항혈전 활성 평가

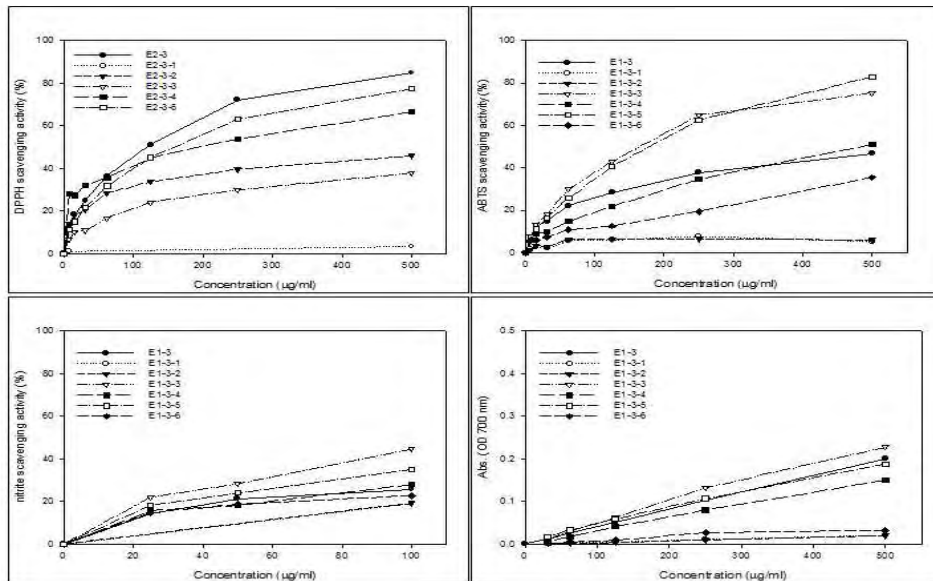
구분	Conc. (mg/ml)	Anti-thrombosis activity (x control)		
		TT	PT	aPTT
E1-3	5	>15.0	>15.0	>15.0
	2.5	4.3±0.1	>15.0	>15.0
	1.25	1.2±0.0	1.6±0.2	1.1±0.1
E1-3-1	2.5	1.0±0.1	1.0±0.0	1.1±0.1
E1-3-2	2.5	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0
E1-3-3	5.0	>15.0	>15.0	>15.0
	2.5	1.1±0.0	1.0±0.0	1.1±0.1
E1-3-4	5.0	>15.0	>15.0	>15.0
	2.5	1.2±0.2	1.1±0.2	1.4±0.1
E1-3-5	6.0	>15.0	>15.0	>15.0
	5.0	>15.0	3.3±0.1	>15.0
	2.5	>15.0	1.6±0.2	>15.0
	1.25	2.7±0.1	-	2.1±0.1
E1-3-6	ND	-	-	-
E1-3-7	1.5	12.2	4.6	0.0210
DMSO	-	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0
Aspirin	1.5	1.7±0.1	1.8±0.1	1.8±0.0

KSD-E1-3의 경우 최소 3종 이상의 항응고 활성물질(KSD-E1-3-3, KSD-E1-3-4, KSD-E1-3-5)이 포함되어 있음. KSD-E1-3-3의 경우 5.0mg/ml 농도에서 무한대로 혈전생성이 억제됨(>15.0). KSD-E1-3-4의 경우 5.0mg/ml 농도에서 무한대로 혈전생성이 억제됨

(>15.0). E1-3-5의 경우 2.5mg/ml 농도에서 TT, aPTT 활성이 우수하며(>15.0), 6.0mg/ml 농도에서 PT 활성이 우수(>15.0)하여 실제적 이용가능성이 매우 높음. 특히 KSD-E1-3의 경우 제 2세부에서 항성장 활성이 매우 강력함을 확인하였다.

표 3-1-10. 옛날 막걸리 활성 소분획의 항산화 활성 평가

구분	항산화 활성			
	DPPH 소거능	ABTS 소거능	Nitrite 소거능	Reducing power(&00nm)
E1-3	37.0	46.6	25.7	0.2000
E1-3-1	20.8	5.3	19.1	0.0210
E1-3-2	8.5	6.0	19.3	0.0200
<b>E1-3-3</b>	<b>33.7</b>	<b>75.2</b>	<b>44.6</b>	<b>0.2280</b>
E1-3-4	23.9	51.1	28.0	0.1500
E1-3-5	10.0	82.9	35.1	0.1880
E1-3-6	4.6	35.5	22.8	0.0330
E1-3-7	1.5	12.2	4.6	0.0210



(4) 백세주 ethanol 추출물의 ethylacetate의 조정제 및 활성분획 정제

Silica-gel chromatography: Silica-gel 60 (0.063-0.2 mm, 70-230 mesh) 200g을 open column에 packing 한 후, E4-3 시료 10 을 Loading 한 후, methylene chloride: methanol을 유출용매(10:0 ~ 0: 100)로 하여, 조정제 하였다.

구분	Elution (MC:M)	회수율 (%)
E4-3-1	10:0	2.1
E4-3-2	8:2	61.7
E4-3-3	6:4	23.1
E4-3-4	4:6	7.7
E4-3-5	2:8	3.6
E4-3-6	0:10	3.9

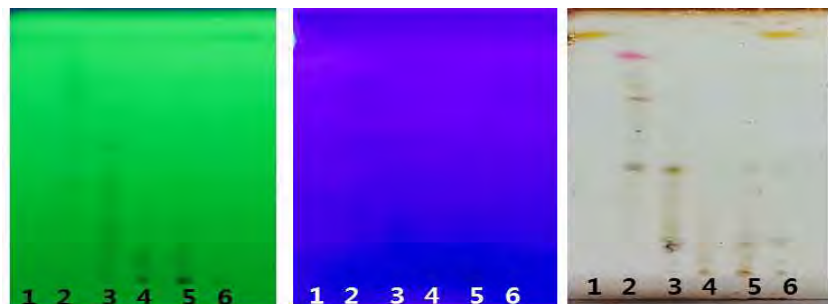


그림 3-1-28. 백세주 ethanol 추출물의 ethylacetate의 조정제 및 활성분획 정제

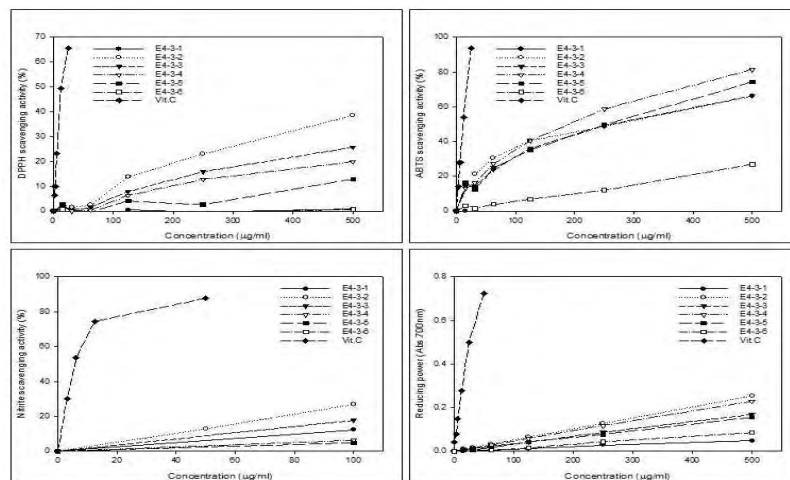
표 3-1-11. 백세주 활성 소분획의 항혈전 활성 평가

구분	Conc. (mg/ml)	Anti-thrombosis activity (x control)		
		TT	PT	aPTT
E4-3	5.0	1.5±0.1	2.7±0.1	3.6±0.1
	2.5	1.0±0.0	1.4±0.1	1.9±0.1
	1.25	1.0±0.0	1.0±0.1	0.9±0.0
E4-3-1	2.5	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0
E4-3-2	5	>15.0	>15.0	>15.0
	2.5	1.5±0.2	1.3±0.1	1.4±0.1
E4-3-3	2.5	1.3±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0
E1-3-4	6	>15.0	>15.0	>15.0
	5	8.1±0.1	>15.0	3.9±0.0
	2.5	2.6±0.1	1.0±0.1	1.5±0.1
E1-3-5	6	>15.0	-	-
	5	5.0±0.3	-	-
	2.5	2.5±0.2	1.0±0.0	1.1±0.0
E1-3-6	2.5	1.1±0.0	1.0±0.0	1.1±0.0
DMSO	-	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0
Aspirin	1.5	1.7±0.1	1.8±0.1	1.8±0.0

KSD-E4-3의 경우 최소 3종 이상의 항응고 활성물질(KSD-E4-3-2, KSD-E4-3-4, KSD-E4-3-5)이 포함되어 있다. 특히 백세주의 E4-3에서의 활성보다 KSD-E4-3-2의 경우 활성 증대가 매우 의미 있으며 KSD-E4-3의 경우 항염증 활성의 핵심군이며, 또한 미백, 주름개선 활성의 최우선 대상이므로, 최우선적으로 제품화 가능성을 검토하였다.

표 3-1-11. 백세주 활성 소분획의 항산화 활성 평가

구분	항산화 활성			
	DPPH 소거능	ABTS 소거능	Nitrite 소거능	Reducing power(&00nm)
E4-3	<b>46.0</b>	<b>20.1</b>	<b>21.3</b>	
E4-3-1	0.7	-0.9	12.2	0.0485
E4-3-2	38.5	66.1	26.9	0.2535
E4-3-3	25.7	66.3	17.7	0.1695
E1-3-4	19.8	81.4	6.3	0.2295
E1-3-5	12.8	74.2	4.8	0.1555
E1-3-6	0.6	26.9	-3.1	0.0855



평가결과, KSD-E4-3의 항산화 활성은 KSD-E4-3-2 및 KSD-E4-3-4에서 우수하였다.

(5) 명작 복분자주 주박의 ethanol 추출물의 ethylacetate의 조정제 및 활성분획 정제

Silica-gel chromatography: Silica-gel 60 (0.063-0.2 mm, 70-230 mesh) 200g을 open column에 packing 한 후, E7-3 시료 10 을 Loading 한 후, methylene chloride: methanol을 유출용매(10:0 ~ 0: 100)로 하여, 조정제하였다.

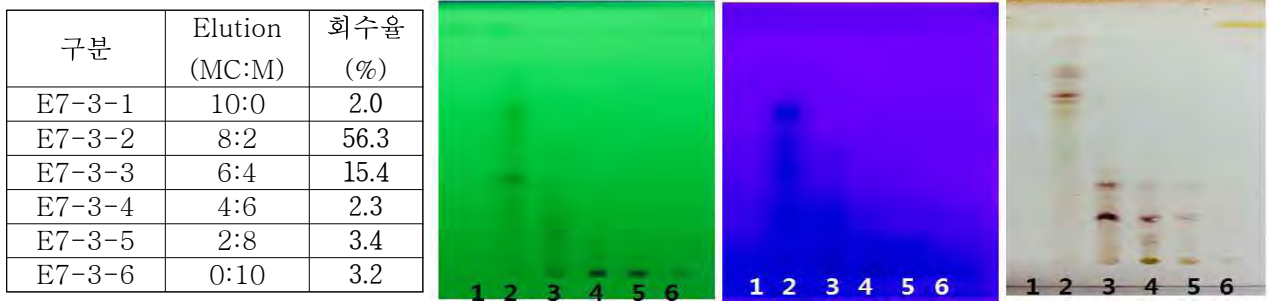


그림3-1-29. 명작복분자주 ethanol 추출물의 ethylacetate의 조정제 및 활성분획 정제

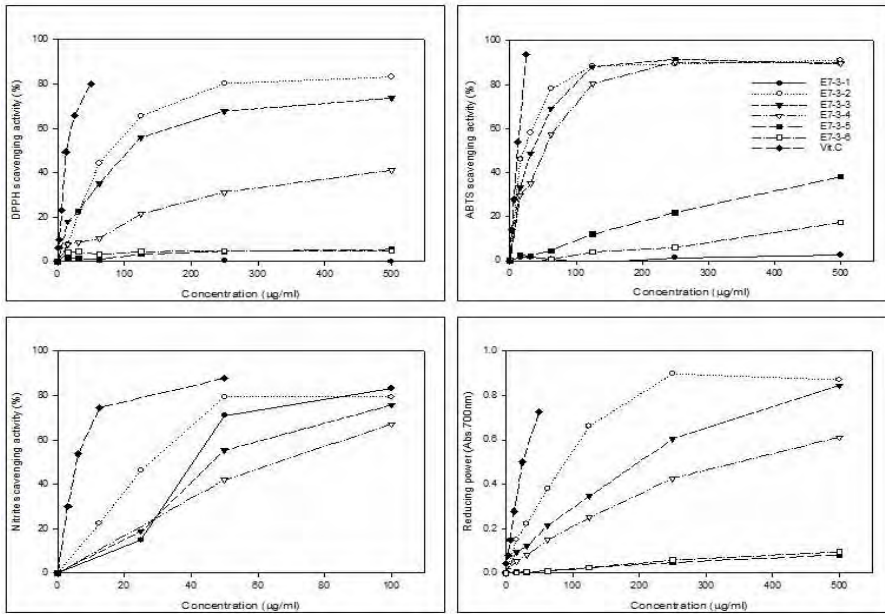
표 3-1-12. 명작 복분자 활성 소분획의 항혈전 활성 평가

구분	Conc. (mg/ml)	Anti-thrombosis activity (x control)		
		TT	PT	aPTT
E7-3	5	>15.0	>15.0	>15.0
	2.5	1.1±0.2	1.8±0.1	2.4±0.1
	1.25	1.0±0.0	1.2±0.2	1.2±0.1
E7-3-1	2.5	1.1±0.0	1.0±0.0	1.1±0.1
E7-3-2	6	>15.0	>15.0	>15.0
	5	>15.0	>15.0	6.2±0.2
	2.5	1.4±0.0	>15.0	1.7±0.0
E7-3-3	1.25	1.1±0.0	1.0±0.0	1.1±0.0
	2.5	1.2±0.0	1.1±0.0	1.2±0.1
E7-3-4	2.5	>15.0	>15.0	>15.0
	1.25	>15.0	>15.0	5.1±0.1
	0.625	3.1±0.1	1.0±0.0	2.2±0.1
E1-3-5	6	2.1±0.0	1.5±0.1	2.5±0.1
	5	1.8±0.1	1.2±0.1	1.8±0.2
	2.5	1.4±0.1	1.0±0.0	1.1±0.0
E1-3-6	2.5	1.2±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0
DMSO	-	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0
Aspirin	1.5	1.7±0.1	1.8±0.1	1.8±0.0

KSD-E7-3의 경우 2종 이상의 항응고 활성물질(KSD-E7-3-2, KSD-E7-3-4) 이 포함되어 있다. 특히 명작 복분자의 경우, KSD-E7-3-4에서의 활성은 매우 강력하여 이를 이용한 항혈전제의 건강기능식품 소재로 활용이 가능할 것으로 판단된다. 그러나 회수율을 감안한다면, KSD-E7-3-2를 상업화에 사용하는 것이 유리하다 결정하였다.

표 3-1-13. 명작 복분자 활성 소분획의 항산화 활성 평가

구분	항산화 활성			
	DPPH 소거능	ABTS 소거능	Nitrite 소거능	Reducing power(λ00nm)
E7-3	<b>82.8</b>	<b>89.0</b>	<b>82.96</b>	
E7-3-1	0.0	2.6	83.2	-0.0065
<b>E7-3-2</b>	<b>83.1</b>	<b>91.0</b>	<b>79.4</b>	0.8705
E7-3-3	73.6	89.3	75.7	0.8445
<b>E7-3-4</b>	<b>41.1</b>	<b>89.8</b>	<b>67.1</b>	0.6115
E7-3-5	5.5	38.2	-9.3	0.0815
E7-3-6	4.8	17.3	-1.6	0.0955



KSD-E4-3의 항산화 활성은 KSD-E4-3-2 및 KSD-E4-3-4에서 우수하다.



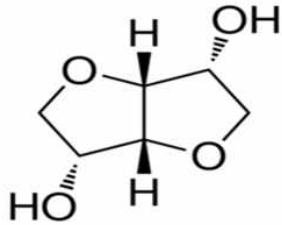
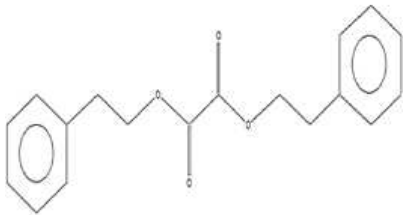
차. 전통주 주박으로부터 유용 핵심활성물질 (Key molecule) 확인

다양한 선정 주박의 실리카겔 크로마토그래피 및 preparative HPTLC에서 회수한 조정제물을 대상으로 활성물질 확인을 하였으며, 주요 확인 물질은 다음과 같다. 이때 확인을 위해 사용한 HPLC-MS alc GC-MS 조건은 다음과 같다.

표 3-1-14. HPLC-MS 및 GC-MS 분석 조건

LC-MS	GC-MS																														
<p>Liquid chromatography conditions                      system : Thermo Scientific Ultimate 3000 UHPLC                      column : Thermo Scientific Hypersil GOLD C18(50×2.1mm, 1.9um)                      mobile phase A : Water with 0.1% formic acid and 5mM ammonium acetate                      mobile phase B : Methanol                      flow rate : 250µl/min.                      column temp. : 30°C                      sample injection : 5µl</p> <p>Gradient</p> <table border="1" data-bbox="215 994 636 1256"> <thead> <tr> <th>Time(min.)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>98</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>98</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>6.5</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>7.5</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>8.0</td> <td>98</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>98</td> <td>2</td> </tr> </tbody> </table>	Time(min.)	A	B	0	98	2	1	98	2	6.5	5	95	7.5	5	95	8.0	98	2	10.0	98	2	<p>Gas chromatography conditions                      system : Thermo Scientific Trace 1310                      Gas chromatograph                      column : Thermo Scientific TG-5ms 30m×0.25mm×0.25µm                      flow gas : He                      flow rate : 1ml/min.                      Split mode : splitless                      sample injection : 1µl                      Inlet temp. : 230°C</p> <p>Head space sampler conditions                      Agitation temp. : 90°C                      Incubation time : 10min.                      시료 10ml in 20ml vial</p> <p>Gradient</p> <table border="1" data-bbox="852 1093 1372 1261"> <thead> <tr> <th>Rate (°C/min)</th> <th>Temp.(°C)</th> <th>Hold time(min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td>40</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>250</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>	Rate (°C/min)	Temp.(°C)	Hold time(min)		40	4	10	250	5
Time(min.)	A	B																													
0	98	2																													
1	98	2																													
6.5	5	95																													
7.5	5	95																													
8.0	98	2																													
10.0	98	2																													
Rate (°C/min)	Temp.(°C)	Hold time(min)																													
	40	4																													
10	250	5																													
Mass spectrometry conditions	Mass spectrometry conditions																														
<p>System : Thermo Scientific Exactive Plus Orbitrap MS                      Method : full MS scan                      Mass range : 100~1000                      Ion mode : positive/negative                      Resolution : 70,000                      Ion source : Heated electrospray ionization(H-ESI)                      Spray voltage : 35000v                      Capillary Temp. : 320°C                      Vaporizer Temp. : 200°C                      Sheath gas : 40                      Auxillary gas : 10                      Sweep gas : 1</p>	<p>System : Thermo Scientific ISQ single quadrupole MS                      Mass range : 40~450                      Ionization mode : electron ionization(EI)                      Transfer line temp. : 250°C                      Ion source temp. : 230°C</p>																														

표 3-1-15. 우국생 주박 확인물질

물질명	구조
1,4:3,6-Dianhydro-D-mannitol (Isomannide) $C_6H_{10}O_4$ Molecular Weight: 146.14 CAS Number: <u>641-74-7</u>	
Oxalic acid di-(2-phenylethyl) ester $C_{18}H_{18}O_4$ (MW 298)	

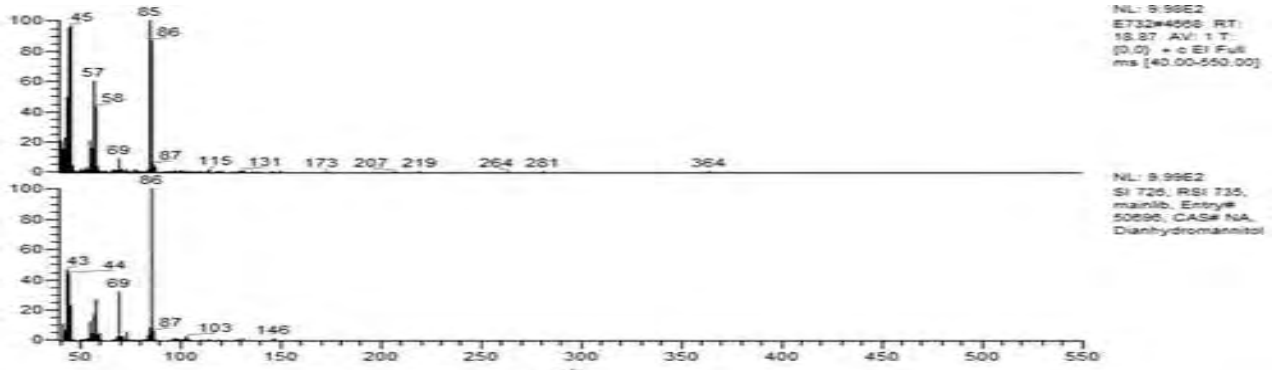
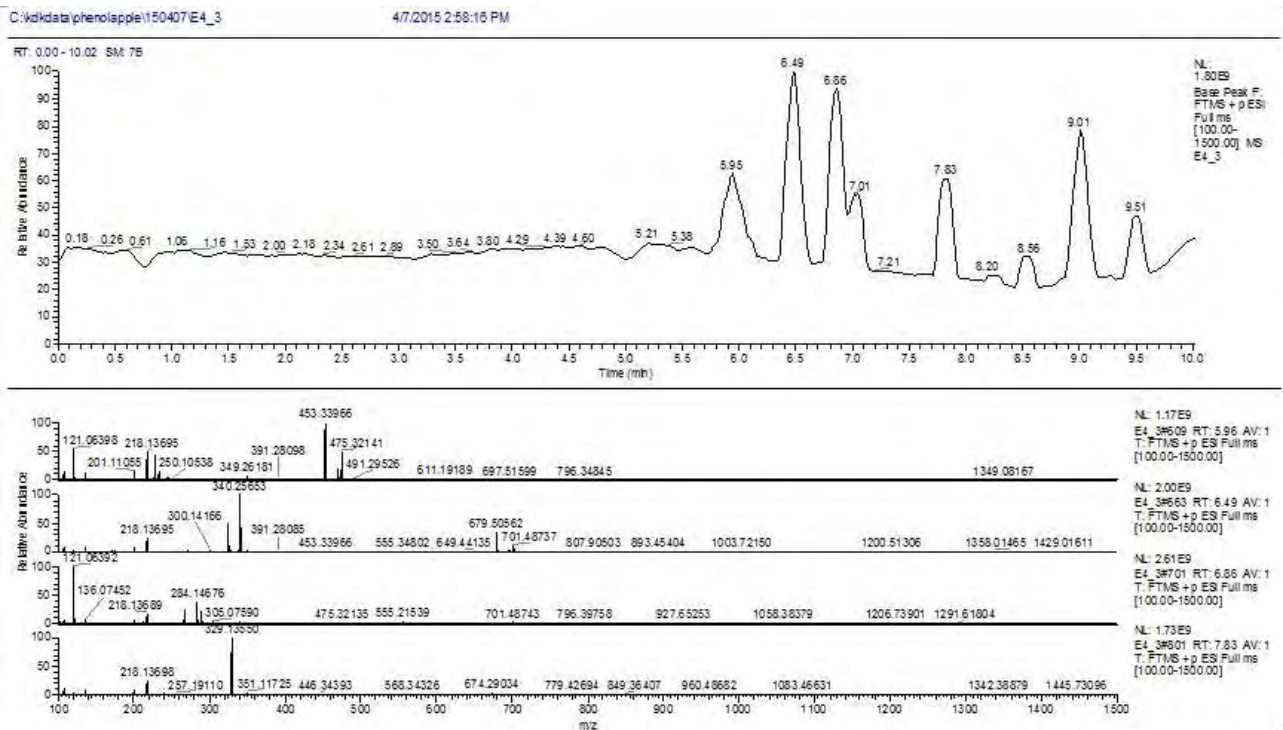


표 3-1-16. 백세주 주박 확인물질



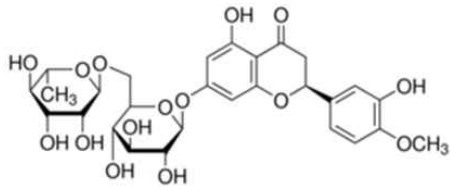
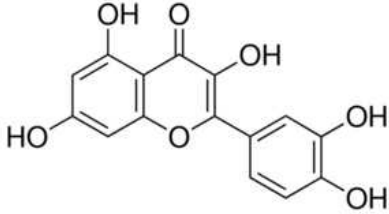
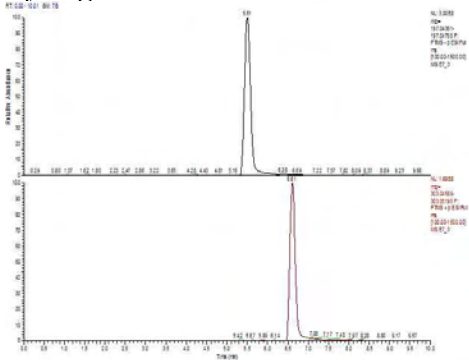
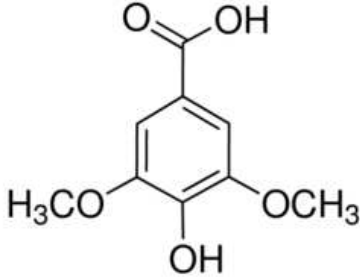
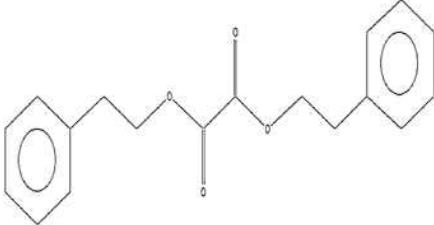
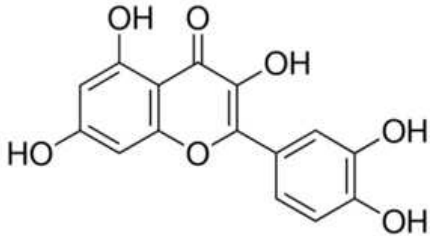
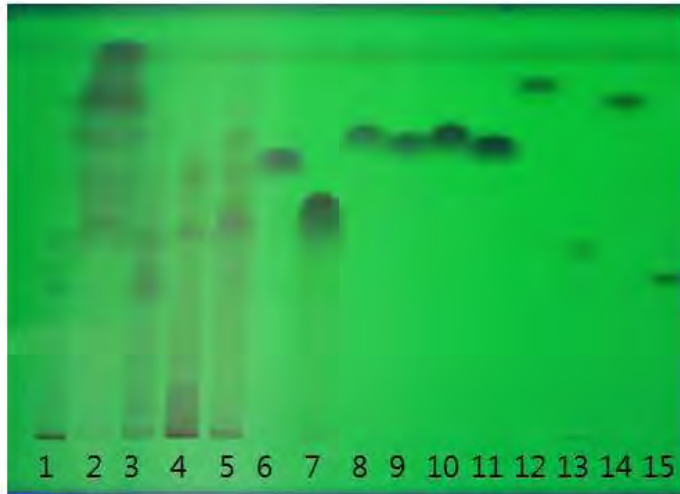
물질명	구조
Hesperidin $C_{28}H_{34}O_{15}$ Molecular Weight 610.56 CAS Number <u>520-26-3</u>	
Quercetin $C_{15}H_{10}O_7$ Molecular Weight 302.24 CAS Number <u>117-39-5</u>	

표 3-1-17. 명작 복분자 주박 확인물질

물질명	구조
Syringic acid 	
Oxalic acid di-(2-phenylethyl) ester $C_{18}H_{18}O_4$ (MW 298) Acetic acid, methoxy-(2-phenylethyl) ester	
Quercetin $C_{15}H_{10}O_7$ Molecular Weight 302.24 CAS Number <u>117-39-5</u>	



1: KSD-E2-3      6: coumaric acid      11: vanillic acid  
 2: KSD-E2-3-2      7: caffeic acid      12: hesperetin  
 3: KSD-E2-3-4      8: sinapic acid      13: hesperidin  
 4: KSD-E7-3      9: ferulic acid      14: Naringenin  
 5: KSD-E7-3-2      10: syringic acid      15: naringin

그림 3-1-30. 전통주 주박의 활성 key molecule (phenolic compounds)

표 3-1-18. 전통주 주박에서 확인된 Phenolic acid compounds Area-Intensity

Chemicals	우국생	우국생	백세주	백세주	복분자주	복분자주
	E2-1	E2-3	E4-1	E4-3	E7-1	E7-3
caffeic acid	35,934	438,958	30,888	1,441,954	1,260,235	20,612,937
ferulic acid		247,698	72,482	776,380	413,908	1,703,347
cinnamic acid		195,597	77,129	915,283	260,084	3,356,914
gentisic acid	1,309,166	734,419	785,342	4,678,434	32,656,472	282,319,934
chlorogenic acid			213,001	668,768	842,651	3,349,657
syringic acid	246,318	13,635	466,654	9,217,296	12,589,042	139,614,173
coumaric acid	312,346	1,292,318	319,868	1,940,675	243,857	2,739,821
catechin	9,309,502	2,571,902	9,099,127	2,524,442	262,389	1,380,212
salicylic acid	676,019	3,202,122	944,757	13,487,578	16,398,734	21,528,189
gallic acid		8,761	584,078	13,425,775	4,650,332	153,639,242
4-hydroxybenzoic acid	676,019	3,202,122	944,757	13,487,578	16,398,734	21,528,189
Vit. B6 (pyridoxine)	476,512	929,013	227,815	2,457,344	1,783,452	1,347,022
folic acid	918,163		1,494,836		92,953	
Vit.C	430,557	1,762,533	458,520	793,672	323,289	1,992,056
genistein		1,410,683	160,897	995,535	1,042,141	884,989
daidzein	413,126	31,217,700	176,070	14,059,916	1,885,709	701,335
kojic acid	629,870	348,191	385,501	253,006	-	
vanillic acid	343,000	856,214	415,590	1,878,082	3,847,715	12,521,133
sinapic acid		63,407		533,716	1,298,273	5,673,334

표 3-1-19. Identified chemical compounds in different Lees of Korean wines (단위: ug/g)

Chemicals	우국생	우국생	백세주	백세주	복분자주	복분자주
	E2-1	E2-3	E4-1	E4-3	E7-1	E7-3
gentisic acid	10.15	3.10	5.19	67.11	587.96	6332.28
catechin	276.19	26.97	148.59	18.51	-	-
chlorogenic acid	14.82	15.50	16.72	22.19	25.19	116.06
caffeic acid	-	0.87	-	10.18	8.94	243.20
cinnamic acid	-	2.87	-	105.18	23.03	512.75
syringic acid	38.81	0.29	84.81	2700.75	3325.96	43511.82
coumaric acid	-	1.33	-	6.30	-	5.70
ferulic acid	-	19.17	-	37.22	21.50	58.92
gallic acid	-	-	-	175.92	36.55	2291.26
vallic acid	43.56	1475.90	310.68	5992.33	10615.96	47107.59
sinapic acid	623.84	664.60	621.12	996.50	950.90	3484.50
sum	1007.37	2210.60	1187.11	10132.20	15595.99	103664.07

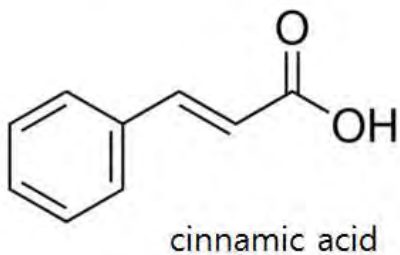
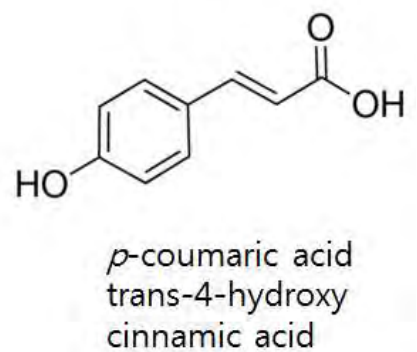
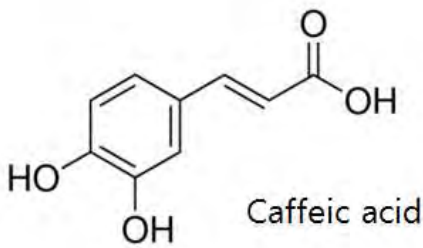
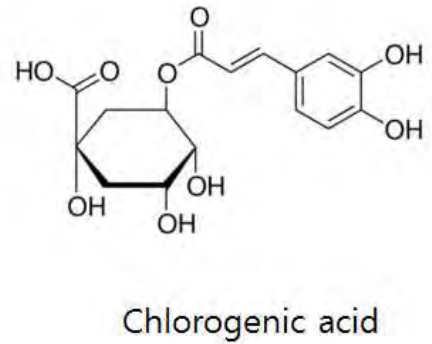
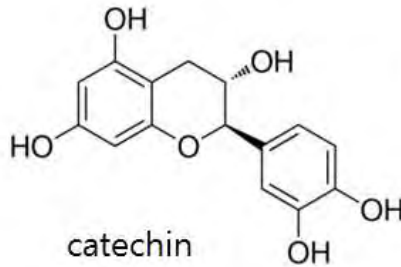
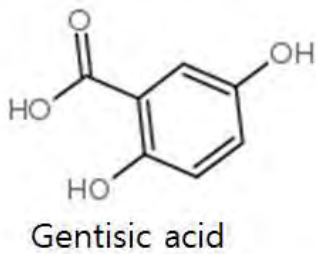


그림 3-1-31. Chemical structure of pure compounds isolated from lees

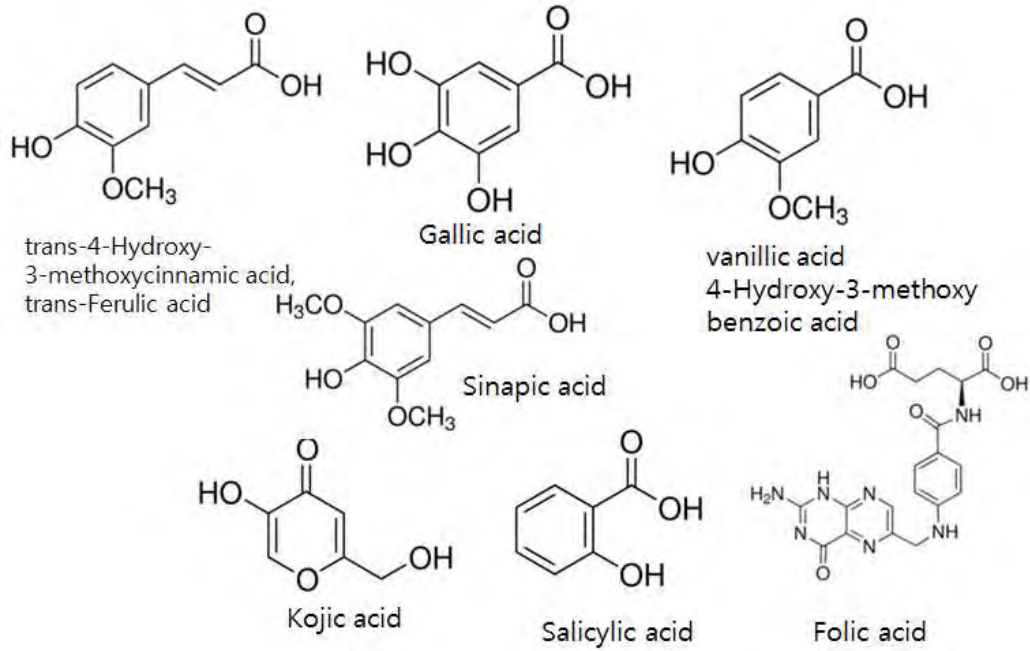


그림 3-1-31. Chemical structure of pure compounds isolated from lees (continued)

#### 카. 주박의 유용 핵심활성물질(Key molecule)의 항혈전 활성

주박에서 확인된 활성 핵심물질들의 항혈전 활성을 평가하였으며, 그 결과 기준에 보고되지 않은 sinapic acid 에서 매우 우수한 항혈전 활성을 확인하였다. 이에 대한 결과는 국제전문저널에 게재된 상태이며, 추가적으로 hesperidin 및 hesperitin과 관련된 aglycon의 항혈전 활성에 대해 국제전문저널에 투고를 준비하고 있는 상태이다 (2016년 투고, 게재완료 계획임). 이러한 결과는 국내 전통주의 항혈전 예방 및 혈행개선 효과가 기대되는 부분으로 향후 식품, 화장품, 의약품 소재로 개발 가능하다고 판단된다.

표 3-1-20. 주박 활성물질의 인간 혈소판 응집저해 활성

Pure compound	Conc. (mg/ml)	Amplitude (ohm)	Slope	Lag time (sec)	Area under	Platelet aggregation activity (%)
DMSO	-	15	3	31	113.5	94.3
DMSO		18	2	26	127.2	105.7
Aspirin	0.50	5	2	72	28.2	23.4
Aspirin	0.25	9	1	41	51.4	42.7
Ferulic acid	0.25	13	2	1	86.6	72.0
Hesperidin	0.25	20	3	8	151.0	125.5
Hesperetin	0.25	4	0	38	26.4	21.9
(IC <sub>50</sub> : 164.85ug/ml)	0.20	5	0	54	26.8	22.3
	0.15	13	2	28	74.3	61.7
	0.25	5	1	10	37.5	31.2
Naringenin	0.20	8	1	49	48.7	40.5
	0.10	16	2	21	107.9	89.7
Naringin	0.25	16	2	39	114.5	95.1
Pantothenic acid	0.25	20	4	12	152.2	126.5

표 3-1-21. 주박 활성물질의 인간 혈소판 응집저해 활성 (계속)

Pure compound	Conc. (mg/ml)	Amplitude (ohm)	Slope	Lag time (sec)	Area under	Platelet aggregation activity (%)
DMSO	-	17	4	29	126.5	105.7
DMSO	-	16	3	26	112.8	94.3
DMSO	-	19	3	28	138.7	100.0
Aspirin	0.5	9	2	130	45.5	38.0
Aspirin	0.25	13	2	30	87.2	72.9
1,4:3,6-Dianhydro-D-mannitol	0.25	14	2	30	104.9	87.7
Sinapic acid	0.25	6	1	138	35.3	29.5
(IC50 : 231.79ug/ml)	0.20	14	2	32	102.6	85.8
Syringic acid	0.25	13	2	30	84.1	70.3
Vanillic acid	0.25	13	2	33	81.2	67.9
p-Coumaric acid	0.25	6	1	84	36.0	30.1
(IC50 : 211.51ug/ml)	0.20	10	1	38	63.9	53.4
	0.15	16	2	25	118.9	85.7
Caffeic acid	0.25	10	2	36	74.7	53.9
(IC50 : 256.04ug/ml)	0.20	17	2	30	119.6	86.2

표 3-1-22. 주박 활성물질의 항응고 활성

시료	Conc.(mg/ml)	TT	PT	aPTT
DMSO	-	1.00±0.06	1.00±0.02	1.00±0.05
Aspirin	1.5	1.87±0.21	1.57±0.00	1.71±0.16
caffeic acid	5.0	>15	>15	>15
	2.5	3.00±0.12	4.51±0.79	2.76±0.30
	1.3	1.05±0.00	1.28±0.03	-
p-Coumaric acid	5.0	>15	>15	>15
	2.5	>15	>15	5.30±0.26
	1.3	1.32±0.05	1.27±0.13	0.92±0.01
1,4:3,6-Dianhydro-D-mannitol	5.0	0.95±0.04	0.97±0.04	0.84±0.00
	2.5	-	0.81±0.01	-
Ferulic acid	5.0	>15	>15	>15
	2.5	1.97±0.31	3.05±0.29	1.67±0.33
	1.3	-	1.21±0.00	-
Hesperetin	5.0	11.33±0.12	>15	5.46±0.12
	2.5	6.63±1.91	1.25±0.15	2.07±0.20
	1.3	0.62±0.03	-	-
Hesperidin	5.0	1.26±0.02	0.96±0.04	0.69±0.02
Naringenin	5.0	>15	>15	>15
	2.5	0.71±0.08	>15	>15
	1.3	-	0.90±0.00	0.92±0.01
Naringin	5.0	0.87±0.00	1.24±0.12	0.96±0.02
	2.5	0.87±0.02	1.01±0.12	0.89±0.03
Sinapic acid	5.0	>15	>15	>15
	2.5	2.17±0.38	2.34±0.14	1.12±0.03
Syringic acid	5.0	>15	>15	>15
	2.5	2.57±0.16	2.30±0.14	2.05±0.00
Vanillic acid	5.0	>15	>15	>15
	2.5	3.25±0.51	>15	2.06±0.03
	1.3	-	1.21±0.01	-

표 3-1-23. 주박 활성물질의 인간 적혈구 용혈활성

<b>Samples</b>	<b>Hemolysis activity (%)</b>
Caffeic acid	-0.7±0.2
p-Coumaric acid	1.5±0.4
1,4:3,6-dianhydro-D-mannitol	4.6±8.5
Ferulic acid	6.5±7.9
Hesperetin	-0.7±2.8
Hesperidin	2.0±8.0
Naringenin	-4.3±0.4
Naringin	-0.7±0.5
Sinapic acid	0.5±1.1
Syringic acid	3.0±1.3
Vanilic acid	5.9±1.4
Pantothenic acid	0.3±0.3



## 제 2 절 2세부과제 연구개발수행 내용 및 결과

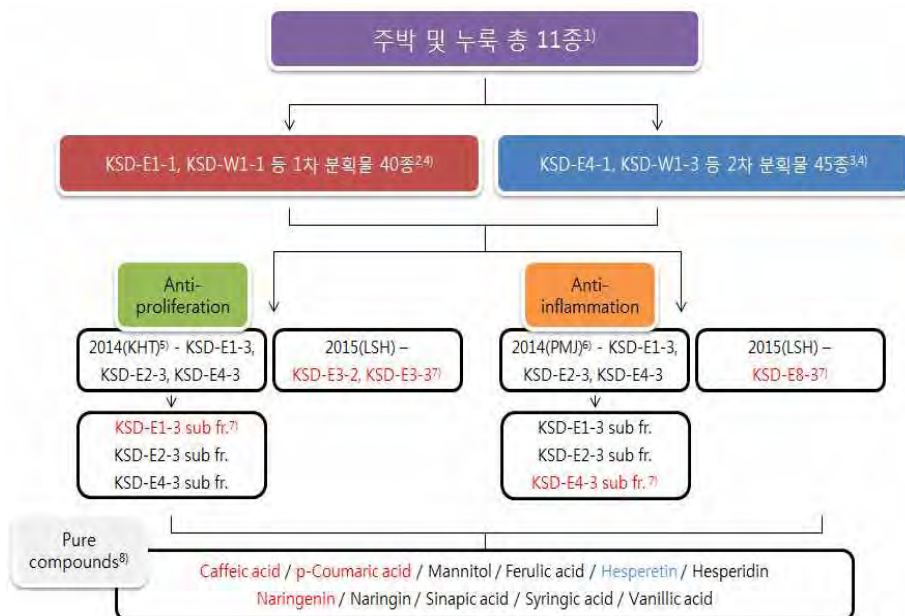
### 1. 제2세부과제 년차별 연구개발 목표 및 내용

연구개발의 목표		연구개발의 내용
1차년도	주박 및 누룩 추출물 5종에 의한 생리활성 연구	○ 주박 및 누룩 추출물(5종)에 의한 지방세포억제활성, 항염증 활성 및 암세포 항성장 활성 연구
2차년도	주박 및 누룩 추출물 85종에 의한 생리활성 연구	○ 주박 및 누룩 추출물 85종에 의한 항염증 활성 및 암세포 항성장 활성 및 작용기전 연구
3차년도	주박 및 누룩 추출물의 조분획물 및 순수물질에 의한 생리활성연구	○ 주박 누룩 추출물의 유기용매 분획물의 조분획물 및 순수물질(11종)에 의한 항염증 활성 및 암세포 항성장 활성 및 작용 기전연구

### 2. 제2세부 과제 생리활성 연구별 재료 및 방법

지방세포억제활성연구	항염증활성연구	암세포 항성장 활성 연구
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 세포주 : Mouse pre-adipocyte 3T3-L1 cell</li> <li>- Adipogenesis</li> <li>- Oil red O 염색</li> <li>- RT-PCR</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 세포주 : Mouse macrophage RAW264.7 cell</li> <li>- Nitric oxide assay</li> <li>- Cell viability assay</li> <li>- RT-PCR</li> <li>- Western blot analysis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 세포주 : Human colorectal HCT116 cell</li> <li>- Cell viability assay</li> <li>- RT-PCR</li> <li>- Western blot analysis</li> <li>- siRNA transfection</li> </ul>

- 1세부과제로부터 제공받은 주박 및 누룩 추출물(85종)과 순수물질 11종 및 생리활성별 연구에 사용한 시료

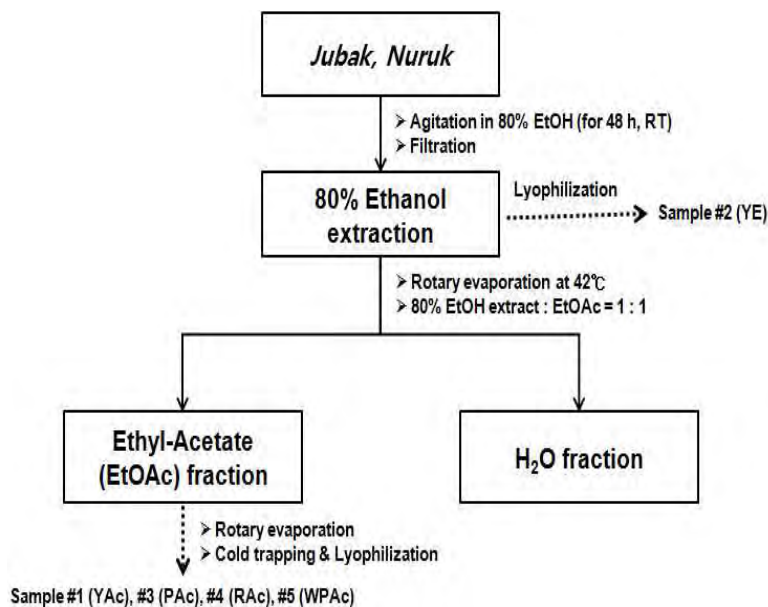


### 3. 제2세부과제 연구결과

가. 주박과 누룩의 추출물 5종에 의한 지방세포형성억제, 항염증 및 항성장 활성

#### (1) 추출물 및 분획물의 제조

본 연구에서 사용된 주박 및 누룩 추출물과 ethyl acetate 분획물은 (주)국순당에서 총 5종을 공급받아 사용하였다. 시료로 사용된 주박 및 누룩은 80% 에탄올에 48 시간 상온에 추출하고, 추출액은 filter paper (Whatman No. 2)로 거른 후 분말화 하고 E-Ju 주박 추출물(YE)을 획득하였다. 또한, 분획물 제조를 위해서는 에탄올 추출물을 42°C에서 감압 농축하여 ethyl acetate를 1:1로 섞은 용액에 현탁하고 감압 건조한 뒤, 분말화 하여 E-Ju 주박의 ethyl acetate 분획물(YAc), B-Ju 주박의 ethyl acetate 분획물(PAc), nuruk의 ethyl acetate 분획물(RAc), W-Ju 주박의 ethyl acetate 분획물(WPac)을 획득하였다. 각각의 시료 분말은 DMSO (Dimethyl Sulfoxide, Sigma, USA)에 녹인 후 사용하였다(Fig. 3-2-1).

