

11-15430  
00-00239  
2-01

국내 농산 자원 활용한 할랄 화장품 소재  
및 스킨케어 개발 최종보고서

2018

농림축산식품부

# 수출전략기술개발사업 R&D Report

보안과제( ), 일반과제( ) / 공개( ), 비공개( )

수출전략기술개발사업 제3차년도 최종보고서

## 국내 농산 자원을 활용한 할랄 화장품 소재 및 스킨케어 개발 최종보고서

2018. 10. 07.

주관연구기관/(주)대덕랩코  
협동연구기관/배재대학교

농림축산식품부

<제출문>

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “국내 농산 자원을 활용한 할랄 화장품 소재 및 스킨케어 개발”(개발기간 : 2015. 08. 31 ~ 2018. 08. 30)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 10. 07.

주관연구기관명 : (주)대덕랩코  
참여기관명 : 배재대학교 산학협력단

(대표자) 전현표 (인)  
(대표자) 최창원 (인)



주관연구책임자 : 전현표  
참여기관책임자 : 최창원

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

|                  |                    |                                   |                             |               |   |
|------------------|--------------------|-----------------------------------|-----------------------------|---------------|---|
| 과제고유번호           | 315053031W<br>T011 | 해 당 단 계<br>연 구 기 간                | 3                           | 단 계 구 분       | (해당단계: 3)/<br>(총 단 계 : 3)                   |
| 연구사업명            | 단 위 사 업            | 농식품기술개발사업                         |                             |               |   |
|                  | 사 업 명              | 수출전략기술개발사업                        |                             |               |   |
| 연구과제명            | 대 과 제 명            | (해당 없음)                           |                             |               |   |
|                  | 세부 과제명             | 국내 농산 자원을 활용한 할랄 화장품 소재 및 스킨케어 개발 |                             |               |   |
| 연구책임자            | 전현표                | 해당단계<br>참여연구원<br>수                | 총: 8명<br>내부: 2명<br>외부: 6명   | 해당단계<br>연구개발비 | 정부:200,000천원<br>민간:67,000천원<br>계:267,000천원  |
|                  |                    | 총 연구기간<br>참여연구원<br>수              | 총: 26명<br>내부: 7명<br>외부: 19명 | 총 연구개발비       | 정부:600,000천원<br>민간:201,000천원<br>계:801,000천원 |
| 연구기관명 및<br>소속부서명 |                    |                                   |                             | 참여기업명         |   |
| 국제공동연구           | 상대국명:              |                                   |                             | 상대국 연구기관명:    |   |
| 위탁연구             | 연구기관명: 배재대학교 산학협력단 |                                   |                             | 연구책임자: 최창원    |   |

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

|                         |  |
|-------------------------|--|
| 연구개발성과의<br>보안등급 및<br>사유 |  |
|-------------------------|--|

9대 성과 등록·기탁번호

| 구분          | 논문 | 특허  | 보고서<br>원문 | 연구시설<br>·장비 | 기술요약<br>정보 | 소프트<br>웨어 | 화합물 | 생명자원     |          | 신품종 |    |
|-------------|----|---|-----------|-------------|------------|-----------|-----|----------|----------|-----|----|
|             |    |   |           |             |            |           |     | 생명<br>정보 | 생물<br>자원 | 정보  | 실물 |
| 등록·기탁<br>번호 |    | 등록 1<br>(10-17<br>76511)<br>등록2<br>(10-18<br>06720) |           |             |            |           |     |          |          |     |    |

국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

| 구입기관 | 연구시설·<br>장비명 | 규격<br>(모델명) | 수량 | 구입연월일 | 구입가격<br>(천원) | 구입처<br>(전화) | 비고<br>(설치장소) | NTIS<br>등록번호 |
|------|--------------|-------------|----|-------|--------------|-------------|--------------|--------------|
|      |              |             |    |       |              |             |              |              |
|      |              |             |    |       |              |             |              |              |

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다) | 보고서 면수

<요약문>

|                                    |  |              |                     |                            |                       |
|------------------------------------|--|--------------|---------------------|----------------------------|-----------------------|
| <p>연구의<br/>목적 및 내용</p>             | <p>1. 무슬림 국가의 할랄 화장품에 대한 니즈는 점차 커지고 있으며 그 규모는 연간 100조원을 넘을 것으로 추정된다. 일례로 인구수 약 2억7,000명에 달하는 인도네시아에서는 내년부터 할랄 인증을 받지 않은 화장품에 대한 규제를 시작한다고 한다. 할랄 화장품에 사용할 수 있는 천연 소재를 국내 농산자원으로 개발한다면 매우 큰 경제적인 효과를 얻을 수 있을 것이다.</p> <p>2. 본 과제는 국내 농산자원을 이용하여 할랄 기준에 맞는 화장품용 소재를 개발하고 이를 이용한 화장품 처방을 개발하는 것이다. 또한 이를 통해 개발된 소재와 화장품을 할랄 인증까지 받는 것이다.</p>  |              |                     |                            |                       |
| <p>연구개발성과</p>                      | <p>1. 할랄 기준에 적합한 식물 (국내 농산자원) 추출물 제조 기술 개발<br/>2. 할랄 적합 식물 (국내 농산자원) 추출물 제조 (13종) 및 할랄 인증 (8종)<br/>3. 할랄 화장품 처방 개발 및 할랄 인증 (115품목)<br/>4. ICID에 할랄 화장품 소재 등재 (2건)<br/>5. KFDA 기능성 화장품 인증 (15건)<br/>6. 사업화 진행 중. : 말레이시아 KPJ 그룹 (말. 최대 병원체인)과 계약, 공급 완료(인도네시아, 두바이, 중국, 미국, 캐나다, 호주 등지에 수출 상담 진행중)<br/>7. 매출액 164백만<br/>8. 수출 계약 6건<br/>9. 고용창출 4건<br/>10. 홍보 및 전시회 참가 11건<br/>11. 특허등록 2건 및 출원 9건<br/>12. 기술 이전 1건<br/>13. 홍보 및 전시회 참가 11건<br/>14. 학술대회 발표 9건 및 우수포스터 발표상 1건<br/>15. 연구인력활용 및 양성 17건<br/>16. 교육 5건</p> |              |                     |                            |                       |
| <p>연구개발성과의<br/>활용계획<br/>(기대효과)</p> | <p>1. 할랄 기준에 적합한 식물 (국내 농산자원) 추출물의 품목을 지속적으로 추가함으로써 국내 농가의 소득을 지속적으로 증대함.</p> <p>2. 1차적으로 자사 할랄 제품 등에 사용하지만 점차 판매 영역을 확대하여 글로벌 판매망 구축</p> <p>3. 할랄 화장품을 글로벌 시장으로 판매 (10년 이내 2조원 규모 계획) : 동남아, 중동 등을 넘어 미국 등 중남미 시장, 유럽 시장, 아프리카 시장으로 확대</p> <p>4. 본 과제로 개발된 성과를 모든 화장품 영역으로 확대</p> <p>5. 위탁 연구기관에서 개발된 기술 (제조, 평가 기술 등)을 이전하여 자사 연구 능력 향상 및 사업 영역 확대</p> <p>6. 사업 영역 및 사업 규모의 확대로 지속적인 고용 창출 가능</p>  |              |                     |                            |                       |
| <p>국문핵심어<br/>(5개 이내)</p>           | <p>화장품소재</p>   | <p>할랄 인증</p> | <p>국내 농산<br/>자원</p> | <p>항산화-항균-<br/>미백-주름개선</p> | <p>돼지콜라겐대<br/>체소재</p> |

<본문목차>

< 목 차 >

|                             |     |
|-----------------------------|-----|
| 1. 연구개발과제의 개요 .....         | 5   |
| 2. 연구수행 내용 및 결과 .....       | 12  |
| 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 ..... | 186 |
| 4. 연구결과의 활용 계획 등 .....      | 187 |
| 붙임. 참고 문헌 .....             | 188 |

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발 목적

### 1. 국내 농산 자원을 활용한 할랄 인증 화장품 소재 개발

- (1) 무슬림 국가에서의 할랄 화장품에 대한 니즈는 점차 커져가는 추세이며 그 규모는 연간 100조원을 넘을 것으로 추정된다. 또한 무슬림 국가에서는 할랄 화장품이 아닌 제품의 수입을 규제하려는 추세이며 이에 따라 거대 무슬림 시장을 위한 할랄 인증 화장품에 대한 중요도는 점차 커져가고 있다. 할랄 인증 화장품을 만들기 위해서는 할랄 인증 소재가 반드시 필요하게 되며 국내 농산물을 이용한 생산품을 할랄 화장품용 소재로 인증받게 된다면 매우 높은 소득을 창출할 수 있을 것으로 기대된다.
- (2) 할랄 화장품은 매우 거대한 시장이며 또한 니즈가 점차 커져가는 추세임에도 불구하고 시장의 성숙도는 매우 초보적인 단계이므로 할랄 인증을 받은 소재는 전 세계적으로 매우 적은 것이 현실이다. 따라서 국내 농산 자원을 이용한 생산품으로 할랄 인증을 획득한다면 세계적인 경쟁력을 확보할 수 있으며 따라서 매우 높은 경제적 효과를 얻을 수 있을 것이다. (거대한 시장의 선점 효과)
- (3) 그러나 할랄 인증을 획득하기 위해서는 매우 까다로운 조건을 충족시켜야 하는 어려움이 있다. 할랄 인증을 받기 위해서는 무슬림의 종교적, 문화적 이해와 할랄 인증을 위한 정확한 정보와 절차가 필수적이다. 할랄 인증을 받기 위해서는 독립된 별도의 전용 생산 설비가 필수적이며 또한 소재의 구입 및 보관, 가공 공정, 출고까지의 전 과정이 할랄 기준에 적합해야 하며 제조에 소요되는 모든 성분에 대한 매우 엄격한 제한 조건 때문에 전혀 새로운 별도 기술을 개발해야만 한다.
- (4) (주)대덕랩코 기술연구소는 지난 10년 동안 할랄 화장품을 개발하여 2013년 80품목의 할랄 인증을 획득(터어키, 짐데스)하였으며 모든 영역의 스킨 케어 화장품의 할랄 인증 획득은 전 세계 최초이다. 할랄 전용 공장의 구비와 할랄 인증의 경험 및 이해는 본 과제 수행 능력에 타당성을 부여한다.

### 2. 상기 할랄 인증 소재를 활용한 할랄 인증 화장품의 개발

- (1) 본 과제를 통해 상기 할랄 인증 소재를 생산하는 공장으로 운영할 것이며 개발 및 인증 받은 소재를 활용한 할랄 인증 화장품을 생산, 판매함으로써 개발된 국내 농산 자원 소재의 판로를 확대한다.
- (2) 자사가 개발한 국내 농산 자원 소재를 사용함으로써 지속적인 판로 확보와 함께 독자 원료를 통한 차별화된 제품 (화장품)의 개발로 경쟁력을 확보하며 화장품 제조 경비의 절감 효과 및 수입 대체 효과를 얻을 수 있다.
- (3) 또한 현재 자사가 추진 중인 기술 이전 프로젝트에 본 과제를 통해 개발된 국내 농산 자원 소재를 적용한다면 더욱 다양한 판매 촉진 효과를 얻을 수 있을 것이다.

## 1-2. 연구개발의 필요성

- (1) 할랄 시장은 금세기 가장 큰 시장 또한 성장하는 시장으로 주목받는 시장이다. “할랄”이란 무슬림들의 생활 수칙이며 이를 영위하기 위하여 필요한 상품이 할랄시장이다. 무슬림에게 있어서 “할랄 생활”이란 단순히 식품, 화장품 등에만 국한되는 것이 아니며 생활 전반을 지배하는 “무슬림의 삶 그 자체”인 것이다.
- (2) 할랄 시장 중에서 할랄 식품은 이미 성숙된 시장의 형태를 갖추고 있으며 이에 필요한 물품의 개발, 공급 및 시장이 충분히 형성되어 있으나 할랄 화장품, 할랄 제약 산업 등은 아직 제대로 개발되지 못한 초기 단계의 성격을 나타낸다. 그러나 무슬림 사회의 인식의 변화, 과학의 발달 등으로 이들 시장에 대한 니즈도 매우 구체적으로 커져가고 있는 추세이다. 또한 전 세계 무슬림은 비교적 젊은 층으로 구성되어 있으며 인구 수는 지속적으로 증가 추세를 보이고 있다.
- (3) 자료(www.pewforum.org.)에 의하면 2010년 전 세계 인구수 69.2억명 중에서 무슬림의 인구수는 16.16억명으로 전 세계 인구의 23.4%를 차지하고 있는데 2030년에는 전 세계 인구수 82.96억명 중에 무슬림 인구수는 21.90억명으로 전 세계 인구의 26.4%를 차지할 것으로 예측하고 있다. 또한 자료(State of the Global Islamic Economy 2013 Report by Thomson Reuters)에 의하면 2012년 전 세계 화장품 소비액 4,500억 달러 중에서 무슬림 소비자의 화장품 소비액은 260억 달러로 전 세계 소비액의 5.7%로 보고되고 있다. 이는 할랄 화장품의 원활한 공급 부족으로 할랄 생활을 생활 수칙으로 삼는 무슬림 고객의 화장품 소비가 매우 위축되어 있는 상황을 보여주는 수치이다. 향후 팽배하는 할랄 화장품에 대한 니즈와 이에 부응하는 할랄 화장품의 공급이 원활해질 경우 2030년 전 세계 할랄 화장품의 시장 규모는 약 100조원 이상의 규모를 가질 것으로 예측할 수 있다.
- (4) 그러나 할랄 화장품 산업은 아직 초기 단계이며 이에 따라 전 세계적으로 할랄 화장품 소재 산업은 매우 미미하며 농산 자원을 이용한 할랄 인증 소재는 전혀 찾아볼 수 없는 것이 현실이다. 한국, 일본을 포함하여 전 세계적으로 화장품 소재 산업은 매우 발달되어 있고 성숙되어 거의 포화 상태를 나타내는 반면 할랄 인증을 받은 소재는 매우 손꼽을 정도로 적으며 특히 농산 자원을 이용한 할랄 인증 소재는 전혀 찾아볼 수 없다.
- (5) 따라서 본 과제를 통해서 할랄 인증을 받은 국내 농산 자원을 이용한 할랄 화장품 소재가 개발, 생산, 공급된다면 이는 전 세계 최초의 할랄 소재가 될 것이며 급속하게 성장하게 될 것으로 전망되는 할랄 화장품 산업과 함께 매우 큰 성장을 기대할 수 있는 산업이 될 것이다. 특히 낮은 생산성, 수익성을 갖는 농가의 소득 증대 및 국내 산업 발달에는 매우 블루 오션 성격의 산업이 될 것이다.
- (6) 그러나 개발하려는 농산 자원 소재가 할랄 인증을 받기 위해서는 매우 까다롭고 엄격한 기준을 충족하여야만 한다. “할랄”의 근거는 이슬람의 경전인 꾸란의 “너희는 성스러운 것과 좋은 것만을 먹어라”라는 말씀을 근거로 지켜지는 종교적 계율이며 이는 종교를 근거로 하는 것이므로 매우 배타적이고 협상이 불가능한 엄격하다는 성격을 갖고 있다. 아래는 터어키의 할랄 인증 기관인 GIMDES의 할랄 화장품 기준이며 할랄 화장품 소재 역시 이에 준하는 기준을 충족시켜야만 한다.

| <b>Halal</b><br>(permissible – Syariah compliant)  | <b>Thoyyiban</b><br>(wholesome : healthy, safe, nutritious, quality)   |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pork origin Free</li> <li>- All of animal origin raw materials Free</li> <li>- Ethanol Free (Halal Formula) &amp;</li> <li>- Halal Factory</li> <li>- Halal Machinery, Equipment</li> <li>- Halal Container, Package, Subsidiary materials.</li> <li>- Halal Storage</li> <li>- Halal Logistics</li> <li>- Halal Quality Control</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Silicone Compound Free</li> <li>- Petroleum derived materials Free</li> <li>- POE additional Surfactant Free</li> <li>- Acrylate Polymer Free</li> <li>- Synthetic Preservative Free (especially Paraben Free)</li> <li>- Synthetic Colorant (Tar Colorant) Free</li> <li>- GMO Free</li> <li>- SLS, SLES, ALS, ALES (Harmful Synthetic Detergent) Free</li> <li>- unconfirmed Nano materials Free</li> <li>- TEA Free</li> <li>- All of the materials that occur Skin Irritation Free</li> </ul> |

- (7) 할랄 기준을 충족시키기 위해서는 식물체에서 유효 성분을 추출, 농축시키기 위하여 광범위하게 사용하는 에탄올을 전혀 사용할 수 없고 다가 알코올류 역시 동물 유래의 성분은 사용할 수 없다. 또한 발효 과정에서 사용하는 균주 역시 까다로운 기준에 따라 선택해서 사용해야 하며 발효 과정에서 생성되는 에탄올 역시 장애 요인이 될 수 있다. 추출, 농축 혹은 발효, 정제 과정에서 첨가될 수 있는 다양한 첨가제 역시 매우 까다로운 기준을 충족시켜야 하며 이 모든 성분들은 단지 할랄 기준에 맞다고 모두 사용할 수 있는 것이 아니고 미리 인증 기관으로부터 모두 사전 허가를 얻은 것만 사용할 수 있게 된다.
- (8) 특히 할랄 인증은 성분에 관한 것만이 아니고 원료 구입 및 배송, 보관, 제조 공정 등 모든 과정에 대한 할랄 적합성을 가져야 하며 이들은 모두 인증 기관의 감시 하에 사전 허가를 얻어야만 한다. 따라서 할랄 인증을 받기 위해서는 할랄 기준에 맞도록 만들었다고 무조건 인증을 받을 수 있는 것이 아니라 개발 초기에서부터 전 과정을 할랄 인증 기관과 함께 진행해야 하는 것이 매우 중요하다.
- (9) 또한 모든 원료 물질, 생산 품목에 대하여 사후 확인 검사가 시행되어야 하며 이는 기존의 GMP 기준에 더하여 유전자 검사, 에탄올 잔류 검사 등 할랄 인증에 필요한 매우 특별한 검사까지 진행해야만 한다. 특히 동물성 소재의 경우, 동물의 도살 과정에서 할랄 의식이 필수적이기 때문에 무슬림 국가가 아닌 한국에서는 특히 어려운 상황이다. 예를 들어 소(牛)를 소재로 한 성분을 개발하기 위해서는 단지 가공 공정 뿐만 아니라 소의 도축 공정까지 할랄 인증을 받아야 하기 때문이다.
- (10) 또한 한국의 경우 산업이 매우 세분화되어 있으므로 어떤 물품을 생산하기 위한 모든 공정을 자체적으로 할 필요없이 일부 공정의 경우 외주 제작이 가능하지만 할랄 제품의 경우 모든 공정을 자체적으로 시행해야만 하는 제약 조건도 있다. 만약 일부 공정을 외주 가공하려 외주 가공 업체 역시 할랄 인증을 받은 공장이어야 하는데 한국의 경우 이것이 불가능한 것이 현실이다.

(11) 그러나 할랄 화장품의 시장은 매우 크고 매우 성장성이 빠른 시장이며 이와 함께 필요한 할랄 화장품 소재 역시 매우 크고 성장성이 빠른 시장이다. 또한 아직 전 세계적으로 할랄 인증받은 농산 자원 소재가 전무하다는 것은 현재 국내 농산 자원의 활용 증대를 위해서는 매우 좋은 기회가 될 것으로 판단된다.

### 1-3. 연구개발 범위

#### 1. 개발 목표

##### (1) 주관연구기관(대덕랩코) : [1-2차년도]

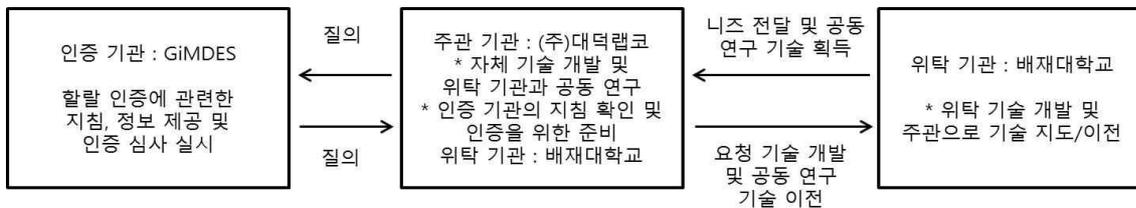
- ① 할랄 인증이 가능한 식물 추출물 추출 방법 개발 : 자체 연구 및 위탁 기관으로부터 기술 전수
- ② 표준화 작업 및 시험 기준 정립 (위탁 기관과 공동 연구 및 기술 이전)
- ③ 개발된 추출물의 효능 평가 결과 확보 (위탁 기관과 공동 연구 및 시험 결과 이전)
- ④ 대체 콜라겐 기술 개발 (위탁 기관과 공동 연구 및 기술 이전)
- ⑤ 개발된 추출물 등이 함유된 할랄 인증에 적합한 화장품 처방 개발
- ⑥ 개발된 할랄 인증 화장품의 표준화 및 각종 인증을 위한 시험 실시(효능 평가)
- ⑦ 안정성 평가 및 사용 품질 평가 등
- ⑧ 할랄 인증 (화장품 소재, 화장품)을 위한 기초 작업 실시(인증 신청 및 인증은 3차 년도에 실시 예정)
- ⑨ 할랄 화장품 소재의 할랄 인증을 위한 제조 공장 설치 준비 (인증 신청 및 인증은 3차 년도에 실시 예정)

##### (2) 위탁연구기관(배재대학교) : [1-2차년도]

- ① 할랄 인증을 위한 농수산자원의 추출법 및 발효법을 확립한 후 추출물 및 발효물의 향산화, 항균, 미백, 주름개선 효능 및 안전성을 검증
- ② 돼지 콜라겐을 대체하기 위한 기술을 개발하기 위해 불가사리 및 생선비늘을 대상으로 콜라겐 추출 및 분리정제 기술을 개발

#### 2. 개발 내용 및 범위

##### (1) 주관연구기관(대덕랩코) : [1-2차년도]



##### (2) 위탁연구기관(배재대학교)

##### [1차년도]

- ① 시료 확보 : 목표 37종에 대한 냉수추출물, 열수추출물 및 유산균 발효액
- ② 성분분석: 각 시료의 탄수화물, 알칼로이드, 플라보노이드, 탄닌 및 단백질 분석
- ③ *in vitro* 활성 탐색
- ㉠ *in vitro* 항산화 효능 탐색 : 각 시료의 DPPH 및 ABTS 라디칼 제거능
- ㉡ *in vitro* 항균 효능 탐색 : 각 시료의 원판 평판배지 확산법(paper disc agar diffusion method)
- ㉢ *in vitro* 미백 효능 탐색 : 각 시료의 타이로시나제(tyrosinase) 억제 활성

㉔ *in vitro* 주름개선 효능 탐색 : 각 시료의 엘라스타제(elastase) 억제 활성

## [2차년도]

① 항여드름균 활성(1종 6점)

㉑ 오이풀 뿌리(지유) 냉수추출물(CWE), 열수추출물(HWE), 냉수추출물의 에틸아세테이트 분획물(CWE-EA) 및 열수추출물의 에틸아세테이트 분획물(HWE-EA)

㉒ 오이풀 뿌리(지유) 메탄올 추출물(ME) 및 분획물(ME-EA)

- 프로피오니박테리움 애크니스에 대한 원판확산법
- 프로피오니박테리움 애크니스에 대한 최소억제농도(MIC) 및 최소살균농도(MBC)
- CWE-EA, HWE-EA 및 ME-EA 성분 분석 : 박층 크로마토그래피(Thin layer chromatography; TLC)
- CWE-EA, HWE-EA 및 ME-EA의 HPLC 분석

② 미백 기능(6종 12점)

㉑ 오이풀 뿌리(지유) 냉수추출물(CWE) 및 열수추출물(HWE)

㉒ 지황 뿌리(건지황) 냉수추출물(CWE) 및 열수추출물(HWE)

㉓ 칩 뿌리(갈근) 냉수추출물(CWE) 및 열수추출물(HWE)

㉔ 오미자 열매 냉수추출물(CWE) 및 열수추출물(HWE)

㉕ 구기자 열매 냉수추출물(CWE) 및 열수추출물(HWE)

㉖ 천마 덩이줄기 냉수추출물(CWE) 및 열수추출물(HWE)

- 농도별 시험관 내 항타이로시나아제 활성 실험(기질 : L-DOPA, L-tyrosine)
- 농도별 세포독성(cytotoxicity)(세포주 : BF16F10 멜라노마 세포)
- 각 추출물 처리 세포 내 멜라닌 함량(melanin content)

③ *in vitro* 항산화 기능(1종 6점)

㉑ 오이풀 뿌리(지유) 냉수추출물, 열수추출물, 메탄올추출물 및 각 추출물의 에틸아세테이트 분획물

- 총 폴리페놀(total polyphenols) 함량
- 총 플라보노이드(total flavonoids) 함량
- 총 탄닌(total tannin) 함량

㉒ *in vitro* 항산화 활성 및 활성산소 제거능 평가

- DPPH 라디칼 억제활성
- ABTS 라디칼 억제활성
- Hydroxyl 라디칼 제거능 : 과산화수소(Hydrogen peroxide) 제거능
- 지질과산화 억제 활성

㉓ 항산화효소 측정

- superoxide dismutase(SOD)
- catalase(CAT)
- glutathione peroxidase(GPx)

- ④ 항염증 효능 검증(1종 2점)
  - ㉠ 냉수추출물 및 열수추출물의 에틸아세테이트 분획물
    - 농도별 세포독성(cytotoxicity)(세포주 : BF16F10 멜라노마 세포)
  - ㉡ 항염증 효과 측정(세포주 : RAW 264.7 대식세포)
    - LPS 처리 후 각 추출물 처리
    - Nitric oxide(NO) 생성 억제 평가
  - ㉢ 항염증 관련 사이토카인 유전자 발현(mRNA) 양 측정 : RT - Real time qPCR
    - TNF- $\alpha$
    - IL-1 $\beta$
- ⑤ 돼지 콜라겐 대체 소재 개발
  - ㉠ 불가사리 및 생선 비늘 콜라겐
    - 추출 및 분리정제
    - 불가사리 추출 후 콜라겐 : input 대비 output 소량(경제성 미약)
    - 어류 비늘로부터 추출된 콜라겐 : input 대비 output 대량(경제성 탁월)
  - ㉡ 생선 비늘로부터 추출한 콜라겐 발효
    - 균주 : Lactobacillus
    - 콜라겐 펩타이드 생산
  - ㉢ 엘라스타제(elastase) 억제 활성 비교

### [3차년도]

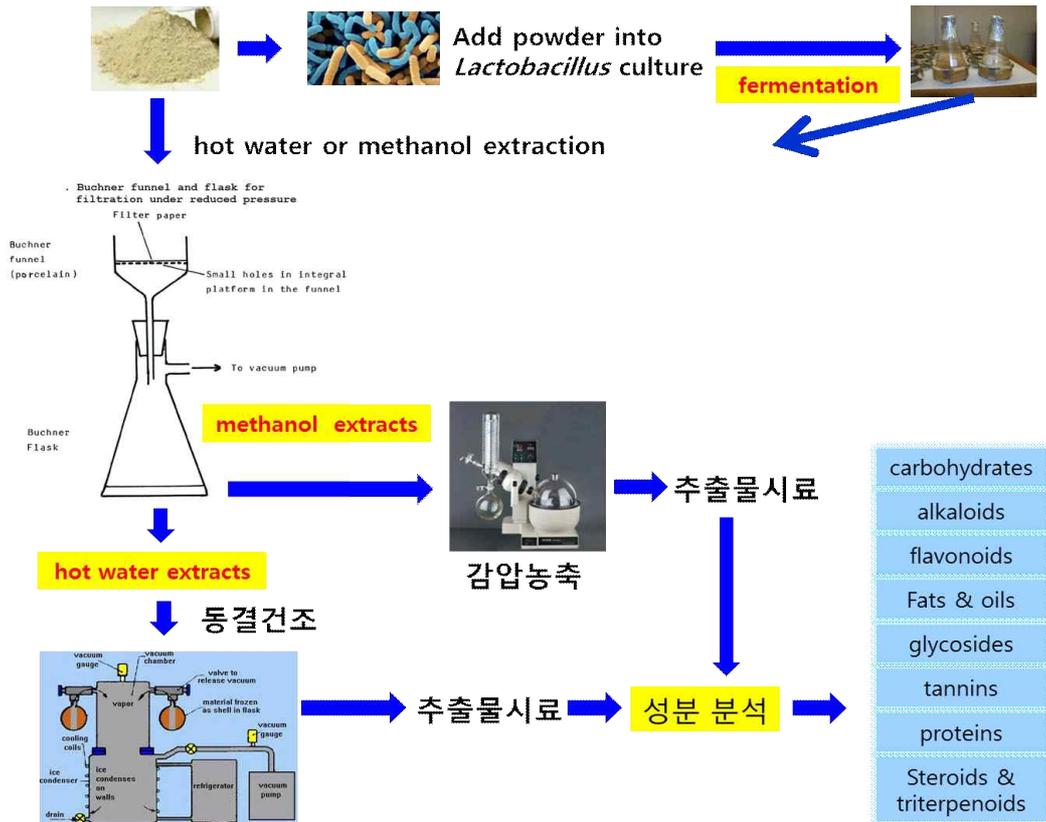
- ① 개발 목표
- ㉠ 주관연구기관(대덕랩코)
  - 할랄 인증이 가능한 식물 추출물의 제조 기술 확립 및 각종 데이터 확보 (효능 데이터, 안전성 데이터 등), 표준화 작업
  - 할랄 소재 제조 공장으로 할랄 인증 획득. (공장 인증 & 품목 인증) : 추출물 5종 이상
  - 개발된 국내 농산물 추출물을 함유하는 화장품의 할랄 인증 획득 : 10종 이상
  - 상기 화장품의 각종 인증 획득 : KFDA 기능성 화장품 인증, 안전성 평가 완료 (국내 임상 기관, FDA)
  - 대체 콜라겐 기술 이전 및 기술 확보
  - 상기 제품을 이용한 해외 수출 : 수출 계약 1건 이상
- 위탁연구기관(배재대학교)
  - 식물의 열수추출물, 냉수추출물 혹은 각추출물의 에틸아세테이드 분획물 시료의 *in vivo* 항염증 효능평가와 각 시료 함유 도포액의 효능 및 안전성 시험
  - 생선비늘 콜라겐 및 콜라겐펩타이드 함유 발효물의 *in vivo* 효능 및 독성

## 2. 연구수행 내용 및 결과

### 2-1. 연구개발 추진전략·방법

I. 향산화, 항균, 미백, 주름개선 향장 소재

(1) 대상식물 추출물/발효산물의 추출물 및 함량



① 추출물

㉠ 열수 추출

- 식물 조직 30 g 분말
- 시료를 1 L 플라스크에 적재하고 증류수 600 mL를 첨가한 후 진탕 항온수조에서 30분간 80°C 가열함
- 현탁액을 Whatman No. 3 여과지를 장착한 Buchner 깔대기에서 여과한 후 2회 반복함
- 열수 추출물을 모은 후 동결건조함

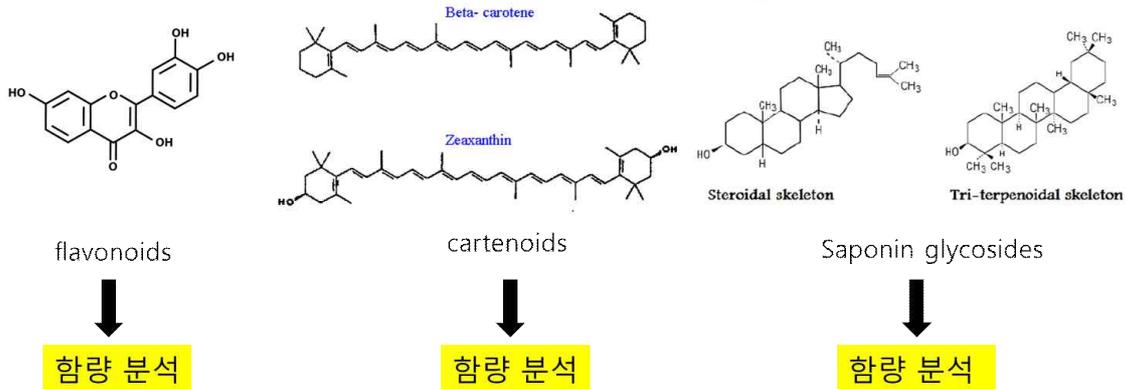
㉡ 메탄올 추출

- 식물 조직 30 g 분말
- 시료를 1 L 플라스크에 적재하고 100% 메탄올 600 mL를 첨가한 후 진탕 항온수조에서 30분간 80°C 가열함
- 현탁액을 Whatman No. 1 여과지를 장착한 Buchner 깔대기에서 여과한 후 2회 반복함
- 메탄올수 추출물을 모은 후 40°C에서 침점물이 형성될 때까지 회전증발농축기로 농축함

㉞ 발효물

- 발효 기법을 통한 향장 소재 획득
- *Lactobacillus plantarum*과 *Lactobacillus acidophilus*을 MRS 액체 배지로 37°C에서 배양함
- 대상 식물조직의 분말을 배지에 첨가한 후 42°C에서 24시간 배양함
- 배양 여액과 배양물을 취하여 함량 및 성분을 확인함

(2) 대상식물 추출물 및 발효산물의 성분 분석



① 탄수화물(carbohydrates)

㉠ Molisch' s 시험

- 추출물 및 발효산물을 Molisch' s 시약( $\alpha$ -Naphthol)과 혼합한 후 몇 방울의 농축 황산 첨가함
- 자색 링이 형성 유무로 결정함

㉡ Fehling 용액 시험

- 추출물 및 발효산물을 1 mL Fehling A 용액과 1 mL Fehling B 용액과 혼합
- 혼합물을 수조에서 5-10분 가열 후 구리산화물(cuprous oxide)에 의한 농적갈색 형성 유무로 결정함

② 알칼로이드(alkaloids)

㉠ Dragendroff' s 시험

- 추출물 및 발효산물을 1 mL Dragendroff' s 시약과 혼합함
- 농적갈색 침전물의 형성 유무로 결정함

㉡ Mayer' s 시험

- 추출물 및 발효산물을 1 mL Mayer' s 시약과 혼합함
- 크림색 침전물의 형성 유무로 결정함

㉢ Wagner' s 시험

- 추출물 및 발효산물을 1 mL Wagner' s 시약과 혼합함
- 농적갈색 침전물의 형성 유무로 결정함

㉣ Hager' s 시험

- 추출물 및 발효산물을 1 mL Hager' s 시약과 혼합함
- 황색 침전물의 형성 유무로 결정함

③ 플라보노이드(flavonoids)

㉠ Alkaline 시약 시험

- 추출물 및 발효산물에 소량의 NaOH 용액을 첨가하여 황색 침전물의 형성
- 몇 방울의 희석된 HCl 용액을 첨가 후 무색으로 변화하면 플라보노이드가 존재함

㉡ Shinoda 시험

- 추출물 및 발효산물에 소량의 마그네슘 조각(magnesium turnings)과 몇 방울의 Hager's 시약과 혼합함
- 선흥빛 발색 유무로 결정함

㉢ 지방과 불휘발성유(fats and fixed oils)

- 1% 황산구리(copper sulphate) 용액에 추출물 및 발효산물 각각 5 방울 첨가한 후 10% NaOH 용액을 추가함
- 투명한 청색의 유무로 결정함

④ 안트라퀴논 글리코사이드(anthraquinone glycosides)

㉠ Borntrager's 시험

- 추출물 및 발효산물을 각각 1 mL 황산에 첨가한 후 5분간 가열하고 여과함
- 여과물을 냉각시키고 동량의 클로로포름과 혼합하여 vortexing
- 하층부의 클로로포름을 분리하고 희석한 암모니아를 1/2 volume 첨가하여 진탕함
- 암모니아 층에 옅은 장밋빛이 형성 유무로 결정함

⑤ 사포닌 배당체(saponin glycosides)

㉠ 거품(froth) 형성 시험

- 추출물 및 발효산물 각각 2 mL을 시험관에 넣고 진탕함
- 거품의 안정성 유무로 결정함

⑥ 탄닌(tannins)

㉠ 염화철(ferric chloride) 시험

- 추출물 및 발효산물 각각에 염화철 용액을 처리함
- 청녹색 유무로 가수분해성 농축 탄닌의 존재를 결정함

㉡ 젤라틴(gelatin) 시험

- 추출물 및 발효산물 각각에 10% NCl을 함유한 1% 젤라틴 용액을 첨가함
- 침전물 유무로 탄닌의 존재를 결정함

⑦ 단백질(proteins)

㉠ 가수분해 시험

- 추출물 및 발효산물 각각에 염산을 처리하여 가수분해 시킨 후 ninhydrin 용액을 첨가하고 가열함
- 자색 유무로 단백질의 존재를 결정함

⑧ 스테로이드(steroids) 및 트리테르페노이드(triterpenoids)

㉠ Salkowski's 시험

- 추출물 및 발효산물 각각에 몇 방울의 농축 황산을 처리함
- 하층부에 홍색과 황색의 존재 유무로 결정함

(3) 대상식물 추출물 및 발효물로부터 플라보노이드, 카로티노이드 및 사포닌 추출 및 함량 측정

① 추출

㉠ 플라보노이드 추출

- 식물 조직 분말시료를 Soxhlet 추출 장치에 넣고 ether를 채운 후 80°C에서 8시간 환류처리하여 정유와 클로로필 제거함
- ether를 증발시킨 후 약 2 g 시료를 61.57% 에탄올로 70°C에서 11분 추출함
- 추출액을 여과한 후 에탄올을 증발시키고 AB-8 resin으로 충전된 컬럼(400 x 2.5 cm)으로 옮김
- 탄수화물을 제거하기 위해 증류수로 충분히 세척한 후 95% 에탄올로 용리함
- 40°C에서 침전물이 형성될 때까지 회전증발농축기로 농축함

㉡ 카로티노이드(carotenoids) 추출

- 식물 조직 분말 15 g + celite 545 3 g
- 시료에 25 mL 아세톤을 첨가하여 유발에서 마쇄한 후 sintered funnel(5  $\mu$ m)을 장착한 Buchner flask로 옮긴 후 진공 상태에서 여과함(무색이 될 때까지 3회 반복)
- 40 mL petroleum ether를 함유한 분별깔대기(500 mL)로 여과액을 옮긴 후 초순수를 천천히 첨가하여 아세톤 제거함(상등 수용층 제거 및 4반복 실시)
- 15 g 무수 황산나트륨을 함유한 플라스크(50 mL)로 옮긴 후 petroleum ether로 채움

㉢ 사포닌(saponin) 추출

- 식물 조직 분말 20 g
- 분말시료에 80% 메탄올 100 mL를 첨가하고 환류냉각 장치를 이용하여 80°C에서 2회 반복하여 추출한 다음 추출물을 모아 감압 농축한 후 농축물을 20 mL의 증류수에 녹여 사포닌 추출에 이용함
- 분말시료 추출물 시료를 250 mL 분액여두에 옮기고 에틸에테르 20 mL을 이용하여 농축물의 지질성분 등을 제거한 후 수포화 부탄올 20 mL을 이용하여 3회 반복하여 추출함
- 추출된 수포화 부탄올 층을 함께 모아 분액여두에 옮기고 15 mL 증류수로 2회 세척함
- 이후 부탄올 층을 농축수기에 옮기고 감압농축한 후 농축물의 무게를 측정함
- 이를 다시 5 mL 메탄올에 녹이고 0.45  $\mu$ m 막필터로 여과하여 총사포닌 함량과 사포닌 조성 분석을 위한 시료로 사용함

② 함량측정

㉠ 총 페놀계(phenolic) 함량: 메탄올 및 열수 추출물

- Gallic acid를 사용하여 표준곡선 작성함
- 추출물 및 발효산물 각각 0.5 mL를 1N folin-ciocalteu 시약 2.5 mL과 혼합한 후 5분간 처리함
- 탄산나트륨(75 g/L) 2 mL를 첨가하고 2시간 실온에서 처리함
- 메탄올 음성대조구에 대한 흡광치(760 nm)를 측정하고 건물중에 대한  $\mu$ g GAE(gallic acid equivalent)로 표시함

㉠ 총 플라보노이드 함량: 플라보노이드 분획물

- quercetin 0-50  $\mu\text{g/mL}$ 를 사용하여 표준곡선 작성함
- 추출물 및 발효산물 각각 5 mL를 염화알루미늄 2%를 함유한 메탄올 용액 5 mL와 혼합하고 10분간 처리함
- 메탄올 음성대조구에 대한 흡광치(415 nm)를 측정하고 건물중에 대한  $\mu\text{g}$  QE(quercetin equivalent)로 표시함

㉡ 총 카로티노이드 함량: 카로티노이드 분획물

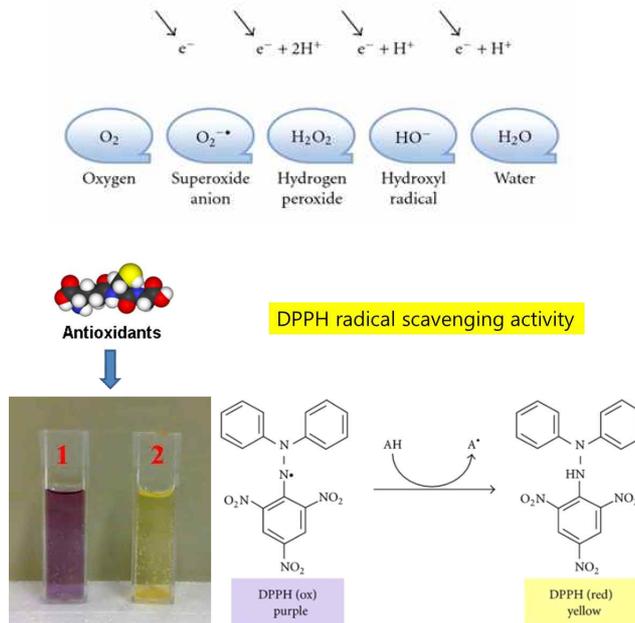
- $\beta$ -carotene 0.001-0.005  $\text{mg/mL}$ 를 이용하여 표준곡선 작성
- 흡광치(450 nm)를 측정하고 다음과 같은 공식을 이용하여 측정함
- 함량( $\mu\text{g/g}$ ) =  $A \times V(\text{mL}) \times 10^4 / \beta\text{-carotene EC} \times P(\text{g})$  [A: 흡광치, V: 총 추출량, P: 시료 무게, EC:  $\beta$ -carotene의 Extinction coefficient(petroleum ether)]

㉢ 총사포닌 함량: 사포닌 분획물

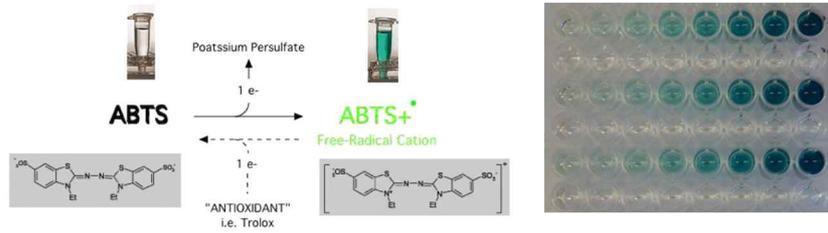
- 사포닌 조추출물 100  $\mu\text{L}$ 에 8% 바닐린용액 0.3 mL을 첨가한 후 냉수조에서 75% 황산용액 4 mL을 첨가함
- 이후 60°C에서 10분 가온하여 발색시키고 545 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선으로부터 총사포닌 함량을 측정함
- 표준곡선은 ginsenoside Rg1, Re 및 Rb1 각각을 0.2~1.0  $\text{mg/mL}$  농도로 순차적으로 조제한 후 시료용액과 동일한 방법으로 반응시킨 후 흡광도를 측정함

(4) 대상식물 추출물 및 발효산물의 *in vitro* 효능 평가

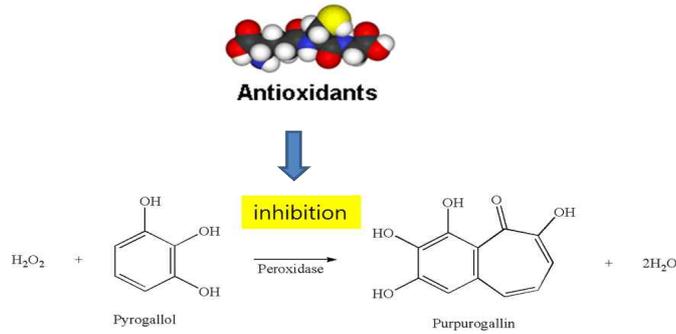
① 항산화 활성 및 활성산소 제거능 평가



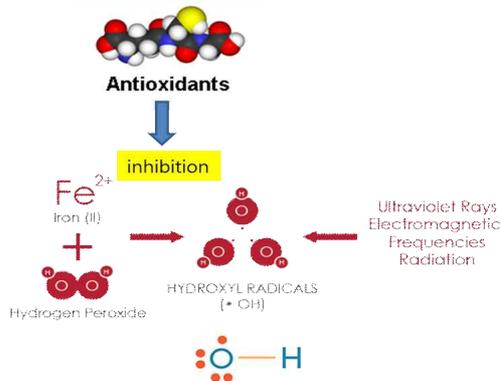
### ABTS radical scavenging activity



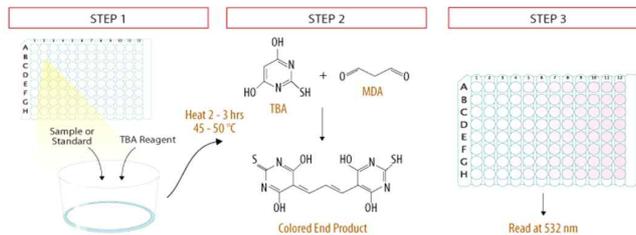
### superoxide radical scavenging activity



### hydroxyl radical scavenging activity



### Lipid peroxidation assay



㉠ DPPH 라디칼 제거능

- 추출물 및 발효산물을 농도별(10, 25, 50, 100, 250, 500  $\mu\text{g/mL}$ )로 에탄올에 희석함
- 0.3 mM DPPH(에탄올) 용액 1 mL을 2.5 mL 각 시료와 혼합한 후 30분간 실온 처리함
- 에탄올 음성대조구에 대한 흡광도(518 nm)를 측정하고  $SC_{50}$  결정함

㉡ ABTS 라디칼 제거능

- ABTS<sup>\*+</sup> 라디칼은 4.9 mM 과황산칼륨(potassium persulfate) 5 mL을 14 mM ABTS 5 mL 용액에 첨가함으로써 생성시킴
- 농도별로 희석한 추출물 및 발효산물 50  $\mu\text{L}$ 를 위의 ABTS 용액 950  $\mu\text{L}$ 에 첨가함
- 진탕혼합 6분 후 에탄올 음성대조구에 대한 흡광도(734 nm)를 측정하고  $SC_{50}$  결정함

㉢ superoxide 라디칼 제거능

- 3 mL 반응액(10 mM 인산칼륨, pH 7.8; 130 mM methionine; 60  $\mu\text{M}$  riboflavin; 0.5 mM EDTA; 0.75 mM NBT)을 준비함
- 농도별로 희석한 추출물 및 발효산물 0.5 mL를 위의 반응액에 첨가한 후 형광등에 6분간 노출함[양성대조구(농도별  $\text{CuSO}_4$ )]
- 동일한 조성액을 암 처리한 음성대조구에 대한 흡광도(560 nm)를 측정하고  $SC_{50}$  결정함

㉣ hydroxyl 라디칼 제거능

- 농도별로 희석한 추출물 및 발효산물을 1 mL 반응액(2.8 mM 2-deoxy-2-ribose; 20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-KOH}$ , pH 7.4; 0.1 mM  $\text{FeCl}_3$ ; 0.1 mM EDTA; 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 0.1 mM ascorbic acid)에 첨가함
- 반응혼합액 37°C에서 1시간 처리한 후 2.8% TCA 1 mL와 1% thiobarbituric acid(TBA) 1 mL 첨가
- 수조에서 15분간 90°C에서 가열하고 냉각한 후 흡광도(532 nm)를 측정하고  $SC_{50}$  결정함 [양성대조구: thiourea 혹은 mannitol]

㉤ 지질과산화 억제 활성

- 반응액 1 mL(농도별로 희석한 추출물 및 발효산물 0.1 mL; 0.5 mL 10% 계란 노른자를 마쇄한 증류수)를 70 mM  $\text{FeSO}_4$  0.05 mL와 혼합함
- 2 mM ascorbic acid를 첨가하여 반응을 개시하고 37°C에서 30분 처리함
- TCA를 첨가하여 반응을 종료시킴
- 반응 혼합액에 250  $\mu\text{l}$  TBA(50 mM NaOH로 녹임)를 첨가하고 10분간 가열함
- 원심분리 후 상등액에서 TBARS의 흡광도 532 nm를 측정한 후 % 억제활성으로 표현함

㉥ 산화질소(Nitric Oxide) 제거능

- 반응액(10 mM sodium nitroprusside; PBS, pH 7.4; 농도별로 희석한 추출물 및 발효산물) 3 mL를 25°C에서 150분 처리한 후 sulfanilamide(20% 빙초산에 0.33%) 1 mL를 반응액 0.5 mL에 첨가함
- 5분 후 naphthylethylenediamine dihydrochloride(NED) 1 mL를 반응혼합액에 추가하고 25°C에서 30분 처리함
- 흡광도 540 nm에서 측정하고  $SC_{50}$  결정함

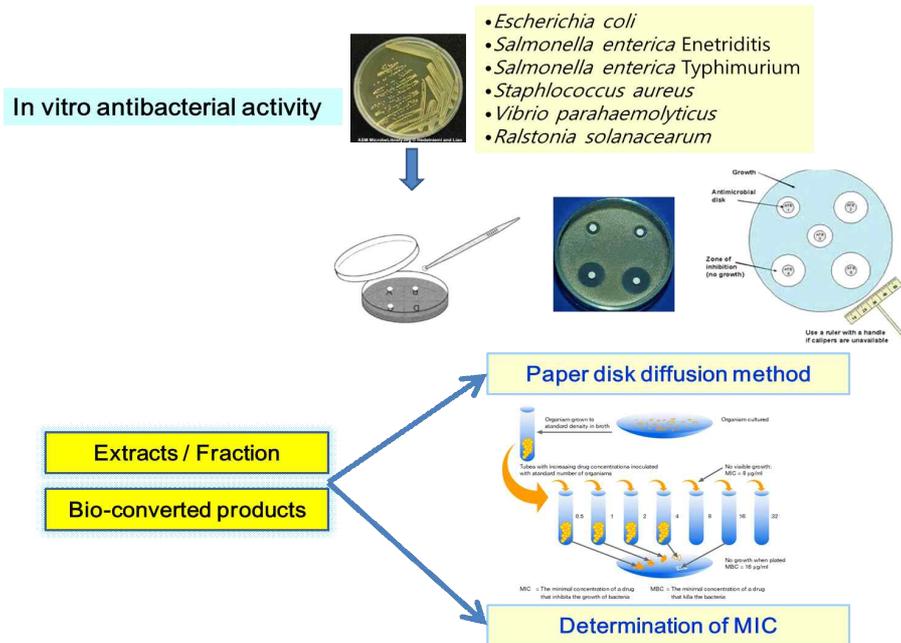
㉞ 과산화수소(Hydrogen peroxide) 제거능

- 농도별로 희석한 추출물 및 발효산물을 50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 1:1로 혼합한 후 실온에서 30분 처리함
- 90 μL 반응시료액과 10 μL HPLC grade 메탄올을 혼합하고 0.9 mL FOX 시약을 추가함 [FOX 시약[HPLC grade 메탄올에 녹인 4.4 mM BHT : 1 mM xylenol orange + 2.56 mM 황산제일철암모늄(ammonium ferrous sulfate)을 함유한 250 mM 황산, (9:1, v/v)]
- 진탕혼합 후 실온에서 30분 처리함
- 흡광도 580 nm에서 측정하고 SC<sub>50</sub> 결정함[reference: sodium pyruvate]

㉟ 환원능 결정

- 농도별로 희석한 추출물 및 발효산물을 0.5 mL 인산용액(200 mM, pH 6.6) 및 0.5 mL 헥사사이아노철(II)산 칼륨(potassium hexacyanoferrate, 0.1%)과 혼합한 후 항온수조에서 20분간 50°C 가열함
- TCA(10%) 0.5 mL를 첨가하여 반응을 종료함
- 반응 상층액 1 mL에 증류수 1 mL와 0.01% 염화제이철(FeCl<sub>3</sub>) 1 mL를 첨가함
- 반응혼합액을 실온에서 10분간 정치한 후 흡광치 700 nm에서 측정함

③ 항균 효능



㉠ 항균 활성

㉡ 대상 시료 및 균주

- ①-㉠의 에탄올 추출물을 용매의 극성도 차이를 이용하여 n-hexane, methylene chloride, ethyl acetate 및 물층으로 나누고 분리된 용매층은 회전증발농축기로 농축하여 각 분획의 건조물 획득함
- 추출물 및 분획물의 항균활성을 확인하기 위해서 다음과 균주를 사용함 [*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, -enetriditis, -typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Ralstonia solanacearum*]

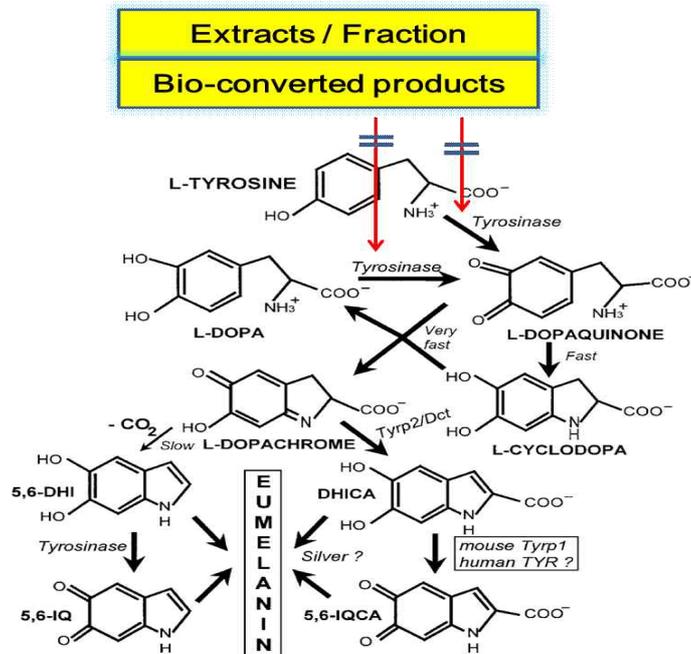
㉠ 디스크 확산법(disk diffusion method)

- 각 균주에 적합한 평판배지에 대상 균주 500  $\mu\text{L}$ 를 도말함
- 멸균된 필터페이퍼 디스크(5-8 mm) 위에 농도별 추출물 및 분획물 50  $\mu\text{L}$ 씩 흡수시킴
- 흡수시켜 놓은 디스크를 배지 중앙에 위치시킨 후 페트리디쉬는 parafilm으로 밀봉함
- 37°C 에서 18시간 배양한 후 디스크 주변의 투명한 크기 측정함 [음성대조구: 각 시료별 용매, 양성대조구: 스트렙토마이신 등 항생제]

㉡ 최소 억제농도(minimum inhibitory concentration; MIC)

- 각 균주에 적합한 액체배지 5 mL에 추출물 및 분획물을 2-fold 연속희석한 농도로 처리한 후 각 균주 50  $\mu\text{L}$ 를 접종함
- 37°C 에서 18시간 배양한 후 분광광도계 600 nm에서 흡광도를 측정하고, 균이 증식되지 않는 농도를 MIC로 결정함

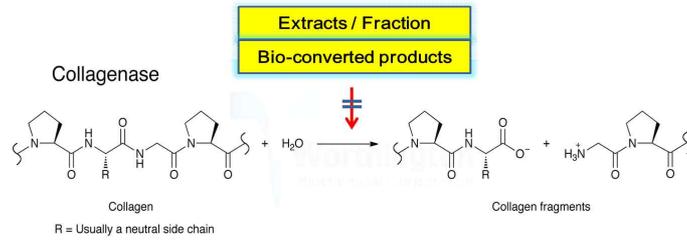
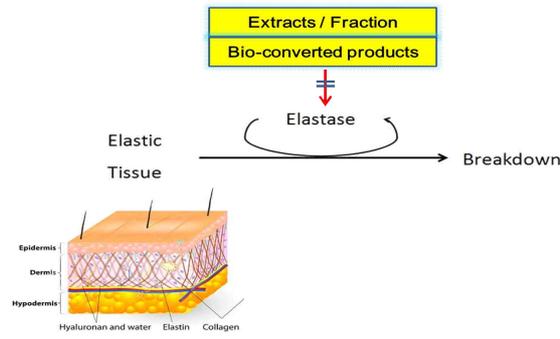
④ 미백 효능



㉢ Tyrosinase 억제 활성

- 반응은 인산나트륨 용액(pH 6.8) 0.5 mL, 10 mM L-DOPA 기질액 0.2 mL, 농도별 추출물 및 분획물 0.1 mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase(110 U/mL) 0.2 mL를 첨가함
- 10초간 진탕 혼합하고 25°C 에서 2분간 반응시킨 후 생성된 DOPA chrome을 475 nm에서 측정함
- Tyrosinase 억제 활성은 시료 용액 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타냄

⑤ 주름개선 효능



㉠ Elastase 억제 활성

- Porcine pancreas elastase 저해 활성 측정은 기질로서 N-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide를 사용하여 37°C 에서 30분간 3-p-nitroanilide의 생성량을 측정함
- 농도별 추출물 및 분획물 0.1 mL를 시험관에 옮긴 후 50 mM Tris-HCl 용액(pH8.6)에 녹인 elastase와 pancreatic solution Type I(porcine Pancreas, 0.6 units/mL) 용액 0.05 mL을 첨가
- 50 mM Tris-HCl 용액(pH.8.6)에 녹인 기질 N-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide(1 mg/mL) 0.1 mL를 첨가하고 30분간 반응시켜 410 nm에서 흡광도를 측정함
- Elastase 억제 활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타냄

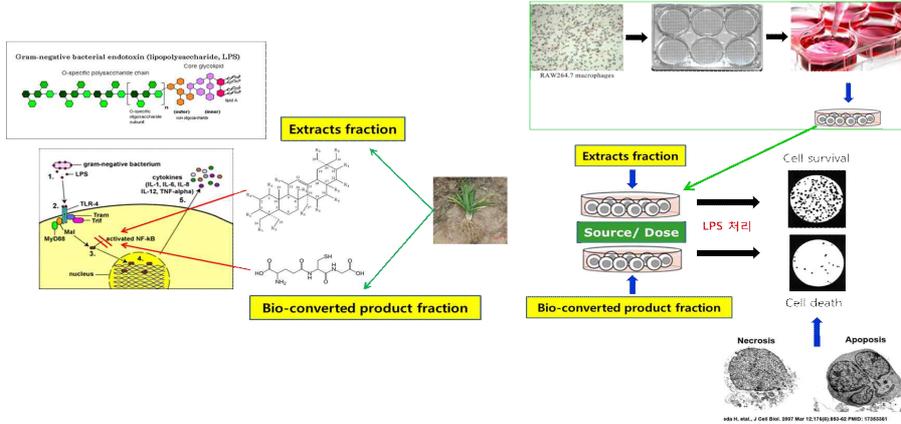
㉡ Collagenase 억제 활성

- 반응구는 4 mM CaCl<sub>2</sub> 를 첨가한 100 mM Tris-HCl 용액(pH7.5)에 농도별 추출물 및 분획물 0.1 mL와 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-pro-Leu-Gly-Pro-Arg (0.3 mg/mL)를 녹인 기질액 0.25 mL를 첨가함
- 반응을 정지시킨 후, ethyl acetate 1.5 mL를 첨가하고 상등액을 320 nm에서 흡광도를 측정함

(5) 대상식물 추출물 및 발효산물의 분획물을 처리한 세포의 *in vitro* 효능 평가

① 조추출물, 분획물 및 발효물 시료 처리 세포의 항염증 효능 검증

항염증 효능 평가 (*in vitro* anti-inflammation effect)



㉠ 세포 배양

- RAW 264.7 세포를 DAEM 배지(+ 10% FBS, 1% streptomycin-penicillin)에 배양
- 세포가 80% 이상 성장하면 PBS로 세척 후 cell scraper를 사용하여 계대배양

㉡ LPS 처리

- 100 uL(10,000 세포/well)의 세포부유액을 96 well plate에 분주함
- CO<sub>2</sub> 배양기 안에서 4시간 동안 전 배양을 한 후 50, 100, 200, 300, 300, 500 ug/mL 농도의 조사포닌 및 정유를 각각 2 μg/mL 농도의 LPS를 10% FBS가 함유된 DAEM 배지와 함께 20 시간 배양함
- 배양 후 각 well에 10 μL의 CCK-8 용액을 첨가함
- 2 시간 동안 CO<sub>2</sub> 배양기 안에서 반응시킨 후 microplate reader를 사용하여 450 nm에서 흡광도 측정함

㉢ Macrophage 세포에서의 항염증 효능 검토 및 세포사멸 억제 효과 측정

- LPS로 염증이 유도된 RAW 264.7 세포를 통해 대상식물 추출물의 분획물을 처리한 후 항염증 및 세포 사멸 억제 효과를 평가

㉣ Nitric Oxide의 측정

- Cytokine에 의하여 대식세포가 발생하는 nitrite를 측정하기 위하여 Griess 반응을 이용함
- 이 방법은 Griess 시약의 diazogi가 nitrite를 만나면 분홍색으로 변색함을 이용함
- 배양 상층액 100 μL를 96 well plate에 분주한 후, 여기에 동량의 Griess 시약을 넣어 상온의 어두운 곳에서 10분간 반응 시킨 후 microplate reader를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정함
- nitrite 농도는 sodium nitrite를 사용하여 얻은 표준 직선과 비교하여 산출함

㉤ 세포 생존능의 측정: MTT

- 미토콘드리아내 효소인 succinate-dehydrogenase에 의해 MTT가 formazan으로 전환하는데 세포의 성장이 멈추거나 세포가 죽으면 formazan의 생성이 줄어들게 되는 것을 이용함
- 먼저 세포를 2.5 X 10<sup>4</sup>/well을 96 well plate 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 12시간 동안 배양. 배양한 세포를 5 mg/mL의 MTT용액 10 μL 각 well에 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 2-4시간 동안 배양함

- 배양 후 배양액을 버리고 DMSO 100  $\mu$ L씩 넣어 formazan을 용해한 후, microplate reader로 550 nm에서 흡광도를 측정함

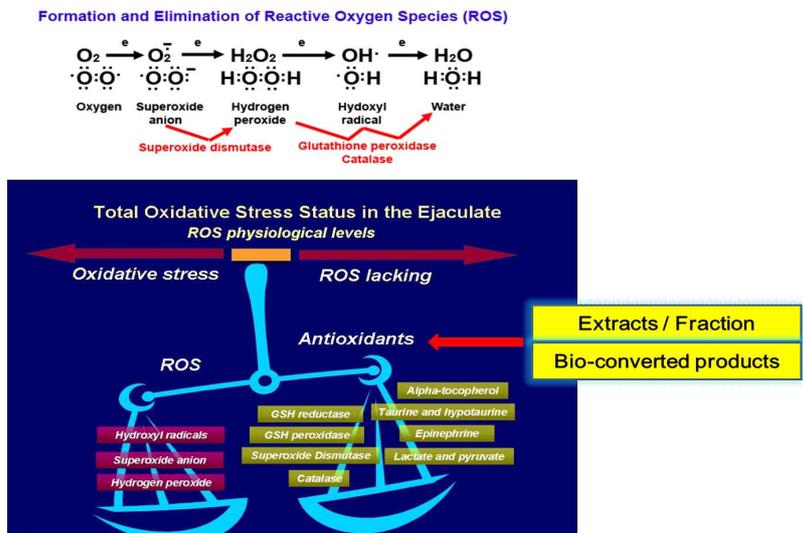
㉠ 사이토카인 측정

- 세포 배양 후 각 well에서 회수된 상층액으로부터 IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 함량을 Mouse IL-6 ELISA kit와 Mouse TNF- $\alpha$  ELISA kit를 사용하여 흡광도를 측정함
- 표준곡선을 바탕으로 생성량 계산함

㉡ Total RNA 추출 및 real-time RT-PCR

- IL-6
- TNF- $\alpha$
- COX-2
- iNOS

② 조추출물, 분획물 및 발효물 시료 처리 세포의 항산화 효능 검증



㉢ 염증세포 내 CAT 활성 측정

- 각 분획물이 염증세포 내 CAT 활성에 미치는 영향을 시그마社의 분석키트를 사용하여 측정함
- Eppendorf 튜브에 시료를 첨가하여 인산염완충용액으로 전체 75  $\mu$ L가 되게 하여 비색분석을 위한 기질용액 25  $\mu$ L를 첨가한 후, 각각의 튜브를 혼합한 다음 실온에서 5분 방치하여 정지 용액 900  $\mu$ L를 첨가함
- 이 중 10  $\mu$ L를 취하여 새로운 Eppendorf 튜브로 옮겨 발색용액 1 mL 첨가하고 역전하여 혼합한 후 15분 실온에서 방치한 다음 520 nm에서 흡광도 측정함

㉣ 염증세포 내 SOD 활성 측정

- 각 분획물이 염증세포 내 SOD 활성에 미치는 영향을 시그마社의 분석키트를 사용하여 측정함
- 96-well plate에 시료와 정해진 양의 각 용매를 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 방치한 다음 450 nm에서 흡광도 측정함

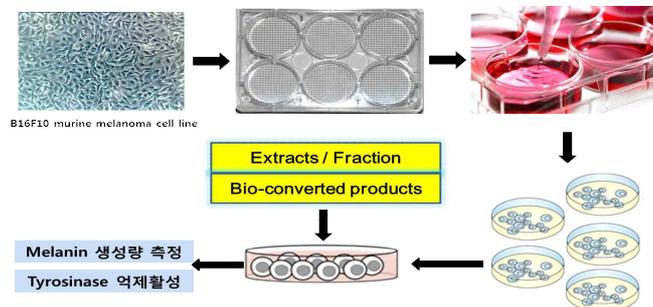
㉞ 염증세포 내 GPx 활성 측정

- 각 분획물이 염증세포 내 GPx 활성에 미치는 영향을 시그마社의 분석키트를 사용하여 측정함
- Eppendorf 튜브에 하기와 같이 정해진 양의 각 용매를 첨가하고, 각각의 튜브를 역전하여 섞어준 다음 340 nm에서 10초 간격으로 총 6번 흡광도 측정함

㉟ 염증세포 내 GST 활성 측정

- 각 분획물이 염증세포 내 GST 활성에 미치는 영향을 시그마社의 분석키트를 사용하여 측정함
- Eppendorf 튜브에 기질용액 1 mL에 각각 시료 2  $\mu$ L를 첨가하거나, 효소 보정군에 GST control 2  $\mu$ L를 첨가한 후 역전하여 섞어준 다음 340 nm에서 30초 간격으로 총 9번 흡광도 측정함

③ 조추출물, 분획물 및 발효물 시료 처리 세포의 미백 효능 검증



㉠ 멜라닌 생성량 측정

- 처리 세포주: B16F10 murine melanoma cell line
- 6-well plate에  $2 \times 10^5$  cell/well 로 접종한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 동안 배양함
- 배지를 제거하고 농도별 분획물이 함유된 배지로 교체한 후 48시간 동안 배양함
- 그 후 배지를 제거한 세포를 PBS로 2번 세척하고, 0.1% (w/v) Triton X-100을 함유한 20 mM Tris (pH 7.58) 100 $\mu$ l를 넣고 -80°C에서 30분 용해시킴
- 세포용해액에 동일한 양의 20% TCA를 첨가하여 침전시킨 후 12000 rpm에서 30분 동안 원심 분리하여 침전물을 획득함
- 침전물을 10% TCA로 2회 세척한 후 ethanol : diethyl ether (3: 1, v/v) 및 diethyl ether를 차례로 처리함
- 침전물을 공기건조 후 0.85 M KOH에 현탁하고 15분간 가열 후 냉각시켜 멜라닌 정량에 사용함
- microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정함

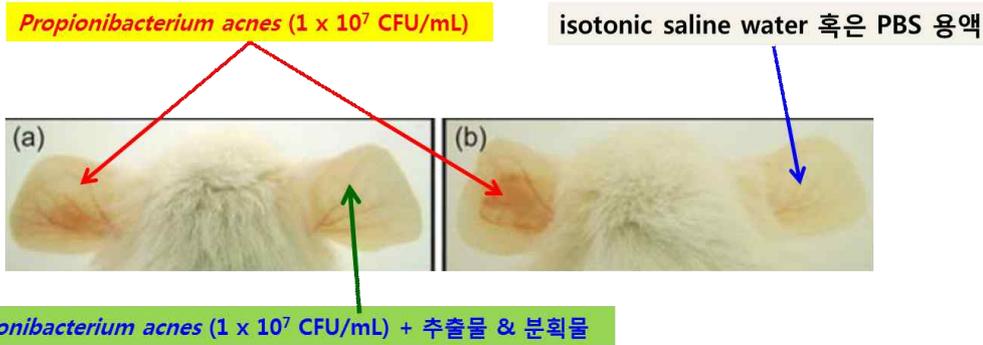
㉡ Tyrosinase 억제 활성

- PBS로 2번 세척한 세포용해액에서 DOPA가 DOPACHrome으로 전환하는 것을 475 nm 흡광도를 측정함
- 반응액은 새로 준비한 100  $\mu$ L 기질용액(0.1% L-DOPA를 함유한 100 mM 인산나트륨 용액, pH 6.0)에 50  $\mu$ L mushroom tyrosinase(110 U/mL)를 첨가함

- 10초간 진탕 혼합하고 37°C에서 2분간 반응시킨 후 생성된 DOPA chrome을 측정함
  - ④ Tyrosinase 억제 활성은 시료 용액 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타냄

(6) 대상식물 추출물 및 발효산물의 *in vivo* 효능 평가

① 항여드름균 효능



① 실험동물 모델

- SD rats 귀에 접종(intradermal injection) 혹은 ICR 마우스

② 여드름균 접종

- *Propionibacterium acnes* 1 x 10<sup>7</sup> CFU/mL

- 음성대조구 : isotonic saline water

- ③ 추출물 및 분획물 처리 : 여드름균 접종 30분 후 농도별로 귀의 전면과 후면 접종

④ 염증 억제 반응

- 귀 조직학적 관찰(Light Microscopy) : 처리 10일 후 접종부위를 절단하여 formalin fixation, section 및 staining(hematoxylin과 eosin)

- 염증 두께 측정 : 시간별(1, 3, 5, 7, 10일) 및 농도별

⑤ 여드름균 살균활성

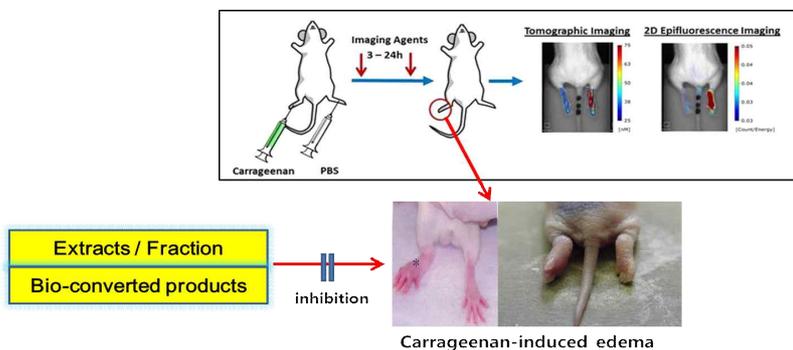
- 귀 8 mm punching을 하여 조직 마쇄액을 고체배지에 접종 72시간 후 박테리아 농도 측정

⑥ 항체 형성 확인

- western blot 및 ELISA법으로 IgG 관련 생성능 측정함

- FACS를 이용한 CD4+, CD8+ 림프구에 대한 활성화를 확인함

② 항염증 효능



㉠ 급성염증 동물모델 확립

- 수컷 SD rat(체중 170-180 g)
- 부종(edema) 유발 물질인 0.5 혹은 1%(PBS 용액) 카라기난(carrageenan) 0.1 혹은 0.05 mL 을 앞발의 밑창에 주사함
- 부종 유도 후 즉시 추출물, 발효산물 및 분획물 투여함
- 경구투여
- 각 시료 농도별 0.1 mL을 앞발의 밑창에 주사함(대조구: saline 투여)
- 시간별로 부종 크기 측정함

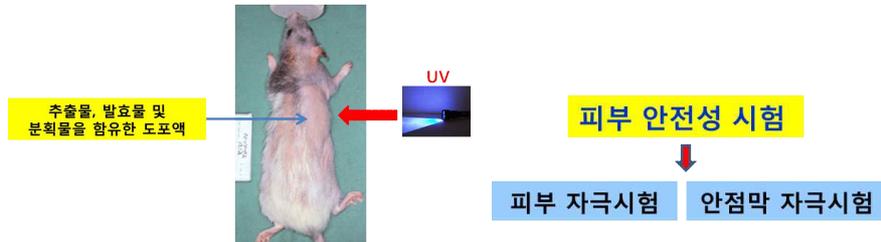
㉡ 유효물질의 염증유발 동물모델에서 입증

- 염증 유도 동물모델에서 효과를 확인하기 위하여 western blot 및 ELISA법으로 JAK/STAT pathway를 경유한 Th1, Th2 cell 활성화 및 IgG 관련 생성능 측정함
- 그리고 FACS를 이용한 CD4+, CD8+ 림프구에 대한 활성화를 확인함으로써 염증관련 동물모델을 분석 및 확립

㉢ 염증유발 동물모델의 혈액 채취 및 림프구 분리

- 혈액 채취 후 원심으로 serum을 분리한 후 ELISA법으로 cytokine과 항체를 측정함
- 분획물의 항염증 효과 규명: 상기의 *in vitro* 실험과 동일한 방법으로 분석함

③ 열수추출물, 냉수추출물 및 발효액 시료 함유 도포액의 효능 평가



㉠ 실험동물 : rat, hairless(nude) mouse 혹은 토끼

- 주령: 6주령 동물을 분양받아 1주일간 사육실에서 적응시킨 후 실험 전 기간 동안 사료와 물은 자유로이 공급함
- 모든 실험동물은 시험전 1주간 검역기간을 거쳐 건강한 동물만 실험에 사용함

㉡ 사육조건

- 온도  $22 \pm 2^\circ\text{C}$
- 상대습도  $60 \pm 5\%$
- 조명주기 12시간씩 명암을 유지함
- 실험동물은 실험 4주째 되는 날 에테르로 마취한 후 피부를 적출한 후 일부는 10% 중성 포르말린 용액에 고정하여 조직학적 검사에 사용하고 나머지는 냉동 보관하여 효소활성 측정에 사용함

㉢ 실험군

- 정상군, 양성대조군, 음성대조군 및 실험군으로 나누어 실험함
- 실험군은 농도별 처리

㉔ 피부처리

- 도포액의 조제
- 도포액의 기본로션은 에탄올, 프로필렌글리콜과 증류수를 각각 일정 비율로 혼합함
- 대조군 도포액은 기본 로션으로, 실험군 도포액은 공시시료를 농도별 정제수 혹은 Polyol 또는 극성 오일에 녹여 조제함

㉕ 인공색소반 제작 및 시료도포

- 실험동물은 실험 8주째 되는 날 염산 케타민으로 마취한 후 시료를 도포한 인공색소반 부위를  $\phi 12\text{mm}$ 의 biopsy punch로 절취하여 10%의 중성 포르말린 용액에 24시간 실온에서 고정한 후 조직학적 관찰에 사용함
- 실험동물 등부위를 animal clipper를 이용하여 털을 깎고 면도기로 깨끗이 면도한 후 염산 케타민 (100 mg/kg 체중)으로 마취한 다음, 자외선 조사 부위( $\phi 12\text{ mm}$ )에 원형으로 뚫은 가죽천을 접착시킨 후 302 nm의 UVB를 방출하는 sunlamp를 사용하여 자외선을 조사함
- 자외선은 1회 500 mL/cm<sup>2</sup> 광량으로 주 1회, 3주간 연속으로 총 1,500 mL/cm<sup>2</sup> 조사함
- UVB 조사에 의해 유발된 인공색소반에 시료를 도포하는 시점은 색소침착 안정화를 위해 마지막 자외선을 조사한 10일 후부터 실험군은 시료 용매를, 양성대조군은 2% 하이드로퀴논을 1일 2회, 주 5일, 매회 30  $\mu\text{L}$  (0.53mg/cm<sup>2</sup>)씩 micro pipette을 이용하여 8주간 도포함

㉖ 관찰

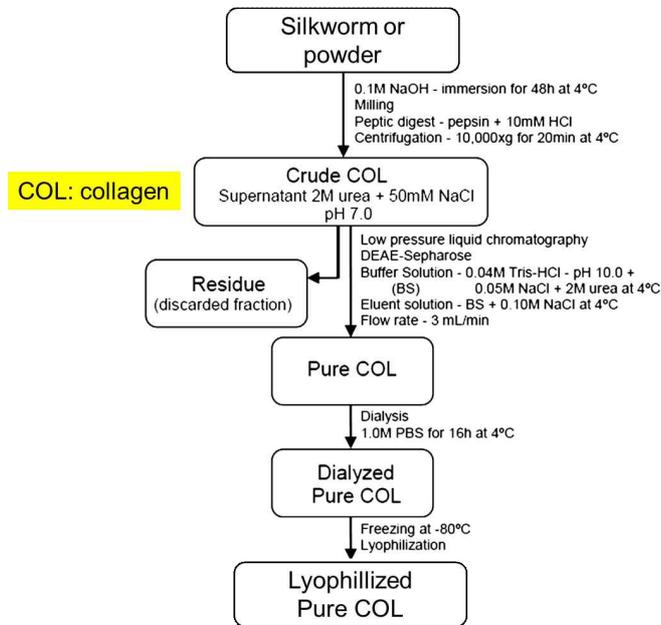
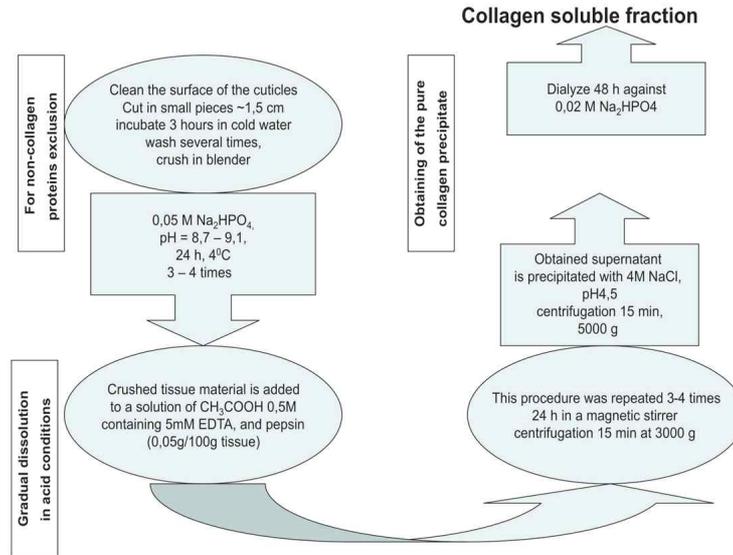
- 육안적 관찰 및 기기 평가
- 시료도포전과 도포 시작 후 매주 1회, 8주 동안 실험동물 피부의 색소침착 상태를 대조군, 시료 도포군의 도포 부위에 대해 육안적으로 관찰함
- 상대적 미백 효능을 비교·분석하고, 피부표면 색소침착 정도를 디지털 카메라로 촬영함

㉗ 피부의 조직학적 관찰

- Hematoxylin-Eosin(H&E) 방법을 사용하여 조직학적 변화를 관찰함
- 절취한 피부조직을 실온에서 10% 중성 포르말린 용액에 24시간 고정한 후 통상적인 방법으로 수세, 탈수, 투명, 침투과정을 거친 후 paraffin에 코팅하고 4  $\mu\text{m}$  두께로 절편을 만들어 H&E 염색 후 광학현미경으로 피부조직의 변화 양상을 관찰함

## 2. 돼지콜라겐 대체 소재 개발

### (1) 생선 콜라겐 추출



① 생선비늘 콜라겐 및 그 발효물 유래 펩타이드의 독성 및 *in vitro* 활성

② 세포독성 및 주름발현 저해 활성

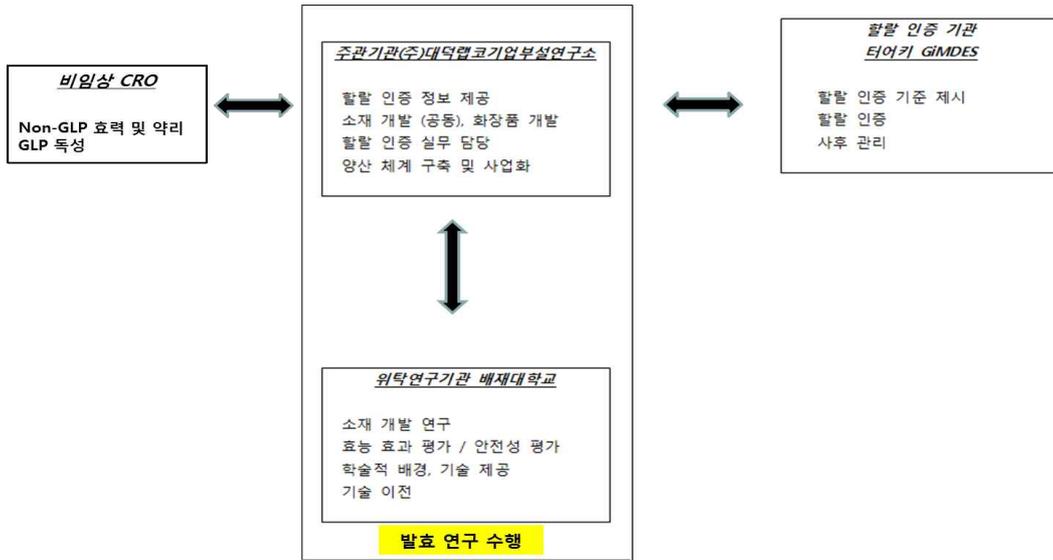
- human dermal fibroblasts CCD-986sk를 배양시점에 콜라겐 펩타이드를 투여하고 MTT 시약을 이용하여 세포 생존율을 측정함
- CCD-986sk를 배양하여 UVA 조사 후 matrix metalloproteinase-1(MMP-1)의 발현량을 조사하여 주름 발현 저해 활성을 측정함

③ 콜라겐 type I 생성량 측정

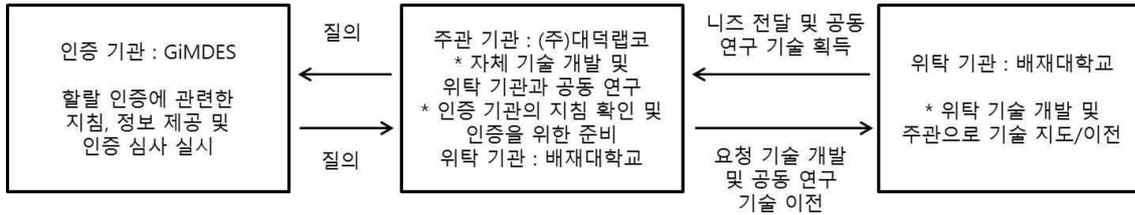
- 배양한 CCD-986sk에 콜라겐 펩타이드를 농도별로 함유한 배지를 첨가함
- 24시간 배양 후 생성된 procollagen type I c-peptide를 ELISA로 정량함

## 2-2. 연구개발 추진 체계

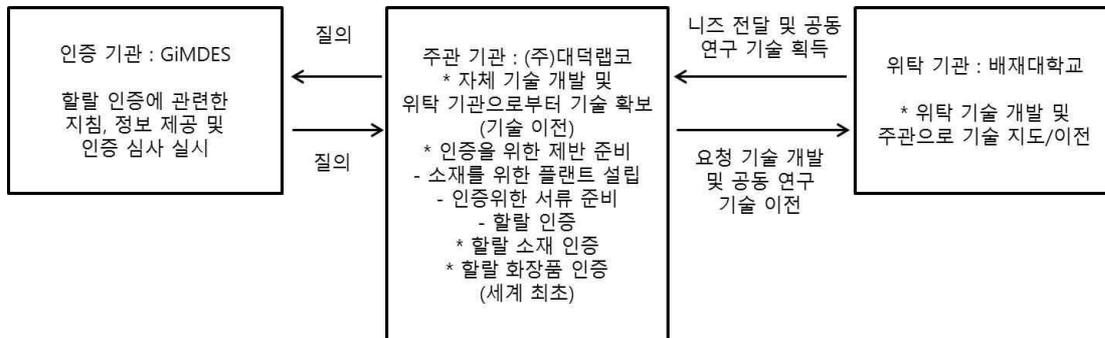
### [총괄]



### [1-2차년도]



### [3차년도]



| 연구개발과제 |                         | 총 참여 연구원               |
|--------|-------------------------|------------------------|
| 과제명    | 국내 농산자원을 활용한 할랄 향장제품 개발 | 주관연구책임자<br>(전현표)외 총 6명 |

| 기관별 참여 현황 |       |        |
|-----------|-------|--------|
| 구분        | 연구기관수 | 참여연구원수 |
| 대기업       |       |        |
| 중견기업      |       |        |
| 중소기업      | 1     | 6      |
| 대학        | 1     | 26     |
| 국공립(연)    |       |        |
| 출연(연)     |       |        |
| 기타        |       |        |

|   |
|---|
| 주관연구기관명: (주)대덕랩코 기업부설연구소  |
| 과제명: 국내 농산자원을 활용한 할랄 향장제품 개발  |
| 연구책임자명<br>(전현표)외<br>6명  |
| 담당기술개발내용  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내 자생 농산물을 이용한 할랄 적합 화장품용 소재 개발함에 있어서 할랄 적합 기술 개발</li> <li>- 상기 개발 소재의 다양한 효능 평가</li> <li>- 상기 소재를 활용한 할랄 적합 화장품 처방 개발</li> <li>- 상기 개발 소재 및 화장품의 할랄 인증 획득</li> <li>- 상기 소재의 ICID 등재</li> <li>- 상기 개발 화장품의 KFDA 기능성 화장품 획득</li> <li>- 할랄 인증이 가능한 대체 콜라겐 기술 개발</li> </ul> |

|   |
|---|
| (주)대덕랩코 기업부설연구소   |
| 국내 농산자원을 활용한 할랄 향장제품 개발   |
| 연구책임자명<br>(전현표)외<br>6명  |
| 담당기술개발내용  |
| <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 자체 기술 개발 및 위탁기관으로부터 기술 확보</li> <li>2. 할랄 인증 기준 확보 및 위탁 기관과 공유</li> </ol> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 소재 개발을 위한 연구 설비 및 Pilot Test 설비 확립</li> <li>- 소재 개발 및 할랄 인증</li> <li>- 화장품 처방 개발 및 할랄 인증</li> <li>- 개발 소재의 ICID 인증</li> <li>- 개발 화장품의 KFDA 기능성화장품 인증</li> </ul> |

|   |
|---|
| 배재대학교   |
| 국내 농산자원을 활용한 할랄 화장품 소재 개발 및 효능평가  |
| 연구책임자명<br>(최창원)외<br>23명   |
| 담당기술개발내용  |
| <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 할랄 인증을 위한 농수산물원의 추출법 및 발효법을 확립한 후 추출물 및 발효물의 항산화, 항균, 미백, 주름개선 <i>in vitro</i> 효능 및 안전성을 검증</li> <li>2. cell-based 효능평가를 통한 항산화, 항균, 미백 및 주름개선 향장소재 개발</li> <li>3. 실험동물 모델을 통한 항균, 및 항염증 검증</li> </ol> <ol style="list-style-type: none"> <li>3. 돼지 콜라겐을 대체하기 위한 기술을 개발하기 위해 생선 비늘을 대상으로 콜라겐 분리정제 및 발효를 이용한 콜라겐 펩타이드 생산 기술을 개발</li> </ol> |

[첨부] 터키 짐데스와의 협업 관련 문서



14.07.2015

To whom it may concern,

GIMDES is an independent, non-profit, voluntary association established in Istanbul in 2005.

Mission of GIMDES is to promote Halal in public in Turkey and abroad and teach people what is Halal and Tayyib (healthy) in terms of Islam.

Although most of the academic discourse on Halal and Haram concentrates on foods and beverages, cosmetic products are also associated with debates on the hazardous effects resulting from the consumption of the products, the insertion of the debated ingredients of GMO(Genetically Modified Organism) within the production process, and the undisclosed non-halal ingredients.

For this reason, GIMDES along with Dr. Hun Pyo Jhun as a team is planning to work jointly to make "Halal Raw materials dictionary" for Halal Cosmetics consumers and industry to give a health, legal and religious basis of raw materials status from the perspective of Islam in a more comprehensive manner.

If you need further information, please don't hesitate to contact with us.

Best regards,

Dr. Hüseyin Kami Büyükozer

GIMDES President

WHC Patron

## 2-3. 연구개발 추진 일정

### [1차년도]

| (1)차년도   |   |       |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |                          |                   |               |
|----------|---|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|--------------------------|-------------------|---------------|
| 일련<br>번호 | 연구내용  | 추진 일정 |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    | 연구<br>개발비<br>(단위:<br>천원) | 책임자<br>(소속<br>기관) |               |
|          |   | 1     | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |                          |                   |               |
| 1        | 할랄 인증이 가능한<br>식물 추출물 추출<br>방법 개발 자체 연구<br>및 위탁<br>기관으로부터 기술<br>전수         | ■     | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■                        | 2,000             | 전현표<br>(대덕랩코) |
| 2        | 표준화 작업 및 시험<br>기준 정립<br>(위탁 기관과 공동<br>연구 및 기술 이전)                         |       |   |   |   |   |   |   | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■                        | 3,000             | 전현표<br>(대덕랩코) |
| 3        | 개발된 추출물의<br>효능 평가 결과 확보<br>(위탁 기관과 공동<br>연구 및 기술 이전)                      |       |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    | ■  | ■                        | 2,000             | 전현표<br>(대덕랩코) |
| 4        | 대체 콜라겐 기술<br>개발(위탁 기관과<br>공동 연구 및 기술<br>이전)                               | ■     | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■                        | 3,000             | 전현표<br>(대덕랩코) |
| 5        | 개발된 추출물 등이<br>함유된 할랄 인증에<br>적합한 화장품 처방<br>개발                              | ■     | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■                        | 25,000            | 전현표<br>(대덕랩코) |
| 6        | 개발된 추출물 등이<br>함유된 할랄 인증에<br>적합한 화장품 처방<br>개발                              |       |   |   |   |   |   |   | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■                        | 25,000            | 전현표<br>(대덕랩코) |
| 7        | 할랄 인증 (화장품<br>소재, 화장품)을 위한<br>기초 작업 실시(인증<br>신청 및 인증은<br>3차년도에 실시<br>예정)  |       |   |   |   |   |   |   |   |   |    | ■  | ■  | ■                        | 20,000            | 전현표<br>(대덕랩코) |
| 8        | 할랄 화장품 소재의<br>할랄 인증을 위한<br>제조 공장 설치 준비<br>(인증 신청 및 인증은<br>3차년도에 실시<br>예정) |       |   |   |   |   |   |   |   |   |    | ■  | ■  | ■                        | 40,000            | 전현표<br>(대덕랩코) |
| 9        | 50종 식물 선정 및<br>열수추출물,<br>냉수추출물, 발효물<br>생산                                 | ■     | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■                        | 6,000             | 최창원<br>(배재대)  |
| 10       | 성분분석  |       |   |   |   |   |   | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■                        | 6,000             | 최창원<br>(배재대)  |
| 11       | 항산화 효능 탐색   |       |   |   |   |   |   |   |   | ■ | ■  | ■  | ■  | ■                        | 6,000             | 최창원<br>(배재대)  |
| 12       | 항균 효능 탐색  |       |   |   |   |   |   |   |   | ■ | ■  | ■  | ■  | ■                        | 3,000             | 최창원<br>(배재대)  |
| 13       | 미백 및 주름개선<br>효능 탐색  |       |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    | ■  | ■                        | 4,160             | 최창원<br>(배재대)  |

[2차년도]

| (2)차년도   |   |       |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |                          |                   |       |              |       |              |
|----------|---|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|--------------------------|-------------------|-------|--------------|-------|--------------|
| 일련<br>번호 | 연구내용  | 추진 일정 |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    | 연구<br>개발비<br>(단위:<br>천원) | 책임자<br>(소속<br>기관) |       |              |       |              |
|          |   | 1     | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |                          |                   |       |              |       |              |
| 1        | 할랄 인증이 가능한<br>식물 추출물 추출<br>방법 개발 자체 연구<br>및 위탁<br>기관으로부터 기술<br>전수         |       |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    | 2,000                    | 전현표<br>(대덕랩코)     |       |              |       |              |
| 2        | 표준화 작업 및 시험<br>기준 정립<br>(위탁 기관과 공동<br>연구 및 기술 이전)                         |       |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    | 3,000                    | 전현표<br>(대덕랩코)     |       |              |       |              |
| 3        | 개발된 추출물의<br>효능 평가 결과 확보<br>(위탁 기관과 공동<br>연구 및 기술 이전)                      |       |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    | 2,000                    | 전현표<br>(대덕랩코)     |       |              |       |              |
| 4        | 대체 콜라겐 기술<br>개발(위탁 기관과<br>공동 연구 및 기술<br>이전)                               |       |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    | 3,000                    | 전현표<br>(대덕랩코)     |       |              |       |              |
| 5        | 개발된 추출물 등이<br>함유된 할랄 인증에<br>적합한 화장품 처방<br>개발                              |       |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    | 25,000                   | 전현표<br>(대덕랩코)     |       |              |       |              |
| 6        | 개발된 추출물 등이<br>함유된 할랄 인증에<br>적합한 화장품 처방<br>개발                              |       |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    | 25,000                   | 전현표<br>(대덕랩코)     |       |              |       |              |
| 7        | 할랄 인증 (화장품<br>소재, 화장품)을 위한<br>기초 작업 실시(인증<br>신청 및 인증은<br>3차년도에 실시<br>예정)  |       |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    | 20,000                   | 전현표<br>(대덕랩코)     |       |              |       |              |
| 8        | 할랄 화장품 소재의<br>할랄 인증을 위한<br>제조 공장 설치 준비<br>(인증 신청 및 인증은<br>3차년도에 실시<br>예정) |       |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    | 40,000                   | 전현표<br>(대덕랩코)     |       |              |       |              |
| 9        | cell-based 항염증<br>효능평가  |       |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    | 6,000                    | 최창원<br>(배재대)      |       |              |       |              |
| 10       | cell-based 항산화<br>효능평가  |       |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |                          |                   | 6,000 | 최창원<br>(배재대) |       |              |
| 11       | cell-based 미백<br>효능평가   |       |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |                          |                   |       |              | 6,000 | 최창원<br>(배재대) |
| 12       | 누에 콜라겐<br>추출법 확립  |       |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    | 3,000                    | 최창원<br>(배재대)      |       |              |       |              |
| 13       | 누에 콜라겐<br>분리정제 및 분석   |       |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    | 4,160                    | 최창원<br>(배재대)      |       |              |       |              |

[3차년도]

| (3)차년도   |  |                |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |                          |                   |
|----------|--|----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|--------------------------|-------------------|
| 일련<br>번호 | 연구내용   | 추진 일정          |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    | 연구<br>개발비<br>(단위:<br>천원) | 책임자<br>(소속<br>기관) |
|          |  | 1              | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |                          |                   |
| 1        | 할랄 인증이 가능한<br>식물 추출물의 선정<br>및 제조 기술 정립<br>(자체 &<br>위탁기관으로부터<br>기술 이전 통해) | [Progress Bar] |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    | 1,000                    | 전현표<br>(대덕랩코)     |
| 2        | 표준화 작업 및 시험<br>기준 정립<br>(자체 & 기술 이전)                                     | [Progress Bar] |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    | 1,000                    | 전현표<br>(대덕랩코)     |
| 3        | 선정된 추출물의<br>표준품 제조<br>(1차 생산 완료)   | [Progress Bar] |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    | 10,000                   | 전현표<br>(대덕랩코)     |
| 4        | 추출물 생산 설비<br>(Pilot Test 스케일)<br>완료                                      | [Progress Bar] |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    | 23,000                   | 전현표<br>(대덕랩코)     |
| 5        | 할랄 인증 가능<br>콜라겐 제조 기술의<br>기술 이전  | [Progress Bar] |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    | 25,000                   | 전현표<br>(대덕랩코)     |
| 6        | 개발된 추출물 등이<br>함유된 할랄 인증에<br>적합한 화장품 처방<br>개발                             | [Progress Bar] |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    | 20,000                   | 전현표<br>(대덕랩코)     |
| 7        | 할랄 인증 완료<br>(상기 추출물을<br>함유한 화장품 처방)                                      | [Progress Bar] |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    | 10,000                   | 전현표<br>(대덕랩코)     |
| 8        | 상기 할랄 인증<br>화장품의 시제품<br>제작 (Pilot Test)                                  | [Progress Bar] |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    | 30,000                   | 전현표<br>(대덕랩코)     |
| 9        | in vivo 항염증<br>효능평가  | [Progress Bar] |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    | 7,000                    | 최창원<br>(배재대)      |
| 10       | in vivo 항산화<br>효능평가  | [Progress Bar] |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    | 3,000                    | 최창원<br>(배재대)      |
| 11       | in vivo 미백<br>효능평가   | [Progress Bar] |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    | 14,000                   | 최창원<br>(배재대)      |
| 12       | 제형화 및 도포액<br>효능 및 안전성 시험   | [Progress Bar] |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    | 4,460                    | 최창원<br>(배재대)      |

## 2-4. 연구내용 및 결과

### 1. 연구성과 요약표

| 세부과제명  | 대표 연구 성과  |
|--|---|
| <p>[대덕랩코]<br/>국내 농산 자원을 활용한<br/>할랄 향장제품 개발</p>               | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 할랄 기준 제조 공정 구축</li> <li>- 할랄 화장품 원료 13종 개발</li> <li>- 터키 짐데스(GiMDES) 할랄 화장품 원료 8종 인증 획득</li> <li>- ICID 화장품 원료 2종 등재</li> <li>- 할랄 화장품 115종 인증 획득</li> <li>- KFDA 기능성화장품 15종 인증 획득</li> <li>- 1.64억원 매출 및 6건 수출 계약 실시</li> </ul> |
| <p>[배재대학교]<br/>국내 농산 자원을 활용한<br/>할랄 화장품 소재 개발 및<br/>효능평가</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내 특허 2건 등록 및 9건 출원</li> <li>- SCI급 논문 1편 게재(Molecules/IF : 3.098)</li> </ul>  |

2. 연구결과 요약표

| 구분<br>(연도)         | 세부과제명   | 세부연구목표   | 연구개발 수행내용   | 연구결과   |
|--------------------|---|--|---|--|
| 1차<br>년도<br>(2015) | [세부과제]<br>국내 농산<br>자원을 활용한<br>할랄 향장제품<br>개발             | 주관기관에서<br>기획특한<br>정보를<br>바탕으로<br>실험계획<br>수립      | 주관기관과<br>위탁기관과의<br>연구회의를 통해 할랄<br>적합 추출방법 모색  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 추출물 제조시 에탄올 배제</li> <li>- 보다 높은 유효 성분 용출을 위하여 다양한 폴리올 성분을 혼합 사용. 단, 피부 자극을 유발할 수 있는 Propylene, Propandiol 류는 배제 (할랄 비허용 성분)</li> <li>- IPA의 사용을 검토하였으나 특이취로 인하여 사용하지 못함</li> <li>- 보다 높은 유효 성분 용출을 위하여 Non-POE계 계면활성제의 배합을 검토</li> <li>- 추출물의 방부 시스템은 할랄 인증에서 허락되지 않는 파라벤류 등 합성 방부제는 배제. 대신 살균, 방부력을 갖는 식물추출물의 배합과 폴리올계 성분을 적절히 혼합하여 방부 시스템 구성 (실험 진행 중)</li> <li>- 방부 시스템은 모든 추출물에 있어서 방부력 테스트와 안전성 테스트를 병행 실시 예정</li> </ul> |
|                    |   | 세부사용물질<br>에대한<br>할랄인증기관<br>의 의견청취<br>및<br>사전인증획득 | 기존 할랄 화장품 연구<br>결과와 화장품 연구<br>경험을 토대로 대상<br>식물체, 추출부위 등에<br>대하여 검색.<br>터어키 할랄 인증<br>기관을 방문하여 본<br>과제에 대하여 설명하고<br>의견 청취 | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 기본적으로 식물체인 국내 농산 자원은 할랄 소재로서 적합함</li> <li>- 단, 유전자변형식물은 제외</li> <li>- 잔류농약검사결과 및 중금속 검사 시행할 것</li> <li>- 추출 과정에 있어 에탄올, 동물유래성분, 효소, 동물유래폴리올(글리세린 등)의 사용을 금지할 것</li> <li>- 추출이 완료된 후 전 추출 공정을 보고할 것.</li> <li>- 추출 과정에 사용된 성분의 Spec., 오리진, 제조공정을 제출할 것</li> <li>- 추출된 모든 완성품에 대하여 DNA 검사를 실시할 것</li> <li>- 추출된 모든 완성품의 샘플을 인증 기관으로 보내어 현지에서 최종 분석을 실시할 것. (비용은 신청기업지불)</li> </ul>  |
|                    | [위탁과제]<br>국내 농산<br>자원을 활용한<br>할랄 화장품<br>소재 개발 및<br>효능평가 | 국내농산자원<br>중에서후보물<br>질선정 (2배수<br>이상)              | 과제 신청시 계획한<br>모든 식물체에 대하여<br>기본적으로 사용 허가.   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 상기 할랄 조건에 준하여 실험 진행 (1차년도 : 물을 이용한 추출법 시행)</li> </ul>   |
|                    |   | 할랄소재개발<br>(대체콜라겐)                                | 할랄 인증 기관<br>(터어키, GiMDES)에<br>서면 문의   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 누에, 불가사리 모두 적합하다는 의견.</li> </ul>  |
|                    |   | 국내농산자원<br>중에서후보물<br>질선정 (2배수<br>이상)              | 과제 신청시 계획한<br>모든 식물체에 대하여<br>기본적으로 사용 허가.   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 상기 할랄 조건에 준하여 실험 진행 (1차년도 : 물을 이용한 추출법 시행)</li> </ul>   |

|                    |   |   |   |  |
|--------------------|---|---|---|--|
| 1차<br>년도<br>(2015) | [위탁과제]<br>국내 농산<br>자원을 활용한<br>할랄 화장품<br>소재 개발 및<br>효능평가 | 할랄소재개발<br>(대체콜라겐)   | 할랄 인증 기관<br>(터어키, GiMDES)에<br>서면 문의   | - 누에, 불가사리 모두 적합하다는 의견.  |
|                    |   | 할랄화장품개발   | 위탁기관 추출물 및<br>주관기관 자체 추출한<br>추출물을 함유하는 할랄<br>적합 화장품 기초 처방<br>개발   | - 미백, 주름완화, 여드름 개선 및 보습 효과를<br>부여하기 위한 크림, 스킨 등 스킨케어<br>화장품 처방 개발. (10종)   |
|                    |   | 시료  | - 열수추출<br>- 냉수추출<br>- 유산균 발효<br>(1차년 표 1 참조)  | - 50종 열수추출물 확보<br>- 50종 냉수추출물 확보<br>- 50종 유산균 발효액 확보   |
|                    |   | 성분분석:<br>50종 시료의<br>열수추출물,<br>냉수추출물<br>및 발효물  | - 탄수화물<br>• Fehling 용액 시험<br>• Molisch's 시험<br>- 알칼로이드<br>• Dragendorff's 시험<br>• Mayer's 시험<br>• Wagner's 시험<br>- 플라보노이드<br>• Alkaline 시약 시험<br>- 단백질<br>• 가수분해 시험<br>- 탄닌<br>• 염화철 시험<br>(1차년 표 2, 3, 4, 5, 6,<br>7, 8, 9 참조) | - 50종 열수추출물 성분분석<br>- 50종 냉수추출물 성분분석<br>- 50종 유산균발효액 성분분석  |
|                    |   | 항산화 효능<br>탐색<br>( <i>in vitro</i> )   | - DPPH 라디칼 제거능<br>(1차년 표 10 참조)   | - 50종 열수추출물<br>• 억제활성 70% 이상: 2종<br>• 억제활성 70% 미만-50% 이상: 5종<br>• 억제활성 50% 미만: 43종<br>• 최고 80.4%: 황기<br>- 50종 냉수추출물<br>• 억제활성 70% 이상: 4종<br>• 억제활성 70% 미만-50% 이상: 1종<br>• 억제활성 50% 미만: 45종<br>• 최고 76.2%: 하눌타리<br>- 유산균 발효액<br>• 억제활성 70% 이상: 6종<br>• 억제활성 70% 미만-50% 이상: 5종<br>• 억제활성 50% 미만: 39종<br>• 최고 98.8%: 속썩음풀 |
|                    | - ABTS 라디칼 제거능<br>(1차년 표 11 참조)                         | - 50종 열수추출물<br>• 억제활성 70% 이상: 1종<br>• 억제활성 70% 미만-50% 이상: 2종<br>• 억제활성 50% 미만: 47종<br>• 최고 84.7%: 옥죽<br>- 50종 냉수추출물<br>• 억제활성 70% 이상: 5종<br>• 억제활성 70% 미만-50% 이상: 1종<br>• 억제활성 50% 미만: 44종<br>• 최고 98.7%: 창출<br>- 50종 유산균 발효액<br>• 억제활성 90% 이상: 3종<br>• 억제활성 50% 미만: 47종<br>• 최고 98.9%: 민들레 |   |  |

|                    |  |  |  |  |   |
|--------------------|--|--|--|--|---|
| 1차<br>년도<br>(2015) |  |  |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 억제활성 50% 미만: 47종</li> <li>• 최고 98.9%: 민들레</li> </ul>  |   |
|                    |  |  |  | <p style="text-align: center;">항균 효능<br/>탐색<br/>(<i>in vitro</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 디스크 확산법</li> <li>- 최소억제농도</li> <li>• 2종 그람음성균</li> <li>• 3종 그람양성균<br/><b>(1차년 표 12, 13, 14, 15, 16 참조)</b></li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 50종 열수추출물</li> <li>① 향대장균: 5종 활성</li> <li>• 최대: 매실나무(1.6x1.6 cm)</li> <li>② 항비브리오: 5종 활성</li> <li>• 최대: 산수유(1.2x1.1 cm)</li> <li>③ 항리스테리아: 1종 활성</li> <li>• 최대: 산수유(1.0x1.1 cm)</li> <li>④ 향포도상구균: 5종 활성</li> <li>• 최대: 산사나무(1.2x1.2 cm)</li> <li>⑤ 항여드름균: 10종 활성</li> <li>• 최대: 긴오이풀(3.4x3.5 cm)</li> </ul> |
|                    |  |  |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 50종 냉수추출물</li> <li>① 향대장균: 5종 활성</li> <li>• 최대: 산수유 및 매실(1.5x1.5 cm)</li> <li>② 항비브리오: 5종 활성</li> <li>• 최대: 오미자(1.3x1.4 cm), 매실(1.3x1.3 cm)</li> <li>③ 항리스테리아: 16종 활성</li> <li>• 최대: 매실나무(1.0x1.1 cm)</li> <li>④ 향포도상구균: 5종 활성</li> <li>• 최대: 매실나무(1.5x1.6 cm)</li> <li>⑤ 항여드름균: 10종 활성</li> <li>• 최대(3.1x3.2 cm): 긴오이풀 및 더덕</li> </ul> |   |
|                    | <p style="text-align: center;">미백 효능<br/>탐색<br/>(<i>in vitro</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- tyrosinase 억제활성<br/>(1차년 표 20참조)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 50종 유산균 발효액</li> <li>① 향대장균: 49종 활성</li> <li>• 최대: 매실나무, 산수유, 오미자(1.5x1.4 cm)</li> <li>② 항비브리오: 50종 활성</li> <li>• 최대: 대나무(1.4x1.6 cm), 오미자(1.4x1.5 cm), 향나무 (1.5x1.4 cm), 황기(1.5x1.4 cm)</li> <li>③ 항리스테리아: 9종 활성</li> <li>• 최대: 매실나무(1.1x1.3 cm)</li> <li>④ 향포도상구균: 49종 활성</li> <li>• 최대: 겨우살이(1.7x1.7 cm)</li> <li>⑤ 항여드름균: 32종 활성</li> <li>• 최대: 긴오이풀(2.8x2.9 cm) 및 옥수수(2.9x2.5 cm)</li> </ul> |  |  |   |
|                    |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 50종 열수추출물</li> <li>• 억제활성 90% 이상: 38종</li> <li>• 억제활성 90% 미만-80% 이상: 4종</li> <li>• 억제활성 80% 미만-60% 이상: 2종</li> <li>• 억제활성 33%: 1종</li> <li>• 억제활성 0%: 5종</li> </ul>   |  |  |   |
|                    |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 50종 냉수추출물</li> <li>• 억제활성 90% 이상: 17종</li> <li>• 억제활성 90% 미만-80% 이상: 14종</li> <li>• 억제활성 80% 미만-60% 이상: 12종</li> <li>• 억제활성 50%: 1종</li> <li>• 억제활성 0%: 6종</li> </ul>   |  |  |   |
|                    |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 50종 유산균 발효액</li> <li>• 억제활성 90% 이상: 3종</li> <li>• 억제활성 90% 미만-80% 이상: 6종</li> <li>• 억제활성 80% 미만-60% 이상: 6종</li> <li>• 억제활성 60% 미만-25% 이상: 6종</li> <li>• 억제활성 0%: 29종</li> </ul>   |  |  |   |

|                    |  |                                      |                                 |   |
|--------------------|--|--------------------------------------|---------------------------------|---|
| 1차<br>년도<br>(2015) |  | 주름개선<br>효능 탐색<br>( <i>in vitro</i> ) | - elastase 억제활성<br>(1차년 표 21참조) | - 50종 열수추출물   |
|                    |  |                                      |                                 | - 50종 냉수추출물   |
|                    |  |                                      |                                 | - 50종 유산균 발효액   |
|                    |  |                                      |                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 억제활성 0.100 이상: 0종</li> <li>• 억제활성 0.100 미만-0.020 이상: 3종</li> <li>• 억제활성 0.020 미만-0.001 이상: 27종</li> <li>• 억제활성 0: 20종</li> </ul> |
|                    |  |                                      |                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 억제활성 0.100 이상: 0종</li> <li>• 억제활성 0.100 미만-0.020 이상: 1종</li> <li>• 억제활성 0.020 미만-0.001 이상: 35종</li> <li>• 억제활성 0: 14종</li> </ul> |
|                    |  |                                      |                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 억제활성 0.100 이상: 2종</li> <li>• 억제활성 0.100 미만-0.020 이상: 1종</li> <li>• 억제활성 0.020 미만-0.001 이상: 45종</li> <li>• 억제활성 0: 2종</li> </ul>  |

| 구분<br>(연도)         | 세부과제명  | 세부연구목표   | 연구개발 수행내용   | 연구결과  |  |
|--------------------|--|--|---|---|--|
| 2차<br>년도<br>(2016) | [세부과제]<br>국내 농산<br>자원을<br>활용한<br>할랄<br>화장품<br>소재 개발<br>및<br>효능평가                                     | 제조된 소재의 효능<br>평가 및 안전성 평<br>가  | 위탁기관과 협력  | - 항여드름균 효능<br>- 각 추출물의 세포독성   |  |
|                    |  | 소재 개발, 효능 평<br>가   | 위탁기관과 협력  | - 미백 활성을 가진 6종 식물   |  |
|                    |  | 할랄 적합 성분을<br>함유하는 할랄 화장<br>품처방개발   | 위탁기관의 1차년도 결과에<br>따른 농산물 선별 후<br>처방개발   | - 3차년 수행함   |  |
|                    | [위탁과제]<br>국내 농산<br>자원을 활<br>용한 할랄<br>화장품 소<br>재 개발 및<br>효능평가<br>(1차년도 in<br>vitro 결과<br>를 토대로<br>선택) | 항균(항여드름균)<br>효능<br>- 오이풀 뿌리<br>(지유)  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 냉수추출물(CWE)</li> <li>• 열수추출물(HWE)</li> <li>• 메탄올추출물(ME)</li> <li>• CWE-에틸아세테이트분획물</li> <li>• HWE-에틸아세테이트분획물</li> <li>• ME-에틸아세테이트분획물</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 원판확산법</li> <li>- 최소억제농도(MIC)</li> <li>- 최소살균농도(MBC)</li> <li>- TLC</li> <li>- HPLC</li> <li>- 성분의 항여드름균 활성 검증</li> </ul>   |  |
|                    |  | 미백 효능 검증 :<br>- 오이풀 뿌리<br>(지유)<br>- 지황뿌리(건지황)<br>- 칩 뿌리(갈근)<br>- 오미자 열매<br>- 구기자 열매<br>- 천마 덩이줄기 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 냉수추출물(CWE)</li> <li>• 열수추출물(HWE)</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- in vitro anti-tyrosinase 활성</li> <li>• L-DOPA</li> <li>• L-tyrosine-</li> <li>- 각 추출물 시료 처리 B16F10 세포</li> <li>• 세포독성 : CCK 키트-8 이용 세포 생존률 상대평가</li> <li>• 멜라닌 함량 측정 : 각 추출물 및 α-MSH 병용 처리</li> </ul>  |  |
|                    |  | 항산화 효능 검증<br>- 오이풀 뿌리<br>(지유)  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 냉수추출물(CWE)</li> <li>• 열수추출물(HWE)</li> <li>• 메탄올추출물(ME)</li> <li>• CWE-에틸아세테이트분획물</li> <li>• HWE-에틸아세테이트분획물</li> <li>• ME-에틸아세테이트분획물</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 각 추출물의 성분 분석</li> <li>• 총 폴리페놀(total polyphenols) 함량</li> <li>• 총 플라보노이드(total flavonoids) 함량</li> <li>• 총 탄닌(total tannin) 함량</li> <li>- in vitro 항산화능</li> <li>• DPPH 라디칼 억제활성</li> <li>• ABTS 라디칼 억제활성</li> <li>• Hydroxyl 라디칼 제거능 : 과산화수소(Hydrogen peroxide) 제거능</li> <li>• 지질과산화 억제 활성</li> </ul> |  |
|                    |  | 항염증 효능 검증<br>- 오이풀 뿌리<br>(지유)  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• CWE-에틸아세테이트분획물</li> <li>• HWE-에틸아세테이트분획물</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 각 추출물의 분획물 처리 B16F10 세포의 항산화능</li> <li>• Superoxide dismutase(SOD) 활성</li> <li>• Catalase(CAT) 활성</li> <li>• Glutathione Peroxidase(GPx) 활성</li> </ul>   |  |
|                    |  | 돼지 콜라겐 대체<br>소재 개발<br>- 생선 비늘  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 콜라겐 추출물</li> <li>• 초산+효소+염침전법</li> <li>- 추출물의 Lactobacillus 발효</li> <li>• 콜라겐 펩타이드</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 각 추출물의 에틸아세테이트 분획물 처리</li> <li>• 세포독성 : CCK 키트-8 이용 세포 생존률 상대평가</li> <li>- LPS 유도 염증세포에 각 추출물의 에틸아세테이트 분획물 처리</li> <li>• Nitric oxide(NO) 생성 억제 평가: 흡광도 측정</li> <li>• TNF-α 및 IL-1β 사이토카인 측정 : RT-Real time qPCR</li> </ul>  |  |
|                    |  |  |   |   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- SDS-PAGE</li> <li>- Elastase 억제 활성</li> </ul> |

| 구분<br>(연도)         | 세부과제명  | 세부연구목표   | 연구개발 수행내용   | 연구결과   |  |
|--------------------|--|--|---|--|--|
| 3차<br>년도<br>(2017) | [세부과제]<br>국내 농산<br>자원을 활용한<br>할랄 화장품<br>소재 개발 및<br>효능평가  | 할랄 적합<br>소재 개발   | - 할랄 적합 공정을 이용하여<br>식물추출물 개발<br>- 개별 공정 개발 및 표준화  | - 소재 개발 완료 (녹차추출물 외 12종)   |  |
|                    |  | 할랄 화장품<br>처방 개발  | - 상기 개발 소재를 활용하는<br>할랄 화장품 처방 개발<br>- 개별 공정 개발 및 규격 확<br>립  | - 처방 개발 완료 (115종)  |  |
|                    |  | 할랄 인증  | - 상기 소재의 할랄 인증<br>- 상기 화장품의 할랄 인증   | - 소재 할랄 인증 (7종)<br>- 할랄 화장품 인증   |  |
|                    |  | INCI 등재  | - 개발 소재 (화장품 원료)를<br>ICID (세계화장품원료사전)<br>에 등재   | - 등재 완료 (2건)   |  |
|                    |  | 기능성<br>화장품 인증  | - 개발 화장품을 KFDA 기능<br>성 화장품 인증   | - 인증 완료 (15건)  |  |
|                    |  | 설비 구축  | - 실험 장비 및 Pilot Test 설<br>비 구축  | - 실험 장비 및 Pilot Test 설비 구축   |  |
|                    |  | 사업화  | - 개발된 할랄 제품의 사업화  | - 말레이시아 수출 완료<br>- 국내 제품에 사업화 완료<br>- 인도네시아, 두바이, 중국, 미국, 캐나다,<br>호주 등지에 수출 상담 진행중   |  |
|                    | [위탁과제]<br>국내 농산<br>자원을 활용한<br>할랄 화장품<br>소재 개발 및<br>효능평가<br>(2차년도<br>cell-based<br>assay 결과를<br>토대로 선택) | 항균(항여드름<br>균) 효능<br>- 오이풀<br>뿌리<br>(지유)                    | • 냉수추출물(CWE)<br>• 열수추출물(HWE)<br>• 메탄올추출물(ME)<br>• CWE-에틸아세테이트분획물<br>• HWE-에틸아세테이트분획물<br>• ME-에틸아세테이트분획물 | - HPLC 및 HPLC-MS를 통한 유효성분 분<br>석<br>- 원판확산법을 통한 유효성분의 항균 활<br>성 검증   |  |
|                    |  | 미백 효능<br>검증 :<br>- 지황뿌리(건<br>지황)                           | • 냉수추출물(CWE)<br>• 열수추출물(HWE)  | - in vitro anti-tyrosinase 활성<br>• Bioautography 분석<br>- 각 추출물 시료 처리 B16F10 세포<br>• 세포독성 : MTT 및 CCK-8을 이용 세포<br>생존률 상대평가<br>• DOPA staining을 이용한<br>항타이로시나아제 활성 검증<br>• 멜라닌 함량 측정 : 각 추출물 및<br>α-MSH 병용 처리<br>• Taqman probe를 이용한 RT-qPCR 및<br>chemidoc을 이용한 western blot을 통한<br>멜라닌 합성 기작 검증 |  |
|                    |  | 대상식물<br>추출물 및<br>분획물의<br>항균 및<br>항염증 효능<br>평가<br>(in vivo) | • 부종유도 동물모델<br>• 림프구 및 사이토카인<br>• 여드름균 감염 모델  | - 동물에서의 항염증 효능 평가(in vivo)<br>• 급성염증 동물 실험 :<br>카라기난(carrageenan)을 이용한 부종<br>유발 및 추출물의 항염증 효능 검증<br>• ELISA kit를 이용한 혈청내 사이토카인<br>농도 확인 및 항염증 효능 검증<br>• P. acnes균에 의한 염증 유발 및<br>추출물의 항균활성에 의한 항염증 효능<br>검증   |  |
|                    |  | 대상식물<br>추출물,<br>분획물 및<br>발효액 함유<br>피부 도포액<br>안전성 실험        | • 육안적 평가<br>• 피부자극 시험   | - 동물에서의 추출물 함유 도포액의<br>안전성 검증(in vivo)<br>• CTFA 안전성 평가 가이드라인 기준에<br>준하여 관찰 및 평가   |  |
|                    |  |  |   |  |  |
|                    |  |  |   |  |  |
|                    |  |  |   |  |  |