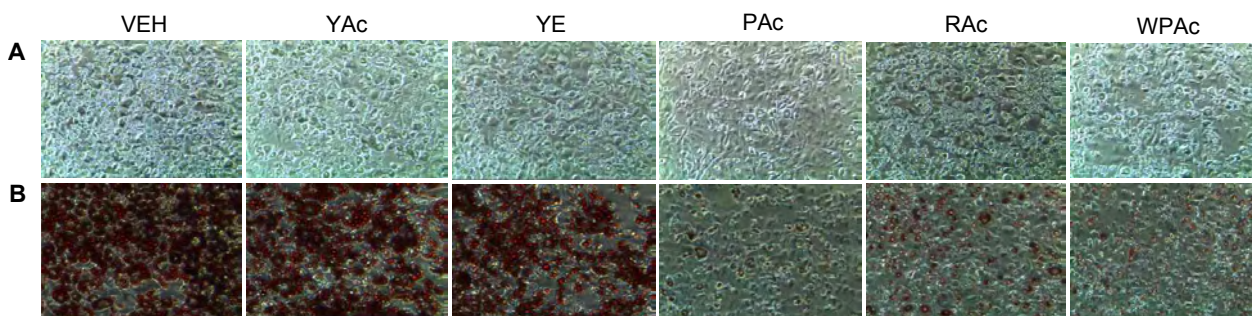


**Fig. 3-2-1. Flow-Scheme of Sample Preparation.** Ethyl acetate fraction of E-Ju lees extract (YAc), E-Ju lees extract (with 80% ethanol) (YE), Ethyl acetate fraction of B-Ju lees extract (PAc), Ethyl acetate fraction of Nuruk extract (RAc), Ethyl acetate fraction of W-Ju lees extract (WPac).

#### (2) 주박 및 누룩 추출물이 지방세포 형성과정에 미치는 영향

주박 및 누룩 추출물이 마우스 전지방 세포주인 3T3-L1 세포의 지방세포형성과정에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 지방세포형성을 유도하면서 각 주박 추출물을 0.1 mg/ml의 농도로 처리하고 대조구로는 DMSO를 각각 처리 하였다. 그 결과, 분화 유도 후 DMSO를

처리한 대조구와 YAc (E-Ju 주박의 ethyl acetate 분획물), YE (E-Ju 주박 추출물)를 처리한 경우에는 지방세포형성이 정상적으로 일어난 반면, PAc (B-Ju 주박의 ethyl acetate 분획물), RAc (nuruk의 ethyl acetate 분획물), WPAc (W-Ju 주박의 ethyl acetate 분획물) 처리군에서는 지방세포 형성이 현저히 억제되는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 3-2-2A). 또한, 지방세포형성 유무를 명확하게 구분하기 위하여 oil red O 염색을 수행하였다. 그 결과, YAc, YE를 처리한 경우에는 대조구와 유사하게 형성된 지방세포가 염색되어 붉게 확인되었으며, 이에 반해 PAc, RAc, WPAc 처리군에서는 지방세포 형성이 거의 관찰되지 않았다(Fig. 3-2-2B). 연구에 사용한 총 5 종의 시료 중 PAc, RAc, WPAc가 지방세포 형성억제 활성을 가지는 것으로 판단된다.

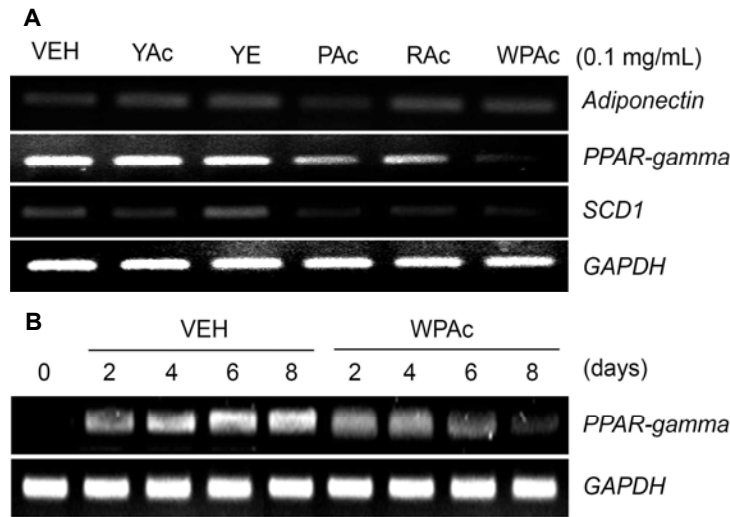


**Fig. 3-2-2. Effects of ethyl acetate fractions of lees and nuruk extracts on pre-adipocyte differentiation.** Mouse 3T3-L1 pre-adipocyte cells were treated with five different kinds of fractions and extracts during adipogenesis. After 8 days, differentiated cells were stained with oil red O solution. (A) before staining, (B) after staining.

### (3) 주박 및 누룩 추출물에 의한 pro-adipogenic 유전자의 발현 변화

주박 및 누룩 추출물에 의한 지방세포형성 억제과정 중 pro-adipogenic 유전자인 *Adiponectin*, *PPAR $\gamma$*  그리고 *SCD-1* 유전자의 발현 변화를 확인하였다. 그 결과, Fig. 3-2-3 A 에서 보는 바와 같이 분획물 PAc, RAc, WPAc를 처리한 경우 *PPAR $\gamma$* 와 *SCD-1* 유전자의 발현이 감소되는 것을 확인할 수 있었고, *Adiponectin* 유전자의 발현은 PAc의 처리에 의해서만 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 분획물 WPAc를 분화유도 후 2일에서 8일까지 처리한 후 *PPAR $\gamma$*  유전자의 발현을 확인한 결과, DMSO만을 처리한 대조구는 분화가 진행됨에 따라 *PPAR $\gamma$*  유전자의 발현이 계속적으로 증가하는 반면, WPAc를 처리한 실험군은 6 일이 되는 날부터 발현이 억제되기 시작하여 8 일이 되는 시점에는 *PPAR $\gamma$*  유전자의 발현이 완전히 억제됨을 확인하였다(Fig. 3-2-3B). 주박 및 누룩 추출물에 의한 지방세포 억제활성 연구는 매우 미미한 상황이므로, 이러한 연구 결과는 주박 및 누룩

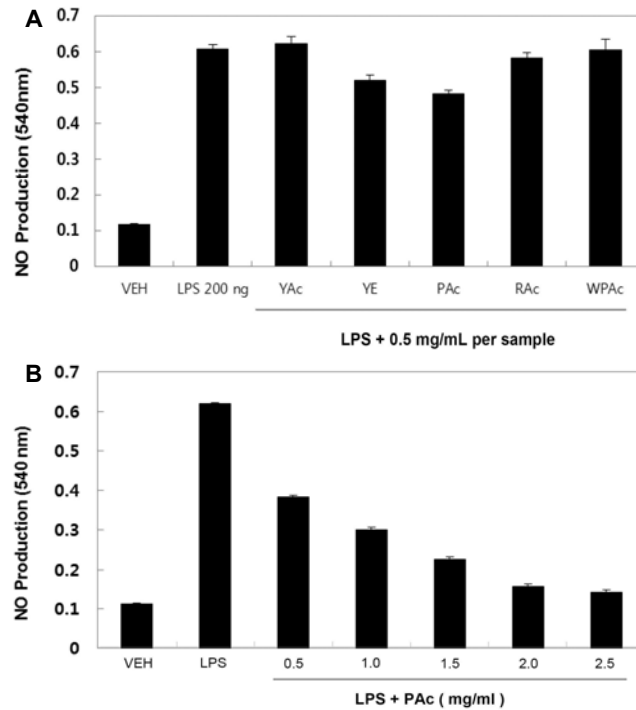
추출물을 활용한 비만 억제용 천연소재 개발 및 관련 산업으로의 활용을 제시할 수 있으리라 기대된다.



**Fig. 3-2-3. Down-regulation of *Adiponectin*, *PPAR $\gamma$*  and *SCD1* genes by ethyl acetate fraction of W-Ju lees extract (WPac).** (A) Mouse 3T3-L1 cells were incubated with WPac during adipogenesis. Total RNAs were prepared from treated cells and used for RT-PCR with *Adiponectin*, *PPAR $\gamma$*  and *SCD1* gene specific primers. (B) Mouse 3T3-L1 pre-adipocytes were treated with WPac or DMSO for 8 days during adipogenesis. Treated cells were collected at different time points. Total RNAs were extracted from treated cells and used for RT-PCR with *PPAR $\gamma$*  gene specific primers.

#### (4) 주박 및 누룩 추출물의 Nitric oxide (NO) 생성 저해 활성

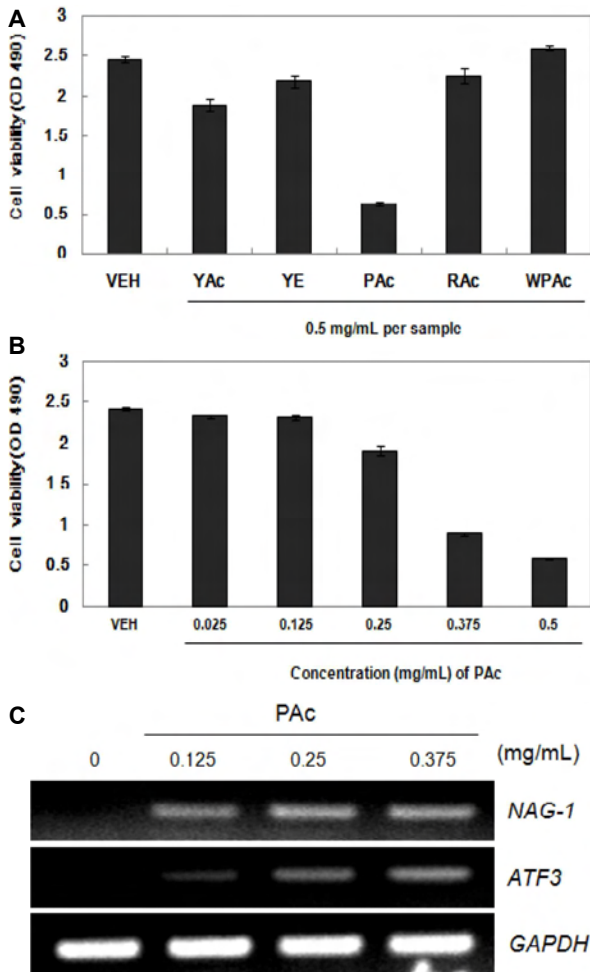
주박 및 누룩 추출물의 항염증 활성을 측정하기 위하여 LPS로 염증을 유도한 RAW 264.7 세포에 각 시료를 0.5 mg/ml 의 농도로 처리한 후, NO 생성을 측정하였다. 그 결과, DMSO만을 처리한 대조구에 비해, 추출물 YE와 PAc 처리군에서만 NO 생성이 저해됨을 확인하였다(**Fig. 3-2-4A**). 이 중 가장 높은 NO 생성 저해능력을 보여준 PAc를 다양한 농도(0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mg/ml)로 24 시간 처리한 후 NO 생성을 측정하였다. 그 결과 **Fig. 3-2-4B**에서 보는 것과 같이 PAc에 의해 농도 의존적으로 NO 생성이 억제됨을 확인하였다. 이러한 결과는 누룩곰팡이의 일종인 *Rhizopus oryzae* KSD-815 로부터 획득한 추출물이 항염증 활성이 있다는 보고와 유사한 결과를 나타내는 것뿐만 아니라, 주박 추출물에 의한 항염증 활성도 보여주고 있어 향후 전통주의 다양한 구성요소들에 의한 항염증 활성 여부 역시 중요한 연구 대상이 될 수 있으리라 생각된다.



**Fig. 3-2-4. Suppressive effects of ethyl acetate fractions of lees and nuruk extracts on nitric oxide production.** (A) RAW 264.7 cells were treated with five different kinds of fractions and extracts for 18 hr. After treatment, nitric oxide production was measured by nitric oxide assay. (B) RAW 264.7 cells were treated with five different concentration of ethyl acetate fraction of B-Ju lees extract (PAc). And then, nitric oxide production was measured by nitric oxide assay.

(5) 주박 및 누룩 추출물 처리에 따른 대장암 세포 성장 억제

주박과 누룩 추출물에 의한 대장암 세포주 HCT116의 성장억제 활성을 정량적으로 확인하기 위하여 각 시료를 0.5 mg/ml의 농도로 처리한 후, 24 시간 후에 cell viability assay를 수행하였다. 그 결과 **Fig. 3-2-5**에서 보는 바와 같이 YAc, YE, PAc에 의해 각각 76.7%, 88.8%, 26%의 세포생존율을 보여준 반면 RAc를 처리한 경우에는 각각 91.2%로 세포생존율의 큰 변화는 없었고, WPAc를 처리한 경우에는 105.4%로 대조구에 비해 세포생존율이 증가하였다(**Fig. 3-2-5A**). PAc의 처리 농도에 따른 대장암 세포주의 생존율을 확인하기 위하여 PAc를 다양한 농도(0.025, 0.125, 0.25, 0.375, 0.5 mg/ml)별로 처리한 후 cell viability assay를 수행하였다. 그 결과 0.025 와 0.125 mg/ml PAc 처리군에서는 세포생존율에 미치는 영향이 거의 없었으나, 0.25, 0.375, 그리고 0.5 mg/ml PAc 처리군부터 각각 21%, 64%, 75% 정도의 생존율 감소를 보여 PAc에 의한 농도 의존적인 세포생존율 감소를 확인하였다(**Fig. 3-2-5B**)



**Fig. 3-2-5. Effects of the ethyl acetate fractions of lees and nuruk extracts on HCT116 cell viabilities and on expression of *NAG1* and *ATF3* genes.** (A) HCT116 cells were treated with five different kinds of fractions and extracts for 24 hrs. And then, cell viability was measured by MTS assay. (B) HCT116 cells were incubated with five different concentrations of ethyl acetate fraction of B-Ju lees extract (PAc). And then, cell viability was measured with MTS assay. (C) HCT116 cells were treated with three different concentrations of PAc for 24 hrs. And then, total RNAs were extracted from treated cells and used for RT-PCR with *NAG-1* and *ATF3* gene specific primers.

#### (6) 분획물 PAc에 의한 *NAG-1*과 *ATF3* 유전자의 발현 연구

분획물 PAc의 처리에 의한 암 억제 유전자인 *NAG-1* (Non-steroidal anti-inflammatory drug activated gene-1)과 *ATF3* (Activating transcription factor-3) 유전자의 발현 변화를 확인하였다. 분획물 PAc에 의한 *NAG-1*과 *ATF3*의 유전자 발현 변화를 확인하기 위하여 대장암 세포주 HCT116에 PAc를 0.125, 0.25, 0.5 mg/ml의 농도로 각각 처리하였다. 그 결과 PAc의 처리 농도가 증가됨에 따라 *NAG-1*과 *ATF3*의 유전자 발현이 농도 의존적으로 증가됨을 확인 할 수 있었다(**Fig. 3-2-5C**). *NAG-1* 유전자는 TGF-beta superfamily의 한 종류로서, *NAG-1* 유전자를 과대 발현하는 transgenic mouse 모델에서 항암 활성과 항비만 활성이 있는 것으로 보고 되었다. 최근에는 *NAG-1*이 암 예방 및 항암 활성이 있는 다양한 천연물에 의한 중재자의 역할과 다양한 전사조절인자에 의해 발현이 조절된다는 총설이 보고된바 있다. *ATF3* 유전자는 항암 활성이 있는 여러 천연물질에 의해 발현이 유도되며 항암 활성과 관련이 있는 것으로 보고 되었다. 이러한 연구결과는 분획물 PAc에 의한 암세포 성장 억제 활성은 항

암 유전자인 *NAG-1*과 *ATF3* 유전자의 발현증가와 관련이 있는 것으로 판단된다. 그러나, 항암 유전자의 발현 증가와 세포성장 억제활성의 직접적인 관련성은 siRNA등을 이용한 추가실험을 진행해야 될 것으로 판단된다.

#### 나. 주박과 누룩의 추출물 85종에 의한 항염증 활성 연구

##### (1) 주박 및 누룩 추출물 제조

본 연구에서 사용된 8종의 주박과 3종의 누룩은 (주)국순당에서 제공받아 사용하였다. 총 11종의 시료에서 총 85종의 분획물을 2회에 나누어 제조하였다. 제조방법은 다음의 절차에 따라 진행하였다. 먼저 주박의 열수 추출물은 시료 1 kg 에 물 1 L을 가하여 100℃에서 30분 동안 추출하였고 여과한 후(Whatman No. 2), 70℃에서 감압 농축하여 분말로 제조하였다. 에탄올 추출물은 시료 1.5 kg에 95% ethanol 6 L를 가하여 상온에서 3일간 2회 추출 하였고, 여과한 후 60℃에서 감압 농축하여 분말로 제조하였다. 또한 누룩의 에탄올 추출물은 시료 200 g에 95% ethanol 1 L를 가하여 상온에서 7일 동안 2회 추출하였고, 여과한 후 60℃에서 감압 농축하여 분말로 제조하였다. 각각 추출된 추출물 4 g을 물에 현탁 하여 n-hexane, ethylacetate, butanol을 이용하여 순차적으로 분획하고 물 잔류물을 회수하여 총 85종의 추출물 및 분획물을 제조하였다. 추출물과 분획물은 DMSO에 녹여 -20℃에서 저장하여 사용하였다. 분리한 추출물 및 분획물의 list는 **Table 3-2-1**에 나타내었다.

Table 3-2-1. 1차, 2차 추출물 및 분획물

No.		추출물	분획물
KSD-W6-1		Hot water ex.	Hot water ex.
KSD-W6-4	Y-Ju (예담)		Buthanol fr.
KSD-W6-5			Water res.
KSD-W3-1	E-Ju (한방이화주)		H.W ex.
KSD-W3-4			B fr.
KSD-W3-5			W res.
KSD-W1-1	M-Ju (옛날막걸리)		H.W ex.
KSD-W1-4			B fr.
KSD-W1-5			W res.
KSD-W5-1	S-Ju (신도주)		H.W ex.
KSD-W5-4			B fr.
KSD-W5-5			W res.
KSD-W2-1	W-Ju (우곡생)		H.W ex.
KSD-W2-4			B fr.
KSD-W2-5			W res.
KSD-E6-1	Y-Ju (예담)	80 % Ethanol ex.	Ethanol ex.
KSD-E6-2			Hexane fr.
KSD-E6-3			Ethylacetate fr.
KSD-E6-4			Buthanol fr.
KSD-E6-5			Water res.
KSD-E3-1	E-Ju (한방이화주)	90 % Ethanol ex.	EtOH ex.
KSD-E3-2			H fr.
KSD-E3-3			EA fr.
KSD-E3-4			B fr.
KSD-E3-5			W res.
KSD-E1-1	M-Ju (옛날막걸리)	80 % Ethanol ex.	EtOH ex.
KSD-E1-2			H fr.
KSD-E1-3			EA fr.
KSD-E1-4			B fr.
KSD-E1-5			W res.
KSD-E5-1	S-Ju (신도주)	80 % Ethanol ex.	EtOH ex.
KSD-E5-2			H fr.
KSD-E5-3			EA fr.
KSD-E5-4			B fr.
KSD-E5-5			W res.
KSD-E2-1	W-Ju (우곡생)	80 % Ethanol ex.	EtOH ex.
KSD-E2-2			H fr.
KSD-E2-3			EA fr.
KSD-E2-4			B fr.
KSD-E2-5			W res.

No.		추출물	분획물
KSD-W3-3	Y-Ju (예담)	Hot water ex.	Ethylacetate fr.
KSD-W1-3	M-Ju (옛날막걸리)		Ethylacetate fr.
KSD-W5-3	S-Ju (신도주)		Ethylacetate fr.
KSD-W2-3	W-Ju (우곡생)		Ethylacetate fr.
KSD-W4-1	B-Ju (백세주)		Hot water ex.
KSD-W4-2		Hexane fr.	
KSD-W4-4		Buthanol fr.	
KSD-W4-5		Water res.	
KSD-E4-1		B-Ju (백세주)	Ethanol ex.
KSD-E4-2	Hexane fr.		
KSD-E4-3	Ethylacetate fr.		
KSD-E4-4	Buthanol fr.		
KSD-E4-5	Water res.		
KSD-W7-1	RM-Ju (영장복분자)	Hot water ex.	Hot water ex.
KSD-W7-4			Buthanol fr.
KSD-W7-5			Water res.
KSD-E7-1	RM-Ju (영장복분자)	80 % Ethanol ex.	Ethanol ex.
KSD-E7-2			Hexane fr.
KSD-E7-3			Ethylacetate fr.
KSD-E7-4			Buthanol fr.
KSD-E7-5			Water res.
KSD-E11-1	E-Nuruk (한방이화주 Nuruk)	90 % Ethanol ex.	Ethanol ex.
KSD-E11-2			Hexane fr.
KSD-E11-3			Ethylacetate fr.
KSD-E11-4			Buthanol fr.
KSD-E11-5			Water res.
KSD-E10-1	M-Nuruk (옛날막걸리 Nuruk)	80 % Ethanol ex.	Ethanol ex.
KSD-E10-2			Hexane fr.
KSD-E10-3			Ethylacetate fr.
KSD-E10-4			Buthanol fr.
KSD-E10-5			Water res.
KSD-W8-1	SJ-Ju (고구마스주)	Hot water ex.	Hot water ex.
KSD-W8-3			Ethylacetate fr.
KSD-W8-4			Buthanol fr.
KSD-W8-5			Water res.
KSD-E8-1			SJ-Ju (고구마스주)
KSD-E8-2	Hexane fr.		
KSD-E8-3	Ethylacetate fr.		
KSD-E8-4	Buthanol fr.		
KSD-E8-5	Water res.		
KSD-E9-1	R4-Nuruk	80 % Ethanol ex.	Ethanol ex.
KSD-E9-2			Hexane fr.
KSD-E9-3			Ethylacetate fr.
KSD-E9-4			Buthanol fr.
KSD-E9-5			Water res.

(2) 85종의 주박 추출물 및 분획물이 NO생성과 세포생존율에 미치는 영향

LPS 처리에 의해 염증이 유도된 RAW 264.7 세포주에서 nitric oxide (NO) 생성을 측정하기 위해 0.2  $\mu\text{g/ml}$ 의 LPS로 염증을 유도하고, 40종의 1차 추출물 및 분획물을 500  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 다음 nitric oxide assay를 수행하였다. 유기용매 분획물의 대조구로는 용매인 DMSO를 처리하였다. 또한 세포생존율을 측정하기 위해 nitric oxide assay에서 실시한 동일한 조건으로 분획물을 RAW 264.7 세포주에 처리한 후 cell viability assay를 수행하였다. 그 결과 LPS로 염증을 유도하면 6배 NO 생성량이 증가되었고, 염증을 유도한 후 40종의 추출물 및 분획물을 처리한 결과 대부분의 분획물에 의해 NO 생성이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 KSD-E6-2, KSD-E6-3, KSD-E3-2, KSD-E3-3, KSD-E1-3 등 몇몇의 분획물에서 NO 생성이 크게 감소한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3-2-6A). 그러나, 동일한 주박 추출물에 의해 세포 생존율도 크게 감소하는 것으로 확인되어, 세포 생존율의 감소에 의해 NO 생성이 억제되는 것으로 확인되었다(Fig. 3-2-6B).

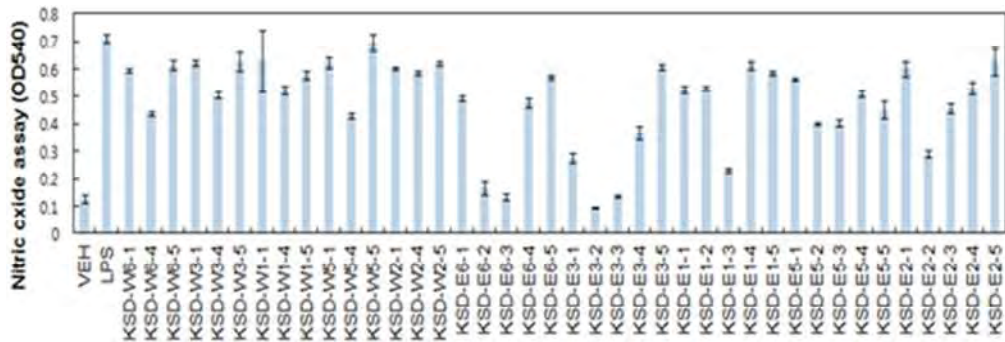
2차 분획물 45종에 의한 nitric oxide (NO)생성을 측정하기 위해 RAW 264.7 세포주에 0.2  $\mu\text{g/ml}$  LPS로 염증을 유도하고, 추출물 및 분획물을 150  $\mu\text{g/ml}$ 와 LPS를 처리한 후 nitric



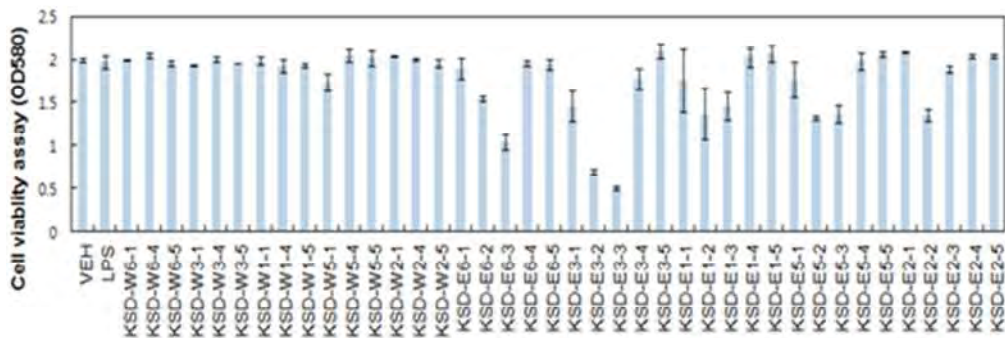
oxide assay를 수행하였다. 주박 분획물의 대조구로는 용매인 DMSO를 처리하였다. 또한 세포생존율을 측정하기 위해 nitric oxide assay에서 실시한 동일한 조건으로 분획물을 RAW 264.7 세포주에 처리한 후 cell viability assay를 수행하였다.

그 결과 LPS로 염증을 유도하면 6배 NO 생성량이 증가되었고, 염증을 유도한 후 45종의 추출물 및 분획물을 처리한 결과 KSD-E4-1, KSD-E4-2, KSD-E4-3, KSD-E7-3, KSD-E10-2, KSD-E8-3, KSD-E9-2, KSD-E9-3, KSD-W8-3 분획물에서 NO 생성이 감소되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3-2-6C). Cell viability assay 결과에서는 모든 분획물 처리에 의해 세포생존율에 큰 변화가 없는 것으로 확인할 수 있었다(Fig. 3-2-6D). 1차 및 2차 연구결과를 종합하여 총 85종의 주박 추출물 및 분획물 중 3종을 (KSD-E1-3, KSD-E2-3 그리고 KSD-E4-3) 최종 선별하여 추후 연구를 진행하였다.

A



B



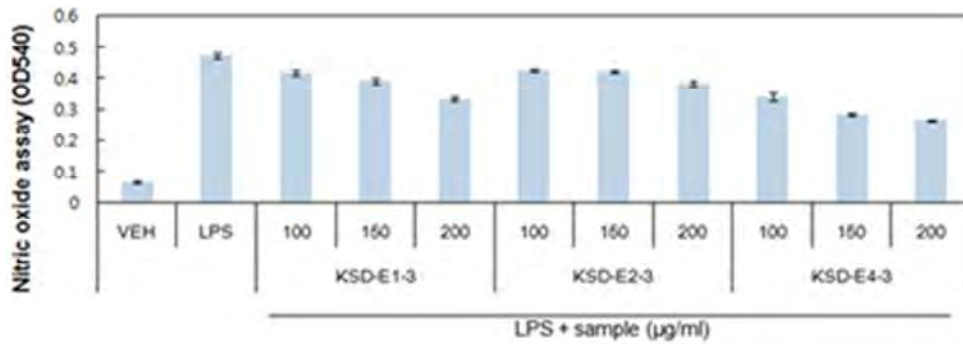


**Fig. 3-2-6. Effects of eighty five kinds of lees extracts and their solvent fractions on production of nitric oxide (A,C) and cell viabilities (B,D) in RAW 264.7 cells.** RAW 264.7 cells were treated with lees extracts and their solvent fractions (500  $\mu\text{g/ml}$  (A,B) and 150  $\mu\text{g/ml}$  (C,D)) for 18hr. After treatment, nitric oxide production was measured by nitric oxide assay and cell viability was measured using MTS proliferation assay kit.

(3) 선별된 3종 분획물의 농도별 nitric oxide (NO) 생성과 세포생존율 측정

선별된 3종(KSD-E1-3, KSDE2-3, KSD-E4-3)의 주박의 유기용매 분획물 농도에 따른 NO 생성 저해 여부와 RAW 264.7 세포 성장에 미치는 영향을 연구하였다. 즉, RAW 264.7 세포주에 0.2  $\mu\text{g/ml}$  LPS를 처리하여 염증을 유도한 후, 3종의 분획물을 100, 150, 200  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하여 NO 생성을 측정하였다. 또한 세포생존율을 측정하기 위하여 동일한 조건으로 3종의 분획물을 처리한 후, cell viability assay를 수행하였다. 그 결과, 분획물 KSD-E1-3, KSD-E4-3를 처리한 경우 농도 의존적으로 NO 생성이 감소되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3-2-7A). 반면, cell viability assay 결과에서는 처리한 3종의 분획물에 의한 세포 생존율에 미치는 영향은 미미한 것으로 확인되었다(Fig. 3-2-7B).

A



B

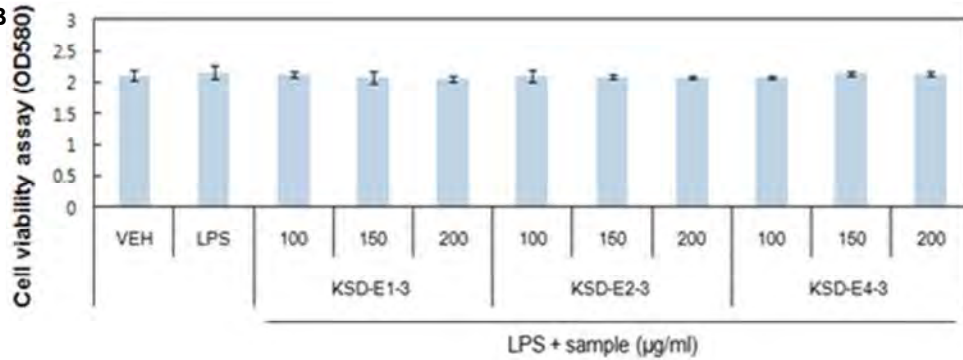
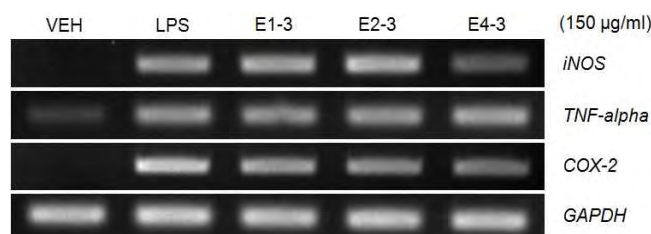


Fig. 3-2-7. Suppressive effects of selected three kinds of lees extracts and their solvent fractions on production of nitric oxide (A) in RAW 264.7 cells without affecting cell viability (B). RAW 264.7 cells were treated three different concentrations (100, 150, 200 µg/ml) of three kinds of solvent fractions for 18hr. After treatment, nitric oxide production was measured by nitric oxide assay and cell viability was measured using MTS proliferation assay kit.

(4) 선별된 3종의 주박 추출물 및 분획물에 의한 *iNOS*, *COX-2*, *TNF-alpha* 유전자의 발현 연구

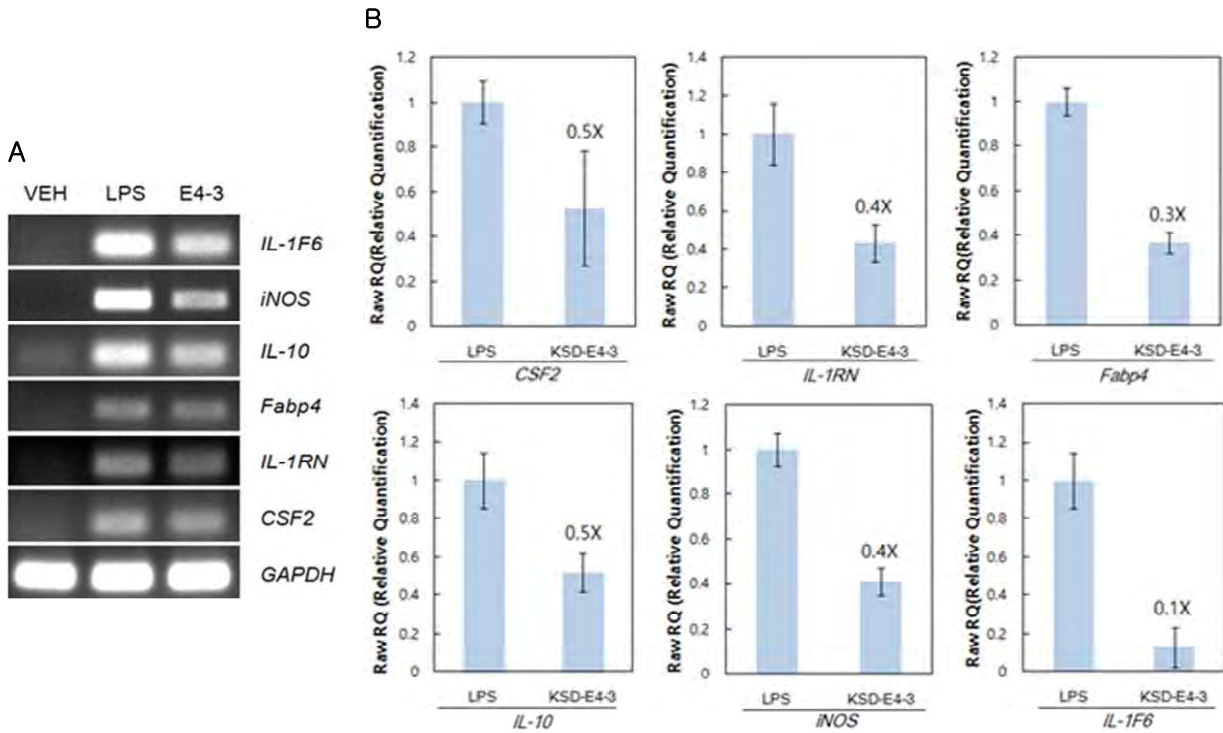
선별된 3종의 주박 분획물(KSD-E1-3, KSD-E2-3, KSD-E4-3)에 의한 염증 유도에 관련된 *iNOS*, *TNF-alpha*, *COX-2* 유전자의 발현 변화를 확인하였다(Fig. 3-2-8). 즉, 염증이 유도된 RAW 264.7 세포주에 주박 추출물을 150 µg/ml의 농도로 각각 처리한 후, 각 유전자 특이적인 primer를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, KSD-E4-3 분획물의 처리에 의해 *iNOS* 유전자와 *COX-2* 유전자의 발현이 현저하게 감소함을 확인 할 수 있었다.



**Fig. 3-2-8. Down-regulation of *iNOS*, *TNF-alpha*, and *COX-2* genes by three kinds of solvent fractions.** RAW 264.7 cells were treated three kinds of solvent fractions (KSD-E1-3, KSDE2-3, KSD-E4-3). Total RNA was prepared for RT-PCR with each gene specific primers.

(5) Oligo DNA microarray를 이용한 유전체 수준에서의 유전자 발현 분석 및 염증관련 유전자 발현 분석

주박 유기용매 분획물 KSD-E4-3에 의한 마우스 대식세포 RAW 264.7 세포주에서 nitric oxide (NO) 생성 저해 활성을 유전자 발현 수준에서 이해하고자, 염증이 유도된 RAW 264.7 세포주에 150  $\mu\text{g/ml}$ 의 KSD-E4-3 주박 분획물을 처리한 후, oligo DNA microarray 실험을 수행하였다. DNA microarray 실험 결과, 염증 유도와 관련이 있는 유전자 중 2배 이상 발현이 감소하는 유전자 6개(interleukin 1 family, member 6 [*IL-1F6*], nitric oxide synthase 2, inducible [*iNOS*], interleukin 10 [*IL-10*], fatty acid binding protein 4, adipocyte [*Fabp4*], interleukin 1 receptor antagonist [*IL-1RN*], colony stimulating factor 2 (granulocyte-macroph-age) [*CSF2*])를 선택하여 RT-PCR을 수행하였다. **Fig. 3-2-9A**에서 보는 바와 같이 150  $\mu\text{g/ml}$ 의 KSD-E4-3 처리에 의해 *IL-1F6*, *iNOS*, *IL-10*, *FABP4*, *IL-1RN*, 그리고 *CSF2*의 유전자의 발현이 모두 down-regulation 되는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 DNA microarray 실험 결과와 모두 일치하였다. 이러한 유전자의 발현을 정량적으로 확인하기 위하여 real-time PCR을 수행하였다. 그 결과, 유전자 발현변화가 *CSF2*에서 0.5배, *IL-1RN*에서 0.4배, *Fabp4*에서 0.3배, *IL-10*에서 0.5배, *iNOS*에서 0.4배, *IL-1F6*에서 0.1배로 유전자 발현이 감소된 것을 확인할 수 있었다(**Fig. 3-2-9B**). 이러한 연구결과는, 주박 추출물 및 이의 유기용매 분획물에 의한 항염증 활성은 염증 발생과 관련이 있는 여러 유전자의 발현을 억제함으로써 작용함을 시사한다. 또한, 향후 KSD-E4-3분획물의 추가적인 분획 및 분리방법을 통하여 이러한 분획물에 포함되어 있는 핵심 물질을 찾아내는 연구가 지속되어야 할 것으로 생각된다.



**Fig. 3-2-9. Confirmation of microarray data with RT-PCR and real time PCR.** Mouse RAW 264.7 cells were treated with 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of KSD-E4-3 and LPS. (A) Total RNA was prepared and used as a template for RT-PCR using gene specific primers. (B) Total RNA was prepared from treated cells and used as a template for real-time PCR with *CSF2*, *IL-1RN*, *Fabp4*, *IL-10*, *iNOS*, and *IL-1F6* gene-specific primers.

다. 주박과 누룩의 추출물 85종에 의한 암세포 항성장 활성 연구

(1) 주박 및 누룩 추출물 제조

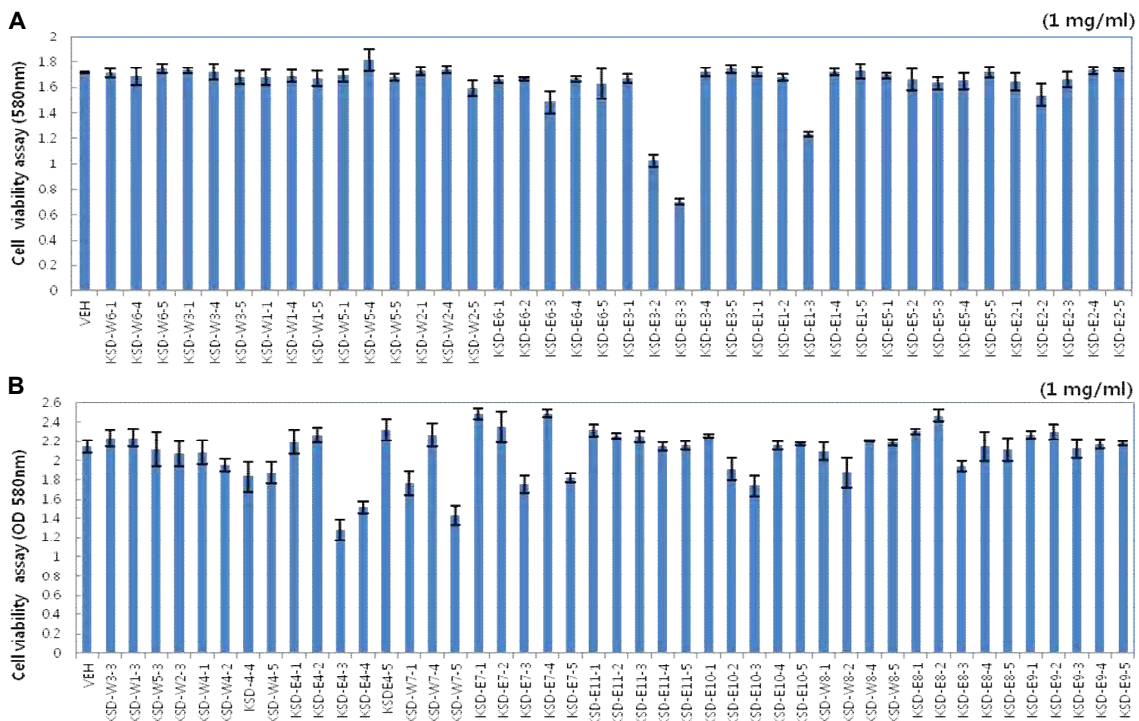
본 연구에서 사용된 총 85종의 추출물 및 분획물은 **Table 3-2-1**에 나타내었다.