2. 항산화, 항균, 미백, 주름개선 향장 소재 선별 [연구내용 요약]

(1) 대상 농산 자원 목록

(2) 성분 분석

- ① 탄수화물
- ② 알칼로이드
- ③ 플라보노이드
- ④ 단백질
- ⑤ 탄닌

(3) 항산화 효능 탐색(*in vitro*)

- ① DPPH free radical 제거 활성(%)
- ② ABTS free radical 제거 활성(%)

(4) 항균 효능 탐색(*in vitro*)

- ① 그람음성 *Escherichia coil*
- ② 그람음성 *Vibrio parahaemolyticus*
- ③ 그람양성 *Listeria monocytogenes*
- ④ 그람양성 *Staphylococcus aureus*
- ⑤ 그람양성 *Propionibacterium acnes*

(5) 미백 효능 탐색(*in vitro*) tyrosinase 억제 활성

- ① tyrosinase 억제 활성: 기질 (L-DOPA)
- ② elastase 억제 활성: 기질 [N-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide]

(1) 대상 농산 자원 목록

[표 1] 일반명, 학명 및 조직부위

|    | 일반명 (영명)                       | 학명                                      | tissue     |
|----|--------------------------------|---|------------|
| 1  | 참( kudzu vine)                 | <i>Pueraria lobata</i>                  | root       |
| 2  | 감초(licorice)                   | <i>Glycyrrhiza uralensis</i>            | leaf       |
| 3  | 개똥쑥(Sweet Wormwood)            | <i>Artemisia annua</i>                  | leaf       |
| 4  | 건지황(dried Adhesive Rehmannia)  | <i>Rehmannia glutinosa</i>              | root       |
| 5  | 겨우살이/꼭기생(mistletoe)            | <i>Viscum album</i>                     | stem       |
| 6  | 회화나무(Japanese pagoda tree)     | <i>Sophora japonica</i>                 | flower(고화) |
| 7  | 구기자(Chinese Matrimony Vine )   | <i>Lycium chinense</i>                  | fruit      |
| 8  | 단풍마(Sevenlobed Yam)            | <i>Discorea quinqueloba</i>             | root       |
| 9  | 당귀(Gigantic angelica)          | <i>Angelica gigas</i>                   | root       |
| 10 | 돼지감자/똥단지(jerusalem artichoke)  | <i>Helianthus tuberosus</i>             | root       |
| 11 | 맥문동(Boardleaf Liriope)         | <i>Liriope platyphylla</i>              | root       |
| 12 | 모과나무(Chinese Flowering-quince) | <i>Chaenomeles sinensis</i>             | fruit      |
| 13 | 모란/목단(Tree Paeony)             | <i>Paenia suffruticosa</i>              | root(목단피)  |
| 14 | 민들레(Dandleion)                 | <i>Taraxacum platycarpum</i>            | leaf       |
| 15 | 박하(Japanese Mint)              | <i>Mentha piperascens</i>               | leaf       |
| 16 | 백출(Atractylodis Rhizoma)       | <i>Atractylodes japonia</i>             | flower     |
| 17 | 별나무/산겨릅나무(Japanese maple)      | <i>Acer tegmentosum</i>                 | stem       |
| 18 | 뽕나무(White Mulberry)            | <i>Morus alba</i>                       | leaf/fruit |
| 19 | 사삼/더덕(Lance Asiabell)          | <i>Codonopsis lanceolata</i>            | root       |
| 20 | 산사나무(Large Chinese Hawthorn)   | <i>Crataegus pinnatifida</i>            | fruit      |
| 21 | 산수유(Japanese Cornelian Cherry) | <i>Cornus officinalis</i>               | fruit      |
| 22 | 삼채(Myanmar chive)              | <i>Allium hookeri</i>                   | leaf/root  |
| 23 | 석창포(Japanese sweet flag)       | <i>Acrus gramineus</i>                  | leaf       |
| 24 | 쑥(Artemisia)                   | <i>Artemisia princeps</i>               | leaf       |
| 25 | 애기똥풀(Asian celandine)          | <i>Chelidonium majus</i> var. asiaticum | leaf/stem  |
| 26 | 오가피(Acanthopanax)              | <i>Acanthopanax sessiliflorus</i>       | stem       |
| 27 | 매실나무(Japanese Apricot)         | <i>Prunus mume</i>                      | fruit(오매)  |
| 28 | 오미자(chinese magnolia vine)     | <i>Schizandra chinensis</i>             | fruit      |
| 29 | 옥수수(corn)                      | <i>Zea mays</i>                         | tassel     |
| 30 | 옥죽(Yama-naruko-yuri)           | <i>Polygonatum thunbergii</i>           | root       |
| 31 | 익모초(siberian motherwort)       | <i>Leonurus sibiricus</i>               | leaf       |
| 32 | 인도삼(Indian ginseng)            | <i>Withania somnifera</i>               | seed       |
| 33 | 자작나무(Japanese White Birch)     | <i>Betula platyphylla</i> var. japonica | stem bark  |
| 34 | 대나무(Bamboo)                    | <i>Phyllostachys bambusoides</i>        | leaf(죽엽)   |
| 35 | 긴오이풀(Great Burnet)             | <i>Sanguisorba longifolia</i>           | root(지유)   |
| 36 | 귤(Unishiu orange)              | <i>Citrus unshiu</i>                    | fruit peel |
| 37 | 창출/삼주(Japanese atractylodes)   | <i>Atractylodes ovata</i>               | root       |
| 38 | 천마(Tall Gastrodia)             | <i>Gastrodia elata</i>                  | root       |
| 39 | 천문동(Cochinchinese Asparagus)   | <i>Asparagus cochinchinensis</i>        | root       |
| 40 | 하늘타리(Mongolian Snakegourd)     | <i>Trichosanthes kirilowii</i>          | root(천화분)  |
| 41 | 대회향나무(Star anise)              | <i>Illicium verum</i>                   | fruit(팔각)  |
| 42 | 부들(Common cattail)             | <i>Typha orientalis</i>                 | pollen(포황) |
| 43 | 향나무(Chinese Juniper)           | <i>Juniperus chinensis</i>              | friut      |
| 44 | 호랑가시나무(Horned Holly)           | <i>Ilex cornuta</i>                     | leaf/stem  |
| 45 | 홍화/잇꽃(Safflower)               | <i>Carthamus tinctorius</i>             | fruit(홍화자) |
| 46 | 속씨옴풀/황금(Baikal Skullcap)       | <i>Scutellaria baicalensis</i>          | root       |
| 47 | 황기(Membranous Milkvetch)       | <i>Astragalus membranaceus</i>          | root       |
| 48 | 황백나무(Amur Cork tree)           | <i>Phellodendron amurense</i>           | fruit(황백자) |
| 49 | 후박나무(Machilus)                 | <i>Machilus thunbergii</i>              | leaf       |
| 50 | 잠사 (Bombycis Excrementum)      | <i>Bombyx mori</i>                      | shit       |

(2) 성분 분석

① 탄수화물

[표 2] Fehling 용액 시험에 의한 탄수화물 분석

| 국내 농산자원 목록                      | 냉수추출물 | 열수추출물 | 유산균 배양액 |
|---------------------------------|-------|-------|---------|
| 칩(kudzu vine)                   | +     | -     | +       |
| 감초(licorice)                    | +     | -     | -       |
| 개똥쑥(Sweet Wormwood)             | +     | +     | +       |
| 건지황(dried Adhesive Rehmannia)   | -     | +     | +       |
| 겨우살이/곡기생(mistletoe)             | -     | -     | +       |
| 회화나무(Japanese pagoda tree)      | +     | -     | +       |
| 구기자(Chinese Matrimony Vine )    | +++   | +++   | ++      |
| 단풍마(Sevenlobed Yam)             | -     | -     | -       |
| 당귀(Gigantic angelica)           | ++    | -     | +       |
| 돼지감자/똥단지(jerusalem artichoke)   | +     | ++    | +       |
| 맥문동(Boardleaf Liriope)          | +++   | +++   | +++     |
| 모과나무(Chinese Flowering-quince)  | +     | +     | +       |
| 모란/목단(Tree Paeony)              | +     | +     | ++      |
| 민들레(Dandleion)                  | ++    | ++    | +       |
| 박하(Japanese Mint)               | ++    | ++    | +       |
| 백출(Attractylodis Rhizoma)       | -     | -     | -       |
| 별나무/산겨릅나무(Japanese maple)       | +     | +     | +       |
| 뽕나무(White Mulberry)             | ++    | -     | -       |
| 사삼/더덕(Lance Asiabell)           | -     | -     | -       |
| 산사나무(Large Chinese Hawthorn)    | ++    | ++    | +++     |
| 산수유(Japanese Cornellian Cherry) | ++    | ++++  | +++     |
| 삼채(Myanmar chive)               | +     | -     | +       |
| 석창포(Japanese sweet flag)        | +++   | ++    | +       |
| 쑥(Artemisia)                    | +     | +     | -       |
| 애기똥풀(Asian celandine)           | +     | +     | +       |
| 오가피(Acanthopanax)               | +     | +     | -       |
| 매실나무(Japanese Apricot)          | +     | ++    | -       |
| 오미자(chinese magnolia vine)      | +     | +++   | +       |
| 옥수수(corn)                       | -     | -     | -       |
| 옥죽(Yama-naruko-yuri)            | +     | +     | ++      |
| 익모초(siberian motherwort)        | -     | -     | -       |
| 인도삼(Indian ginseng)             | +     | -     | +       |
| 자작나무(Japanese White Birch)      | +     | +     | +       |
| 대나무(Bamboo)                     | +     | -     | -       |
| 긴오이풀(Great Burnet)              | ++    | ++    | +       |
| 귤(Unishiu orange)               | +     | ++    | +       |
| 창출/삼주(Japanese atractylodes)    | +     | ++    | +       |
| 천마(Tall Gastrodia)              | +     | +     | +       |
| 천문동(Cochinchinese Asparagus)    | +     | +     | +       |
| 하늘타리(Mongolian Snakegourd)      | -     | -     | -       |
| 대회향나무(Star anise)               | +     | -     | +       |
| 부들(Common cattail)              | ++    | -     | -       |
| 향나무(Chinese Juniper)            | +     | +     | -       |
| 호랑가시나무(Horned Holly)            | -     | +     | -       |
| 홍화/잇꽃(Safflower)                | -     | +     | -       |
| 속씨음풀/황금(Baikal Skullcap)        | ++    | -     | -       |
| 황기(Membranous Milkvetch)        | +     | +     | +       |
| 황백나무(Amur Cork tree)            | +     | -     | -       |
| 후박나무(Machilus)                  | +     | -     | -       |
| 잠사 (Bombycis Excrementum)       | -     | -     | -       |

++++: very high, +++: high, ++: intermediate, +: low, -: negative

[표 3] Molisch's 시험에 의한 탄수화물 분석

| 국내 농산자원 목록                      | 냉수추출물 | 열수추출물 | 유산균 배양액 |
|---------------------------------|-------|-------|---------|
| 칠향(kudzu vine)                  | +     | -     | +       |
| 감초(licorice)                    | +     | -     | -       |
| 개똥쑥(Sweet Wormwood)             | +     | +     | +       |
| 건지황(dried Adhesive Rehmannia)   | -     | +     | +       |
| 겨우살이/꼭기생(mistletoe)             | -     | -     | +       |
| 회화나무(Japanese pagoda tree)      | +     | -     | +       |
| 구기자(Chinese Matrimony Vine )    | +++   | +++   | ++      |
| 단풍마(Sevenlobed Yam)             | -     | -     | -       |
| 당귀(Gigantic angelica)           | ++    | -     | +       |
| 돼지감자/똥단지(jerusalem artichoke)   | +     | ++    | +       |
| 맥문동(Boardleaf Liriope)          | +++   | +++   | +++     |
| 모과나무(Chinese Flowering-quince)  | +     | +     | +       |
| 모란/목단(Tree Paeony)              | +     | +     | ++      |
| 민들레(Dandleion)                  | ++    | ++    | +       |
| 박하(Japanese Mint)               | ++    | ++    | +       |
| 백출(Atractylodis Rhizoma)        | -     | -     | -       |
| 별나무/산겨릅나무(Japanese maple)       | +     | +     | +       |
| 뽕나무(White Mulberry)             | ++    | -     | -       |
| 사삼/더덕(Lance Asiabell)           | -     | -     | -       |
| 산사나무(Large Chinese Hawthorn)    | ++    | ++    | +++     |
| 산수유(Japanese Cornellian Cherry) | ++    | ++++  | +++     |
| 삼채(Myanmar chive)               | +     | -     | +       |
| 석창포(Japanese sweet flag)        | +++   | ++    | +       |
| 쑥(Artemisia)                    | +     | +     | -       |
| 애기똥풀(Asian celandine)           | +     | +     | +       |
| 오가피(Acanthopanax)               | +     | +     | -       |
| 매실나무(Japanese Apricot)          | +     | ++    | -       |
| 오미자(chinese magnolia vine)      | +     | +++   | +       |
| 옥수수(corn)                       | -     | -     | -       |
| 옥죽(Yama-naruko-yuri)            | +     | +     | ++      |
| 익모초(siberian motherwort)        | -     | -     | -       |
| 인도삼(Indian ginseng)             | +     | -     | +       |
| 자작나무(Japanese White Birch)      | +     | +     | +       |
| 대나무(Bamboo)                     | +     | -     | -       |
| 긴오이풀(Great Burnet)              | ++    | ++    | +       |
| 귤(Unishiu orange)               | +     | ++    | +       |
| 창출/삽주(Japanese atractylodes)    | +     | ++    | +       |
| 천마(Tall Gastrodia)              | +     | +     | +       |
| 천문동(Cochinchinese Asparagus)    | +     | +     | +       |
| 하늘타리(Mongolian Snakegourd)      | -     | -     | -       |
| 대회향나무(Star anise)               | +     | -     | +       |
| 부들(Common cattail)              | ++    | -     | -       |
| 향나무(Chinese Juniper)            | +     | +     | -       |
| 호랑가시나무(Horned Holly)            | -     | +     | -       |
| 홍화/잇꽃(Safflower)                | -     | +     | -       |
| 속씨음푼/황금(Baikal Skullcap)        | ++    | -     | -       |
| 황기(Membranous Milkvetch)        | +     | +     | +       |
| 황백나무(Amur Cork tree)            | +     | -     | -       |
| 후박나무(Machilus)                  | +     | +     | +       |
| 잠사 (Bombycis Excrementum)       | +     | -     | +       |

++++: very high, +++: high, ++: intermediate, +: low, -: negative

② 알칼로이드

[표 4] Dragendroff's 시험에 의한 알칼로이드 분석

| 국내 농산자원 목록                      | 냉수추출물 | 열수추출물 | 유산균 배양액 |
|---------------------------------|-------|-------|---------|
| 칠향(kudzu vine)                  | +++   | ++    | ++      |
| 감초(licorice)                    | +++   | ++++  | ++      |
| 개똥썩(Sweet Wormwood)             | +++   | ++    | ++      |
| 건지황(dried Adhesive Rehmannia)   | ++++  | +     | +++     |
| 겨우살이/꼭기생(mistletoe)             | ++++  | ++++  | +++     |
| 회화나무(Japanese pagoda tree)      | +     | ++++  | +       |
| 구기자(Chinese Matrimony Vine )    | ++    | ++++  | +++     |
| 단풍마(Sevenlobed Yam)             | ++++  | ++++  | ++++    |
| 당귀(Gigantic angelica)           | ++    | +++   | +       |
| 돼지감자/똥단지(jerusalem artichoke)   | ++    | ++    | ++      |
| 맥문동(Boardleaf Liriope)          | +     | -     | +++     |
| 모과나무(Chinese Flowering-quince)  | -     | +     | ++++    |
| 모란/목단(Tree Paeony)              | -     | ++++  | +       |
| 민들레(Dandleion)                  | +     | +     | ++      |
| 박하(Japanese Mint)               | ++    | ++    | ++      |
| 백출(Atractylodis Rhizoma)        | -     | +     | +       |
| 벌나무/산겨릅나무(Japanese maple)       | +     | ++    | ++      |
| 뽕나무(White Mulberry)             | ++    | ++++  | +++     |
| 사삼/더덕(Lance Asiabell)           | ++    | ++    | +       |
| 산사나무(Large Chinese Hawthorn)    | +     | -     | +       |
| 산수유(Japanese Cornellian Cherry) | +     | -     | +       |
| 삼채(Myanmar chive)               | +     | -     | ++      |
| 석창포(Japanese sweet flag)        | +     | ++    | +       |
| 쑥(Artemisia)                    | +     | ++    | +       |
| 애기똥풀(Asian celandine)           | +     | ++++  | +++     |
| 오가피(Acanthopanax)               | ++    | -     | ++      |
| 매실나무(Japanese Apricot)          | ++    | ++++  | ++++    |
| 오미자(chinese magnolia vine)      | +     | ++    | +++     |
| 옥수수(corn)                       | +     | +++   | ++      |
| 옥죽(Yama-naruko-yuri)            | +     | -     | ++      |
| 익모초(siberian motherwort)        | +     | ++++  | ++      |
| 인도삼(Indian ginseng)             | ++    | ++++  | +       |
| 자작나무(Japanese White Birch)      | -     | -     | +       |
| 대나무(Bamboo)                     | +     | ++    | ++      |
| 긴오이풀(Great Burnet)              | +     | -     | +       |
| 귤(Unishiu orange)               | +     | +     | +++     |
| 창출/삼주(Japanese atractylodes)    | +     | +     | ++      |
| 천마(Tall Gastrodia)              | +     | +     | ++      |
| 천문동(Cochinchinese Asparagus)    | -     | -     | +++     |
| 하늘타리(Mongolian Snakegourd)      | +     | ++    | +++     |
| 대회향나무(Star anise)               | +     | +     | +       |
| 부들(Common cattail)              | ++    | ++++  | +       |
| 향나무(Chinese Juniper)            | ++++  | +     | ++      |
| 호랑가시나무(Horned Holly)            | +     | +     | ++      |
| 홍화/잇꽃(Safflower)                | +     | +     | +       |
| 속씨옴풀/황금(Baikal Skullcap)        | -     | ++++  | +       |
| 황기(Membranous Milkvetch)        | ++    | +++   | +       |
| 황백나무(Amur Cork tree)            | ++++  | ++++  | +       |
| 후박나무(Machilus)                  | +     | +     | +       |
| 잠사 (Bombycis Excrementum)       | +     | +     | ++      |

++++: very high, +++: high, ++: intermediate, +: low, -: negative

[표 5] Mayer' s 시험에 의한 알칼로이드 분석

| 국내 농산자원 목록                     | 냉수추출물 | 열수추출물 | 유산균 배양액 |
|--------------------------------|-------|-------|---------|
| 칠향(kudzu vine)                 | +     | +     | +       |
| 감초(licorice)                   | -     | -     | -       |
| 개똥쑥(Sweet Wormwood)            | +     | +     | -       |
| 건지황(dried Adhesive Rehmannia)  | +     | -     | +       |
| 겨우살이/꼭기생(mistletoe)            | +     | +     | +       |
| 회화나무(Japanese pagoda tree)     | -     | +     | +       |
| 구기자(Chinese Matrimony Vine )   | +     | +     | +       |
| 단풍마(Sevenlobed Yam)            | -     | -     | +       |
| 당귀(Gigantic angelica)          | -     | -     | +       |
| 돼지감자/똥단지(jerusalem artichoke)  | +     | +     | -       |
| 맥문동(Boardleaf Liriope)         | -     | -     | +       |
| 모과나무(Chinese Flowering-quince) | -     | +     | -       |
| 모란/목단(Tree Paeony)             | -     | +     | -       |
| 민들레(Dandleion)                 | +     | -     | -       |
| 박하(Japanese Mint)              | -     | -     | -       |
| 백출(Attractylodis Rhizoma)      | -     | -     | -       |
| 별나무/산겨릅나무(Japanese maple)      | -     | -     | +       |
| 뽕나무(White Mulberry)            | -     | +     | +       |
| 사삼/더덕(Lance Asiabell)          | +     | +     | +       |
| 산사나무(Large Chinese Hawthorn)   | -     | -     | -       |
| 산수유(Japanese Cornelian Cherry) | -     | -     | -       |
| 삼채(Myanmar chive)              | -     | -     | +       |
| 석창포(Japanese sweet flag)       | -     | -     | -       |
| 쑥(Artemisia)                   | -     | +     | -       |
| 애기똥풀(Asian celandine)          | -     | +     | +       |
| 오가피(Acanthopanax)              | -     | -     | +       |
| 매실나무(Japanese Apricot)         | +     | +     | +       |
| 오미자(chinese magnolia vine)     | +     | +     | +       |
| 옥수수(corn)                      | -     | +     | -       |
| 옥죽(Yama-naruko-yuri)           | -     | -     | -       |
| 익모초(siberian motherwort)       | -     | -     | -       |
| 인도삼(Indian ginseng)            | -     | -     | -       |
| 자작나무(Japanese White Birch)     | -     | -     | -       |
| 대나무(Bamboo)                    | -     | -     | +       |
| 긴오이풀(Great Burnet)             | +     | +     | -       |
| 귤(Unishiu orange)              | -     | -     | +       |
| 창출/삼주(Japanese atractylodes)   | -     | -     | -       |
| 천마(Tall Gastrodia)             | -     | -     | -       |
| 천문동(Cochinchinese Asparagus)   | -     | -     | -       |
| 하늘타리(Mongolian Snakegourd)     | -     | -     | +       |
| 대회향나무(Star anise)              | +     | -     | -       |
| 부들(Common cattail)             | -     | -     | -       |
| 향나무(Chinese Juniper)           | +     | -     | +       |
| 호랑가시나무(Horned Holly)           | -     | -     | -       |
| 홍화/잇꽃(Safflower)               | -     | -     | +       |
| 속씨음풀/황금(Baikal Skullcap)       | -     | +     | -       |
| 황기(Membranous Milkvetch)       | +     | -     | +       |
| 황백나무(Amur Cork tree)           | +     | +     | +       |
| 후박나무(Machilus)                 | -     | -     | +       |
| 잡사 (Bombycis Excrementum)      | +     | -     | +       |

+: positive, -: negative

[표 6] Wagner' s 시험에 의한 알칼로이드 분석

| 국내 농산자원 목록                      | 냉수추출물 | 열수추출물 | 유산균 배양액 |
|---------------------------------|-------|-------|---------|
| 칠향(kudzu vine)                  | +     | ++++  | +++     |
| 감초(licorice)                    | -     | ++++  | ++      |
| 개똥쑥(Sweet Wormwood)             | +     | +     | ++      |
| 건지황(dried Adhesive Rehmannia)   | +     | +     | ++      |
| 겨우살이/꼭기생(mistletoe)             | +     | +     | +++     |
| 회화나무(Japanese pagoda tree)      | -     | ++    | ++      |
| 구기자(Chinese Matrimony Vine )    | +     | ++    | ++      |
| 단풍마(Sevenlobed Yam)             | +     | ++    | ++      |
| 당귀(Gigantic angelica)           | +     | +     | ++      |
| 돼지감자/똥단지(jerusalem artichoke)   | +     | +     | ++      |
| 맥문동(Boardleaf Liriope)          | +     | -     | ++      |
| 모과나무(Chinese Flowering-quince)  | -     | +     | ++      |
| 모란/목단(Tree Paeony)              | +     | ++++  | ++      |
| 민들레(Dandleion)                  | +     | +     | ++      |
| 박하(Japanese Mint)               | +     | +     | ++      |
| 백출(Atractylodis Rhizoma)        | -     | -     | ++      |
| 별나무/산겨릅나무(Japanese maple)       | ++    | +     | ++      |
| 뽕나무(White Mulberry)             | -     | ++    | ++      |
| 사삼/더덕(Lance Asiabell)           | +     | +     | ++      |
| 산사나무(Large Chinese Hawthorn)    | -     | +     | ++      |
| 산수유(Japanese Cornellian Cherry) | -     | -     | ++      |
| 삼채(Myanmar chive)               | -     | -     | +++     |
| 석창포(Japanese sweet flag)        | +     | +++   | ++      |
| 쑥(Artemisia)                    | -     | +     | +++     |
| 애기똥풀(Asian celandine)           | +     | ++    | ++      |
| 오가피(Acanthopanax)               | +     | -     | +++     |
| 매실나무(Japanese Apricot)          | +     | +     | ++      |
| 오미자(chinese magnolia vine)      | +     | ++    | ++      |
| 옥수수(corn)                       | +     | +     | ++      |
| 옥죽(Yama-naruko-yuri)            | +     | -     | ++      |
| 익모초(siberian motherwort)        | -     | -     | ++      |
| 인도삼(Indian ginseng)             | +     | ++    | ++      |
| 자작나무(Japanese White Birch)      | -     | +     | +++     |
| 대나무(Bamboo)                     | -     | +     | +++     |
| 긴오이풀(Great Burnet)              | -     | +     | ++      |
| 귤(Unishiu orange)               | -     | -     | ++      |
| 창출/삽주(Japanese atractylodes)    | +     | -     | ++      |
| 천마(Tall Gastrodia)              | ++    | +++   | +++     |
| 천문동(Cochinchinese Asparagus)    | -     | -     | ++      |
| 하늘타리(Mongolian Snakegourd)      | -     | +     | ++      |
| 대회향나무(Star anise)               | +     | +     | ++      |
| 부들(Common cattail)              | +     | ++    | ++      |
| 향나무(Chinese Juniper)            | +     | +     | +++     |
| 호랑가시나무(Horned Holly)            | +     | +++   | ++      |
| 홍화/잇꽃(Safflower)                | +     | -     | +++     |
| 속씨옴풀/황금(Baikal Skullcap)        | +     | ++++  | ++      |
| 황백나무(Amur Cork tree)            | +     | ++    | ++      |
| 후박나무(Machilus)                  | +     | +++   | ++      |
| 잡사 (Bombycis Excrementum)       | +     | +++   | ++      |

++++: very high, +++: high, ++: intermediate, +: low, -: negative

③ 플라보노이드

[표 7] Alkaline 시약에 의한 플라보노이드 분석

| 국내 농산자원 목록                      | 냉수추출물 | 열수추출물 | 유산균 배양액 |
|---------------------------------|-------|-------|---------|
| 칠향(kudzu vine)                  | +     | +     | +       |
| 감초(licorice)                    | +     | +     | +       |
| 개똥쑥(Sweet Wormwood)             | -     | -     | +       |
| 건지황(dried Adhesive Rehmannia)   | +     | +     | +       |
| 겨우살이/꼭기생(mistletoe)             | +     | +     | +       |
| 회화나무(Japanese pagoda tree)      | +     | +     | +       |
| 구기자(Chinese Matrimony Vine )    | +     | +     | +       |
| 단풍마(Sevenlobed Yam)             | +     | +     | +       |
| 당귀(Gigantic angelica)           | +     | +     | +       |
| 돼지감자/똥단지(jerusalem artichoke)   | +     | +     | +       |
| 맥문동(Boardleaf Liriope)          | +     | +     | +       |
| 모과나무(Chinese Flowering-quince)  | +     | +     | +       |
| 모란/목단(Tree Paeony)              | +     | +     | +       |
| 민들레(Dandleion)                  | +     | +     | +       |
| 박하(Japanese Mint)               | +     | +     | +       |
| 백출(Atractylodis Rhizoma)        | +     | +     | +       |
| 벌나무/산겨릅나무(Japanese maple)       | +     | +     | +       |
| 뽕나무(White Mulberry)             | +     | +     | +       |
| 사삼/더덕(Lance Asiabell)           | +     | +     | +       |
| 산사나무(Large Chinese Hawthorn)    | +     | +     | +       |
| 산수유(Japanese Cornellian Cherry) | +     | +     | +       |
| 삼채(Myanmar chive)               | +     | +     | +       |
| 석창포(Japanese sweet flag)        | +     | +     | +       |
| 쑥(Artemisia)                    | +     | +     | +       |
| 애기똥풀(Asian celandine)           | -     | -     | +       |
| 오가피(Acanthopanax)               | +     | +     | +       |
| 매실나무(Japanese Apricot)          | +     | +     | +       |
| 오미자(chinese magnolia vine)      | +     | +     | +       |
| 옥수수(corn)                       | +     | +     | +       |
| 옥죽(Yama-naruko-yuri)            | +     | +     | +       |
| 익모초(siberian motherwort)        | -     | -     | +       |
| 인도삼(Indian ginseng)             | +     | +     | +       |
| 자작나무(Japanese White Birch)      | +     | +     | +       |
| 대나무(Bamboo)                     | +     | +     | +       |
| 긴오이풀(Great Burnet)              | +     | +     | +       |
| 귤(Unishiu orange)               | +     | +     | +       |
| 창출/삼주(Japanese atractylodes)    | +     | +     | +       |
| 천마(Tall Gastrodia)              | +     | +     | +       |
| 천문동(Cochinchinese Asparagus)    | +     | +     | +       |
| 하늘타리(Mongolian Snakegourd)      | +     | +     | +       |
| 대회향나무(Star anise)               | +     | +     | +       |
| 부들(Common cattail)              | +     | +     | +       |
| 향나무(Chinese Juniper)            | +     | +     | +       |
| 호랑가시나무(Horned Holly)            | +     | +     | +       |
| 홍화/잇꽃(Safflower)                | +     | +     | +       |
| 속썩음풀/황금(Baikal Skullcap)        | +     | +     | +       |
| 황기(Membranous Milkvetch)        | +     | +     | +       |
| 황백나무(Amur Cork tree)            | +     | +     | +       |
| 후박나무(Machilus)                  | +     | +     | +       |
| 잠사 (Bombycis Excrementum)       | +     | -     | +       |

+: positive, -: negative

④ 단백질

[ 표 8 ] 가수분해 시험에 의한 단백질 분석

| 국내 농산자원 목록                      | 냉수추출물 | 열수추출물 | 유산균 배양액 |
|---------------------------------|-------|-------|---------|
| 칠틈(kudzu vine)                  | +     | -     | +       |
| 감초(licorice)                    | +     | +     | +       |
| 개똥쑥(Sweet Wormwood)             | +     | +     | -       |
| 건지황(dried Adhesive Rehmannia)   | +     | +     | +       |
| 겨우살이/꼭기생(mistletoe)             | +     | +     | +       |
| 회화나무(Japanese pagoda tree)      | +     | +     | +       |
| 구기자(Chinese Matrimony Vine )    | +     | -     | +       |
| 단풍마(Sevenlobed Yam)             | +     | +     | +       |
| 당귀(Gigantic angelica)           | +     | +     | +       |
| 돼지감자/똥단지(jerusalem artichoke)   | +     | +     | +       |
| 맥문동(Boardleaf Liriope)          | +     | +     | +       |
| 모과나무(Chinese Flowering-quince)  | +     | +     | +       |
| 모란/목단(Tree Paeony)              | +     | +     | +       |
| 민들레(Dandleion)                  | +     | +     | +       |
| 박하(Japanese Mint)               | +     | +     | +       |
| 백출(Atractylodis Rhizoma)        | -     | +     | +       |
| 벌나무/산겨릅나무(Japanese maple)       | +     | +     | +       |
| 뽕나무(White Mulberry)             | +     | -     | +       |
| 사삼/더덕(Lance Asiabell)           | +     | +     | +       |
| 산사나무(Large Chinese Hawthorn)    | +     | +     | +       |
| 산수유(Japanese Cornellian Cherry) | +     | +     | +       |
| 삼채(Myanmar chive)               | +     | +     | +       |
| 석창포(Japanese sweet flag)        | +     | +     | +       |
| 쑥(Artemisia)                    | +     | +     | +       |
| 애기똥풀(Asian celandine)           | +     | +     | +       |
| 오가피(Acanthopanax)               | +     | +     | +       |
| 매실나무(Japanese Apricot)          | +     | +     | +       |
| 오미자(chinese magnolia vine)      | +     | +     | +       |
| 옥수수(corn)                       | +     | +     | +       |
| 옥죽(Yama-naruko-yuri)            | +     | +     | +       |
| 익모초(siberian motherwort)        | +     | +     | +       |
| 인도삼(Indian ginseng)             | -     | +     | +       |
| 자작나무(Japanese White Birch)      | -     | +     | +       |
| 대나무(Bamboo)                     | -     | +     | +       |
| 긴오이풀(Great Burnet)              | +     | +     | +       |
| 귤(Unishiu orange)               | +     | +     | +       |
| 창출/삼주(Japanese atractylodes)    | +     | +     | +       |
| 천마(Tall Gastrodia)              | -     | +     | +       |
| 천문동(Cochinchinese Asparagus)    | +     | +     | +       |
| 하늘타리(Mongolian Snakegourd)      | +     | -     | +       |
| 대회향나무(Star anise)               | +     | +     | +       |
| 부들(Common cattail)              | +     | -     | +       |
| 향나무(Chinese Juniper)            | +     | +     | +       |
| 호랑가시나무(Horned Holly)            | +     | -     | +       |
| 홍화/잇꽃(Safflower)                | -     | +     | +       |
| 속썩음풀/황금(Baikal Skullcap)        | +     | -     | +       |
| 황기(Membranous Milkvetch)        | +     | +     | +       |
| 황백나무(Amur Cork tree)            | +     | +     | +       |
| 후박나무(Machilus)                  | +     | +     | +       |
| 잠사 (Bombycis Excrementum)       | +     | -     | +       |

+: positive, -: negative

⑤ 탄닌

[표 9] 염화철 시험에 의한 탄닌 분석

| 국내 농산자원 목록                      | 냉수추출물 | 열수추출물 | 유산균 배양액 |
|---------------------------------|-------|-------|---------|
| 칠틈(kudzu vine)                  | ++    | +     | +       |
| 감초(licorice)                    | ++    | +     | +       |
| 개똥쑥(Sweet Wormwood)             | +     | +     | +       |
| 건지황(dried Adhesive Rehmannia)   | +     | -     | -       |
| 겨우살이/꼭기생(mistletoe)             | ++    | +     | +       |
| 회화나무(Japanese pagoda tree)      | ++    | ++    | +       |
| 구기자(Chinese Matrimony Vine )    | +     | +     | -       |
| 단풍마(Sevenlobed Yam)             | -     | +     | +       |
| 당귀(Gigantic angelica)           | -     | +     | +       |
| 돼지감자/똥단지(jerusalem artichoke)   | +     | +     | +       |
| 맥문동(Boardleaf Liriope)          | +     | +     | +       |
| 모과나무(Chinese Flowering-quince)  | ++    | +     | +       |
| 모란/목단(Tree Paeony)              | ++    | ++    | ++      |
| 민들레(Dandleion)                  | +     | +     | +       |
| 박하(Japanese Mint)               | +     | ++    | +       |
| 백출(Atractylodis Rhizoma)        | +     | +     | +       |
| 벌나무/산겨릅나무(Japanese maple)       | +     | ++    | +       |
| 뽕나무(White Mulberry)             | +     | +     | +       |
| 사삼/더덕(Lance Asiabell)           | -     | -     | +       |
| 산사나무(Large Chinese Hawthorn)    | -     | -     | +       |
| 산수유(Japanese Cornellian Cherry) | ++    | ++    | ++      |
| 삼채(Myanmar chive)               | +     | +     | +       |
| 석창포(Japanese sweet flag)        | -     | -     | +       |
| 쑥(Artemisia)                    | ++    | ++    | +       |
| 애기똥풀(Asian celandine)           | +     | +     | +       |
| 오가피(Acanthopanax)               | ++    | ++    | +       |
| 매실나무(Japanese Apricot)          | +     | +     | +       |
| 오미자(chinese magnolia vine)      | +     | +     | +       |
| 옥수수(corn)                       | -     | -     | +       |
| 옥죽(Yama-naruko-yuri)            | -     | -     | +       |
| 익모초(siberian motherwort)        | -     | -     | +       |
| 인도삼(Indian ginseng)             | +     | +     | +       |
| 자작나무(Japanese White Birch)      | +     | +     | +       |
| 대나무(Bamboo)                     | +     | +     | +       |
| 긴오이풀(Great Burnet)              | ++    | ++    | ++      |
| 귤(Unishiu orange)               | ++    | ++    | +       |
| 창출/삼주(Japanese atractylodes)    | -     | -     | +       |
| 천마(Tall Gastrodia)              | +     | +     | +       |
| 천문동(Cochinchinese Asparagus)    | -     | -     | +       |
| 하늘타리(Mongolian Snakegourd)      | -     | -     | +       |
| 대회향나무(Star anise)               | +     | +     | +       |
| 부들(Common cattail)              | +     | -     | +       |
| 향나무(Chinese Juniper)            | -     | +     | +       |
| 호랑가시나무(Horned Holly)            | ++    | ++    | +       |
| 홍화/잇꽃(Safflower)                | +     | +     | +       |
| 속썩음풀/황금(Baikal Skullcap)        | +     | ++    | +       |
| 황기(Membranous Milkvetch)        | +     | +     | +       |
| 황백나무(Amur Cork tree)            | +     | +     | -       |
| 후박나무(Machilus)                  | ++    | ++    | +       |
| 잠사 (Bombycis Excrementum)       | ++    | ++    | +       |

++: high, +: low, -: negative

(3) 항산화 효능 탐색(*in vitro*)

① DPPH free radical 제거 활성(%)

[표 10] DPPH assay를 이용한 냉수추출물, 열수추출물 및 유산균 배양액의 항산화 활성

| 국내 농산자원 목록                      | 냉수추출물 | 열수추출물 | 유산균 배양액 |
|---------------------------------|-------|-------|---------|
| 칠향(kudzu vine)                  | 0     | 0     | 0       |
| 감초(licorice)                    | 0     | 0     | 0       |
| 개똥쑥(Sweet Wormwood)             | 23.2  | 0     | 56      |
| 건지황(dried Adhesive Rehmannia)   | 30.4  | 44    | 45.2    |
| 겨우살이/곡기생(mistletoe)             | 0     | 60.1  | 49.4    |
| 회화나무(Japanese pagoda tree)      | 0     | 58.3  | 0       |
| 구기자(Chinese Matrimony Vine )    | 0     | 0     | 0       |
| 단풍마(Sevenlobed Yam)             | 0     | 50.6  | 55.4    |
| 당귀(Gigantic angelica)           | 0     | 0     | 32.7    |
| 돼지감자/똥단지(jerusalem artichoke)   | 0     | 0     | 0       |
| 맥문동(Boardleaf Liriope)          | 75.6  | 54.2  | 0       |
| 모과나무(Chinese Flowering-quince)  | 5.4   | 0     | 0       |
| 모란/목단(Tree Paeony)              | 0     | 0     | 0       |
| 민들레(Dandleion)                  | 0     | 0     | 0       |
| 박하(Japanese Mint)               | 0     | 0     | 0       |
| 백출(Atractylodis Rhizoma)        | 67.3  | 0     | 0       |
| 벌나무/산겨릅나무(Japanese maple)       | 0     | 0     | 0       |
| 뽕나무(White Mulberry)             | 0     | 0     | 0       |
| 사삼/더덕(Lance Asiabell)           | 45.2  | 0     | 0       |
| 산사나무(Large Chinese Hawthorn)    | 0     | 0     | 19      |
| 산수유(Japanese Cornellian Cherry) | 0     | 0     | 0       |
| 삼채(Myanmar chive)               | 0     | 0     | 46.4    |
| 석창포(Japanese sweet flag)        | 13.7  | 9.5   | 22      |
| 쑥(Artemisia)                    | 0     | 0     | 0       |
| 애기똥풀(Asian celandine)           | 0     | 0     | 0       |
| 오가피(Acanthopanax)               | 0     | 0     | 37.5    |
| 매실나무(Japanese Apricot)          | 0     | 0     | 36.3    |
| 오미자(chinese magnolia vine)      | 0     | 0     | 66.1    |
| 옥수수(corn)                       | 0     | 26.8  | 94      |
| 옥죽(Yama-naruko-yuri)            | 0     | 75.6  | 0       |
| 익모초(siberian motherwort)        | 29.8  | 29.8  | 85.1    |
| 인도삼(Indian ginseng)             | 35.7  | 0     | 80.4    |
| 자작나무(Japanese White Birch)      | 0     | 0     | 80.4    |
| 대나무(Bamboo)                     | 0     | 0     | 0       |
| 긴오이풀(Great Burnet)              | 0     | 0     | 0       |
| 귤(Unishiu orange)               | 0     | 0     | 33.3    |
| 창출/삼주(Japanese atractylodes)    | 0     | 0     | 80.4    |
| 천마(Tall Gastrodia)              | 70.8  | 3.6   | 0       |
| 천문동(Cochinchinese Asparagus)    | 39.3  | 54.2  | 69.6    |
| 하늘타리(Mongolian Snakegourd)      | 76.2  | 0     | 58.9    |
| 대회향나무(Star anise)               | 0     | 0     | 0       |
| 부들(Common cattail)              | 0     | 0     | 0       |
| 향나무(Chinese Juniper)            | 0     | 0     | 0       |
| 호랑가시나무(Horned Holly)            | 0     | 0     | 0       |
| 홍화/잇꽃(Safflower)                | 0     | 0     | 0       |
| 속썩음풀/황금(Baikal Skullcap)        | 0     | 8.9   | 98.8    |
| 황기(Membranous Milkvetch)        | 75.6  | 80.4  | 0       |
| 황백나무(Amur Cork tree)            | 0     | 0     | 0       |
| 후박나무(Machilus)                  | 0     | 0     | 0       |
| 잠사 (Bombycis Excrementum)       | 0     | 0     | 0       |

② ABTS free radical 제거 활성(%)

[표 11] ABTS assay를 이용한 냉수추출물, 열수추출물 및 유산균 배양액의 항산화 활성

| 국내 농산자원 목록                      | 냉수추출물 | 열수추출물 | 유산균 배양액 |
|---------------------------------|-------|-------|---------|
| 칠향(kudzu vine)                  | 0     | 56.7  | 4       |
| 감초(licorice)                    | 0     | 7.1   | 22.7    |
| 개똥쑥(Sweet Wormwood)             | 0     | 11.6  | 1.6     |
| 건지황(dried Adhesive Rehmannia)   | 10.8  | 12.1  | 8.4     |
| 겨우살이/꼭기생(mistletoe)             | 33.2  | 4.5   | 12.4    |
| 회화나무(Japanese pagoda tree)      | 14    | 9     | 4       |
| 구기자(Chinese Matrimony Vine )    | 16.1  | 4     | 27.2    |
| 단풍마(Sevenlobed Yam)             | 18.7  | 22.7  | 5.3     |
| 당귀(Gigantic angelica)           | 94.5  | 2.1   | 4.7     |
| 돼지감자/똥단지(jerusalem artichoke)   | 35.4  | 15.3  | 4.7     |
| 맥문동(Boardleaf Liriope)          | 63.6  | 8.7   | 29      |
| 모과나무(Chinese Flowering-quince)  | 0.8   | 0     | 1.1     |
| 모란/목단(Tree Paeony)              | 2.6   | 1.3   | 96.6    |
| 민들레(Dandleion)                  | 6.6   | 5.5   | 98.9    |
| 박하(Japanese Mint)               | 6.6   | 4.5   | 17.4    |
| 백출(Atractylodis Rhizoma)        | 6.9   | 6.9   | 2.1     |
| 벌나무/산겨릅나무(Japanese maple)       | 6.6   | 4.7   | 1.6     |
| 뽕나무(White Mulberry)             | 0     | 8.7   | 2.9     |
| 사삼/더덕(Lance Asiabell)           | 20.1  | 52.8  | 6.3     |
| 산사나무(Large Chinese Hawthorn)    | 10    | 1.3   | 7.7     |
| 산수유(Japanese Cornellian Cherry) | 2.1   | 0.3   | 2.6     |
| 삼채(Myanmar chive)               | 83.9  | 15.3  | 43.3    |
| 석창포(Japanese sweet flag)        | 2.4   | 0     | 3.7     |
| 쑥(Artemisia)                    | 2.9   | 2.6   | 2.6     |
| 애기똥풀(Asian celandine)           | 73.4  | 3.2   | 3.2     |
| 오가피(Acanthopanax)               | 2.6   | 2.1   | 4.2     |
| 매실나무(Japanese Apricot)          | 3.2   | 6.9   | 7.7     |
| 오미자(chinese magnolia vine)      | 32.7  | 8.7   | 17.9    |
| 옥수수(corn)                       | 3.4   | 11.6  | 8.4     |
| 옥죽(Yama-naruko-yuri)            | 10.3  | 84.7  | 8.7     |
| 익모초(siberian motherwort)        | 6.1   | 0.3   | 9       |
| 인도삼(Indian ginseng)             | 4.5   | 0.3   | 8.2     |
| 자작나무(Japanese White Birch)      | 2.1   | 7.9   | 8.2     |
| 대나무(Bamboo)                     | 5.8   | 1.3   | 18.5    |
| 긴오이풀(Great Burnet)              | 5     | 2.9   | 96.3    |
| 귤(Unishiu orange)               | 1.1   | 11.1  | 13.7    |
| 창출/삼주(Japanese atractylodes)    | 98.7  | 1.6   | 3.4     |
| 천마(Tall Gastrodia)              | 5     | 8.4   | 7.4     |
| 천문동(Cochinchinese Asparagus)    | 5     | 0.8   | 32.7    |
| 하늘타리(Mongolian Snakegourd)      | 2.6   | 7.1   | 7.9     |
| 대회향나무(Star anise)               | 0     | 0     | 11.3    |
| 부들(Common cattail)              | 0     | 9.5   | 38.8    |
| 향나무(Chinese Juniper)            | 4.5   | 1.6   | 21.1    |
| 호랑가시나무(Horned Holly)            | 4.7   | 23    | 4.5     |
| 홍화/잇꽃(Safflower)                | 10    | 2.9   | 8.4     |
| 속씨옴풀/황금(Baikal Skullcap)        | 74.4  | 0     | 2.1     |
| 황기(Membranous Milkvetch)        | 5     | 0.5   | 11.9    |
| 황백나무(Amur Cork tree)            | 4     | 3.7   | 6.3     |
| 후박나무(Machilus)                  | 3.2   | 35.1  | 4.5     |
| 잠사 (Bombycis Excrementum)       | 25.6  | 2.6   | 7.9     |

(4) 항균 효능 탐색(*in vitro*)

① 그람음성 *Escherichia coli*

[표 12] 디스크확산법에 의한 대장균에 대한 냉수추출물, 열수추출물 및 유산균 배양액의 항균활성

| 국내 농산자원 목록                     | 냉수추출물     | 열수추출물     | 유산균 배양액   |
|--------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| 참( kudzu vine)                 | -         | -         | 1.4 x 1.3 |
| 감초(licorice)                   | -         | -         | 1.5 x 1.4 |
| 개똥쑥(Sweet Wormwood)            | -         | -         | 1.1 x 1.0 |
| 건지황(dried Adhesive Rehmannia)  | -         | -         | 1.3 x 1.2 |
| 겨우살이/꼭기생(mistletoe)            | -         | -         | 1.3 x 1.3 |
| 회화나무(Japanese pagoda tree)     | -         | -         | 1.1 x 1.0 |
| 구기자(Chinese Matrimony Vine )   | -         | -         | 1.0 x 1.0 |
| 단풍마(Sevenlobed Yam)            | -         | -         | 1.3 x 1.2 |
| 당귀(Gigantic angelica)          | -         | -         | 1.2 x 1.3 |
| 돼지감자/똥단지(jerusalem artichoke)  | -         | -         | 1.0 x 1.0 |
| 맥문동(Boardleaf Liriope)         | -         | -         | 1.2 x 1.2 |
| 모과나무(Chinese Flowering-quince) | -         | -         | 1.3 x 1.1 |
| 모란/목단(Tree Paeony)             | -         | -         | 1.2 x 1.2 |
| 민들레(Dandleion)                 | -         | -         | 1.0 x 1.0 |
| 박하(Japanese Mint)              | -         | -         | 1.0 x 1.0 |
| 백출(Attractylodis Rhizoma)      | -         | -         | 1.0 x 1.1 |
| 별나무/산겨릅나무(Japanese maple)      | -         | -         | 0.9 x 0.9 |
| 뽕나무(White Mulberry)            | -         | 1.1 x 1.2 | 1.2 x 1.2 |
| 사삼/더덕(Lance Asiabell)          | -         | -         | 1.0 x 1.0 |
| 산사나무(Large Chinese Hawthorn)   | 1.3 x 1.4 | 1.4 x 1.3 | 1.1 x 1.0 |
| 산수유(Japanese Cornelian Cherry) | 1.5 x 1.5 | 1.5 x 1.6 | 1.4 x 1.5 |
| 삼채(Myanmar chive)              | 1.3 x 1.3 | -         | 1.2 x 1.2 |
| 석창포(Japanese sweet flag)       | -         | -         | 1.1 x 1.0 |
| 쑥(Artemisia)                   | -         | -         | 1.1 x 1.1 |
| 애기똥풀(Asian celandine)          | -         | -         | 1.0 x 1.0 |
| 오가피(Acanthopanax)              | -         | -         | 1.1 x 1.2 |
| 매실나무(Japanese Apricot)         | 1.5 x 1.5 | 1.6 x 1.6 | 1.3 x 1.4 |
| 오미자(chinese magnolia vine)     | 1.5 x 1.3 | 1.3 x 1.4 | 1.4 x 1.5 |
| 옥수수(corn)                      | -         | -         | 1.2 x 1.1 |
| 육죽(Yama-naruko-yuri)           | -         | -         | 1.1 x 1.1 |
| 익모초(siberian motherwort)       | -         | -         | 1.1 x 1.1 |
| 인도삼(Indian ginseng)            | -         | -         | 1.1 x 1.1 |
| 자작나무(Japanese White Birch)     | -         | -         | 1.4 x 1.3 |
| 대나무(Bamboo)                    | -         | -         | 1.5 x 1.3 |
| 긴오이풀(Great Burnet)             | -         | -         | 1.2 x 1.1 |
| 귤(Unishiu orange)              | -         | -         | 1.4 x 1.3 |
| 창출/삽주(Japanese atractylodes)   | -         | -         | 1.3 x 1.4 |
| 천마(Tall Gastrodia)             | -         | -         | 1.2 x 1.3 |
| 천문동(Cochinchinese Asparagus)   | -         | -         | 1.4 x 1.4 |
| 하늘타리(Mongolian Snakegourd)     | -         | -         | 1.4 x 1.4 |
| 대회향나무(Star anise)              | -         | -         | 1.3 x 1.3 |
| 부들(Common cattail)             | -         | -         | -         |
| 향나무(Chinese Juniper)           | -         | -         | 1.2 x 1.2 |
| 호랑가시나무(Horned Holly)           | -         | -         | 1.0 x 0.9 |
| 홍화/잇꽃(Safflower)               | -         | -         | 1.0 x 1.0 |
| 속씨음풀/황금(Baikal Skullcap)       | -         | -         | 1.1 x 0.9 |
| 황기(Membranous Milkvetch)       | -         | -         | 1.0 x 1.0 |
| 황백나무(Amur Cork tree)           | -         | -         | 0.9 x 0.9 |
| 후박나무(Machilus)                 | -         | -         | 1.1 x 1.0 |
| 잠사 (Bombycis Excrementum)      | -         | -         | -         |

|       |            |           |               |           |
|-------|------------|-----------|---------------|-----------|
| 양성대조구 | Ampicillin | 1.3 x 1.5 | Spectinomycin | 0.8 x 0.8 |
|       | Kanamycin  | 1.5 x 1.1 | Timentin      | 1.1 x 1.1 |

② 그람음성 *Vibrio parahaemolyticus*

[표 13] 디스크확산법에 의한 장염비브리오균에 대한 냉수추출물, 열수추출물 및 유산균 배양액의 항균활성

| 국내 농산자원 목록                     | 냉수추출물     | 열수추출물     | 유산균 배양액   |
|--------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| 참( kudzu vine)                 | -         | -         | 1.1 x 1.1 |
| 감초(licorice)                   | -         | -         | 1.2 x 1.1 |
| 개동쑥(Sweet Wormwood)            | -         | -         | 1.1 x 1.1 |
| 건지황(dried Adhesive Rehmannia)  | -         | -         | 1.3 x 1.3 |
| 겨우살이/꼭기생(mistletoe)            | -         | -         | 1.3 x 1.3 |
| 회화나무(Japanese pagoda tree)     | -         | -         | 1.1 x 1.1 |
| 구기자(Chinese Matrimony Vine )   | -         | -         | 1.3 x 1.2 |
| 단풍마(Sevenlobed Yam)            | -         | -         | 1.4 x 1.4 |
| 당귀(Gigantic angelica)          | -         | -         | 1.2 x 1.1 |
| 돼지감자/똥단지(jerusalem artichoke)  | -         | -         | 1.0 x 1.1 |
| 맥문동(Boardleaf Liriope)         | -         | -         | 1.2 x 1.2 |
| 모과나무(Chinese Flowering-quince) | -         | -         | 1.0 x 1.1 |
| 모란/목단(Tree Paeony)             | -         | -         | 1.1 x 1.1 |
| 민들레(Dandleion)                 | -         | -         | 1.2 x 1.3 |
| 박하(Japanese Mint)              | -         | -         | 1.2 x 1.3 |
| 백출(Attractylodis Rhizoma)      | -         | -         | 1.1 x 1.1 |
| 별나무/산겨릅나무(Japanese maple)      | -         | -         | 1.1 x 1.1 |
| 뽕나무(White Mulberry)            | -         | 1.1 x 1.1 | 1.4 x 1.4 |
| 사삼/더덕(Lance Asiabell)          | -         | -         | 1.2 x 1.2 |
| 산사나무(Large Chinese Hawthorn)   | 1.2 x 1.2 | 1.1 x 1.1 | 1.1 x 1.1 |
| 산수유(Japanese Cornelian Cherry) | 1.2 x 1.2 | 1.2 x 1.1 | 1.3 x 1.3 |
| 삼채(Myanmar chive)              | -         | -         | 1.2 x 1.2 |
| 석창포(Japanese sweet flag)       | -         | -         | 1.2 x 1.2 |
| 쑥(Artemisia)                   | -         | -         | 1.0 x 1.0 |
| 애기똥풀(Asian celandine)          | -         | -         | 1.2 x 1.2 |
| 오가피(Acanthopanax)              | -         | -         | 1.1 x 1.1 |
| 매실나무(Japanese Apricot)         | 1.3 x 1.3 | 1.1 x 1.1 | 1.2 x 1.3 |
| 오미자(chinese magnolia vine)     | 1.3 x 1.4 | 1.1 x 1.1 | 1.4 x 1.5 |
| 옥수수(corn)                      | -         | -         | 1.2 x 1.2 |
| 육죽(Yama-naruko-yuri)           | -         | -         | 1.1 x 1.0 |
| 익모초(siberian motherwort)       | -         | -         | 1.3 x 1.2 |
| 인도삼(Indian ginseng)            | -         | -         | 1.1 x 1.2 |
| 자작나무(Japanese White Birch)     | -         | -         | 1.3 x 1.4 |
| 대나무(Bamboo)                    | -         | -         | 1.4 x 1.6 |
| 긴오이풀(Great Burnet)             | -         | -         | 1.3 x 1.1 |
| 귤(Unishiu orange)              | -         | -         | 1.1 x 1.2 |
| 창출/삽주(Japanese atractylodes)   | -         | -         | 1.2 x 1.1 |
| 천마(Tall Gastrodia)             | -         | -         | 1.2 x 1.2 |
| 천문동(Cochinchinese Asparagus)   | -         | -         | 1.2 x 1.2 |
| 하늘타리(Mongolian Snakegourd)     | -         | -         | 1.3 x 1.5 |
| 대회향나무(Star anise)              | -         | -         | 1.3 x 1.3 |
| 부들(Common cattail)             | -         | -         | 0.9 x 1.0 |
| 향나무(Chinese Juniper)           | -         | -         | 1.5 x 1.4 |
| 호랑가시나무(Horned Holly)           | -         | -         | 1.2 x 1.1 |
| 홍화/잇꽃(Safflower)               | -         | -         | 1.4 x 1.4 |
| 속씨음풀/황금(Baikal Skullcap)       | -         | -         | 1.1 x 1.1 |
| 황기(Membranous Milkvetch)       | -         | -         | 1.5 x 1.4 |
| 황백나무(Amur Cork tree)           | -         | -         | 1.2 x 1.2 |
| 후박나무(Machilus)                 | -         | -         | 1.1 x 1.1 |
| 잠사 (Bombycis Excrementum)      | -         | -         | 1.0 x 1.0 |

|       |            |           |               |           |
|-------|------------|-----------|---------------|-----------|
| 양성대조구 | Ampicillin | 1.3 x 1.4 | Spectinomycin | 0.8 x 0.8 |
|       | Kanamycin  | 1.2 x 1.1 | Timentin      | 1.1 x 1.1 |

③ 그람양성 *Listeria monocytogens*

[표 14] 디스크확산법에 의한 리스테리아균에 대한 냉수추출물, 열수추출물 및 유산균 배양액의 항균활성

| 국내 농산자원 목록                      | 냉수추출물       | 열수추출물     | 유산균 배양액   |
|---------------------------------|-------------|-----------|-----------|
| 칠틈(kudzu vine)                  | -           | -         | -         |
| 감초(licorice)                    | -           | -         | -         |
| 개똥쑥(Sweet Wormwood)             | -           | -         | -         |
| 건지황(dried Adhesive Rehmannia)   | -           | -         | -         |
| 겨우살이/꼭기생(mistletoe)             | 0.9 x 0.9   | -         | -         |
| 회화나무(Japanese pagoda tree)      | -           | -         | -         |
| 구기자(Chinese Matrimony Vine )    | -           | -         | -         |
| 단풍마(Sevenlobed Yam)             | 0.8 x 0.9   | -         | -         |
| 당귀(Gigantic angelica)           | 0.9 x 0.9   | -         | -         |
| 돼지감자/똥단지(jerusalem artichoke)   | -           | -         | -         |
| 맥문동(Boardleaf Liriope)          | 0.9 x 0.8   | -         | -         |
| 모과나무(Chinese Flowering-quince)  | -           | -         | -         |
| 모란/목단(Tree Paeony)              | 0.9 x 0.7   | -         | -         |
| 민들레(Dandleion)                  | -           | -         | -         |
| 박하(Japanese Mint)               | 0.8 x 0.8   | -         | -         |
| 백출(Atractylodis Rhizoma)        | 0.9 x 0.7   | -         | -         |
| 벌나무/산겨릅나무(Japanese maple)       | -           | -         | -         |
| 뽕나무(White Mulberry)             | 1.0 x 1.0   | -         | -         |
| 사삼/더덕(Lance Asiabell)           | 0.8 x 0.9   | -         | -         |
| 산사나무(Large Chinese Hawthorn)    | 0.9 x 1.0   | -         | -         |
| 산수유(Japanese Cornellian Cherry) | 1.0 x 1.0   | 1.0 x 1.1 | -         |
| 삼채(Myanmar chive)               | 0.75 x 0.70 | -         | 1.0 x 1.0 |
| 석창포(Japanese sweet flag)        | 0.8 x 0.9   | -         | -         |
| 쑥(Artemisia)                    | 0.8 x 0.8   | -         | 1.0 x 1.0 |
| 애기똥풀(Asian celandine)           | -           | -         | -         |
| 오가피(Acanthopanax)               | -           | -         | -         |
| 매실나무(Japanese Apricot)          | 1.0 x 1.1   | -         | 1.1 x 1.3 |
| 오미자(chinese magnolia vine)      | 0.8 x 0.8   | -         | 1.0 x 1.0 |
| 옥수수(corn)                       | -           | -         | -         |
| 옥죽(Yama-naruko-yuri)            | -           | -         | -         |
| 익모초(siberian motherwort)        | -           | -         | -         |
| 인도삼(Indian ginseng)             | -           | -         | -         |
| 자작나무(Japanese White Birch)      | -           | -         | 1.0 x 1.0 |
| 대나무(Bamboo)                     | -           | -         | 1.0 x 1.0 |
| 긴오이풀(Great Burnet)              | -           | -         | -         |
| 귤(Unishiu orange)               | -           | -         | -         |
| 창출/삽주(Japanese atractylodes)    | -           | -         | -         |
| 천마(Tall Gastrodia)              | -           | -         | -         |
| 천문동(Cochinchinese Asparagus)    | -           | -         | -         |
| 하늘타리(Mongolian Snakegourd)      | -           | -         | -         |
| 대회향나무(Star anise)               | -           | -         | -         |
| 부들(Common cattail)              | -           | -         | -         |
| 향나무(Chinese Juniper)            | -           | -         | 1.0 x 0.8 |
| 호랑가시나무(Horned Holly)            | -           | -         | -         |
| 홍화/잇꽃(Safflower)                | -           | -         | 0.9 x 0.9 |
| 속씨음푼/황금(Baikal Skullcap)        | -           | -         | -         |
| 황기(Membranous Milkvetch)        | -           | -         | 0.9 x 0.9 |
| 황백나무(Amur Cork tree)            | -           | -         | -         |
| 후박나무(Machilus)                  | -           | -         | -         |
| 잠사 (Bombycis Excrementum)       | -           | -         | -         |

|       |            |           |               |           |
|-------|------------|-----------|---------------|-----------|
| 양성대조구 | Ampicillin | -         | Spectinomycin | 1.1 x 1.1 |
|       | Kanamycin  | 1.1 x 1.1 | Timentin      | -         |

④ 그람양성 *Staphylococcus aureus*

[표 15] 디스크확산법에 의한 포도상구균에 대한 냉수추출물, 열수추출물 및 유산균 배양액의 항균활성

| 국내 농산자원 목록                      | 냉수추출물     | 열수추출물     | 유산균 배양액   |
|---------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| 칠틈(kudzu vine)                  | -         | -         | 1.4 x 1.5 |
| 감초(licorice)                    | -         | -         | 1.5 x 1.5 |
| 개똥쑥(Sweet Wormwood)             | -         | -         | 1.6 x 1.7 |
| 건지황(dried Adhesive Rehmannia)   | -         | -         | 1.5 x 1.5 |
| 겨우살이/곡기생(mistletoe)             | -         | -         | 1.7 x 1.7 |
| 회화나무(Japanese pagoda tree)      | -         | -         | 1.4 x 1.4 |
| 구기자(Chinese Matrimony Vine )    | -         | -         | 1.4 x 1.3 |
| 단풍마(Sevenlobed Yam)             | -         | -         | 1.6 x 1.6 |
| 당귀(Gigantic angelica)           | -         | -         | 1.3 x 1.3 |
| 돼지감자/똥단지(jerusalem artichoke)   | -         | -         | 1.4 x 1.4 |
| 맥문동(Boardleaf Liriope)          | -         | -         | 1.3 x 1.4 |
| 모과나무(Chinese Flowering-quince)  | -         | -         | 1.4 x 1.4 |
| 모란/목단(Tree Paeony)              | -         | -         | 1.5 x 1.5 |
| 민들레(Dandleion)                  | -         | -         | 1.3 x 1.4 |
| 박하(Japanese Mint)               | -         | -         | 1.3 x 1.2 |
| 백출(Atractylodis Rhizoma)        | -         | -         | 1.2 x 1.2 |
| 벌나무/산겨릅나무(Japanese maple)       | -         | -         | 1.3 x 1.3 |
| 뽕나무(White Mulberry)             | -         | 0.9 x 1.0 | 1.5 x 1.5 |
| 사삼/더덕(Lance Asiabell)           | -         | -         | 1.4 x 1.4 |
| 산사나무(Large Chinese Hawthorn)    | 1.3 x 1.3 | 1.2 x 1.2 | 1.3 x 1.2 |
| 산수유(Japanese Cornellian Cherry) | 1.2 x 1.3 | 1.1 x 1.2 | 1.4 x 1.4 |
| 삼채(Myanmar chive)               | 1.0 x 1.0 | -         | 1.4 x 1.5 |
| 석창포(Japanese sweet flag)        | -         | -         | 1.5 x 1.5 |
| 쑥(Artemisia)                    | -         | -         | 1.3 x 1.2 |
| 애기똥풀(Asian celandine)           | -         | -         | 1.6 x 1.6 |
| 오가피(Acanthopanax)               | -         | -         | 1.4 x 1.4 |
| 매실나무(Japanese Apricot)          | 1.5 x 1.6 | 1.1 x 1.2 | 1.5 x 1.5 |
| 오미자(chinese magnolia vine)      | 1.5 x 1.4 | 1.1 x 1.1 | 1.5 x 1.5 |
| 옥수수(corn)                       | -         | -         | 1.3 x 1.3 |
| 옥죽(Yama-naruko-yuri)            | -         | -         | 1.0 x 1.0 |
| 익모초(siberian motherwort)        | -         | -         | 1.1 x 1.1 |
| 인도삼(Indian ginseng)             | -         | -         | 1.2 x 1.1 |
| 자작나무(Japanese White Birch)      | -         | -         | 1.3 x 1.2 |
| 대나무(Bamboo)                     | -         | -         | 1.3 x 1.2 |
| 긴오이풀(Great Burnet)              | -         | -         | 1.1 x 1.1 |
| 귤(Unishiu orange)               | -         | -         | 1.4 x 1.4 |
| 창출/삽주(Japanese atractylodes)    | -         | -         | 1.3 x 1.3 |
| 천마(Tall Gastrodia)              | -         | -         | 1.2 x 1.2 |
| 천문동(Cochinchinese Asparagus)    | -         | -         | 1.3 x 1.4 |
| 하늘타리(Mongolian Snakegourd)      | -         | -         | 1.3 x 1.4 |
| 대회향나무(Star anise)               | -         | -         | 1.4 x 1.4 |
| 부들(Common cattail)              | -         | -         | 0.9 x 0.9 |
| 향나무(Chinese Juniper)            | -         | -         | 1.3 x 1.3 |
| 호랑가시나무(Horned Holly)            | -         | -         | 1.1 x 1.1 |
| 홍화/잇꽃(Safflower)                | -         | -         | 1.4 x 1.4 |
| 속씨음푼/황금(Baikal Skullcap)        | -         | -         | 1.3 x 1.2 |
| 황기(Membranous Milkvetch)        | -         | -         | 1.2 x 1.3 |
| 황백나무(Amur Cork tree)            | -         | -         | 1.1 x 1.0 |
| 후박나무(Machilus)                  | -         | -         | 0.9 x 0.9 |
| 잠사 (Bombycis Excrementum)       | -         | -         | -         |

|       |            |           |               |           |
|-------|------------|-----------|---------------|-----------|
| 양성대조구 | Ampicillin | 1.3 x 1.5 | Spectinomycin | 0.8 x 0.8 |
|       | Kanamycin  | 1.5 x 1.1 | Timentin      | 1.1 x 1.1 |

⑤ 그람양성 *Propionibacterium acnes*

[표 16] 디스크확산법에 의한 여드름균에 대한 냉수추출물, 열수추출물 및 유산균 배양액의 항균활성

| 국내 농산자원 목록                      | 냉수추출물     | 열수추출물     | 유산균 배양액   |
|---------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| 칠향(kudzu vine)                  | -         | -         | 2.6 x 2.7 |
| 감초(licorice)                    | -         | -         | 1.5 x 1.5 |
| 개똥쑥(Sweet Wormwood)             | -         | -         | 2.4 x 2.3 |
| 건지황(dried Adhesive Rehmannia)   | -         | -         | 2.0 x 2.1 |
| 겨우살이/곡기생(mistletoe)             | -         | -         | -         |
| 회화나무(Japanese pagoda tree)      | -         | -         | 1.6 x 1.9 |
| 구기자(Chinese Matrimony Vine )    | -         | -         | 1.5 x 1.5 |
| 단풍마(Sevenlobed Yam)             | -         | -         | -         |
| 당귀(Gigantic angelica)           | -         | -         | -         |
| 돼지감자/똥단지(jerusalem artichoke)   | -         | -         | -         |
| 맥문동(Boardleaf Liriope)          | -         | -         | -         |
| 모과나무(Chinese Flowering-quince)  | -         | -         | -         |
| 모란/목단(Tree Paeony)              | -         | 1.6 x 1.5 | -         |
| 민들레(Dandleion)                  | -         | -         | 1.5 x 1.5 |
| 박하(Japanese Mint)               | -         | -         | 2.2 x 2.4 |
| 백출(Atractylodis Rhizoma)        | -         | -         | 1.6 x 1.9 |
| 벌나무/산겨릅나무(Japanese maple)       | -         | -         | 2.1 x 2.2 |
| 뽕나무(White Mulberry)             | -         | 1.5 x 1.4 | 1.4 x 1.5 |
| 사삼/더덕(Lance Asiabell)           | 3.1 x 3.2 | -         | 1.5 x 1.5 |
| 산사나무(Large Chinese Hawthorn)    | -         | 1.2 x 1.2 | 1.4 x 1.5 |
| 산수유(Japanese Cornellian Cherry) | 1.5 x 1.4 | 1.5 x 1.5 | 1.5 x 1.5 |
| 삼채(Myanmar chive)               | -         | -         | 1.5 x 1.6 |
| 석창포(Japanese sweet flag)        | -         | -         | -         |
| 쑥(Artemisia)                    | -         | -         | 2.2 x 2.5 |
| 애기똥풀(Asian celandine)           | -         | -         | 1.5 x 1.9 |
| 오가피(Acanthopanax)               | 1.7 x 1.6 | -         | -         |
| 매실나무(Japanese Apricot)          | -         | 2.3 x 2.2 | 1.4 x 1.7 |
| 오미자(chinese magnolia vine)      | -         | 1.5 x 1.5 | 1.6 x 1.6 |
| 옥수수(corn)                       | -         | -         | 2.8 x 2.9 |
| 옥죽(Yama-naruko-yuri)            | -         | -         | -         |
| 익모초(siberian motherwort)        | -         | 2.9 x 2.7 | 1.8 x 1.6 |
| 인도삼(Indian ginseng)             | 2.8 x 3.0 | 2.0 x 1.8 | 2.1 x 2.3 |
| 자작나무(Japanese White Birch)      | -         | -         | 1.8 x 1.8 |
| 대나무(Bamboo)                     | -         | -         | 1.7 x 1.8 |
| 긴오이풀(Great Burnet)              | 3.2 x 3.0 | 3.4 x 3.5 | 2.9 x 2.5 |
| 굴(Unishiu orange)               | -         | -         | 2.0 x 2.2 |
| 창출/삽주(Japanese atractylodes)    | 2.7 x 2.8 | -         | 2.1 x 2.2 |
| 천마(Tall Gastrodia)              | 1.9 x 2.1 | -         | 1.9 x 2.1 |
| 천문동(Cochinchinese Asparagus)    | -         | -         | 2.0 x 2.2 |
| 하늘타리(Mongolian Snakegourd)      | -         | -         | 2.0 x 2.0 |
| 대회향나무(Star anise)               | -         | -         | 2.1 x 2.3 |
| 부들(Common cattail)              | -         | -         | -         |
| 향나무(Chinese Juniper)            | -         | -         | -         |
| 호랑가시나무(Horned Holly)            | -         | -         | -         |
| 홍화/잇꽃(Safflower)                | -         | -         | -         |
| 속씨음푼/황금(Baikal Skullcap)        | -         | 1.5 x 1.5 | -         |
| 황기(Membranous Milkvetch)        | 2.4 x 2.3 | -         | -         |
| 황백나무(Amur Cork tree)            | 1.9 x 1.9 | -         | -         |
| 후박나무(Machilus)                  | 2.5 x 2.6 | -         | 1.6 x 1.9 |
| 잠사 (Bombycis Excrementum)       | -         | -         | -         |

|       |            |           |               |   |
|-------|------------|-----------|---------------|---|
| 양성대조구 | Ampicillin | -         | Spectinomycin | - |
|       | Kanamycin  | 3.1 x 3.0 | Timentin      | - |

(5) 미백 효능 탐색(*in vitro*) tyrosinase 억제 활성

① tyrosinase 억제 활성: 기질 (L-DOPA)

[표 20] 냉수추출물, 열수추출물 및 유산균 배양액(0.2 mg/mL)의 tyrosinase 억제 활성(%)

| 국내 농산자원 목록                     | 냉수추출물 | 열수추출물 | 유산균 배양액 |
|--------------------------------|-------|-------|---------|
| 참( kudzu vine)                 | 91.0  | 95.0  | 88.0    |
| 감초(licorice)                   | 90.4  | 92.6  | 0       |
| 개똥쑥(Sweet Wormwood)            | 85.3  | 95.9  | 0       |
| 건지황(dried Adhesive Rehmannia)  | 91.4  | 95.6  | 89.3    |
| 겨우살이/꼭기생(mistletoe)            | 0     | 93.8  | 0       |
| 회화나무(Japanese pagoda tree)     | 88.1  | 94.3  | 78.6    |
| 구기자(Chinese Matrimony Vine )   | 96.3  | 92.3  | 93.3    |
| 단풍마(Sevenlobed Yam)            | 61.5  | 60.0  | 80.0    |
| 당귀(Gigantic angelica)          | 70.6  | 81.8  | 0       |
| 돼지감자/똥단지(jerusalem artichoke)  | 0     | 90.9  | 70.0    |
| 맥문동(Boardleaf Liriope)         | 76.2  | 0     | 87.5    |
| 모과나무(Chinese Flowering-quince) | 76.2  | 90.0  | 25.0    |
| 모란/목단(Tree Paeony)             | 79.2  | 85.7  | 57.1    |
| 민들레(Dandleion)                 | 91.7  | 94.1  | 75.0    |
| 박하(Japanese Mint)              | 91.1  | 90.0  | 90.3    |
| 백출(Attractylodis Rhizoma)      | 50.0  | 0     | 25.0    |
| 별나무/산겨릅나무(Japanese maple)      | 85.7  | 88.2  | 0       |
| 뽕나무(White Mulberry)            | 95.2  | 90.5  | 0       |
| 사삼/더덕(Lance Asiabell)          | 68.8  | 0     | 66.7    |
| 산사나무(Large Chinese Hawthorn)   | 77.3  | 77.8  | 85.0    |
| 산수유(Japanese Cornelian Cherry) | 93.4  | 0     | 0       |
| 삼채(Myanmar chive)              | 0     | 0     | 80.0    |
| 석창포(Japanese sweet flag)       | 0     | 33.3  | 0       |
| 쑥(Artemisia)                   | 0     | 87.5  | 90.3    |
| 애기똥풀(Asian celandine)          | 0     | 97.2  | 0       |
| 오가피(Acanthopanax)              | 90.7  | 97.4  | 0       |
| 매실나무(Japanese Apricot)         | 97.2  | 99.0  | 0       |
| 오미자(chinese magnolia vine)     | 95.8  | 98.3  | 50.0    |
| 옥수수(corn)                      | 91.5  | 97.3  | 0       |
| 육죽(Yama-naruko-yuri)           | 92.6  | 97.3  | 0       |
| 익모초(siberian motherwort)       | 87.3  | 96.9  | 0       |
| 인도삼(Indian ginseng)            | 82.8  | 96.9  | 0       |
| 자작나무(Japanese White Birch)     | 77.3  | 97.7  | 0       |
| 대나무(Bamboo)                    | 87.2  | 97.6  | 0       |
| 긴오이풀(Great Burnet)             | 89.1  | 97.1  | 76.9    |
| 귤(Unishiu orange)              | 84.4  | 97.4  | 0       |
| 창출/삽주(Japanese atractylodes)   | 90.0  | 97.1  | 0       |
| 천마(Tall Gastrodia)             | 87.8  | 97.0  | 70.0    |
| 천문동(Cochinchinese Asparagus)   | 79.2  | 97.5  | 0       |
| 하늘타리(Mongolian Snakegourd)     | 84.4  | 98.2  | 0       |
| 대회향나무(Star anise)              | 92.9  | 96.6  | 0       |
| 부들(Common cattail)             | 89.1  | 97.1  | 0       |
| 향나무(Chinese Juniper)           | 82.1  | 97.2  | 0       |
| 호랑가시나무(Horned Holly)           | 91.1  | 97.7  | 0       |
| 홍화/잇꽃(Safflower)               | 73.7  | 97.4  | 0       |
| 속씨음풀/황금(Baikal Skullcap)       | 73.7  | 97.3  | 57.1    |
| 황기(Membranous Milkvetch)       | 82.8  | 97.7  | 40.0    |
| 황백나무(Amur Cork tree)           | 80.8  | 97.8  | 0       |
| 후박나무(Machilus)                 | 90.9  | 97.0  | 0       |
| 잠사 (Bombycis Excrementum)      | 79.2  | 97.3  | 0       |

|       |                 |      |      |      |
|-------|-----------------|------|------|------|
| 양성대조구 | Kojic acid 50μM | 78.3 | 92.6 | 89.7 |
| 음성대조구 | assay buffer    | 0    | 0    | 0    |

② elastase 억제 활성: 기질 [N-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide]

[표 21] 냉수추출물, 열수추출물 및 유산균 배양액(0.2 mg/mL)의 elastase의 억제 활성(OD 410nm)

| 국내 농산자원 목록                     | 냉수추출물 | 열수추출물 | 유산균 배양액 |
|--------------------------------|-------|-------|---------|
| 참( kudzu vine)                 | 0.007 | 0.008 | 0       |
| 감초(licorice)                   | 0.012 | 0.006 | 0.015   |
| 개똥쑥(Sweet Wormwood)            | 0.002 | 0.007 | 0.022   |
| 건지황(dried Adhesive Rehmannia)  | 0.011 | 0.007 | 0.012   |
| 겨우살이/꼭기생(mistletoe)            | 0.013 | 0.001 | 0.007   |
| 회화나무(Japanese pagoda tree)     | 0.005 | 0.017 | 0.009   |
| 구기자(Chinese Matrimony Vine )   | 0.012 | 0.008 | 0.003   |
| 단풍마(Sevenlobed Yam)            | 0.012 | 0     | 0.011   |
| 당귀(Gigantic angelica)          | 0.010 | 0.007 | 0.019   |
| 돼지감자/똥단지(jerusalem artichoke)  | 0.015 | 0     | 0.007   |
| 맥문동(Boardleaf Liriope)         | 0.001 | 0.008 | 0.011   |
| 모과나무(Chinese Flowering-quince) | 0.006 | 0.008 | 0.004   |
| 모란/목단(Tree Paeony)             | 0.008 | 0.007 | 0.009   |
| 민들레(Dandleion)                 | 0.011 | 0.009 | 0.009   |
| 박하(Japanese Mint)              | 0.011 | 0.007 | 0.006   |
| 백출(Atractylodis Rhizoma)       | 0.012 | 0.006 | 0.007   |
| 벌나무/산겨릅나무(Japanese maple)      | 0.032 | 0.010 | 0.007   |
| 뽕나무(White Mulberry)            | 0.054 | 0.015 | 0.008   |
| 사삼/더덕(Lance Asiabell)          | 0.011 | 0.007 | 0.009   |
| 산사나무(Large Chinese Hawthorn)   | 0.010 | 0.023 | 0       |
| 산수유(Japanese Cornelian Cherry) | 0.006 | 0.000 | 0.005   |
| 삼채(Myanmar chive)              | 0.011 | 0.007 | 0.009   |
| 석창포(Japanese sweet flag)       | 0.008 | 0.016 | 0.007   |
| 쑥(Artemisia)                   | 0.013 | 0.012 | 0.016   |
| 애기똥풀(Asian celandine)          | 0.007 | 0.001 | 0.008   |
| 오가피(Acanthopanax)              | 0.005 | 0     | 0.007   |
| 매실나무(Japanese Apricot)         | 0     | 0     | 0.009   |
| 오미자(chinese magnolia vine)     | 0.013 | 0.030 | 0.006   |
| 옥수수(corn)                      | 0.011 | 0     | 0.008   |
| 옥죽(Yama-naruko-yuri)           | 0.006 | 0.007 | 0.011   |
| 익모초(siberian motherwort)       | 0     | 0     | 0.008   |
| 인도삼(Indian ginseng)            | 0     | 0.035 | 0.009   |
| 자작나무(Japanese White Birch)     | 0.002 | 0     | 0.009   |
| 대나무(Bamboo)                    | 0.002 | 0     | 0.119   |
| 긴오이풀(Great Burnet)             | 0     | 0     | 0.005   |
| 귤(Unishiu orange)              | 0.012 | 0     | 0.007   |
| 창출/삼주(Japanese atractylodes)   | 0     | 0     | 0.008   |
| 천마(Tall Gastrodia)             | 0.003 | 0     | 0.007   |
| 천문동(Cochinchinese Asparagus)   | 0     | 0     | 0.006   |
| 하늘타리(Mongolian Snakegourd)     | 0.001 | 0.013 | 0.008   |
| 대회향나무(Star anise)              | 0.002 | 0     | 0.014   |
| 부들(Common cattail)             | 0     | 0     | 0.007   |
| 향나무(Chinese Juniper)           | 0     | 0     | 0.007   |
| 호랑가시나무(Horned Holly)           | 0.009 | 0     | 0.009   |
| 홍화/잇꽃(Safflower)               | 0     | 0     | 0.007   |
| 속씨옴풀/황금(Baikal Skullcap)       | 0     | 0.008 | 0.008   |
| 황기(Membranous Milkvetch)       | 0     | 0.033 | 0.045   |
| 황백나무(Amur Cork tree)           | 0     | 0.003 | 0.008   |
| 후박나무(Machilus)                 | 0     | 0     | 0.009   |
| 잠사 (Bombycis Excrementum)      | 0     | 0.003 | 0.153   |

|       |              |    |   |   |
|-------|--------------|----|---|---|
| 음성대조구 | assay buffer | 00 | 0 | 0 |
|-------|--------------|----|---|---|

### 3. 향균 소재 개발 [연구내용 요약]

(1) 오이풀 뿌리(지유) 냉수추출물, 열수추출물, 메탄올추출물 및 각 추출물 분획물의 여드름 원인 세균에 대한 특이적 항균 활성

- ① 특허 및 논문 성과
- ② 오이풀 뿌리(지유) 냉수추출물(CWE) 및 열수추출물(HWE)
- ③ 냉수추출물, 열수추출물 및 각 추출물의 분획물 항균활성 실험
- ④ 여드름균에 대한 지유 냉수추출물과 열수추출물(CWE)의 에틸아세트 분획물(CWE-EA)의 최소억제농도(MIC) 및 최소살균농도(MBC)
- ⑤ 항여드름균 활성을 가진 지유 냉수추출물(CWE)과 열수추출물(HWE)의 에틸아세트 분획물 성분 분석 : 박층 크로마토그래피(Thin layer chromatography; TLC)
- ⑥ 오이풀 뿌리(지유) 메탄올 추출물(ME)
- ⑦ 메탄올추출물(ME) 및 분획물(ME-EA)의 항균활성 실험
- ⑧ 메탄올추출물(ME) 및 분획물(ME-EA)의 항균활성 실험 : 최소억제농도(MIC) 및 최소살균농도(MBC)
- ⑨ 항여드름균 활성을 가진 메탄올 추출물의 에틸아세티이트 분획물의 성분 분석 : 박층 크로마토그래피
- ⑩ High performance liquid chromatography(HPLC)
- ⑪ UPLC-Triple-TOF-MS
- ⑫ 각 성분의 항여드름균 활성 비교 검증

(2) 향나무, 홍화자, 황기뿌리 발효액의 리스테리아균, 포도상구균, 비브리오균, 대장균에 대한 항균 활성

- ① 특허 성과
- ② 향나무 발효액의 항균활성 실험 : 원판 평판배지 확산법
- ③ 홍화자 발효액의 항균활성 실험 : 원판 평판배지 확산법
- ④ 황기뿌리 발효액의 항균활성 실험 : 원판 평판배지 확산법

(1) 오이풀 뿌리(지유) 냉수추출물, 열수추출물, 메탄올추출물 및 각 추출물 분획물의 여드름 원인 세균에 대한 특이적 항균 활성

- ① 특허 및 논문 성과
- ① 출원(지유 열수)

관인생략

## 출원번호통지서

출원일자 2017.06.30  
 특기사항 심사청구(무) 공개신청(무) 참조번호(1062668)  
 출원번호 10-2017-0083419 (접수번호 1-1-2017-0630284-94)  
 출원인명칭 배재대학교 산학협력단(2-2004-010555-1)  
 대리인성명 특허법인이코리아(9-2016-100061-5)  
 발명자성명 최창원 오성 김성대 노한별  
 발명의명칭 여드름 원인 세균에 대한 특이적 항균 활성을 가지는 오이풀 열수추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 화장료 조성물

## 특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
 ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
 ※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허담당-PCT/마드리드  
 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내  
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
 ※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

㉠ 출원(지유 냉수)

관인생략

## 출원번호통지서

출원일자 2017.06.30  
특기사항 심사청구(우) 공개신청(우) 참조번호(1062669)  
출원번호 10-2017-0083420 (접수번호 1-1-2017-0630285-39)  
출원인명칭 배재대학교 산학협력단(2-2004-010555-1)  
대리인성명 특허법인이플리온(9-2016-100061-5)  
발명자성명 최창원 오성 김성대 노한별  
발명의명칭 여드름 원인 세균에 대한 특이적 항균 활성을 가지는 오이풀 냉수추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 화장료 조성물

## 특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의 견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드  
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내  
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

## 출원 번호 통지서

출원 일자 2017.06.30  
 특 기 사 항 심사청구(무) 공개신청(무) 참조번호(1062698)  
 출원 번호 10-2017-0083424 (접수번호 1-1-2017-0630290-68)  
 출원인 명칭 배재대학교 산학협력단(2-2004-010555-1)  
 대리인 성명 특허법인이플리온(9-2016-100061-5)  
 발명자 성명 최창원 오성 김성대 노한별  
 발명의 명칭 여드름 원인 세균에 대한 특이적 항균 활성을 가지는 오이풀 메탄올 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 화장료 조성물

## 특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
 ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 인편서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
 ※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드  
 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내  
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
 ※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

Article

# In Vitro Antioxidant and Anti-*Propionibacterium acnes* Activities of Cold Water, Hot Water, and Methanol Extracts, and Their Respective Ethyl Acetate Fractions, from *Sanguisorba officinalis* L. Roots

Seongdae Kim <sup>1</sup>, Sung Oh <sup>1</sup>, Han Byul Noh <sup>1</sup>, Seongmi Ji <sup>1</sup>, Song Hee Lee <sup>1</sup>, Jung Mo Koo <sup>1</sup>, Chang Won Choi <sup>1,\*</sup> and Hyun Pyo Jhun <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology & Medicinal Science, Pai Chai University, Daejeon 35345, Korea; khboy111@pcu.ac.kr (S.K.); 5star@pcu.ac.kr (S.O.); creator1018@pcu.ac.kr (H.B.N.); hijism91@gmail.com (S.J.); thdgm16245@naver.com (S.H.L.); jungmo9@gmail.com (J.M.K.)

<sup>2</sup> Daeduck Lab. Co. Ltd., Daejeon 34024, Korea; hpjhon@daeducklab.com

\* Correspondence: choicw@pcu.ac.kr; Tel.: +82-42-520-5617

Academic Editors: Natália Martins and Gertjan van Dijk

Received: 5 November 2018; Accepted: 14 November 2018; Published: 16 November 2018



**Abstract:** Identification of medicinal plants and naturally derived compounds as new natural antioxidant and antibacterial sources for topical acne treatment has long been important. To determine anti-*Propionibacterium acnes* activity and in vitro antioxidant activities, *Sanguisorba officinalis* L. root (SOR) was extracted with cold water (CWE), hot water (HWE), and methanol (ME), and each extract was fractionated successively with hexane, ethyl acetate (EA), and butanol to determine whether the activities could be attributed to the total phenolic, flavonoid, terpenoid, and condensed tannin contents. Pearson's correlation coefficients were analyzed between the respective variables. The SOR CWE, HWE, ME, and their respective EA fractions showed anti-*P. acnes* activity based on the paper disc diffusion method on agar plates, minimum inhibitory concentration (MIC), and minimal bactericidal concentration (MBC). The MIC against *P. acnes* had a moderate (+) correlation with the total phenolic content, but not with the other measures. The 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging capacity (SC) had a strong (−) correlation with the total phenolic content and a moderate (−) correlation with the total flavonoid content. The total antioxidant capacity had a strong (+) correlation with the condensed tannin content. Linoleic acid peroxidation inhibition had a strong (−) correlation with the total phenolic content. To elucidate the major active phytochemicals in the CWE-EA, HWE-EA, and ME-EA fractions, high performance liquid chromatography-ultraviolet (HPLC-UV) and ultra high performance liquid chromatography coupled with hybrid triple quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-QTOF-MS) were performed. The HPLC-UV analysis showed the presence of nine compounds in common (arjunic acid and/or euscaphic acid, gallic acid, kaempferol, caffeic acid, ferulic acid, tannic acid, and coumarin, quercetin). The UHPLC-QTOF-MS analysis showed the presence of nine compounds in common (gallic acid; caffeic acid; umbelliferone; arjunic acid, euscaphic acid, and/or tormentic acid; pomolic acid; rosamultic acid; and benzoic acid). When standards of the identified phytochemicals were tested against the same bacterium, quercetin, coumarin, and euscaphic acid showed antibacterial activity against *P. acnes*.

**Keywords:** *Sanguisorba officinalis* L. root; cold water extract; hot water extract; methanol extract; ethyl acetate fraction; anti-*Propionibacterium acnes* activity; in vitro antioxidant activities

② 오이풀 뿌리(지유) 냉수추출물(CWE) 및 열수추출물(HWE)

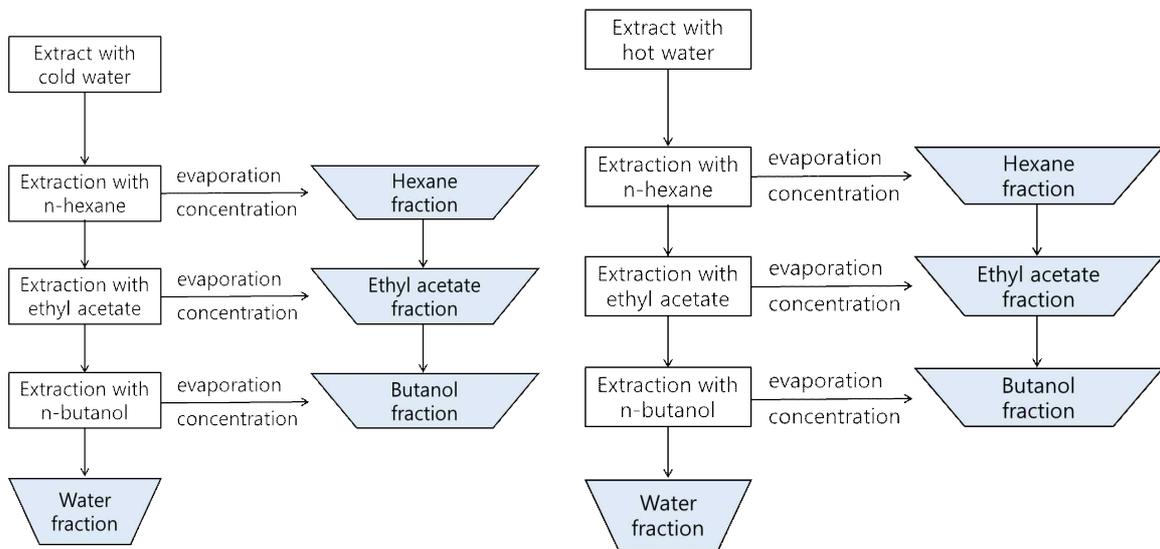
㉠ 추출물 수확량

[표 1] 지유로부터 냉수 추출을 통한 수확량

| 지유 건물중 | 냉수추출물(CWE)의 동결건조 수확량 | 열수추출물(HWE)의 동결건조 수확량 |
|--------|----------------------|----------------------|
| 50 g   | 0.2916 g             | 0.4673 g             |

㉡ 냉수추출물 및 열수추출물의 분획물(fraction) 제조

- 냉수추출물 및 열수추출물에 일정량의 물을 첨가한 후, 분액여두를 이용하여 극성이 다른 추출용매인 n-헥산, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물을 차례대로 혼합하여 각 분획을 추출하였음
- 먼저 분액여두에 n-헥산을 증류수와 동량으로 넣고, 잘 혼합한 후 수층과 추출용매의 두 층으로 나뉘도록 방치하였다. 추출용매를 분리하고 남은 여액을 다시 같은 방법으로 에틸아세테이트와 부탄올을 차례대로 넣어 각각 추출하였음
- 이때 추출용매는 남은 여액과 같은 양으로 첨가하였다. 추출 및 분획 과정의 개략도를 [그림 1]에 나타내었음



[그림 1] 지유의 냉수추출물 및 열수추출물로부터 활성 분획 분리과정의 흐름도

③ 냉수추출물, 열수추출물 및 각 추출물의 분획물 항균활성 실험

- ㉠ 그람음성균(2종) 및 그람양성균(3종)에 대한 항균 활성 측정은 원판 확산법(paper disk diffusion method), 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 및 최소살균농도(minimum bactericidal concentration, MBC)를 사용하여 평가하였음

㉠ 냉수추출물 및 분획물의 항균활성 실험 : 원판 확산법

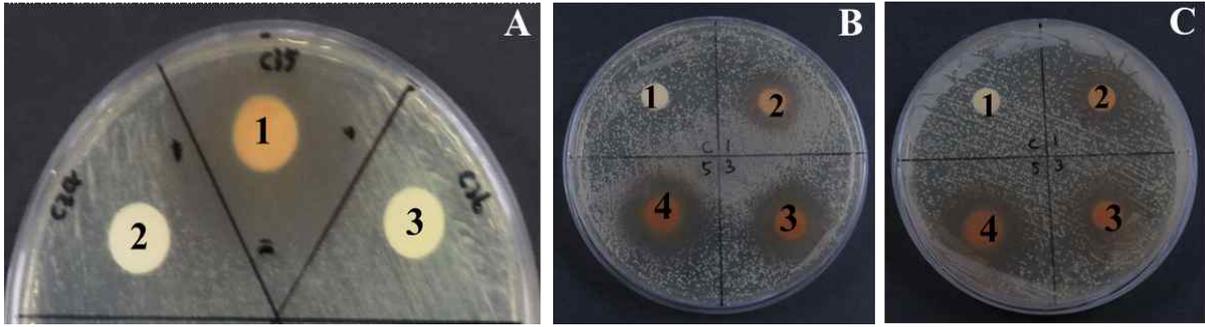
- 실험결과, 지유의 냉수추출물의 경우 10 mg/disk 처리구에서 강력한 항여드름균 활성이 확인되었음 [그림 2A 및 표 2]
- 그러나 냉수추출물 및 열수추출물 모두 다른 4종 박테리아에 대해서는 항균 활성이 전혀 관찰되지 않았음
- 이 결과를 통해 지유의 냉수추출물은 프로피오니박테리움 애크니스에 대해서 특이적 항균활성을 가지는 것으로 나타났음
- 냉수추출물의 농도별 처리구에서도 1 mg/disk 처리구까지 우수한 항여드름균 활성이 확인되었음 [그림 2B]
- 냉수추출물의 분획물 처리구에서는 에틸아세테이트 분획물에서 우수한 항여드름균 활성이 관찰되었으나 n-hexane 분획층, n-butanol 분획층 및 물 분획층에는 항균활성이 미약하거나 관찰되지 않았음 [그림 4]
- 냉수추출물의 에틸아세테이트 분획물 처리구에서도 1 mg/disk 처리구까지 우수한 항여드름균 활성이 확인되었음 [그림 2C]

㉡ 열수추출물 및 분획물의 항균활성 실험 : 원판 확산법

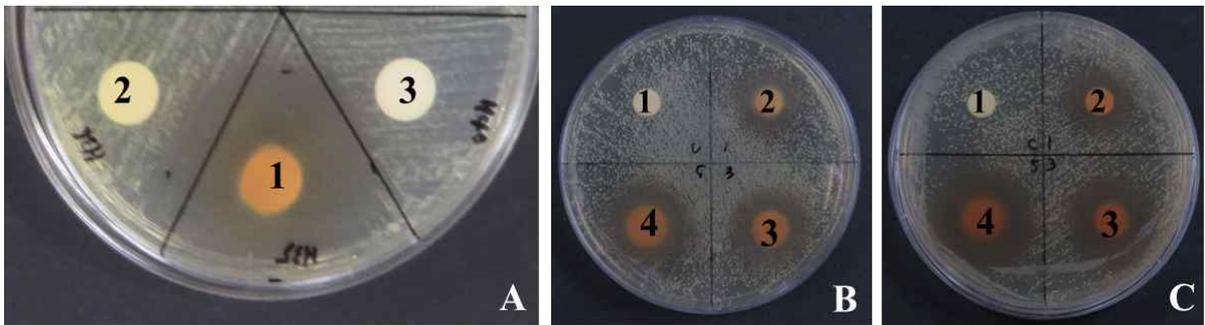
- 실험결과, 지유의 열수추출물의 경우 10 mg/disk 처리구에서 강력한 항여드름균 활성이 확인되었음 [그림 3A 및 표 2]
- 그러나 열수추출물 모두 다른 4종 박테리아에 대해서는 항균 활성이 전혀 관찰되지 않았음
- 이 결과를 통해 지유의 열수추출물은 프로피오니박테리움 애크니스에 대해서 특이적 항균활성을 가지는 것으로 나타났음
- 열수추출물의 농도별 처리구에서도 1 mg/disk 처리구까지 우수한 항여드름균 활성이 확인되었음 [그림 3B]
- 열수추출물의 분획물 처리구에서도 에틸아세테이트 분획물에서 우수한 항여드름균 활성이 관찰되었으나 n-hexane 분획층, n-butanol 분획층 및 물 분획층에는 항균활성이 미약하거나 관찰되지 않았음 [그림 4]
- 열수추출물의 에틸아세테이트 분획물 처리구에서도 1 mg/disk 처리구까지 우수한 항여드름균 활성이 확인되었음 [그림 3C]

[표 2] 그람양성균 프로피오니박테리움 애크니스에 대한 항균 활성

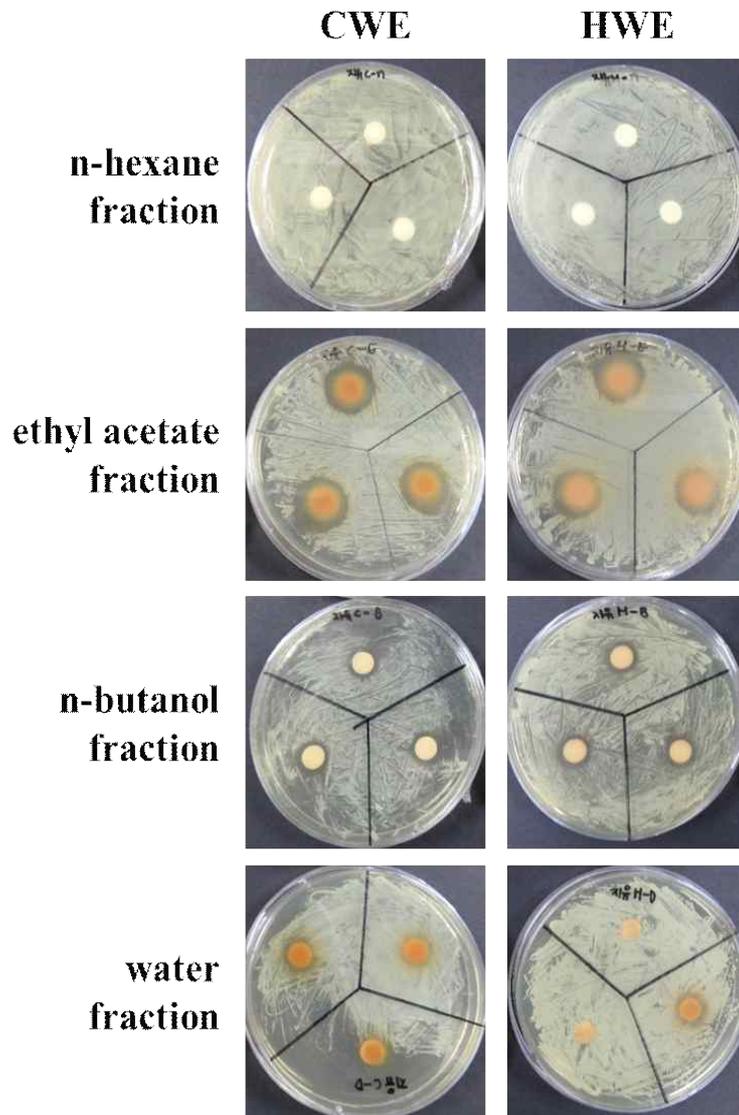
| 시료(10 mg/disc) | 생육억제한 크기(cm) |
|----------------|--------------|
| 냉수추출물(CWE)     | 3.2 x 3.0    |
| 열수추출물(CWE)     | 3.4 x 3.5    |
| ampicillin     | —            |
| kanamycin      | 3.1 x 3.0    |
| spectinomycin  | —            |
| timentin       | —            |



[그림 2] 지유 냉수추출물(CWE) 및 냉수추출물의 에틸아세테이트 분획물(CWE-EA)의 여드름균(*Propionibacterium acnes*)에 대한 항균활성을 분석한 원판 평판배지 확산법(paper disc agar diffusion method)이다. 그림 (A)는 CWE 10 mg/disk 처리구(1), 무처리구(2), 증류수처리구(3)의 여드름균에 대한 억제환을 관찰한 사진이다. 그림 (B)는 증류수처리구(1) 및 CWE 1 mg/disk 처리구(2), 3 mg/disk 처리구(3), 5 mg/disk 처리구(4)의 여드름균에 대한 억제환을 관찰한 사진이다. 그림 (C)는 증류수처리구(1) 및 CWE-EA 1 mg/disk 처리구(2), 3 mg/disk 처리구(3), 5 mg/disk 처리구(4)의 여드름균에 대한 억제환을 관찰한 사진



[그림 3] 지유 열수추출물(HWE) 및 열수추출물의 에틸아세테이트 분획물(HWE-EA)의 여드름균(*Propionibacterium acnes*)에 대한 항균활성을 분석한 원판 평판배지 확산법(paper disc agar diffusion method)이다. 그림 (A)는 HWE 10 mg/disk 처리구(1), 무처리구(2), 증류수처리구(3)의 여드름균에 대한 억제환을 관찰한 사진이다. 그림 (B)는 증류수처리구(1) 및 HWE 1 mg/disk 처리구(2), 3 mg/disk 처리구(3), 5 mg/disk 처리구(4)의 여드름균에 대한 억제환을 관찰한 사진이다. 그림 (C)는 증류수처리구(1) 및 HWE-EA 1 mg/disk 처리구(2), 3 mg/disk 처리구(3), 5 mg/disk 처리구(4)의 여드름균에 대한 억제환을 관찰한 사진



[그림 4] 지유의 냉수추출물(CWE)과 열수추출물(HWE)의 n-헥산(n-hexane), 에틸아세테이트(ethyl acetate), n-부탄올(n-butanol) 및 물 분획물을 원판 평판배지 확산법(paper disc agar diffusion method)에 의해 여드름균 억제환 비교

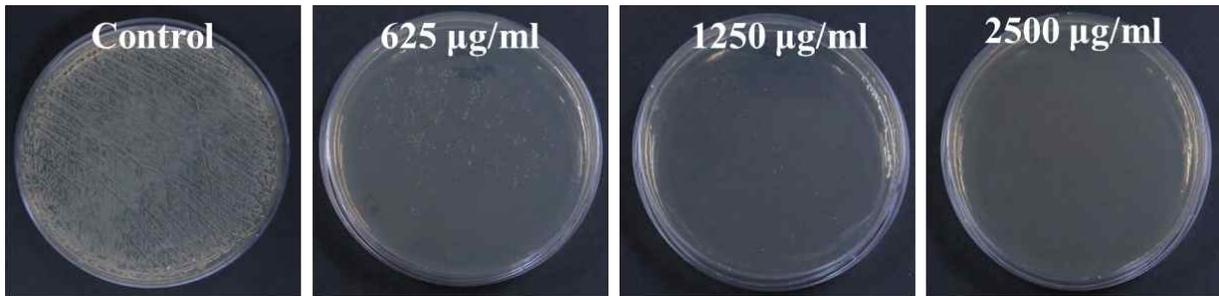
④ 여드름균에 대한 지유 냉수추출물과 열수추출물(CWE)의 에틸아세테이트 분획물(CWE-EA)의 최소억제농도(MIC) 및 최소살균농도(MBC)

[표 3] 지유 열수추출물 및 에틸아세테이트 분획물의 프로피오니박테리움 애크니스에 대한 최소억제농도(MIC) 및 최소살균농도(MBC)

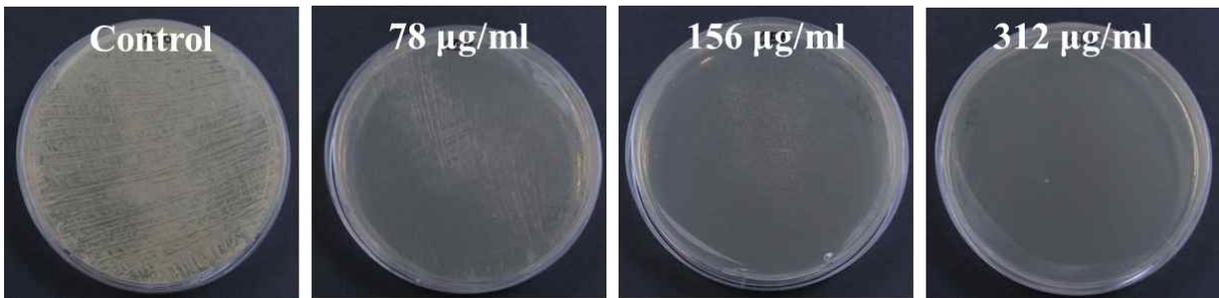
| 추출물                 | MIC( $\mu\text{g/mL}$ ) | MBC( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|---------------------|-------------------------|-------------------------|
| 냉수추출물(CWE)          | 1250                    | 2500                    |
| 에틸아세테이트 분획물(CWE-EA) | 156                     | 312                     |
| 열수추출물(HWE)          | 625                     | 1250                    |
| 에틸아세테이트 분획물(HWE-EA) | 156                     | 312                     |

- ㉠ 냉수추출물 및 분획물의 항균활성 실험 : 최소억제농도(MIC) 및 최소살균농도(MBC)
- [표 3]에 나타난 바와 같이, 프로피오니박테리움 애크니스에 대한 냉수추출물 및 에틸아세테이트 분획물의 MIC 값은 1250  $\mu\text{g/mL}$  및 156  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었음
  - [표 3]에 나타난 바와 같이, 프로피오니박테리움 애크니스에 대한 냉수추출물 및 에틸아세테이트 분획물의 MBC 값은 2500  $\mu\text{g/mL}$  및 312  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었음
  - [그림 5] 냉수추출물 및 에틸아세테이트 분획물 MIC 및 MBC 농도에서 콜로니 형성 유무 관찰하였음

### CWE

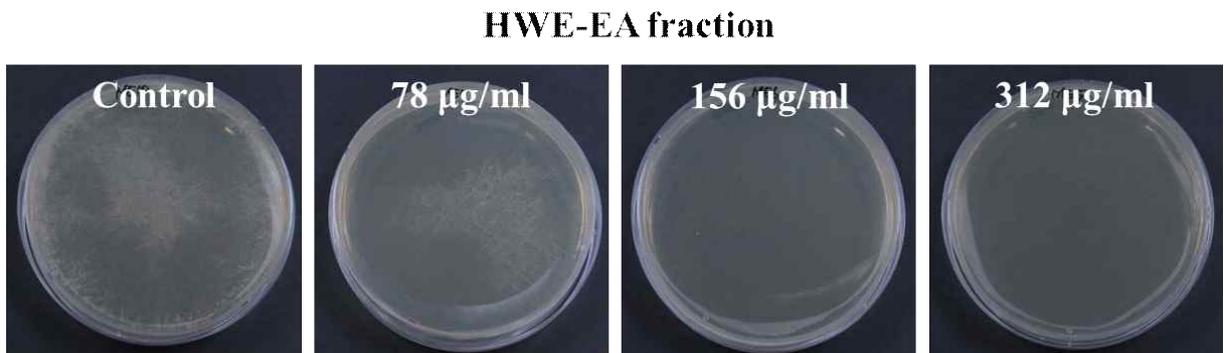
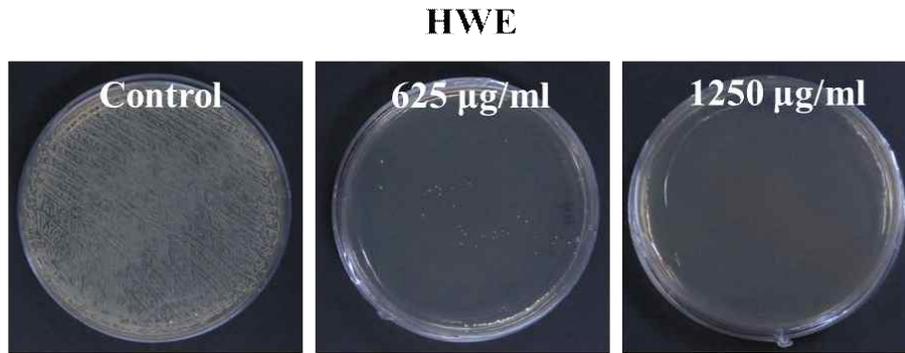


### CWE-EA fraction



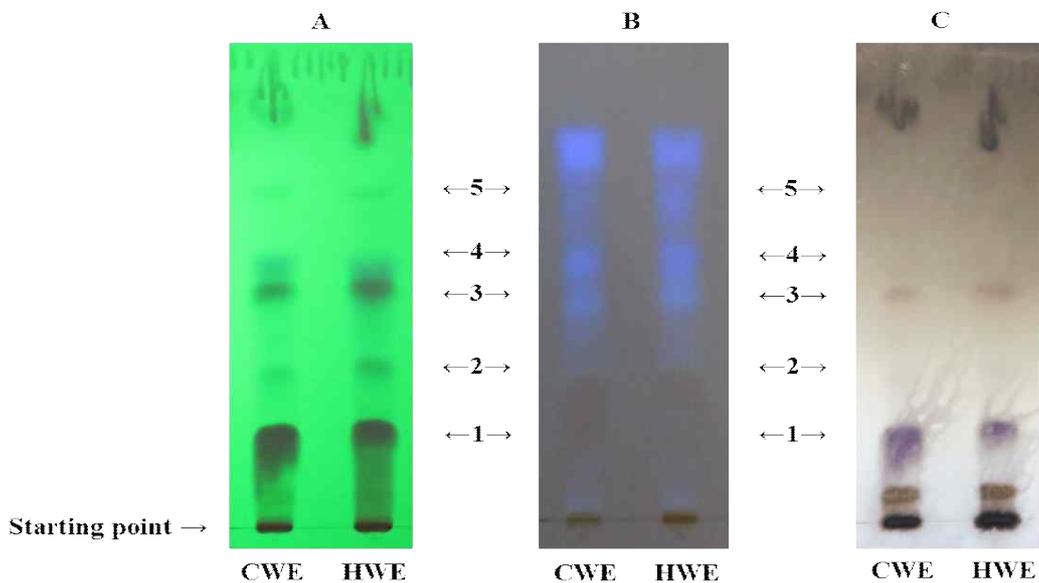
[그림 5] 지유의 냉수추출물(CWE) 및 에틸아세테이트(CWE-EA)의 여드름균 (*Propionibacterium acnes*)에 대한 최소억제농도(MIC) 및 최소살균농도(MBC)를 확인하기 위하여 고체배지에 콜로니 형성 유무를 확인한 사진

- ㉡ 열수추출물 및 분획물의 항균활성 실험 : 최소억제농도(MIC) 및 최소살균농도(MBC)
- [표 3]에 나타난 바와 같이, 프로피오니박테리움 애크니스에 대한 열수추출물 및 에틸아세테이트 분획물의 MIC 값은 625  $\mu\text{g/mL}$  및 156  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었음
  - [표 3]에 나타난 바와 같이, 프로피오니박테리움 애크니스에 대한 냉수추출물 및 에틸아세테이트 분획물의 MBC 값은 1250  $\mu\text{g/mL}$  및 312  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었음
  - [그림 5] 냉수추출물 및 에틸아세테이트 분획물 MIC 및 MBC 농도에서 콜로니 형성 유무 관찰하였음



[그림 6] 지유의 열수추출물(HWE) 및 에틸아세이트(HWE-EA)의 여드름균 (*Propionibacterium acnes*)에 대한 최소억제농도(MIC) 및 최소살균농도(MBC)를 확인하기 위하여 고체배지에 콜로니 형성 유무를 확인한 사진

- ⑤ 항여드름균 활성을 가진 지유 냉수추출물(CWE)과 열수추출물(HWE)의 에틸아세트 분획물 성분 분석 : 박층 크로마토그래피(Thin layer chromatography; TLC)
- ⑦ 표준물질인 caffeic acid, ferulic acid, quercetin, kaempferol R<sub>f</sub> 값과 비슷한 band를 확인하였음



[그림 7] 지유의 냉수추출물(CWE)의 에틸아세테이트(ethyl acetate) 분획물을 silica gel 60 glass plate에 점지하고 혼합용매 ethyl acetate, n-hexane, chloroform, acetic acid(40:30:30:2, v/v/v/v) 로 전개하고 UV 파장 254 nm (A), 366 nm (B) 및 황산 스프레이 발색법 (C)으로 분석하였음

⑥ 오이풀 뿌리(지유) 메탄올 추출물(ME)

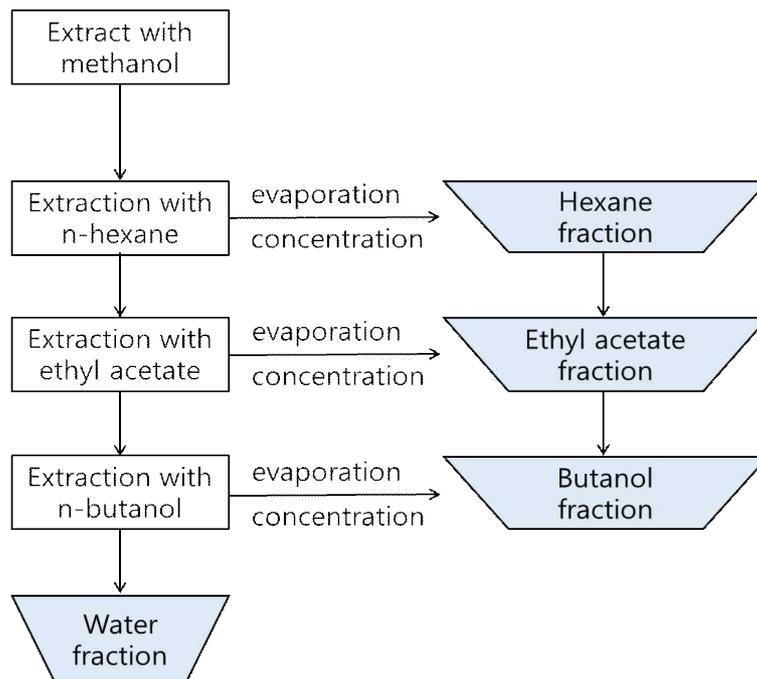
㉠ 추출물 수확량

[표 4] 지유로부터 메탄올 추출을 통한 수확량

| 지유 건물중 | 메탄올추출물(ME)의 동결건조 수확량 |
|--------|----------------------|
| 50 g   | 3.5 g                |

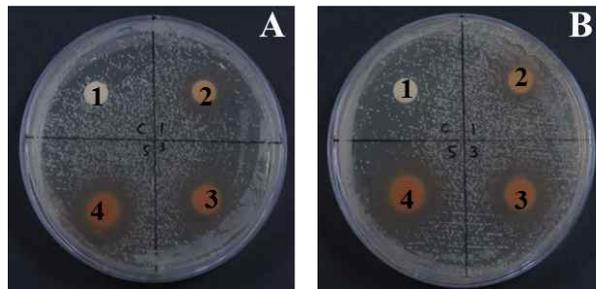
㉡ 메탄올추출물의 분획물 제조

- 메탄올추출물에 일정량의 물을 첨가한 후, 분액여두를 이용하여 극성이 다른 추출용매인 n-헥산, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물을 차례대로 혼합하여 각 분획을 추출하였음
- 먼저 분액여두에 n-헥산을 증류수와 동량으로 넣고, 잘 혼합한 후 수층과 추출용매의 두 층으로 나뉘도록 방지하였음
- 추출용매를 분리하고 남은 여액을 다시 같은 방법으로 에틸아세테이트와 부탄올을 차례대로 넣어 각각 추출하였음
- 이때 추출용매는 남은 여액과 같은 양으로 첨가하였음