(2) 85종의 주박 추출물 및 분획물이 세포생존율에 미치는 영향

주박 추출물 및 분획물이 대장암 세포주 HCT116의 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위하여 40종의 1차 추출물 및 분획물을 1 mg/ml의 농도로 처리한 다음 cell viability assay를 수행하였다. 주박 추출물 및 분획물의 대조물질로는 DMSO를 이용하였다. 그 결과 대부분의 추출물 및 분획물에 의해 cell viability 생성이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 KSD-E3-2, KSD-E3-3, 그리고 KSD-E1-3등의 시료에 의해 생존율이 크게 감소되는 것을 확인할 수 있었다(**Fig. 3-2-10A**).

2차 주박 추출물 및 분획물 45종에 의한 세포생존율을 측정하기 위해 1 mg/ml의 농도로 처리한 뒤 동일한 조건으로 cell viability assay를 수행하였다. 그 결과 KSD-E4-3, KSD-E4-4

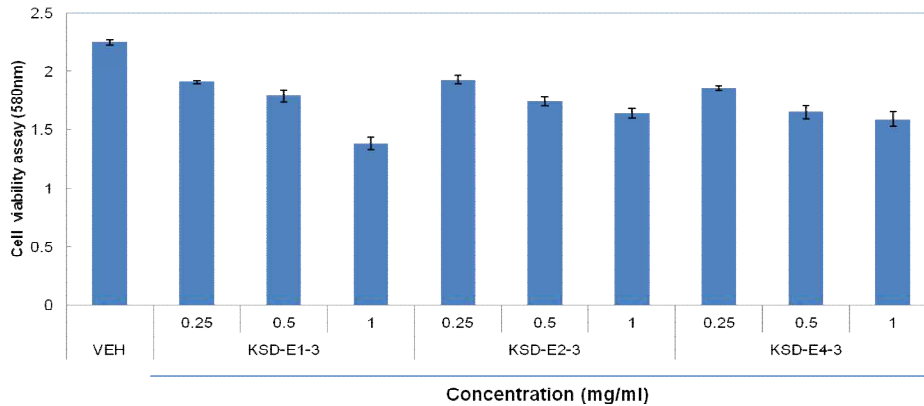
그리고 KSD-W7-5 등의 분획물에서 세포생존율의 큰 감소를 확인 할 수 있었다(Fig. 3-2-10B). 본 연구에서는 총 85종의 주박 추출물 및 분획물에 의한 cell viability assay에 결과와 마우스 대식 세포인 RAW264.7 세포주에 대한 세포 사멸결과(data not shown)를 종합하여 최종적으로 3종의 분획물(KSD-E1-3, KSD-E2-3, KSD-E4-3)을 선정하여 추후 실험을 진행하였다.



**Fig. 3-2-10. Effects of eighty-five kinds of lees extracts and their solvent fractions on HCT116 cell viabilities.** HCT116 cells were plated at  $1 \times 10^3$  cells/well in a 96-well plate and treated with eighty-five kinds of solvent fractions of lees extracts (1 mg/ml(A) and 1 mg/ml (B)) for 24hr. After treatment, cell viability was measured using MTS proliferation assay kit. Bars are mean values  $\pm$  SE from 4 independent experiments.

(3) 선별된 3종의 시료의 농도별 처리에 따른 세포생존율 측정

선별된 3종의 주박 추출물 및 분획물(KSD-E1-3, KSD-E2-3, KSD-E4-3)의 농도에 따른 처리가 HCT116세포 생존율에 미치는 영향을 연구하였다. 연구방법은 HCT116 세포주에 선별된 주박 추출물 및 분획물 3종을 0.25, 0.5, 1 mg/ml의 농도로 24시간 처리한 후, cell viability를 측정하였다. 그 결과 3종의 시료에 의해 농도 의존적으로 cell viability가 감소함을 확인할 수 있었으나, 이 중 KSD-E1-3에 의한 세포 생존율 감소가 가장 크게 일어남을 확인하였다 (Fig. 3-2-11). KSD-E1-3에 의한 유전체수준에서의 발현을 확인하기 위하여 oligo DNA microarray 실험을 진행하였다.

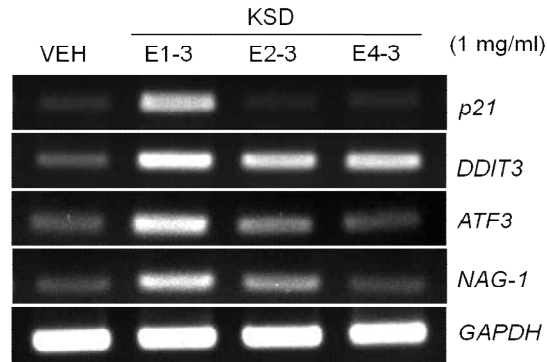


**Fig. 3-2-11. Effects of three kinds of solvent fractions on human HCT116 cell viabilities.** HCT116 cells were plated at  $1 \times 10^3$  cells/well in a 96-well plate and treated with three kinds of solvent fractions (KSD-E1-3, KSD-E2-3 and KSD-E4-3) of different concentrations (0.25, 0.5, and 1 mg/ml) for 24 hr. After treatment, cell viability was measured using MTS proliferation assay. Bars are mean values  $\pm$  SE from 4 independent experiments.

(4) Oligo DNA microarray를 이용한 유전체 수준에서의 유전자 발현 분석

선별된 3종의 시료중에서 가장 높은 항성장 활성을 보여준 KSD-E1-3 분획물을 1 mg/ml 농도로 HCT116 세포주에 처리한 후, oligo DNA microarray analysis를 수행하였다. DNA microarray 실험 결과, 2배 이상 발현이 증가되는 유전자중 항암 유전자 4개(Non-steroid Anti-inflammatory drug-activated gene-1 [*NAG-1*], Activating Transcription Factor 3 [*ATF3*], DNA-damage-inducible Transcript 3 [*DDIT3*], Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A [*CDKN1A*, *p21*])를 선별하였다. 세포 생존을 실험 결과에 따라 선별된 3종의 분획물을 1 mg/ml의 농도로 처리한 후, 4가지의 유전자 발현을 확인하였다. 그 결과, *p21* 유전자의 경우 KSD-E1-3에 의해서만 발현이 증가된 반면, *DDIT3*, *ATF3* 그리고 *NAG-1* 유전자는 처리한 모든 분획물에 의해 발현이 유도되었다(Fig. 3-2-12). 또한, 처리한 분획물 중 KSD-E1-3에 의해 모든 항암 유전자의 발현이 가장 높게 증가됨을 확인하였다.

*NAG-1* 유전자는 TGF- $\beta$ (Transforming Growth Factor- $\beta$ )의 superfamily의 한 종류로써, pro-apoptotic 및 anti-tumorigenic의 기능을 가지는 것으로 알려져 있으며, 최근 파이토케미칼과 같은 천연물에 의해 다양한 기작에 의해 *NAG-1* 유전자의 발현이 조절된다는 총설이 보고된 바 있다. *ATF3* 유전자는 전사조절인자로서 ATF/cAMP responsive element binding protein (CREB) family에 속하며, 천연물에 의해 발현이 증가되며 세포사멸과 관련이 있는 것으로 보고되었다. *DDIT3* 유전자는 endoplasmic reticulum stress에 의해 활성화되며 세포사멸과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. *p21WAF1/CIP1* 유전자는 대표적인 cyclin-dependent kinase inhibitor 중 하나로서, 세포주기 진행을 억제하는 역할을 수행한다.



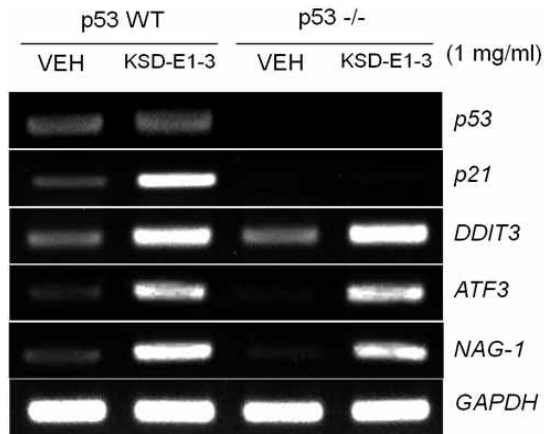
**Fig. 3-2-12. Up-regulation of *NAG-1*, *ATF3*, *DDIT3* and *p21* gene by three kinds of solvent fractions.** HCT116 cells were treated with three kinds of solvent fractions of lees extracts (KSD-E1-3, KSD-E2-3 and KSD-E4-3) for 24 hr. And then, total RNAs were extracted from treated cells and used for RT-PCR with *NAG-1*, *ATF3*, *DDIT3* and *p21* gene specific primers.

(5) KSD-E1-3에 의해 발현이 유도된 유전자의 p53 의존성 검증

암 억제 유전자인 *p53*은 DNA 손상으로 인해 발생할 수 있는 치명적인 영향으로부터 세포를 보호하는 역할 이외에 세포주기의 정지, 노화, apoptosis 등 다양한 역할을 수행하는 전사조절인자이다. 또한, 천연물의 처리에 의해 발현이 증가되며, 암세포 사멸과 직접적 관련성이 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 oligo DNA microarray 실험에 의해 선별된 4개의 유전자 발현이 전사조절인자 *p53*에 의존적인지 확인하고자 *p53* 유전자가 null인 HCT116 세포주를 이용하였다. *p53* wild type HCT116 세포주는 *p53*의 발현이 되는 것을 확인하였고, KSD-E1-3의 처리 유무에 관계없이 *p53* null 세포주에서는 *p53*이 발현되지 않았다. 선별된 4개의 유전자 중 *NAG-1*, *ATF3*, *DDIT3* 유전자는 *p53* 발현 유무에 관계없이 KSD-E1-3에 의해 발현이 증가됨을 확인하였다. 반면, *p21* 유전자의 경우 *p53*에 의해서만 KSD-E1-3에 의해 발현이 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 3-2-13).

연구결과를 종합하면 주박 추출물 및 분획물이 여러 항암 유전자 발현을 다양한 경로를 통하여 증가시킴으로써 암세포에 대한 항성장 활성을 나타냄을 증명하였다. 그러나, 선별된 KSD-E1-3 분획물의 작용기전을 이해하고, 항성장 활성의 핵심물질을 찾기 위해서는 추가 분획물을 제조하고, 추가적인 기전연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.





**Fig. 3-2-13. Effect of p53 on gene expression by KSD-E1-3.** HCT116 cells or *p53* null HCT116 were treated with 1 mg/ml KSD-E1-3 for 24 hr and then RT-PCR was performed using *p53*, *p21*, *ATF3*, *DDIT3* and *NAG-1* gene specific primers.

라. 고구마 소주 주박 추출물에 의한 항염증 활성 연구

(1) 고구마 소주 주박 추출물 및 분획물의 제조

본 연구에서 사용된 고구마 소주 주박은 (주)국순당에서 제공받아 사용하였으며, 다음의 절차에 따라 에탄올 추출물 및 유기용매 분획물을 제조하였다. 고구마 소주 주박 시료 1.5 kg에 95% 에탄올 6 L를 가하여 상온에서 3일간 2회 추출 하였고, 여과한 후 60°C에서 감압 농축하여 분말로 제조하였다. 추출된 추출물 4 g을 물에 현탁한 후, n-hexane, ethyl acetate 및 butanol을 이용하여 순차적으로 분획하고 최종적으로 물 잔류물을 회수하였다. 이렇게 준비된 시료를 각각 KSD-E8-1 ~ KSD-E8-5로 명명하였다(**Table 3-2-2**). 각 시료는 dimethyl sulfoxide (DMSO, sigma, USA)에 녹여 사용하였다.

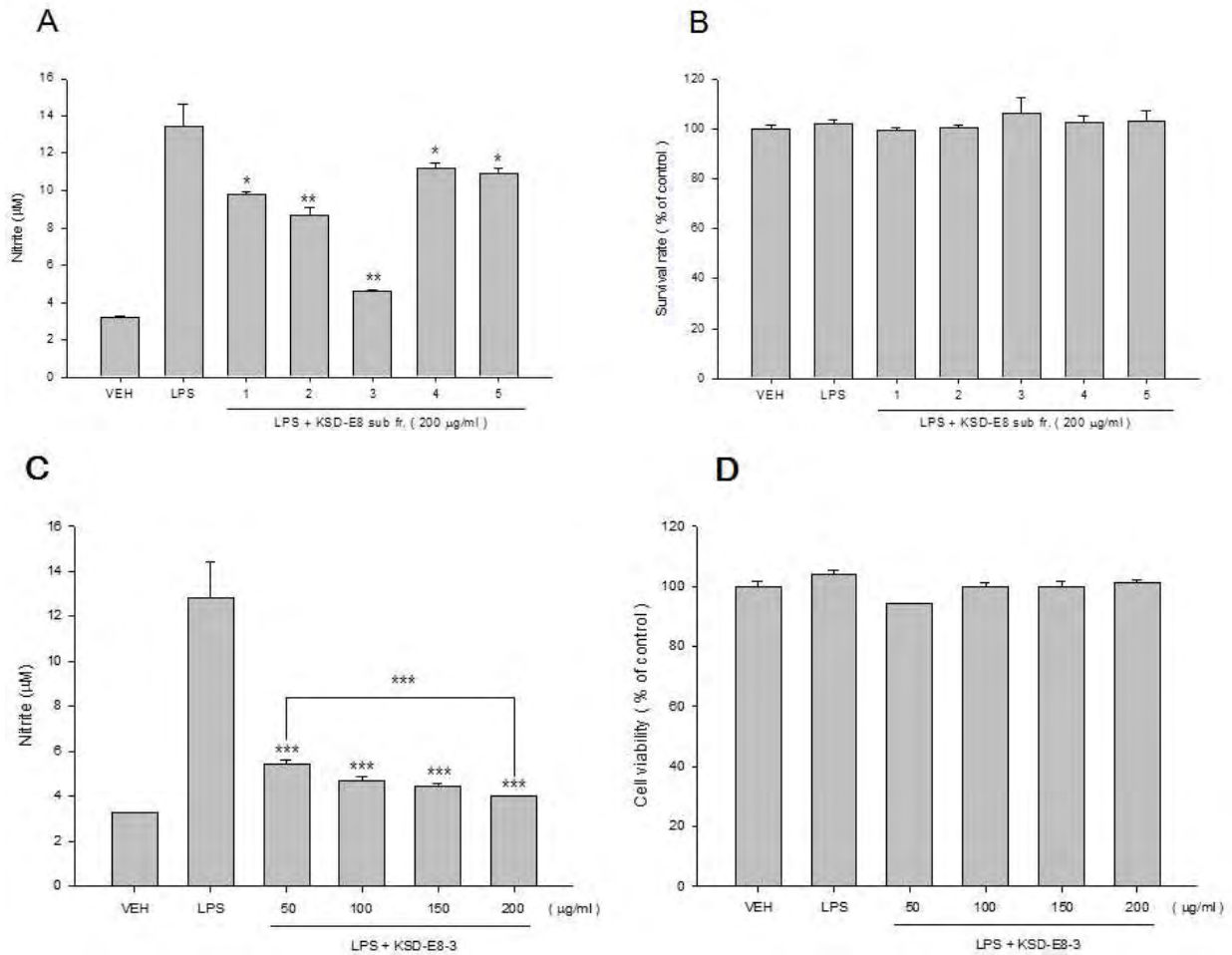
(2) 고구마 소주 주박 추출물의 유기용매 분획물이 Nitric oxide 생산과 생장에 미치는 영향

본 연구팀은 선행 연구로서 주박과 누룩 추출물 및 유기용매 분획물 85종에 의한 nitric oxide (NO) 생산 저해 활성을 보고 한 바 있다. 본 연구에서는 이 중 nitric oxide 생산 저해율은 매우 높으나, 현재까지 전혀 보고되지 않은 고구마 소주 주박 에탄올 추출물 및 유기용매 분획물(**Table 3-2-2**)이 NO 생산에 미치는 영향과 세포 생존에 미치는 영향을 연구하였다. 즉, 고구마 소주 주박 추출물 및 유기용매 분획물 (KSD-E8-1 ~ KSD-E8-5)이 NO 생산 및 세포 생존율에 미치는 영향을 연구하기 위해 LPS로 염증이 유도된 RAW 264.7 세포주에 각 시료를 200 µg/ml의 농도로 처리한 결과 **Fig. 3-2-14A** 에서 보는 바와 같이 KSD-E8-3 (ethyl acetate 분획물)의 처리에 의해 가장 높게 NO 생산이 저해되었다. 시료의 처리에 의한

Table 3-2-2. List of lees extract and its solvent fractions of sweet potato soju

Name	Sample name	Extract	Sample name	Extract or Fraction
Sweet Potato Soju	KSD-E8	80% EtOH	KSD-E8-1	Extract
			KSD-E8-2	H. fr.
			KSD-E8-3	EA fr.
			KSD-E8-4	B. fr.
			KSD-E8-5	W res

세포 생존율에 미치는 영향은 없는 것으로 확인되었다(Fig. 3-2-14B). KSD-E8-3의 농도 의존적인 처리에 따른 NO 생산에 미치는 영향을 연구하기 위하여 시료를 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포주에 50, 100, 150, 200 µg/ml의 농도로 처리한 후 NO 생산을 측정하였다. 그 결과, 시료를 50 µg/ml의 농도로 처리한 군부터 현저하게 NO 생산이 저해됨을 확인하였고, 시료의 처리 농도가 증가됨에 따라 NO 생산이 저해되는 농도 의존적인 양상을 보여 주었다(Fig. 3-2-14C). 한편, 처리한 시료의 농도에서 세포 생존율에는 영향이 없는 것으로 확인되었다(Fig. 3-2-14D). 이후 연구는 NO 생산의 저해율이 가장 높은 KSD-E8-3 시료를 이용하여 수행하였다.

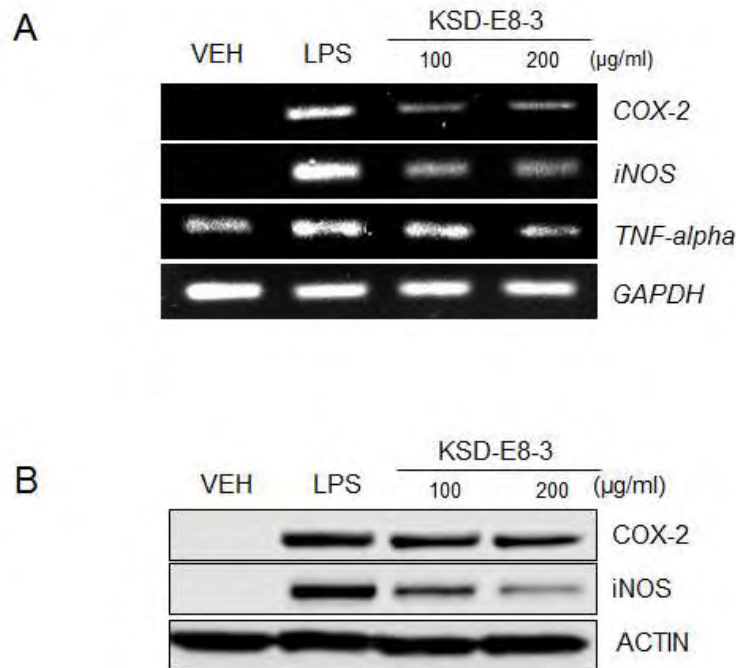


**Fig. 3-2-14. Effects of ethanol extract and its subsequent solvent fractions from lees of sweet potato soju on nitric oxide production and cell viabilities.** Mouse macrophage RAW 264.7 cells were plated at  $2 \times 10^5$  cells/well in a 96-well plate and (A, B) incubated with 200 mg/ml of each lees sample or (C, D) four different concentrations of KSD-E8-3. After 24 hr treatment, (A, C) nitric oxide production was measured by nitric oxide assay and (B, D) cell viability was measured using MTS proliferation assay kit.\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

### (3) Ethyl-acetate 분획물에 의한 pro-inflammatory 유전자 및 단백질 발현 감소

KSD-E8-3에 의한 염증 억제 기전을 연구하기 위해 100, 200 µg/ml 농도를 LPS로 염증 유도된 RAW 264.7 세포주에 처리 한 후, pro-inflammatory 유전자인 COX-2, iNOS 그리고 TNF-alpha 의 유전자 및 단백질 발현 변화를 조사하였다(Fig. 3-2-15A, B). 그 결과, LPS에 의해 염증이 유도된 대조군에 비해 전반적으로 억제하였으며 특히, iNOS의 경우 유전자와 단백질 모두 크게 감소함을 확인하였다. 이는 KSD-E8-3 처리에 의해 NO 생성이 크게 억제되는 Fig.3-2-14C의 결과와 부합하는 것으로 볼 수 있다. LPS에 의한 염증 유도 시 MAPK pathway 및 NF-κB 경로를 통해 COX-2, iNOS 그리고 TNF-alpha 등이 생산되며 PGE<sub>2</sub> 및 NO 생성 등을 통해 염증반응을 매개하는 것으로 알려져 있다. 이러한 결과를 통해

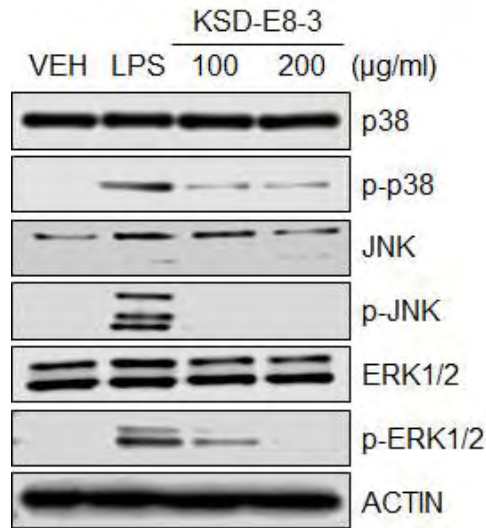
주박 추출물에 포함된 생리활성 물질이 NO 생성을 억제하고 pro-inflammatory 반응을 매개하는 인자들의 발현을 조절 할 수 있음을 알 수 있다.



**Fig. 3-2-15. Down-regulation of *COX-2*, *iNOS* and *TNF-a* genes by KSD-E8-3 treatment.** Mouse macrophage RAW 264.7 cells were treated with KSD-E8-3, and then total RNA and total protein were prepared from KSD-E8-3 treated cells. (A) Total RNA was used for RT-PCR with *COX-2*, *iNOS*, and *TNF-a* gene specific primers. (B) Western blot was carried out by using anti-*COX-2*, anti-*iNOS*, and anti-Actin antibodies.

#### (4) Ethyl-acetate 분획물에 의한 MAPK 단백질의 인산화 억제

MAPK는 세포 내 주요 신호전달 경로 중 하나로서 인산화를 통해 활성화되며 수많은 전사인자를 통해 다양한 단백질의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다. KSD-E8-3에 의한 NO 생산의 저해와 MAPK 경로와의 관련성을 검증 하기 위해 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에 처리하여 MAPK family에 속하는 p38, ERK1/2 그리고 JNK의 인산화 수준을 확인하였다. 그 결과, **Fig. 3-2-16**에서 보는 것과 같이 모든 MAPK 단백질의 인산화가 LPS만 단독 처리된 대조구에 비해 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다. 이 결과를 통해 KSD-E8-3에 포함된 생리활성 물질이 MAPK 단백질들의 활성화를 억제함으로써 TLR-4 & MD-2 복합체로부터 촉발된 신호 전달을 조절 할 수 있음을 알 수 있다.



**Fig. 3-2-16. Inhibition of phosphorylation of MAPK proteins by KSD-E8-3.** Mouse RAW 264.7 cells were treated with 100 mg/ml or 200 mg/ml of KSD-E8-3 and total protein was prepared from treated cells. And then, Western blot was carried out by using p38, phospho-p38, JNK, phospho-JNK, ERK1/2, phospho-ERK1/2 and Actin antibodies.

마. 한방이화주 주박 추출물에 의한 암세포 항성장 및 세포사멸 활성

(1) 한방이화주 주박 추출물 및 분획물의 제조

한방 이화주 주박은 (주)국순당 에서 제공 받아 사용하였으며, 제조방법은 다음의 절차에 따라 진행하였다. 주박의 에탄올 추출물은 시료 1.5 kg에 95% 에탄올 6 L 를 가하여 상온에서 3 일간 2회 추출 하였고, 여과한 후 60 °C 에서 감압 농축하여 분말로 제조하였다. 분말 4 g을 물에 현탁한 후, n-hexane, ethyl acetate 및 butanol을 이용하여 순차적으로 분획하고 최종적으로 물 잔류물을 회수하였다. 이렇게 준비된 시료를 각각 KSD-E3-1 ~ KSD-E3-5으로 명하였다 (Table 3-2-3). 추출물과 분획물은 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma, USA)에 녹여 -20 °C 에서 보관하며 실험에 사용하였다.

(2) 한방 이화주 주박 추출물의 유기용매 분획물이 세포 성장에 미치는 영향

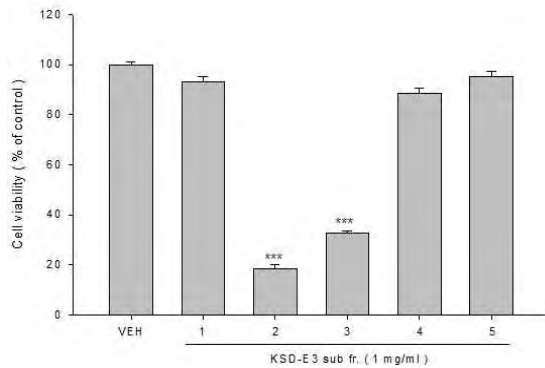
본 연구그룹은 선행연구에서 8종의 주박과 3종의 누룩으로부터 총 85종의 추출물 및 분획물을 제조하고, 이들의 암세포 항성장 활성을 보고한 바 있다. 본 연구에서는 Table 3-2-3에 나타낸 바와 같이 1차 선별된 주박 추출물 중 한방이화주 주박 (KSD-E3)으로 부터 제조한 80% 에탄올 추출물(KSD-E3-1), 이의 순차적 유기용매 분획물 3종 (KSD-E1-2, KSD-E1-3, KSD-E1-4)과 최종적으로 물 잔류물(KSD-E1-5)이 HCT116 세포주의 성장에 미치는 영향을

연구하였다. 그 결과 1차 선별 결과와 유사하게 KSD-E3-2 분획물과 KSD-E3-3 분획물에 의해 가장 높게 세포생존율이 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 3-2-17A). 현저한 암세포 성장률 감소를 보여준 KSD-E3-2 분획물과 KSD-E3-3 분획물의 농도에 따른 처리가 HCT116세포 생존율에 미치는 영향을 연구하였다. 즉, HCT116 세포주에 분획물 2종을 0.1, 0.25, 0.5, 그리고 1.0 mg/ml의 농도로 24시간 처리한 후 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과, KSD-E3-2 분획물을 처리한 경우 0.5 mg/ml의 농도 처리군부터 cell viability가 감소됨을 확인할 수 있었고, KSD-E3-3 분획물을 처리한 경우는 0.25 mg/ml의 농도 처리군부터 급격한 cell viability가 감소됨을 확인하였다(Fig. 3-2-17B). 이러한 결과에 근거하여 추후 실험을 위한 처리 농도는 KSD-E3-2 분획물은 세포 처리 농도를 0.5 mg/ml로 정하고, KSD-E3-3 분획물은 0.1 mg/ml로 정하였다.

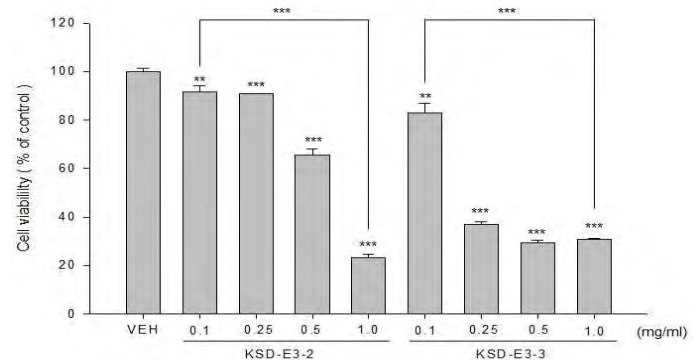
Table 3-2-3. List of lees extract and its solvent fractions of Ehwa Makgeolli

Name	Sample name	Extraction solvent	Sample name	Extract and Fraction
Ehwa Makgeolli	KSD-E3	80% EtOH	KSD-E3-1	Extract
			KSD-E3-2	Hexane fr.
			KSD-E3-3	Ethyl Acetate fr.
			KSD-E3-4	Butanol fr.
			KSD-E3-5	Water residue

A



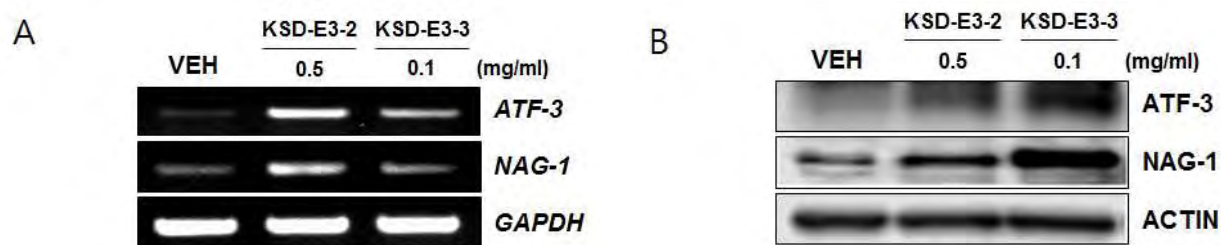
B



**Fig. 3-2-17. Effects of organic solvent fractions of lees extracts from Ehwa Makgeolli on HCT116 cell viabilities.** (A) HCT116 cells were plated at  $3 \times 10^3$  cells / well in a 96-well plate and incubated with five different samples from lees of Ehwa Makgeolli for 24hr. And then, cell viability was measured using MTS proliferation assay. (B) Cells were treated with five different concentrations of KSD-E3-2 and KSD-E3-3. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

### (3) 유기용매 분획물에 의한 ATF3와 NAG-1 유전자 및 단백질의 발현 증가

한방 이화주 주박의 hexane 분획물(KSD-E3-2)과 ethyl acetate 분획물(KSD-E3-3)에 의해 pro-apoptotic 유전자인 *ATF3*와 *NAG-1*의 발현에 미치는 영향을 연구하였다. KSD-E3-2 분획물은 0.5 mg/ml, KSD-E3-3 분획물은 0.1 mg/ml의 농도로 24시간 동안 처리한 다음, *NAG-1*과 *ATF3*의 유전자의 발현을 확인하였다. **Fig. 3-2-18A**에서 보는 바와 같이 두 분획물의 처리에 의해 *ATF3*와 *NAG-1* 유전자의 발현이 모두 증가되었다. 또한, 동일한 분획물 처리 조건하에서 *ATF3*와 *NAG-1* 단백질의 발현을 확인하기 위하여 Western blot을 수행하였다. 그 결과, **Fig. 3-2-18B**에서 보는 바와 같이 두 단백질 모두 발현이 증가되었으며 KSD-E3-3 분획물 처리군의 경우 KSD-E3-2 분획물 처리군 보다 낮은 농도임에도 불구하고 *ATF3*와 *NAG-1*의 단백질의 발현을 훨씬 높게 증가시켰다. 이것은 KSD-E3-3 분획물에 포함되어 있는 생리활성물질이 좀 더 강력한 *ATF3*와 *NAG-1* 단백질의 유도물질임을 시사한다.

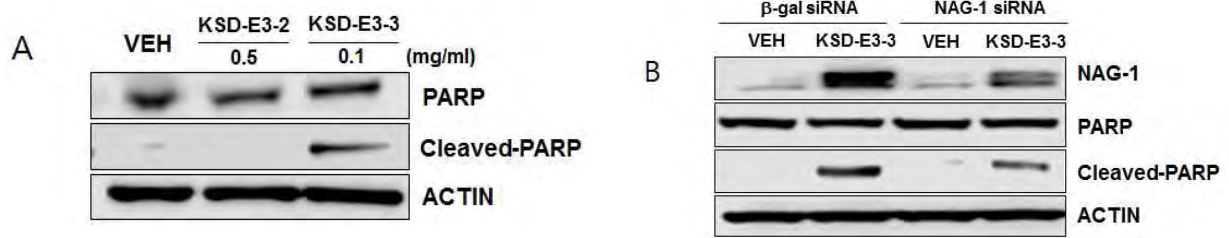


**Fig. 3-2-18.** Up-regulation of NAG-1 and ATF3 by the treatment of KSD-E3-2 and KSD-E3-3. HCT116 cells were incubated with KSD-E3-2 and KSD-E3-3 for 24 hr. And then, total RNAs or proteins were prepared from treated cells. (A) Total RNA was used for RT-PCR with *NAG-1* and *ATF3* gene specific primers. (B) Western blot was carried out by using anti-NAG-1, anti-ATF-3 and anti-Actin antibodies.

#### (4) *NAG-1* siRNA의 도입에 의한 세포 사멸의 회복

KSD-E3-3 (한방이화주 주박 ethyl acetate 분획물)에 의한 세포생존율의 감소의 원인이 apoptosis와 관련이 있는지 확인하기 위하여, apoptosis의 지표인자 중의 하나인 Poly-ADP ribose polymerase (PARP) 단백질의 cleavage를 확인하였다. 그 결과, 0.1 mg/ml의 KSD-E3-3 분획물의 처리에 의해 PARP cleavage가 관찰되었고, 이는 KSD-E3-3에 의해 apoptosis가 유도됨을 시사한다(**Fig. 3-2-19A**). KSD-E3-3 분획물의 처리에 의해 유도되는 apoptosis가 *NAG-1* 유전자의 발현 증가를 통해서 이루어지는지 확인하기 위하여 *NAG-1* siRNA를 이용하여 증명하였다. 즉, HCT116 세포주에 대조구인 b-gal siRNA와 *NAG-1* siRNA를 transfection한 후, 24시간 후에 KSD-E3-3 분획물을 0.1 mg/ml 농도로 처리 혹은 DMSO를 처리하였다. **Fig. 3-2-19B**에서 보는 바와 같이 b-gal siRNA를 transfection 후 KSD-E3-3 분획물을 처리한 경우 *NAG-1* 단백질이 현저하게 증가되고, 또한 PARP cleavage도 관찰됨으로써 apoptosis가 정상적으로 일어남을 확인하였다. 반면, *NAG-1* siRNA를 transfection 후 KSD-E3-3 분획물을 처리한 경우, *NAG-1* 단백질의 발현이 현저하게 감소하였으며, PARP cleavage 또한 현저히 감소됨을 확인하였다(**Fig. 3-2-19B**). 이러한 연구결과는 한방이화주 주박의 ethyl acetate 분획물인 KSD-E3-3의 처리에 의해 apoptosis가 유도되며, 이러한 apoptosis는 암 억제 유전자인 *NAG-1*의 발현증가와 직접적인 관련성이 있음을 시사한다. 향후, KSD-E3-3 분획물로부터 apoptosis와 직접적인 관련성이 있는 핵심물질을 찾는 연구가 지속되어야 할 것으로 판단된다.





**Fig. 3-2-19. Induction of apoptosis by the treatment of KSD-E3-3 and recovery of apoptosis by NAG-1 siRNA transfection.** (A) HCT116 cells were treated with 0.5 mg/ml KSD-E3-2 or 0.1 mg/ml KSD-E3-3 for 24 hr, and treated cells were collected for Western blot analysis using PARP, cleaved PARP, and Actin antibodies. (B) Either b-gal siRNA (control) or NAG-1 siRNA was transfected into HCT116 cells. After 24 hr, cells were treated with DMSO (vehicle) or 0.1 mg/ml KSD-E3-3. After 24 hr treatment, cells were collected for Western blot analysis using NAG-1, PARP, cleaved-PARP, and Actin antibodies.

바. 옛날 막걸리 및 백세주 주박의 조분획물에 의한 항염증 및 항암 활성 연구

(1) 옛날 막걸리 및 백세주 주박의 조 분획물 제조

생리활성을 나타내는 KSD-E1-3와 KSD-E4-3 분획물은 silica gel column chromatography로 정제하였다. Column (length 80 cm, diameter 4 cm)에 silica gel (0.063~0.200 mm, Merck, Germany)을 25 cm 채우고 용매는 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100% 로 mobile phase의 elution을 시작하여 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH=10:0, 8:2, 6:4, 4:6, 2:8, 0:10의 순으로 극성을 높이면서 각각 elution 시켜 총 11개의 소분획물을 얻었다(**Table 3-2-4**). 각각의 시료는 DMSO에 100 mg/ml의 농도로 제조한 후 aliquot하여 -20°C에서 저장하여 사용하였다.

Table 3-2-4. List of eleven kinds of sub-fraction of lees extracts and their solvent fractions

NO.	Sample Name	Fractions *MC : MeOH
KSD-E1-3 (Yet-Nal Makgeolli)	E-1-3-1	10 : 0
	E-1-3-2	8 : 2-1
	E-1-3-3	8 : 2-2
	E-1-3-4	6 : 4
	E-1-3-5	4 : 6
KSD-E4-3 (Bekse-Ju)	E-4-3-1	10 : 0
	E-4-3-2	8 : 2
	E-4-3-3	6 : 4
	E-4-3-4	4 : 6
	E-4-3-5	2 : 8
	E-4-3-6	0 : 10

\*MC : Methylene Chloride

(2) KSD-E1-3 소분획물 5종에 의한 암세포 생존율 측정

암세포 항성장 활성을 나타내는 KSD-E1-3의 소분획물 5종이 HCT116의 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위하여 각각 1 mg/ml의 농도로 처리한 다음 cell viability assay를 수행하였다. 그 결과 모든 소분획물에서 생존율이 감소되었으며, 그 중 KSD-E1-3-3의 소분획물에 의해 41%로 가장 크게 감소되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3-2-20).

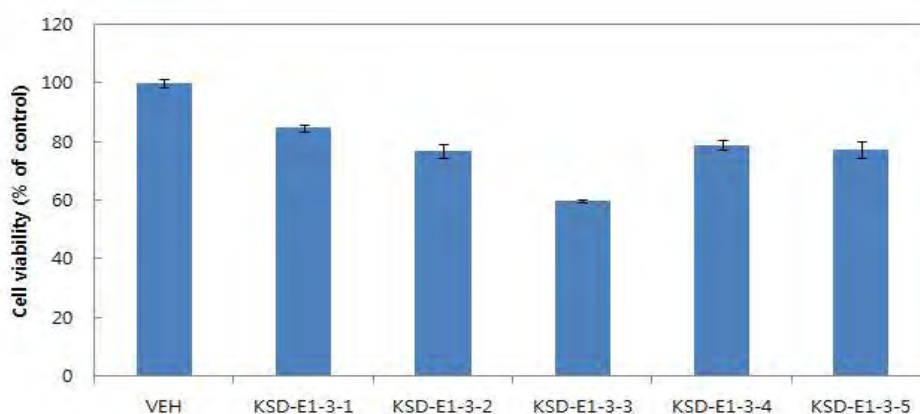
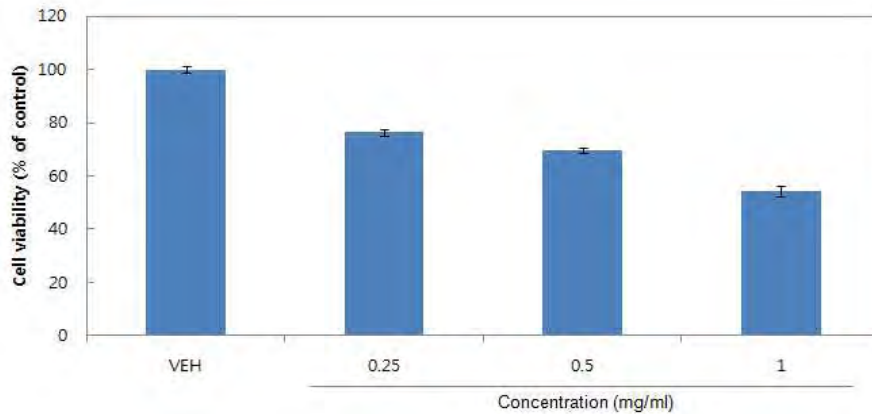


Fig. 3-2-20. Effects of five kinds of sub-fractions of lees extracts and their solvent fractions on HCT116 cell viabilities. HCT116 cells were plated at  $1 \times 10^3$  cells/well in a 96-well plate and treated with five kinds of sub-fractions of lees extracts (1 mg/ml) for 24 hr. After treatment, cell viability was measured using MTS proliferation assay kit.

(3) 선별된 KSD-E1-3-3의 농도별 처리에 따른 세포생존율 측정

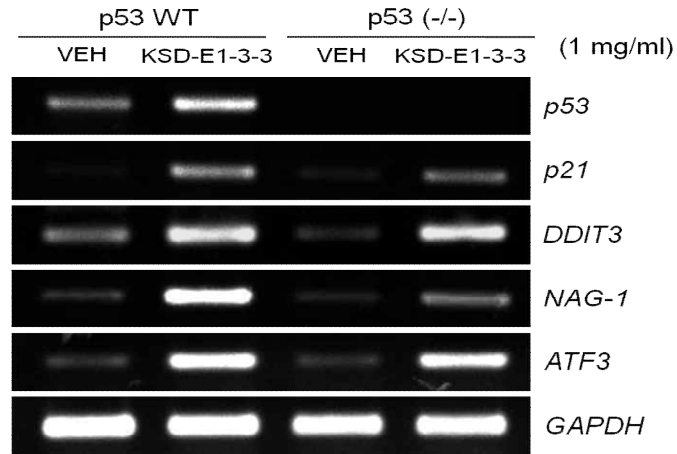
소분획물 KSD-E1-3-3의 농도에 따른 HCT116 세포의 생존율에 미치는 영향을 연구하였다. 연구방법은 HCT116 세포주에 선별된 KSD-E1-3-3 소분획물을 0.25, 0.5 그리고 1 mg/ml의 농도로 24시간 처리한 후, cell viability를 측정하였다. 그 결과 농도 의존적으로 cell viability가 감소하였으며, 1 mg/ml의 농도에서 가장 우수한 암세포 항성장 활성을 확인하였다 (Fig. 3-2-21).



**Fig. 3-2-21. Effects of sub-fraction KSD-E1-3-3 on human HCT116 cell viabilities.** HCT116 cells were plated at  $1 \times 10^3$  cells/well in a 96-well plate and treated with sub-fraction (KSD-E1-3-3) of different concentrations (0.25, 0.5, and 1 mg/ml) for 24 hr. After treatment, cell viability was measured using MTS proliferation assay.

(4) KSD-E1-3-3에 의한 *ATF3*, *NAG-1*, *DDIT3*, *p21* 그리고 *p53* 유전자의 발현 연구

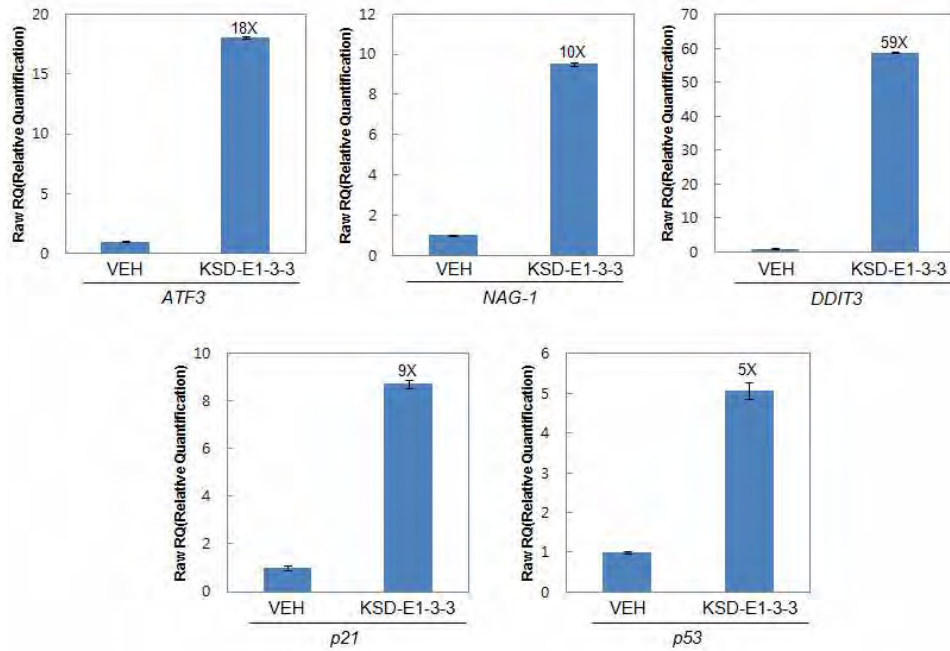
KSD-E1-3-3을 1 mg/ml의 농도로 처리한 후 5종류의 유전자 발현을 확인하였다. 그리고 *p53*의 의존성을 확인하기 위해서 *p53* null HCT116 세포주를 이용하였다. 그 결과, *ATF3*, *NAG-1*, *DDIT3* 그리고 *p21*에서 *p53*의 존재 유무 상관없이 KSD-E1-3-3에 의해 발현이 증가됨을 확인하였다. 또한 KSD-E1-3-3의 처리 유무에 관계없이 *p53* null 세포주에서는 *p53*이 발현되지 않았다(Fig. 3-2-22).



**Fig. 3-2-22.** Up-regulation of *NAG-1*, *ATF3*, *DDIT3*, *p21* and *p53* genes by **KSD-E1-3-3**. HCT116 cells were treated with KSD-E1-3-3 for 24 hr. And then, total RNA were extracted from treated cells and used for RT-PCR with *ATF3*, *NAG-1*, *DDIT3*, *p21* and *p53* gene specific primers.

(5) Quantitative real-time PCR을 통한 유전자 발현 분석

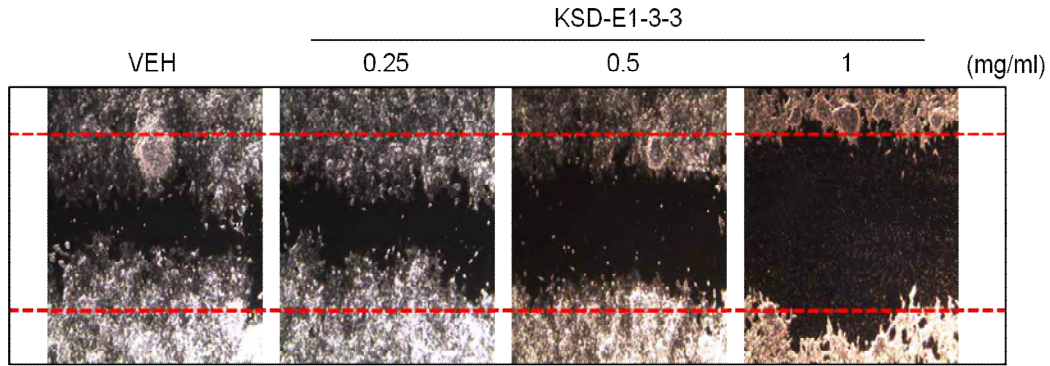
유전자의 발현을 정량적으로 확인하기 위하여 quantitative real-time PCR을 수행하였다. 그 결과, *ATF3* 유전자에서 18배, *NAG-1* 유전자에서 10배, *DDIT3* 유전자에서 59배, *p21* 유전자에서 9배 그리고 *p53* 유전자에서 5배로 유전자 발현이 전부 증가되었다(**Fig. 3-2-23**).



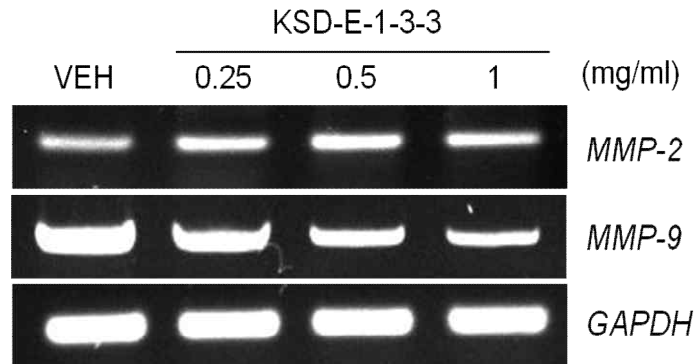
**Fig. 3-2-23.** Up-regulation of *ATF3*, *NAG-1*, *DDIT3*, *p21* and *p53* genes by **KSD-E1-3-3**. HCT116 cells were treated with 1 mg/ml KSD-E1-3-3. Total RNA was prepared from treated cells and used as a template for real-time PCR with *ATF3*, *NAG-1*, *DDIT3*, *p21* and *p53* gene-specific primers.

(6) KSD-E1-3-3에 의한 HCT116 세포의 이동성 억제

소분획물 KSD-E1-3-3에 의한 HCT116 세포의 이동성 억제를 연구하기 위해 wound healing migration assay를 수행하였다. 그 결과, 대조군에 비해 소분획물 KSD-E1-3-3 처리 농도가 증가 할수록 HCT116 세포의 전이 능력이 감소가 되어 wound area에 큰 변화가 없음을 확인할 수 있었다(**Fig. 3-2-24**). 암세포의 전이와 관련이 있는 대표적인 유전자 *MMP2*와 *MMP9* 유전자의 발현 변화를 확인하였다. 그 결과, *MMP2* 유전자의 발현 변화는 없었으나 *MMP9* 유전자는 처리한 소분획물 농도 의존적으로 유전자 발현이 감소함을 확인할 수 있었다(**Fig. 3-2-25**). 기질금속단백분해효소(Matrix metallo proteinases, MMPs)는 염증조직 파괴에 핵심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 그 중 *MMP9*의 경우 암세포에서 활성이 높게 활성 되어 침윤 및 전이에 중요한 역할을 한다.



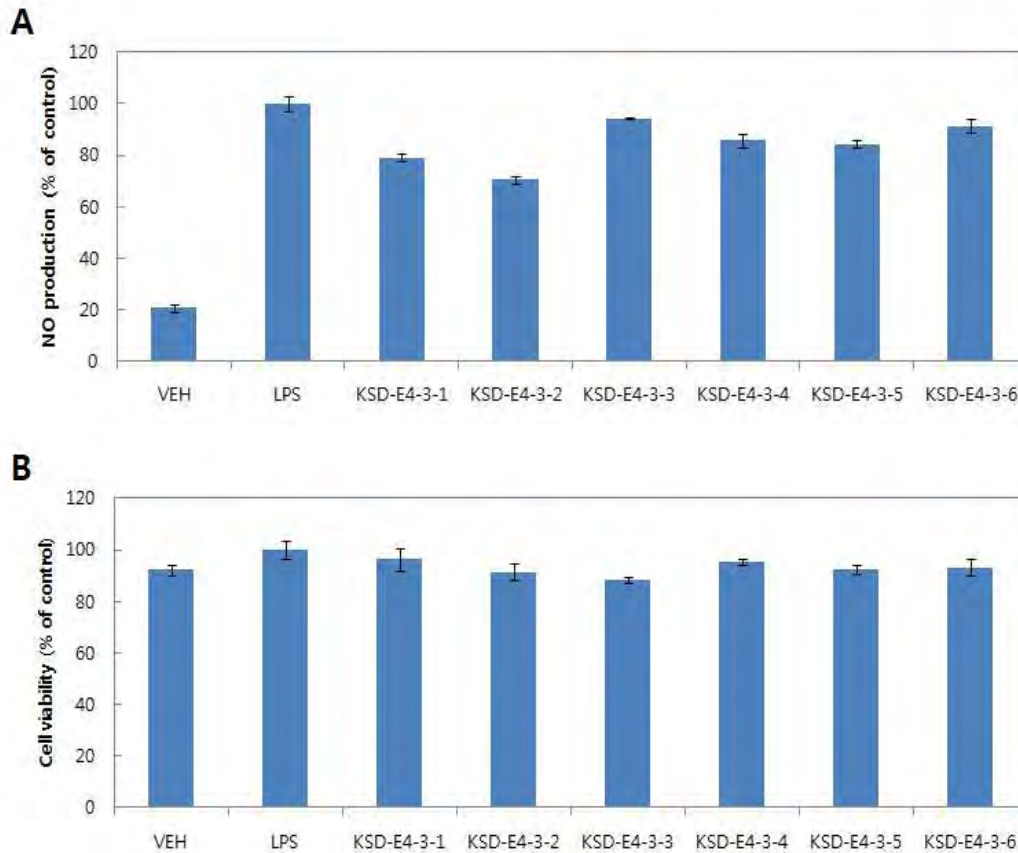
**Fig. 3-2-24. Effects of sub-fraction KSD-E1-3-3 on cell motility in HCT116 cells.** HCT116 cells were grown to confluency on 60mm cell culture dishes. Scratch was then made through the cell layer using a pipette tip. After washing with PBS, serum free media containing either vehicle or KSD-E1-3-3 (0.25, 0.5 and 1 mg/ml) was added for the 24 hr.



**Fig. 3-2-25. Down-regulation of *MMP2* and *MMP9* genes by KSD-E1-3-3.** HCT116 cells were treated with KSD-E1-3-3 for 24 hr. And then, total RNA were extracted from treated cells and used for RT-PCR with *MMP2* and *MMP9* gene specific primers.

(7) RAW264.7 세포주에서 KSD-E4-3의 소분획물에 의한 NO 생성과 세포 생존을 측정

항염증 활성이 보고된 KSD-E4-3로부터 6종의 소분획물을 획득하여, RAW264.7 세포주에서 NO 생성 및 세포 생존율에 미치는 영향을 연구하였다. 그 결과 모든 소분획물에서 NO 생성이 감소되는 반면, 세포 생존율에는 큰 영향을 주지 않음을 확인 할 수 있었다(**Fig. 3-2-26**). 그 중 KSD-E4-3-2의 소분획물 처리군에서 NO 생성율이 염증유도물질인 LPS 처리군에 비해 30% 감소하여 가장 낮았으며, 세포 생존율에는 큰 영향을 주지 않음을 확인할 수 있었다.



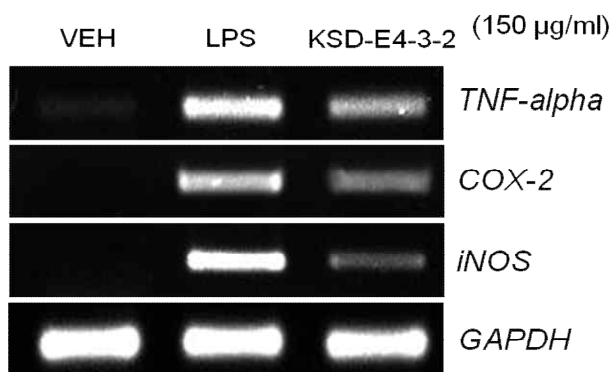
**Fig. 3-2-26. Effects of six kinds of sub-fractions of solvent fractions on mouse RAW264.7 cell viabilities.** NO production was measured by nitric oxide assay(A) and viability(B) was measured using MTS proliferation assay kit (150  $\mu$ g/ml).

(8) KSD-E4-3-2에 의한 *iNOS*, *TNF- $\alpha$*  그리고 *COX-2* 유전자의 발현 연구

소분획물 KSD-E4-3-2를 150  $\mu$ g/ml의 농도로 처리한 후, pro-inflammatory 유전자 3가지의 발현을 확인하였다. 그 결과, *iNOS*, *TNF- $\alpha$*  그리고 *COX-2* 유전자 모두 KSD-E4-3-2 처리에 의한 유전자 발현이 감소됨을 확인하였다(Fig. 3-2-27). NO는 세 가지 NOS isoform (neuronal NOS [nNOS], endothelial NOS [eNOS], inducible NOS [iNOS])에 의해 생성되는 자유 라디칼인데, 이 중 iNOS는 염증성 자극에 의해 조절이 된다. 이러한 iNOS의 발현이 증가하게 되면 L-citrullin과 nitric oxide를 생성하게 되며, 염증 및 종양 형성에 중요한 인자가 된다고 알려져 있다. COX (cyclooxygenase)는 prostaglandin 형성에 이용되는 물질로 알려져 있으며, COX-1, COX-2의 두 가지 형태가 있다. 그 중 COX-2는 cytokines, mitogen 등의 요인에 의하여 자극 받게 되면 암세포의 세포사멸을 방해하고 염증을 유발한다. 이러한 COX-2는 NSAIDs (nonsteroidal anti-inflammatory drugs) 또는 선택적 COX-2 억제제에 의해 조절

된다. TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ )는 면역 반응 시 초기에 분비되는 세포활성물질로 다양한 질환의 염증반응조절에 관여한다. 특히 pro-inflammatory 기능에 있어서 중요한 cytokine으로 혈압강하, 발열, 대사과정의 손실을 유발한다고 알려져 있다.

이러한 연구결과는 다양한 주박 추출물 및 분획물이 암세포 항성장 및 항염증 활성을 가지고 있으며, 다양한 기전에 의해 이러한 생리활성을 가지는 것을 시사한다. 향후 생리활성을 가지고 있는 단일 핵심물질을 정제하는 과정이 필요하며, 이러한 단일 핵심물질에 의한 작용기전을 이해하기 위한 연구가 진행되어야 할 것이다.



**Fig. 3-2-27. Down-regulation of *iNOS*, *COX-2* and *TNF- $\alpha$*  gene by KSD-E4-3-2.** RAW264.7 cells were treated 150  $\mu$ g/ml KSD-E4-3-2 for 18 hr. And total RNA was prepared. RT-PCR was performed with *iNOS*, *COX-2* and *TNF- $\alpha$*  gene specific primers.

### 사. 주박 유래 pure compounds에 의한 항염증 및 항암 활성 연구

#### (1) 주박 유래 순수 물질 11종 제조

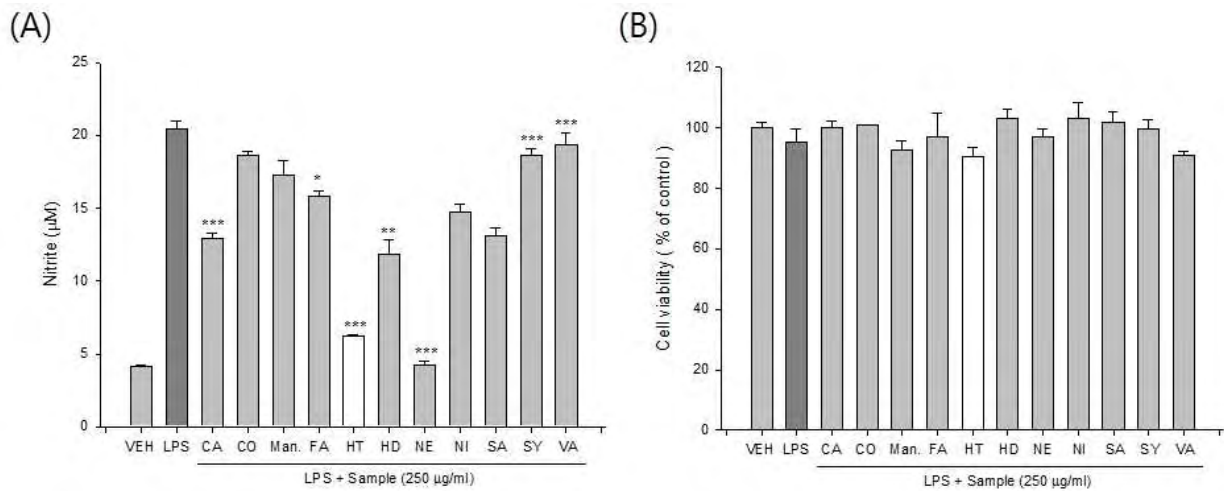
주박으로부터 정제된 순수 물질은 제1세부 과제팀으로부터 총 11종을 제공받았으며, 정제 방법은 제1세부과제 연구결과에 잘 명시되어 있다. 본 연구에 사용한 순수물질 11종은 caffeic acid (CA), p-coumaric acid (CO), 1,4:3,6-dianhydro-mannitol (Man), ferulic acid (FA), hesperetin (HT), hesperedin (HD), naringenin (NE), naringin (NI), sinapic acid (SA), syringic acid (SY), 그리고 vanillic acid (VA) 등이다.

#### (2) 순수 물질 11종이 RAW264.7세포에서 nitric oxide 생산과 세포생존율에 미치는 영향

LPS 처리에 의해 염증이 유도된 RAW 264.7 세포주에 주박 추출물에서 분리한 순수물질 11종을 250  $\mu$ g/ml의 농도로 처리한 다음 nitric oxide assay를 수행하였다. 대조구로는



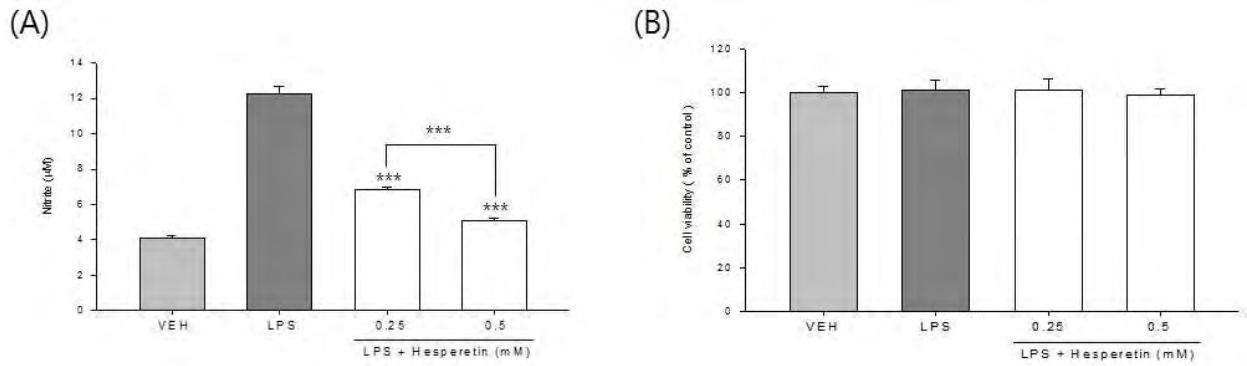
DMSO를 처리하였다. 또한, 세포생존율을 측정하기 위해 nitric oxide assay에서 실시한 동일한 조건으로 순수물질을 RAW 264.7 세포주에 처리한 후 cell viability assay를 수행하였다. 그 결과, **Fig. 3-2-28A**에서 보는 바와 같이 처리한 순수물질 중 hesperetin과 naringenin에 의해 가장 높게 NO 생산이 저해됨을 확인하였다. 그러나, 동일한 처리 조건에서 세포 생존율에는 영향이 없는 것으로 확인되었다(**Fig. 3-2-28B**).



**Fig. 3-2-28. Effects of eleven different kinds of pure compounds on NO production and cell viabilities in mouse RAW 264.7 cells.** Mouse RAW264.7 cells were plated at  $2 \times 10^5$  cells/well in a 96-well plate and incubated with 250 µg/ml of eleven different kinds of pure compounds for 16 hr. And then, (A) NO production was measured by NO assay. (B) Cell viability was measured using MTS proliferation kit. Values indicate means SD(n=4). \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001

(3) Hesperetin이 RAW264.7세포에서 nitric oxide 생산과 세포생존율에 미치는 영향

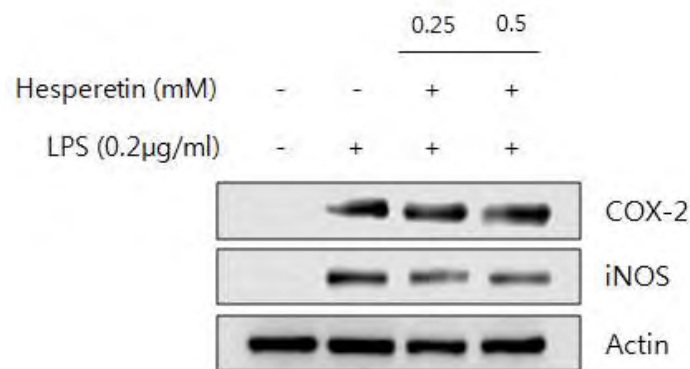
Hesperetin 처리가 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포주에서 NO 생산과 cell viability에 미치는 영향을 연구하였다. **Fig. 3-2-29A**에서 보는 바와 같이, 처리한 hesperetin의 농도 의존적으로 NO 생산이 감소됨을 확인하였다. 그러나, 동일한 처리 조건에서 세포 생존율에는 영향이 없는 것으로 확인되었다(**Fig. 3-2-29B**).



**Fig. 3-2-29. Effects of hesperetin on NO production and cell viabilities in mouse RAW264.7 cells.** RAW264.7 cells were plated at  $2 \times 10^5$  cells/well in a 96-well plate and incubated with 2 mM of hesperetin for 16 hr. (A) And then, NO production was measured by NO assay. (B) Cell viability was measured using MTS proliferation assay kit.

(4) Hesperetin에 의한 pro-inflammatory 단백질 발현 감소

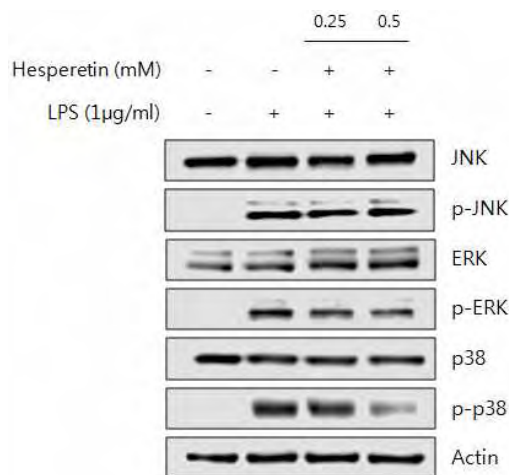
Hesperetin에 의한 염증 억제 기전을 연구하기 위해 100, 200 µg/ml 농도를 LPS로 염증 유도된 RAW 264.7 세포주에 처리 한 후, pro-inflammatory 단백질인 COX-2와 iNOS 단백질 발현 변화를 확인 하였다(Fig. 3-2-30). 그 결과, LPS에 의해 염증이 유도된 대조군에 비해 COX-2 단백질의 변화는 관찰되지 않았으나, iNOS 단백질의 발현은 감소하였다. 이러한 결과를 통해 Hesperetin이 NO 생성을 억제하고 pro-inflammatory 반응을 매개하는 인자들의 발현을 조절 할 수 있음을 알 수 있다.



**Fig. 3-2-30. Down-regulation of COX-2 and iNOS proteins by the treatment of hesperetin.** RAW264.7 cells were treated with LPS (0.2 µg/ml) and 0.25 or 0.5 mM of hesperetin and cell lysates were prepared and subjected to Western blotting by using antibodies against COX-2 or iNOS.

(5) Hesperetin에 의한 p38 MAPK 단백질의 인산화 억제

MAPK는 세포 내 주요 신호전달 경로 중 하나로서 인산화를 통해 활성화되며 수많은 전사인자를 통해 다양한 단백질의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다. Hesperetin에 의한 NO 생산의 저해와 MAPK 경로와의 관련성을 검증 하기위해 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에 처리하여 MAPK family 에 속하는 p38, ERK1/2 그리고 JNK 의 인산화 수준을 확인하였다. 그 결과, **Fig. 3-2-31**에서 보는 것과 같이 p38 MAPK 단백질의 인산화가 LPS 만 단독 처리된 대조구에 비해 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다. 이 결과를 통해 Hesperetin이 p38 MAPK 단백질의 인산화를 억제함으로써 NO 생산을 억제함을 확인할 수 있었다.



**Fig. 3-2-31. Suppression of p38 signaling by the treatment of hesperetin.** RAW264.7 cells were pre-treated with 0.25 or 0.5 mM of hesperetin for 4 hr and stimulated with LPS (1 µg/ml) for 30 min. Cell lysates were prepared and Western blot was carried out by using antibodies against ERK-1, p-ERK1/2, JNK, p-JNK, p38, p-p38 or Actin.

(6) 순수물질 11종에 의한 암세포 성장 억제 활성

전통주 주박으로부터 분리한 순수 분리한 11종에 의한 대장암 세포주 HCT116의 성장억제 활성을 정량적으로 확인하기 위하여 각 시료를 1 mg/ml의 농도로 처리한 후, 24 시간 후에 cell viability assay를 수행하였다. 그 결과 **Fig. 3-2-32A**에서 보는 바와 같이 p-coumaric acid (CO), Hesperetin (HT), 그리고 Narigenin (NE)에 의해 급격한 세포 생존율 감소를 확인할 수 있었으며, 특히 hesperetin의 처리에 의해 세포 생존율 감소율이 가장 높았다. 이러한 세 가지의 물질의 농도 의존적인 처리에 따른 세포생존율 감소를 확인하였다. 즉, 각 물질을 1.0, 2.5, 5.0, 그리고 10 mM의 농도로 처리한 후 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과,

Fig. 3-2-32B에서 보는 바와 같이 p-coumaric acid, hesperetin, 그리고 naringenin 처리에 농도의존적으로 세포 생존율이 감소함을 확인할 수 있었다.

향후, 감귤과의 과일에 풍부한 flavonoid 중의 하나인 hesperetin과 naringenin에 의한 암세포 항성장 활성, 세포사멸, 이러한 활성의 작용기전등을 규명할 예정이다.

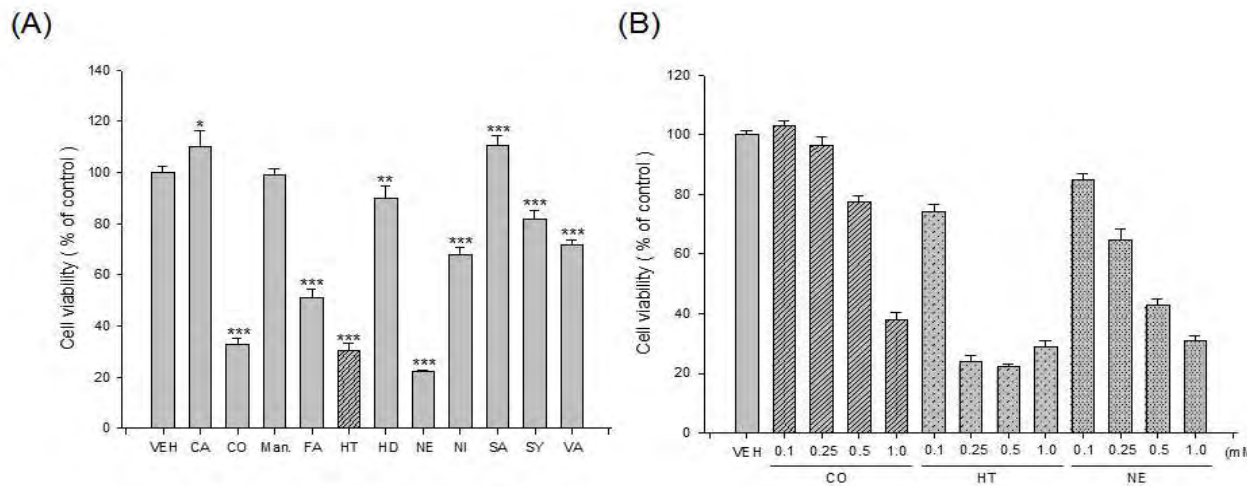


Fig. 3-2-32. Effects of eleven kinds of pure compounds from lees on HCT116 cell viabilities. HCT116 cells were plated at  $3 \times 10^3$  cells / well in a 96-well plate and (A) incubated with eleven different kinds of pure compounds isolated from lees for 24hr. And then, cell viability was measured using MTS proliferation assay. (B) Cells were treated with four different concentrations of p-coumaric acid, hesperetin, and naringenin.

(7) 분리된 순수물질에 의한 항염증 활성 및 암세포 사멸기전 연구 계획 및 SCI 논문계획

현재 주박에서 확인된 활성 핵심물질들의 항염증 활성 및 암세포 사멸기전 연구에 대한 연구를 진행중에 있다. 항염증 활성의 경우 hesperetin에 의한 항염증 기전을 MAPK pathway와 NF-kB pathway를 위주로 연구 중에 있으며, 연구 결과는 2016년 전반기에 SCI논문에 투고할 예정이다(투고 예정 학회지명: Biomolecules & Therapeutics). 그리고, 암 세포 사멸 활성을 보여주는 3가지의 순수 물질 중 naringenin에 의한 항암 유전자인 NAG-1의 발현 유도과 조절을 중심으로 연구 중에 있으며, 이러한 연구결과는 2016년 하반기에 SCI 논문에 투고할 예정이다(투고 예정 학회지명 : Journal of Microbiology & Biotechnology).

## 제 3 절 협동과제 연구개발수행 내용 및 결과

### 1. 제1협동 과제 년차별 연구개발 목표 및 내용

연구개발의 목표		연구개발의 내용
1차년도	주박, 기능성화장품 소재화 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>○주박 분획별, 피부 미백 개선 활성 검증                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 피부 미백 활성 평가</li> <li>- 주름 예방/개선 활성 평가</li> </ul> </li> <li>○활성물질의 작용기전 규명                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 피부 미백 기전 규명</li> <li>- 주름 억제 기전 규명</li> </ul> </li> </ul>
2차년도	주박, 기능성화장품 소재화 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>○유용 활성물의 작용기전 규명</li> <li>○유효성분의 2차, 3차 분획의 피부 미백 활성 작용 기전 규명</li> <li>○누룩 분획별 주름 억제 기전 규명</li> <li>○건조주박의 중금속 제거능 규명</li> </ul>
	이너뷰티 시제품 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>○주박의 Washing 및 균질화와 HTST를 통한 시제품 제조 (이너뷰티 시제품 제조)</li> </ul>
3차년도	주박, 기능성화장품 소재화 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 활성분획물의 진정 효과 규명</li> <li>○ 활성분획물의 항균 효과 규명</li> </ul>
	향장 시제품 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 활성분획물의 원료화 및 안전성, 안정성 평가</li> <li>○ 향장 시제품 개발                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 발효 입욕제</li> <li>- 발효 클렌징 폼</li> <li>- 발효 크림</li> <li>- 발효 앰플</li> </ul> </li> <li>○ 시제품 안전성, 안정성 평가 및 사용 평가</li> </ul>

### 2. 제1협동 연구내용

#### 가. 주박, 기능성화장품 소재화 연구

피부노화는 그 요인에 따라 내인적 노화(intrinsic aging)와 외인적 노화(extrinsic aging)로 구분할 수 있다. 내인적 노화는 피부의 구조와 생리적 기능이 나이를 먹으면서 쇠퇴하는 것이며, 외인적 노화는 태양광선 등 누적된 외부 스트레스에 의해 노화 현상이 나타나는 것이다. 특히, 각종 오염물질과 자외선에 노출 등 외인적 노화에 의해 피부가 얇아지며, 주름이 증가되고, 탄력이 감소될 뿐만 아니라, 기미, 주근깨 및 검버섯이 증가하게 된다. 자외선에 피부가 노

출되면 색소침착이 증가하는 이유는 피부 세포가 자외선 흡수에 의한 손상을 방어하기 위한 목적으로 멜라닌 색소 생성 유도과 밀접한 관계가 있다. 자외선에 의한 피부 노화가 진행되면 멜라닌 증식이 항시적으로 되고 그 결과 기미가 나타난다. 이런 노화들이 진행될수록 피부를 구성하는 물질인 collagen, elastin, hyaluronic acid 등 구조 단백질을 생성하는 능력이 감소하고 type-1 collagenase의 생합성이 증가하여 matrix metalloproteinases(MMPs)의 발현이 증가되면 진피 내 교원 섬유, 탄력섬유, fibronectin 및 laminin과 같은 기질 단백질 분해를 유도하여 피부탄력을 떨어뜨리고 피부 주름생성을 야기 시킨다. 최근 연구에 의하면, elastase가 피부 탄력성 섬유의 3차원적 뒤틀림에 중요한 역할을 한다고 보고되었으며, 이러한 elastase의 활성 증가는 피부 탄력섬유를 감소시켜 피부 주름 형성에 기여한다고 알려져 있다. 또한 누적되는 산화적 스트레스는 피부 노화를 더 촉진하게 된다. 피부 미백과 주름 개선 효과 있는 다양한 소재 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 미백 물질의 경우 arbutin, ascorbic acid, kojic acid, hydroquinone 등이 사용되고 있으나 미백효과가 뛰어난 것으로 알려져 있음에도 불구하고 제품의 안전성에서 끊임없이 문제가 제기되고 있다. 또한 주름 개선으로 쓰이고 있는 물질로는 retinol, retinyl palmitate, adenosine, epigallocatechin, gallate 등이 있다.

#### 나. 피부 미백 활성 스크리닝

##### (1) 멜라닌(melanin) 생성 저해 활성 평가

사람의 피부색을 결정하는 근본적인 내적인자는 천연 피부 색소인 melanin이다. 과도한 멜라닌의 합성은 인체에 기미, 주근깨, 피부반점을 형성하고 피부노화를 촉진하며 피부암 유발에 관여하는 것으로 보고되고 있다. 마우스 흑색 세포인 B16F10에 주박 추출물 및 누룩 추출물을 처리하여 세포내 멜라닌 생성 저해활성을 평가하였다. 또한 세포 외부로 배출되는 멜라닌의 양을 얼마나 저해하는지도 함께 측정하였다. 노란색 박스로 표시한 것은 20% 이상 멜라닌 생성 저해율을 나타낸 것이며, 녹색 박스는 30% 이상 멜라닌 생성 저해를 나타내는 것을 표시한 것이다.

Hot water ex.		농도	저해율(%)		80% EtOH ex.		농도	저해율(%)	
분획	시료명	(ug/mL)	Cellular	in medium	분획	시료명	(ug/mL)	Cellular	in medium
Extract	KSD-W1-1	200	23.94	23.25	Extract	KSD-E1-1	200	30.34	12.56
H fr.	KSD-W1-2	-	-	-	H fr.	KSD-E1-2	50	2.74	0.43
EA fr.	KSD-W1-3	200	18.62	22.51	EA fr.	KSD-E1-3	200	34.44	34.44
B fr.	KSD-W1-4	200	6.38	23.99	B fr.	KSD-E1-4	200	36.75	13.02
W res.	KSD-W1-5	200	20.74	20.66	W res.	KSD-E1-5	200	16.67	2.33
Extract	KSD-W2-1	200	26.73	32.17	Extract	KSD-E2-1	200	-25.71	11.5
H fr.	KSD-W2-2	-	-	-	H fr.	KSD-E2-2	200	4.93	7.25
EA fr.	KSD-W2-3	200	28.71	32.48	EA fr.	KSD-E2-3	200	13.79	9.33
B fr.	KSD-W2-4	200	23.27	32.48	B fr.	KSD-E2-4	200	4.93	8.29
W res.	KSD-W2-5	200	26.73	30.89	W res.	KSD-E2-5	200	9.85	1.55
Extract	KSD-W3-1	200	20	34.28	Extract	KSD-E3-1	200	13.79	0
H fr.	KSD-W3-2	-	-	-	H fr.	KSD-E3-2	200	9.48	13.39
EA fr.	KSD-W3-3	200	20.53	24.38	EA fr.	KSD-E3-3	200	-	-
B fr.	KSD-W3-4	200	37.37	28.62	B fr.	KSD-E3-4	200	-	-
W res.	KSD-W3-5	200	14.21	27.92	W res.	KSD-E3-5	200	12.41	3.94
Extract	KSD-W4-1	200	20.26	13.39	Extract	KSD-E4-1	200	20	29.62
H fr.	KSD-W4-2	200	14.22	11.42	H fr.	KSD-E4-2	200	23.27	25.38
EA fr.	KSD-W4-3	-	-	-	EA fr.	KSD-E4-3	200	0.36	0.38
B fr.	KSD-W4-4	200	35.34	13.78	B fr.	KSD-E4-4	200	7.64	7.31
W res.	KSD-W4-5	200	35.34	3.94	W res.	KSD-E4-5	200	9.82	13.08

그림 3-3-1. 주박 분획물의 melanin 생성 저해율 측정 1

Hot water ex.		농도	저해율(%)		80% EtOH ex.		농도	저해율(%)	
분획	시료명	(ug/mL)	Cellular	in medium	분획	시료명	(ug/mL)	Cellular	in medium
Extract	KSD-W5-1	200	24.37	20.15	Extract	KSD-E5-1	200	-25.71	11.5
H fr.	KSD-W5-2	-	-	-	H fr.	KSD-E5-2	100	9	1.95
EA fr.	KSD-W5-3	200	24.87	20.9	EA fr.	KSD-E5-3	100	16	10.73
B fr.	KSD-W5-4	200	22.84	22.76	B fr.	KSD-E5-4	200	12.38	12.5
W res.	KSD-W5-5	200	21.83	20.52	W res.	KSD-E5-5	200	7.14	7
Extract	KSD-W6-1	200	8.33	11.57	Extract	KSD-E6-1	200	28.02	0
H fr.	KSD-W6-2	-	-	-	H fr.	KSD-E6-2	200	26.72	13.39
EA fr.	KSD-W6-3	-	-	-	EA fr.	KSD-E6-3	200	28.88	11.42
B fr.	KSD-W6-4	200	15.79	11.57	B fr.	KSD-E6-4	200	22.41	13.78
W res.	KSD-W6-5	200	9.65	5.09	W res.	KSD-E6-5	200	18.1	3.94
Extract	KSD-W7-1	200	4.25	-20.27	Extract	KSD-E7-1	200	1.79	-7.55
H fr.	KSD-W7-2	-	-	-	H fr.	KSD-E7-2	200	16.97	-18.07
EA fr.	KSD-W7-3	-	-	-	EA fr.	KSD-E7-3	200	-	-60.67
B fr.	KSD-W7-4	200	26.69	-80.05	B fr.	KSD-E7-4	200	3.26	-47.3
W res.	KSD-W7-5	200	2.2	-10.89	W res.	KSD-E7-5	200	8.89	-20.58
Extract	KSD-E10-1	200	13.43	5.26	Extract	KSD-E10-1	200	13.43	5.26
H fr.	KSD-E10-2	200	26.3	4.68	H fr.	KSD-E10-2	200	26.3	4.68
EA fr.	KSD-E10-3	200	37.13	-3.39	EA fr.	KSD-E10-3	200	37.13	-3.39
B fr.	KSD-E10-4	200	0.92	2.6	B fr.	KSD-E10-4	200	0.92	2.6
W res.	KSD-E10-5	200	-7.48	10.46	W res.	KSD-E10-5	200	-7.48	10.46
Extract	KSD-E11-1	200	0.03	1.79	Extract	KSD-E11-1	200	0.03	1.79
H fr.	KSD-E11-2	200	10.92	7.55	H fr.	KSD-E11-2	200	10.92	7.55
EA fr.	KSD-E11-3	200	-	-	EA fr.	KSD-E11-3	200	-	-
B fr.	KSD-E11-4	200	-9.21	0	B fr.	KSD-E11-4	200	-9.21	0
W res.	KSD-E11-5	200	-6.01	-1.6	W res.	KSD-E11-5	200	-6.01	-1.6

그림 3-3-2. 주박 분획물의 melanin 생성 저해율 측정 2

그 결과 멜라닌 생성과 멜라닌 분비를 20%이상 효과적으로 저해하고 있는 분획물은 KSD-W3-4, KSD-W2-1, KSD-W2-3, KSD-W2-4, KSD-W2-5, KSD-E1-3 총 6가지였으며, 멜라닌 생성만 30% 이상 저해하는 것은 KSD-E1-1, KSD-E1-4, KSD-W4-4, KSD-W4-5, KSD-W8-3 5가지, 그리고 멜라닌 분비만 30%이상 저해시키는 것은 KSD-W3-1, KSD-E4-1 2가지였다. 이 중 가장 효과가 탁월한 것은 KSD-E1-3 이었다.

(2) 타이로시나아제(Tyrosinase) 활성 저해 평가

멜라닌 생합성 경로에서 가장 중요한 생합성 효소로 작용하는 것이 타이로시나아제이다. 이 효소가 저해 될 경우 멜라닌 생성을 저해시키는 것으로 알려져 있다. in vitro에서 주박 및 누룩 분획물의 타이로시나아제 저해 활성을 측정하였다. 기질은 L-tyrosine 과 L-DOPA 두가지를 사용하였다(그림 3-3-3, 4).

Hot water ex.				비고	80% ETOH ex.				
분획	시료명	L-tyrosin (6,667 ppm)	L-DOPA (5,000 ppm)		분획	시료명	L-tyrosin (6,667 ppm)	L-DOPA (5,000 ppm)	비고
Extract	KSD-W1-1	-9.23	9.61		Extract	KSD-E1-1	75.75	1.85	침전
H fr.	KSD-W1-2	-	-		H fr.	KSD-E1-2	59.03	2.13	침전
EA fr.	KSD-W1-3	88.39	85.03		EA fr.	KSD-E1-3	96.07	95.29	침전
B fr.	KSD-W1-4	84.52	16.73		B fr.	KSD-E1-4	97.92	72.37	
W res.	KSD-W1-5	6.85	4.44		W res.	KSD-E1-5	9.01	3.33	
Extract	KSD-W2-1	-10.12	10.17		Extract	KSD-E2-1	-122.17	5.73	침전
H fr.	KSD-W2-2	-	-		H fr.	KSD-E2-2	19.48	-2.5	침전
EA fr.	KSD-W2-3	79.17	23.11		EA fr.	KSD-E2-3	-177.6	96.03	침전
B fr.	KSD-W2-4	21.73	5.55		B fr.	KSD-E2-4	4.62	3.42	
W res.	KSD-W2-5	-16.67	4.25		W res.	KSD-E2-5	-11.32	9.89	
Extract	KSD-W3-1	59.52	10.91		Extract	KSD-E3-1	82.68	12.57	
H fr.	KSD-W3-2	-	-		H fr.	KSD-E3-2	71.35	-15.34	침전
EA fr.	KSD-W3-3	52.98	19.32		EA fr.	KSD-E3-3	158.66	113.68	침전
B fr.	KSD-W3-4	68.75	20.43		B fr.	KSD-E3-4	89.38	26.89	
W res.	KSD-W3-5	3.57	2.59		W res.	KSD-E3-5	12.01	16.54	
Extract	KSD-W4-1	-10.89	2.58		Extract	KSD-E4-1	-49	4.82	침전
H fr.	KSD-W4-2	-	-1.09		H fr.	KSD-E4-2	-118.91	-9.94	침전
EA fr.	KSD-W4-3	-	-		EA fr.	KSD-E4-3	56.45	76.69	침전
B fr.	KSD-W4-4	-5.44	2.78		B fr.	KSD-E4-4	83.09	7.36	
W res.	KSD-W4-5	43.84	17.95		W res.	KSD-E4-5	39.83	19.27	
Extract	KSD-W5-1	-13.39	1.94		Extract	KSD-E5-1	18.24	4.34	침전
H fr.	KSD-W5-2	-	-		H fr.	KSD-E5-2	4.3	-2.59	침전
EA fr.	KSD-W5-3	67.26	15.34		EA fr.	KSD-E5-3	91.69	99.91	침전
B fr.	KSD-W5-4	-23.51	7.21		B fr.	KSD-E5-4	88.91	10.17	
W res.	KSD-W5-5	-3.57	-2.22		W res.	KSD-E5-5	-	5.64	
Extract	KSD-W6-1	-17.26	9.24		Extract	KSD-E6-1	-2.54	2.4	
H fr.	KSD-W6-2	-	-		H fr.	KSD-E6-2	-2.29	19.96	침전
EA fr.	KSD-W6-3	-	-		EA fr.	KSD-E6-3	158.66	30.13	침전
B fr.	KSD-W6-4	-13.99	5.91		B fr.	KSD-E6-4	26.1	-0.37	침전
W res.	KSD-W6-5	-8.63	11.55		W res.	KSD-E6-5	2.77	11.09	

그림 3-3-3. 주박 및 누룩 추출물의 타이로시나아제(Tyrosinase) 저해 활성 평가

Hot water ex.				비고	80% ETOH ex.				
분획	시료명	L-tyrosin (3,333 ppm)	L-DOPA (5,000 ppm)		분획	시료명	L-tyrosin (3,333ppm)	L-DOPA (5,000 ppm)	비고
Extract	KSD-W7-1	34.09	-8.53		Extract	KSD-E7-1	35.23	-0.3	
H fr.	KSD-W7-2	-	-		H fr.	KSD-E7-2	28.79	-7.8	
EA fr.	KSD-W7-3	-	-		EA fr.	KSD-E7-3	15.15	14.12	
B fr.	KSD-W7-4	116.29	14.84		B fr.	KSD-E7-4	93.56	7.7	색간섭
W res.	KSD-W7-5	1.14	-8.46		W res.	KSD-E7-5	71.21	0	색간섭
Extract	KSD-E10-1				Extract	KSD-E10-1	33.23	-2.57	침전
H fr.	KSD-E10-2				H fr.	KSD-E10-2	8.08	-14.81	침전
EA fr.	KSD-E10-3				EA fr.	KSD-E10-3	29.64	-3.36	침전
B fr.	KSD-E10-4				B fr.	KSD-E10-4	2.99	9.67	
W res.	KSD-E10-5				W res.	KSD-E10-5	-0.9	6.61	
Extract	KSD-E11-1				Extract	KSD-E11-1	117.66	29.32	침전
H fr.	KSD-E11-2				H fr.	KSD-E11-2	61.68	-16.88	침전
EA fr.	KSD-E11-3				EA fr.	KSD-E11-3	-162.87	76.41	침전
B fr.	KSD-E11-4				B fr.	KSD-E11-4	98.2	57.35	
W res.	KSD-E11-5				W res.	KSD-E11-5	82.34	5.92	

그림 3-3-4. 주박 및 누룩 추출물의 타이로시나아제(Tyrosinase) 저해 활성 평가

이 결과 두가지 기질에 대해 모두 저해 활성을 갖는 것은 KSD-W1-3, KSD-E1-3, KSD-E3-3, KSD-E5-3 4가지 였으며, L-tyrosinase에 대하여 70% 이상 저해율을 보인 것은 KSD-W1-4, KSD-E1-1, KSD-W2-3, KSD-E6-3, KSD-E3-1, KSD-E3-2, KSD-E5-4, KSD-E4-2, KSD-E4-4,



KSD-W7-2, KSD-E7-4, KSD-E7-5, KSD-E11-1, KSD-E11-4, KSD-E11-5 15종 이었다. 그리고 L-DOPA에 대하여 30% 이상 저해율을 보인 것은 KSD-E4-3 과 KSD-E11-3 2종 이었다. 이렇게 선별 된 분획물들은 저농도에서도 그 활성이 있는지 재현성 평가를 하였다(그림 3-3-5, 6).