[그림 8] 메탄올추출물의 분획 공정 개략도

- ⑦ 메탄올추출물(ME) 및 분획물(ME-EA)의 항균활성 실험
- ㉠ 실험결과, 지유의 메탄올추출물 및 에틸아세테이트 분획물 농도별 처리구 모두에서 억제환이 형성되었고, 시료 중 에틸아세테이트 분획물 5 mg/disk 처리구에서 가장 강력한 항여드름균 활성이 관찰되었음 [그림 9B]
- ㉡ 또한, 메탄올추출물 1 mg/disk 처리구에서도 양호한 항여드름균 활성이 확인되었음 [그림 9A]
- ㉢ 지유의 메탄올추출물로부터 획득한 에틸아세테이트 분획물에서는 우수한 항여드름균 활성이 관찰되었으나, 헥산, 부탄올 및 증류수 분획물에서는 미약하거나 관찰되지 않았음

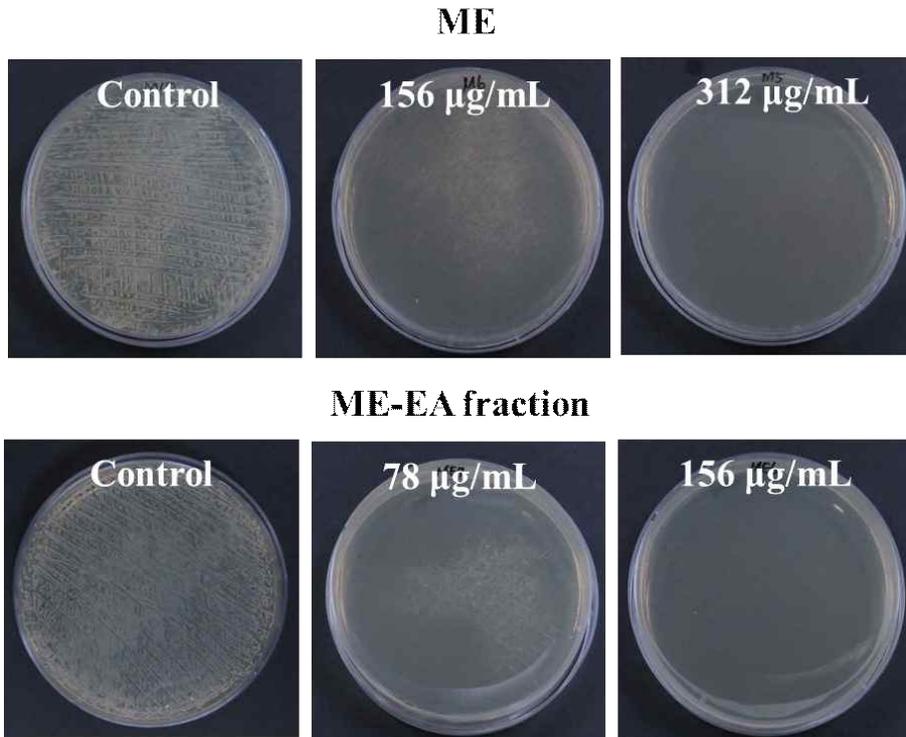


[그림 9] 지유 메탄올추출물(ME) 및 추출물의 에틸아세테이트 분획물(ME-EA)의 여드름균 (*Propionibacterium acnes*)에 대한 항균활성을 분석한 원판 평판배지 확산법(paper disc agar diffusion method)이다. 그림 (A)는 메탄올 처리구(1) 및 ME 1 mg/disk 처리구(2), 3 mg/disk 처리구(3), 5 mg/disk 처리구(4)의 여드름균에 대한 억제환을 관찰한 사진이다. 그림 (B)는 메탄올 처리구(1) 및 ME-EA 1 mg/disk 처리구(2), 3 mg/disk 처리구(3), 5 mg/disk 처리구(4)의 여드름균에 대한 억제환을 관찰한 사진

- ⑧ 메탄올추출물(ME) 및 분획물(ME-EA)의 항균활성 실험
- ㉠ [표 5]에 나타난 바와 같이, 프로피오니박테리움 애크니스에 대한 메탄올추출물 및 에틸아세테이트 분획물의 MIC 값은 312  $\mu$ g/mL 및 156  $\mu$ g/mL로 측정되었음
- ㉡ MIC로 선택된 농도보다 그 이상의 농도에 해당하는 시험관의 배양액 100  $\mu$ L 씩 고체배지에 도말하여 균을 배양한 후 plate 상에서 관찰되는 콜로니(colony) 수를 직접 계수하였음
- ㉢ 이때 확인되어지는 콜로니 수가 100% 사멸되어지는 효과를 나타내는 추출물 처리농도를 MBC로 결정하고 [표 5] 및 [그림 10]와 같이 결정하였음
- ㉣ [표 5]에 나타난 바와 같이, 프로피오니박테리움 애크니스에 대한 메탄올추출물 및 에틸아세테이트 분획물의 MBC 값은 312  $\mu$ g/mL 및 156  $\mu$ g/mL로 측정되었음

[표 5] 지유 메탄올추출물 및 에틸아세테이트 분획물의 프로피오니박테리움 아크니스에 대한 최소억제농도(MIC) 및 최소살균농도(MBC)

| 추출물                | MIC( $\mu\text{g/mL}$ ) | MBC( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|--------------------|-------------------------|-------------------------|
| 메탄올추출물(ME)         | 312                     | 312                     |
| 에틸아세테이트 분획물(ME-EA) | 156                     | 156                     |

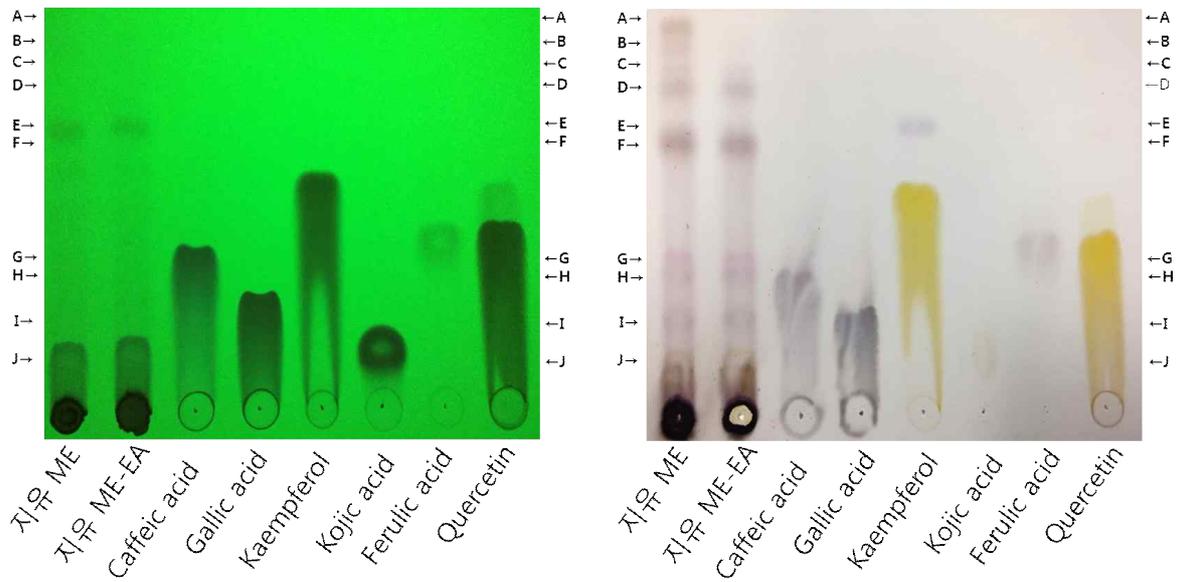


[그림 10] 지유의 메탄올추출물(ME)의 여드름균(*Propionibacterium acnes*)에 대한 최소억제농도(MIC) 및 최소살균농도(MBC)를 확인하기 위하여 고체배지에 콜로니 형성 유무를 확인한 사진

⑨ 항여드름균 활성을 가진 에틸아세테이트 분획물의 성분 분석

㉠ 박층 크로마토그래피(Thin layer chromatography; TLC)

- 항여드름균 활성을 가진 에틸아세테이트 분획물을 silica gel 60 glass plate(20 x 20 cm, Merck, DarDarmstadt, Germany)를 이용하여 클로로포름/ 에틸에테르(1:2, v/v) 혼합 용매로 하여 전개하고 UV 램프(254 nm 및 366 nm 파장) 및 황산 스프레이 발색법으로 에틸아세테이트 분획물과 표준물질(caffeic acid, gallic acid, kaempferol, kojic acid, ferulic acid, quercetin)과의  $R_f$  값을 비교하여 분석하였음
- 표준물질인 caffeic acid, gallic acid, kojic acid, kaempferol  $R_f$  값과 비슷한 band를 확인할 수 있었음 [그림 11]



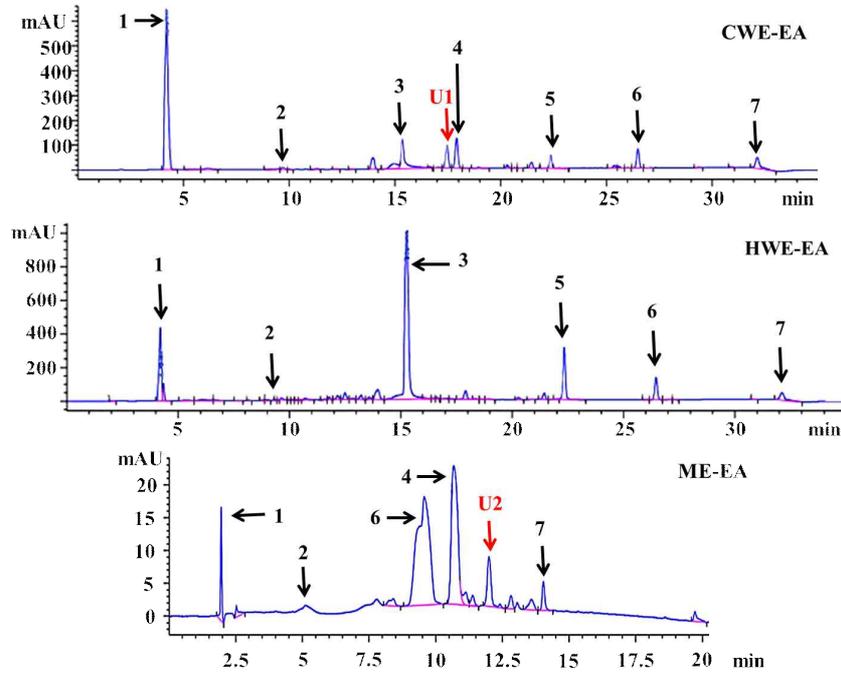
**E : Kaempferol    H : Caffeic acid    I : Gallic acid    J : Kojic acid**

[그림 11] 지유의 메탄올추출물(ME)의 에틸아세테이트(ethyl acetate) 분획물을 silica gel 60 glass plate에 점지하고 혼합용매 chloroform / ethyl ether (1:2, v/v) 로 전개하고 UV 파장 254 nm (A), 366 nm (B) 및 황산 스프레이 발색법 (C)으로 분석함

⑩ High performance liquid chromatography(HPLC)

㉠ 냉수추출물 및 열수추출물의 에틸아세테이트 분획물

- HPLC 방법으로 지유 열수추출물의 에틸아세테이트 분획물 중에서 표준물질과의 retention time을 비교하여 2종의 hydroxycinnamic acids(caffeic acid, ferulic acid) 및 2종의 flavonols(quercetin, kaempferol)을 확인하였음 [그림 12]
- 에틸아세테이트 분획물 중 caffeic acid, ferulic acid, quercetin, kaempferol 등을 포함하여 여러 미지의 물질이 검출되었으며 그중 ferulic acid 함량이 가장 높았음

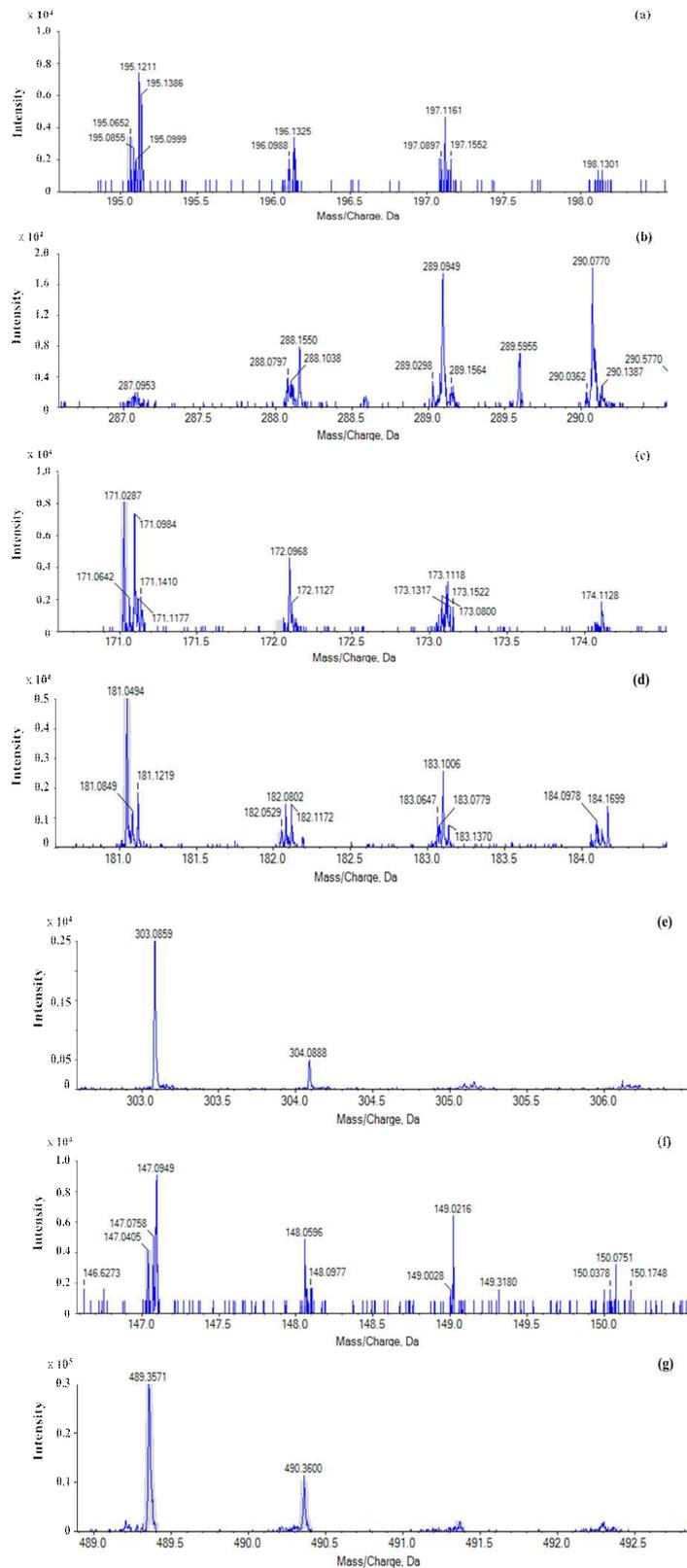


[그림 12] 지유의 냉수추출물(CWE), 열수추출물(HWE), 메탄올추출물(ME)의 에틸아세테이트(ethyl acetate) 분획물을 HPLC-DAD로 분석한 것이다. (1) gallic acid, (2) caffeic acid, (3) ferulic acid, (4) coumarin, (5) quercetin, (6) kaempferol, (7) euscaphic acid, (U1) CWE-EA에서 밝혀내지 못한 물질, (U2) ME-EA에서 밝혀내지 못한 물질

① UPLC-Triple-TOF-MS

[표 6] 지유의 냉수추출물, 열수추출물, 메탄올추출물의 에틸아세테이트 분획물의 MS 분석

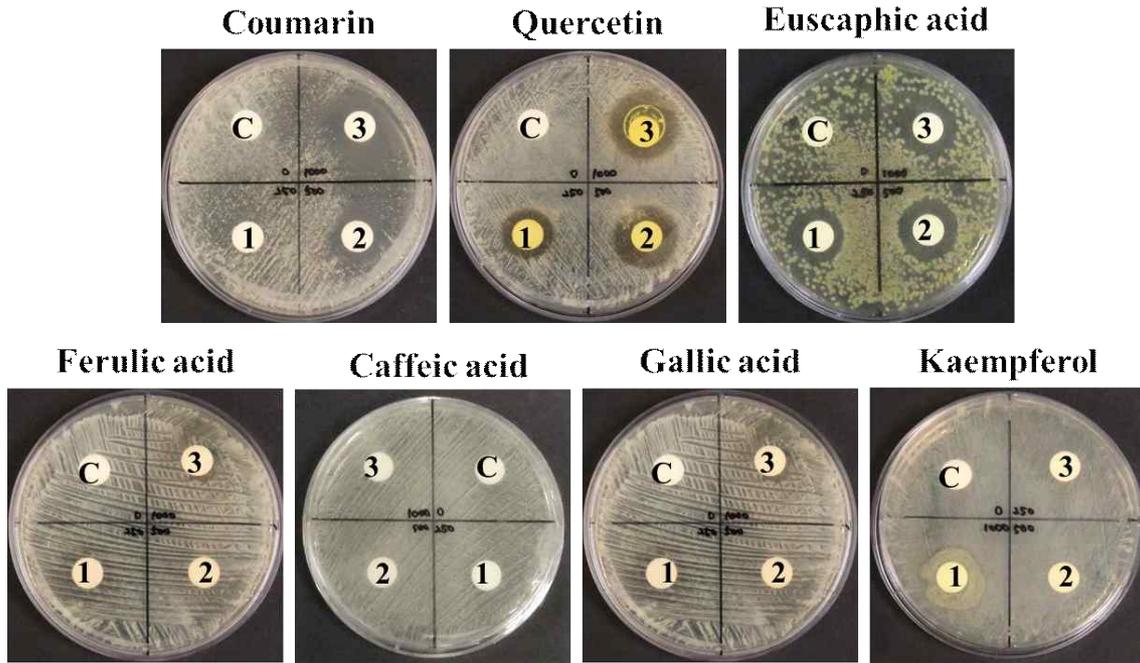
| Sample | Compound name      | Score (%) | Molecular weight | Formula  | Expected / Found (m/z) | Error (ppm) | RT (min) |
|--------|--------------------|-----------|------------------|--|------------------------|-------------|----------|
| CWE-EA | Kaempferol         | 85        | 287.06           | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub> | 287.0550 / 287.0637    | 0.4         | 0.70     |
|        | Gallic acid        | 92        | 171.03           | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>   | 171.0288 / 171.0287    | -0.8        | 0.89     |
|        | Coumarin           | 71        | 147.04           | C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>   | 147.0441 / 147.0439    | -0.8        | 1.01     |
|        | Quercetin          | 85        | 303.05           | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub> | 303.0499 / 303.0500    | 0.1         | 1.02     |
|        | Caffeic acid       | 91        | 181.05           | C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>   | 181.0495 / 181.0494    | -0.9        | 1.13     |
|        | Trans-ferulic acid | 81        | 195.07           | C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> | 195.0652 / 195.0651    | -0.5        | 1.29     |
|        | Euscaphic acid     | 97        | 489.36           | C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>5</sub> | 489.3575 / 489.3574    | -0.2        | 3.92     |
| HWE-EA | Gallic acid        | 61        | 171.03           | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>   | 171.0288 / 171.0288    | -0.1        | 0.92     |
|        | Quercetin          | 87        | 303.05           | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub> | 303.0499 / 303.0498    | -0.4        | 1.02     |
|        | Trans-ferulic acid | 84        | 195.07           | C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> | 195.0652 / 195.0650    | -0.7        | 1.30     |
|        | Caffeic acid       | 92        | 181.05           | C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>   | 181.0495 / 181.0496    | 0.6         | 1.15     |
|        | Euscaphic acid     | 64        | 489.36           | C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>5</sub> | 489.3575 / 489.3577    | 0.5         | 3.89     |
|        | Kaempferol         | 85        | 287.06           | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub> | 287.0550 / 287.0551    | 0.4         | 3.90     |
| ME-EA  | Gallic acid        | 55        | 171.03           | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>   | 171.0288 / 171.0290    | 1.0         | 0.88     |
|        | Caffeic acid       | 96        | 181.05           | C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>   | 181.0495 / 181.0496    | 0.4         | 1.07     |
|        | Kaempferol         | 81        | 287.06           | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub> | 287.0550 / 287.0548    | -0.7        | 2.25     |
|        | Coumarin           | 84        | 147.04           | C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>   | 147.0441 / 147.0442    | 1.1         | 2.27     |
|        | Euscaphic acid     | 74        | 489.36           | C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>5</sub> | 489.3575 / 489.3574    | -0.1        | 3.85     |



[그림 13] UHPLC-Triple-TOF-MS를 이용한 지유의 주성분 분석. (a) trans-ferulic acid, (b) kaempferol, (c) gallic acid, (d) caffeic acid, (e) quercetin, (f) coumarin, (g) euscaphic acid

⑫ 각 성분의 항여드름균 활성 비교 검증

㉠ 에틸아세테이트 분획물 중 coumarin, quercetin 그리고 euscaphic acid은 항여드름균 활성을 나타냈으나, 가장 함량이 많았던 ferulic acid, caffeic acid alc gallic acid는 항여드름균 활성이 없는 것으로 나타났음



[그림 14] HPLC에서 분석된 성분의 항여드름균 활성 검증

(2) 향나무, 홍화자, 황기뿌리 발효액의 리스테리아균, 포도상구균, 비브리오균, 대장균에 대한 항균 활성

- ① 특허 출원
- ① 출원(황기)

관인생략  
**출원번호통지서**

출원일자 2016.07.04  
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(1061039)  
 출원번호 10-2016-0084265 (접수번호 1-1-2016-0646026-16)  
 출원인명칭 배재대학교 산학협력단(2-2004-010555-1)  
 대리인성명 특허법인이름리온(9-2016-100061-5)  
 발명자성명 최창원 오성 김성대 지성미 노한별  
 발명의명칭 락도바실러스 플라타룸으로 발효시킨 황기 뿌리 배양액의 리스테리아 항균조성물

**특 허 청 장**

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
 ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
 ※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드  
 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내  
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
 ※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

㉠ 출원(홍화자)

관인생략  
출원번호통지서

출원일자 2016.07.04  
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(1061038)  
출원번호 10-2016-0084255 (접수번호 1-1-2016-0645976-86)  
출원인명칭 배재대학교 산학협력단(2-2004-010555-1)  
대리인성명 특허법인이플리온(9-2016-100061-5)  
발명자성명 최창원 오성 김성대 지성미 노한별  
발명의명칭 락도바실러스 플란타룸으로 발효시킨 홍화자 배양액의 리스테리아 항균 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허-실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드  
※ 우선권 인정기간 : 특허-실용신안은 12개월, 상표-디자인은 6개월 이내  
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

㉔ 출원(항나무)

관인생략  
출원번호통지서

출원일자 2016.07.04  
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(1061037)  
출원번호 10-2016-0084226 (접수번호 1-1-2016-0645855-60)  
출원인명칭 배재대학교 산학협력단(2-2004-010555-1)  
대리인성명 특허법인이름리온(9-2016-100061-5)  
발명자성명 최창원 오성 김성대 지성이 노한별  
발명의명칭 락토바실러스 플라타룸으로 발효시킨 향나무 열매 배양액의 리스테리아 항균조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마달-PCT/마드리드  
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내  
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

㉔ 등록(항나무)



㉔ 등록(황기)



**특허증**  
CERTIFICATE OF PATENT

**특허** 제 10-1806720 호  
Patent Number

**출원번호** 제 10-2016-0084265 호  
Application Number

**출원일** 2016년 07월 04일  
Filing Date

**등록일** 2017년 12월 01일  
Registration Date

발명의 명칭 Title of the Invention  
락토바실러스 플란타룸으로 발효시킨 황기 뿌리 배양액의 리스테리아 항균조성물

특허권자 Patentee  
배재대학교 산학협력단(160171-\*\*\*\*\*)  
대전광역시 서구 배재로 155-40 (도마동)

발명자 Inventor  
등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.  
This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention  
has been registered at the Korean Intellectual Property Office.

2017년 12월 01일

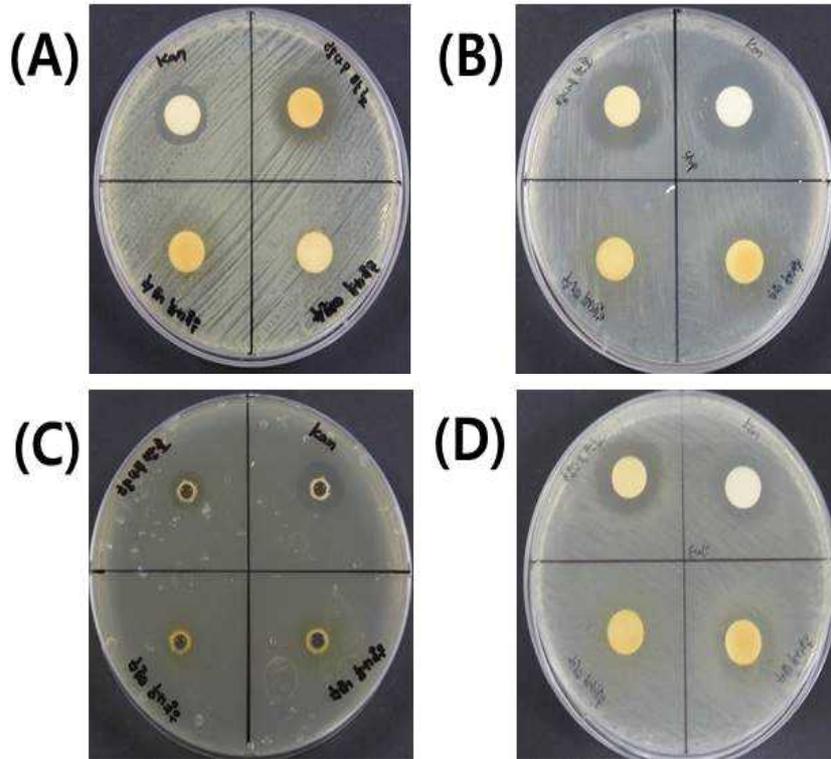
  
**특허청**  
Korean Intellectual  
Property Office

**특허청장**  
COMMISSIONER,  
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

성 문 보

② 향나무 발효액의 항균활성 실험

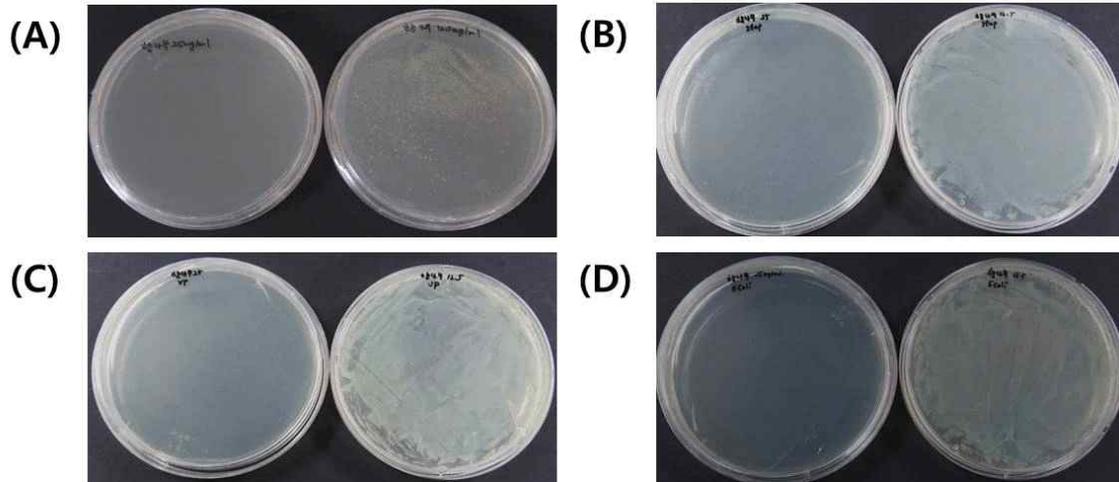
- ㉠ 실험결과, 향나무 발효액의 처리구 모두에서 각 균에 대한 억제환이 형성되었음
- ㉡ 냉수 및 열수추출물에서는 모든 균에 대한 억제환이 형성되지 않음
- ㉢ 특히 식중독 원인균인 리스테리아균에 대한 활성은 50종의 식물 중 9종에서만 나타나 가치가 있음



[그림 1] 리스테리아균(a), 포도상구균(b), 비브리오균(c), 대장균(d)에 대한 향나무 열매 열수추출물, 냉수추출물 및 발효액의 항균 효과의 확인

[표 1] 향나무 열매 발효액의 MIC 결정

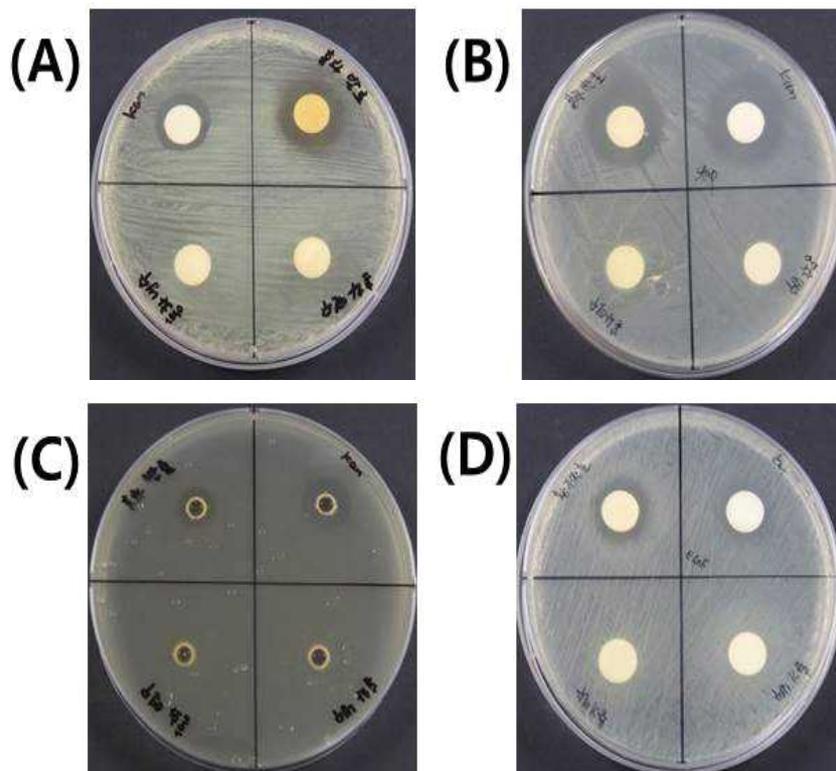
| 향나무 열매 발효액  | OD 600 nm |
|-------------|-----------|
| 50 mg/ml    | 0.038     |
| 25 mg/ml    | 0.091     |
| 12.5 mg/ml  | 0.906     |
| 6.25 mg/ml  | 1.775     |
| 3.125 mg/ml | 3.235     |
| 음성 대조균      | 3.184     |
| 양성 대조균      | 0.026     |



[그림 2] 리스테리아균(a), 포도상구균(b), 비브리오균(c), 대장균(d)의 증식을 억제하는 향나무 열매 발효액의 최소억제농도(MIC)의 콜로니 생성유무 확인

③ 홍화자 발효액의 항균활성 실험

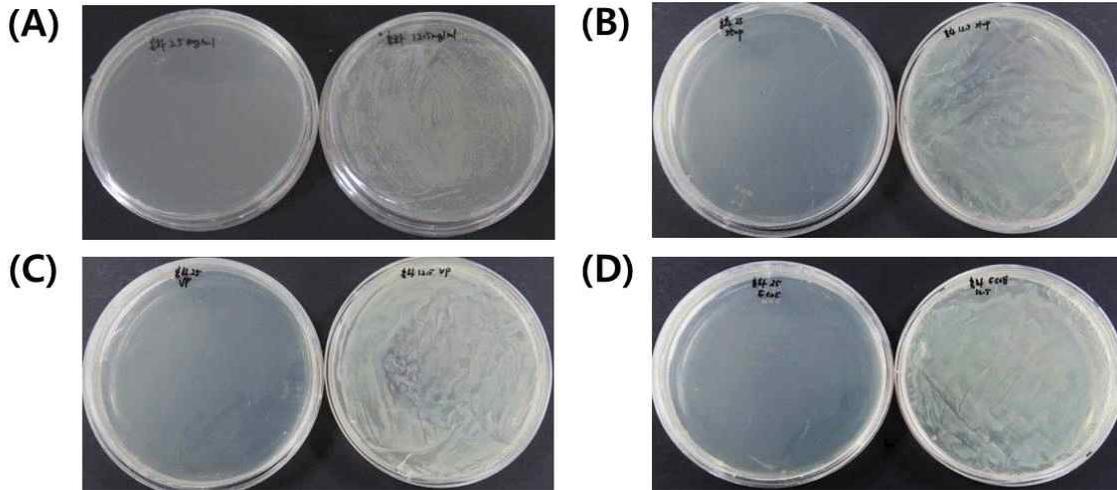
- ㉠ 실험결과, 홍화자 발효액의 처리구 모두에서 각 균에 대한 억제환이 형성되었음
- ㉡ 냉수 및 열수추출물에서는 모든 균에 대한 억제환이 형성되지 않음
- ㉢ 특히 식중독 원인균인 리스테리아균에 대한 활성은 50종의 식물 중 9종에서만 나타나 가치가 있음



[그림 3] 리스테리아균(a), 포도상구균(b), 비브리오균(c), 대장균(d)에 대한 홍화자 열수추출물, 냉수추출물 및 발효액의 항균 효과의 확인

[표 2] 홍화자 발효액의 MIC 결정

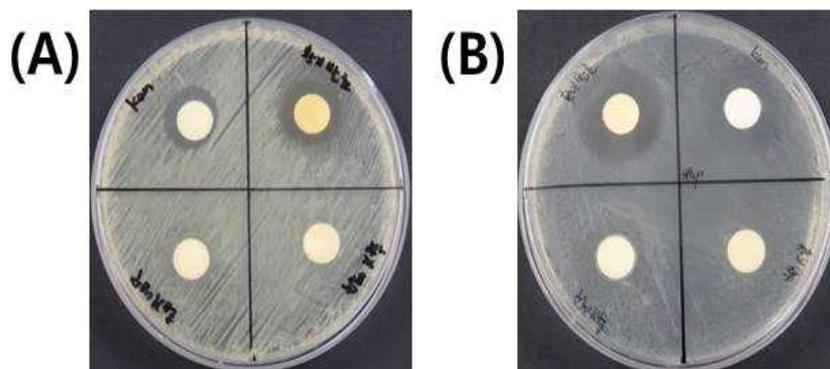
| 홍화자 발효물     | OD 600 nm |
|-------------|-----------|
| 50 mg/ml    | 0.032     |
| 25 mg/ml    | 0.057     |
| 12.5 mg/ml  | 0.487     |
| 6.25 mg/ml  | 1.390     |
| 3.125 mg/ml | 3.288     |
| 음성 대조군      | 3.184     |
| 양성 대조군      | 0.026     |

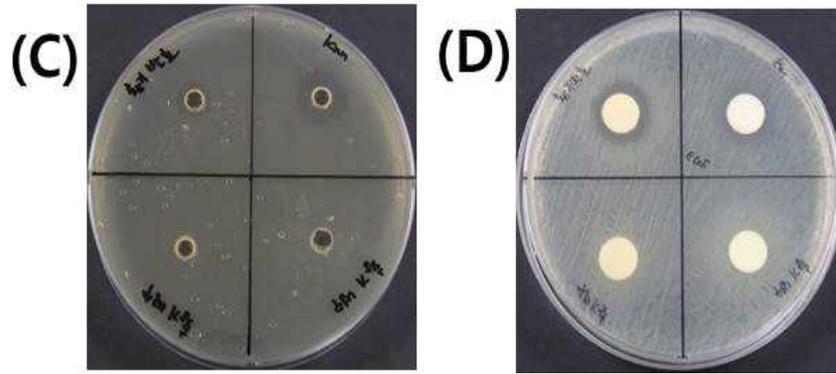


[그림 4] 리스테리아균(a), 포도상구균(b), 비브리오균(c), 대장균(d)의 증식을 억제하는 홍화자 발효액의 최소억제농도(MIC)의 콜로니 생성유무 확인

④ 황기뿌리 발효액의 항균활성 실험

- ㉠ 실험결과, 황기뿌리 발효액의 처리구 모두에서 각 균에 대한 억제환이 형성되었음
- ㉡ 냉수 및 열수추출물에서는 모든 균에 대한 억제환이 형성되지 않음
- ㉢ 특히 식중독 원인균인 리스테리아균에 대한 활성은 50종의 식물 중 9종에서만 나타나 가치가 있음

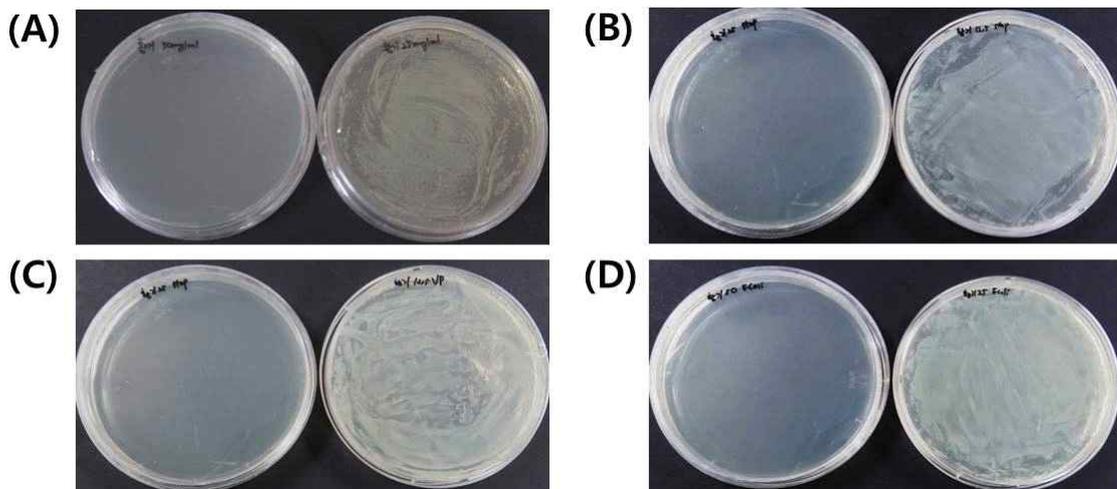




[그림 5] 리스테리아균(a), 포도상구균(b), 비브리오균(c), 대장균(d)에 대한 황기 뿌리 열수추출물, 냉수추출물 및 발효액의 항균 효과의 확인

[표 3] 황기뿌리 발효액의 MIC 결정

| 황기 뿌리 발효액 처리 농도 | OD 600 nm |
|-----------------|-----------|
| 50 mg/ml        | 0.041     |
| 25 mg/ml        | 0.213     |
| 12.5 mg/ml      | 0.826     |
| 6.25 mg/ml      | 2.957     |
| 3.125 mg/ml     | 3.225     |
| 음성 대조군          | 3.184     |
| 양성 대조군          | 0.026     |



[그림 6] 리스테리아균(a), 포도상구균(b), 비브리오균(c), 대장균(d)의 증식을 억제하는 황기뿌리 발효액의 최소억제농도(MIC)의 콜로니 생성유무 확인

### 3. 미백 소재 개발 [연구내용 요약]

(1) 지황 뿌리(건지황) 냉수추출물 및 열수추출물의 항타이로시나제 활성 및 미백 기능

- ① 특허 성과
- ② 건지황 추출물
- ③ 건지황 냉수추출물 및 열수추출물의 시험관 내 항타이로시나아제 활성 실험
- ④ 건지황 냉수추출물(CWE) 및 열수추출물(HWE)의 세포독성
- ⑤ 건지황 냉수추출물(CWE) 및 열수추출물(HWE) 처리 세포 내 멜라닌 함량
- ⑥ 건지황 추출물 및 에틸아세테이트 분획물의 세포 내 미백 활성 실험

(2) 오이풀 뿌리(지유) 냉수추출물 및 열수추출물의 항타이로시나제 활성 및 미백 기능

- ① 특허 성과
- ② 오이풀 뿌리 냉수추출물 및 열수추출물의 시험관 내 항타이로시나아제 활성 실험
- ③ 오이풀 뿌리 냉수추출물(CWE) 및 열수추출물(HWE)의 세포독성
- ④ 오이풀 뿌리 냉수추출물(CWE) 및 열수추출물(HWE) 처리 세포 내 멜라닌 함량

(3) 칩 뿌리(갈근) 냉수추출물 및 열수추출물의 항타이로시나제 활성 및 미백 기능

- ① 칩 뿌리(갈근)추출물
- ② 갈근 냉수추출물 및 열수추출물의 시험관 내 항타이로시나아제 활성 실험
- ③ 갈근 냉수추출물(CWE) 및 열수추출물(HWE)의 세포독성
- ④ 갈근 냉수추출물(CWE) 및 열수추출물(HWE) 처리 세포 내 멜라닌 함량

(4) 오미자 열매 냉수추출물 및 열수추출물의 항타이로시나제 활성 및 미백 기능

- ① 오미자 열매 추출물
- ② 오미자 열매 냉수추출물 및 열수추출물의 시험관 내 항타이로시나아제 활성 실험
- ③ 오미자 열매 냉수추출물(CWE) 및 열수추출물(HWE)의 세포독성
- ④ 오미자 열매 냉수추출물(CWE) 및 열수추출물(HWE) 처리 세포 내 멜라닌 함량

(5) 구기자 열매 냉수추출물 및 열수추출물의 항타이로시나제 활성 및 미백 기능

- ① 구기자 열매 추출물
- ② 구기자 열매 냉수추출물 및 열수추출물의 시험관 내 항타이로시나아제 활성 실험
- ③ 구기자 열매 냉수추출물(CWE) 및 열수추출물(HWE)의 세포독성
- ④ 구기자 열매 냉수추출물(CWE) 및 열수추출물(HWE) 처리 세포 내 멜라닌 함량

(6) 천마 덩이줄기 냉수추출물 및 열수추출물의 항타이로시나제 활성 및 미백 기능

- ① 천마 덩이줄기 추출물
- ② 천마 덩이줄기 냉수추출물 및 열수추출물의 시험관 내 항타이로시나아제 활성 실험
- ③ 천마 덩이줄기 냉수추출물(CWE) 및 열수추출물(HWE)의 세포독성
- ④ 천마 덩이줄기 냉수추출물(CWE) 및 열수추출물(HWE) 처리 세포 내 멜라닌 함량

- (1) 지황 뿌리(건지황) 냉수추출물 및 열수추출물의 항타이로시나제 활성 및 미백 기능  
 ① 출원증  
 ㉠ 출원(지황 열수)

## 출원 번호 통지서

출원 일자 2017.06.30  
 특 기 사 항 심사청구(무) 공개신청(무) 참조번호(1062671)  
 출원 번호 10-2017-0083422 (접수번호 1-1-2017-0630287-20)  
 출원인 명칭 배재대학교 산학협력단(2-2004-010555-1)  
 대리인 성명 특허법인이플리온(9-2016-100061-5)  
 발명자 성명 최창원 오성 김성대 노한별  
 발명의 명칭 지황 열수 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 또는 색소 침착 개선용 화장품 조성물

## 특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) - 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
 ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
 ※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드  
 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내  
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO-SB-39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
 ※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

## 출원 번호 통지서

출원 일자 2017.06.30  
특기사항 심사청구(무) 공개신청(무) 참조번호(1062672)  
출원번호 10-2017-0083423 (접수번호 1-1-2017-0630288-76)  
출원인명칭 배재대학교 산학협력단(2-2004-010555-1)  
대리인성명 특허법인이름리온(9-2016-100061-5)  
발명자성명 최창원 오성 김성대 노한별  
발명의명칭 지항 냉수 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 또는 색소 침착 개선용 화장료 조성물

## 특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드  
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내  
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

② 건지황 추출물

㉠ 시료 : 건지황의 뿌리를 증류수로 세척하고 건조시킨 후 분쇄기로 잘게 분쇄하였음

㉡ 추출

- 분쇄물을 10배 중량의 냉수 및 열수를 각각 가하고 24 시간 동안 추출한 후 와트만 종이 여과지(Whatman No. 2)로 여과한 후 그 여액을 65±2°C 감압 농축하여 초저온냉동고에서 동결한 후 냉동건조기(freeze dryer)로 동결건조하여 최종 추출물을 수득하였음

[표 1] 지황 뿌리로부터 냉수 추출을 통한 수확량

| 건지황 뿌리 건물중 | 냉수추출물(CWE)의 동결건조량 | 열수추출물(HWE)의 동결건조량 |
|------------|-------------------|-------------------|
| 50 g       | 13.9 g            | 14.7 g            |

③ 건지황 냉수추출물 및 열수추출물의 시험관 내 항타이로시나아제 활성 실험

㉠ 시약

- 본 실험에 사용된 효소는 mushroom tyrosinase(Sigma-Aldrich Co., USA)를 구입하여 사용하였음
- 타이로시나제 활성 측정 시 기질은 L-DOPA와 L-tyrosine을 사용하였음
- 멜라닌 생성을 더 자극하기 위해서 α-MSH(melanocyte stimulating hormone)를 구입하여 세포에 처리하였음

㉡ 기질에 따른 시험관 내 타이로시나제 저해 활성 측정

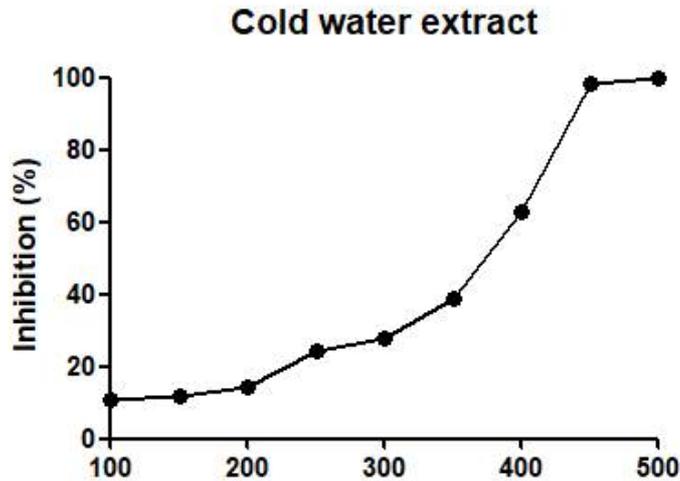
- L-DOPA와 L-tyrosine을 각각 100 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)로 녹이고 타이로시나제는 333 U/mL를 사용하였음
- 30 μL의 10 mM L-DOPA 혹은 L-tyrosine과 농도별로 희석된 각 추출물 시료는 최종 농도를 조절하여 70 μL를 첨가하였음
- 반응액은 37°C에서 30 분간 반응시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하고 저해 비율을 다음과 같이 계산하였음
- 타이로시나제 억제율(%) =  $[1 - \{(B-C)/(A-D)\}] \times 100$  ; A는 효소만 첨가된 반응용액, B는 효소와 시료가 모두 첨가된 반응용액, C는 시료만 첨가된 반응용액, D는 효소와 시료가 모두 첨가되지 않은 반응용액의 490 nm에서의 흡광도 값임

[표 2] 냉수추출물 및 열수추출물의 머섯 타이로시나제 억제 농도: IC<sub>50</sub> (μg/mL)

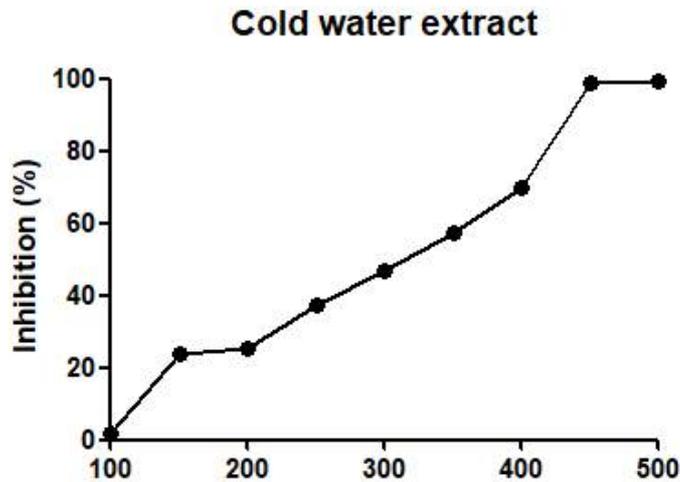
| 기질         | IC <sub>50</sub> (μg/mL) |       |            |
|------------|--------------------------|-------|------------|
|            | 냉수추출물                    | 열수추출물 | Kojic acid |
| L-DOPA     | 385.9                    | 381.4 | 34.9       |
| L-tyrosine | 314.2                    | 274.3 | 46.1       |

- 실험결과, L-DOPA를 기질로 사용했을 때 냉수추출물은 500 μg/mL 농도에서 100% 타이로시나제 억제 활성을 나타냈고, IC<sub>50</sub>은 385.9 μg/mL로 측정되었음 [그림 1 및 표2]

- 또한, L-tyrosine을 기질로 사용했을 때 냉수추출물은 500  $\mu\text{g/mL}$ 에서 100% 타이로시나제 억제 활성을 나타냈고,  $\text{IC}_{50}$ 은 314.2  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었음 [그림 2 및 표2]
- 비교 대조구인 kojic acid는 L-DOPA를 기질로 사용했을 때  $\text{IC}_{50}$ 은 34.9  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었고, L-tyrosine을 기질로 사용했을 때  $\text{IC}_{50}$ 은 46.1  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었음

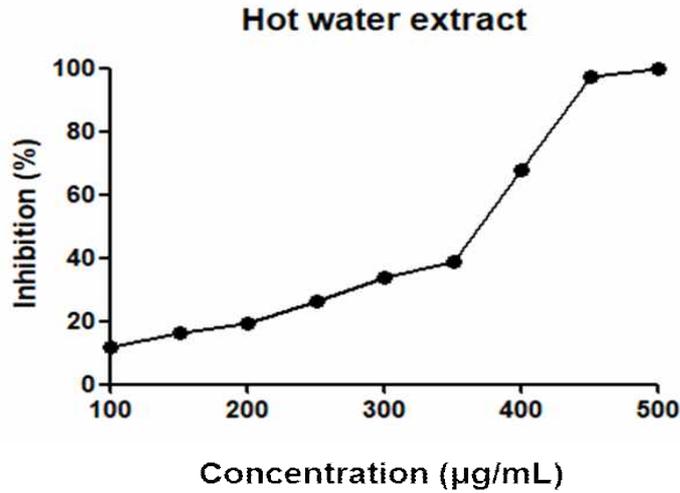


[그림 1] L-DOPA를 기질로 사용했을 때 건지황 냉수추출물 농도별(100~500  $\mu\text{g/mL}$ )로 버섯 타이로시나제 효소활성(%)을 억제하는 것을 나타내었다. 각 측정값은 3번 반복의 평균값

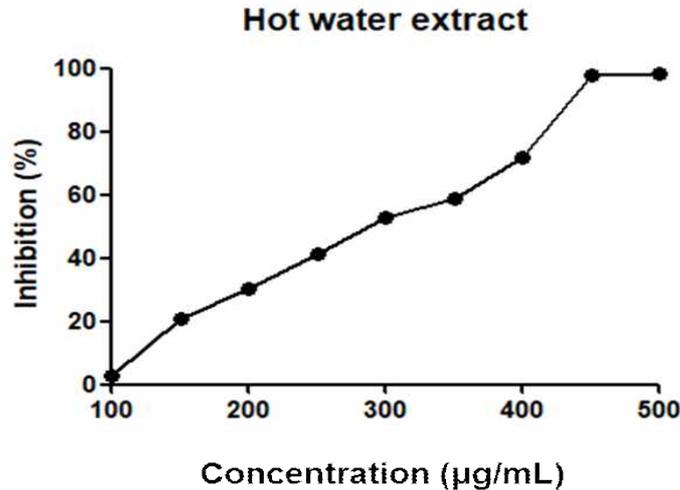


[그림 2] L-tyrosine을 기질로 사용했을 때 건지황 냉수추출물 농도별(100~500  $\mu\text{g/mL}$ )로 버섯 타이로시나제 효소활성(%)을 억제하는 것을 나타내었다. 각 측정값은 3번 반복의 평균값

- 실험결과, L-DOPA를 기질로 사용했을 때 냉수추출물은 500  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 100% 타이로시나제 억제 활성을 나타냈고,  $\text{IC}_{50}$ 은 385.9  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었음 [그림 1 및 표2]



[그림 3] L-DOPA를 기질로 사용했을 때 건지황 열수추출물 농도별(100~500 µg/mL)로 버섯 타이로시나제 효소활성(%)을 억제하는 것을 나타내었다. 각 측정값은 3번 반복의 평균값

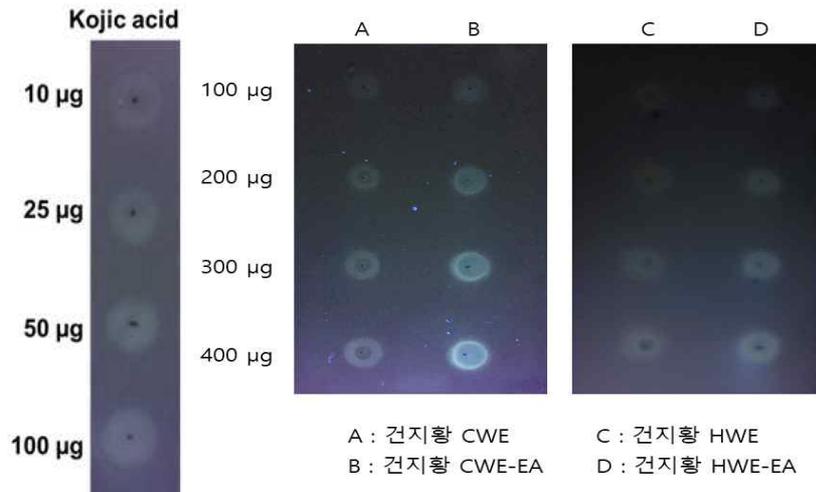


[그림 4] L-tyrosine을 기질로 사용했을 때 건지황 열수추출물 농도별(100~500 µg/mL)로 버섯 타이로시나제 효소활성(%)을 억제하는 것을 나타내었다. 각 측정값은 3번 반복의 평균값

㉔ 시험관 내 타이로시나제 저해 활성 측정(Bioautography)

- L-DOPA를 2mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)로 녹이고 타이로시나제는 333 U/mL를 사용함
- 각 추출물 및 분획물을 농도별(100ug/ml~400ug/ml)로 조절하여 10 µL를 TLC plate(Sigma-Aldrich, Silica gel C18 TLC Plate)에 분주함
- 대조군으로 Kojic acid (10ug/ml~100ug/ml)를 사용함
- 분무기를 이용 하여 Tyrosinase 용액(333U/ml)을 TLC plate에 분사함
- 실온에서 5분간 방치 후 L-dopa 용액(2mM)을 분무기를 이용하여 TLC plate에 분사함

- 실온에서 5분간 방치 후 37°C 조건에서 1시간 반응 후 UV 365nm에서 확인함
- 실험결과, 냉수추출물과 열수추출물에서는 kojic acid와 동일한 항타이로시나제 활성을 관찰함[그림 5A, C]
- 냉수추출물 분획물은 매우 강한 항타이로시나제 활성을 보였고, 열수추출물 분획물은 kojic acid와 각 추출물에 비해 강한 항타이로시나제 활성을 나타냄



[그림 5] 대조군 Kojic acid, 건지황 냉수, 열수 추출물 및 분획물을 사용하여 Bioautography 한 결과

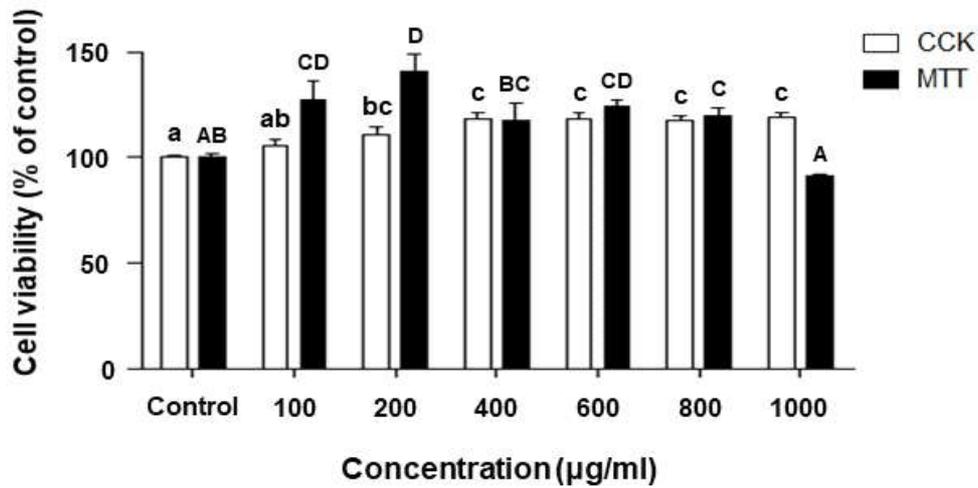
④ 건지황 냉수추출물(CWE) 및 열수추출물(HWE)의 세포독성(cytotoxicity)

㉠ 세포 배양

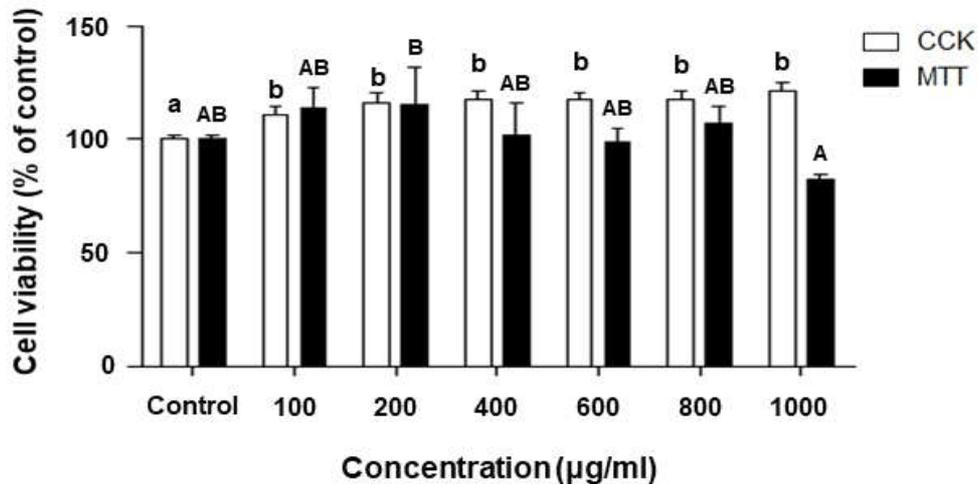
- B16F10 세포(ATCC, CRL-6475, mouse melanoma cell)의 생육 배지로는 RPMI 1640(Sigma, USA)을 이용하였음
- 배지에는 10% fetal bovine serum(Gibco, USA)와 penicillin-streptomycin(100 U/ml)을 첨가하였으며, 실험기간 동안 세포주는 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였음