NO.	농도 (ug/mL)	저해율 (%)		NO.	농도 (ug/mL)	저해율 (%)	
		L-tyrosine	L-DOPA			L-tyrosine	L-DOPA
KSD-W1-3	100	-3.97	4.05	KSD-E3-1	100	15.69	
	500	0.28	0.64		500	51.86	
	1000	8.78	-0.53		1000	70.74	
	5000	77.90	96.91		5000	85.90	
KSD-W1-4	100	44.12		KSD-E3-2	100	14.16	
	500	43.97			500	40.23	
	1000	43.24			1000	54.11	
	5000	67.65			5000	76.49	
KSD-W2-3	100	6.05		KSD-E3-3	100	85.67	9.38
	500	14.19			500	81.46	29.32
	1000	16.74			1000	70.51	42.32
	5000	72.56			5000	22.75	118.66
KSD-E6-3	100	-2.13		KSD-E3-4	100	19.94	
	500	13.03			500	62.92	
	1000	23.40			1000	80.62	
	5000	55.59			5000	88.76	

그림 3-3-5. 주박 및 누룩 추출물의 타이로시나아제(Tyrosinase) 저해 활성 평가(농도별 재현성 평가)

NO.	농도 (ug/mL)	저해율 (%)		NO.	농도 (ug/mL)	저해율 (%)		NO.	농도 (ug/mL)	저해율 (%)		
		L-tyrosine	L-DOPA			L-tyrosine	L-DOPA			L-tyrosine	L-DOPA	
KSD-E1-1	100	8.42		KSD-E5-4	100	5.14		KSD-E7-4	0	0.00		
	500	7.14			500	-6.04			10	1.72		
	1000	6.12			1000	0.60			50	28.02		
	5000	9.69			5000	58.91			100	42.24		
KSD-E1-3	100	6.38	-6.93	KSD-E2-3	100	2.42	1.39	KSD-E11-4	500	92.24		
	500	14.03	-4.48		500	19.64	-8.00		0	0.00		0.00
	1000	30.10	2.77		1000	47.13	-7.04		10	13.36		7.97
	5000	65.82	98.72		5000	71.60	98.40		50	33.62		12.29
KSD-E1-4	100	5.43	-0.85	KSD-E4-2	100	48.97	-7.89	Kojic acid	100	57.33	31.05	
	500	9.82	7.04		500	57.21	-9.06		500	90.52	48.69	
	1000	10.34	-1.92		1000	64.56	3.84		10	19.30		
	5000	93.80	79.21		5000	89.56	90.83		50	56.61		
KSD-E5-3	100	9.56	2.35	KSD-E4-4	100	14.65		100	74.20			
	500	20.67	-2.88		500	25.12		500	94.24			
	1000	44.19	6.40		1000	29.53		500	97.33			
	5000	91.47	95.10		5000	43.49						

그림 3-3-6. 주박 및 누룩 추출물의 타이로시나아제(Tyrosinase) 저해 활성 평가(농도별 재현성 평가)

두가지 기질에 대하여 모두 우수한 효과를 보인 것은 KSD-E3-3 이었다. 그리고 L-Tyrosine만 저해 활성을 보인것은 KSD-W1-4, KSD-E3-1, KSD-E3-2, KSD-E3-4, KSD-E1-3, KSD-E7-4, KSD-E11-4 7종이었다. 특히 KSD-E1-3, KSD-E7-4, KSD-E11-4 3종은 저농도(10~500 ug/mL)에서도 우수한 활성을 확인 할 수 있었다(그림 3-3-7).

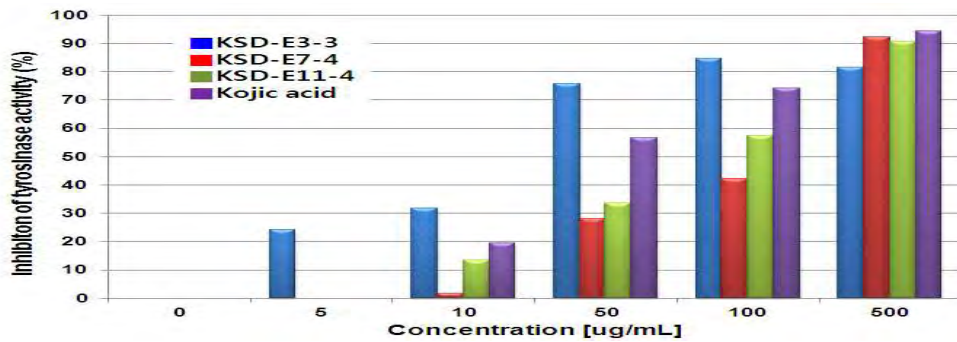


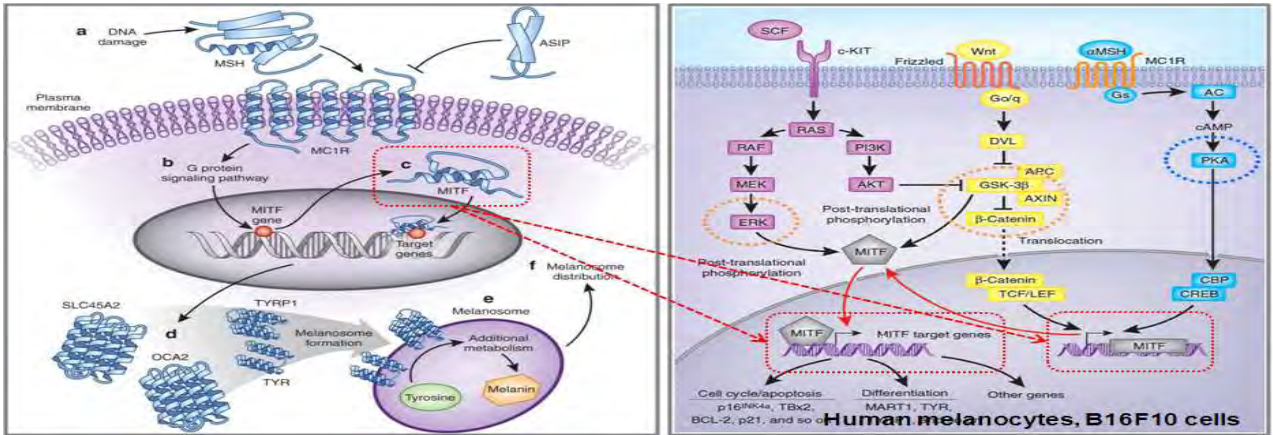
그림 3-3-7. 주박 분획물과 피부 미백의 대표 물질인 Kojic acid의 IC<sub>50</sub> 값 비교

활성이 우수하게 평가된 KSD-E3-3, KSD-E7-4, KSD-E11-4를 피부미백의 대표물질인 Kojic acid와 IC<sub>50</sub> 값을 비교하였다. 그 결과 KSD-E3-3의 IC<sub>50</sub> 값은 26.66 ug/mL 이었고, KSD-E7-4는 164.77 ug/mL, KSD-E11-4는 87.37 ug/mL Kojic acid는 44.33 ug/mL이었다. 이 결과에서 KSD-E3-3의 활성이 Kojic acid 보다 우수함을 확인할 수 있었다.

#### 다. 피부미백 활성 작용 기전 분석

멜라닌 생성시에 멜라닌세포를 감싸는 다양한 환경에 반응하여 그 생합성량이 증가 또는 감소한다. 이러한 조절 구조의 연구는 자외선에 의한 피부의 멜라닌 증가 기전의 해석을 중심으로 진행되어져 왔다. 그 결과로 자외선에 의한 멜라닌 생성 촉진은 자외선에 의해 유도된 각질형성세포 유래의 cytokine이 주된 기능을 담당한다는 것이 밝혀졌다. UVB 조사에 의해서 각질형성 세포는 bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), alpha-MSH (Melanocyte stimulating hormone), ET-1 (endothelin-1)등이 생성/ 분비되어 멜라닌 세포의 증가와 멜라닌의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 또한 UVB의 조사로 멜라닌 세포의 BC12 단백질이 발현되어 apoptosis의 저항을 가지게 하며, 인슐린, IGF-1등이 멜라닌 세포를 활성화 하는 것이 보고되었다. UVA 및 UVB 조사에 의하여 각질형성 세포로부터 산화스트레스가 발생하는 데, 이것은 타이로시나아제 및 TRP-1(tyrosinase related protein-1)을 활성화 시켜 멜라닌 생합성을 유도 시킨다. 이런 인자들에 대응하는 수용체는 멜라닌 세포의 세포막에 존재하며, 그 신호전달은 대부분 최종적으로 MITF (microphthalmia associated transcription factor) 전사인자로 집약된다. 이 MITF는 멜라닌 생성에 중심 역할을 하는 타이로시나아제와 TRP-1, TRP-2 등의 발현을 촉진하는 것으로 알려져 있다.

MITF의 발현을 조절하는 단백질은 ERK, GSK-3beta, PKA, CREB등이며, ERK, CREB의 인산화는 MITF의 발현을 촉진하게 된다. 이러한 신호 전달체계를 분석함으로써 멜라닌 생합성 저해 활성을 탐색 할 수 있다(그림 3-3-8).



❖ MIF: Microphthalmia-associated transcription factor

그림 3-3-8. Human melanocytes(B16F10)에서의 멜라닌 생합성 경로

(1) KSD-E4-3의 피부 미백기전

KSD-E4-3을 농도별로 처리하였을 때 농도 별로 melanocyte 세포에서 멜라닌의 생성을 저해하는 것을 확인하였다. 이러한 효과는 멜라닌 합성에 중요하게 작용하는 효소인 타이로시네이즈의 활성을 저해하고 이와 관련된 단백질인 TRP-1, 2의 발현을 저해에서 유래한 것임을 확인하였다.

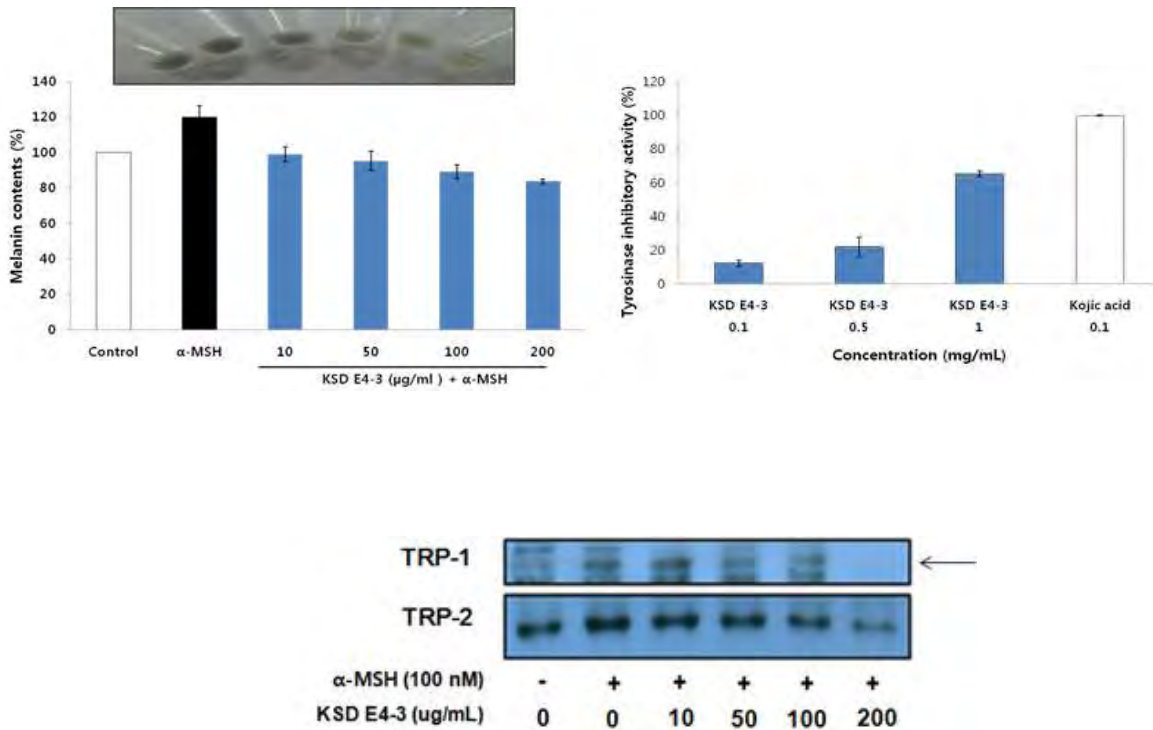


그림 3-3-9. KSD-E4-3에 의한 멜라닌 생성 저해 및 관련 효소 저해 확인

(2) KSD-E2-3의 피부 미백기전

KSD-E4-3을 농도별로 처리하였을 때 농도별로 타이로시네이즈의 발현이 감소하였고 이러한 발현감소는 전사인자인 MITF의 발현감소에서 비롯되는 것임을 보아 KSD-E4-3는 MITF의 발현과 타이로시네이즈 발현 저해를 통해서 미백활성을 나타낸다.

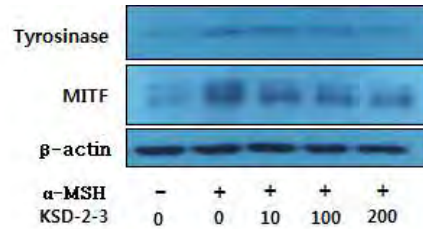


그림 3-3-10. KSD-E4-3에 의한 타이로시네이즈, MITF 발현 감소

(3) KSD-E1-3의 피부 미백기전

앞선 주박 및 누룩 분획물들의 활성평가에서 KSD-E1-3에서 다양한 미백 활성을 확인 할 수 있었다. 그래서 KSD-E1-3을 중심으로 보다 깊이 있는 활성 평가를 진행 하였다.

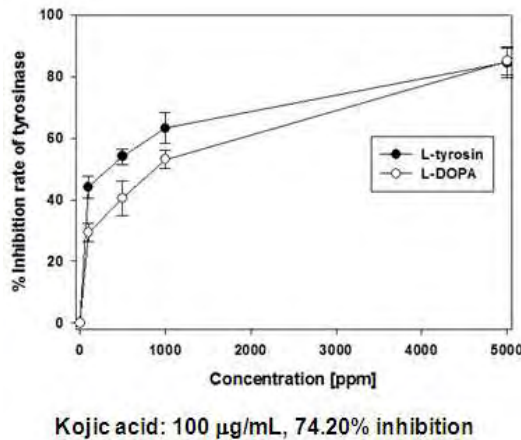


그림 3-3-11. KSD-E1-3의 in vitro 타이로시나아제 활성 저해 활성 평가

먼저, in vitro 타이로시나아제 저해 활성 평가를 확인하였다. 1000 ug/mL 의 농도에서 최고 65% 정도의 저해율을 보이고 있다(그림 3-3-11). 또한 melanin content assay로 멜라닌 생성 저해 실험을 한 결과 100 ug/mL에서 약 20%의 저해율을 보였으며, 세포외 분비율 또한 15% 정도 감소되는 것을 확인하였다. (그림 3-3-12)

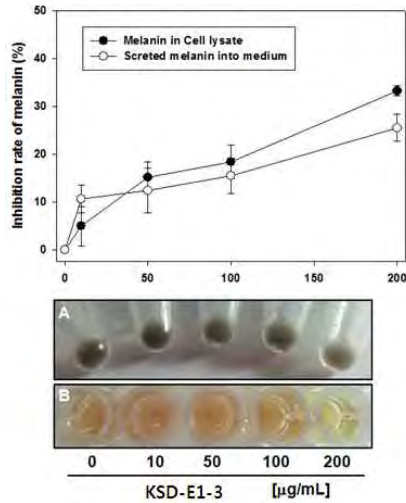


그림 3-3-12. KSD-E1-3의 멜라닌 생성 저해 활성 평가

다음, B16F10 melanocyte 세포에 KSD-E1-3을 농도별로 처리하여 멜라닌 생성에 중요한 역할을 하는 MITF, tyrosinase, TRP-1/-2의 발현양을 immunoblot assay를 통하여 분석하였다. 그 결과, 물질을 처리하지 않은 대조군에 비하여 MITF, tyrosinase, TRP-1/-2의 발현양이 감소함을 알 수 있었다 (그림 3-3-13).

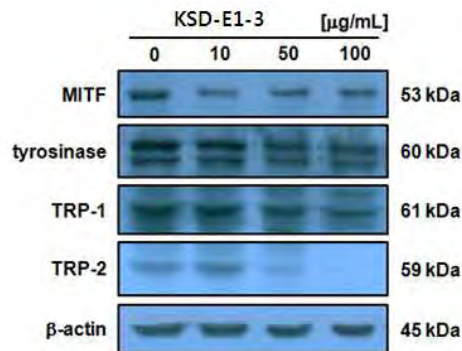


그림 3-3-13. KSD-E1-3의 Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 단백질의 발현 저해 활성

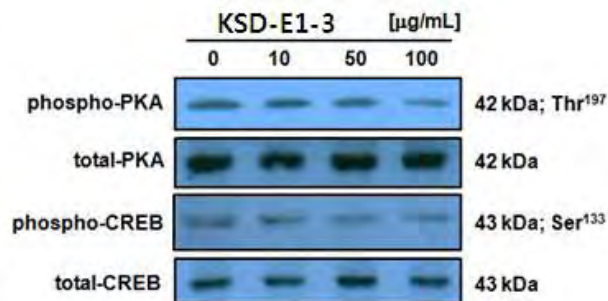


그림 3-3-14. KSD-E1-3의  $\alpha$ -MSH에 의한 신호전달체계 저해 활성

또한, MITF(Tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 발현 조절 단백질)의 발현을 조절하는 단백질, p-PKA,

p-CREB의 발현량을 조사하였다. 그 결과 p-PKA와 p-CREB 또한 발현이 저해되었음을 알 수 있었다 (그림 3-3-14). 이러한 결과로 KSD-E1-3은 MITF의 발현양을 조절하는 p-PKA, p-CREB의 발현양을 조절하므로써 최종적으로 멜라닌 합성에 증용한 효소 단백질인 Tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 단백질 발현양을 조절함을 알 수 있었다.

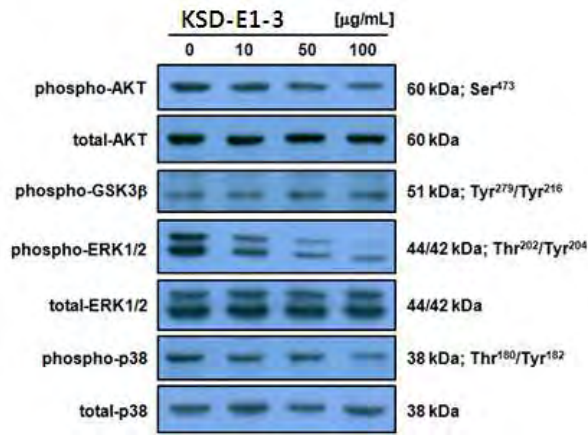


그림 3-3-15. KSD-E1-3의 MITF를 저해시키는 신호전달체계 저해 활성화

또다른 MITF 발현 조절 유전자인 p-AKT, p-GSK3β, p-ERK, p-p38의 발현양을 조사하였다. 이 결과 또한 KSD-E1-3을 처리한 실험군에서 MITF 조절 단백질의 발현양이 감소하고 있음을 알 수 있었다 (그림 3-3-15). 이 중 p-ERK의 발현양이 가장 감소하고 있음을 알 수 있었다. 이는 KSD-E1-3이 ERK를 통한 MITF 활성화단계를 효과적으로 차단하고 있음을 알 수 있었다.

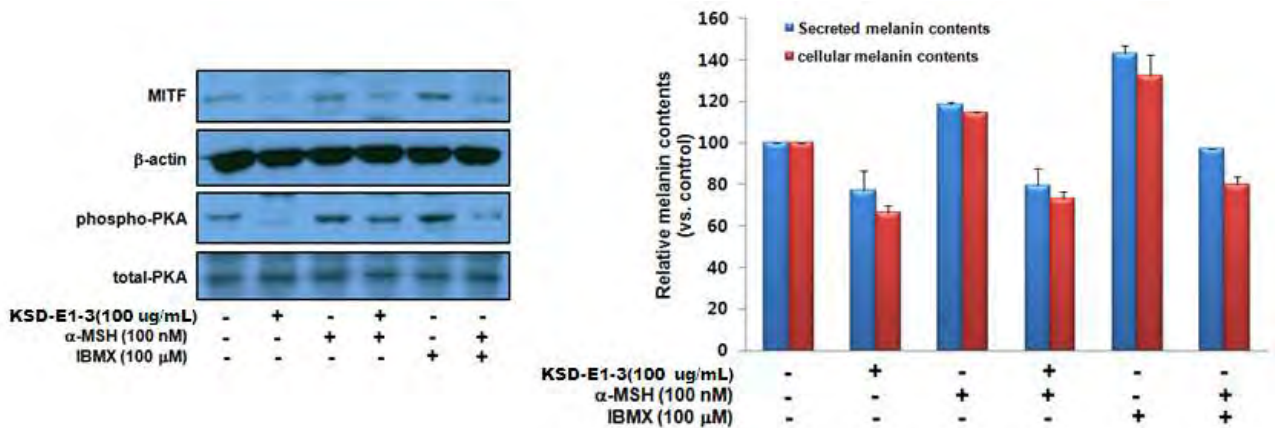


그림 3-3-16. KSD-E1-3의 MITF 관련 멜라닌 생합성 신호전달체계 저해 활성화

α-MSH와 cyclic AMP와 cyclic GMP의 활성을 증가시키는 IBMX(3-Isobutyl-1-methylanxthine)을 이용하여 멜라닌의 생합성이 증가 하도록 유도 하였다. 그 후 KSD-E1-3을 처리하여 MITF, p-PKA등의 발현양의 감소여부를 확인하였다. 그 결과 멜라닌이 다량 생산된 조건하에서도 KSD-E1-3은 MITF,

p-PKA를 효과 적으로 감소시키고 있음을 확인하였다 (그림 3-3-16). 이러한 결과들로 KSD-E1-3은 MITF 유전자 발현을 조절하여 효과적으로 멜라닌 생성을 억제시킴을 알 수 있었으며, 피부 미백효과 탁월한 효능을 보일 것으로 생각된다.

라. 생리 기능활성 유효성분/핵심물질 분리 연구의 소분획물들에 대한 미백 활성 평가

2차년도 제1세부기관에서 생리 기능활성 유효성분/핵심물질 분리를 위해 진행하며 제공받은 1차년도 분획물들에서 유래된 소분획물들(3차 분획물)에 대한 미백활성 평가도 진행하였다. 이는 1차년도에 피부개선 효과가 있었던 분획물들의 기능성 핵심물질을 찾고자 함이다. 본 연구 결과는 1차년도의 약 80종 주박 및 누룩 추출분획물의 활성 측정 결과, 2차년도 연구를 위해 최종 선별되었던 3종(옛날막걸리, KSD-E1-3; 우국생, KSD-E2-3; 백세주, KSD-E4-3)의 추가 소분획물들에 대한 미백 활성을 확인하였다.

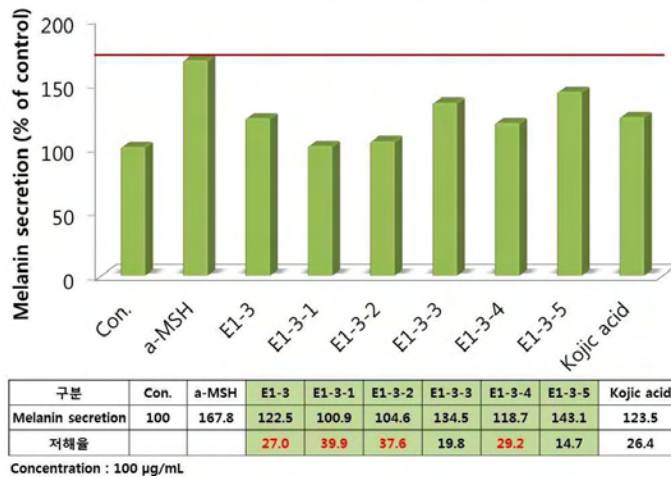


그림 3-3-17. KSD-E1-3의 소분획물 멜라닌 합성 저해력

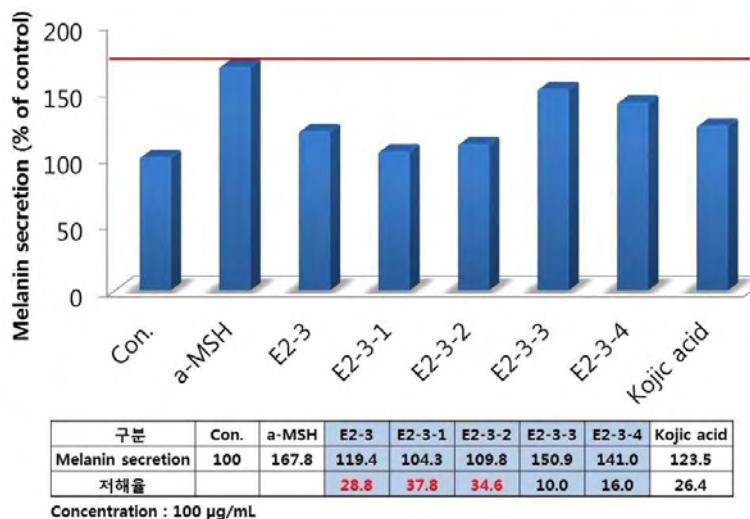
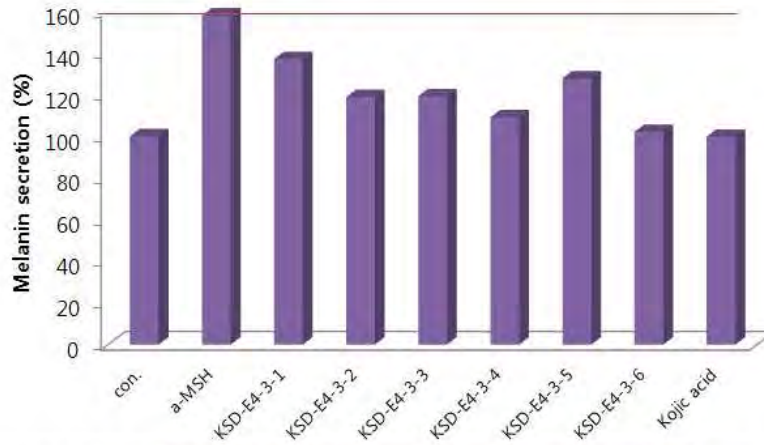


그림 3-3-18. KSD-E2-3의 소분획물 멜라닌 합성 저해력



	con.	a-MSH	E4-3-1	E4-3-2	E4-3-3	E4-3-4	E4-3-5	E4-3-6	Kojic acid
Melanin secretion	100	157.9	137.0	118.8	119.1	109.0	127.7	102.1	99.8
저해율			13.3	24.8	24.6	31.0	19.1	35.4	36.8

Concentration: 100 µg/ml

그림 3-3-19. KSD-E4-3의 소분획물 멜라닌 합성 저해력

분획물에서 추가 분획된 소분획물들의 미백활성을 분석한 결과 모두 미백 활성을 가지는 것으로 확인할 수 있었다(그림 3-3-17, 18, 19). KSD-E1-3의 소분획물들은 대조군인 kojic acid의 멜라닌 합성 저해율(26.4%)보다 높은 3가지 소분획물들의 저해력(KSD-E1-3-1, 39.9%; KSD-E1-3-2, 37.6%; KSD-E-3-4, 29.2%)을 확인하였다(그림 3-3-17). KSD-E2-3의 소분획물들은 대조군보다 2가지 소분획물(KSD-E2-3-1, 37.8%; KSD-E2-3-2, 34.6%)의 멜라닌 합성 저해율이 높게 분석되었다. 이 소분획물들은 제1세부기관에서 각 EtOAc 분획물들(KSD-E1-3, KSD-E2-3)을 silica gel column chromatography을 사용하여 용매를 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 10:0, 8:2, 6:4, 4:6, 2:8, 0:10 순으로 elution 시킨 분획물들로서 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 10:0와 8:2 비율의 용매로 분획되는 시료에서 핵심 미백 활성 성분이 함유될 수 있음으로 판단된다.

#### 마. 주름 개선 활성 평가

UV에 지속적으로 노출될 경우, UV에 의한 피부영향으로 주름생성이 촉진되는 광노화가 유발된다. 특히 UV에 의해 피부세포에서 MMPs의 생성과 그 활성이 증가하여 주변 extracellular matrix (ECM)을 구성하는 단백질, 특히 collagen과 elastin을 분해하여 주름이 형성하는 것으로 보고되었다. 주박 및 누룩 추출물이 MMP-2와 MMP-9의 proteolytic 활성에 미치는 영향을 gelatin-zymography 방법을 이용하여 분석하였다 (그림 3-3-20).

이 결과 MMP-2/-9을 80% 이상 저해시키는 분획물은 KSD-W6-1, KSD-W1-1,



KSD-W1-3이었다.

Hot water ex.			저해율 (%)		80% EtOH ex.			저해율 (%)	
분획	시료명	농도(ug/mL)	MMP-9	MMP-2	분획	시료명	농도(ug/mL)	MMP-9	MMP-2
Extract	KSD-W1-1	200	97.04	55.57	Extract	KSD-E1-1	200	27.18	40.46
H fr.	KSD-W1-2	200	-	-	H fr.	KSD-E1-2	200	-22.71	-57.16
EA fr.	KSD-W1-3	200	96.77	50.55	EA fr.	KSD-E1-3	200	41.77	43.57
B fr.	KSD-W1-4	200	96.56	7.39	B fr.	KSD-E1-4	200	40.85	61.44
W res.	KSD-W1-5	200	-46.17	0.65	W res.	KSD-E1-5	200	40.39	54.63
Extract	KSD-W2-1	200	-32.62	-62.3	Extract	KSD-E2-1	200	10.25	-26.19
H fr.	KSD-W2-2	200	-	-	H fr.	KSD-E2-2	200	-40.74	-72.99
EA fr.	KSD-W2-3	200	-135.84	-206.52	EA fr.	KSD-E2-3	200	-1.1	-31.37
B fr.	KSD-W2-4	200	-31.5	-70.86	B fr.	KSD-E2-4	200	-10.04	-56.75
W res.	KSD-W2-5	200	-41.88	-81.86	W res.	KSD-E2-5	200	-20.26	-59.36
Extract	KSD-W3-1	200	-7.59	6.97	Extract	KSD-E3-1	200	23.12	46.52
H fr.	KSD-W3-2	200	-	-	H fr.	KSD-E3-2	200	58.71	70.74
EA fr.	KSD-W3-3	200	38.25	51.2	EA fr.	KSD-E3-3	200	-	-
B fr.	KSD-W3-4	200	24.42	23.58	B fr.	KSD-E3-4	200	10.55	48.31
W res.	KSD-W3-5	200	17.68	4.99	W res.	KSD-E3-5	200	-16.54	46.75
Extract	KSD-W4-1	200	-14.22	-10.02	Extract	KSD-E4-1	200	0.87	0.8
H fr.	KSD-W4-2	200	-64.74	-132.94	H fr.	KSD-E4-2	200	-0.86	1.57
EA fr.	KSD-W4-3	200	-	-	EA fr.	KSD-E4-3	200	4.21	17.67
B fr.	KSD-W4-4	200	20.32	28.83	B fr.	KSD-E4-4	200	-0.19	8.88
W res.	KSD-W4-5	200	-13.93	-33.57	W res.	KSD-E4-5	200	-8.39	-12.47
Extract	KSD-W5-1	200	-12.39	15.04	Extract	KSD-E5-1	200	-10.79	-1.63
H fr.	KSD-W5-2	200	-	-	H fr.	KSD-E5-2	200	-18.52	-1.08
EA fr.	KSD-W5-3	200	28.41	-9.73	EA fr.	KSD-E5-3	200	-10.42	10.39
B fr.	KSD-W5-4	200	5.54	-6.37	B fr.	KSD-E5-4	200	-16.43	-0.31
W res.	KSD-W5-5	200	0.42	1.37	W res.	KSD-E5-5	200	-	-
Extract	KSD-W6-1	200	92.12	92.36	Extract	KSD-E6-1	200	-39.37	49.76
H fr.	KSD-W6-2	200	-	-	H fr.	KSD-E6-2	200	-4.43	-97.41
EA fr.	KSD-W6-3	200	-	-	EA fr.	KSD-E6-3	200	28.19	34.16
B fr.	KSD-W6-4	200	42.92	-22.17	B fr.	KSD-E6-4	200	12.75	30.53
W res.	KSD-W6-5	200	39.29	-22.14	W res.	KSD-E6-5	200	31.95	35.13

그림 3-3-20. 주박 및 누룩 분획물의 MMP-2/-9 저해 활성 평가

(1) KSD-E1-3의 주름 개선/예방 효과

자외선에 피부가 노출되면 자외선에 의한 세포 손상을 막기 위하여 멜라닌 생성이 증가하게 된다. 그리고 항시적으로 증가된 멜라닌은 피부에 기미를 만들게 된다. 이러한 피부노화가 진행 되면 될수록 피부를 구성하는 물질인 collagen, elastin, hyaluronic acid등 구조 단백질을 생성하는 능력이 감소되고 type-1 collagenase의 생성이 증가하여 MMPs의 발현양이 증가하게 된다. 이는 결국 피부내부의 섬유질을 파괴하여 피부 주름이 생성되게 한다. 또한 최근에는 elastase가 피부의 탄력섬유를 파괴하여 피부에 주름이 생성된다고 보고되었다. 이러한 내용들은 MMPs, elastase, type-1 collagenase등을 효과적으로 저해하면 주름 생성을 예방할 수 있음을 시사한다.

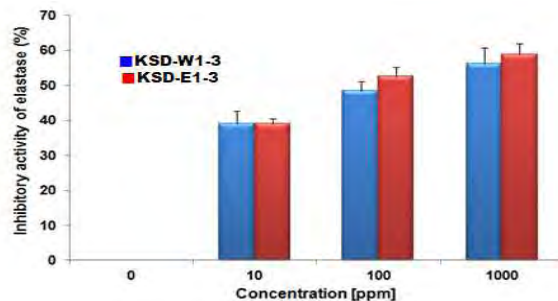


그림 3-3-21. KSD-W1-3과 KSD-E1-3의 in vitro 엘라스타아제 저해 활성

KSD-W1-3, E1-3의 주름개선 및 예방 효과를 알아보기 위하여 *in vitro* elastase inhibition assay를 진행 하였다. Human Dermal Fibroblasts, neonatal(HDFn) 세포에서 추출한 elastase 단백질을 추출물, elastase 기질과 함께 혼합하여 1시간 30분간 반응 시킨 후 elastase 활성 저해능을 측정하였다. 그 결과 1000 ug/mL의 농도에서 KSD-E1-3은 elastase의 활성을 약 60% 정도 저해시킴을 확인하였다(그림 3-3-21).

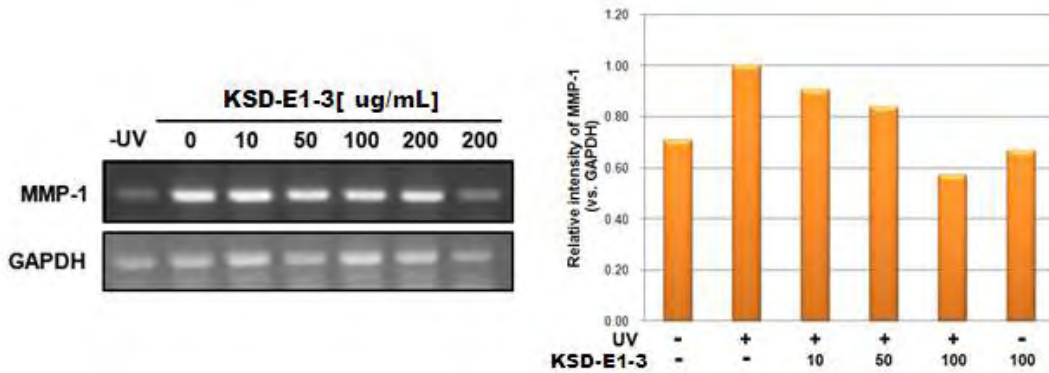


그림 3-3-22. RT-PCR을 이용한 KSD-E1-3의 MMP-1 저해 활성

다음 RT-PCR을 이용하여 MMP-1 유전자의 발현양을 조사하였다. 농도 의존적으로 MMP-1 유전자의 발현이 감소함을 확인하였다(그림 3-3-22). 또한 immunoblot assay를 통해서도 UV에 의해 유도된 MMP-1 단백질의 양을 감소시킴을 확인하였다(그림 3-3-23). 그리고 MMP-1 조절단백질로 알려진 p-ERK, p-p38의 발현양 조사에서도 KSD-E1-3을 처리한 실험군에서 대조군대비 효과적으로 발현이 감소하였다.(그림 3-3-24).

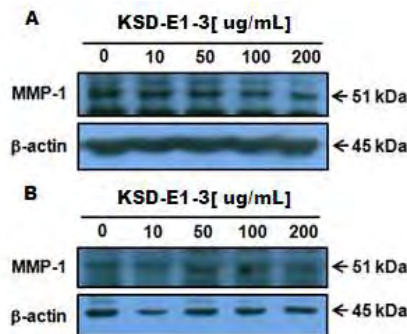


그림 3-3-23. KSD-E1-3의 MMP-1 단백질 발현 저해 활성(A)UV조사 없음 (B)UV 조사

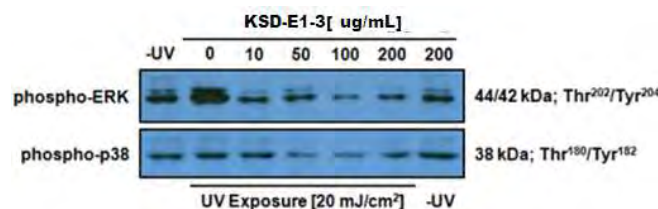


그림 3-3-24. KSD-E1-3의 MMP-1 조절 단백질의 발현 저해 활성

이러한 결과들은 KSD-E1-3이 주름생성의 주요인자인 elastase 단백질의 활성을 저해하고 MMP-1 단백질의 발현을 억제시켜 주름을 개선 또는 예방할 수 있음을 시사한다.

바. KSD-E4-3의 광노화성 피부 개선 평가와 작용 기전 분석

자외선에 피부가 노출되면 색소침착이 증가하는 이유는 피부 세포가 자외선 흡수에 의한 손상을 방어하기 위한 목적으로 멜라닌 색소 생성 유도와 밀접한 관계가 있다. 자외선에 의한 피부 노화가 진행되면 멜라닌 증식이 항시적으로 되고 그 결과 기미가 나타난다. 이런 노화들이 진행될수록 피부를 구성하는 물질인 collagen, elastin, hyaluronic acid 등 구조 단백질을 생성하는 능력이 감소하고 type-1 collagenase의 생합성이 증가하여 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현이 증가되면 진피 내 교원 섬유, 탄력섬유, fibronectin 및 laminin과 같은 기질 단백질 분해를 유도하여 피부탄력을 떨어뜨리고 피부 주름생성을 야기 시킨다.

백세주 EtOH 추출물을 EtOAc로 분획한 KSD-E4-3을 처리하여 MMPs 중 MMP-1 유전자의 발현양이 RT-PCR 분석에서 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다(그림 3-3-25, 좌). 또한 immunoblot assay를 통해서도 UV에 의해 유도된 MMP-1 단백질의 양을 감소시킴을 확인하였다(그림 3-3-25, 우). 그리고 이 분획물이 MMP-2와 MMP-9의 proteolytic 활성에 미치는 영향을 gelatin-zymography 방법을 이용하여 분석하였다(그림 3-3-26).

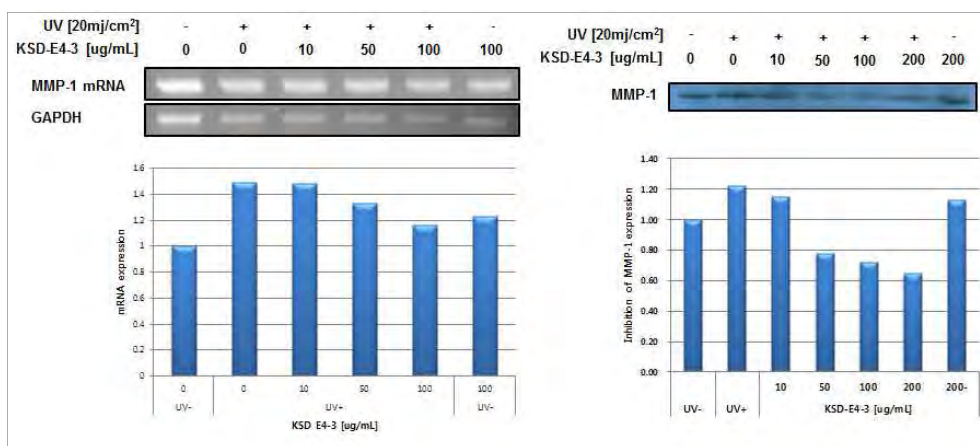


그림 3-3-25. RT-PCR와 Immunoblot assay를 이용한 KSD E4-3의 MMP-1 저해활성

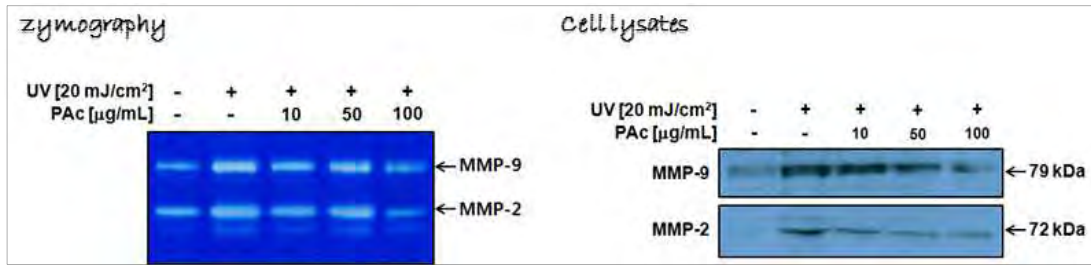


그림 3-3-26. KSD-E4-3의 MMP-2/-9 저해 활성 평가

이 실험 결과 KSD-E4-3(= PAc)은 MMP-2와 MMP-9의 단백질을 농도 의존적으로 저해하였다(그림 3-3-26). 앞서 말한 바와 같이 MMPs의 활성이 증가되면 피부 내 collagen과 같은 구성 단백질을 붕괴시킨다. MMPs는 진피층의 extracellular matrix (ECM) 붕괴에 영향을 미쳐 피부 노화에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 본 실험에서 KSD-E4-3은 UV에 의한 피부노화가 진행되면서 피부 탄력을 유지하는 구성단백질 파괴에 관여하는 MMPs의 효소적 활성과 발현을 저해하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 KSD E4-3이 피부 탄력을 유지하여 UV에 의한 피부 노화를 억제할 수 있는 가능성이 높을 것으로 사료된다.

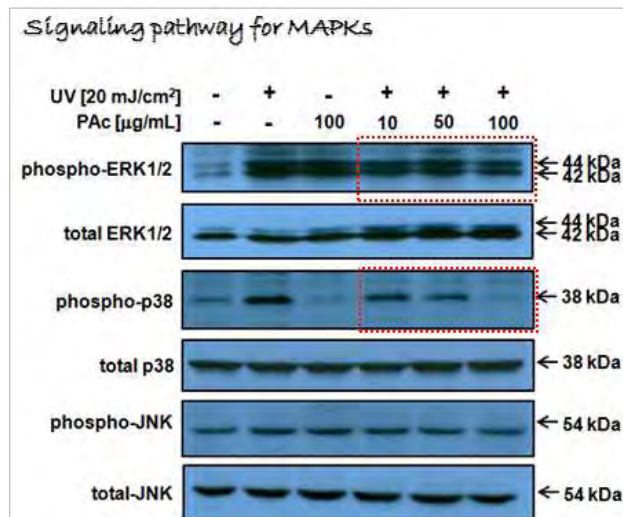


그림 3-3-27. KSD-E4-3의 항주름 효과 기전 연구1

또한, 항주름 효과를 나타내는 기전을 알아보기 위해 신호전달계에 관여하는 단백질들의 발현량을 조사하였다. 그 결과 KSD-E4-3을 처리한 HaCaT 세포에서는 ERK(extracellular signal-regulated kinase) 1/2과 p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 인산화가 저해되었음을 알 수 있었다(그림 3-3-27). 하지만 JNK(c-JUN N-terminal kinase)에는 영향을 주지 못하였다. 그리고 KSD-E4-3은 UV에 의해 유도된 nuclear factor-kappa B(NF-κB)와 activator protein-1(AP-1)의 DNA-binding 활성을 농도 의존적으로 강하게 저해하는 것을 확

인할 수 있었다(그림 3-3-28). 이러한 결과로 KSD-E4-3은 ERK1/2과 p38의 인산화를 억제하고, NF- $\kappa$ B DNA-binding activity를 감소시킴으로서 MMP-9의 발현을 억제한 것으로 보인다. 최종적으로 KSD E4-3은 아래 그림 3-3-29와 같은 기작으로 광노화로 유도된 피부노화 반응의 개선 효과를 가지는 것으로 사료된다.

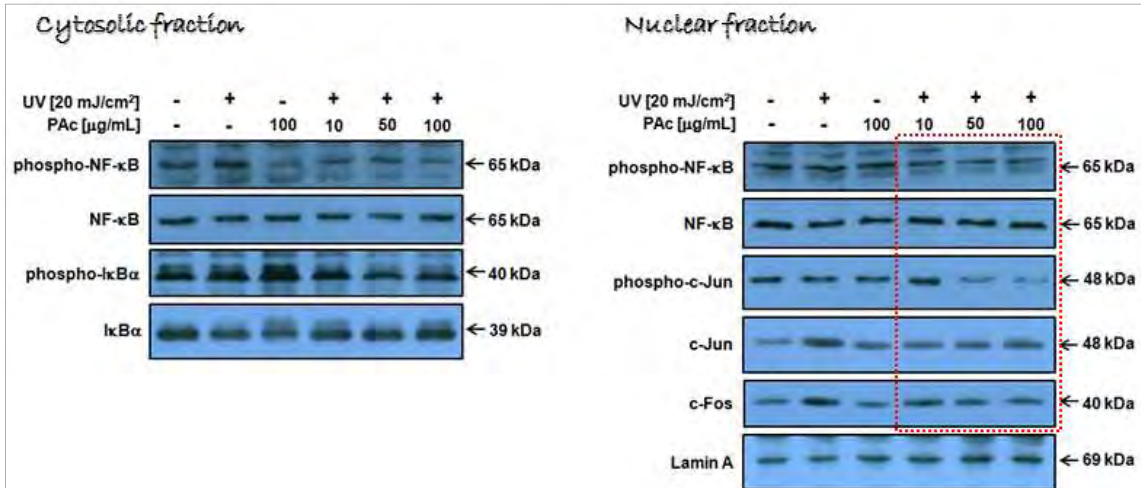


그림 3-3-28. KSD-E4-3의 항주름 효과 기전 연구2

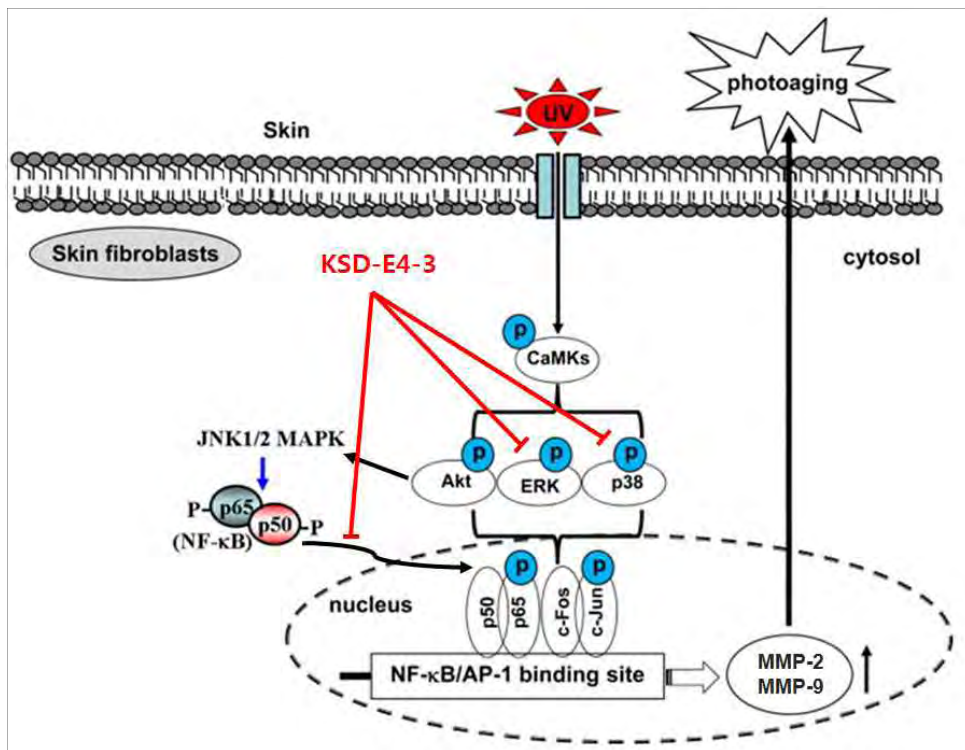


그림 3-3-29. KSD-E4-3의 항주름 저해 기전

사. 누룩 추출/분획물의 광노화성 피부 개선 평가와 작용 기전 분석

1차년도에 진행되었던 주박 추출·분획물들의 피부 개선 활성 평가 중 최종 선발된 3종 외에도 많은 시료들에서 미백 및 주름개선 활성이 높게 나타난 바 있다. 이러한 활성들은 이 주박들 상당수의 제조과정의 원료로 사용되는 누룩(*Rhizopus oryzae* KSD-815 균주 배양 누룩, R4)에서 유래될 수 있을 것이라 판단되었다. 그래서 제1세부기관에서 제공해준 R4 누룩 추출·분획물 5종에 대한 미백활성 및 tyrosinase 저해활성도 2차년도에 진행하였다. B16F10에 누룩 추출·분획물들을 처리한 결과, 미백 활성은 KSD-E9-3 시료에서 21.48%으로 가장 높은 활성을 나타내었다.

그림 3-3-30. 누룩 추출·분획물들의 Tyrosinase 저해활성(%)

80% EtOH ex.		L-tyrosin	L-DOPA
	추출물 및 분획물	최종 시료명	(6,667 ppm) (5,000 ppm)
국순당 (R4) 누룩	Extract	KSD-E9-1	-14.37 11.43
	H fr.	KSD-E9-2	20.82 -32.59
	<b>EA fr.</b>	<b>KSD-E9-3</b>	<b>34.31</b> <b>96.60</b>
	B fr.	KSD-E9-4	-7.04 4.64
	W res.	KSD-E9-5	10.56 9.60

이 누룩 추출·분획물들 중 KSD-E9-3의 저해활성이 가장 높았고, 멜라닌 합성 등에 중요한 효소 단백질인 tyrosinase을 효과적으로 저해함을 알 수 있었다(그림 3-3-30). 앞서 말한 바와 같이 이 추출·분획물들은 국순당 누룩 R4로부터 얻었고, 이는 백세주 및 우국생 등의 주박이 만들어지는 공정에서 공통적으로 사용되는 원료이기 때문에 이러한 활성이 기존에 스크리닝되었던 주박 추출·분획물들의 우수한 활성과 상관관계가 있을 것으로 판단된다. 그래서 이 분획물(KSD-E9-3)에 대한 광노화성 피부노화 개선에 대한 기전연구를 진행하였다.

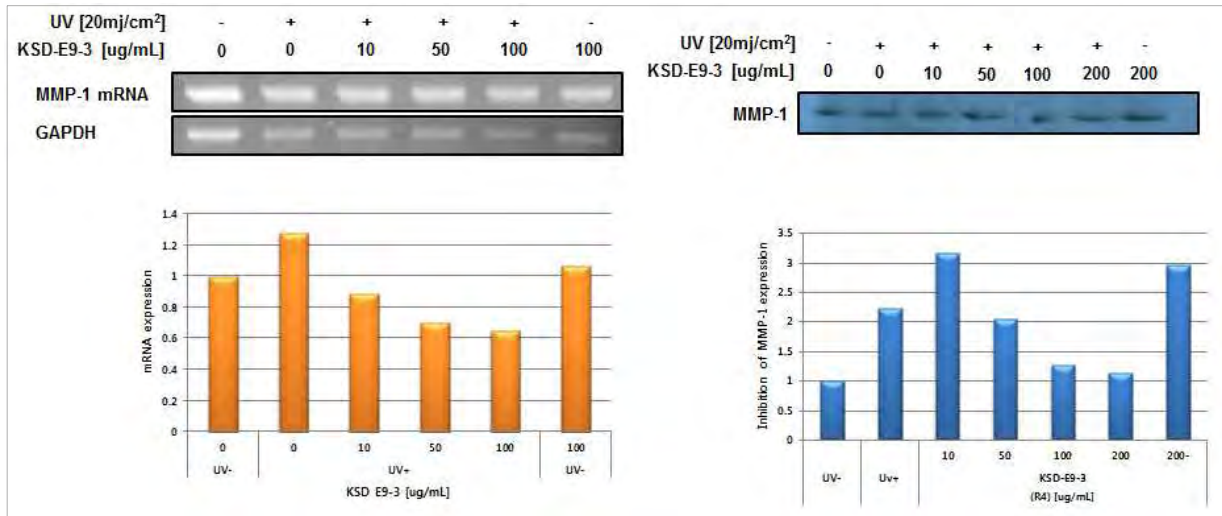


그림 3-3-31. RT-PCR와 Immunoblot assay를 이용한 KSD-E9-3의 MMP-1 저해활성

KSD-E4-3과 마찬가지로 KSD-E9-3을 처리한 RT-PCR을 이용한 분석에서 MMP-1 유전자의 발현양이 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다(그림 3-3-31, 좌). 또한 immunoblot assay를 통해서도 UV에 의해 유도된 MMP-1 단백질의 양을 감소시킴을 확인하였다(그림 3-3-31, 우). 그리고 이 분획물이 MMP-2와 MMP-9의 proteolytic 활성에 미치는 영향을 gelatin-zymography 방법을 이용하여 분석하였다 (그림 3-3-32). 이는 앞의 KSD-E4-3의 실험방법과 동일하게 진행되었다.

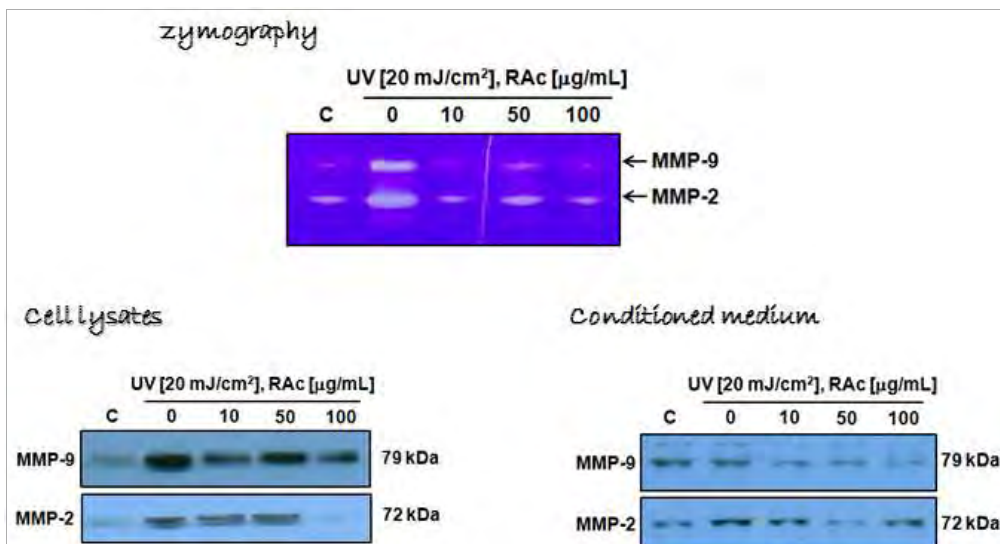


그림 3-3-32. KSD-E9-3의 MMP-2/-9 저해 활성 평가

이 실험 결과 KSD-E9-3(= RAc)은 MMP-2와 MMP-9의 단백질 발현을 농도 의존적으로 저해하였다(그림 3-3-32). 이는 KSD-E4-3(백세주 주박 분획물)과 유사한 저해력을 보이는 점에

서, 백세주 주박의 MMPs의 저해력이 백세주의 발효원료인 R4 누룩에서 일부 유래될 수 있음으로 예상된다. 또한, R4 누룩을 발효제로 사용된 전통주 및 부산물인 주박에서 공통적인 효능을 가질 수 있을 것으로 사료된다.

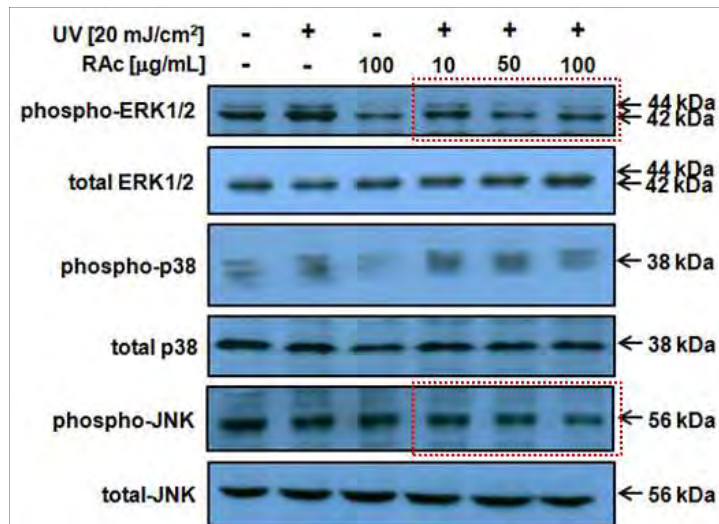


그림 3-3-33. KSD-E9-3에 의한 신호전달체계 변화 확인

또한, KSD-E9-3의 효과 기전을 알아보기 위하여 관련 신호전달 단백질의 발현량을 조사하였다. 그 결과 KSD-E9-3을 처리한 HaCaT 세포에서는 ERK (extracellular signal-regulated kinase) 1/2과 JNK(c-JUN N-terminal kinase)의 인산화가 저해되었음을 알 수 있었다(그림 3-3-33). 하지만 p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)에는 영향을 주지 못하였다. 이는 KSD-E4-3의 실험 결과와 차이가 있었지만, KSD-E9-3도 KSD-E4-3과 유사하게 UV에 의해 유도된 nuclear factor-kappa B(NF-κB)와 activator protein-1(AP-1)의 DNA-binding 활성을 농도 의존적으로 강하게 저해하는 것을 확인할 수 있었다(그림 3-3-34). 이러한 결과로 KSD-E9-3은 ERK1/2과 JNK의 인산화를 억제하고, NF-κB DNA-binding activity를 감소시킴으로써 MMP-9의 발현을 억제한 것으로 보인다. 최종적으로 KSD E9-3은 아래 그림 3-3-35와 같은 기작으로 광노화서 피부 개선 효과를 가지는 것으로 사료된다.



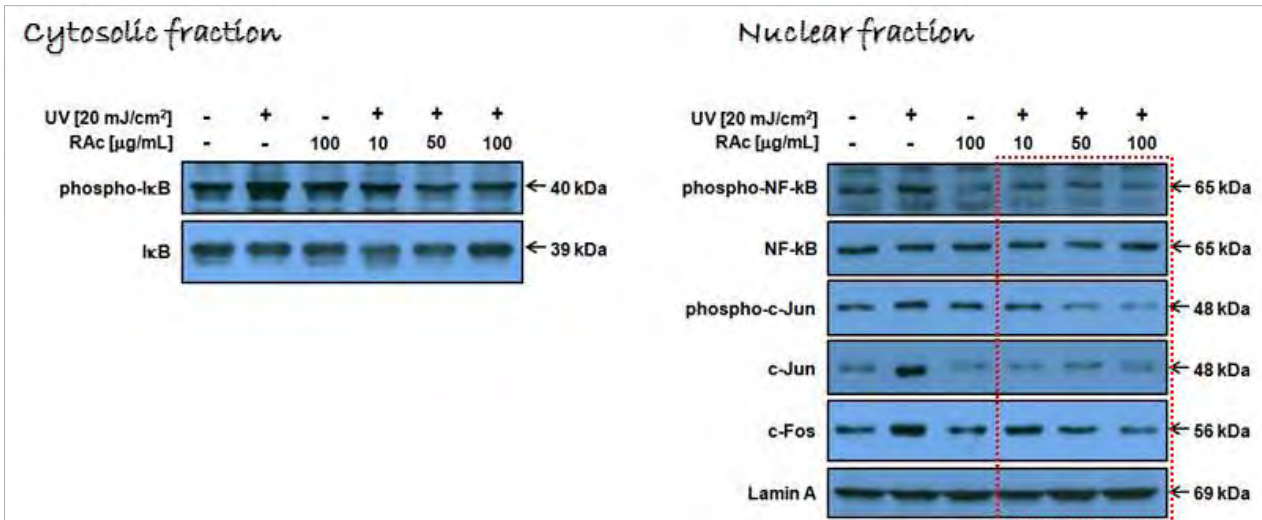


그림 3-3-34. KSD-E9-3의 항주름 효과 기전 연구2

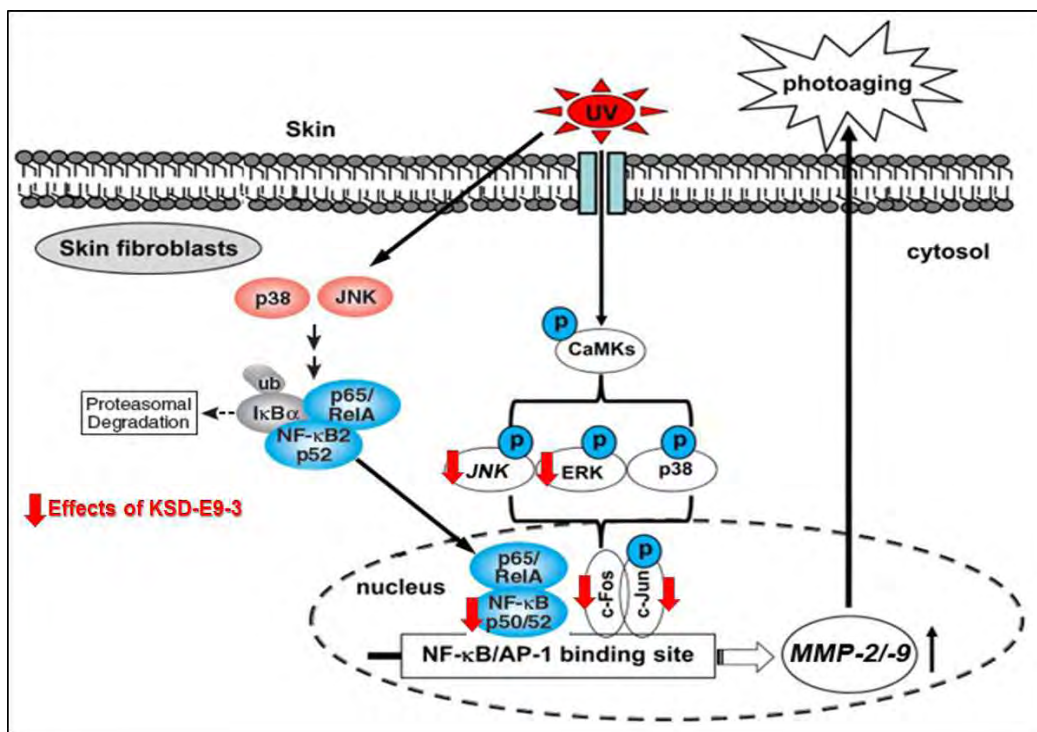


그림 3-3-35. KSD-E9-3의 항주름 저해 기전

아. 막걸리 주박의 중금속 흡착 활성화

근래에, 특히 올해, 국내의 대기 미세먼지 오염문제는 사회적으로 크게 문제가 되며 국민들이 건강을 해칠 수 있는 오염원으로 우려 되고 있다. 대기 중의 미세먼지는 사람들의 호흡기를 통한 흡수 외에도 피부를 오염시키며 피부 노화 및 피부 트러블의 원인이 될 수 있다. 이는

주로 미세먼지에 함유된 중금속에 인한 것이다. 중금속은 수은, 카드뮴, 납 및 구리와 같은 금속류를 말하며, 일반적으로 생체 내로 흡수되면 생체 내 물질과 결합하여 잘 분해되지 않는 유기복합체를 형성하기 때문에 몸 밖으로 빨리 배출되지 않는다. 피부에서는 이러한 유해 중금속을 포함하는 미세먼지가 화학반응을 일으켜 질소산화물, 황산화물 등과 같은 유해물질을 추가로 생성해 피부의 염증성물질인 시토키인 등을 증가시키고 아토피나 피부 트러블을 유발할 수 있다. 또한, 중금속이 피부의 보습과 밀접한 관계에 있는 히아루론산(Hyaluronic Acid)을 파괴한다는 것은 이미 알려져 있다.

이와 같은 이유로 본 연구기관에서는 3차년도 최종 결과물인 주박을 활용한 향장 시제품 개발을 위한 연구 중 주박이 중금속 흡착능을 가질 수 있는지에 대해 실험을 진행하였다. 실험 방법은 건조 막걸리 주박의 중금속 흡착 효과를 확인하기 위하여 건조주박과 납, 카드뮴 용액 (Pb 60ppm, Cd 30ppm 100ml DW 용액)을 농도별로 주박을 넣어 1시간 반응 시킨 후 고형분을 제거한 용액 시료를 만들었다. 시료는 서울대학교 농생명 과학 공동기기에 분석을 의뢰하여 유도결합플라즈마 분광분석기(ICP-OES)를 이용한 중금속의 양을 측정하고 제거율은 주박을 넣지 않은 대조군의 중금속 농도 대비로 계산하였다. 건조 막걸리 주박 함량 증가에 따라 중금속 흡착력이 증가함을 확인하고 이 새로운 기능을 특허로 출원하였다(주박을 포함하는 중금속 및 미세먼지 제거용 화장품 조성물, 출원번호 10-2014-0078216). 세정 제품에 건조 주박을 사용하면 주박의 사용량이 추출물에 비해 많을 뿐 아니라 천연 소재를 사용한다는 장점과 함께 피부의 미세먼지와 중금속을 제거하여 타제품과의 차별성을 가질 것으로 생각된다.

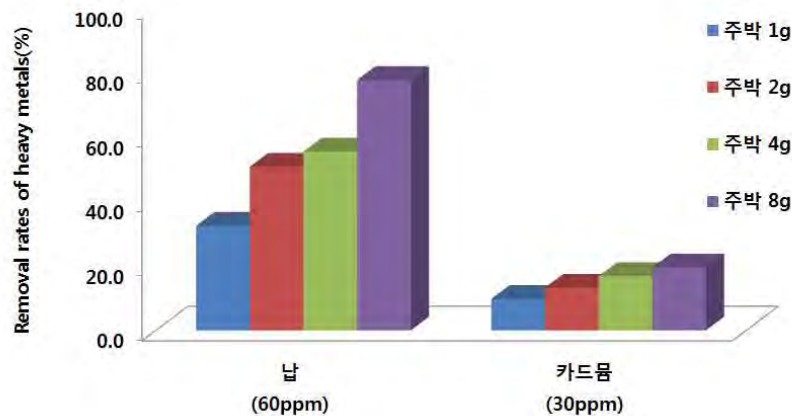


그림 3-3-36. 주박의 납과 카드뮴 중금속 흡착력

#### 자. 피부 진정활성

환경변화와 오염으로 인하여 건조하고 민감한 피부가 증가하고 있으며 그 대표적인 예가

아토피피부염이다. 아토피피부염환자에서의 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*, 이하 *S. aureus*)의 역할은 매우 중요하여 20여 년 전부터 심각한 수준의 *S. aureus*의 집락형성(colonization)이 보고된 바 있으며, 이러한 균의 집락형성은 중증 아토피피부염의 원인이 되며 일반적인 치료에 반응 하지 않는 난치성 아토피피부염 및 질병의 만성화를 초래하는 주범으로 대두되었다. 아토피 피부염에서 발견되는 innate immunity의 이상반응은 *S. aureus* 감염의 심각성을 더욱 증가시켜 질환의 만성화와 악성화의 악순환 고리를 유도한다. 또한 *S. aureus*의 피부 감염의 중요성은 세균 자체의 심한 집락형성에 의한 문제 뿐 아니라 *S. aureus*에서 유래 되는 super-antigen(초항원)에 의한 염증의 악화다. 따라서 이 실험에서는 피부에서 분리한 *S. aureus*에 대한 추출물의 항균 활성을 확인해 보았다. 우국생, 백세주 주박 에탄올 추출물은 *S. aureus*에 대한 항균활성이 없었으나 우국생 에틸아세테이트 분획물(KSD-E2-3)은 *S. aureus*에 뚜렷한 항균 활성을 보였다.

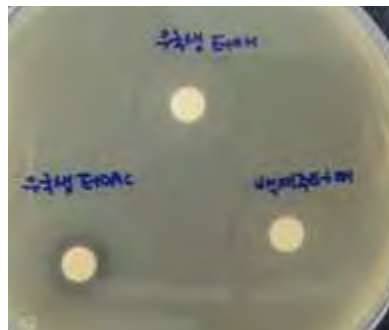


그림 3-3-37. 주박 분획물에 의한 항균활성

또 KSD-E2-3의 피부 진정효과를 확인하기 위하여 피부 자극제인 sodium dodecyl sulfate(SDS)와 함께 농도별로 우국생 에틸아세테이트 분획물을 처리하여 하루동안 피부 첩포 후 홍반 정도를 확인하였다. 그 결과 아래의 그림과 같이 control에 비해 홍반의 정도가 처리물의 농도에 의존적으로 감소함을 확인하였다.



그림 3-3-38. 주박 분획물에 의한 진정효과 평가



카. 향장료 원료화

다양한 주박의 생리활성을 바탕으로 화장품 원료화를 위한 종합 평가를 실시하였다. 생산량이 많아 주박을 대량으로 얻을 수 있고 국순당 누룩을 이용하여 전통누룩에 비해 원료의 균질성을 가질 수 있으며 기존에 알려진 미백 뿐 아니라 중금속 제거, 진정효과를 나타내는 우국생 주박을 최종 후보로 선정하고 이를 이용하여 파우더와 추출물로 원료화를 진행하였다. 원료의 제조공정 및 원료의 스펙은 아래 표와 같으며 쌀발효물의 경우 한국식품연구소에 의뢰하여 비소와 납의 함량을 분석하였으며 비소 4 ppm이하, 납 10 ppm이하의 기준을 충족하였으며 세균, 진균 각 100 CFU/ml의 기준을 충족하였다. 두 원료는 리조푸스/쌀발효추출여과물, 리조푸스/쌀발효물로 화장품협회에 이름을 등재하였다.











제품명	샘플	주종	원료	누룩	비고	생산량	원료 균질성	생리활성	차별성	종합평가
			쌀 100%	국순당 누룩		대량	○	★★★	○	1순위
		탁주	쌀 100%	이화 누룩	약재 4종	소량	△	★★	○	
			쌀 100%	전통 누룩		소량	△	★★★	○	
			설경미, 전분	국순당 누룩	약재 12종	대량	○	★★★	○	2순위
		약주	쌀, 밀가루	국순당 누룩		소량	○			
			쌀, 전분, 과당	국순당 누룩		소량	○			
		과일주	복분자 56%, 주정, 과당			소량	○	★★		
		증류주	쌀, 고구마	국순당 누룩		소량	○	★		
										
								★★★		

그림 3-3-40. 최종 원료 선별

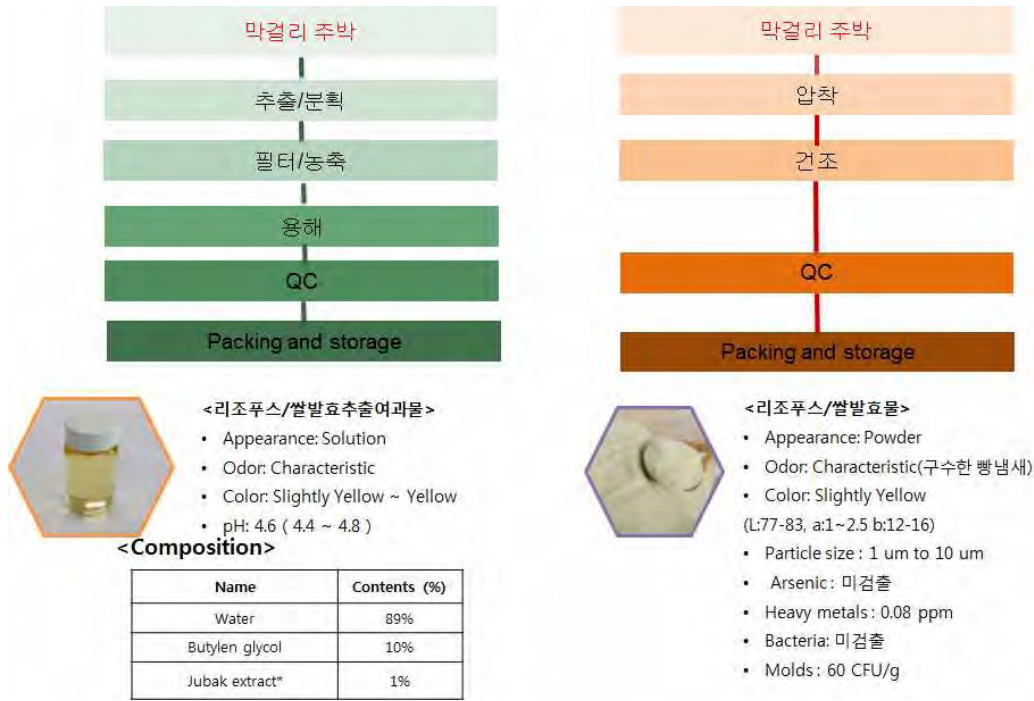


그림 3-3-41. 우국생 주박 원료화 2종

**▶ 화장품 성분 표준 정보**

성분명	리조푸스/쌀발효물
영문명	
CAS No.	
EINECS No.	
기원 및 정의	이 원료는 미생물인 Rhizopus로 벼 Oryza sativa의 씨를 발효하여 얻은 것이다.
분자구조식	
시성식	
배합목적	
별명	

**▶ 화장품 성분 표준 정보**

성분명	리조푸스/쌀발효추출여과물
영문명	
CAS No.	
EINECS No.	
기원 및 정의	이 원료는 미생물인 Rhizopus로 벼 Oryza sativa의 씨를 발효하여 얻은 것을 추출하고 여과한 것이다.
분자구조식	
시성식	
배합목적	
별명	

그림 3-3-42. 주박 원료 등재 2종

타. 원료 및 제품의 안전성 평가

원료의 안정성평가를 위하여 사람세포를 배양하여 진피부터 표피까지 피부의 전 층을 재현해 놓은 실험용 3D(Human skin reconstructed model) 피부모델로 원료의 피부자극성 검사를 실시하였다. 두 원료와 시제품 3종 모두 인공피부에 자극을 나타내지 않았다.

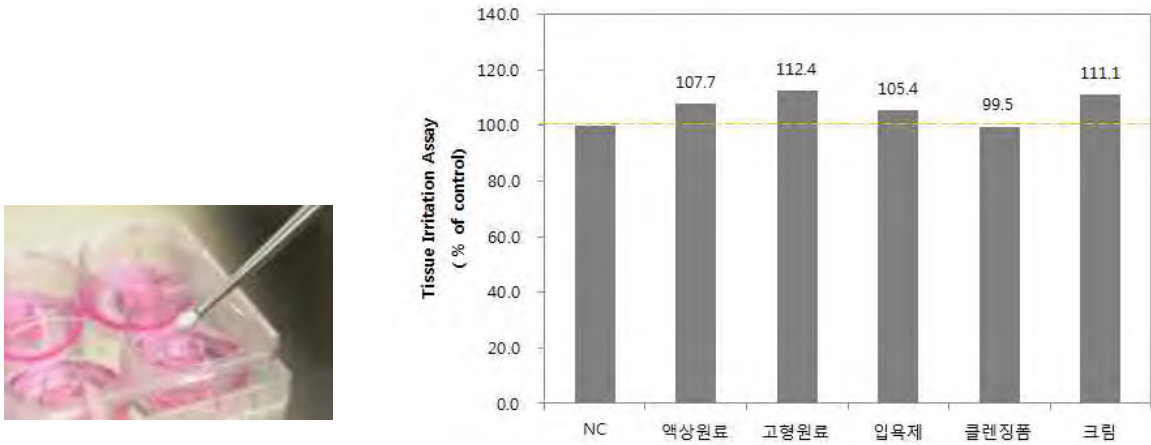


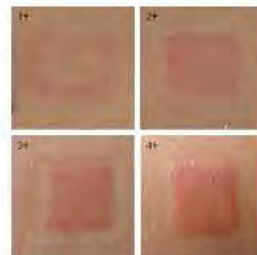
그림 3-3-43. 인공 피부모델을 이용한 원료 및 제품의 피부자극성 검사

직접 사람을 대상으로 두 원료의 안전성 평가를 실시하였다. 전문 임상기관인 더마프로에 의뢰하여, 18-60세의 피부질환이 없는 건강한 남녀 31명의 피험자에게 피부 첩포 테스트를 실시하였다. 48h, 72h뒤의 피부의 변화를 확인한 결과, 시험물질 2종에서 피부반응이 관찰되지 않았다. 본 시험을 통하여 원료 2종은 인체피부 일차자극 측면에서 저자극 범주의 물질로 판단된다. 이 원료를 이용한 시제품 3종에 대한 피부 자극 테스트에서도 피부 자극이 나타나지 않았다.

Table 1. Scoring criteria of skin reactions

Symbol	Grade	Clinical Description
+	1	Slight erythema, either spotty or diffuse
++	2	Moderate uniform erythema
+++	3	Intense erythema with edema
++++	4	Intense erythema with edema & vesicles

<Clinical standard photographs>



No.	Test material	48 hrs					72 hrs					Reaction grade <sup>b)</sup>		
		±	1+	2+	3+	4+	±	1+	2+	3+	4+	48 h	72 h	Mean
1	Squalene	- <sup>a)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
2	짚발효물	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
3	짚발효추출물(10%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0

a) No reaction

b) Reaction grade =  $\frac{\sum \{ \text{Grade X No. of Responders} \}}{4 \text{ (Maximum grade)} \times 30 \text{ (Total Subjects)}} \times 100 \times (1/2)$

### Result

No.	Test material	Reaction grade*		
		24 h	48 h	Mean
1	크림	0	0	0
2	입욕제	0	0	0
3	폼 클렌저	0	0	0

\* Reaction grade =  $\frac{\sum \{ \text{Grade X No. of Responders} \}}{4 \text{ (Maximum grade)} \times \text{(Total Subjects)}} \times 100 \times (1/2)$



그림 3-3-44. 피부자극성 검사 결과

### 파. 향장 시제품 개발

건조한 환경으로 인한 소양증이 증가하고 유해환경과 스트레스로 인한 민감성 피부가 증가하고 있어 저자극의 천연, 발효 소재에 대한 관심이 높다. 한 조사에 따르면 화장품 원료 중 수입 비중은 64.5%에 달했으며 국내산 원료는 37.3%에 머물렀고 이 중 자가 생산은 3%에 불과한 것으로 나타났다. 하지만 ‘유전자원 이용국은 유전자원 제공국의 승인 후 자원에 접근할 수 있으며, 그 이용으로 발생한 이익을 제공국과 공유해야 한다’는 나고야의정서가 발효됨에 따라 화장품 업계에 원료 수입에 대한 부담이 증가할 것으로 예상되면서 국내 원료 산업에 대한 관심이 높아지고 있다. 이러한 니즈에 맞추어 생쌀을 발효하여 술을 만들고 남은 부산물인 막걸리 주박을 활용하여 파우더와 추출물로 원료화 하고 새로운 기능을 밝혀 시제품화 하였다.

#### (1) 자연발효 입욕제

웰니스(wellness=well-being+happiness)에 대한 관심이 증가하면서 홈스파가 대중화되었으며 민감성 피부의 증가로 저자극 천연소재의 홈스파를 찾는 소비자도 늘어나고 있다. 따라서



쌀발효물(주박)을 활용한 입욕제를 아래의 표와 같이 제조하였다. 건조함, 가려움 등을 호소하는 민감성 피부 33명을 대상으로 입욕제 사용을 실시하고 설문조사를 통하여 개선 정도를 확인하였다. 아래의 결과처럼 입욕제의 사용으로 건조함, 가려움, 따가움, 붉은기, 피부거침이 개선되는 것을 확인 할 수 있었으며 제품사용으로 자극을 느낀 사람은 없었고 79%가 제품의 만족도를 나타내 재사용을 원하였다. 이러한 피부 진정효과는 건조 쌀발효물에 다량 존재하는 발효 영양물과 함께 항염, 보습작용을 하는 판토텐산의 효과로 보여지며 피부의 pH를 개선하여 장벽개선에 도움을 주는 것으로 생각된다.

**현황**

- 건조한 환경으로 인한 소양증 증가
- 유해환경으로 인한 민감성 피부 증가
- 현대인의 스트레스 증가
- 천연, 발효 소재에 대한 관심
- 웰니스에 대한 관심 증가로 홈스파 대중화
- 아기 입욕제 사용 증가



성분	함량 (g)
중조	492
글리세린	16
쌀발효물	164
전분	82
구연산	246

민감성 피부 대상 입욕제 사용 후 설문조사

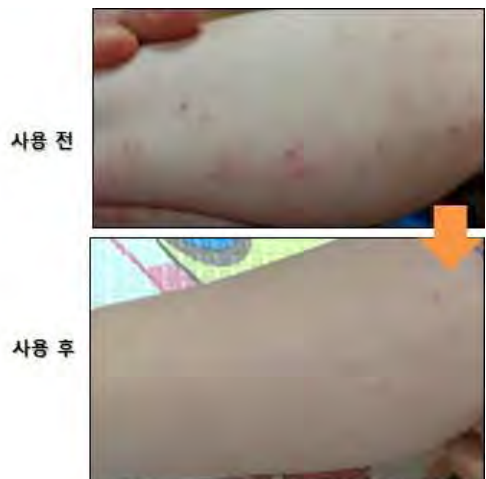
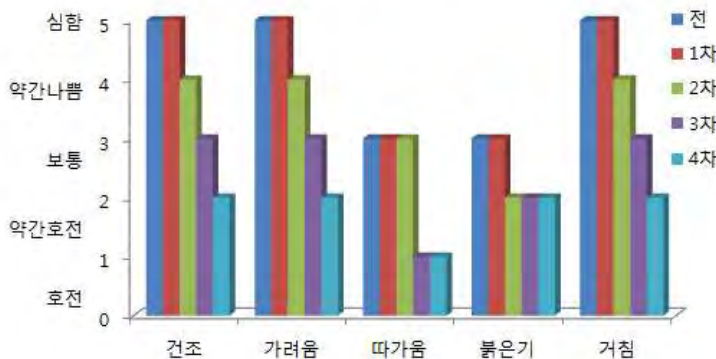


그림 3-3-45. 자연 발효 입욕제 성분 함량

민감 피부 품평단 33인이 말한  
**발효 입욕제 사용 후기**

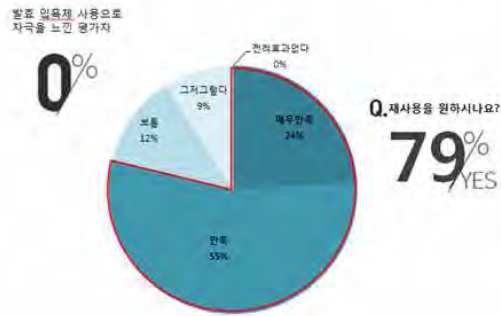


그림 3-3-46. 입욕제 설문 조사 결과

(2) 자연발효 클렌징 폼

환경오염과 더불어 “Anti-dust” 제품이 각광받고 있다. 특히 미세먼지는 1년 내내 우리의 건강을 위협하며 피부에 있는 모공보다 작아 피부에 흡착되어 피부 트러블을 발생시킬 수 있다. 특히 미세먼지내의 중금속은 몸속에 축적되어 다양한 질병의 원인이 됨이 알려져 있다. 선행 연구에서 건조주박을 화장품 원료화한 쌀발효물(건조 주박)은 중금속 제거 효과가 있었으며 이를 특허로 출원한 바 있다. 따라서 쌀발효물을 다량 함유하는 폼클렌저를 만들어 피부를 깨끗이 세척하면서 더불어 쌀발효물의 보습효과를 함께 느낄 수 있는 제품을 개발하였다.

- 특징**
- 쌀발효여과물 7% 함유
  - 쌀발효여과물의 발효 영양
  - 쌀의 정화력에 발효의 힘이 더해져 미세먼지와 각종 노폐물을 제거해주고, 잔여감 없이 산뜻하게 마무리 (특허출원: 10-2014-0078216)
  - 천연 스크럽
  - 촉촉한 발효 보습막

**완제품 시험 규격 및 시험 성적서**

번 호	명칭	시험 방법	시험 결과	시험 일자	시험 장소
1	제조명	PCD 003	003	2014. 08. 20	진해제약원
2	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
3	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
4	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
5	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
6	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
7	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
8	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
9	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
10	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
11	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
12	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
13	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
14	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
15	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
16	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
17	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
18	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
19	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
20	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
21	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
22	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
23	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
24	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
25	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
26	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
27	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
28	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
29	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
30	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
31	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
32	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
33	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
34	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
35	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
36	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
37	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
38	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
39	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
40	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
41	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
42	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
43	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
44	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
45	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
46	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
47	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
48	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
49	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
50	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
51	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
52	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
53	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
54	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
55	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
56	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
57	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
58	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
59	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
60	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
61	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
62	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
63	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
64	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
65	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
66	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
67	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
68	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
69	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
70	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
71	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
72	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
73	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
74	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
75	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
76	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
77	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
78	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
79	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
80	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
81	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
82	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
83	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
84	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
85	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
86	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
87	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
88	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
89	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
90	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
91	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
92	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
93	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
94	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
95	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
96	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
97	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
98	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
99	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원
100	제조명	003	003	2014. 08. 20	진해제약원



그림 3-3-47. 클렌징 폼 특징, 시험 성적서 및 디자인

쌀발효물이 천연 스크럽 작용을 하여 피부의 각질을 깨끗이 제거해 주며 이를 확인하기 위하여 세안 전후의 각질을 디스컴 테이프를 이용하여 피부 각질 변화를 확인하였다.