㉡ 세포 독성

- 배양된 BF16F10 멜라노마 세포를 96 well plate에 각각 5 x 10<sup>4</sup> cells/well로 분주하고 24 시간 배양한 후 각 추출물을 농도별로 희석하여 처리하고 24 시간 배양하였음
- PBS 용액을 처리한 멜라노마 세포는 음성대조구로 사용하였다. 세포밀도는 Cell Counting Kit-8(CCK-8, Sigma-Aldrich, USA)와 MTT(Sigma-Aldrich, USA)를 이용하여 흡광도 450 nm에서 측정하였음
- 모든 처리구는 3반복하였음
- BF16F10 멜라노마 세포에서 농도별 냉수추출물의 세포독성을 확인한 결과, 냉수추출물은 100, 200 µg/mL 농도에서 증가하는 경향이 보였으며 1,000 µg/mL(91.5%) 농도에서는 다소 감소했으나 음성대조구인 PBS 처리구(100%)와 차이의 유의성은 없었음 [그림 6]
- BF16F10 멜라노마 세포주에서 열수추출물의 농도별 세포독성을 확인한 결과, 1,000 µg/mL(82.4%) 농도에서 음성대조구인 PBS 처리구(100%)보다 생존율이 다소 감소했으나 유의성 있는 차이는 없었음 [그림 7]



[그림 6] 건지황 냉수추출물을 농도별(100~1000 µg/mL)로 멜라노마 세포주 B16F10에 처리한 후 측정된 세포독성을 나타냄

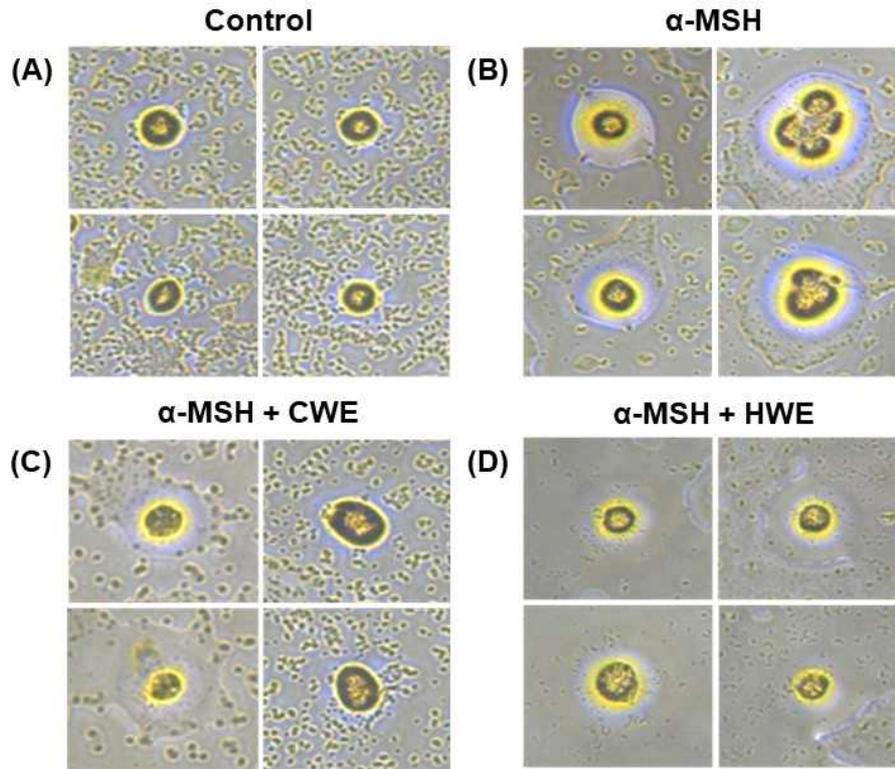


[그림 7] 건지황 열수추출물을 농도별(100~1,000 µg/mL)로 멜라노마 세포주 B16F10에 처리한 후 측정된 세포독성을 나타냄

㉔ 건지황 냉수추출물(CWE) 및 열수추출물(HWE) 처리 세포내 항타이로시나아제 활성 실험 (DOPA staining)

- B16F10 세포를  $1 \times 10^5$  cells/mL 농도로 24 well 배양판에 100 µl씩 분주하여 배양기에서 24 시간 방치한 후, 음성대조구로서 PBS 용액 처리, 양성대조구로서 α-MSH(melanocyte stimulating hormone) 단독 처리(200 nM), 비교 처리구로서 α-MSH + 냉수추출물(100 µg/mL) 병용 처리와 α-MSH + 열수추출물(100 µg/mL) 병용 처리하였음
- 각 시료 처리하고 48 시간 배양한 후 PBS 용액으로 2회 세척하고 4% paraformaldehyde로 고정시킨 다음에 2회 PBS용액으로 세척함
- 10 mM L-DOPA로 염색하고 탈색한 후에 관찰함

- 실험결과,  $\alpha$ -MSH 단독 처리된 B16F10 세포에서 L-DOPA 염색이 강하게 나타남 [그림 7B]
- 반면 냉수추출물과 열수추출물이 처리된 B16F10 세포에서는 PBS 처리군과 동일하게 염색이 약하게 나타남[그림 7A, C, D]

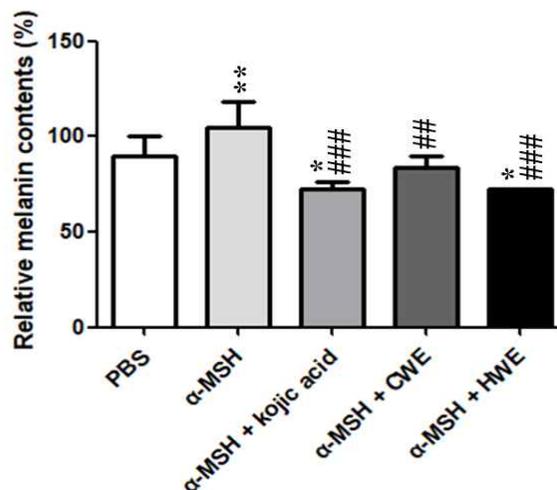


[그림 8] 건지황 열수추출물을 농도별(100~1,000  $\mu$ g/mL)로 멜라노마 세포주 B16F10에 처리한 후 측정된 세포독성을 나타냄

⑤ 건지황 냉수추출물(CWE) 및 열수추출물(HWE) 처리 세포 내 멜라닌 함량(melanin content)

㉠ 멜라닌 정량

- B16F10 세포를  $5 \times 10^4$  cells/mL 농도로 24 well 배양판에 100  $\mu$ l씩 분주하여 배양기에서 24 시간 방치한 후, 음성대조구로서 PBS 용액 처리, 양성대조구로서  $\alpha$ -MSH(melanocyte stimulating hormone) 단독 처리(1  $\mu$ M), 비교 처리구로서  $\alpha$ -MSH + kojic acid(500  $\mu$ M/mL) 병용 처리 및  $\alpha$ -MSH + 냉수추출물(100  $\mu$ g/mL) 병용 처리와  $\alpha$ -MSH + 열수추출물(100  $\mu$ g/mL) 병용 처리하였음
- 각 시료 처리하고 48 시간 배양한 후 1N NaOH 200  $\mu$ L를 처리하여 1 시간 동안 60 $^{\circ}$ C 항온수조에서 반응시켰다. 멜라닌을 완전히 용해시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였고 모든 시료 처리는 3반복 수행하였음
- 실험결과, B16F10 세포에서 멜라닌 함량은 PBS 용액 처리구에서 89.7%로 나타났으며  $\alpha$ -MSH 단독 처리구에서 105.1%로 증가하였음 [그림 7]
- 그러나  $\alpha$ -MSH + kojic acid 병용 처리구에서 멜라닌 생합성율은 72.3%로 유의성 있게 감소하였음
- $\alpha$ -MSH + 냉수추출물 병용 처리구에서도 멜라닌 생합성율은 83.5%로 유의성 있게 감소하였음
- $\alpha$ -MSH + 열수추출물 병용 처리구에서도 멜라닌 생합성율은 72.2%로 유의성 있게 감소하여 kojic acid와 유사하였음



[그림 9] 건지황 냉수추출물 및 열수추출물 각각을 100  $\mu$ g/mL 농도로 멜라노마 세포주 B16F10에 처리한 후 측정된 멜라닌 함량이다. 좌로부터 PBS 용액 처리 B16F10 세포(음성대조구),  $\alpha$ -MSH(melanocyte stimulating hormone) 처리 B16F10 세포(양성대조구),  $\alpha$ -MSH + kojic acid 처리 B16F10 세포,  $\alpha$ -MSH + 냉수추출물 처리 B16F10 세포 및  $\alpha$ -MSH + 열수추출물 처리 B16F10 세포이다. 기호 \*는 PBS 용액 처리구와의 유의성 있는 차이(\* P < 0.05, \*\* P < 0.01)를 나타내며, #는  $\alpha$ -MSH 처리구와 유의성 있는 차이(# P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001)를 나타냄

⑥ 건지황 추출물 및 에틸아세테이트 분획물의 세포 내 미백 활성 실험

㉠ 세포 배양

- B16F10 세포(ATCC, CRL-6475, mouse melanoma cell)의 생육 배지로는 DMEM High Glucose(Gibco, USA)을 이용하였고, 배지에는 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco, USA)와 penicillin 및 streptomycin(100 U/ml)을 첨가하였으며, 실험기간 동안 세포주는 37° C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였음
- B16F10 세포를 1 x 10<sup>6</sup> cells/well 농도로 6 well 배양판에 1 ml 씩 분주하여 배양기에서 24 시간 방치한 후, 음성대조구로서 PBS 용액 처리, 양성대조구로서 α-MSH(melanocyte stimulating hormone) 단독 처리(1 μM), 비교 처리구로서 α-MSH + kojic acid(500 μM/mL) 병용 처리 α-MSH + 냉수추출물 병용 처리와 α-MSH + 열수추출물 병용 처리 하였음

[표 3] 건지황 추출물 및 분획물 처리 및 음성 및 양성 대조구 처리표

|                     |   |   |   |     |     |
|---------------------|---|---|---|-----|-----|
| α-MSH (1 μM)        | - | + | + | +   | +   |
| Kojic acid (500 μM) | - | - | + | -   | -   |
| CWE(μg/ml)          | - | - | - | 100 | -   |
| HWE(μg/ml)          | - | - | - | -   | 100 |

㉡ RT-qPCR

- 세포에서의 미백 효능을 검증하기 위해 멜라닌 합성 과정의 대표적 유전자 4개를 선정하여 mRNA 발현 정도를 확인함
- Microphthalmia-associated transcription factor(MITF), Tyrosinase, Tyrosinase related protein 1(TRP-1), Tyrosinase related protein 2(TRP-2), 그리고 housekeeping 유전자인 GAPDH를 선정함
- [표 3]과 같은 조건으로 각 추출물과 분획물이 처리된 세포를 37° C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양 후 세포의 RNAiso Plus(Takara, Japan) 키트를 이용하여 RNA를 추출함
- cDNA 합성은 SuPrimeScript RT Premix(GenetBio, Korea)를 이용하여 합성했으며, qPCR은 HS Prime qPCR Premix with UDG(GenetBio, Korea)를 이용하여 수행함
- Taqman probe(Bioneer, Korea)는 FAM과 BHQ1을 이용하여 제작함
- MX3000p (Agilent, USA)를 이용하여 Real-time PCR을 수행함
- 실험결과, 멜라닌 합성에 관여되는 tyrosinase의 합성을 촉진시키는 MITF 유전자의 mRNA 발현을 냉수추출물과 열수추출물 모두 무처리군과 동일하게 각각 76.4% 그리고 83.4% 감소시키는 것을 확인함[그림 8A]
- L-tyrosine과 L-DOPA를 분해하여 멜라닌 합성에 직접적으로 관여하는 tyrosinase 유전자의 mRNA 발현을 냉수추출물 46.8%과 열수추출물 64.8% 감소시켜 kojic acid(53.4%)와 동일한 유의성을 확인함[그림 8B]
- TRP1의 경우, 냉수추출물 65.7%과 열수추출물 70.8% 감소시켜 kojic acid(44.9%)보다 높은 억제능을 확인함[그림 8C]

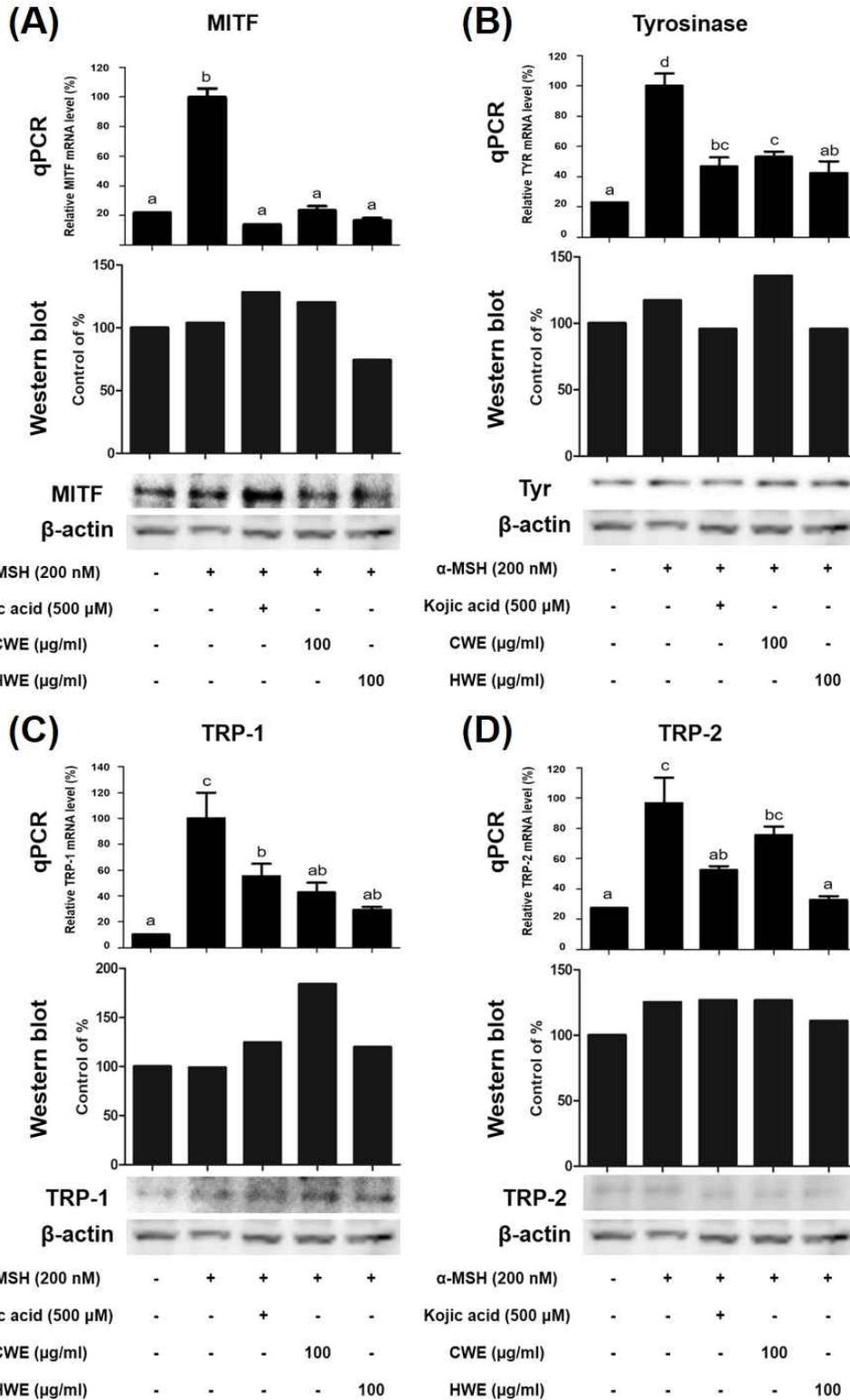
- TRP2의 경우, 냉수추출물 24.4%로 kojic acid(47.6%) 보다 낮은 억제능을 보이는 반면 열수추출은 67.3%로 높은 억제능을 확인함[그림 8D]

[표 4] 건지황 추출물 및 분획물 처리 및 음성 및 양성 대조구 처리표

| Gene       | Primer       | Sequences (5'→3')                      |
|------------|--------------|--|
| MITF       | q-Forward    | CTA TGG CTA TGC TCA CTC TTA ACT C      |
|            | q-Reverse    | CTC GAG AGT GCG TGT TCA TAC C          |
|            | RT-Reverse   | GAC AGG AGT TGC TGA TGG TAA GG         |
|            | Taqman probe | [FAM]TAAGTTTGAGGAGCAGAGCAGGGC[BHQ1]    |
| tyrosinase | q-Forward    | GGG ATT GGA GAG ATG CAG AAA ACT        |
|            | q-Reverse    | TCT GCC AGG AGG AGA AGA AGG            |
|            | RT-Reverse   | GTT TCT AAA GCT GAA ATT GGC AGT TCT AT |
|            | Taqman probe | [FAM]TACTTGGGAGGTCGTCACCCTGAA[BHQ1]    |
| TRP-1      | q-Forward    | GCT TGG AGG TCC GTG TAT TTG AC         |
|            | q-Reverse    | TCG AAC AGC AGG GTC ATA TTT TCC        |
|            | RT-Reverse   | GTT ATG TCC AAT AGG TGC GTT TTC C      |
|            | Taqman probe | [FAM]AGTGGAAAGTTACAGTGCTCCCAC[BHQ1]    |
| TRP-2      | q-Forward    | CCA TCT GTT GTG GCT GGA AAG AG         |
|            | q-Reverse    | GCA CAC GTC ACA CTC GTT CTT C          |
|            | RT-Reverse   | TTA AGG TTG GCA GTT TCT CAT TAT TTC TG |
|            | Taqman probe | [FAM]ATGAGTCCTTTGCGTTGCCCTACT[BHQ1]    |
| GAPDH      | q-Forward    | GGG TGT GAA CCA CGA GAA ATA TGA        |
|            | q-Reverse    | GGT CAT GAG CCC TTC CAC AAT G          |
|            | RT-Reverse   | AAG GCC ATG CCA GTG AGC TTC            |
|            | Taqman probe | [FAM]ATTGTCAGCAATGCATCCTGCACC[BHQ1]    |

㉔ Western blot

- 배양기에서 72 시간 방치 한 후 PBS로 3회 세척, RIPA(Thermo, USA) 용액을 사용하여 세포 단백질을 추출 한 후 각 단백질 100  $\mu$ g을 사용하여 Western blot을 수행함
- 항체로는 beta-Actin, MITF(3F)276, TRP1(3F388), TRP2(B-7), Tyrosinase (O.N.596), p-ERK 1/2, ERK 1/2(C-9), p-p38 (E-1), p38 alpha/beta (A-12), p-JNK (G-7), JNK (D-2) (Santa Cruz biotechnology, Inc. USA.)를 사용함
- Azure c280(azure biosystems. USA) Chemidoc을 사용하여 단백질을 확인함
- 실험결과, 멜라닌 합성에 관여되는 tyrosinase의 합성을 촉진시키는 MITF 단백질의 발현은 mRNA 레벨과 달리  $\alpha$ -MSH + kojic acid 병용처리가 가장 높았으며(128.2%) 냉수추출물이 120.2%로 높아진 반면 열수추출물은 74.3%로 감소를 확인함[그림 8A]
- L-tyrosine과 L-DOPA를 분해하여 멜라닌 합성에 직접적으로 관여하는 tyrosinase 단백질 발현은 냉수추출물이 135.7%로 높아진 반면 열수추출물은 95.5%로 감소시켜 kojic acid(95.6%)와 동일한 억제능을 확인함[그림 8B]
- TRP1의 경우, 냉수추출물이 183.9%로 높아진 반면 열수추출물 119.8%로 감소시켜 kojic acid(124.6%)과 동일한 억제능을 확인함[그림 8C]
- TRP2의 경우, 냉수추출물이 126.5%로 kojic acid(126.7)와 동일하게 높아진 반면 열수추출물 110.8%로 약 10% 감소시켜 억제능을 확인함[그림 8D]



[그림 10] 건지황 냉수추출물 및 열수추출물 각각을 100  $\mu\text{g/mL}$  농도로 멜라노마 세포주 B16F10에 처리한 후 측정된 mRNA 정량 값이다. 좌로부터 PBS 용액 처리 B16F10 세포(음성대조구),  $\alpha$ -MSH(melanocyte stimulating hormone) 처리 B16F10 세포(양성대조구),  $\alpha$ -MSH + kojic acid 처리 B16F10 세포,  $\alpha$ -MSH + 냉수추출물 처리 B16F10 세포 및  $\alpha$ -MSH + 열수추출물 처리 B16F10 세포이다.

(2) 오이풀 뿌리(지유) 냉수추출물 및 열수추출물의 항타이로시나제 활성 및 미백 기능

① 특허 성과

① 출원(지유)

## 출원 번호 통지서

출원 일자 2017.06.30  
특기사항 심사청구(우) 공개신청(우) 참조번호(1062670)  
출원번호 10-2017-0083421 (접수번호 1-1-2017-0630286-85)  
출원인명칭 배재대학교 산학협력단(2-2004-010555-1)  
대리인성명 특허법인이플리온(9-2016-100061-5)  
발명자성명 최창원 오성 김성대 노한별  
발명의명칭 오이풀 수 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 또는 색소 침착 개선용 화장료 조성물

## 특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당·PCT/마드리드  
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내  
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

② 오이풀 뿌리(지유) 냉수추출물 및 열수추출물의 시험관 내 항타이로시나아제 활성 실험

㉠ 시약

- 본 실험에 사용된 효소는 mushroom tyrosinase(Sigma-Aldrich Co., USA)를 구입하여 사용하였음
- 타이로시나제 활성 측정 시 기질은 L-DOPA와 L-tyrosine을 사용하였음
- 멜라닌 생성을 더 자극하기 위해서  $\alpha$ -MSH(melanocyte stimulating hormone)를 구입하여 세포에 처리하였음

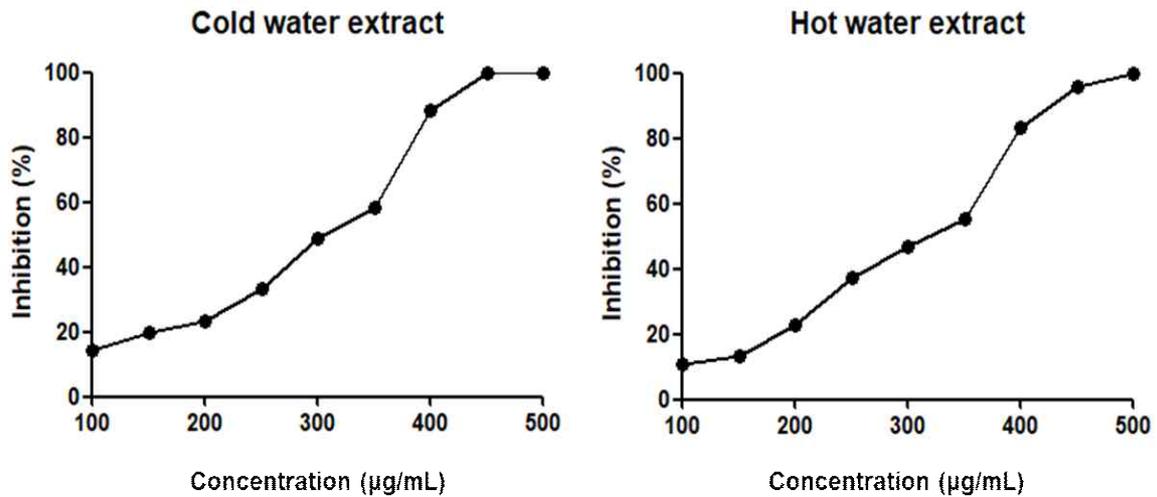
㉡ 기질에 따른 시험관 내 타이로시나제 저해 활성 측정

- L-DOPA와 L-tyrosine을 각각 100 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)로 녹이고 타이로시나제는 333 U/mL를 사용하였음
- 30  $\mu$ L의 10 mM L-DOPA 혹은 L-tyrosine과 농도별로 희석된 각 추출물 시료는 최종 농도를 조절하여 70  $\mu$ L를 첨가하였음
- 반응액은 37°C에서 30 분간 반응시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하고 저해 비율을 다음과 같이 계산하였음
- 타이로시나제 억제율(%) =  $[1 - \{(B-C)/(A-D)\}] \times 100$  ; A는 효소만 첨가된 반응용액, B는 효소와 시료가 모두 첨가된 반응용액, C는 시료만 첨가된 반응용액, D는 효소와 시료가 모두 첨가되지 않은 반응용액의 490 nm에서의 흡광도 값임

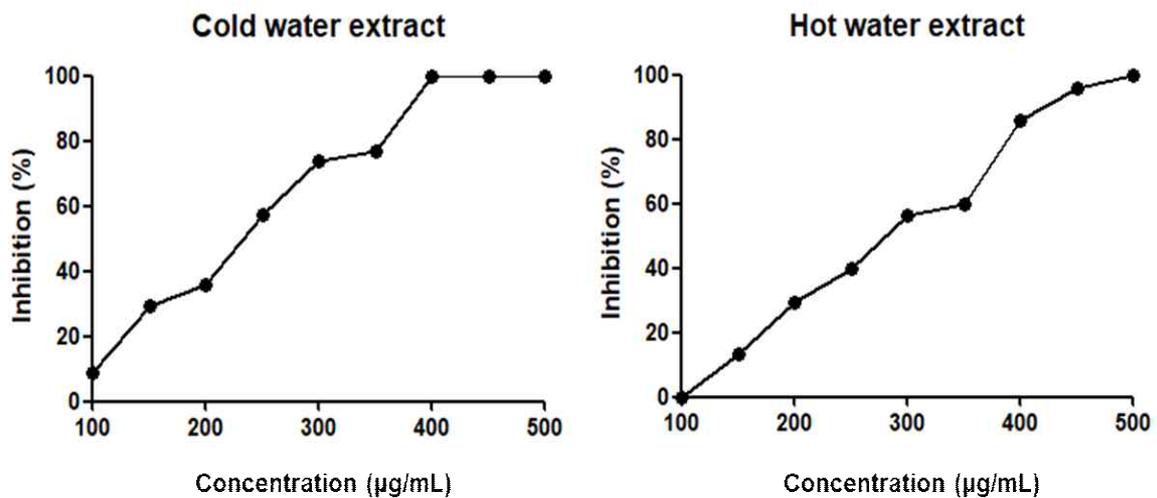
[표 1] 지유 냉수추출물 및 열수추출물의 버섯 타이로시나제 억제활성

| 기질         | IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL) |            |            |
|------------|--------------------------------|------------|------------|
|            | 냉수추출물(CWE)                     | 열수추출물(HWE) | Kojic acid |
| L-DOPA     | 333.6                          | 324.7      | 34.9       |
| L-tyrosine | 248.2                          | 244.9      | 46.1       |

- ㉢ 실험 결과, L-DOPA를 기질로 사용했을 때 냉수추출물은 450  $\mu$ g/mL 농도에서 100% 타이로시나제 억제 활성을 나타냈고, IC<sub>50</sub>은 333.6  $\mu$ g/mL로 측정되었음
- ㉣ 열수추출물의 경우 500  $\mu$ g/mL 농도에서 100% 타이로시나제 억제 활성을 나타냈고, IC<sub>50</sub>은 324.7  $\mu$ g/mL로 측정되었음 [그림 1 및 표 1].
- ㉤ 또한 L-tyrosine을 기질로 사용했을 때 냉수추출물은 400  $\mu$ g/mL에서 100% 타이로시나제 억제 활성을 나타냈고, IC<sub>50</sub>은 248.2  $\mu$ g/mL로 측정되었음
- ㉥ 열수추출물의 경우 500  $\mu$ g/mL에서 100% 타이로시나제 억제 활성을 나타냈고, IC<sub>50</sub>은 244.9  $\mu$ g/mL로 측정되었다 [그림 2 및 표1].
- ㉦ 한편 비교 대조구인 kojic acid는 L-DOPA를 기질로 사용했을 때 IC<sub>50</sub>은 34.9  $\mu$ g/mL로 측정되었고, L-tyrosine을 기질로 사용했을 때 IC<sub>50</sub>은 46.1  $\mu$ g/mL로 측정되었음



[그림 1] L-DOPA를 기질로 사용했을 때 지유 냉수추출물 및 열수추출물의 농도별(100~500  $\mu\text{g/mL}$ ) 버섯 타이로시나제 효소 억제활성(%)을 나타내었고, 각 측정값은 3번 반복의 평균값



[그림 2] L-tyrosine을 기질로 사용했을 때 지유 냉수추출물 및 열수추출물의 농도별 (100~500  $\mu\text{g/mL}$ ) 버섯 타이로시나제 효소 억제활성(%)을 나타내었고, 각 측정값은 3번 반복의 평균값

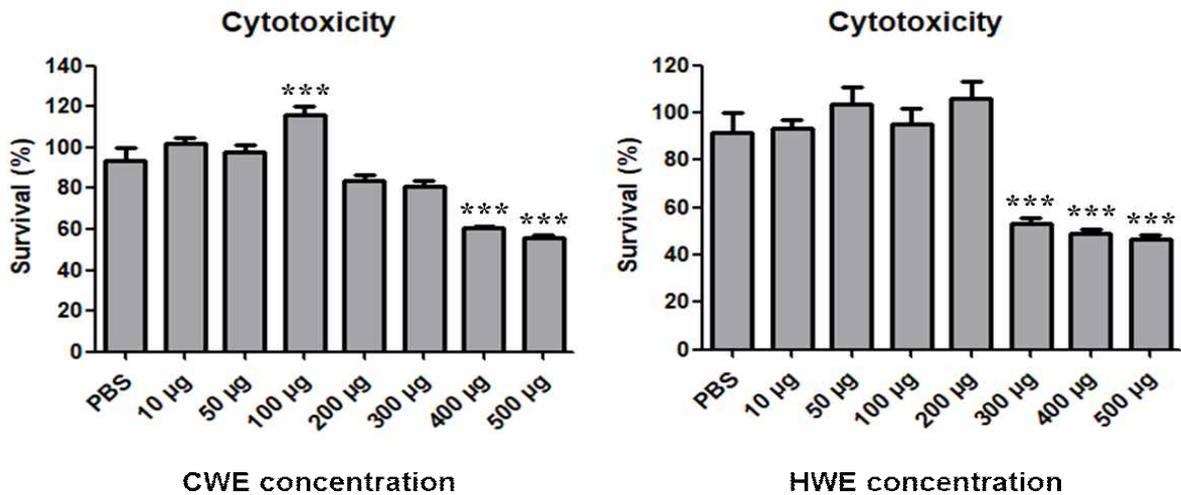
③ 오이풀 뿌리(지유) 냉수추출물(CWE) 및 열수추출물(HWE)의 세포독성(cytotoxicity)

㉠ 세포 배양

- B16F10 세포(ATCC, CRL-6475, mouse melanoma cell)의 생육 배지로는 RPMI 1640(Sigma, USA)을 이용하였음
- 배지에는 10% fetal bovine serum(Gibco, USA)와 penicillin-streptomycin(100 U/ml)을 첨가 하였으며, 실험기간 동안 세포주는 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였음

㉠ 세포 독성

- 배양된 BF16F10 멜라노마 세포를 96 well plate에 각각  $5 \times 10^4$  cells/well로 분주하고 24 시간 배양한 후 냉수추출물을 농도별로 희석하여 처리하고 24 시간 배양하였음
- PBS 용액을 처리한 멜라노마 세포는 음성대조구로 사용하였다. 세포밀도는 Cell Counting Kit-8(CCK-8, Sigma-Aldrich, USA)를 이용하여 흡광도 450 nm에서 측정하였음
- 모든 처리구는 3반복하였음
- 세포독성은 다음과 같은 공식을 이용하여 결정하였음 : 세포독성(%) =  $(1 - \text{처리구 } A_{450 \text{ nm}} / \text{대조구 } A_{450 \text{ nm}}) \times 100$
- 실험결과, BF16F10 멜라노마 세포에서 농도별 냉수추출물 및 열수추출물의 세포독성을 확인한 결과, 냉수추출물은 100  $\mu\text{g/mL}$ (115.9%) 농도까지 세포독성이 없는 것으로 측정되었음 [그림 3]
- 열수추출물은 200  $\mu\text{g/mL}$ (106.2%) 농도까지 음성대조구인 PBS 처리구(93.3%)와 차이의 유의성이 없었음 [그림 3]



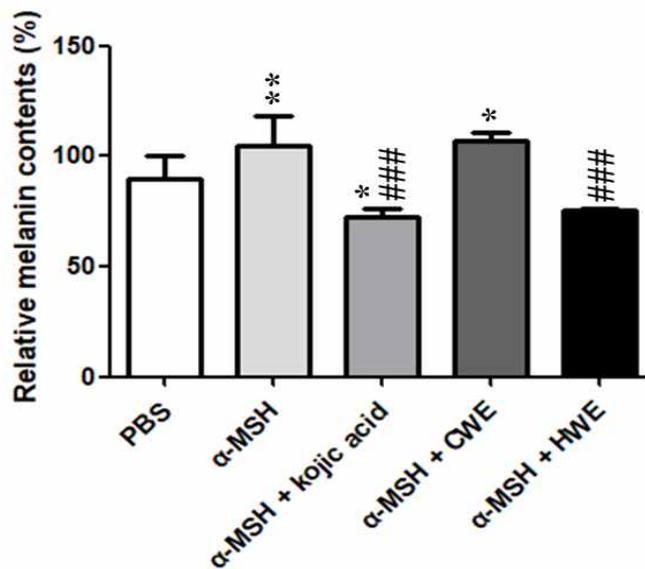
[그림 3] 지유 냉수추출물 및 열수추출물을 농도별(10~500  $\mu\text{g/mL}$ )로 멜라노마 세포주 B16F10에 처리한 후 측정된 세포독성이다. 기호 \*는 PBS 용액 처리구와의 유의성 있는 차이(\*\*\*)  $P < 0.001$ 를 나타냄

④ 오이풀 뿌리(지유) 냉수추출물(CWE) 및 열수추출물(HWE) 처리 세포 내 멜라닌 함량 (melanin content)

㉡ 멜라닌 정량

- B16F10 세포를  $5 \times 10^4$  cells/mL 농도로 24 well 배양판에 100  $\mu\text{l}$ 씩 분주하여 배양기에서 24 시간 방치한 후, 음성대조구로서 PBS 용액 처리, 양성대조구로서  $\alpha$ -MSH(melanocyte stimulating hormone) 단독 처리(100 nM), 비교 처리구로서  $\alpha$ -MSH + kojic acid(30  $\mu\text{g/mL}$ ) 병용 처리 및  $\alpha$ -MSH + 냉수추출물(50  $\mu\text{g/mL}$ ) 병용 처리와  $\alpha$ -MSH + 열수추출물(50  $\mu\text{g/mL}$ ) 병용 처리하였음

- 각 시료 처리하고 48 시간 배양한 후 1N NaOH 200  $\mu$ L를 처리하여 1 시간 동안 60 $^{\circ}$ C 항온수조에서 반응시켰다. 멜라닌을 완전히 용해시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였고 모든 시료 처리는 3반복 수행하였음
- 실험결과, B16F10 세포에서 멜라닌 함량은 PBS 용액 처리구에서 89.7%로 나타났으나,  $\alpha$ -MSH 단독 처리구에서 상대적으로 증가하였음(105.1%)
- 향타이로시나제 활성이 탁월한 냉수추출물의 경우 기대와 달리  $\alpha$ -MSH + 열수추출물 병용 처리구에서 상대적으로 높은 멜라닌 함량(106.9%)이 측정되었음
- $\alpha$ -MSH + 열수추출물 병용 처리구에서는 멜라닌 함량은 75.4%로 유의성 있게 감소하여  $\alpha$ -MSH + kojic acid 병용 처리구(72.3%)와 유사한 멜라닌 생합성 억제 효과를 나타내었음 [그림 4]



[그림 4] 지유 냉수추출물 및 열수추출물을 50  $\mu$ g/mL 농도로 멜라노마 세포주 B16F10에 처리한 후 측정된 멜라닌 함량이다. 좌로부터 PBS 용액 처리 B16F19 세포(음성대조구),  $\alpha$ -MSH(melanocyte stimulating hormone) 단독 처리 B16F19 세포(양성대조구),  $\alpha$ -MSH + kojic acid 병용 처리 B16F19 세포(비교대조구),  $\alpha$ -MSH + 냉수추출물 병용 처리 B16F19 세포 및  $\alpha$ -MSH + 열수추출물 병용 처리 B16F19 세포이다. 기호 \*는 PBS 용액 처리구와의 유의성 있는 차이(\* P < 0.05, \*\* P < 0.01)를 나타내며, #는  $\alpha$ -MSH 처리구와 유의성 있는 차이(### P < 0.001)를 나타냄

(3) 쉼 뿌리(갈근) 냉수추출물 및 열수추출물의 항타이로시나제 활성 및 미백 기능

① 쉼 뿌리(갈근)추출물

㉠ 시료 : 갈근을 증류수로 세척하고 건조시킨 후 분쇄기로 잘게 분쇄하였음

㉡ 추출

- 분쇄물을 10배 중량의 냉수 및 열수를 각각 가하고 24 시간 동안 추출한 후 와트만 종이 여과지(Whatman No. 2)로 여과한 후 그 여액을 65±2°C 감압 농축하여 초저온냉동고에서 동결한 후 냉동건조기(freeze dryer)로 동결건조하여 최종 추출물을 수득하였음

[표 1] 쉼 뿌리(갈근)로부터 냉수 추출을 통한 수확량

| 갈근 건물중 | 냉수추출물(CWE)의 동결건조량 | 열수추출물(HWE)의 동결건조량 |
|--------|-------------------|-------------------|
| 50 g   | 6.32 g            | 4.67 g            |

② 갈근 냉수추출물 및 열수추출물의 시험관 내 항타이로시나아제 활성 실험

㉠ 시약

- 본 실험에 사용된 효소는 mushroom tyrosinase(Sigma-Aldrich Co., USA)를 구입하여 사용하였음
- 타이로시나제 활성 측정 시 기질은 L-DOPA와 L-tyrosine을 사용하였음
- 멜라닌 생성을 더 자극하기 위해서 α-MSH(melanocyte stimulating hormone)를 구입하여 세포에 처리하였음

㉡ 기질에 따른 시험관 내 타이로시나제 저해 활성 측정

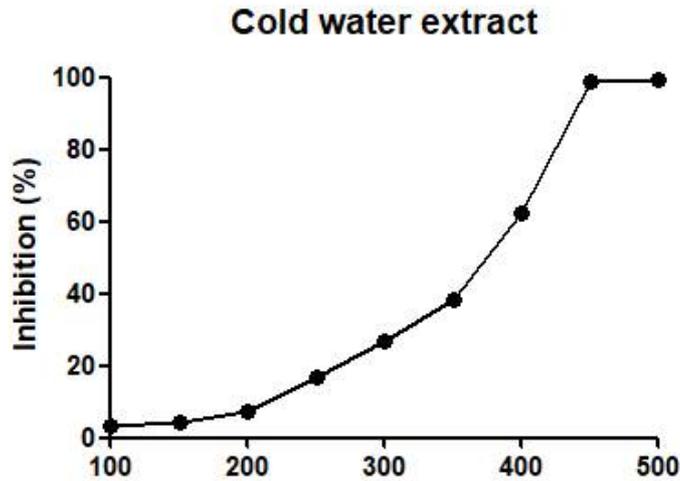
- L-DOPA와 L-tyrosine을 각각 100 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)로 녹이고 타이로시나제는 333 U/mL를 사용하였음
- 30 μL의 10 mM L-DOPA 혹은 L-tyrosine과 농도별로 희석된 각 추출물 시료는 최종 농도를 조절하여 70 μL를 첨가하였음
- 반응액은 37°C에서 30 분간 반응시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하고 저해 비율을 다음과 같이 계산하였음
- 타이로시나제 억제율(%) =  $[1 - \{(B-C)/(A-D)\}] \times 100$  ; A는 효소만 첨가된 반응용액, B는 효소와 시료가 모두 첨가된 반응용액, C는 시료만 첨가된 반응용액, D는 효소와 시료가 모두 첨가되지 않은 반응용액의 490 nm에서의 흡광도 값임

[표 2] 쉼 뿌리(갈근) 냉수추출물 및 열수추출물의 버섯 타이로시나제 억제 농도: IC<sub>50</sub> (μg/mL)

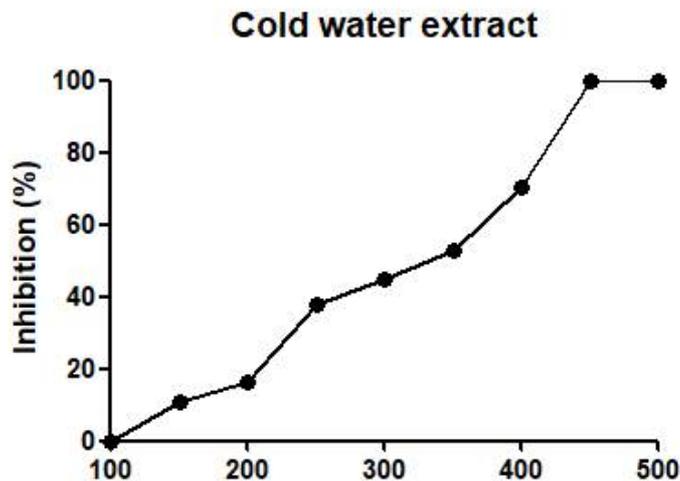
| 기질         | IC <sub>50</sub> (μg/mL) |       |            |
|------------|--------------------------|-------|------------|
|            | 냉수추출물                    | 열수추출물 | Kojic acid |
| L-DOPA     | 403.1                    | 394.1 | 34.9       |
| L-tyrosine | 308.8                    | 393.5 | 46.1       |

- 실험결과, L-DOPA를 기질로 사용했을 때 냉수추출물은 500 μg/mL 농도에서 99.2% 타이로시나제 억제 활성을 나타냈고, IC<sub>50</sub>은 403.1 μg/mL로 측정되었음 [그림 1 및 표2]

- 또한, L-tyrosine을 기질로 사용했을 때 냉수추출물은 450  $\mu\text{g/mL}$ 에서 100% 타이로시나제 억제 활성을 나타냈고,  $\text{IC}_{50}$ 은 308.8  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었음 [그림 2 및 표2]
- 비교 대조구인 kojic acid는 L-DOPA를 기질로 사용했을 때  $\text{IC}_{50}$ 은 34.9  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었고, L-tyrosine을 기질로 사용했을 때  $\text{IC}_{50}$ 은 46.1  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었음

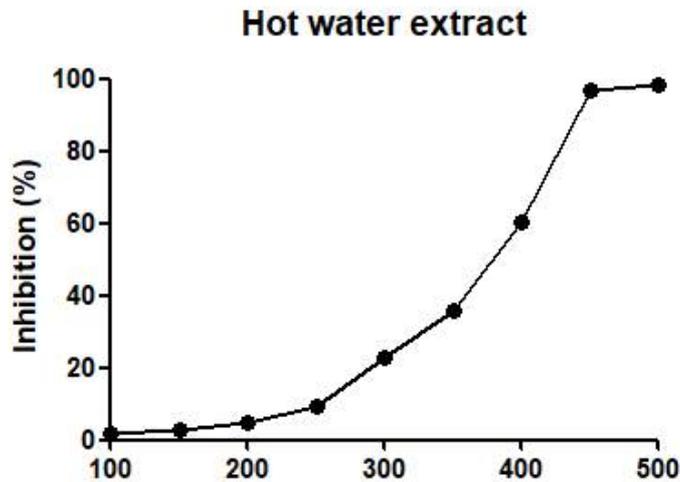


[그림 1] L-DOPA를 기질로 사용했을 때 갈근 냉수추출물 농도별(100~500  $\mu\text{g/mL}$ )로 버섯타이로시나제 효소활성(%)을 억제하는 것을 나타내었다. 각 측정값은 3번 반복의 평균값

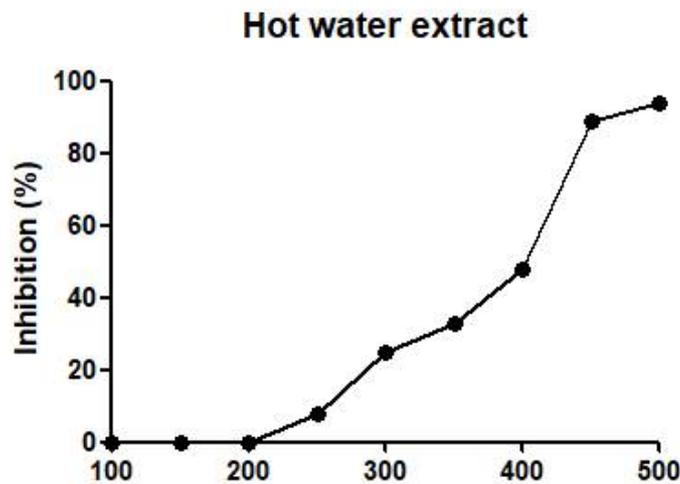


[그림 2] L-tyrosine을 기질로 사용했을 때 갈근 냉수추출물 농도별(100~500  $\mu\text{g/mL}$ )로 버섯타이로시나제 효소활성(%)을 억제하는 것을 나타내었다. 각 측정값은 3번 반복의 평균값

- L-DOPA를 기질로 사용했을 때 열수추출물은 500  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 98.1% 타이로시나제 억제 활성을 나타냈고,  $\text{IC}_{50}$ 은 394.1  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었음 [그림 3 및 표2]
- 또한, L-tyrosine을 기질로 사용했을 때 열수추출물은 500  $\mu\text{g/mL}$ 에서 93.6% 타이로시나제 억제 활성을 나타냈고,  $\text{IC}_{50}$ 은 393.5  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었음 [그림 4 및 표2]



[그림 3] L-DOPA를 기질로 사용했을 때 갈근 열수추출물 농도별(100~500  $\mu\text{g/mL}$ )로 버섯타이로시나제 효소활성(%)을 억제하는 것을 나타내었다. 각 측정값은 3번 반복의 평균값



[그림 4] L-tyrosine을 기질로 사용했을 때 갈근 열수추출물 농도별(100~500  $\mu\text{g/mL}$ )로 버섯타이로시나제 효소활성(%)을 억제하는 것을 나타내었다. 각 측정값은 3번 반복의 평균값

③ 갈근 냉수추출물(CWE) 및 열수추출물(HWE)의 세포독성(cytotoxicity)

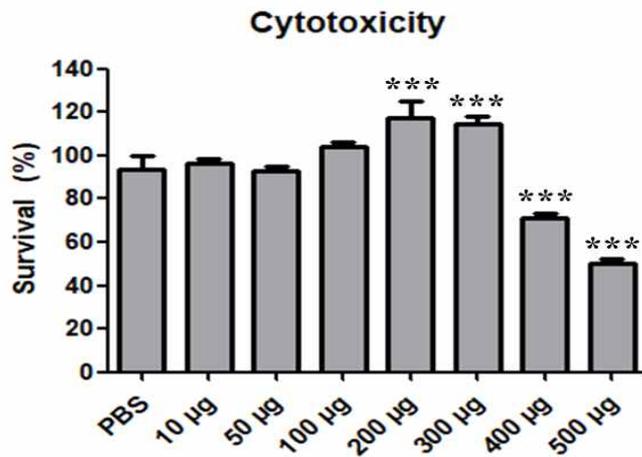
㉠ 세포 배양

- B16F10 세포(ATCC, CRL-6475, mouse melanoma cell)의 생육 배지로는 RPMI 1640(Sigma, USA)을 이용하였음
- 배지에는 10% fetal bovine serum(Gibco, USA)와 penicillin-streptomycin(100 U/ml)을 첨가하였으며, 실험기간 동안 세포주는 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였음

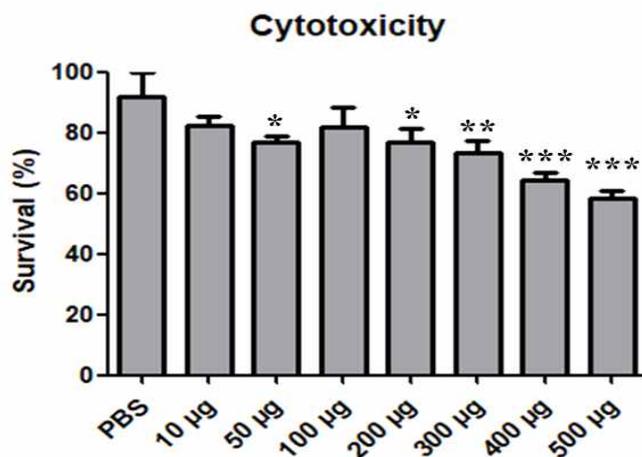
㉡ 세포 독성

- 배양된 BF16F10 멜라노마 세포를 96 well plate에 각각  $5 \times 10^4$  cells/well로 분주하고 24 시간 배양한 후 각 추출물을 농도별로 희석하여 처리하고 24 시간 배양하였음

- PBS 용액을 처리한 멜라노마 세포는 음성대조구로 사용하였다. 세포밀도는 Cell Counting Kit-8(CCK-8, Sigma-Aldrich, USA)를 이용하여 흡광도 450 nm에서 측정하였음
- 모든 처리구는 3반복하였음
- 세포독성은 다음과 같은 공식을 이용하여 결정하였음 : 세포독성(%) = (1-처리구  $A_{450\text{ nm}}$  / 대조구  $A_{450\text{ nm}}$ ) x 100
- BF16F10 멜라노마 세포에서 농도별 냉수추출물의 세포독성을 확인한 결과, 냉수추출물은 300  $\mu\text{g/mL}$ (114.6%) 농도까지 세포독성은 없었음( $P < 0.001$ ) [그림 5].
- BF16F10 멜라노마 세포주에서 열수추출물의 농도별 세포독성을 확인한 결과, 100  $\mu\text{g/mL}$ (81.9%) 농도까지 음성대조구인 PBS 처리구(93.3%)보다 생존율이 다소 감소했으나 유의성 있는 차이는 없었으나, 200  $\mu\text{g/mL}$ (76.7%) 농도부터 세포독성이 나타났음( $P < 0.05$ ) [그림 6]



[그림 5] 같은 냉수추출물을 농도별(10~500  $\mu\text{g/mL}$ )로 멜라노마 세포주 B16F10에 처리한 후 측정된 세포독성이다. 기호 \*는 PBS 용액 처리구와의 유의성 있는 차이(\*  $P < 0.05$ )를 나타냄

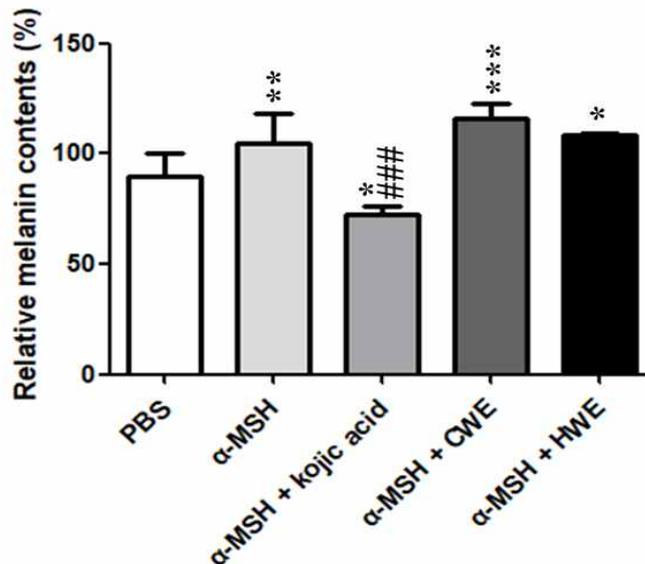


[그림 6] 같은 열수추출물을 농도별(10~500  $\mu\text{g/mL}$ )로 멜라노마 세포주 B16F10에 처리한 후 측정된 세포독성이다. 기호 \*는 PBS 용액 처리구와의 유의성 있는 차이(\*  $P < 0.05$ )를 나타냄

④ 갈근 냉수추출물(CWE) 및 열수추출물(HWE) 처리 세포 내 멜라닌 함량(melanin content)

㉠ 멜라닌 정량

- B16F10 세포를  $5 \times 10^4$  cells/mL 농도로 24 well 배양판에 100  $\mu$ l씩 분주하여 배양기에서 24 시간 방치한 후, 음성대조구로서 PBS 용액 처리, 양성대조구로서  $\alpha$ -MSH(melanocyte stimulating hormone) 단독 처리(100 nM), 비교 처리구로서  $\alpha$ -MSH + kojic acid(30  $\mu$ g/mL) 병용 처리 및  $\alpha$ -MSH + 냉수추출물(50  $\mu$ g/mL) 병용 처리와  $\alpha$ -MSH + 열수추출물(50  $\mu$ g/mL) 병용 처리하였음
- 각 시료 처리하고 48 시간 배양한 후 1N NaOH 200  $\mu$ L를 처리하여 1 시간 동안 60°C 항온수조에서 반응시켰다. 멜라닌을 완전히 용해시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였고 모든 시료 처리는 3반복 수행하였음
- 실험결과, B16F10 세포에서 멜라닌 함량은 PBS 용액 처리구에서 89.7%로 나타났으며  $\alpha$ -MSH 단독 처리구에서 105.1%로 증가하였음 [그림 7]
- 그러나  $\alpha$ -MSH + 냉수추출물 병용 처리구 및  $\alpha$ -MSH + 열수추출물 병용 처리구에서 멜라닌 함량은 116.0% 및 108.3%로 감소 효과가 나타나지 않았음
- 갈근 냉수추출물 및 열수추출물의 항타이로시나제 활성에도 불구하고 멜라닌 함량 감소 효과를 보이지 않은 것은 각 추출물 처리농도(50  $\mu$ g/mL)가 미약하여 고농도의 추출물 처리 실험이 필요할 것으로 고려됨



[그림 7] 갈근 냉수추출물 및 열수추출물 각각을 50  $\mu$ g/mL 농도로 멜라노마 세포주 B16F10에 처리한 후 측정된 멜라닌 함량이다. 좌로부터 PBS 용액 처리 B16F19 세포(음성대조구),  $\alpha$ -MSH(melanocyte stimulating hormone) 처리 B16F19 세포(양성대조구),  $\alpha$ -MSH + kojic acid 처리 B16F19 세포,  $\alpha$ -MSH + 냉수추출물 처리 B16F19 세포 및  $\alpha$ -MSH + 열수추출물 처리 B16F19 세포이다. 기호 \*는 PBS 용액 처리구와의 유의성 있는 차이(\* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001)를 나타내며, #는  $\alpha$ -MSH 처리구와 유의성 있는 차이(### P < 0.001)를 나타냄

(4) 오미자 열매 냉수추출물 및 열수추출물의 항타이로시나제 활성 및 미백 기능

① 오미자 열매 추출물

㉠ 시료 : 오미자 열매를 증류수로 세척하고 건조시킨 후 분쇄기로 잘게 분쇄하였음

㉡ 추출

- 분쇄물을 10배 중량의 냉수 및 열수를 각각 가하고 24 시간 동안 추출한 후 와트만 종이 여과지(Whatman No. 2)로 여과한 후 그 여액을 65±2°C 감압 농축하여 초저온냉동고에서 동결한 후 냉동건조기(freeze dryer)로 동결건조하여 최종 추출물을 수득하였음

[표 1] 오미자 열매로부터 냉수 및 열수 추출을 통한 수확량

| 오미자 열매 건물중 | 냉수추출물(CWE)의 동결건조량 | 열수추출물(HWE)의 동결건조량 |
|------------|-------------------|-------------------|
| 50 g       | 4.69 g            | 5.72 g            |

② 오미자 열매 냉수추출물 및 열수추출물의 시험관 내 항타이로시나아제 활성 실험

㉠ 시약

- 본 실험에 사용된 효소는 mushroom tyrosinase(Sigma-Aldrich Co., USA)를 구입하여 사용하였음
- 타이로시나제 활성 측정 시 기질은 L-DOPA와 L-tyrosine을 사용하였음
- 멜라닌 생성을 더 자극하기 위해서 α-MSH(melanocyte stimulating hormone)를 구입하여 세포에 처리하였음

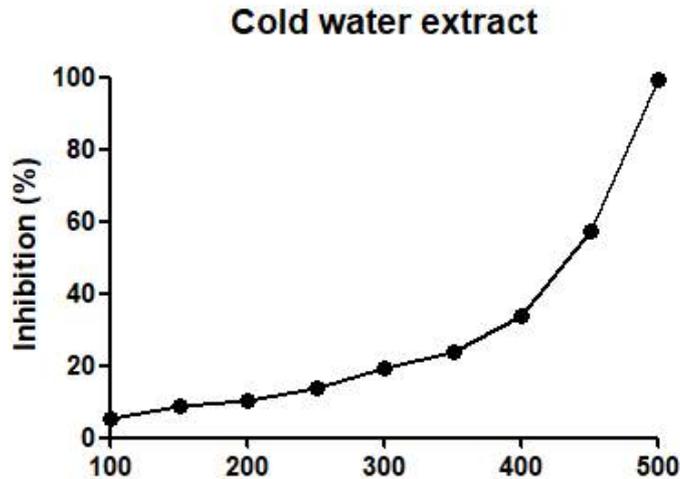
㉡ 기질에 따른 시험관 내 타이로시나제 저해 활성 측정

- L-DOPA와 L-tyrosine을 각각 100 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)로 녹이고 타이로시나제는 333 U/mL를 사용하였음
- 30 μL의 10 mM L-DOPA 혹은 L-tyrosine과 농도별로 희석된 각 추출물 시료는 최종 농도를 조절하여 70 μL를 첨가하였음
- 반응액은 37°C에서 30 분간 반응시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하고 저해 비율을 다음과 같이 계산하였음
- 타이로시나제 억제율(%) =  $[1 - \{(B-C)/(A-D)\}] \times 100$  ; A는 효소만 첨가된 반응용액, B는 효소와 시료가 모두 첨가된 반응용액, C는 시료만 첨가된 반응용액, D는 효소와 시료가 모두 첨가되지 않은 반응용액의 490 nm에서의 흡광도 값임

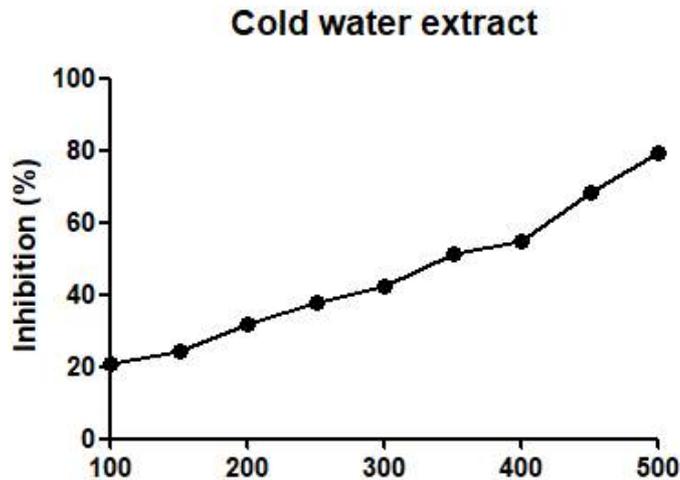
[표 2] 오미자 열매 냉수추출물 및 열수추출물의 버섯 타이로시나제 억제 농도: IC<sub>50</sub> (μg/mL)

| 기질         | IC <sub>50</sub> (μg/mL) |       |            |
|------------|--------------------------|-------|------------|
|            | 냉수추출물                    | 열수추출물 | Kojic acid |
| L-DOPA     | 475.4                    | 473.6 | 34.9       |
| L-tyrosine | 358.1                    | 371.4 | 46.1       |