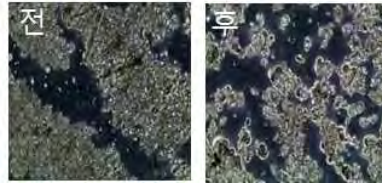


그림 3-3-48. 클렌징 폼에 의한 각질 변화

소비자의 반응을 살펴보기 위하여 10-60대 체험단에게 일주일간 아침저녁 사용 후 설문을 실시하였다. 184명의 설문결과를 정리하여 5점 척도 중 만족과 매우만족을 합산하여 항목별로 아래와 같이 나타내었다. 제품 사용 중의 롤링감과 사용 후의 보습감, 피부 부드러움, 세정력 순으로 만족도가 높았으며, 최종 만족도 71%이고 76.5%가 구매의사를 보였다.

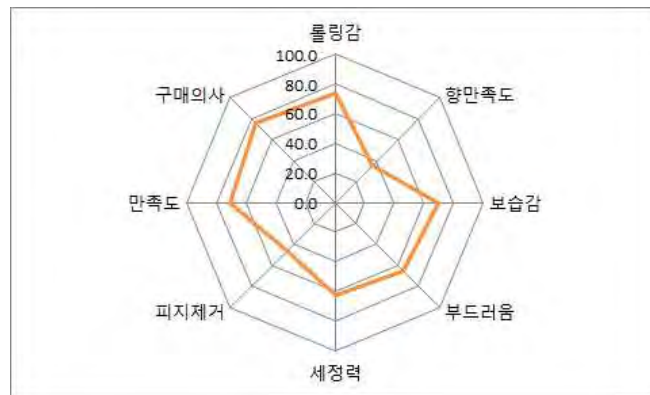


그림 3-3-49. 자연발효 클렌징 폼 설문조사 결과

### (3) 수분 발효 크림

치료가 아닌 화장품이나 생활용품을 통한 민감성 피부의 관리 영역이 확대되면서 건조 및 민감성 피부를 위한 치료 보조용 보습제 시장이 성장하고 있으며, 특히 저자극, 고보습의 해외 브랜드들이 강세를 나타내고 있으며, 피부에 보습력을 주는 히아루론산, 피부 장벽의 성분인 세라미이드, 진정효과를 나타내는 식물 추출물, 항산화제 등의 사용을 특징으로 하고 있다.

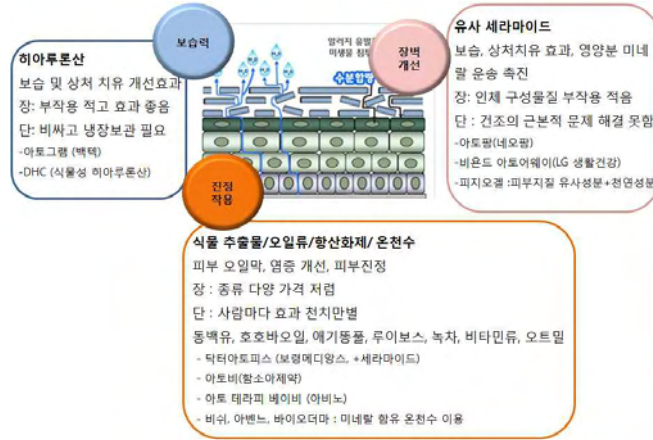


그림 3-3-50. 보습제 성분과 기능

항염, 진정활성을 나타내는 리조푸스/쌀발효추출여과물을 이용하여 아래의 처방(그림 3-3-51)과 같이 저자극 보습 크림을 개발하였다.

쌀의 영양에 발효의 힘이 더해져 피부에 에너지를 공급해드립니다.

**특징** 피부 스트레스를 진정시키고 발효 보습막이 피부 수분을 지켜주어 도포 후는 물론 물로 씻은 후에도 부드러움이 지속됩니다.

Ingredient	Wt (%)
A 정제수	To 100
한방 발효수	30.0
나이아신아마이드	2.0
B.포도씨오일	3.00
해바라기씨 오일	3.00
호호바 오일	5.00
스테아릴올리베이트	5.00
세틸 알코올	1.00
디베히콘	1.00
C.알로에 베라겔	4.00
아데노신 리포솜	1.00
D. 쌀발효 추출여과물	1.50
천연 보존제	1.50
향료	0.10

◆ Procedure

- Heat A to 70°C and disperse completely.
- Heat B to 70°C separately and mix to disperse.
- Pour B into A and homogenize for 5 min.
- Add C and cool to 45°C.
- Add D while stirring.
- Stop stirring when temperature reaches 30°C

그림 3-3-51. 발효 보습 크림 성분 및 조제 방법

제조된 크림을 16명을 대상으로 5점 척도의 사용성 테스트를 실시하였으며 만족이상의 결과를 아래의 표와 같이 나타냈다.

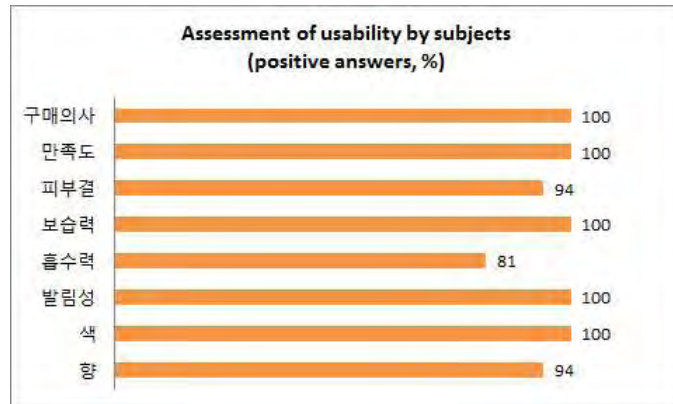


그림 3-3-52. 발효 보습 크림 사용성 테스트 결과

#### (4) 백세주 주박 추출물의 원료화 및 시제품 개발

백세주 주박 추출물의 경우 향산화, 항주름, 항염, 미백, 항비만, 항암 등에서 좋은 효과를 나타내며 이는 백세주에 포함된 12가지 한약재에서 유래한 다양한 폴리페놀의 영향으로 확인되었다. 백세주 주박을 에탄올로 추출하여 농축한 것을 10%로 Butylen glycol과 증류수에 녹여 원료를 0.45 um 필터로 필터링하여 원료화 하였다. 백세 추출물이 2% 들어간 고농축 발효 앰플을 제작하였으며 여기에 한방 효모 발효액을 첨가하여 추출물의 효과를 극대화 하고 사용직 후 피부 부드러움을 느낄 수 있도록 개발 하였다.

**<백세 추출물>**

- Appearance: Solution
- Odor: Characteristic
- Color: Slightly Yellow ~ Yellow
- pH: 4.6 ( 4.4 ~ 4.8 )
- Bacteria: 미검출
- Molds: 미검출

**<Composition>**

Name	Contents (%)
Water	80%
Butylen glycol	10%
Jubak extract*	10%



그림 3-3-53. 백세주 주박 활용 원료화 및 시제품

#### 하. 막걸리 주박을 활용한 항비만 음료 시제품 개발

최근, 세계적으로 이너뷰티(Inner beauty) 시장이 신체 외형 및 피부를 개선하는 개념의 기능성 식품 형태로 태동하고 매년 5% 성장률을 보이고 있다. 하지만 아직 이너뷰티는 명확한 정의와 법적 기준이 없어 뷰티푸드(beauty food), 뉴트리코스메틱스(nutricosmetics) 등의 다양한 용어로도 불리며 화장품 브랜드를 중심으로 시장 진입이 이루어지고 있다. 현재는 유럽의

다이어트/미용 식품 시장의 성장세가 Oenobiol 브랜드를 중심으로 뚜렷한 강세를 보이며, 이어 성장하는 일본과 미국 브랜드 시장을 포함해 2012년 기준 2조 5000억 원 규모까지 성장하였다.

국내에서는 약 10년 전부터 이너뷰티 제품들이 출시되면서 현재는 관련 건강기능성식품 개별 인정형 소재가 전체의 10%를 차지하고 있다. 현재 국내 이너뷰티 개별인정형 소재는 현재 8가지가 있으며, 보습과 UV차단 기능이 전부이지만 자율적이고 신뢰성 있는 연구결과물들을 제출 시 관련된 다른 기능성 소재인정도 가능하다. 또한 이너뷰티 제품은 모든 생명과학 분야에서 융합적인 기술이 접목될 수 있다는 장점이 있다.

1차년도 제2세부기관에서 연구한 주박 추출물의 지방세포형성 억제 연구 중 KSD-E2-3(우국생 막걸리 주박 추출·분획물)은 마우스 전지방 세포주 3T3-L1의 지방세포 형성과정을 억제하는 효과와 지방세포 형성의 최종 전사인자인 *PPAR $\gamma$*  유전자 발현을 현저하게 감소시키는 결과를 얻은 바 있다. 이와 관련된 주박을 활용한 항비만 건강기능식품 등에 대한 특허를 출원(출원번호 10-2013-0091213)하였고, 본 연구기관에서는 주박을 활용해 항비만, 다이어트 음료 타입 시제품을 개발하였다.

본 시제품 개발의 제조 공정은 아래 표와 같이 진행되었다. 먼저 주박의 알코올 성분을 희석시키기 위하여, 주박에 v/w 비율로 3-5배의 급수를 가해 1차 washing을 진행하였다. 그리고 1차 washing된 주박에 v/w 비율로 3-5배의 급수를 가해 2차 washing을 진행하였다. 마지막으로 2차 washing된 주박에 v/w 비율로 5-10배의 급수를 가한 후 균질화를 진행하였다. 이를 주박 이너뷰티 음료 베이스로 하고 HTST(high temperature short time method)를 수행하며 살균을 진행하였다. 이 후 HTST가 완료된 베이스에 당, 산, 액기스 등을 혼합하여 제성함으로써 음용 기호성을 조정하였다. 이후 탄산 주입 과정을 선택적으로 진행하고 pasteurization을 수행하여 시제품을 완성하였다.



그림 3-3-54. 막걸리 주박을 활용한 항비만 음료 시제품 개발 공정 모식도

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 1차년도 연구목표에 입각한 연구개발 목표 달성도

구분	연도	연구개발의 목표		연구개발의 내용	목표 달성도
1차년도	2012	제1세부	주박, 물질 추출 및 분획	<ul style="list-style-type: none"> <li>○주박을 MeOH, EtOH, 또는 열수를 이용한 다양한 용매 추출물 조제</li> <li>○추출물에 대한 용매 극성을 이용한 분획물 조제</li> </ul>	100%
			주박 분획별, 항산화, 항혈전, 항균 활성 작용 기전 규명	<ul style="list-style-type: none"> <li>○다양한 추출물, 분획물의 유용 생리기능 평가 및 활성분획물 대량 확보</li> <li>○유용 활성의 작용기전 규명</li> <li>○활성분획의 안전성 및 안정성 평가</li> </ul>	100%
		제2세부	주박 분획별, 전지방세포 분화 및 염증 반응 억제 작용 탐색	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 주박 유래 다양한 추출물에 의한 전지방세포의 성장 및 지방세포 분화에 미치는 영향 연구                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cell viability assay</li> <li>- 지방세포 분화</li> <li>- Oil Red O 염색</li> </ul> </li> <li>○ 주박유래 다양한 추출물에 의한 항염증 활성 연구                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Nitric oxide 정량</li> </ul> </li> </ul>	100%
			제1협동	주박 분획별, 피부 미백 및 주름 개선 활성 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>○피부 미백 활성 평가                             <ul style="list-style-type: none"> <li>-미백 활성 스크리닝</li> </ul> </li> <li>○주름 예방/개선 활성 평가                             <ul style="list-style-type: none"> <li>-주름 활성 스크리닝</li> </ul> </li> </ul>

## 제 2 절 2차년도 연구목표에 입각한 연구개발 목표 달성도

구분	연도	연구개발의 목표		연구개발의 내용	목표 달성도
2차년도	2013	제1세부	생리 기능활성별 유효 성분/핵심물질 분리 · 동정1	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 활성성분의 분리, 정제                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Column chromatography를 이용한 소분획의 조제</li> <li>- 활성소분획에 대한 column chromatography를 이용한 활성성분의 추적, 분리</li> <li>- 활성성분의 정제 (HPLC)</li> </ul> </li> <li>○ 활성성분의 구조 규명                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 활성성분의 물리, 화학적 특성 규명</li> <li>- 스펙트럼 data를 이용한 화학구조 결정</li> </ul> </li> </ul>	100%
		제2세부	주박 추출물 85종에 의한 항염증 및 항암 활성 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 주박 추출물 85종에 의한 항염증 활성 및 작용기전 연구                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- DNA microarray 실험</li> <li>- RT-PCR 및 real-time PCR</li> </ul> </li> <li>○ 주박 추출물 85종에 의한 항암 활성 및 작용기전 연구                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- DNA microarray 실험</li> <li>- RT-PCR 및 real-time PCR</li> </ul> </li> </ul>	100%
		제1협동	유효성분(핵심물질)별 피부 미백 및 주름 개선 활성 작용 기전 규명	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 유효성분 활성 평가                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 분획물의 세포 미백력 확인</li> </ul> </li> <li>○ 피부 미백 활성 평가 및 작용 기전 (signal pathway) 분석                             <ul style="list-style-type: none"> <li>-cAMP-PKA-CREB-MITF-Tyrosinase의 기전 저해 확인</li> </ul> </li> <li>○ 주름 예방/개선 활성 평가 및 작용 기전 (signal pathway) 분석                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- NF-κB ,MAPK signaling pathway 및 MMPs 발현 확인</li> </ul> </li> </ul>	100%
			향장 시제품 개발을 위한 선행 연구 및 시제품 제조	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 주박의 중금속 흡착능 실험 (클렌징 향장 시제품을 위한 기능성 연구)</li> <li>○ 주박의 Washing 및 균질화와 HTST를 통한 시제품 제조 (항비만음료 시제품 제조)</li> </ul>	추가 달성



### 제 3 절 3차년도 연구목표에 입각한 연구개발 목표 달성도

구분	연도	연구개발의 목표		연구개발의 내용	목표 달성도
3차년도	2014	제1세부	유효성분(핵심물질) 별 항산화, 항혈전, 항균 활성 작용 기전 규명	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 분리 핵심물질의 생리활성 평가 및 활성물질의 작용기전 규명</li> <li>○ 활성분획 및 분리 핵심물질의 제제화 기초자료 확보</li> </ul>	100%
		제2세부	주박 추출물에 의한 항염증 및 항암 활성 및 작용기전 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 고구마 소주 유래 주박 추출 물에 의한 항염증 활성 및 기 전 연구</li> <li>○ 한방이화주 유래 주박 추출물 에 의한 항암 활성 및 기전 연 구</li> <li>○ 순수물질 11종에 의한 항염증 및 항암 활성 연구</li> </ul>	100%
		제1협동	주박, 기능성 화장품 소재화 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 활성분획물의 항균 효과 규명</li> <li>○ 활성분획물의 진정 효과 규명</li> </ul>	100%
	향장 시제품 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 활성성분물의 원료화 및 안전성, 안정성 평가</li> <li>○ 향장 시제품 개발 - 4종</li> <li>○ 시제품 안전성, 사용성 평가</li> </ul>			

## 제 4 절 연구수행에 따른 관련분야 기술발전 기여도

### 1. 연구개발결과의 활용방안(제품화, 산업화 기술 개발)

- ◇ 기능성화장품 및 입욕제를 포함하는 생활용품 개발
- ◇ 폐기물 주박으로부터 고부가가치 향장소재 개발 기술 flow 확립
- ◇ 다이어트 관련 시제품 개발
- ◇ 주박으로부터 고부가가치 항혈전제 식의약품 소재 개발 기술 flow 확립
- ◇ 시제품은 참여기업인 국순당에서 제품화하고 판매할 예정임.
- ◇ 다양한 전통주 주박의 유용생리활성 성분 및 유용생리활성 DB화

### 2. 기술발전

- ◇ 전통주 주박으로부터 새로운 생리활성물질 분리 및 동정
- ◇ 다양한 생리활성 평가를 위한 *in vitro* 및 *in vivo* 모델 확립
- ◇ 다양한 생물자원에서 생리활성물질 분리 및 동정기술 확립

### 3. 경제적 · 산업적 측면

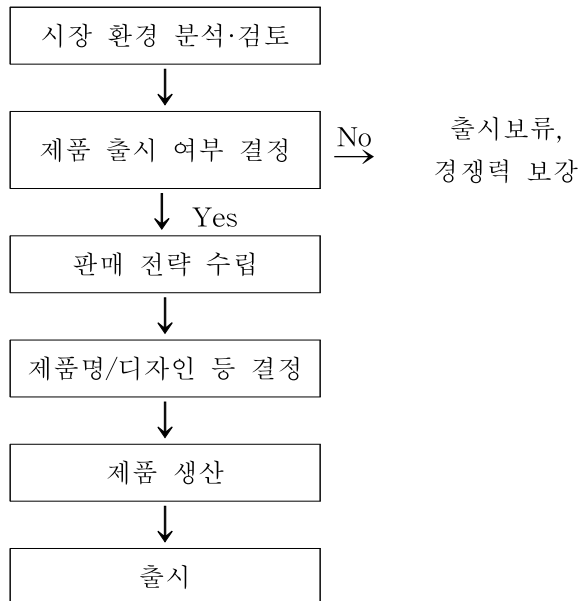
- ◇ 산업폐기물인 주박으로부터 새로운 자원의 탐색
- ◇ 산업폐기물로부터 고부가가치 기능성 화장품 및 다이어트 제품 개발
- ◇ 2종의 화장품원료(리조푸스/쌀발효추출여과물, 리조푸스/쌀발효물) 신규 등록으로 새로운 향장제품 개발 가능
- ◇ 경제적, 산업적 기대효과는 폐기물에서 고부가가치 제품을 생산하므로 매우 크다고 판단됨

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절 실용화·산업화 계획(기술실시 등)

#### 1. 시제품의 실용화·산업화 방안

- 실용화·산업화를 위한 시제품의 개발 및 평가
- 다양한 전통주 주박에 대한 새로운 가능성을 규명하고 성분을 분리 동정하여 천연 기능성 제품으로써 부산물의 가치를 한 단계 높일 수 있어 실용화 가치가 충분할 것으로 판단됨.
- 추출물뿐만 아니라 건조물 자체로의 활용을 함께 검토하여 폐기되는 주박의 활용률을 높였고 폐기되는 주박의 상당량을 고부가 가치화 하는데 기여할 수 있음.
- (주)국순당 연구소, 신사업 기획팀 주관으로 국내 화장품 시장 현황 및 기술 경쟁력 등 시장 환경 검토 후 제품 출시 여부 결정할 예정임



영양성분이 풍부하여 가난한 시절에는 먹기도 하였으나 현재는 폐기물로 처리 중인 술 발효 부산물을 고부가가치화하기 위하여 다양한 생리기능성을 검토하였다. 추출, 분획물 뿐만 아니라 건조물 자체로의 활용을 함께 검토하여 활용률을 높였으며 그 중에서 피부 기능성을 바탕으로 향장 소재화, 제품화를 하였으며 이를 바탕으로 사업화를 준비하고 있다. 사업화에 앞서 SWOT분석을 해보았다. 자사의 술 생산 방식인 생쌀 발효법과 국순당 독자적인 누룩을 사용, 또는 전통 누룩을 사용 하는 점은 타 사와의 차별성을 가질 수 있고 무엇보다도 부산물을 활용하여 자가 개발한 원료를 사용할 때의 경제적인 강점이 있을 뿐만 아니라 과제연구를 통하여 새로운 효과를 밝혀낸 점은 긍정적으로 작용할 수 있을 것이라 생각된다. 하지만 현재 화장품 시장이 포화상태를 이루고 있고 특히 미백, 주름 원료의 경우 기능성 원료로 지정되어 기능성을 인증 받는 절차가 까다로울 뿐만 아니라 이미지와 트렌드를 중요시하는 화장품 사업에서 막걸리, 발효와 같은 유사한 컨셉이 많아 차별성을 나타내기가 어렵다. 따라서 미세먼지 제거

효과와 향염, 진정효과를 바탕으로, 천연소재이면서 보습과 진정의 기능을 요하는 소비자를 대상으로 발효 기능성 화장품에 제품 포지셔닝을 설정하였다.

### SWOT분석

<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 국순당 누룩, 전통 누룩을 사용한 제품으로 효과 차별화</li> <li>▪ 생살발효기법으로 영양 증대</li> <li>▪ 다양한 종류의 주박을 다량 사용 가능</li> <li>▪ 좋은 기업이미지</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 술회사 이미지</li> <li>▪ 판로 미확보</li> </ul>				
<table border="1"> <tr> <td>S</td> <td>W</td> </tr> <tr> <td>O</td> <td>T</td> </tr> </table>		S	W	O	T
S	W				
O	T				
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 주박의 새로운 효과 확인 및 특허 보유</li> <li>▪ 저자극, 먹을 수 있는 소재</li> <li>▪ 이너뷰티 제품과의 연계 가능</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 화장품 시장의 과열</li> <li>▪ 유사 컨셉 과다(발효, 막걸리)</li> <li>▪ 미백 주름 원료의 포화</li> </ul>				

### STP 전략

<p><b>Market Segmentation</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-천연소재 선호자</li> <li>-저자극 선호자</li> <li>-기능성 선호자</li> </ul> <p><b>Targeting</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-목적 시장 : 천연 소재로 기능을 나타내는 저자극 제품을 찾는 고객</li> </ul> <p><b>Positioning</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-발효 기능성 화장품</li> </ul>
--

현재 내부 신사업팀을 발족하여 시장을 분석 중에 있으며 과제의 연구 성과를 바탕으로 사내 벤처를 통한 자체 사업화와 업체인수를 통한 향장 사업화를 검토하고 있다. 급성장하던 화장품 내수 소비는 최근 4-5% 내외 수준 성장하는데 그쳐 저성장 국면에 접어든 것으로 추정된다. 반면, 중국인 수요가 강세를 보이 해외(면세점+해외현지) 매출이 전년대비 70% 가까이 성장하는 등 해외사업의 중장기 성장성이 기대돼 완만한 성장세를 이어가고 있다. 하지만 최근 중국을 포함한 글로벌 시장의 경제 침체로 이러한 성장세는 타격을 입을 것으로 보고 있다. 화장품 시장의 성장이 둔화되고 있는 상황에서 본 연구개발을 통해 개발된 다양한 주박의 기능을 바탕으로 기술적 완성도를 높이고 적절한 타이밍을 찾아 세계시장을 선도할 수 있는 화장품을 준비할 예정이다.



시장진입을 위한 단계적 전략

1단계 2015년	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 신사업 개발팀 구성 및 사업성 평가</li> <li>- 화장품 시장 분석</li> <li>- 시장 진입 시기 결정</li> <li>- 원료 및 제품 경쟁력 강화</li> </ul>
2단계 2016년	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 사업화 방안 모색</li> <li>- 상품 개발 및 생산 전략 수립</li> <li>- 판매 전략 수립</li> <li>- 공급,유통 채널 확보</li> </ul>
3단계 2017년	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 기능성을 바탕으로 한 제품 출시 및 수출 전략 수립</li> </ul>

\* 향후 사업화시에 안동대학교와 공동출원된 특허 및 기술을 이용시에는 기술실시계약을 체결하고, 이에 따른 제반의무를 성실히 수행할 예정임.

\* 또한 안동대학교 산학협력단과 상의하여, 개발기술에 대한 통상실시권 사용에 대한 양해를 구하고, 이에 제품화시 상업적 독점권을 사용하고자 함.

## 제 2 절 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등

1. (주)국순당 직접 운영하고 있는 직원 및 일반인을 대상으로 한 ‘우리술 교육’에서 ‘막걸리의 기능성과 우수성’ 분야에서 교육 콘텐츠로 활용.
2. 시제품의 판촉용 활용으로 주박 활용 화장품의 소비자 평가 및 시장성 검토

## 제 3 절 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

현재 본 사업을 통하여 총 10개의 특허를 참여기업인 국순당과 공동으로 출원하였으며 (이 중 2건 등록), 15편의 논문 역시 국순당과 공동으로 발표함.

따라서, 주박을 이용한 향장제품 사업화에 특허, 논문 등의 지식재산권은 충분히 확보되어 있으며, 3차년도에 확보된 다양한 pure compound를 이용하여, 국제 전문 학술지 게재 및 특허 출원을 더욱 가속화 할 예정임. 이와 관련하여, 사업 종료후에도 참여기업과 세부과제 책임자 간의 합의가 있으므로, 문제 발생 소지는 없다고 판단됨.

## 제 4 절 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

현재 참여기업 국순당에서는 개발된 원료 및 시제품의 임상 효능을 추가 연구하여 가치를 차별화하고 더욱 고부가가치화 할 수 있도록 할 예정임.

또한 본 연구개발사업 진행중, 주박의 미세먼지 및 중금속 흡착 제거능이 매우 우수함을 확인하였으며, 그 겨로가를 바탕으로 현재 2015년 후반기에 진행될 [발효기반 기능성 소재 R&D 혁신거점 구축] 사업에 안동대학교와 국순당이 계획서상에 참여하고 있음 (지정부 예타사업 : 상세내용은 과제선정 대외비로 공개가 어렵습니다. 이에 양해를 구합니다).

향후 발효기반 소재개발 관련하여, 현재 연구개발사업에서 도출된 주박의 광범위한 활성 평가 및 활성물질 스크리닝 결과를 바탕으로 식의약품, 향장품 소재개발을 지속적으로 진행할 예정임.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 제 1 절 관련분야 해외과학기술 정보

1) 주박에서 스쿠알렌, 자일리톨, 유기산, 생물적 계면활성제와 같은 유용성 물질 분리연구

주박은 다양한 영양성분을 함유하고 있어 사료, 퇴비, 식품첨가제로 사용될 뿐 아니라 유산균과 같은 산업적 미생물을 키우는 영양원으로 작용하는 것이 알려져 있으며 주박에서 스쿠알렌, 자일리톨, 유기산, 생물적 계면활성제와 같은 유용성 물질을 분리하는 연구들이 활발히 진행 중이다.

- 와인 주박에서 스쿠알렌의 존재 확인
- 유산균개발을 위한 주박의 활용
- 맥주 주박, 사과와인 주박을 이용한 자일리톨 생산능력 평가
- 사케 주박에서 글루코실세라마이드의 존재를 확인
- 아토피 모델에서 사케주박에서 분리한 Linoleoyl ethanolamide의 항염효과 규명

2) 주박추출물에 의해 발현이 유도되는 NAG-1 유전자의 항비만 및 항암 활성 기작 규명

Non-steroidal anti-inflammatory gene-1 (NAG-1) 유전자는 TGF-beta superfamily의 하나로서, 다양한 천연물 혹은 NSAID drug에 의해 발현이 유도되며, 다양한 전사 조절인자가 발현을 조절한다. 미국 NIEHS의 Dr. Eling 그룹은 NAG-1을 과대발현하는 transgenic 마우스를 제조하고, 이러한 마우스가 정상적인 마우스에 비해 항암활성과 항비만 활성이 있음을 보고하였다. 본 연구그룹에서도 암세포 항성장 활성을 보여주는 여러 주박 추출물과 분리된 순수 물질 중 하나인 naringenin에 의해 항암 및 항비만 유전자인 NAG-1의 발현을 현저히 증가시키고, 이러한 NAG-1의 증가가 주박 시료에 의한 세포사멸과 직접적인 관련성이 있음을 증명하였다.

## 제 7 장 연구시설·장비 현황

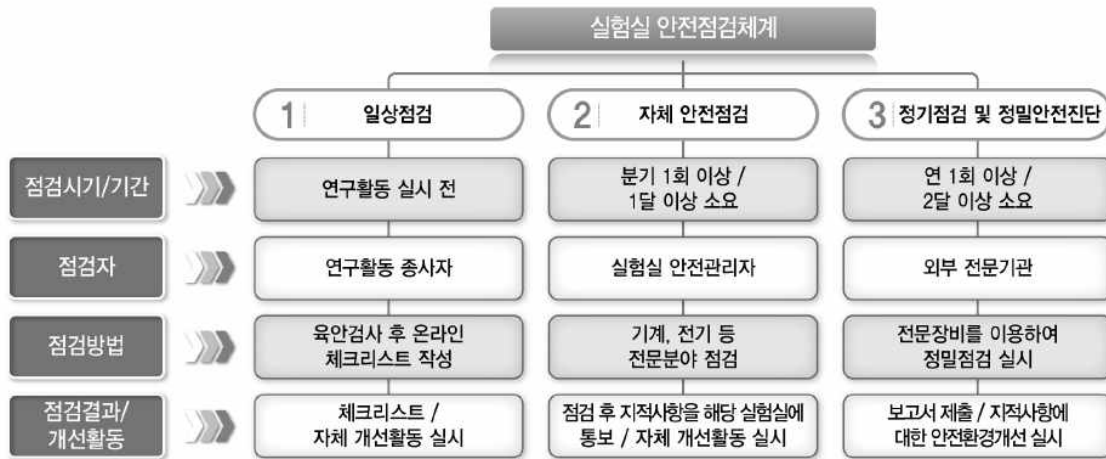
- \* 도입·개발한 연구시설·장비 현황 및 국가과학기술종합정보시스템 장비 등록번호를 기술
- \* 해당사항 없음.



# 제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

## 제 1 절 연구실 안전점검 체계 및 실시

### 1. 실험실 안전 점검 체계



### 2. 실험실 안전점검

#### 1) 실험실 일상 점검

- 연구활동 시작 전 각 실험실 책임자가 육안으로 장비 및 시설을 매일 점검.

#### 2) 실험실 정기 점검

- 내용 : 과학기술분야 실험실의 일반안전, 산업위생, 전기안전, 소방안전, 화공안전, 가스 안전, 기계안전, 생물안전 등의 전문분야 점검
- 실시 : 매월 각 실험실을 주기적으로 점검

#### 3) 실험실 정밀안전진단

- 대상 : 연구개발활동에 유해화학물질 관리법 제2조 7호에 따른 유해화학물질을 취급하는 연구실, 산업안전보건법 제39조에 따른 유해인자를 취급하는 연구실, 과학기술부령이정하는 독성가스를 취급하는 연구실.(우리대학은 실험실관리등급 1, 2급에 해당하는 실험실)
- 실시 : 매년 1회 이상 외부 전문기관에 의뢰하여 실시 후 중대결함이 발견될 경우, 보고 및 조치

#### ※ 관리위험등급의 지정

- 1등급 : 가연성가스, 인화성 시약, 유해화학물질, 다량의 폐액배출, 독극물, 생물 및 동물, 방사성 동위원소, 위험성이 높은 기계장비가 설치된 실험실
- 2 등급 : 일반시약, 소규모 인화성 시약, 불연성가스, 소량의 폐수발생실험실
- 3 등급 : 이화학실험을 수행하지 않는 전기, 설계, 컴퓨터 관련 실험실

### 3. 교육 훈련

- 1) 개요 : 실험실의 안전을 확보하고 종사자의 건강을 보호하여 실험 및 연구활동에 기여하고, 또한 연구실 안전환경조성에 관한 법률에 의거하여 실험실의 환경안전교육이 의무화됨에 따라 이공계열 대학원생 및 관련자 전원은 환경안전교육을 의무적으로 수강
- 2) 교육대상 : 교수, 대학원생, 소속연구원, 전문직원, 실험참여 학부생 등
- 3) 교육실시
  - 1학기 : 법정 교육시간인 6시간을 온라인 및 집합교육으로 실시.
  - 2학기 : 법정 교육시간인 6시간을 온라인 교육으로 실시.

### 4. 건강 검진

- 1) 개요: 인체에 치명적인 위험물질 및 바이러스 등에 노출될 위험성이 있는 연구활동 종사자의 건강을 보호함.
- 2) 대상: 산업안전보건법 시행령 제29조에 따른 유해물질 및 같은 법 시행규칙 별표 12의 2에 다른 유해인자를 취급하는 연구활동 종사자에 대하여 일반건강검진과 특수건강검진을 실시.
- 3) 건강검진 실시 : 매년 1회 건강검진 대상자를 선정하여 건강증진센터에 의뢰하여 일반건강검진 및 특수건강검진 실시

### 5. 보험 가입 현황

보 험 명	보 상 내 용	대 상	주관부서
연구실 안전공제 보험	사망 : 1억원	연구활동 종사자	시설팀
	부상 : 최대 1,000만원	연구활동 종사자	“
	후유장애 : 최대 1억원	연구활동 종사자	“
	연구활동 중 발생한 사고에 대한 보상	연구활동 종사자	“

### 5. 추가 이행 계획

1) 실험실 안전환경 개선	노후 실험실 개선공사 시행(흡후드 개선 등)
2) 실험실 소방설비 개선	실험실에 설치되어 있는 노후 소방시설을 개선하여 신속한 화재경보 및 소화활동 실시
3) 실험실 전기 안전관리	비접지형 콘센트 노후 분전반 교체 등
4) 고압가스 안전관리	안전시설 설치(전도방지장치 등)
5) 안전보호장비 설치	1. 개인용 보호장비 구매 2. 시약장 안전가이드바 설치 3. 밀폐형 시약장 설치

## 제 2 절 연구실 안전점검 이행실적

### 제 1세부과제 실험실 안전교육

- 1) 실험실 안전교육 정기실시
- 2) 실험실 정류 및 임시 안전점검
- 3) 환경개선비 : 실험실 공기 청정장치 설치 : 2013. 3.31. (520,000원)  
실험실 제습장치 설치 : 2014. 06.07 (459,000원) 집행.

- 관련영상자료 삭제

### 제2세부과제 실험실 안전교육

- 2014년도 상반기 : 실험실내 소화기 사용법 교육
- 2014년도 하반기 : 시약 사용시 안전 교육

- 관련영상자료 삭제

신규·변경 안전교육(상반기) 기록부				
소 속 기 관	안동대학교	학과(진공)명	식품영양학과	
건물명 및 호실	생활과학대학 415-417호	관리 번호		
		연구실 명	식품미생물실험실	
교육실시자 (조교수 이상)	손호용 (인)	연구실 안전관리자	(정)	손호용 (인)
			(부)	김미선 (인)
실시 년월일	참가자	교 육 내 용		
	총계 명			
2015. 3. 30	연구생 이예슬 (인)	안전한 연구개발 활동에 관한 사항 • 보호장비 및 안전장치 취급과 사용에 관한 사항 • 연구실 사고사례 및 사고예방 대책에 관한 사항 • 안전표지에 관한 사항 • 물질안전자료에 관한 사항 • 그 밖에 연구실 안전관리에 관한 사항		
	합계 1 명			
2015. 3. 30	박사학위 김미선 (인)	- 연구실내 유해·위험요인에 관한 사항 실험실 안전수칙 설명 (교육자료 별첨) -보호장비 및 안전장치 취급과 사용에 관한 사항 고글 및 방진마스크 등의 보호장비 이용 및 실험실 유해시약 보관 및 취급법 설명 (후드 사 용) (교육자료 별첨) - 안전표지에 관한 사항		
	합계 1 명			
2015. 3. 30	석사학위 김덕진 김동 (인)	- 연구실내 유해·위험요인에 관한 사항 실험실 안전수칙 설명 (교육자료 별첨) -보호장비 및 안전장치 취급과 사용에 관한 사항 고글 및 방진마스크 등의 보호장비 이용 및 실험실 유해시약 보관 및 취급법 설명 (후드 사 용) (교육자료 별첨) - 안전표지에 관한 사항		
	합계 2 명			
2015. 3. 30	학부생 김찬중 (인)	- 연구실내 유해·위험요인에 관한 사항 실험실 안전수칙 설명 (교육자료 별첨) -보호장비 및 안전장치 취급과 사용에 관한 사항 고글 및 방진마스크 등의 보호장비 이용 및 실험실 유해시약 보관 및 취급법 설명 (후드 사 용) (교육자료 별첨) - 안전표지에 관한 사항		
	합계 1 명			
안동대학교 연구실안전관리규정 제14조제1항의 규정에 의하여 위 연구실의 연구활동종사자에 대하여 신규·변경에 따른 안전교육을 2시간 이상 실시하였음을 확인함 2015 년 3 월 30 일 확 인 자 : 안전관리책임자 성 명 손 호 용 (인)				

## 2014년 상반기 연구실 정기안전점검 실시 내용

건물명	생활과학대학	점검 일자	2014년 6월 19일
연구실명(호실)	실험기기사실 (415호)	안전관리자	손 호 용 (인)
연구실 자체안전 (1~5)등급	1등급	점 검 자	손 호 용 (인)
분 야	<b>‘13.11.13(수) 미래부점검, 정밀진단, 소방점검 등 연구실 현장점검 지적사항 및 중점점검 개선항목</b>	점검완료 (○,△,×, -)	비고(개선 및 조치 등)
일반 안전	<ul style="list-style-type: none"> <li>정기안전교육(신규변경교육 포함)- 교육시간 이수인원 명단 확인</li> <li>비상계획 및 사고결 과조치(비상연락망 및 보고체계 작성, 응급조치 등) 이행</li> <li>일상점검 실시율 개선</li> <li>안전규정, 일반 및 특성 안전수칙 게시</li> <li>인간과오 및 실수요인</li> <li>기타 일반 분야 위험요소</li> </ul>	○	<ul style="list-style-type: none"> <li>일일점검 및 정기안전교육실시함</li> <li>문 앞에 표지판 부착</li> <li>구급약 비치</li> </ul>
화공 안전	<ul style="list-style-type: none"> <li>물질안전보건자료(MSDS) 비치</li> <li>화학약품, 시약, 시약병전용용기 및 시약전용장(시건장치)과 폐액전용용기 비치 및 정상벨(인화성, 부식성, 독성, 급수성) 분류와 라벨 부착(명칭, 조제자, 조제일자, 주의사항 등), 최상부 위치 시약병 등을 시약전용장 보관, 낙하방지용 안전바(최상부 포함) 설치, 흡후드내 약품→시약전용장(시건장치) 보관</li> <li>보호액속에 보존되어야 할 위험물을 보호액속에 보관 및 처리(황린, 나트륨 등)</li> <li>산업안전보건법 시행규칙별표12-2 유해인자 178종 이내 1일 4시간 이상 실험중인 상시 연구실 종사자 일반 및 특수건강검진 실시</li> <li>실험중 환기시설 가동</li> <li>기타 화공안전 위험요소</li> </ul>	○	<ul style="list-style-type: none"> <li>세안기 및 비상샤워기 보완(시설과) - 리모델링 시기 및 예산 확보 등</li> <li>MSDS 비치</li> <li>환기시설 항시 작동</li> </ul>
가스 안전	<ul style="list-style-type: none"> <li>가스용기 전도방지장치 개별체결 및 고정상태 개선(·가스용기 교체 시 인접용기의 전도로 인한 가스 분출 우려로 전도 방지용 개별체결 및 고정상태 요함)</li> <li>미사용 가스용기 보호캡 체결 요함</li> <li>충진기한 경과된 가스용기 교체 요함(·내압력 저하→폭발 위험)</li> <li>불필요한 가스용기 즉시 철거</li> <li>가연성 및 조연성가스 혼재여부 실내보관 개선(가연성 가스 실린더캐비닛 등 전용용기실 보관 및 기타)</li> <li>가스 누출 점검현황 및 청소, 용기 보관 상태(환기여부) 정보 및 차단 장치 적정성- 출입업체 무상점검 확인</li> <li>기타 가스 분야 위험요소</li> </ul>	○	
기계 안전	<ul style="list-style-type: none"> <li>복장단정, 짧은 머리(머리띠)</li> <li>단자 충전부 노출→절연보호덮개 설치, 용접기 홀더선 단자 노출→단자 충전부 절연 튜브 등 설치</li> <li>유해·위험기계 목록 작성 및 방호장치 설치(교류이크용접기)</li> <li>안전수칙 및 기타 기계 분야 위험요소</li> </ul>	○	
전기 안전	<ul style="list-style-type: none"> <li>비접지형 콘센트→접지형 콘센트 교체 및 접지선 포설, 과부하차단 및 접지형 난연성 멀티탭 사용, 2KW이상 단독회로 차단기 용량 등</li> <li>방폭전기설비 설치 적정성</li> <li>분전반내(차단기)부하별 명판 부착 및 도면비치</li> <li>기타 전기 분야 위험요소</li> </ul>	○	<ul style="list-style-type: none"> <li>유도등 설치(시설과) - 리모델링 시기 및 예산 확보 등</li> </ul>
소방 안전	<ul style="list-style-type: none"> <li>인화성 물질 최소량(40L) 이내 별도 장소(인화물 캐비닛 등) 보관</li> <li>출입구 앞 적재물 제거</li> <li>비상통로 확보, 화재감지기·경보기·소화기 유도등 미비 및 고장 여부</li> <li>기타 소방안전 위험요소</li> </ul>	○	<ul style="list-style-type: none"> <li>소화기 배치됨. (단체)</li> </ul>
생물 안전 (LMO 등)	<ul style="list-style-type: none"> <li>고압멸균기설치 및 관리상태 보관 생물시료의 목록작성 폐기물의 안전한 장소 또는 용기에 보관, 실험폐기물 처리규정 마련 및 활용, 미생물 취급보관장소 생물재해(Biohazard) 표시 부착</li> <li>기타 생물 분야 위험요소</li> </ul>	○	<ul style="list-style-type: none"> <li>폐수 분리 배출</li> <li>- 폐수 유기용매, 무기용매 분리</li> </ul>
산업 위생	<ul style="list-style-type: none"> <li>보호구 비치 및 착용</li> <li>음식물 반입과 음주 및 흡연 금지</li> <li>안전보건 표지 부착</li> <li>기타 산업위생 분야 위험요소 등</li> </ul>	○	<ul style="list-style-type: none"> <li>보호구 및 마스크 비치됨</li> </ul>
기타 안전	<ul style="list-style-type: none"> <li>방사선관리-실험실 입구에 방사능표지 부착, 방사능 폐기물 기록대장 관리, 방사선폐기물의 적정용기 사용, 관리요원 자질 향상 및 법정면허 소지자</li> <li>기타 안전 위험요소</li> </ul>	○	



## 제 9 장 참고문헌

1. Adachi, A., Hamamoto, H. and Okano, T. 2005. Use of lees materials as an adsorbent for removal of organochlorine compounds or benzene from wastewater. *Chemosphere* **58**, 817-822.
2. Akira, S. and Takeda, k. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 499-511.
3. Cha, W. S., Park, M, S. and Park, K. M. 2001. Physiological activities of *Rubus coreanus* Miquel. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **33**, 409-415.
4. Chang, J.H. 1989. History of Korean spirits. *Korean J. Dietary Culture* **4**, 271-274.
5. Chen, H., Qi, X., He, C., Yin, Z., Fan, D. and Han, G. 2013. Coagulation imbalance may not contribute to the development of portal vein thrombosis in patients with cirrhosis. *Thrombosis Res.* **131**, 173-177.
6. Cho, E. J., Yang, M. O. and Kang, H. J. 2007. Physicochemical characteristics of *Yackwa* with added rice wine cake. *J. East Asian Soc. Dietary Life* **17**, 94-102.
7. Cho, S. Y., Park, J. W. and Rhee, C. 1998. Edible films from protein concentrates of rice wine meal. *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**, 1097-1106.
8. Cho, Y. H., Cho, J. S., Kim, J. Y., Kim, U. S., Choi, J. H. and Park, J. H. 2013. Quality characteristics of sulgidduk with makgeolli lees. *J. East Asian Soc. Dietary Life* **23**, 227-233.
9. Choi, B. B., Lee, H. J. and Bang, S. K. 2004. Studies on the amino acid, sugar analysis and antioxidative effect of extracts from *Artemisia* sp. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **17**, 86-91.
10. Choi, H. S., Kim. M. K., Park, H. S., Kim, Y. S. and Shin, D. H. 2006. Alcoholic fermentation of bokbunja (*Rubus coreanus* Miq.) wine. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **38**, 543-547.
11. Choi, J., Lee, K. T., Ha, J., Yun, S. Y., Ko, C. D., Jung, H. J. and Park, H. J. 2003. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Niga-ichigoside F1 and 23-hydroxytormentic acid obtained from *Rubus coreanus*. *Biol. Pharm. Bull.* **26**, 1436-1441.
12. Chung, T. H., Kim, J. C., Lee, C. Y., Moon, M. K., Chae, S. C., Lee, I. S., Kim, S. H., Hahn, K. S. and Lee, I. P. 1997. Potential antiviral effects of *Terminalis chebula*,

- Sanguisorba officinalis*, *Rubus coreanus* and *Rheum palmatum* against duck hepatitis B virus (DHBV). *Phytother. Res.* **11**, 179-182.
13. Huh, C. K., Kim, S. M. and Kim, Y. D. 2014. Comparison for enzymatic activity of nuruk and quality properties of yakju by different fungi. *Korean J. Food Preserv.* **21**, 573-580.
  14. Hwang, H. J., Kang, M. S., Kim, B. K., Jung, B. M. and Kim, M. H. 2012. The effect of *Opuntia humifusa* seed extracts on platelet aggregation and serum lipid level in ovariectomized rats. *J. Life Sci.* **22**, 1680-1687.
  15. Jang, D., Park, S., Lee, H., Pyo, S. and Lee, H. S. 2013. Isolation of alcohol-tolerant lactic acid bacteria *Pediococcus acidolactici* K3 and S1 and their physiological characterization. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 442-448.
  16. Jeon, H. J., Noda, M., Murayama, M., Matoba, Y., Kumagai, T. and Sugiyama, M. 2006. Identification and kinetic study of tyrosinase inhibitors found in sake lees. *J. Agric. Food. Chem.* **54**, 9827-9833.
  17. Jung, B. J. 2002. Effects of spray dried Takju cake powder on the quality of white pan bread. *M.S. dissertation, Hankyong University, Anseong, Korea.*
  18. Jung, H. N., Kim, H. O., Shim, H. H., Jung, H. S. and Choi, O. J. 2012. Quality characteristics of low-salt yacon jangachi using rice wine lees during storage. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 383-389.
  19. Jung, I. C. and Moon, Y. H. 2005. Effects on quality characteristics of pork loin fed with wild grape (*Vitis amurensis* Ruprecht) wine by-product. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **25**, 168-174.
  20. Jung, I. C. and Sohn, H. Y. 2014. Antioxidation, antimicrobial and antithrombosis activities of aged black garlic (*Allium sativum* L.). *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 285-292.
  21. Kang, H. T., Lee, S. H., Kim, S. Y., Kim, M. S., Shin, W. C., Sohn, H. Y. and Kim, J. S. 2014. Anti-proliferative activities of solvent fractions of lees extract in human colorectal HCT116 cells. *J. Life Sci.* **24**, 967-972.
  22. Kang, Y. J., Park, S. J., Bae, K., Yoo, J. M., Pyo, H. B., Choi, J. H. and Kim, T. J. 2011. Ethyl acetate extract of Korean rice wine lees inhibits IgE-Mediated degranulation in rat basophile leukemia RBL-2H3 cells and passive cutaneous anaphylaxis in mice. *J. Life Sci.* **21**, 1364-1369.



23. Kim, E. K. 2010. Effects of lees from brown rice on waist circumference and metabolic parameters in type 2 diabetes: A randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *M.S. Dissertation, Ajou University, Suwon, Korea.*
24. Kim, D. N., Lee, J. B. and Kim, D. H. 2010. Research of Effective Method for Pellet Using Jubak. *New & Renewable Energy* **17**, 247-247.
25. Kim, I. S., Ryu, S. J., Choe, Y. H., Park, Y. G., Kim, G. W. and Bae, J. H. 2009. *Korean J. Oranic Agri.* **11**, 306-306.
26. Kim, J.E., Jung, S.K., Lee, S.J., Lee, K.W., Kim, G.W. and Lee, H.J. 2008. Nuruk Extract Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Production of Nitrite and Interleukin-6 in RAW 264.7 Cells Through Blocking Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 1423-1426.
27. Kim, J. I., Jang, H. S., Kim, J. S. and Sohn, H. Y. 2009. Evaluation of antimicrobial, antithrombin, and antioxidant Activity of *Dioscorea batatas* Decne. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 113-139.
28. Kim, M. S., Lee, Y. S., Kim, J. S., Shin, W. C. and Sohn, H. Y. 2014. Anti-microbial and anti-thrombosis activities of lees of sweet potato soju. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 258-266.
29. Kim, M. S., Lee, Y. S., Kim, J. S., Shin, W. C. and Sohn, H. Y. 2014. Evaluation of *in-vitro* antithrombosis activity of lees of Korean traditional wine. *J. Life Sci.* **24**, 865-872.
30. Kim, M. S., Lee, Y. S., Kim, J. S., Shin, W. C. and Sohn, H. Y. 2015. Evaluation of *in-vitro* antithrombosis and anti-oxidation activity of lees of takju (Wookukseng). *J. Life Sci.* **25**, 425-432.
31. Kim, M. S., Lee, Y. S., Kim, J. S., Shin, W. C. and Sohn, H. Y. 2014. *In-vitro* antithrombosis activity of Ehwa nuruk. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 302-306.
32. Kim, M. S., Oh, I. T., Jun, D. Y., Lee, J. Y., Sohn, H. Y., Kwak, D. Y., Seo, M. C., Woo, K. S., Ko, J. Y., Jung, T. W., Nam, M. H., Woo, M. H. and Kim, Y. H. 2013. Anticoagulant activity and fibrinolytic activities of Hwanggeumchal sorghum *in vitro*. *J. Life Sci.* **23**, 1460-1470.
33. Kim, M. S. and Sohn, H. Y. 2014. Anti-thrombosis activity of the aerial parts of *Aruncus dioicus* var *kamtschaticus*. *J. Life Sci.* **24**, 515-521.

34. Kim, S. M. and Cho, W. K. 2006. Effect of takju (Korean turbid rice wine) lees on the serum glucose levels in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J. Food Culture* **21**, 638-643.
35. Kim, S. M., Yoon, C. H. and Cho, W. K. 2007. Quality characteristics of noodle added with Takju (Korean turbid rice wine) lees. *Korean J. Food Culture* **22**, 359-364.
36. Kim, T. Y., Jeon, T. W., Yeo, S. H., Kim, S. B., Kim, J. S. and Kwak, J. S. 2010. Antimicrobial, antioxidant and SOD-like activity effect of jubak extracts. *Korean J. Food Nutr.* **23**, 299-305.
37. Kindt, T. J., Goldsby, R. A. and Osborne, B. A. 2007. Innate immunity: Tenney S. Kuby Immunology. *New York, Freeman press* **6**, 52-73.
38. Ko, Y. S. and Sim, K. H. 2014. Quality Characteristics and Antioxidant Activity of *Jeung-pyun* added with *Ju-bak* Powder. *J. East Asian Soc. Dietary Life* **24**, 190-200.
39. Kwak, H. Y., Lee, S. J., Lee, D. Y., Jung, L., Bae, N. H., Hong, S. Y., Kim, G. W. and Baek, N. I. 2008. Cytotoxic and anti-inflammatory activities of lipids from the nuruk (*Rhizopus oryzae* KSD-815). *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **51**, 142-147.
40. Kwon, S. C., Jeon, T. W., Park, J. S., Kwak, J. S. and Kim, T. Y. 2012. Inhibitory effect on tyrosinase, ACE, and xanthine oxidase and nitrite scavenging activities of Jubak (alcohol filter cake) extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 1191-1196.
41. Lee, D. Y., Lee, S. J., Kwak, H. Y., Jung, L., Heo, J., Hong, S. Y., Kim, G. W. and Baek, N. I. 2009. Sterols isolated from Nuruk (*Rhizopus oryzae* KSD-815) inhibit the migration of cancer cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 1328-1332.
42. Lee, H. S., Hong, K. H., Kim, J. Y., Kim, D. H., Yoon, C. H. and Kim, S. M. 2009. Blood pressure lowering effect of Korean turbid rice wine (Takju) lees extracts in spontaneously hypertensive rat (SHR). *Korean J. Food Culture* **24**, 338-343.
43. Lee, H. S., Hong, K. H., Yoon, C. H., Cho, W. K. and Kim, S. M. 2009. Glycemic index and oral glucose tolerance test of Takju (Korean turbid rice wine) lees extract. *Korean J. Food Culture* **23**, 662-665.
44. Lee, H. S., Hong, K. H., Yoon, C. H., Kim, J. M. and Kim, S. M. 2009. Effect of Korean turbid rice wine (Takju) lees extract on blood glucose in the db/db mouse. *Korean J. Food Culture* **24**, 219-223.

45. Lee, J. H., Choi, H. R., Lee, S. J., Lee, M. J., Ko, Y. J., Kwon, J. W. and Lee, T. B. 2014. Blood pressure modulating effects of black raspberry extracts *in vitro* and *in vivo*. *Kor J. Food Sci. Technol.* **46**, 375-383
46. Lee, J. H., Park, S. M., Park, C. D., Jung, H. J., Kim, H. S. and Yu, T. S. 2007. Characteristics of Ju-bak and effect of Ju-bak fertilizer on growth of crop plants. *J. Life Sci.* **17**, 1562-1570.
47. Lee, J. P. 2008. Qualitative characteristics of brown sauce with added Jubak and chicken meat marinated in Jubak. *Ph.D. dissertation, Sejong University, Seoul, Korea.*
48. Lee, K. S. and Kim, D. H. 1991. Effect of sake cake on the quality of low salted kochuzang. *Korean J. Food Sci. Technol.* **23**, 109-115.
49. Lee, M. K., Lee, H. S., Choi, G. P., Oh, D. H., Kim, J. D., Yu, C. Y. and Lee, H. Y. 2003. Screening of biological activities of the extracts from *Rubus coreanum* Miq. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* **11**, 5-12.
50. Lee, M. S. 2010. Dietary fiber from lees of unpolished rice : clinical effect on the obese. *M.S. Dissertation, Ajou University, Suwon, Korea.*
51. Lee, M. W. 1995. Phenolic compounds from the leaves of *Rubus coreanum*. *Yakhak Hoeji.* **39**, 200-204.
52. Lee, S. J. 2013. Physico-chemical characteristics of black raspberry fruits (Bokbunja) and wines in Korea. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **45**, 451-459.
53. Lee, S. J. and Ahn, B. M. 2009. Changes in physicochemical characteristics of black raspberry wines from different regions during fermentation. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **41**, 662-667
54. Lee, S. J., Bae, H. J., Ryu, J. Y., Lee, D.Y., Kim, G. W., Baek, N. I., Kwon, M. S. and Hong, S. Y. 2009. Extracts from *Rhizopus oryzae* KSD-815 of Korean traditional nuruk confer the potential to inhibit hypertension, platelet aggregation, and cancer metastasis in vitro. *Food Sci. Biotechnol.* **18**, 1423-1429.
55. Lee, S. J., Cho, S. W., Kwon, Y. Y., Kwon, H. S. and Shin, W. C. 2012. Inhibitory Effects of Ethanol Extracts from Nuruk on Oxidative Stress, Melanogenesis, and Photo-Aging. *Mycobiology* **40**, 117-123.
56. Lee, S. J., Choi, H. R., Lee, J. H., Kwon, J. W. Lee, H. K. Jeong, J. T. and Lee, T. B. 2014. Effects of unripe black raspberry extracts on prostate cancer cell line and rat model of benign prostatic hyperplasia. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **43**, 507-515.

57. Lee, S. J., Hong, S. Y. and Kim, G. W. 2010.  $\gamma$ -Linolenic acid methyl ester from *Rhizopus oryzae* KSD-815 isolated from nuruk induced apoptosis in prostate cancer LNCaP cells. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **53**, 752-760.
58. Lee, S. J. and Kim, G. W. 2010. Hypolipidemic effect of hexane fraction from *Rhizopus oryzae* KSD-815 through peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ . *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **53**, 761-765.
59. Lee, S. J., Kim, J. H., Jung, Y. W., Park, S. Y., Shin, W. C., Park, C. S., Hong, S. Y. and Kim, G. W. 2011. Composition of organic acids and physiological functionality of commercial makgeolli. *Korean J. Food Sci. Technol.* **43**, 206-212.
60. Lee, S. J., Kwon, Y. Y., Cho, S. W., Kwon, H. S. and Shin, W. C. 2013. Effect of ehwa makgeolli containing oriental herbs on skin whitening and wrinkles. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **42**, 550-555.
61. Lee, S. J. and Shin, W. C. 2011. Physiological functionalities of makgeolli (Korean paradox). *Food Sci. Ind.* **44**, 2-11.
62. Lee, S. M., Lee, S. J., Kwon, Y. Y., Baek, S. H., Kim, J. S., Sohn, H. Y. and Shin, W. C. 2014. Skin whitening and anti-wrinkle effects of extract from Jubak of oriental herbal liquor. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **43**, 1695-1700.
63. Lee, Y., Kim, J. C., Hwang K. T., Kim, D. H. and Jung, C. M. 2013. Quality characteristics of black raspberry wine fermented with different yeasts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **42**, 784-791
64. Lim, J. M., Kwon, H. J., Yong, S. E., Choi, J. H., Lee, C. H., Kim, T. J., Park, P. S., Choi, Y. H., Kim, E. M. and Park, S. Y. 2013. Antioxidant activity and quality characteristics of rice wine cakes cookies with different ratio of *Astragalus membranaceus*. *Korean J. Food Cookery Sci.* **29**, 11-18.
65. Lim, Y. S., Bae, S. M. and Kim, K. 2004. Production of yeast spores from rice wine cake. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 184-189.
66. Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* **25**, 402-408.
67. Lowenstein, C. J. and Snyder, S. H. 1992. Nitric Oxide, a Novel Biologic Messenger. *Cell* **70**, 705-707.
68. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.

69. Monick, M. M., Carter, A. B., Robeff, P. K., Flaherty, D. M., Peterson, M. W. and Hunninghake, G. W. 2001. Lipopolysaccharide activates Akt in human alveolar macrophages resulting in nuclear accumulation and transcriptional activity of beta-catenin. *J. Immunol.* **166**, 4713-4720.
70. Moon, K. H., Yoon, J. W., Yoon, C. S. and Kim, S. W. 1998. Selection of optimum medium for mass production of *Metarhizium anisopliae* ARS 978. *Korean J. Pesticide Science* **2**, 90-96.
71. Park, J. H., Choi, J. H., Yeo, S. H., Teong, S. T., Cho, H. A., Kang, J. E. and Kim, S. R. 2013. A study on the quality characteristics of makgeolli using heat treatment of traditional Korean nuruk extract. *J. East Asian Soc. Dietary Life* **23**, 620-628.
72. Park, J. H. and Chung, C. H. 2014. Characteristics of takju (a cloudy Korean rice wine) prepared with Nuruk (a traditional Korean rice wine fermentation starter), and identification of lactic acid bacteria in Nuruk. *Korean J. Food Sci. Technol.* **46**, 153-164.
73. Park, M. J., Kang, H. T., Kim, M. S., Shin, W. C., Sohn, H. Y. and Kim J. S. 2014. Anti-inflammatory effects of extracts and their solvent fractions of rice wine lees. *J. Life Sci.* **24**, 843-850.
74. Ryu, H. Y., Ahn, S. M., Kim, J. S. and Sohn, H. Y. 2010. Evaluation of *in-vitro* anticoagulation activity of 33 different medicinal herbs. *J. Life Sci.* **20**, 922-928.
75. Seo, G. U., Choi, S. Y., Kim, T. W., Ryu, S. G., Park, J. H. and Lee, S. C. 2013. Functional activities of makgeolli by-products as cosmetic materials. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **32**, 505-511.
76. Shin, M. O., Kang, D. Y., Kim, M. H. and Bae, S. J. 2008. Effect of growth inhibition and quinone reductase activity stimulation of makgeoly fractions in various cancer cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 288-293.
77. Singleton, V. L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* **299**, 152-178.
78. Son, W. R. and Choi S. W. 2013. Biological activity and analysis of  $\alpha$ -glucosidase inhibitor from mulberry (*Morus alba* L.) wine. *Kor. J. Food Preserv.* **20**, 877-885.
79. Sung, M. J., Davaatseren, M., Kim, W., Park, S. K., Kim, S. H., Hur, H. J., Kim, M. S., Kim, Y. S. and Kwon, D. Y., 2009. Vitisin A suppresses LPS-induced NO production by inhibiting ERK, p38, and NF-kappaB activation in RAW 264.7 cells. *International*

*Immunopharmacology* **9**, 319-323.

80. Sweeney, J. D., Hoerning, L. A., Behrens, A. N., Novak, E. and Swank, R. T. 1990. Thrombocytopenia after desmopressin but absence of *in-vitro* hypersensitivity to ristocetin. *Amer. J. Clin. Path.* **93**, 522-525.
81. Sweeney, J. D., Hoerning, L. A. and Fitzpatrick, J. E. 1989. Whole blood aggregation in Von willebrand disease. *Amer. J. Hematol.* **32**, 190-193.
82. Takahashi, K., Izumi, K., Nakahata, E., Hirata, M., Sawada, K., Tsuge, K., Nagao, K. and Kitagaki, H. 2014. Quantification and structural determination of glucosylceramides contained in sake lees. *J. Oleo. Sci.* **63**, 15-23.
83. Valentina, U., Fabcic, J. and Stampar, F. 2007. Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chem.* **107**, 185-192.
84. Wanatanabe, T. and Yamamoto, A. 2009. Anti-obesity effect of sake lees indigestive products. *Food Style 21* **13**, 80-83.
85. Wang, S. J., Lee, H. J., Cho, J. Y., Jang, M. Y., Park, K. H. and Moon, H. H. 2012. Inhibition effect against the rat blood plasma oxidation of the makgeolli (Takju) Korean rice wine. *Korean J. Food Preserv.* **19**, 116-122.
86. Won, J. H., Son, J. A., Youn, A. R., Kim H. J., Kim, G. W. and Noh, B. S. 2006. Quality characteristics of pork with addition of *Jubak*(*Sulchigegie*). *Korean J. food culture* **21**, 565-570.
87. Yang, H. J., Jeong, S. J., Jeong, S. Y., Heo, J. H. and Jeong, D. Y. 2015. Screening of biogenic amine non-producing yeast and optimization of culture conditions using statistical method for manufacturing black raspberry wine. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **44**, 592-601.
88. Yang, H. M., Lim, S. S., Lee, Y. S., Shin, H. K., Oh, Y. S. and Kim, J. K. 2007. Comparison of the anti-inflammatory effects of the extracts from *Rubus coreanus* and *Rubus occidentalis*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **39**, 342-347.
89. Yang, S., Lee, J., Kwak, J., Kim, K., Seo, M. and Lee, Y. W. 2011. Fungi associated with the traditional starter cultures used for rice wine in Korea. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **54**, 933-943.

90. Yoo, J. M., Kang, Y. J., Pyo, H. B., Choung, E. S., Park, S. Y., Choi, J. H., Han, G. J., Lee, C. H. and Kim, T. J. 2010. Anti-wrinkle effects of Korean rice wine cake on human fibroblast. *J. Life Sci.* **20**, 1838-1843.
91. Yoon, H. J., Park, S. Y., Oh, S. T., Lee, K. Y., and Yang S. Y. 2011. Extract of *Rubus coreanus* fruits increases expression and activity of endothelial nitric oxide synthase in the human umbilical vein endothelial cells. *J. Life Sci.* **21**, 44-55.
92. Yu, T. S., Yeo, S. H. and Kim, H. S. 2004. A new species of Hyphomycetes, *Aspergillus coreanus* sp. nov., isolated from traditional Korean Nuruk. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 182-187.
93. Yun, C. S., Kim, H. A. and Kim, Y. S. 2015. Quality Characteristics of Muffin added with *Makgeolli Lees*. *The Korean J. Culinary Research* **21**, 198-211

[제2 세부과제 및 협동과제 참고문헌]

1. Baek, S. J., Okazaki, R., Lee, S. H., Martinez, J., Kim, J. S., Yamaguchi, K., Mishina, Y., Martin, D. W., Shoieb, A., McEntee, M. F. and Eling, T. E. 2006. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1 over expression in transgenic mice suppresses intestinal neoplasia. *Gastroenterology* **131**, 1553-1560.
2. Cho, K. N., Shkhthankar, M., Lee, S. H., Yoon, J. H. and Baek, S. J. 2007. Green tea catechin (-)-epicatechin gallate induces tumor suppressor protein ATF3 via EGR-1 activation. *Eur. J. Cancer* **43**, 2404-2412.
3. Chrysovergis, K., Wang, X., Kosak, J., Lee, S. H., Kim, J. S., Foley, J. F., Travlos, G., Singh S., Baek, S. J. and Eling, T. E. 2014. NAG-1/GDF-15 prevents obesity by increasing thermogenesis, lipolysis and oxidative metabolism. *Int. J. Obes.* **10**, 1555-1564.
4. Kang, H. T., Lee, S. H., Kim, S. Y., Kim, M. S., Shin, W. C., Sohn, H. Y. and Kim, J. S. 2014. Anti-proliferative activities of solvent fractions of lees extracts in human colorectal HCT116 cells. *J. Life Sci.* **24**, 967-972.
5. Kojda, G. and Harrison, D. 1999. Interactions between NO and reactive oxygen speices : pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc. Res.* **43**, 562-571.
6. Lai, C. Y., Tsai, A. C., Chen, M. C., Chang, L. H., Sun, H. L., Chang, Y. L., Chen, C. C., Teng, C. M. and Pan, S. L. 2012. Aciculatin induces *p53*-dependent apoptosis via MDM2 depletion in human cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *PLOS One* **7**, e42192.
7. Lee, E. S., Ju, H. K., Moon, T. C., Lee, E., Jahng, Y., LEE, S. H. and Chang, H. W.

2004. Inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) production by prepenone compound through blockade of nuclear factor (NF)- $\kappa$ B activation in cultured murine macrophages. *Biol. Pharm. Bull.* **27**, 617-620.
8. Lo, J. Y., Kamarudin, M. N., Hamdi, O. A., Awang, K. and Kadir, H. A. 2015. Curcumenol isolated from *Curuma zedoaria* suppresses Akt-mediated NF- $\kappa$ B activation and p38 MAPK signaling pathway in LPS-stimulated BV-2 microglial cells. *Food Funct.* 10.1039/C5FO00607D.
  9. Park, G. H., Park, J. H., Song, H. H., Eo, H. J., Kim, M. K., Lee, J. W., Lee, M. H., Cho, K. H., Lee, J. R., Cho, H. J. and Jeong, J. B. 2014. Anti-cancer activity of Ginger (*zingiber officinale*) leaf through the expression of activating transcription factor-3 in human colorectal cancer cells. *BMC Complement Altern. Med.* **14**, 408-415.
  10. Park, M. J., Kang, H. T., Kim, M. S., Shin, W. C., Sohn, H. Y. and Kim, J. S. 2014. Anti-inflammatory effects of extracts and their solvent fractions of rice wine lees. *J. Life Sci.* **24**, 843-850.
  11. Piyanuch, R., Sukhthankar, M., Wandee, G. and Baek, S. J., 2007. Berberine, a natural isoquinoline alkaloid, induces NAG-1 and ATF3 expression in human colorectal cancer cells. *Cancer Lett.* **2**, 230-240.
  12. Sano, R. and Reed, J. C. 2013. *ER stress-induced cell death mechanisms.* *Biochim Biophys Acta* **1833**, 3460-3470.
  13. Sui, C. G., Meng, F. D., Li, Y., and Jiang, Y. H. 2015. Antiproliferative activity of rosamultic acid is associated with induction of apoptosis, cell cycle arrest, inhibition of cell migration and caspase activation in human gastric cancer (SGC-7901) cells. *Phytomedicine.* **22**, 796-806.
  14. Whitlock, N. C., Bahn, J. H., Lee, S. H., Eling, T. E. and Baek, S. J. 2011. Resveratrol-induced apoptosis is mediated by early growth response-1, Krüppel-like factor 4, and activating transcription factor 3. *Cancer Prev Res (Phila)* **4**, 116-127.
  15. Xu, C., Chen, G., Yang, W., Xu, Y., Xu, Y., Huang, X., Liu, J., Feng, Y., Xu, Y. and Liu, B. 2015. Hyaluronan ameliorates LPS-induced acute lung injury in mice via Toll-like receptor (TLR) 4-dependent signaling pathway. *Int. Immunopharmacol.* DOI: 10.1016/j.intimp.2015.08.021.
  16. Yang, M. H., Kim, J., Khan I. A., Walker, L. A. and Khan, S. I. 2014. Nonsteroidal anti-inflammatory drug activated gene-1 (NAG-1) modulators from natural products as



- anti-cancer agents. *Life Sci.* **2**, 75-84.
17. Perez-Bibbins, B., Torrado-Agrasar, A., Salgado, J. M., Oliveira, R. P. and Dominquez, J. M. 2015. Potential of lees from wine, beer and cider manufacturing as a source of economic nutrients: An overview. *Waste Manag.* **40**, 72-81.
  18. Naziri, E., Glisic S. B., Mantzouridou, F. T. Tsimidou, M. Z., Nedovic, V., and Bugarski, B. 2015. Advantages of supercritical fluid extraction for recovery of squalene from wine lees. *The Journal of Supercritical Fluids*. doi:10.1016/j.supflu.2015.07.014
  19. Hu, Y., Pan, L., Dun, Y., Peng, N., Liang, Y., and Zhao, S. 2014. Conversion of yellow wine lees into high-protein yeast culture by solid-state fermentation. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **28**, 843-849
  20. Rodriguez, N., Torrado, A. Cortes, S. and Dominquez, J. M. 2010. Use of waste materials for Lactococcus lactis development. *J. Sci. Food Agric.* **90**, 1726-34.
  21. Perez-Bibbins, B., Torrado-Agrasar, A., Perez-Rodriguez, N., Aguilar-Uscanga, M. G. and Dominguez, J. M. 2015. Evaluation of the liquid, solid and total fractions of beer, cider and wine lees as economic nutrient for xylitol production. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **90**, 1027-1039.
  22. Takahashi, K., Izumi, K., Nakahata, E., Hirata, M., Sawada, K., Tsuge, K., Naqao, K., and Kitagaki, H. 2014. Quantitation and structural determination of glucosylceramides contained in sake lees. *J. Oleo. Sci.* **63**, 15-23.
  23. Ishida, T., Nishiumi, S., Tanahashi, T., Yamasaki, A., Yamazaki, A., Akshi, T., Miki, I., Kondo, Y., Inoue, J., Kawauchi, S., Azuma, T., Yoshida, M. and Mizuno, S. 2013. Linoleoyl ethanolamide reduces lipopolysaccharide-induced inflammation in macrophages and ameliorates 2,4-dinitrofluorobenzene-induced contact dermatitis in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **699**, 6-13.

## <첨부> 특허, 논문 및 시장분석 보고서

### 1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
주박에서 유효성분 분리	일본	10%	35%	80%	
주박, 기능성 소재 개발	일본	20%	40%	90%	

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) 현재 기술수준은 선진국 100% 대비 우리나라 및 신청한 연구팀의 기술수준 표시
- 3) 기술개발 목표수준은 당해과제 완료 후 선진국 100% 대비 목표수준 제시
- 4) 부가설명이 필요한 경우 비고란에 작성

### 2. 특허분석

#### 가. 특허분석 범위

(예시)

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허 DB	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr), Aureka DB
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목 및 초록

#### 나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

◇ “주박에서 유효성분 분리“에 대한 국내외 특허 출원에 대한 자료는 전무한 상태임.

개발기술명	주박, 기능성 소재 개발	주박, 기능성 소재 개발	
Keyword	sake, lees, cosmetics (일본특허)	sake, lees, cosmetics (일본특허)	
검색건수	16	16	
유효특허건수	12	12	
핵심특허 및 관련성	특허명	화장료	미백 화장료
	보유국	일본	일본
	등록년도	2011	2011
	관련성(%)	80	60
	유사점	일본청주 주박을 화장료 배합성분으로 이용하는 것으로 미백효과 및 피부항노화 작용을 가지는 화장료를 제공	일본청주 주박을 이용하여 미백효과를 가지는 화장료 개발
차이점	일본청주 주박에 납두균, 누룩곰팡이, 텐페균을 이용하여 발효 전후 가수분해를 처리하여 얻은 효소 분해 발효물을 유효성분으로 활용함.	주박을 유산균으로 재발효하여 얻은 발효물 또는 그 효소 분해물을 이용한 미백 효과를 가지는 화장료	

개발기술명		주박, 기능성 소재 개발	주박, 기능성 소재 개발
Keyword		주박, 미백	술지게미
검색건수		34	91
유효특허건수		1	3
핵심특허 및 관련성	특허명	주박을 이용한 보습 미백 주름 개선의 기능성 천연화장료 및 그 제조방법	청주 순미주 농축물 및 청주박 추출물 중 어느 하나 이상을 함유하는 피부 보호 또는 염증 완화용 조성물
	보유국	대한민국	대한민국
	등록년도	2004	2011 (공개)
	관련성(%)	70	
	유사점	청주 주박을 활용한 미백, 주름개선 활성을 가지는 화장료	청주박 추출물을 활용한 자외선에 대한 염증 완화 및 피부 보호 효과
차이점	청주주박을 발효시켜 얻은 발효물을 활용한 보습력, 미백 및 주름 개선 효과가 있는 화장료 개발. 주박 발효물을 자체를 사용. 추가적인 유효성분 분리과정 없음.	순미주 농축물 및 청주박을 활용. 본 연구진은 전통누룩을 활용한 약주·막걸리의 추출물/조성물을 이용한 기능성화장료 개발이 목적.	

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총 검색건수를, 유효특허건수는 검색한 특허 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 특허를 의미
- 3) 핵심특허는 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 특허를 기준으로 분석

### 3. 논문분석

#### 가. 논문분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽
논문 DB	pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov), 국회도서관(www.nanet.go.kr)
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목, 초록 및 키워드

#### 나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

◇ “주박에서 유효성분 분리“ 관련 국내외 논문 발표가 전무한 상황임.

개발기술명		주박, 기능성 소재 개발	주박, 기능성 소재 개발
Keyword		sake, lees	sake, lees
검색건수		6	6
유효논문건수		4	4
핵심논문 및 관련성	논문명	Sake lees fermented with lactic acid bacteria prevents allergic rhinitis-like symptoms and IgE-mediated basophil degranulation	Identification and kinetic study for tyrosinase inhibitor found in sake lees
	학술지명	Biosci. Biotechnol. Biochem.	J. Agric. Food Chem.
	저자	Kawamoto S, Kaneoke M, Ohkouchi K, Amano Y, Takaoka Y, et al.	Jeon HJ, Noda M, Maruyama M, Matoba Y, Kumagai T, Sugiyama M.
	게재년도	2011: 75(1), 140-144	2006: 54(26), 9827-9833
	관련성(%)	40	70
	유사점	청주주박의 알레르기 저해 활성평가	청주주박 유래 피부 미백 활성에 관여하는 tyrosinase 저해제의 분리 및 활성 평가
차이점	알러지에 대한 활성과 면역체계에 대한 연구를 수행. 다이어트나 피부 관련 활성 평가는 이루지지 않음. 주박 분획화 또는 유효성분에 대한 활성 평가 없음.	피부미백 중 tyrosinase 저해활성에 중점을 맞춰 연구 수행. 주름 또는 항산화 활성은 평가하지 않음.	

개발기술명		주박, 기능성 소재 개발	주박, 기능성 소재 개발
Keyword		sake, lees	sake, lees
검색건수		6	6
유효논문건수		4	4
핵심논문 및 관련성	논문명	Sake lees fermented with lactic acid bacteria prevents allergic rhinitis-like symptoms and IgE-mediated basophil degranulation	Identification and kinetic study for tyrosinase inhibitor found in sake lees
	학술지명	Biosci. Biotechnol. Biochem.	J. Agric. Food Chem.
	저자	Kawamoto S, Kaneoke M, Ohkouchi K, Amano Y, Takaoka Y, et al.	Jeon HJ, Noda M, Maruyama M, Matoba Y, Kumagai T, Sugiyama M.
	게재년도	2011: 75(1), 140-144	2006: 54(26), 9827-9833
	관련성(%)	40	70
	유사점	청주주박의 알레르기 저해 활성평가	청주주박 유래 피부 미백 활성에 관여하는 tyrosinase 저해제의 분리 및 활성 평가
차이점	알러지에 대한 활성과 면역체계에 대한 연구를 수행. 다이어트나 피부 관련 활성 평가는 이루지지 않음. 주박 분획화 또는 유효성분에 대한 활성 평가 없음.	피부미백 중 tyrosinase 저해활성에 중점을 맞춰 연구 수행. 주름 또는 항산화 활성은 평가하지 않음.	

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효논문건수는 검색한 논문 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 논문을 의미
- 3) 핵심논문은 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 논문을 기준으로 분석

## 4. 제품 및 시장 분석

### 가. 생산 및 시장현황

#### 1) 국내 제품생산 및 시장 현황

##### ○ 최근 약탁주 생산량 및 주박 발생량 현황

통계청에 따르면 2009년 막걸리 생산량은 214,000 kL로 2008년 생산량 대비 52.7% 증가하였다. 2009년부터 한식의 세계화 및 막걸리의 품질 향상, 기능성 측면이 부각되면서 소비량이 급격히 증가하여 2010년은 전년대비 73% 이상의 급격하게 생산량이 증가하였다. 하지만 약주의 생산량은 2006년부터 지속적으로 감소하고 있으며, 2009년도는 2006년 대비 50% 이하의 생산되었다. 이는 2009년부터 시작된 막걸리 열풍으로 인한 생산량 증가가 원인으로 생각할 수 있다.

주박 발생량에 대한 통계자료는 전무하다. 약탁주 생산량에 따른 주박 발생량을 유추하면 그 양은 엄청난 수준임을 짐작할 수 있다. 특히 2009년부터 막걸리의 생산이 급격하게 증가하면서 그로 인해 발생하는 주박의 양 또한 급격히 증가했을 것으로 사료된다.

##### ○ 약탁주 주박을 활용한 시장 현황

법적으로 주박은 산업폐기물로 분류가 되어 있다. 전통주 (약탁주)의 주박은 제조과정에서 발생하는 부산물로서 추가적인 비용을 투자하여 폐기하고 있는 실정이며 이런 환경으로 인해 별도의 전통주 주박을 활용한 시장의 형성과 제품 개발이 이루어지고 있지 않다. 일부 축산업자들은 주박을 동물 (특히 돼지)의 사료로 사용하고 있으며 농산

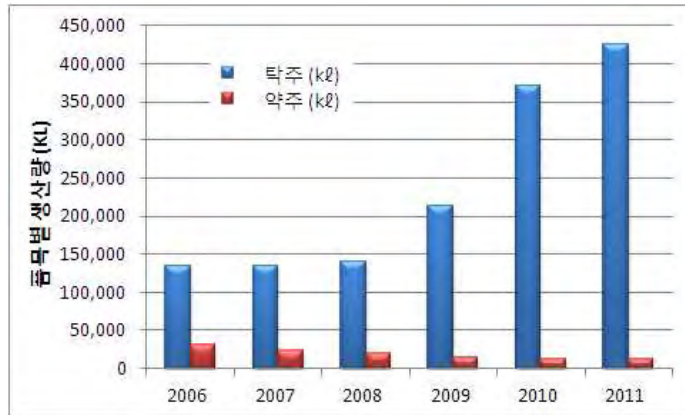


그림 1. 약탁주 생산량 추이 (출처: 통계청산업동향)

물 재배를 위한 퇴비나 비료로 사용하고 있는 정도이다. 최근, 주박에서 식이섬유를 추출하여 계육 유허형 소시지 제조방법과 기능성 유기질 비료를 제조하는 방법에 대한 특허성이 인정을 받아 산업적으로 이용하고자 하는 움직임이 있는 정도이다. 주박을 이용하여 울외짱아찌를 제조하거나 보쌈 등 육류를 가공하기 위한 소재로 활용하고 있는 정도이다.

## 2) 국외 제품생산 및 시장 현황

주박에 대한 연구가 가장 많이 진행된 일본에서도 주박을 이용한 뚜렷한 제품이 없으며 주박 발효물 또는 추출물을 화장품의 일부 성분으로 사용하고 있는 정도이다. 일본 청주 주박에서 angiotensin I converting enzyme의 펩타이드성 저해제를 개발했다고 보고가 되고 있지만, 아직 상용화는 되지 않았다.

## 나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

### 1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

- 시장성 분석 결과, 전통주 주박을 활용한 시장은 전무한 상태이다. 최근 막걸리의 지속적인 성장으로 전통주 제조 과정에서 발생하는 주박의 생산량은 증가되고 있다. 또한 일본의 경우, 아직 청주 주박을 이용한 제품화는 성공하지 못하였으나 기능성 식품 소재뿐만 아니라 의약품 소재로써 그 가능성은 충분히 확인되었다. 우리 농산물을 활용하여 제조되는 우리나라 전통주는 국내 농가의 판로 확장과 부가적 소득의 창출원으로 자리를 잡아 가고 있다. 막걸리의 지속적인 생산량 증가로 막걸리 제조는 국내에서 생산되는 잉여 쌀에 대한 새로운 공급처로 기능을 충실히 하고 있다.
- 환경적인 측면에서 전통주 제조 과정에서 발생하는 주박은 가축의 사료나 비료의 용도가 일부 제한적으로 사용되고 있으나 대부분의 주박은 산업적으로 폐기되고 있다. 주박의 폐기과정은 추가적 비용 발생 뿐만 아니라 환경적으로 많은 문제가 대두될 수 있다.
- 전통주 발효 부산물인 주박을 이용한 기능성 소재 발굴은 기능성 화장품의 소재 · 원료 및 제품을 개발하여 기존 화학 기반의 화장품과 차별화되는 고기능성 화장품 시장을 개척할 수 있다. 일부 화장품업체에서 개발하고 있는 한방화장품은 일종의 마케팅 전략의 일환으로 개발되고 있다고 할 수 있지만, 누룩 미생물과 효모 등에 의한 알코올 발효 과정에서 생성되는 주박은 그 자체가 천연 발효물로 그 효용 가치가 높다고 생각되어지며, 실제로 일본의 특정 화장품 브랜드는 일본청주 발효 과정에서 생성되는 주박과 효모 추출물을 활용하여 제조되었으며, 우리나라를 포함하여 전 세계적으로 매우 높은 매출을

올리고 있다. 또한 항비만성 기능성 소재 발굴은 기능성 음료 시장과 의약품 소재로의 개발 가능성이 높다고 사료된다.

- 산업 폐기물인 주박을 고부가가치 기능성 소재로 개발하여 블루오션인 새로운 시장을 창출하고 신규 소득원을 제고할 수 있다. 주박의 고부가가치 소재를 이용한 산업화는 새 전통주 원료를 공급하는 농가 소득의 증대와 안정적 판로가 개척될 수 있다. 또한 농산물 자원의 recycling이라는 개념에서 우리 땅에서 생산된 농산물을 이용하여 막걸리를 비롯한 전통주를 제조하고 그 부산물을 새로운 기능성 소재로 발굴하여 zero emission recycling system을 구축하여 친환경적인 산업으로 발전 가능하다.

2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

산업화 기준 항 목	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	-	250	500			
경제적 파급효과	-	500	1,500			
부가가치 창출액	-	360	720			
합 계						

- 1) 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
- 2) 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
- 3) 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

5. 3P(특허,논문,제품)분석을 통한 연구추진계획

가. 분석결과 향후 연구계획(특허, 논문, 제품 측면에서 연구방향 제시)

1) 특허분석 측면

- 주박을 포함하는 증금속 및 미세먼지 제거용 화장료 조성물:  
기존에 알려지지 않은 주박의 증금속 제거력 및 세포 보호효과를 밝혀 화장료로의 새로운 가치를 확인하고 그 소재를 이용한 기능성 화장품 시제품(클렌징 폼, 입욕제)을 개발함.
- 주박 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강 기능 식품:  
기존 특허는 전통주 주박을 활용한 항비만성 소재 발굴과 관련된 전혀 없는 상황으로 전통주 주박 또는 그의 추출물 및 유효성분의 전지방세포 분화 억제 및 다이어트 효과에 대한 연구를 추진하여 이를 바탕으로 기능성 다이어트 음료 시제품을 개발함.
- 기존 특허는 주박 발효물 또는 추출물의 기능성화장품 소재 연구에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 주박으로부터 유효성분을 분리 · 동정하여 고부가가치 기능성 화장품 소재화 방향으로 연구를 추진하여 “기능성 미백 및 주름개선 효과가 있는 전통주 주박 유래 유효 성분 또는 조성물” 특허 등을 국내 및 국외에 출원할 계획임
- 기존 특허는 전통주 주박을 활용한 항비만성 소재 발굴과 관련된 전혀 없는 상황으로 전통주 주박 또는 그의 추출물 및 유효성분의 전지방세포 분화 억제 및 다이어트 효과에 대한 연구를 추진하여 “전통주 주박 및 그의 유효 조성물을 이용한 비만 개선 기능

성 조성물 개발 기술” 특허 등을 국내 및 국외에 출원할 계획임

## 2) 논문분석 측면

- 본 연구과제에서는 한방 발효 주박 추출물의 항산화, 미백 및 주름개선 작용기전에 대한 연구를 추진하여 “한방 발효주박 추출물의 미백 및 피부 주름 개선 효과“에 관한 논문을 게재하였으며 향후 활성 물질과 작용기전을 바탕으로 SCI급 학술지에 게재할 계획임.
- 기존 논문은 주박 추출물의 생리 기능활성에 대한 전반적인 탐색/평가 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 주박 추출물의 항산화, 미백 및 주름개선 작용기전에 대한 연구를 추진하여 “주박의 광노화에 대한 작용기전 규명 연구“에 관한 논문 등을 SCIE급 (Food Science and Biotechnology, J. Microbiology and Biotechnology 등) 및 SCI급 (Biochemical Biophysical Research Communications, Biological and Pharmaceutical Bulletin, J. Medicinal Food 등) 학술지 등에 게재할 계획이며, 그 소재를 이용한 기능성 화장품 시제품 (마스크팩 등)을 개발할 예정임.
- 기존 논문은 주박 추출물의 생리 기능활성에 대한 전반적인 탐색/평가 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 주박 추출물의 항비만 및 항염증에 대한 활성과 그 작용기전에 대한 연구를 추진하여 “주박의 염증성 비만 저해 효과에 대한 작용기전 규명 연구“에 관한 논문 등을 SCI급 (Biochemical Biophysical Research Communications, Biological and Pharmaceutical Bulletin, J. Medicinal Food 등) 학술지 등에 게재할 계획이며 이를 이용하여 다이어트 보조 음료 등 시제품을 개발할 예정임.
- 기존 논문은 주박 유래 유효성분 및 단일물질에 대한 분리 · 정제에 대한 보고가 전무한 상황이므로, 본 연구과제에서는 주박으로부터 기능성 물질 및 유효성분을 분리 · 정제하는 연구를 추진하여 “주박 유래 생리기능활성을 가지는 유효성분 및 조성물의 분리 동정“에 관한 논문 등을 SCI급 (J Agricultural Chemistry 등) 학술지 등에 게재할 계획임.
- 기존 논문은 주박 유래 유효성분 및 단일물질에 대한 분리 · 정제에 대한 보고가 전무한 상황이므로, 본 연구과제에서 분리 · 정제한 유효성분 또는 조성물에 대한 피부광노화 또는 항비만에 대한 연구를 추진하여 그 작용기전을 규명에 관한 논문을 SCI급 (J Biochemical Chemistry, FEBS letters ) 학술지 등에 게재할 계획임.

## 3) 제품 및 시장분석 측면

- 국내 및 국외 시장을 분석한 결과, 전통주 제조 과정에서 발생하는 주박을 활용한 제품화 또는 산업화가 전무한 상태이다. 하지만, 막걸리의 지속적인 시장 증가로 인해 주박의 발생량이 매년 꾸준히 증가되고 있으며 이를 활용한 부분은 가축의 사료나 비료로 매우 제한적이다. 자원의 재활용 (recycling)의 관점에서 친환경적인 시장을 창출할 수 있다. 따라서 본 연구과제에서 주박 유래 생리 기능활성을 가지는 유효성분(조성물)을 분리 동정한다. 주박 유래 유효성분을 고부가가치 기능성 소재로 개발하기 위하여 각 유효성분에 대하여 미백, 주름개선, 항산화, 항비만, 항염증 등 생리 기능활성 탐색 및 작용기전을 규명할 것이다. 도출된 연구성과 및 기술을 산업체에 기술이전 하여 상품화를 추진하거나 직접 기능성화장품 및 다이어트 관련 소재 및 제품 개발할 것이다. 우리 농산물로부터 제조된 막걸리를 비롯한 전통주 제조, 그리고 그 과정에서 발생된 부산물을 이용하여 친환경적인 기능성 고부가가치 소재 및 제품을 개발할 수 있을 것으로 기대된다.