- 실험결과, L-DOPA를 기질로 사용했을 때 냉수추출물은 500  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 99.4% 타이로시나제 억제 활성을 나타냈고,  $\text{IC}_{50}$ 은 475.4  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었음 [그림 1 및 표2]
- 또한, L-tyrosine을 기질로 사용했을 때 냉수추출물은 500  $\mu\text{g/mL}$ 에서 79.5% 타이로시나제 억제 활성을 나타냈고,  $\text{IC}_{50}$ 은 358.1  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었음 [그림 2 및 표2]
- 비교 대조구인 kojic acid는 L-DOPA를 기질로 사용했을 때  $\text{IC}_{50}$ 은 34.9  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었고, L-tyrosine을 기질로 사용했을 때  $\text{IC}_{50}$ 은 46.1  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었음



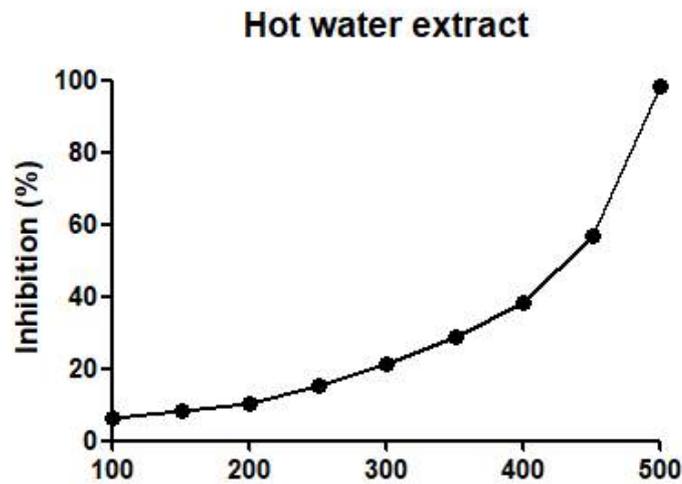
[그림 1] L-DOPA를 기질로 사용했을 때 오미자 열매 냉수추출물 농도별(100~500  $\mu\text{g/mL}$ )로 버섯타이로시나제 효소활성(%)을 억제하는 것을 나타내었다. 각 측정값은 3번 반복의 평균값



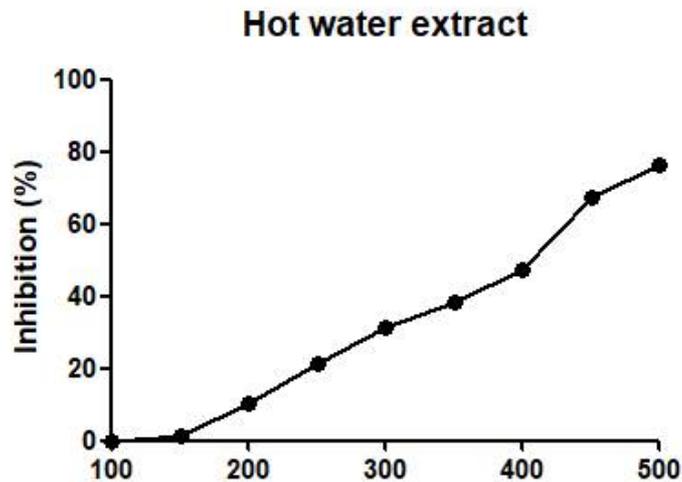
[그림 2] L-tyrosine을 기질로 사용했을 때 오미자 열매 냉수추출물 농도별(100~500  $\mu\text{g/mL}$ )로 버섯타이로시나제 효소활성(%)을 억제하는 것을 나타내었다. 각 측정값은 3번 반복의 평균값

- L-DOPA를 기질로 사용했을 때 열수추출물은 500  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 98.2% 타이로시나제 억제 활성을 나타냈고,  $\text{IC}_{50}$ 은 473.6  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었음 [그림 3 및 표2]

- 또한, L-tyrosine을 기질로 사용했을 때 열수추출물은 500  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 78.9% 타이로시나제 억제 활성을 나타냈고,  $\text{IC}_{50}$ 은 381.4  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었음 [그림 4 및 표2]



[그림 3] L-DOPA를 기질로 사용했을 때 오미자 열매 열수추출물 농도별(100~500  $\mu\text{g/mL}$ )로 버섯타이로시나제 효소활성(%)을 억제하는 것을 나타내었다. 각 측정값은 3번 반복의 평균값



[그림 4] L-tyrosine을 기질로 사용했을 때 오미자 열매 열수추출물 농도별(100~500  $\mu\text{g/mL}$ )로 버섯타이로시나제 효소활성(%)을 억제하는 것을 나타내었다. 각 측정값은 3번 반복의 평균값

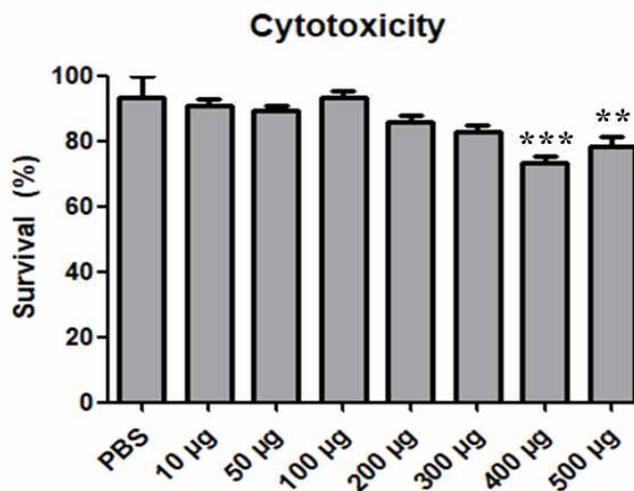
③ 오미자 열매 냉수추출물(CWE) 및 열수추출물(HWE)의 세포독성

㉠ 세포 배양

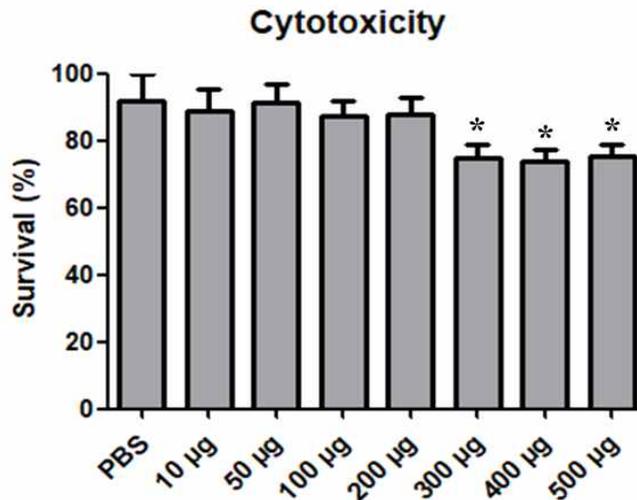
- B16F10 세포(ATCC, CRL-6475, mouse melanoma cell)의 생육 배지로는 RPMI 1640(Sigma, USA)을 이용하였음
- 배지에는 10% fetal bovine serum(Gibco, USA)와 penicillin-streptomycin(100 U/ml)을 첨가 하였으며, 실험기간 동안 세포주는 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였음

㉡ 세포 독성

- 배양된 BF16F10 멜라노마 세포를 96 well plate에 각각 5 x 10<sup>4</sup> cells/well로 분주하고 24 시간 배양한 후 각 추출물을 농도별로 희석하여 처리하고 24 시간 배양하였음
- PBS 용액을 처리한 멜라노마 세포는 음성대조구로 사용하였다. 세포밀도는 Cell Counting Kit-8(CCK-8, Sigma-Aldrich, USA)를 이용하여 흡광도 450 nm에서 측정하였음
- 모든 처리구는 3반복하였음
- 세포독성은 다음과 같은 공식을 이용하여 결정하였음 : 세포독성(%) = (1-처리구 A<sub>450 nm</sub> / 대조구 A<sub>450 nm</sub>) x 100
- BF16F10 멜라노마 세포에서 농도별 냉수추출물의 세포독성을 확인한 결과 냉수추출물은 300 μg /mL(82.7%) 농도까지 PBS 처리구와 유의성이 없었음 [그림 5]
- BF16F10 멜라노마 세포주에서 열수추출물의 농도별 세포독성을 확인한 결과, 200 μg/mL(87.9%) 농도까지 음성대조구인 PBS 처리구(93.3%)와 비교하여 생존율이 다소 감소했으나 유의성 있는 차이는 없었고, 300 μg/mL(74.8%) 농도부터 세포독성이 나타났음(\* P < 0.05) [그림 6]



[그림 5] 오미자 열매 냉수추출물을 농도별(10~500 μg/mL)로 멜라노마 세포주 B16F10에 처리한 후 측정된 세포독성이다. 기호 \*는 PBS 용액 처리구와의 유의성 있는 차이(\*\* P < 0.05, \*\*\* P < 0.001)를 나타냄

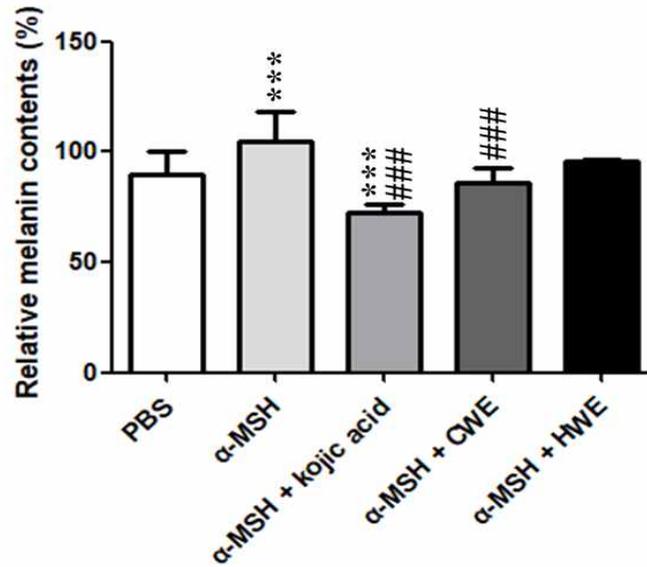


[그림 6] 오미자 열매열수추출물을 농도별(10~500  $\mu\text{g/mL}$ )로 멜라노마 세포주 B16F10에 처리한 후 측정된 세포독성이다. 기호 \*는 PBS 용액 처리구와의 유의성 있는 차이(\*  $P < 0.05$ )를 나타냄

④ 오미자 열매 냉수추출물(CWE) 및 열수추출물(HWE) 처리 세포 내 멜라닌 함량

㉠ 멜라닌 정량

- B16F10 세포를  $5 \times 10^4$  cells/mL 농도로 24 well 배양판에 100  $\mu\text{l}$ 씩 분주하여 배양기에서 24 시간 방치한 후, 음성대조구로서 PBS 용액 처리, 양성대조구로서  $\alpha$ -MSH(melanocyte stimulating hormone) 단독 처리(100 nM), 비교 처리구로서  $\alpha$ -MSH + kojic acid(30  $\mu\text{g/mL}$ ) 병용 처리 및  $\alpha$ -MSH + 냉수추출물(50  $\mu\text{g/mL}$ ) 병용 처리와  $\alpha$ -MSH + 열수추출물(50  $\mu\text{g/mL}$ ) 병용 처리하였음
- 각 시료 처리하고 48 시간 배양한 후 1N NaOH 200  $\mu\text{L}$ 를 처리하여 1 시간 동안 60°C 항온수조에서 반응시켰다. 멜라닌을 완전히 용해시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였고 모든 시료 처리는 3반복 수행하였음
- 실험결과, B16F10 세포에서 멜라닌 함량은 PBS 용액 처리구에서 89.7%로 나타났으며  $\alpha$ -MSH 단독 처리구에서 105.1%로 증가하였음 [그림 7]
- 그러나  $\alpha$ -MSH + 냉수추출물 병용 처리구 및  $\alpha$ -MSH + 열수추출물 병용 처리구에서 멜라닌 함량은 86.2% 및 95.4%로 감소 효과가 나타났음
- 오미자 열매의 냉수추출물이 열수추출물과 비교하여 멜라닌 함량 감소 효과가 더 탁월한 것으로 판단됨



[그림 7] 오미자 열매 냉수추출물 및 열수추출물 각각을 50  $\mu\text{g/mL}$  농도로 멜라노마 세포주 B16F10에 처리한 후 측정된 멜라닌 함량이다. 좌로부터 PBS 용액 처리 B16F19 세포(음성대조구),  $\alpha$ -MSH(melanocyte stimulating hormone) 처리 B16F19 세포(양성대조구),  $\alpha$ -MSH + kojic acid 처리 B16F19 세포,  $\alpha$ -MSH + 냉수추출물 처리 B16F19 세포 및  $\alpha$ -MSH + 열수추출물 처리 B16F19 세포이다. 기호 \*는 PBS 용액 처리구와의 유의성 있는 차이(\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ )를 나타내며, #는  $\alpha$ -MSH 처리구와 유의성 있는 차이(###  $P < 0.001$ )를 나타냄

(5) 구기자 열매 냉수추출물 및 열수추출물의 항타이로시나제 활성 및 미백 기능

① 구기자 열매 추출물

㉠ 시료 : 구기자 열매를 증류수로 세척하고 건조시킨 후 분쇄기로 잘게 분쇄하였음

㉡ 추출

- 분쇄물을 10배 중량의 냉수 및 열수를 각각 가하고 24 시간 동안 추출한 후 와트만 종이 여과지(Whatman No. 2)로 여과한 후 그 여액을 65±2°C 감압 농축하여 초저온냉동고에서 동결한 후 냉동건조기(freeze dryer)로 동결건조하여 최종 추출물을 수득하였음

[표 1] 구기자 열매로부터 냉수 및 열수 추출을 통한 수확량

| 구기자 열매 건물중 | 냉수추출물(CWE)의 동결건조량 | 열수추출물(HWE)의 동결건조량 |
|------------|-------------------|-------------------|
| 50 g       | 2.87 g            | 6.69 g            |

② 구기자 열매 냉수추출물 및 열수추출물의 시험관 내 항타이로시나아제 활성 실험

㉠ 시약

- 본 실험에 사용된 효소는 mushroom tyrosinase(Sigma-Aldrich Co., USA)를 구입하여 사용하였음
- 타이로시나제 활성 측정 시 기질은 L-DOPA와 L-tyrosine을 사용하였음
- 멜라닌 생성을 더 자극하기 위해서 α-MSH(melanocyte stimulating hormone)를 구입하여 세포에 처리하였음

㉡ 기질에 따른 시험관 내 타이로시나제 저해 활성 측정

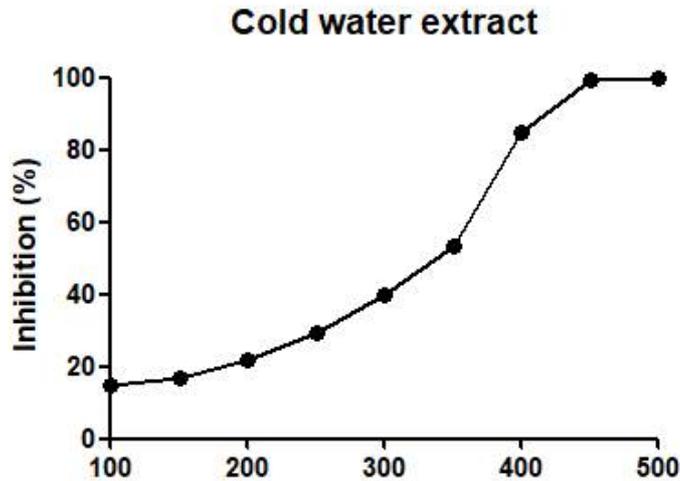
- L-DOPA와 L-tyrosine을 각각 100 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)로 녹이고 타이로시나제는 333 U/mL를 사용하였음
- 30 μL의 10 mM L-DOPA 혹은 L-tyrosine과 농도별로 희석된 각 추출물 시료는 최종 농도를 조절하여 70 μL를 첨가하였음
- 반응액은 37°C에서 30 분간 반응시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하고 저해 비율을 다음과 같이 계산하였음
- 타이로시나제 억제율(%) =  $[1 - \{(B-C)/(A-D)\}] \times 100$  ; A는 효소만 첨가된 반응용액, B는 효소와 시료가 모두 첨가된 반응용액, C는 시료만 첨가된 반응용액, D는 효소와 시료가 모두 첨가되지 않은 반응용액의 490 nm에서의 흡광도 값임

[표 2] 구기자 열매 냉수추출물 및 열수추출물의 버섯 타이로시나제 억제 농도: IC<sub>50</sub> (μg/mL)

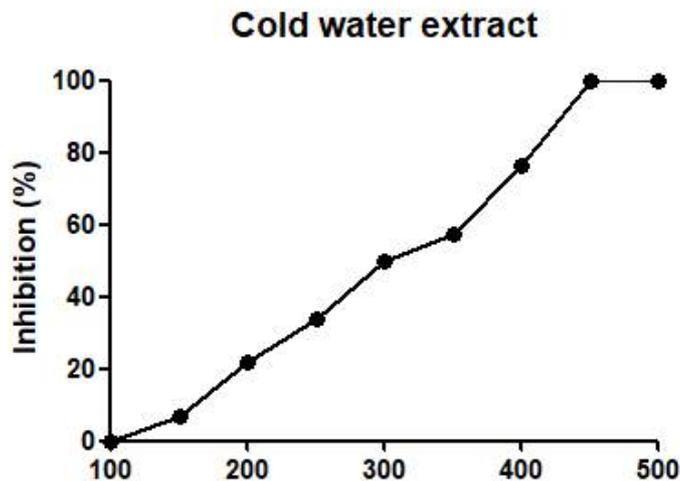
| 기질         | IC <sub>50</sub> (μg/mL) |       |            |
|------------|--------------------------|-------|------------|
|            | 냉수추출물                    | 열수추출물 | Kojic acid |
| L-DOPA     | 351.3                    | 345.3 | 34.9       |
| L-tyrosine | 295.5                    | 371.4 | 46.1       |

- 실험결과, L-DOPA를 기질로 사용했을 때 냉수추출물은 500 μg/mL 농도에서 100% 타이로시나제 억제 활성을 나타냈고, IC<sub>50</sub>은 475.4 μg/mL로 측정되었음 [그림 1 및 표2]

- 또한, L-tyrosine을 기질로 사용했을 때 냉수추출물은 450  $\mu\text{g/mL}$ 에서 100% 타이로시나제 억제 활성을 나타냈고,  $\text{IC}_{50}$ 은 295.5  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었음 [그림 2 및 표2]
- 비교 대조구인 kojic acid는 L-DOPA를 기질로 사용했을 때  $\text{IC}_{50}$ 은 34.9  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었고, L-tyrosine을 기질로 사용했을 때  $\text{IC}_{50}$ 은 46.1  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었음

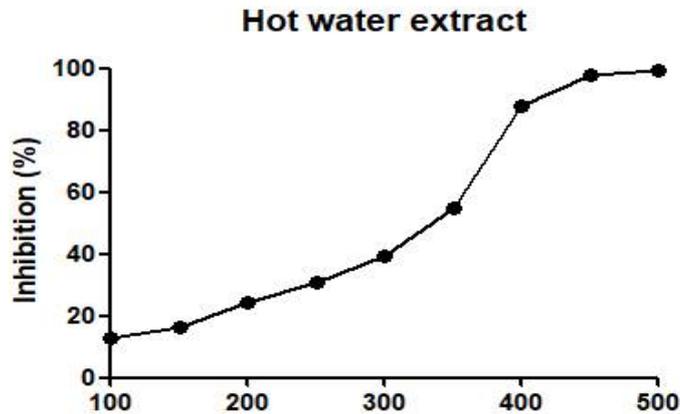


[그림 1] L-DOPA를 기질로 사용했을 때 구기자 열매 냉수추출물 농도별(100~500  $\mu\text{g/mL}$ )로 버섯타이로시나제 효소활성(%)을 억제하는 것을 나타내었다. 각 측정값은 3번 반복의 평균값

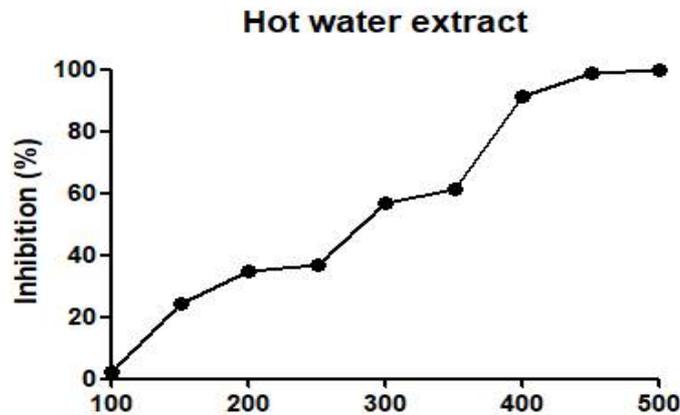


[그림 2] L-tyrosine을 기질로 사용했을 때 구기자 열매 냉수추출물 농도별(100~500  $\mu\text{g/mL}$ )로 버섯타이로시나제 효소활성(%)을 억제하는 것을 나타내었다. 각 측정값은 3번 반복의 평균값

- L-DOPA를 기질로 사용했을 때 열수추출물은 500  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 99.4% 타이로시나제 억제 활성을 나타냈고,  $\text{IC}_{50}$ 은 345.3  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었음 [그림 3 및 표2]
- 또한, L-tyrosine을 기질로 사용했을 때 열수추출물은 500  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 100% 타이로시나제 억제 활성을 나타냈고,  $\text{IC}_{50}$ 은 270.1  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었음 [그림 4 및 표2]



[그림 3] L-DOPA를 기질로 사용했을 때 구기자 열매 열수추출물 농도별(100~500  $\mu\text{g/mL}$ )로 버섯타이로시나제 효소활성(%)을 억제하는 것을 나타내었다. 각 측정값은 3번 반복의 평균값



[그림 4] L-tyrosine을 기질로 사용했을 때 구기자 열매 열수추출물 농도별(100~500  $\mu\text{g/mL}$ )로 버섯타이로시나제 효소활성(%)을 억제하는 것을 나타내었다. 각 측정값은 3번 반복의 평균값

③ 구기자 열매 냉수추출물(CWE) 및 열수추출물(HWE)의 세포독성(cytotoxicity)

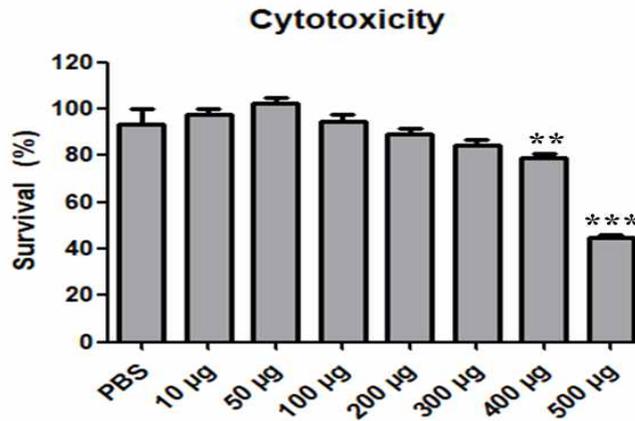
㉠ 세포 배양

- B16F10 세포(ATCC, CRL-6475, mouse melanoma cell)의 생육 배지로는 RPMI 1640(Sigma, USA)을 이용하였음
- 배지에는 10% fetal bovine serum(Gibco, USA)와 penicillin-streptomycin(100 U/ml)을 첨가하였으며, 실험기간 동안 세포주는 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였음

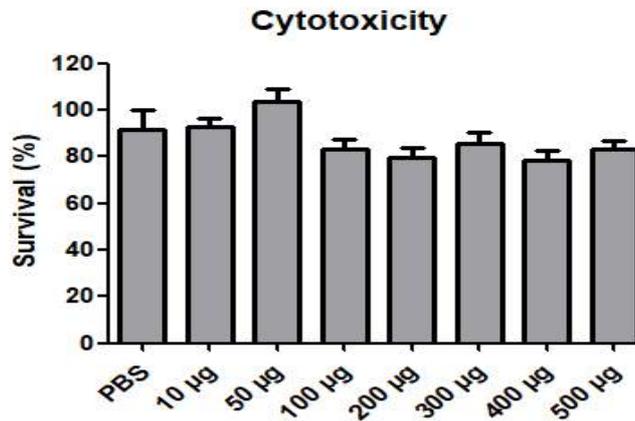
㉡ 세포 독성

- 배양된 BF16F10 멜라노마 세포를 96 well plate에 각각  $5 \times 10^4$  cells/well로 분주하고 24 시간 배양한 후 각 추출물을 농도별로 희석하여 처리하고 24 시간 배양하였음

- PBS 용액을 처리한 멜라노마 세포는 음성대조구로 사용하였다. 세포밀도는 Cell Counting Kit-8(CCK-8, Sigma-Aldrich, USA)를 이용하여 흡광도 450 nm에서 측정하였음
- 모든 처리구는 3반복하였음
- 세포독성은 다음과 같은 공식을 이용하여 결정하였음 : 세포독성(%) = (1-처리구  $A_{450\text{ nm}}$  / 대조구  $A_{450\text{ nm}}$ ) x 100
- BF16F10 멜라노마 세포에서 농도별 냉수추출물의 세포독성을 확인한 결과, 음성대조구인 PBS 처리구(93.3%)와 비교하여 생존율이 다소 감소했으나 냉수추출물은 300  $\mu\text{g/mL}$ (84.5%) 농도까지 유의성이 없었음 [그림 5]
- BF16F10 멜라노마 세포주에서 열수추출물의 농도별 세포독성을 확인한 결과, 음성대조구인 PBS 처리구(93.3%)와 비교하여 생존율이 다소 감소했으나 500  $\mu\text{g/mL}$ (83.1%) 농도까지 유의성 있는 차이는 없었음 [그림 6]



[그림 5] 구기자 열매 냉수추출물을 농도별(10~500  $\mu\text{g/mL}$ )로 멜라노마 세포주 B16F10에 처리한 후 측정된 세포독성이다. 각 측정값은 3번 반복의 평균값을 나타내고 기호 \*는 PBS 용액 처리구와의 유의성 있는 차이(\*\*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ )를 나타냄

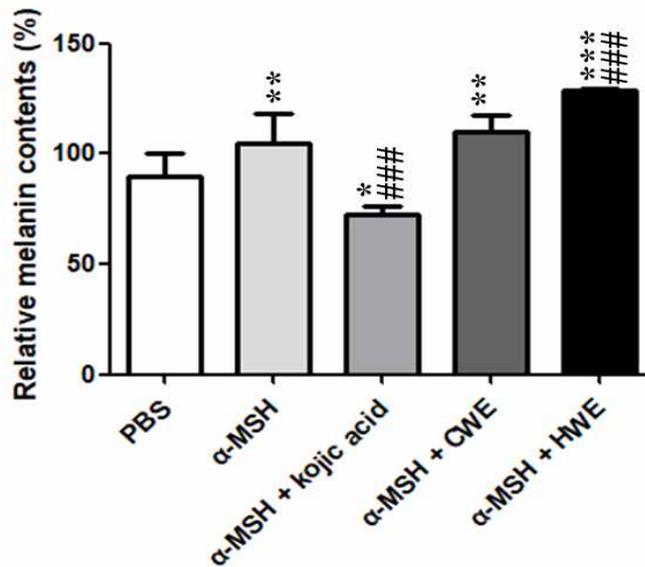


[그림 6] 구기자 열매 열수추출물을 농도별(10~500  $\mu\text{g/mL}$ )로 멜라노마 세포주 B16F10에 처리한 후 측정된 세포독성을 나타내고 각 측정값은 3번 반복의 평균값임

④ 구기자 열매 냉수추출물(CWE) 및 열수추출물(HWE) 처리 세포 내 멜라닌

㉠ 멜라닌 정량

- B16F10 세포를  $5 \times 10^4$  cells/mL 농도로 24 well 배양판에  $100 \mu\text{l}$ 씩 분주하여 배양기에서 24 시간 방치한 후, 음성대조구로서 PBS 용액 처리, 양성대조구로서  $\alpha$ -MSH(melanocyte stimulating hormone) 단독 처리(100 nM), 비교 처리구로서  $\alpha$ -MSH + kojic acid( $30 \mu\text{g/mL}$ ) 병용 처리 및  $\alpha$ -MSH + 냉수추출물( $50 \mu\text{g/mL}$ ) 병용 처리와  $\alpha$ -MSH + 열수추출물( $50 \mu\text{g/mL}$ ) 병용 처리하였음
- 각 시료 처리하고 48 시간 배양한 후 1N NaOH  $200 \mu\text{L}$ 를 처리하여 1 시간 동안  $60^\circ\text{C}$  항온수조에서 반응시켰다. 멜라닌을 완전히 용해시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였고 모든 시료 처리는 3반복 수행하였음
- 실험결과, B16F10 세포에서 멜라닌 함량은 PBS 용액 처리구에서 89.7%로 나타났으며  $\alpha$ -MSH 단독 처리구에서 105.1%로 증가하였음 [그림 7]
- 그러나  $\alpha$ -MSH + 냉수추출물 병용 처리구 및  $\alpha$ -MSH + 열수추출물 병용 처리구에서 멜라닌 함량은 110.1% 및 123.6%로 멜라닌 함량 감소 효과를 나타내지 않았음
- 오미자 열매의 냉수추출물 및 열수추출물은 탁월한 항타이로시나제 활성에도 불구하고 처리농도( $50 \mu\text{g/mL}$ )보다 고농도의 처리가 필요할 것으로 판단됨



[그림 7] 구기자 열매 냉수추출물 및 열수추출물 각각을  $50 \mu\text{g/mL}$  농도로 멜라노마 세포 B16F10에 처리 후 측정된 멜라닌 함량. PBS 용액 처리 대조구,  $\alpha$ -MSH(melanocyte stimulating hormone) 처리 대조구,  $\alpha$ -MSH + kojic acid 처리 비교구,  $\alpha$ -MSH + 냉수추출물 처리구 및  $\alpha$ -MSH + 열수추출물 처리구이다. 기호 \*는 PBS 용액 처리구와의 유의성 있는 차이(\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ )를 나타내며, #는  $\alpha$ -MSH 처리구와 유의성 있는 차이(###  $P < 0.001$ )를 나타냄

(6) 천마 덩이줄기 냉수추출물 및 열수추출물의 항타이로시나제 활성 및 미백 기능

① 천마 덩이줄기 추출물

- 시료 : 천마의 덩이줄기를 증류수로 세척하고 건조시킨 후 분쇄기로 잘게 분쇄하였음
- 추출

- 분쇄물을 10배 중량의 냉수 및 열수를 각각 가하고 24 시간 동안 추출한 후 와트만 종이 여과지(Whatman No. 2)로 여과한 후 그 여액을 65±2°C 감압 농축하여 초저온냉동고에서 동결한 후 냉동건조기(freeze dryer)로 동결건조하여 최종 추출물을 수득하였음

[표 1] 천마 덩이줄기로부터 냉수 및 열수 추출을 통한 수확량

| 천마 덩이줄기 건물중 | 냉수추출물(CWE)의 동결건조량 | 열수추출물(HWE)의 동결건조량 |
|-------------|-------------------|-------------------|
| 50 g        | 3.36 g            | 4.89 g            |

② 천마 덩이줄기 냉수추출물 및 열수추출물의 시험관 내 항타이로시나아제 활성 실험

㉠ 시약

- 본 실험에 사용된 효소는 mushroom tyrosinase(Sigma-Aldrich Co., USA)를 구입하여 사용하였음
- 타이로시나제 활성 측정 시 기질은 L-DOPA와 L-tyrosine을 사용하였음
- 멜라닌 생성을 더 자극하기 위해서 α-MSH(melanocyte stimulating hormone)를 구입하여 세포에 처리하였음

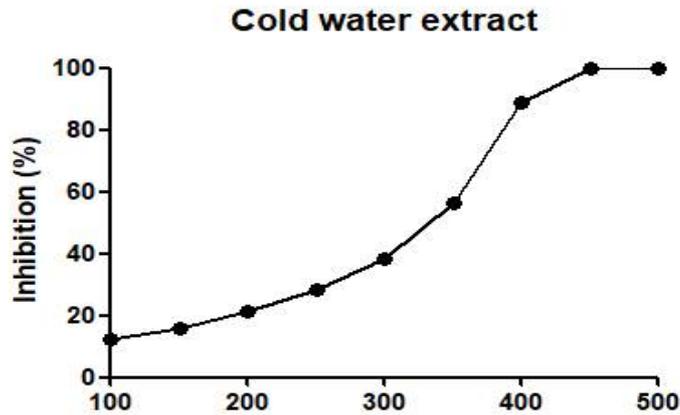
㉡ 기질에 따른 시험관 내 타이로시나제 저해 활성 측정

- L-DOPA와 L-tyrosine을 각각 100 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)로 녹이고 타이로시나제는 333 U/mL를 사용하였음
- 30 μL의 10 mM L-DOPA 혹은 L-tyrosine과 농도별로 희석된 각 추출물 시료는 최종 농도를 조절하여 70 μL를 첨가하였음
- 반응액은 37°C에서 30 분간 반응시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하고 저해 비율을 다음과 같이 계산하였음
- 타이로시나제 억제율(%) =  $[1 - \{(B-C)/(A-D)\}] \times 100$  ; A는 효소만 첨가된 반응용액, B는 효소와 시료가 모두 첨가된 반응용액, C는 시료만 첨가된 반응용액, D는 효소와 시료가 모두 첨가되지 않은 반응용액의 490 nm에서의 흡광도 값임

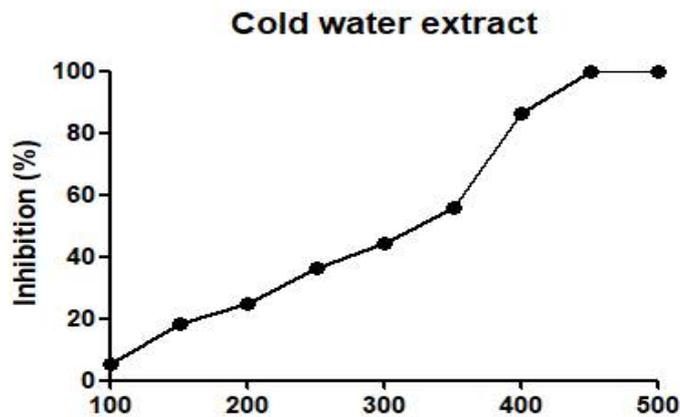
[표 2] 천마 덩이줄기 냉수추출물 및 열수추출물의 버섯 타이로시나제 억제 농도: IC<sub>50</sub> (μg/mL)

| 기질         | IC <sub>50</sub> (μg/mL) |       |            |
|------------|--------------------------|-------|------------|
|            | 냉수추출물                    | 열수추출물 | Kojic acid |
| L-DOPA     | 346.7                    | 351.5 | 34.9       |
| L-tyrosine | 322.2                    | 299.5 | 46.1       |

- 실험결과, L-DOPA를 기질로 사용했을 때 냉수추출물은 450  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 100% 타이로시나제 억제 활성을 나타냈고,  $\text{IC}_{50}$ 은 346.7  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었음 [그림 1 및 표2]
- 또한, L-tyrosine을 기질로 사용했을 때 냉수추출물은 450  $\mu\text{g/mL}$ 에서 100% 타이로시나제 억제 활성을 나타냈고,  $\text{IC}_{50}$ 은 322.2  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었음 [그림 2 및 표2]
- 비교 대조구인 kojic acid는 L-DOPA를 기질로 사용했을 때  $\text{IC}_{50}$ 은 34.9  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었고, L-tyrosine을 기질로 사용했을 때  $\text{IC}_{50}$ 은 46.1  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었음

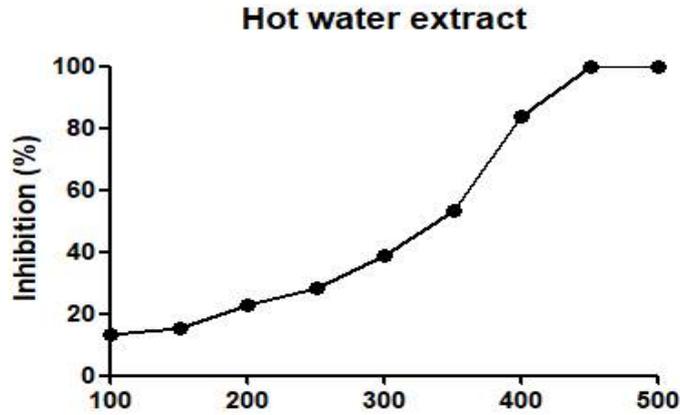


[그림 1] L-DOPA를 기질로 사용했을 때 천마 덩이줄기 냉수추출물 농도별(100~500  $\mu\text{g/mL}$ )로 버섯타이로시나제 효소활성(%)을 억제하는 것을 나타내었다. 각 측정값은 3번 반복의 평균값

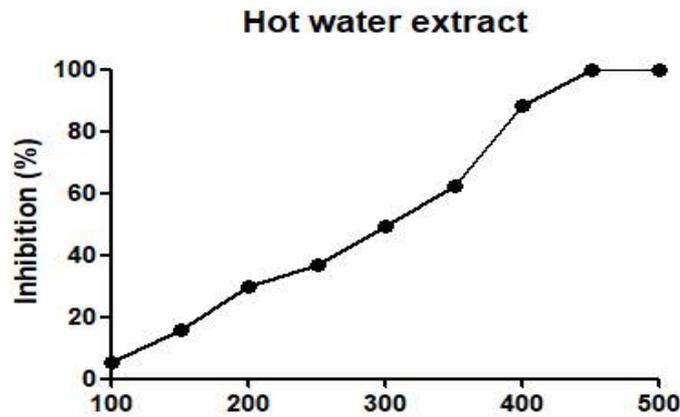


[그림 2] L-tyrosine을 기질로 사용했을 때 천마 덩이줄기 냉수추출물 농도별(100~500  $\mu\text{g/mL}$ )로 버섯타이로시나제 효소활성(%)을 억제하는 것을 나타내었다. 각 측정값은 3번 반복의 평균값

- L-DOPA를 기질로 사용했을 때 열수추출물은 450  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 100% 타이로시나제 억제 활성을 나타냈고,  $\text{IC}_{50}$ 은 351.5  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었음 [그림 3 및 표2]
- 또한, L-tyrosine을 기질로 사용했을 때 열수추출물은 450  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 100% 타이로시나제 억제 활성을 나타냈고,  $\text{IC}_{50}$ 은 299.5  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었음 [그림 4 및 표2]



[그림 3] L-DOPA를 기질로 사용했을 때 천마 덩이줄기 열수추출물 농도별(100~500  $\mu$ g/mL)로 버섯타이로시나제 효소활성(%)을 억제하는 것을 나타내었다. 각 측정값은 3번 반복의 평균값



[그림 4] L-tyrosine을 기질로 사용했을 때 천마 덩이줄기 열수추출물 농도별(100~500  $\mu$ g/mL)로 버섯타이로시나제 효소활성(%)을 억제하는 것을 나타내었다. 각 측정값은 3번 반복의 평균값

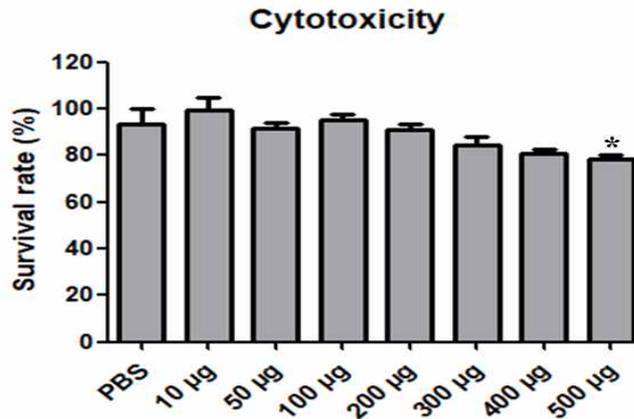
③ 천마 덩이줄기 냉수추출물(CWE) 및 열수추출물(HWE)의 세포독성(cytotoxicity)

㉠ 세포 배양

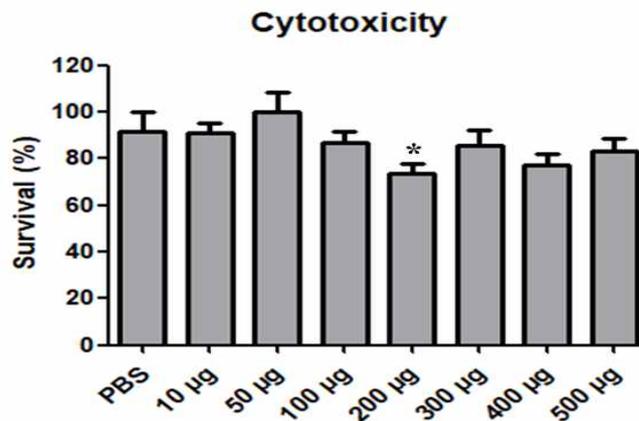
- B16F10 세포(ATCC, CRL-6475, mouse melanoma cell)의 생육 배지로는 RPMI 1640(Sigma, USA)을 이용하였음
- 배지에는 10% fetal bovine serum(Gibco, USA)와 penicillin-streptomycin(100 U/ml)을 첨가하였으며, 실험기간 동안 세포주는 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였음

㉠ 세포 독성

- 배양된 BF16F10 멜라노마 세포를 96 well plate에 각각  $5 \times 10^4$  cells/well로 분주하고 24 시간 배양한 후 각 추출물을 농도별로 희석하여 처리하고 24 시간 배양하였음
- PBS 용액을 처리한 멜라노마 세포는 음성대조구로 사용하였다. 세포밀도는 Cell Counting Kit-8(CCK-8, Sigma-Aldrich, USA)를 이용하여 흡광도 450 nm에서 측정하였음
- 모든 처리구는 3반복하였음
- 세포독성은 다음과 같은 공식을 이용하여 결정하였음 : 세포독성(%) =  $(1 - \text{처리구 } A_{450 \text{ nm}} / \text{대조구 } A_{450 \text{ nm}}) \times 100$
- BF16F10 멜라노마 세포에서 농도별 냉수추출물의 세포독성을 확인한 결과, 음성대조구인 PBS 처리구(93.3%)와 비교하여 생존율이 다소 감소했으나 냉수추출물은 400  $\mu$ g/mL(88.0%) 농도까지 유의성이 없었음 [그림 5]
- BF16F10 멜라노마 세포주에서 열수추출물의 농도별 세포독성을 확인한 결과, 음성대조구인 PBS 처리구(93.3%)와 비교하여 생존율이 다소 감소했으나 500  $\mu$ g/mL(83.3%) 농도까지 유의성 있는 차이는 없었음 [그림 6]



[그림 5] 천마 덩이줄기 냉수추출물을 농도별(10~500  $\mu$ g/mL)로 멜라노마 세포주 B16F10에 처리한 후 측정한 세포독성이다. 각 측정값은 3번 반복의 평균값을 나타내고 기호 \*는 PBS 용액 처리구와의 유의성 있는 차이(\*\* P < 0.05, \*\*\* P < 0.001)를 나타냄

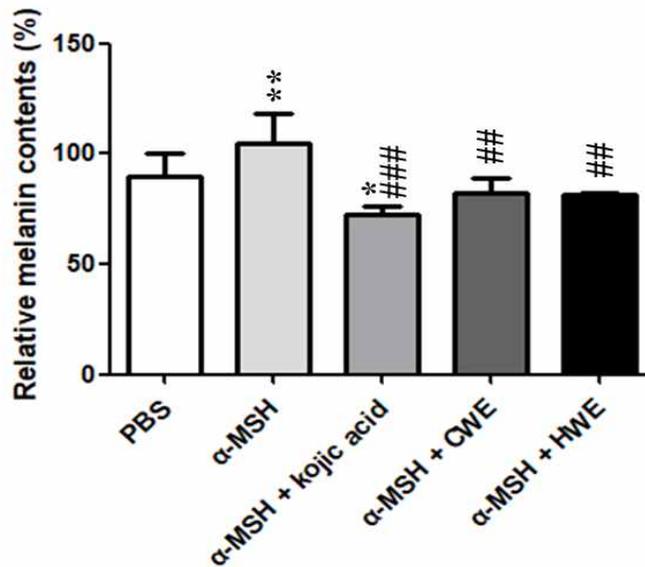


[그림 6] 천마 덩이줄기 열수추출물을 농도별(10~500  $\mu$ g/mL)로 멜라노마 세포주 B16F10에 처리한 후 측정한 세포독성을 나타내고 각 측정값은 3번 반복의 평균값임

④ 천마 덩이줄기 냉수추출물(CWE) 및 열수추출물(HWE) 처리 세포 내 멜라닌 함량

㉠ 멜라닌 정량

- B16F10 세포를  $5 \times 10^4$  cells/mL 농도로 24 well 배양판에  $100 \mu\text{l}$ 씩 분주하여 배양기에서 24 시간 방치한 후, 음성대조구로서 PBS 용액 처리, 양성대조구로서  $\alpha$ -MSH(melanocyte stimulating hormone) 단독 처리(100 nM), 비교 처리구로서  $\alpha$ -MSH + kojic acid( $30 \mu\text{g/mL}$ ) 병용 처리 및  $\alpha$ -MSH + 냉수추출물( $50 \mu\text{g/mL}$ ) 병용 처리와  $\alpha$ -MSH + 열수추출물( $50 \mu\text{g/mL}$ ) 병용 처리하였음
- 각 시료 처리하고 48 시간 배양한 후 1N NaOH  $200 \mu\text{L}$ 를 처리하여 1 시간 동안  $60^\circ\text{C}$  항온수조에서 반응시켰다. 멜라닌을 완전히 용해시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였고 모든 시료 처리는 3반복 수행하였음
- 실험결과, B16F10 세포에서 멜라닌 함량은 PBS 용액 처리구에서 89.7%로 나타났으며  $\alpha$ -MSH 단독 처리구에서 105.1%로 증가하였음 [그림 7]
- 그러나  $\alpha$ -MSH + 냉수추출물 병용 처리구 및  $\alpha$ -MSH + 열수추출물 병용 처리구에서 멜라닌 함량은 82.52% 및 81.70%로 멜라닌 함량 감소 효과를 나타내지 않았음
- 천마 덩이줄기의 열수추출물이 냉수추출물 보다 더 효과적인 멜라닌 함량 감소 효과를 나타내었으나 두 처리구간 유의성은 없었음



[그림 7] 천마 덩이줄기 냉수추출물 및 열수추출물 각각을  $50 \mu\text{g/mL}$  농도로 멜라노마 세포 B16F10에 처리 후 측정된 멜라닌 함량. PBS 용액 처리 대조구,  $\alpha$ -MSH(melanocyte stimulating hormone) 처리 대조구,  $\alpha$ -MSH + kojic acid 처리 비교구,  $\alpha$ -MSH + 냉수추출물 처리구 및  $\alpha$ -MSH + 열수추출물 처리구이다. 기호 \*는 PBS 용액 처리구와의 유의성 있는 차이(\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ )를 나타내며, #는  $\alpha$ -MSH 처리구와 유의성 있는 차이(##  $P < 0.01$  및 ###  $P < 0.001$ )를 나타냄

#### 4. 항산화 및 항염증 소재 개발 [연구내용 요약]

- (1) 오이풀 뿌리(지유) 냉수추출물, 열수추출물 및 각 분획물의 항산화 및 항염증 기능을 이용한 아토피 개선용 화장품
- ① 오이풀 뿌리(지유) 냉수추출물(CWE), 열수추출물(HWE), 메탄올추출물(ME) 및 각 추출물의 분획물
  - ② 냉수추출물, 열수추출물, 메탄올추출물 및 각 추출물의 분획물 성분 분석
  - ③ 냉수추출물, 열수추출물, 메탄올추출물 및 각 추출물의 *in vitro* 항산화능
  - ④ 각 추출물의 에틸아세테이트 분획물의 세포 내 항산화 활성 실험
  - ⑤ 각 추출물의 에틸아세테이트 분획물의 세포 내 항염증 활성 실험
  - ⑥ 대상식물 추출물, 발효산물 및 분획물을 처리한 동물에서의 항염증 효능 평가
  - ⑦ 대상식물 추출물, 발효산물 및 분획물을 처리한 동물에서의 항염증 사이토카인 분석
  - ⑧ 지유의 열수추출물, 냉수추출물 혹은 각추출물의 에틸아세테이드 분획물 시료의 *in vivo* 항염증 효능평가 와 각 시료 함유 도포액의 효능 및 안전성 시험

(1) 오이풀 뿌리(지유) 냉수추출물, 열수추출물 및 각 분획물의 항산화 및 항염증 기능을 이용한 아토피 개선용 화장품

① 오이풀 뿌리(지유) 냉수추출물(CWE), 열수추출물(HWE), 메탄올추출물(ME) 및 각 추출물의 분획물

㉠ 냉수추출물, 열수추출물 및 메탄올추출물의 분획물(fraction) 제조

- 냉수추출물, 열수추출물 및 메탄올추출물 각각에 일정량의 물을 첨가한 후, 분액여두를 이용하여 극성이 다른 추출용매인 n-헥산, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물을 차례대로 혼합하여 각 분획을 추출하였음
- 먼저 분액여두에 n-헥산을 증류수와 동량으로 넣고, 잘 혼합한 후 수층과 추출용매의 두 층으로 나뉘도록 방치하였다. 추출용매를 분리하고 남은 여액을 다시 같은 방법으로 에틸아세테이트와 부탄올을 차례대로 넣어 각각 추출하였음
- 이때 추출용매는 남은 여액과 같은 양으로 첨가하였음

② 냉수추출물, 열수추출물, 메탄올추출물 및 각 추출물의 분획물 성분 분석

㉠ 총 폴리페놀(total polyphenols) 함량 측정

- 총 페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 시약이 시료의 페놀성 화합물에 의해 환원되어 불리브덴 청색으로 발색되는 원리를 이용하여 정량분석하였음
- 각 추출물 및 각 분획물 50  $\mu$ L에 10% Folin-Ciocalteu 시약 500  $\mu$ L를 혼합하여 실온에 5분간 방치하였다. 반응액에 1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  용액 400  $\mu$ L를 혼합하고 실온에 1 시간 방치한 후 UV/Visible Spectrophotometer(Libra S22, biochrom, UK)를 이용하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였음
- 표준물질로 gallic acid를 사용하였으며, gallic acid 표준곡선(standard curve)의 회귀식과 비교하여 총 페놀의 함량(mg GAE/g powder)을 측정하였음
- 공시험은 반응 혼합물에 Folin-Ciocalteu 시약 대신에 각 시료를 녹인 용매를 사용하였도, 실험은 3회 반복 측정하고 평균값을 결정하였음.
- 측정 결과, 열수추출물이 가장 많은 폴리페놀을 함유함을 알 수 있었고, 냉수추출물 > 냉수추출물-에틸아세테이트 분획물 > 메탄올추출물 > 열수추출물-에틸아세테이트 분획물 > 메탄올추출물-에틸아세테이트 분획물 순으로 나타났음 [표 1]

㉡ 추출물 및 분획물의 총 플라보노이드(total flavonoids) 함량

- 총 플라보노이드 화합물 함량은 각 추출물 및 각 분획물 시료 용액(10 mg/mL) 20  $\mu$ L에 메탄올 60  $\mu$ L를 혼합한 반응액에 혼합액 10%  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  20  $\mu$ L를 더 첨가하고 5 분간 방치한 후 1 M  $\text{CH}_3\text{COOK}$ 를 4  $\mu$ L 추가하고 DW 112  $\mu$ L 넣은 후 30 분간 방치함
- 415 nm에서 흡광도를 측정하였으며 총 플라보노이드 함량은 mg catechin equivalents(CE)/g powder로 나타내었음
- 측정 결과, 열수추출물이 가장 많은 플라보노이드를 함유함을 알 수 있었고 냉수추출물-에틸아세테이트 분획물 > 냉수추출물 > 열수추출물-에틸아세테이트 분획물 > 메탄올추출물-에틸아세테이트 분획물 > 메탄올추출물 순으로 나타났음 [표 1]

㉔ 총 탄닌(total tannin) 함량 측정

- Tannic acid를 표준물질로 표준곡선을 작성한 후 회귀식에 따라서 탄닌 함량을 정량하였다.
- 탄닌 함량은 Folin-Denis법 응용하여 시료 1 mL에 95% Methanol 9 mL을 혼합 한 후, sodium carbonate 무수 포화용액 1 mL와 10% Folin-denis reagent 0.5 mL를 첨가하여 30분 실온에서 반응시킨 다음 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- 탄닌 함량은 gallic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 산출하였다.
- 측정 결과, 냉수추출물-에틸아세테이트 분획물이 가장 많은 탄닌을 함유함을 알 수 있었고 열수추출물-에틸아세테이트 분획물 > 열수추출물 > 메탄올추출물-에틸아세테이트 분획물 > 냉수추출물 > 메탄올추출물 순으로 나타났음 [표 1]

[표 1] 지유 추출물 및 분획물의 총 페놀, 총 플라보노이드 및 총 탄닌 함량

| 시료                         | Total phenol<br>(mg GAE/g dry powder±RSD) | Total flavonoid<br>(mg CE/g dry powder±RSD) | Total tannin<br>(%±RSD) |
|----------------------------|---|---|-------------------------|
| 냉수추출물(CWE)                 | 59.0±0.57                                 | 2.7±0.16                                    | 1.69±0.058              |
| 열수추출물(HWE)                 | 60.0±1.15                                 | 6.6±0.99                                    | 1.80±0.004              |
| 메탄올추출물(ME)                 | 46.1±3.23                                 | 1.7±0.33                                    | 1.14±0.001              |
| CWE-ethyl acetate fraction | 58.1±1.89                                 | 2.9±0.14                                    | 2.15±0.002              |
| HWE-ethyl acetate fraction | 38.3±2.41                                 | 2.6±0.37                                    | 2.06±0.001              |
| ME-ethyl acetate fraction  | 25.6±1.99                                 | 1.8±0.93                                    | 1.73±0.007              |

③ 냉수추출물, 열수추출물, 메탄올추출물 및 각 추출물의 in vitro 항산화능

㉕ DPPH 라디칼(radical) 소거능(scavenging capacity; SC) 측정

- DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거능은 DPPH에 대한 수소공여 효과로 측정하였음
- DPPH 용액은 100 mL 에탄올에 DPPH  $1.5 \times 10^{-4}$  M을 녹인 후 증류수와 혼합하여 Whatman filter paper No.2로 여과하여 제조하였음
- 96 well plate에 냉수추출물, 열수추출물, 메탄올추출물 및 각 추출물의 에틸아세테이트 분획물을 각각 농도별로 희석하여 DPPH 용액과 혼합하고 37°C에서 30 분간 반응시킨 후 Microplate Reader를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였음

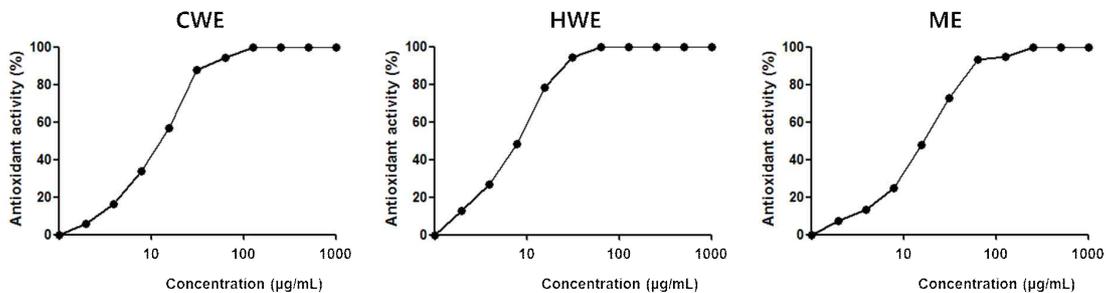
[표 2] 지유 추출물 및 분획물의 DPPH 라디칼 소거능

| 시료                         | SC <sub>50</sub> (µg/mL) |
|----------------------------|--------------------------|
| 냉수추출물(CWE)                 | 12.14                    |
| 열수추출물(HWE)                 | 7.58                     |
| 메탄올추출물(ME)                 | 16.74                    |
| CWE-ethyl acetate fraction | 19.14                    |
| HWE-ethyl acetate fraction | 35.81                    |
| ME-ethyl acetate fraction  | 52.46                    |

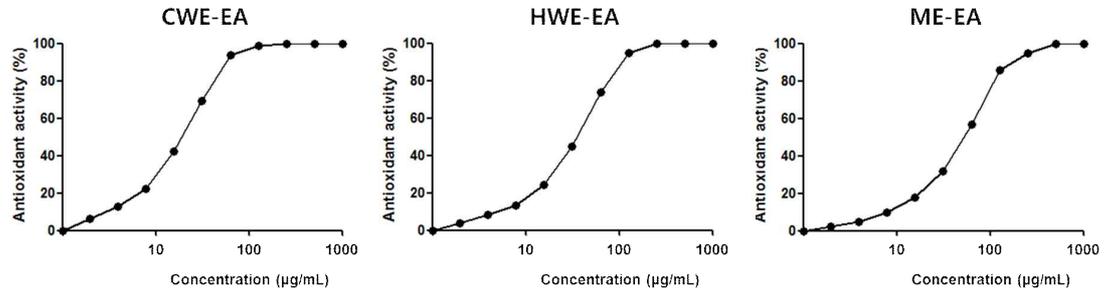
- 냉수, 열수 및 메탄올 추출물과 각 추출물의 에틸아세테이트 분획물을 비교한 결과, [표 2], [그림 1] 및 [그림 2]에 나타난 바와 같이 모든 시료에서 처리 농도가 증가함에 따라 DPPH 라디칼 소거능이 증가하였음
- 각 시료의 SC<sub>50</sub> 값은 12.14 µg/mL(냉수추출물), 7.58 µg/mL(열수추출물), 16.74 µg/mL(메탄올추출물), 19.14 µg/mL(냉수추출물-에틸아세테이트 분획물), 35.81 µg/mL(열수추출물-에틸아세테이트 분획물) 그리고 52.46 µg/mL(메탄올추출물-에틸아세테이트 분획물)로 나타났음
- 따라서 열수추출물이 가장 강력한 라디칼 소거능을 보였음

㉔ DPPH 라디칼(radical) 소거능(scavenging capacity; SC) 측정

- DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거능은 DPPH에 대한 수소공여 효과로 측정하였음
- DPPH 용액은 100 mL 에탄올에 DPPH 1.5 x 10<sup>-4</sup> M을 녹인 후 증류수와 혼합하여 Whatman filter paper No.2로 여과하여 제조하였음
- 96 well plate에 냉수추출물, 열수추출물, 메탄올추출물 및 각 추출물의 에틸아세테이트 분획물을 각각 농도별로 희석하여 DPPH 용액과 혼합하고 37°C에서 30 분간 반응시킨 후 Microplate Reader를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였음



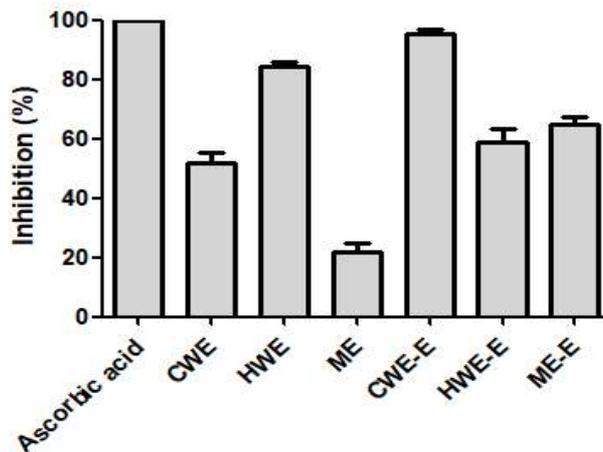
[그림 1] 지유 냉수추출물(CWE), 열수추출물(HWE) 및 메탄올추출물(ME)의 농도별 DPPH 라디칼 제거능



[그림 2] 지유 냉수추출물(CWE), 열수추출물(HWE) 및 메탄올추출물(ME) 각각의 에틸아세테이트 분획물 농도별 DPPH 라디칼 제거능

㉔ 과산화수소(Hydrogen peroxide) 제거능

- 1mg/ml 희석한 추출물 및 분획물을 50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 1:1로 혼합한 후에 실온에서 30분 처리함
- 90 µL 반응시료액과 10 µL HPLC grade 메탄올을 혼합하고 0.9 mL FOX 시약을 추가함: FOX 시약 [HPLC grade 메탄올에 녹인 4.4 mM BHT : 1 mM xylenol orange + 2.56 mM 황산제일철암모늄(ammonium ferrous sulfate)을 함유한 250 mM 황산, (9:1, v/v)]
- 진탕혼합 후 실온에서 30분 처리함
- 흡광도 580 nm에서 측정

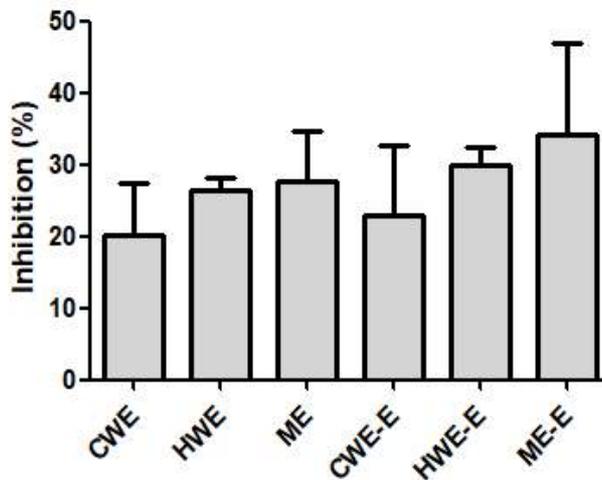


[그림 3] 지유 냉수추출물(CWE), 열수추출물(HWE) 및 메탄올추출물(ME) 각각의 에틸아세테이트 분획물 농도별 과산화수소(Hydrogen peroxide) 제거능

- 지유의 각 추출물과 분획물의 과산화수소 제거 활성을 확인한 결과, ascorbic acid (2 mM)의 활성을 100% 기준으로 CWE 51.92%, HWE 84.37%, ME 21.87%, CWE-E 95.19%, HWE-E 59.04%, ME-E 64.69%의 활성을 나타냄
- 측정 결과, 냉수추출물-에틸아세테이트 분획물이 가장 높은 과산화수소 제거 활성을 갖고 있었고 열수추출물 > 메탄올추출물-에틸아세테이트 분획물 > 열수추출물-에틸아세테이트 분획물 > 냉수추출물 > 메탄올추출물 순으로 나타났음 [표 그림3]

㉞ 지질과산화(lipid peroxidation) 억제 활성

- 추출물 및 분획물 200  $\mu$ L를 70 mM FeSO<sub>4</sub> 100  $\mu$ L 와 혼합함
- 2 mM ascorbic acid를 첨가하여 반응을 개시하고 37°C에서 30분 1시간 처리함
- TCA를 100  $\mu$ L 첨가하여 반응을 종료시킴
- 반응 혼합액에 300  $\mu$ L TBA(50 mM NaOH로 녹임)를 첨가하고 80 °C 30분간 가열함
- 원심분리 후 상등액에서 TBARS 의 흡광도 532 nm를 측정 한 후 % 억제활성으로 표현함
- 지유의 각 추출물과 분획물의 과산화수소 제거 활성을 확인한 결과, ascorbic acid (2mM)의 활성을 100% 기준으로 CWE 20.22%, HWE 26.52%, ME 27.60%, CWE-E 22.79%, HWE-E 29.88%, ME-E 34.11%의 활성을 나타냄
- 측정 결과, 메탄올-에틸아세테이트 분획물이 가장 높은 지질과산화 제거 활성을 갖고 있었고 열수추출물-에틸아세테이트 분획물> 메탄올추출물> 열수추출물> 냉수추출물-에틸아세테이트 분획물> 냉수추출물 순으로 나타났음 [그림 4]



[그림 4] 지유 냉수추출물(CWE), 열수추출물(HWE) 및 메탄올추출물(ME) 각각의 에틸아세테이트 분획물 농도별 지질과산화(lipid peroxidation) 제거능

④ 각 추출물의 에틸아세테이트 분획물의 세포 내 항산화 활성 실험

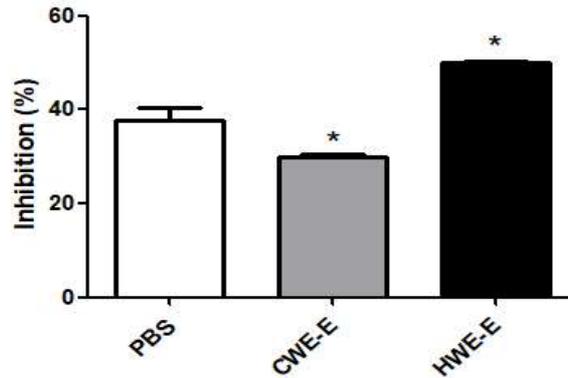
㉠ 세포 배양

- B16F10 세포(ATCC, CRL-6475, mouse melanoma cell)의 생육 배지로는 RPMI 1640(Sigma, USA)을 이용하였고, 배지에는 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco, USA)와 penicillin 및 streptomycin(100 U/ml)을 첨가하였으며, 실험기간 동안 세포주는 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였음

㉡ 항산화 효능 측정 : Superoxide dismutase (SOD) 활성 평가

- 배양된 BF16F10 멜라노마 세포를 96 well plate에 각각 5 x 10<sup>6</sup> cells/well로 분주하고 24 시간 배양한 후 각 추출물의 에틸아세테이트 분획물(50  $\mu$ g/ml)를 처리하고 24시간을 더 배양함
- SOD Assay Kit-WST (Dojindo, Japan)를 이용하여 활성을 확인함

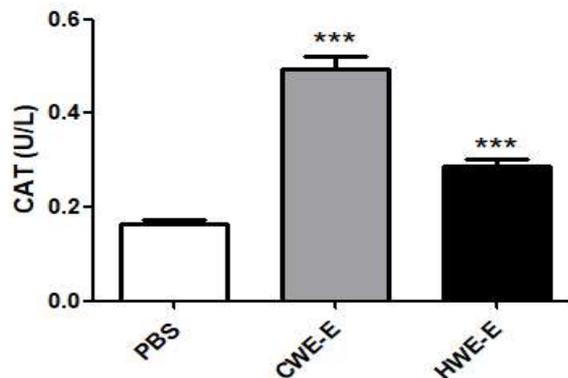
- PBS 처리구가 37.7%의 기본 활성도를 나타냈으며 냉수추출물의 에틸아세테이트 분획물의 SOD 활성은 29.8%, 열수추출물의 에틸아세테이트 분획물의 SOD 활성은 50.0%의 활성도를 나타냄
- 냉수추출물의 에틸아세테이트 분획물은 PBS 처리구에 비해 21% 낮았으며, 열수추출물의 에틸아세테이트 분획물은 32% 높게 나타나 탁월한 SOD 활성을 확인함



[그림 5] 지유 냉수추출물(CWE-E) 및 열수추출물(HWE-E) 각각의 에틸아세테이트 분획물의 SOD 활성도

㉔ 항산화 효능 측정 : Catalase (CAT) 활성 평가

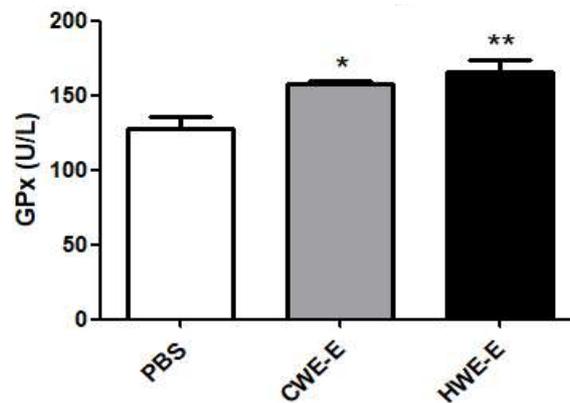
- 배양된 BF16F10 멜라노마 세포를 96 well plate에 각각  $1 \times 10^7$  cells/well로 분주하고 24 시간 배양한 후 각 추출물의 에틸아세테이트 분획물( $50 \mu\text{g/ml}$ )를 처리하고 24시간을 더 배양함
- Catalase assay kit (BioAssay Systems, USA)를 이용하여 활성을 확인함
- PBS 처리구가 0.1633 U/L의 기본 활성도를 나타냈으며 냉수추출물의 에틸아세테이트 분획물의 CAT 활성은 0.4933 U/L, 열수추출물의 에틸아세테이트 분획물은 0.2867 U/L를 나타냄
- PBS 처리구 대비 냉수추출물의 에틸아세테이트는 202.1%, 열수추출물의 에틸아세테이트는 75.6% 높게 나타나 매우 뛰어난 CAT 활성을 확인함



[그림 6] 지유 냉수추출물(CWE-E) 및 열수추출물(HWE-E) 각각의 에틸아세테이트 분획물의 CAT 활성도

㉔ 항산화 효능 측정 : Glutathione Peroxidase (GPx) 활성 평가

- 배양된 BF16F10 멜라노마 세포를 96 well plate에 각각  $1 \times 10^7$  cells/well로 분주하고 24 시간 배양한 후 각 추출물의 에틸아세테이트 분획물( $50 \mu\text{g/ml}$ )를 처리하고 24시간을 더 배양함
- Glutathione Peroxidase assay kit (BioAssay Systems, USA)를 이용하여 활성을 확인함
- PBS 처리구가 127.4 U/L의 기본 활성도를 나타냈으며 냉수추출물의 에틸아세테이트 분획물의 GPx 활성은 157.3 U/L, 열수추출물의 에틸아세테이트 분획물은 165.6 U/L를 나타냄
- PBS 처리구 대비 냉수추출물의 에틸아세테이트는 23.5%, 열수추출물의 에틸아세테이트는 30.0% 높은 CAT 활성을 확인함



[그림 7] 지유 냉수추출물(CWE-E) 및 열수추출물(HWE-E) 각각의 에틸아세테이트 분획물의 GPx 활성도

⑤ 각 추출물의 에틸아세테이트 분획물의 세포 내 항염증 활성 실험

㉑ 세포 배양

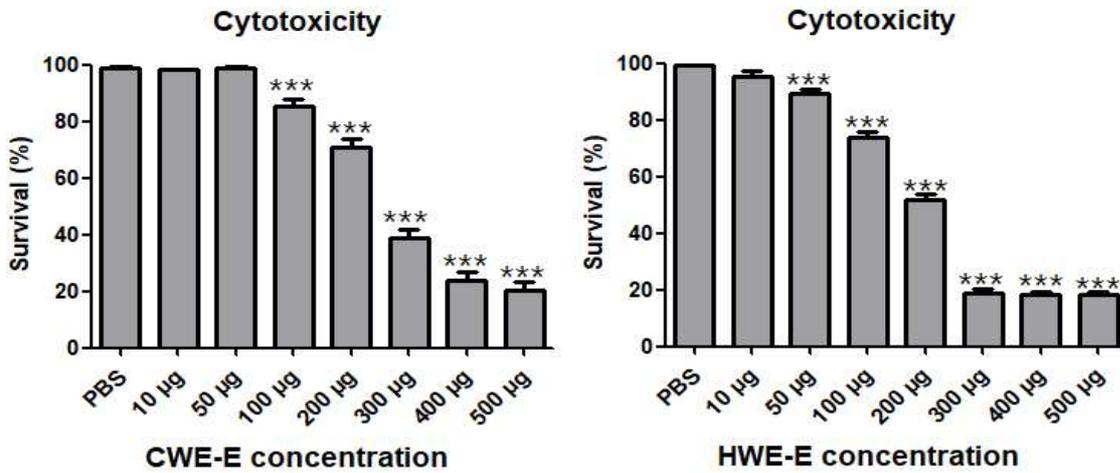
- B16F10 세포(ATCC, CRL-6475, mouse melanoma cell)의 생육 배지로는 RPMI 1640(Sigma, USA)을 이용하였고, 배지에는 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco, USA)와 penicillin 및 streptomycin( $100 \text{ U/ml}$ )을 첨가하였으며, 실험기간 동안 세포주는 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 배양하였음
- 마우스 대식세포주(RAW 264.7 세포)는 Dulbecco' s modified Eagle' s medium(DMEM, Hyclone Laboratories, USA)에 10% FBS,  $100 \text{ U/ml}$  penicillin 및  $100 \mu\text{g/ml}$  streptomycin(Gibco BRL, USA)을 혼합한 배지를 이용하여  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 배양하였음

㉒ 세포 독성

- 배양된 BF16F10 멜라노마 세포를 96 well plate에 각각  $5 \times 10^4$  cells/well로 분주하고 24 시간 배양한 후 각 추출물의 에틸아세테이트 분획물을 농도별로 희석하여 처리하고 24 시간 배양하였음
- PBS 용액을 처리한 멜라노마 세포는 음성대조구로 사용하였음

- 세포 생존률은 Cell Counting Kit-8(CCK-8, Sigma-Aldrich, USA)를 이용하여 흡광도 450 nm에서 측정하였음
- 모든 처리구는 3반복하였고, 세포독성은 다음과 같은 공식을 이용하여 결정하였음:  

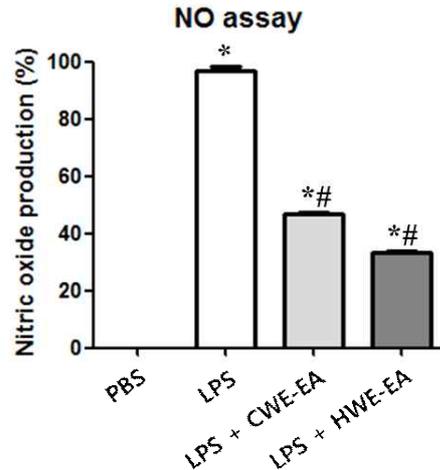
$$\text{세포독성}(\%) = (1 - \text{처리구 } A_{450 \text{ nm}} / \text{대조구 } A_{450 \text{ nm}}) \times 100$$
- BF16F10 멜라노마 세포에서 농도별 냉수추출물 및 열수추출물의 에틸아세테이트 분획물의 세포독성을 확인한 결과, 냉수추출물은 50  $\mu\text{g/mL}$ (98.6%) 농도까지 세포독성이 없는 것으로 측정되었음
- 열수추출물은 10  $\mu\text{g/mL}$ (95.5%) 농도까지 음성대조구인 PBS 처리구(98.8%)와 차이의 유의성이 없었음 [그림 8]



[그림 8] 지유 냉수추출물(CWE) 및 열수추출물(HWE) 각각의 에틸아세테이트 분획물 농도별 세포독성 결과

㉔ 항염증 효과 측정 : Nitric oxide(NO) 생성 억제 평가

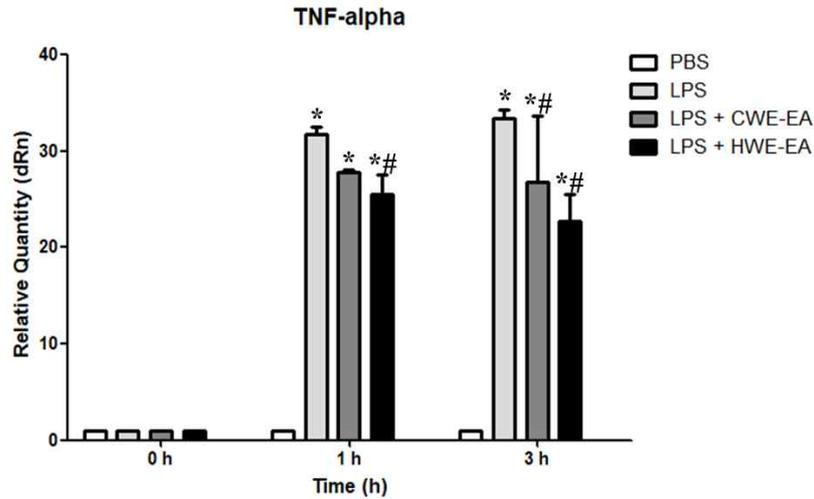
- 배양된 BF16F10 멜라노마 세포를 96 well plate에 각각  $5 \times 10^5$  cells/well로 분주하고 24 시간 배양한 후 각 추출물의 에틸아세테이트 분획물(50  $\mu\text{g/ml}$ )와 LPS(2  $\mu\text{g/mL}$ )을 동시에 처리하고 24시간을 더 배양함
- 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는  $\text{NO}^{2-}$  형태로 측정하였음
- 세포배양 상등액 100  $\mu\text{L}$ 와 Griess 시약 [2.5% (w/v) phosphoric acid에 용해한 1% (w/v) sulfani-lamide, 0.1% (w/v) naphyl-ethylenediamine] 100  $\mu\text{L}$ 를 혼합하여 96 well plate에서 10분동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였음
- NO의 농도는 sodium nitrite( $\text{NaNO}_2$ )를 표준용액으로 사용하여 정량하였음
- LPS를 단독 처리구(96.9%)와 비교할 때 냉수추출물의 에틸아세테이트 분획물의 NO 생성량은 46.7%, 열수추출물의 에틸아세테이트 분획물의 NO 생성량은 33.5%로 높은 NO 생성을 억제하는 것으로 나타나 저농도에서도 탁월한 NO 생성 억제 활성을 나타냈음



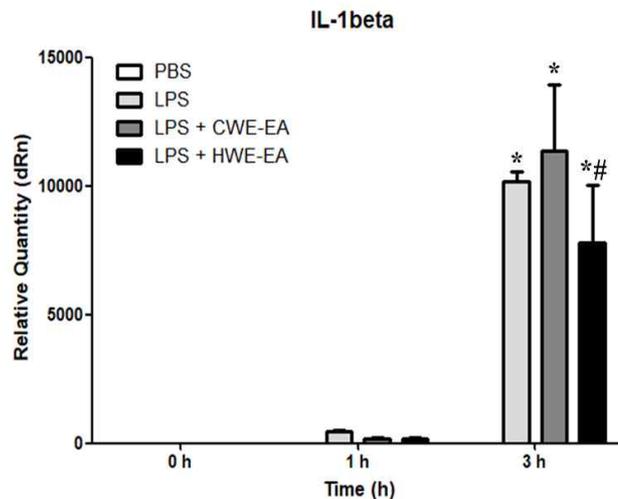
[그림 9] LPS 처리 BF16F10 세포주에서 지유의 냉수추출물-에틸아세테이트 분획물 (CWE-EA) 및 열수추출물-에틸아세테이트 분획물(HWE-EA)이 NO 생성에 미치는 억제 효과

㉔ 항염증 관련 사이토카인(cytokines)의 발현 양 측정 : 역전사반응(RT)-Real-time qPCR

- RAW 264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여  $5 \times 10^4$  cells/well로 조절한 후 24-well plate에 접종하고 24 시간 배양한 후 각 추출물의 에틸아세테이트 분획물( $50 \mu\text{g/ml}$ )와 LPS( $2 \mu\text{g/mL}$ )을 동시에 처리하고 1~3 시간을 더 배양함
- 배지를 제거한 후 RNAiso Plus(Takara, Japan)을 이용하여 RNA를 추출하였음
- RT 반응: 100 ng total RNA를 oligo (dT)<sub>18</sub> 프라이머, dNTP ( $0.5 \mu\text{M}$ ), 1 U RNase inhibitor, M-MuLV reverse transcriptase (2 U)로  $42^\circ\text{C}$  에서 60분,  $70^\circ\text{C}$  에서 15분 반응하여 cDNA 합성함
- qPCR 반응: 1ng cDNA를 SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) (Takara, Japan)으로  $95^\circ\text{C}$  에서 5초,  $60^\circ\text{C}$  에서 34초 반응하여 DNA 증폭함
- LPS를 단독 처리구와 비교할 때 냉수추출물의 에틸아세테이트 분획물의 TNF- $\alpha$  생성량이 반응 1시간에서는 87%, 3시간에서는 80%로 감소시키고, 열수추출물의 에틸아세테이트 분획물은 반응 1시간에서는 80%, 3시간에서는 68%로 감소시켜 열수추출물 분획물이 높은 TNF- $\alpha$  억제 활성을 나타냈음
- LPS를 단독 처리구와 비교할 때 냉수추출물의 에틸아세테이트 분획물의 IL- $\beta$  생성량이 반응 1시간에서는 41%로 감소 그리고 3시간에서는 111%로 증가된 반면 열수추출물의 에틸아세테이트 분획물은 반응 1시간에서는 42%, 3시간에서는 76%로 감소시켜 열수추출물 분획물이 TNF- $\alpha$  와 마찬가지로 IL- $\beta$  또한 높은 억제 활성을 보여 항염증효과에서 뛰어난 효능을 나타냈음



[그림 10] LPS 처리 RAW265.7 세포주에서 지유의 냉수추출물-에틸아세테이드 분획물 (CWE-EA) 및 열수추출물-에틸아세테이드 분획물(HWE-EA)이 TNF- $\alpha$  유전자 발현에 미치는 효과



[그림 11] LPS 처리 RAW265.7 세포주에서 지유의 냉수추출물-에틸아세테이드 분획물 (CWE-EA) 및 열수추출물-에틸아세테이드 분획물(HWE-EA)이 IL-1 $\beta$  유전자 발현에 미치는 효과

⑥ 대상식물 추출물 및 분획물을 처리한 동물에서의 항염증 효능 평가

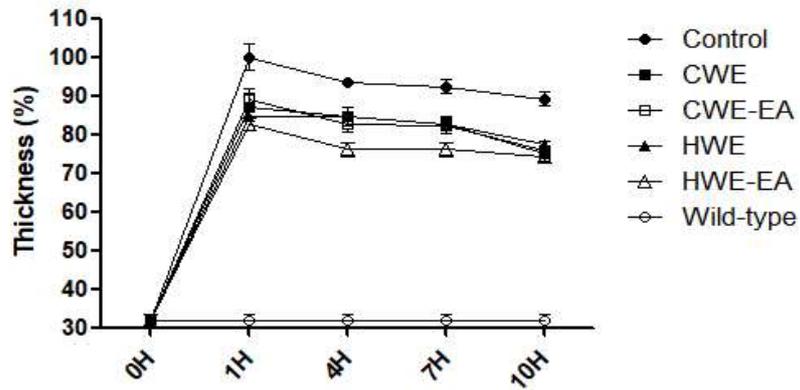
㉠ 급성염증 동물모델 확립

- 수컷 BALB/c mouse(5주령 25-40g)를 이용하여 부종(edema) 유발 물질인 1%(PBS 용액) 카라기난(carrageenan) 0.1 mL을 뒷발 밑창에 주사함

㉡ 유효물질의 염증유발 동물모델에서 입증

- 카라기난과 추출물 및 분획물 100  $\mu$ g을 병행 접종함(대조구: PBS)
- 염증유발 동물모델의 부종 크기를 0, 1, 4, 7, 10 시간별로 확인함
- 실험결과, 카라기난 단독 접종 1시간 후에 최대 둘레가 약 3.2배 증가하며 10시간 후에는 2.8배 증가함

- 최대 길이를 100% 기준으로 카라기난 단독 접종 10시간 후 89.1%로 감소함
- 냉수추출물 병행 접종 1시간 후 87%로 카라기난 대비 13% 감소했으며 10시간 후 최대 25.1% 감소함
- 냉수추출 분획물 병행 접종 1시간 후 89.1%로 카라기난 대비 10.9% 감소했으며 10시간 후 최대 24.0% 감소함
- 열수추출물 병행 접종 1시간 후 84.9%로 카라기난 대비 15.1% 감소했으며 10시간 후 최대 22.4% 감소함
- 열수추출 분획물 병행 접종 1시간 후 82.6%로 카라기난 대비 17.4% 감소했으며 10시간 후 최대 25.9 감소시켜 가장 좋은 효능을 나타냄



[그림 12] 카라기난으로 유도된 부종의 둘레를 측정된 결과

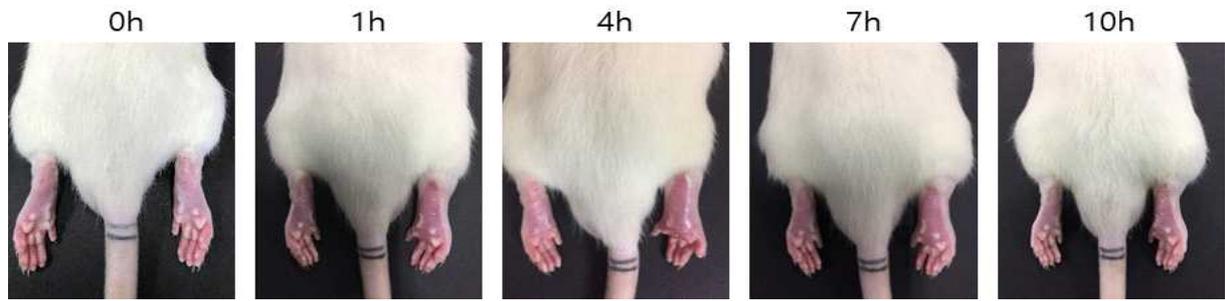
[표 3] 카라기난으로 유도된 부종의 둘레를 측정된 결과

| %   | Wild-type | Control | CWE  | CWE-EA | HWE  | HWE-EA |
|-----|-----------|---------|------|--------|------|--------|
| 0H  | 31.7      | 31.7    | 31.7 | 31.7   | 31.7 | 31.7   |
| 1H  | 31.7      | 100     | 87.0 | 89.1   | 84.9 | 82.6   |
| 4H  | 31.7      | 93.5    | 84.8 | 82.6   | 84.5 | 77.3   |
| 7H  | 31.7      | 92.4    | 82.6 | 82.1   | 82.6 | 75.8   |
| 10H | 31.7      | 89.1    | 74.9 | 76.0   | 77.6 | 74.1   |



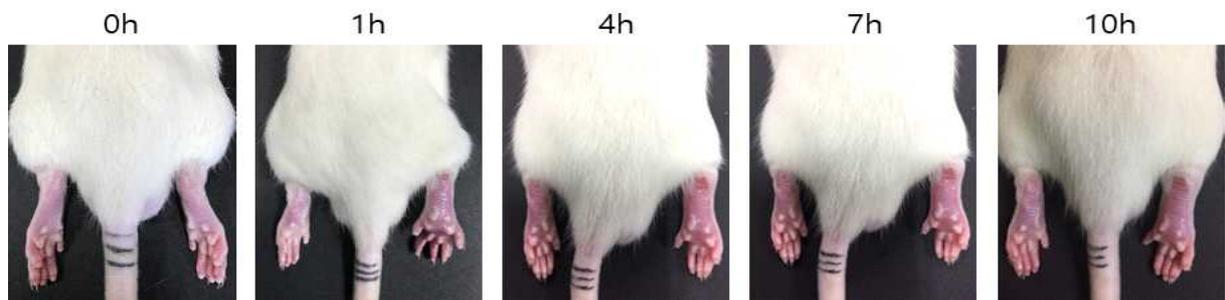
[그림 13] 카라기난 처리 후 control (PBS) 처리 사진

지유 CWE



[그림 14] 카라기난 처리 후 냉수추출물 처리 사진

지유 CWE-EA



[그림 15] 카라기난 처리 후 냉수추출 분획물 처리 사진

지유 HWE



[그림 16] 카라기난 처리 후 열수추출물 처리 사진

지유 HWE-EA

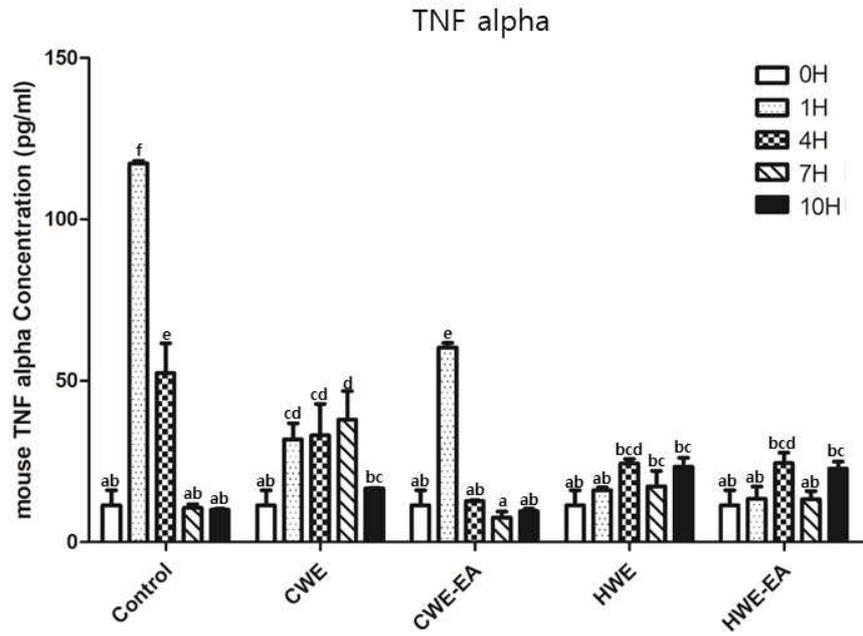


[그림 17] 카라기난 처리 후 열수추출 분획물 처리 사진

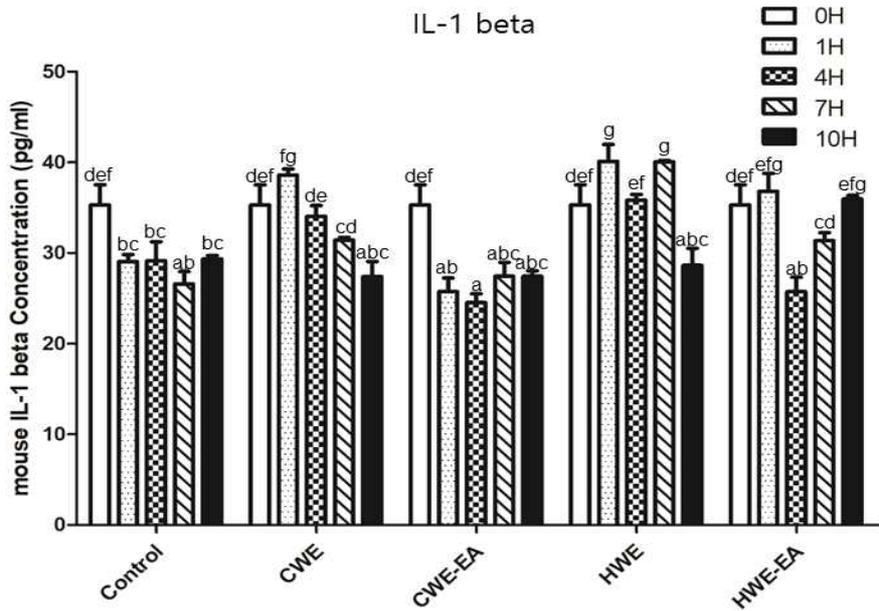
⑦ 대상식물 추출물 및 분획물을 처리한 동물에서의 항염증 사이토카인 분석

㉠ 염증유발 동물모델의 혈액 채취 및 림프구 분리

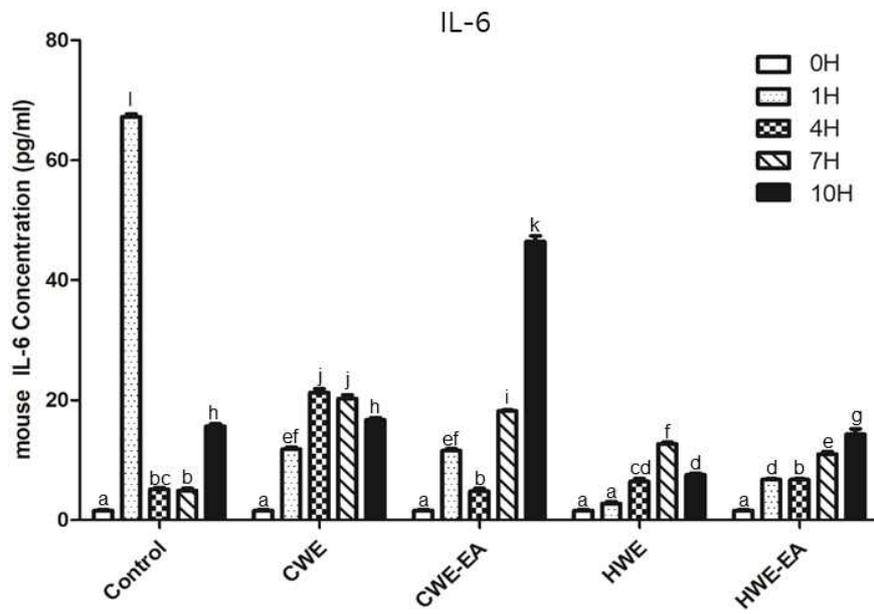
- 혈액 채취 후 원심으로 serum을 분리한 후 ELISA kit(ThermoFisher, Invitrogen, USA)를 이용하여 제품의 방법에 따라 cytokine 농도를 측정함
- TNF- $\alpha$  (Cat : BMS607-3), IL-1(BMS6002), IL-6(BMS603-2), IL-10(BMS614), IL-12(BMS616)
- 실험결과, 급성 발열과 염증을 발생시키는 TNF- $\alpha$  농도는 카라기난 단독 접종 1시간 후 117.5 pg/ml(100%)로 가장 높은 증가를 보인 반면 냉수추출물(31.8 pg/ml)은 72.9%, 냉수추출 분획물(60.3 pg/ml)은 48.7%, 열수추출물(16.1 pg/ml)은 86.3%, 열수추출 분획물(13.4 pg/ml)은 88.6% 감소시킴[그림 19]
- 추출물 및 분획물 모두 탁월한 TNF- $\alpha$  발현 억제력을 나타냄
- IL-1은 카라기난 단독 접종 1시간 후부터 10시간까지 꾸준히 18% 감소했으며 냉수추출물은 접종 1시간 후에 38.6 pg/ml로 0시간 대비 9% 증가하고 4시간부터 감소함
- 냉수추출 분획물은 카라기난 단독 접종과 유사하게 1시간부터 감소 27% 감소함[그림20]
- 열수추출물은 접종 1시간 후에 40.1 pg/ml로 0시간 대비 13.5% 증가하고 10시간에는 정상개체와 동일한 수준으로 감소함
- 열수추출 분획물은 접종 1시간 후에 36.8 pg/ml로 근소하게 증가했고, 다른 시료와 달리 10시간에도 36.0 pg/ml의 높은 농도가 관찰됨
- IL-6은 카라기난 단독 접종 시 1시간 후에 67.2 pg/ml로 높은 농도를 보인 후 급감했으며 냉수추출물은 4시간과 7시간에 21.3, 20.3 pg/ml로 농도가 상승함[그림 21]
- 냉수추출 분획물은 접종 10시간 후 46.4 pg/ml로 높은 농도를 보였으며 열수추출물은 7시간에 12.7 pg/ml 그리고 열수추출 분획물은 10시간에 14.3 pg/ml로 비교적 낮은 수치를 나타냄
- 항염증 역할을 하는 IL-10은 카라기난 단독접종 시 7시간 후에 151.8 pg/ml로 상승했으며 냉수 추출물은 접종 1시간 후부터 148.6 pg/ml로 높은 농도를 보임[그림 22]
- 냉수추출 분획물은 7시간 후에 110.8 pg/ml로 가장 높은 농도를 나타냈고 열수추출물은 4시간 후에 204.3 pg/ml로 카라기난 단독 대비 35% 높은 농도가 관찰됨
- 열수추출 분획물은 접종 10시간 후에 222.3 pg/ml로 전체 시료중에 가장 높은 농도를 보였고 카라기난 단독 대비 46% 높은 농도가 관찰되어 뛰어난 항염증 효능을 검증함
- 선천 면역과 후천 면역을 모두 자극하는 IL-12의 경우, 카라기난 단독 접종 7시간 후 315.3 pg/ml로 가장 높은 농도를 나타냈고, 냉수추출물은 접종 1시간 후 184.7 pg/ml로 소량 상승하고 감소함[그림 23]
- 냉수추출 분획물은 접종 1시간 후부터 감소하고 10시간에 166.1 pg/ml로 상승함
- 열수추출물은 접종 후 7시간까지 변화가 없고 10시간에 105.3 pg/ml로 크게 감소하며 열수추출 분획물은 냉수추출 분획물과 유사하게 접종 1시간 후부터 감소한 후 10시간에 196.9 pg/ml로 상승함
- 전체적으로 추출물은 IL-10이 감소하며 분획물은 감소한 후 10시간에 농도가 높아져 선천 및 후천면역을 유도하는 것을 관찰함



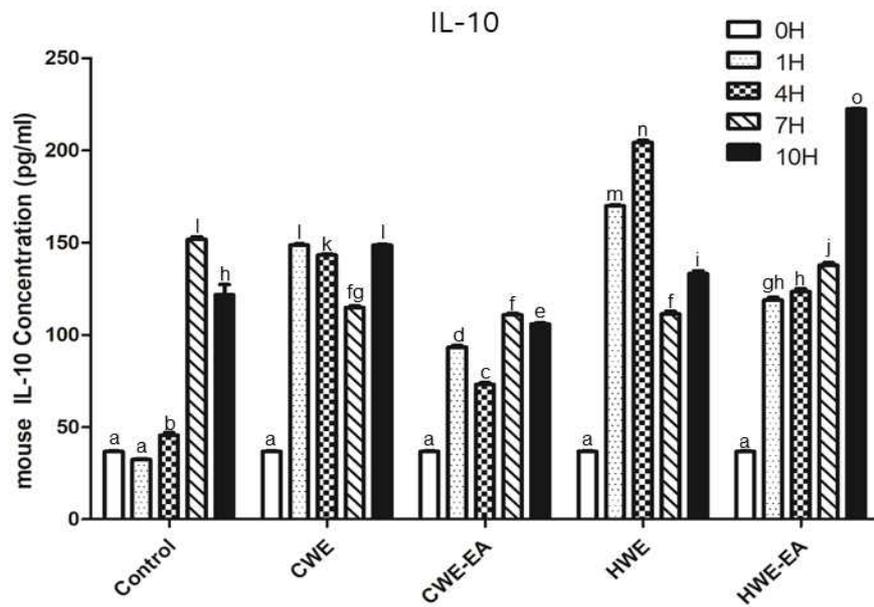
[그림 19] ELISA kit를 이용한 혈청내 TNF- $\alpha$  농도 결과



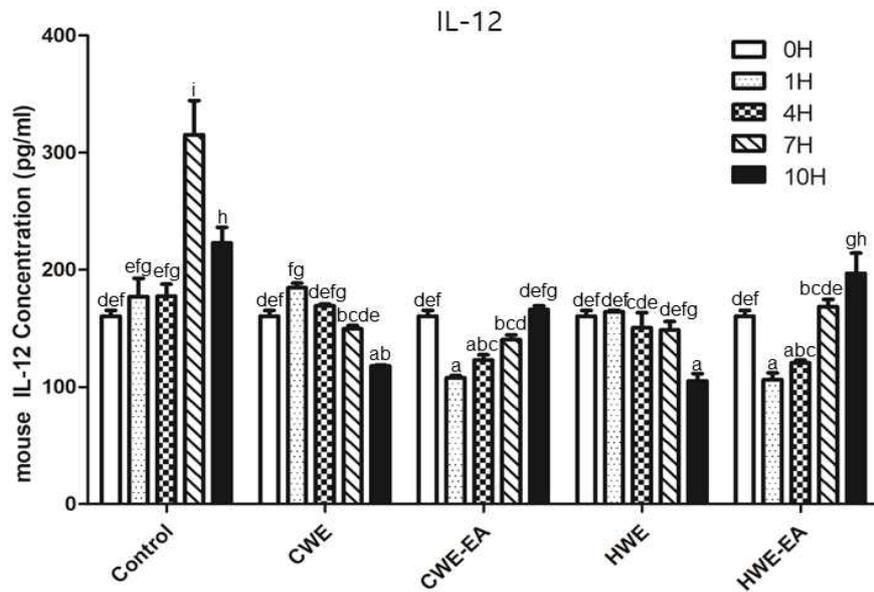
[그림 20] ELISA kit를 이용한 혈청내 IL-1 농도 결과



[그림 21] ELISA kit를 이용한 혈청내 IL-6 농도 결과

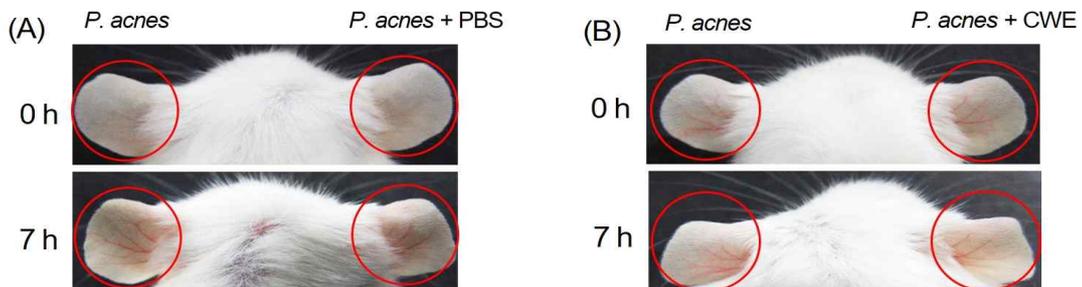


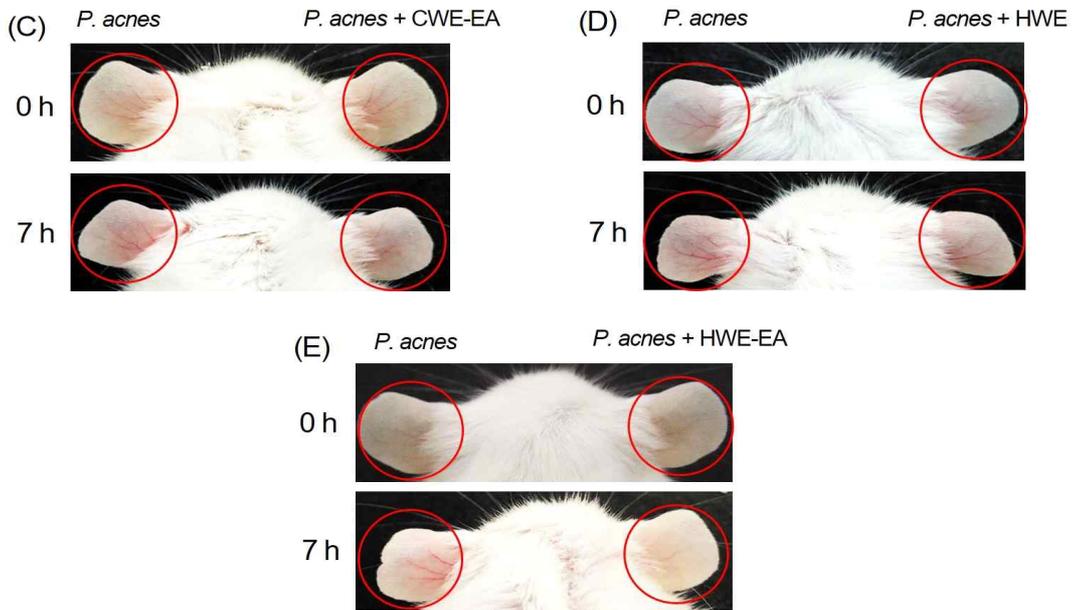
[그림 22] ELISA kit를 이용한 혈청내 IL-10 농도 결과



[그림 23] ELISA kit를 이용한 혈청내 IL-12 농도 결과

- ⑧ 대상식물 열수추출물, 냉수추출물 및 분획물 시료의 *in vivo* 효능평가와 각 시료 함유 도포액의 안전성 시험
- ① 대상식물 추출물 및 분획물을 처리한 동물에서의 항여드름균 효능 평가
  - ICR 마우스(5주령)의 귀에 접종(intradermal injection) 여드름균인 *P. acnes* 균을  $1 \times 10^7$  접종 함(음성대조구 : PBS)
  - 추출물 및 분획물 처리과 여드름균을 귀의 전면과 후면에 동시 접종함
  - 여드름균에 의해 자극된 귀의 충혈로 상태를 관찰하고 치유되는 과정을 0, 1, 4, 7, 10시간에 확인함
  - 실험결과, *P. acnes*균 단독 접종 및 PBS 처리구는 접종 후 7시간까지 충혈이 관찰되었고 10시간에는 자연 치유되었고[그림 24A], 냉수추출물은 접종 후 7시간까지 큰 차이는 나타내지 않았으며 10시간에는 모두 치유됨[그림 24B]
  - 냉수추출 분획물과 열수추출물은 접종 후 7시간에 충혈을 완화시키는 것을 관찰함[그림 24C, D]
  - 열수추출 분획물은 접종 후 7시간에 충혈이 완치를 보이며 뚜렷한 항염 및 항균 작용을 나타냄[그림 24E]





[그림 24] *P. acnes* 균에 의한 염증반응을 항균 및 항염증 활성으로 완화여부를 관찰한 결과

㉠ 대상식물 추출물 및 분획물을 처리한 동물에서의 각 시료 함유 도포액의 안전성 시험

- ICR 마우스(5주령)의 털을 제모한 후 7일마다 도포를 수행함
- 지유 열수, 냉수 추출물 및 ethyl acetate 분획물을 vaseline 100  $\mu$ l에 각 시료 100  $\mu$ g을 연고화하여 마우스 피부에 도포함
- 안전성 평가는 CTFA 안전성 평가 가이드라인 기준에 준하여 관찰 및 평가함

[표 4] DRAIZE 피부 자극성 점수 시스템

| 홍반 및 가피 형성                    | 점수 |
|-------------------------------|----|
| 홍반이 보이지 않는다                   | 0  |
| 극히 약간의 홍반(겨우 인지될 정도)          | 1  |
| 명백한 홍반                        | 2  |
| 중등도에서 강도의 홍반                  | 3  |
| 심홍색의 강한 홍반에 가벼운 가피형성(장해는 심부에) | 4  |

[표 5] DRAIZE 피부 자극성 점수 시스템에 대한 결과

|     | Control | CWE | CWE-EA | HWE | HWE-EA |
|-----|---------|-----|--------|-----|--------|
| 2주  | 0       | 1   | 1      | 1   | 1      |
| 4주  | 0       | 0   | 1      | 1   | 0      |
| 6주  | 0       | 1   | 1      | 0   | 1      |
| 8주  | 0       | 0   | 1      | 1   | 0      |
| 10주 | 0       | 1   | 0      | 1   | 1      |

[표 6] DRAIZE 피부 자극성 점수 시스템II

| 부종 형성  | 점 수 |
|--|-----|
| 부종이 보이지 않는다                                    | 0   |
| 극히 약간의 부종 (겨우 인지될 정도)                          | 1   |
| 경도의 부종<br>(명확한 용기에 의하여 명시될 부위의 주위와 명백하게 구분 가능) | 2   |
| 중등도의 부종 (약 1mm의 용기)                            | 3   |
| 강도의 부종 (1mm를 넘어서 용기하고 주위에도 퍼진다)                | 4   |

[표 7] DRAIZE 피부 자극성 점수 시스템II에 대한 결과

|     | Control | CWE | CWE-EA | HWE | HWE-EA |
|-----|---------|-----|--------|-----|--------|
| 2주  | 0       | 0   | 0      | 0   | 0      |
| 4주  | 0       | 0   | 0      | 0   | 0      |
| 6주  | 0       | 0   | 0      | 0   | 0      |
| 8주  | 0       | 0   | 0      | 0   | 0      |
| 10주 | 0       | 0   | 0      | 0   | 0      |

[표 8] 패치 테스트 피부 자극성 점수 시스템

| 피부 반응   | 점 수    |
|---|--------|
| 염증성의 징후를 보이지 않는다; 건강하고 정상적 피부                     | 0      |
| 부위 외관에 광택이 있거나 또는 겨우 인지될 정도의 홍반                   | ±(0.5) |
| 약간의 홍반  | 1      |
| 중등도의 홍반,가장자리에 겨우 인지될 정도의 부종을 수반하는 가능성,구진(丘疹)의 가능성 | 2      |
| 전체에 부종을 수반하는 중등도의 홍반                              | 3      |
| 강도의 부종을 수반하는 강도의 홍반,작은 수포를 수반하거나 수반하지 않는다         | 4      |
| 척포부위를 넘어서 퍼진 강도의 반응                               | 5      |

[표 9] 패치 테스트 피부 자극성 점수 시스템에 대한 결과

|     | Control | CWE | CWE-EA | HWE | HWE-EA |
|-----|---------|-----|--------|-----|--------|
| 2주  | 0       | 1   | 0      | 1   | 1      |
| 4주  | 0       | 1   | 1      | 0   | 0      |
| 6주  | 0       | 0   | 1      | 0   | 1      |
| 8주  | 0       | 1   | 1      | 0   | 0      |
| 10주 | 0       | 0   | 0      | 1   | 1      |

5. 돼지콜라겐 대체 소재 개발 [연구내용 요약]

(1) 불가사리 및 생선 비늘의 콜라겐을 이용한 할랄 적합 돼지콜라겐 대체 소재 개발

① 불가사리 및 어류 비늘을 이용한 콜라겐

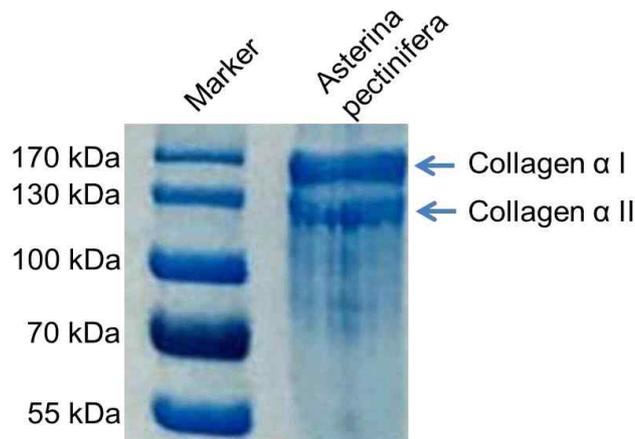
② 각 콜라겐의 Elastase 억제 활성 실험

## 5. 돼지콜라겐 대체 소재 개발

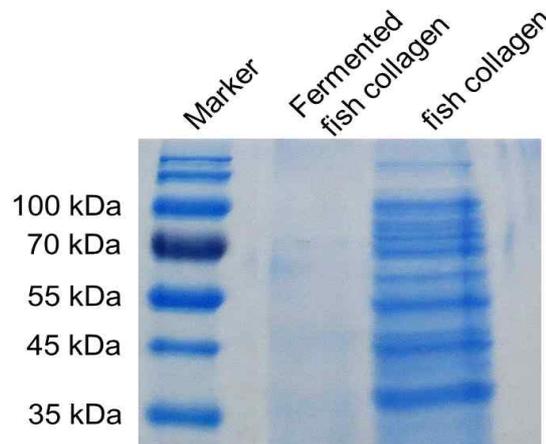
### ① 불가사리 및 어류 비늘을 이용한 콜라겐

#### ㉠ 방법(콜라겐 조추출물: 산 + 효소 추출법 및 염 침전법)

- 시료 분말을 함유한 0.05M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(pH 8.7~9.1) 용액을 4℃에 처리하여 조단백질을 추출함
- 5mM EDTA를 함유한 0.5M CH<sub>3</sub>COOH(pH 2.5~3) 용액에 점진적으로 용해시킴
- pepsin(50 mg / 1g 분말)을 용해액에 직접 첨가하고 4℃에서 24시간 동안 2회 처리하고 이 과정을 3회 반복함
- 3000 g에서 15분 동안 원심분리하여 상등액을 획득하고 염화나트륨 4M 용액을 4℃에서 점진적으로 첨가하여 콜라겐을 침전시킴
- 침전물을 수확하여 1M CH<sub>3</sub>COOH(pH 2.5~3) 용액에 용해시킴
- 콜라겐 함유 용액을 0.02M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(pH 8.7~9.1) 용액에 대해 4℃에서 24시간 동안 투석시킴
- 단백질 정량 후 20 μg을 SDS-PAGE 수행함



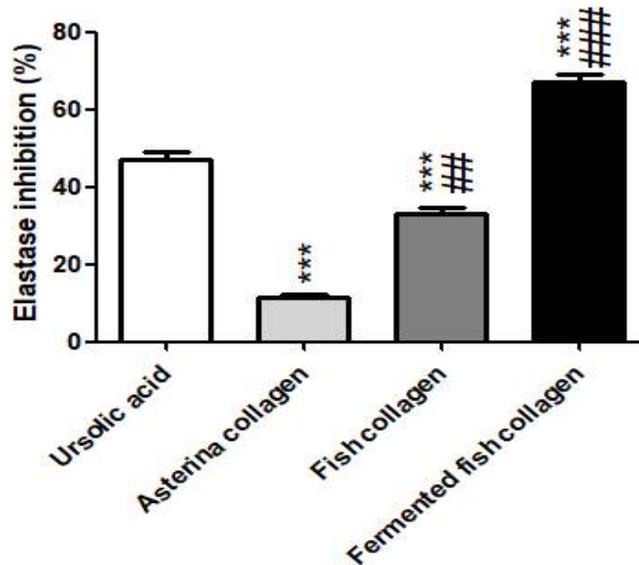
[그림 4] 불가사리에서 추출한 콜라겐을 SDS-PAGE로 확인한 결과



[그림 4] 어류 비늘에서 추출한 콜라겐과 발효된 콜라겐을 SDS-PAGE로 확인한 결과

② 각 콜라겐의 Elastase 억제 활성 실험

- Porcine pancreas elastase 저해 활성 측정은 기질로서 N-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide를 사용하여 37°C 에서 30분간 3-p-nitroanilide의 생성량을 측정함
- 각 콜라겐 100mg를 시험관에 옮긴 후 50 mM Tris-HCl 용액(pH8.6)에 녹인 elastase와 pancreatic solution Type I(porcine Pancreas, 0.6 units/mL) 용액 0.05 mL을 첨가함
- 양성대조군으로 Ursolic acid 250  $\mu$ g을 사용함
- 50 mM Tris-HCl 용액(pH.8.6)에 녹인 기질 N-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide(1 mg/mL) 0.1 mL를 첨가하고 30분간 반응시켜 410 nm에서 흡광도를 측정함
- Elastase 저해 활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타냄
- Ursolic acid (250  $\mu$ g)은 46.9%의 elastase 저해 활성을 보였으며, 불가사리는 11.4%로 매우 낮은 저해 활성을 나타냄
- 어류 콜라겐은 33.2%의 억제 활성을 보였으며, 발효 콜라겐은 67.1%로 매우 높은 저해 활성을 나타냄
- 결과적으로 불가사리 콜라겐은 추출과정의 번거로움과 낮은 수율 그리고 낮은 저해 활성으로 사업화에 이점을 찾을 수 없었으나 어류 콜라겐은 높은 수율과 그에 따른 발효과정을 수행이 가능하였고, 큰 분자량의 콜라겐이 아닌 발효 과정 중에 분해된 콜라겐이 높은 저해 활성을 나타냄에 따라 돼지 콜라겐 대체제로 적합함



6. 할랄 적합 소재 및 제품 인증 그리고 사업화 [연구내용 요약]

(1) 할랄 적합 식물 소재 개발

- ① 소재 품목
- ② 상기 추출물의 원산지

(2) 할랄 인증 완료

- ① 화장품 : PURESHE MISCELLA CLEANSING WATER 포함 115종
- ② 식물 소재 ddL-AC-Complex 포함 8종
- ③ 할랄 인증서

(3) 국내 농산자원 화장품용 원료의 ICID 등재

- ① ddL-MTIC System
- ② ddL-Stellera Chamaejasme Extract

(4) KFDA 기능성 화장품 인증

- ① 인증 리스트
- ② KFDA 인증서

(5) 추출물 개발 장비 및 Pilot test 설비 구축

(6) 사업화 성과 및 매출 실적

- ① 사업화 성과
- ② 사업화 계획 및 매출 실적

6. 할랄 적합 소재 및 제품 인증 그리고 사업화

(1) 할랄 적합 식물 소재 개발

① 소재 품목

|    | 원료 명칭                                  | 사용 식물                        | 비고               |
|----|--|------------------------------|------------------|
| 1  | ddL-AC-Complex                         | 고삼, 모란뿌리, 초피나무, 황금, 녹차, 후박나무 | 할랄 인증            |
| 2  | ddL-Camellia Sinensis Leaf Extract     | 녹차                           | 할랄 인증            |
| 3  | ddL-Magnolia Officialis Bark Extract   | 후박나무                         | 할랄 인증            |
| 4  | ddL-Centella Asiatica Extract          | 병풀                           | 할랄 인증            |
| 5  | ddL-MTIC System                        | 울산도깨비바늘, 서양자두, 맥문동           | 할랄 인증<br>ICID 등재 |
| 6  | ddL-NPC Complex                        | 고삼, 모란뿌리, 초피나무, 라일락, 황금      | 할랄 인증            |
| 7  | ddL-Portulaca Extract                  | 마치현                          | 할랄 인증            |
| 8  | ddL-Stellera Chamaejasme Extract       | 피뿌리풀                         | ICID 등재          |
| 9  | ddL-Poterium Officinatum Root Extract  | 지유                           |                  |
| 10 | ddL-Rehmannia Chinensis Root Extract   | 지황                           |                  |
| 11 | ddL-Schisandra Chinensis Fruit Extract | 오미자                          |                  |
| 12 | ddL-Lycium Chinense Fruit Extract      | 구기자                          |                  |
| 13 | ddL-Gastrodia Elata Root Extract       | 천마                           |                  |





② 상기 추출물의 원산지

| 식물 이름      | 원산지 (국내)          |
|------------|-------------------|
| 고삼         | 강원도 횡성            |
| 모란뿌리       | 전라남도 강진           |
| 초피나무       | 제주도               |
| 황금         | 충청북도 제천           |
| 녹차         | 보성, 하동, 제주도 등 전국적 |
| 후박         | 제주도               |
| 병풀         | 제주도 등 남부 지역       |
| 울산도깨비바늘    | 울산광역시             |
| 서양자두       | 경상북도 안동           |
| 맥문동        | 충청남도 청양           |
| 라일락        | 제주도, 충청북도 옥천 등    |
| 마치현        | 경기도 이천            |
| 피뿌리풀꽃/잎/줄기 | 제주도 동쪽            |
| 지유         | 지리산 일대            |
| 지황뿌리       | 경상남도 산청           |
| 오미자        | 문경, 영주 등 경북지역     |
| 구기자        | 충청남도 청양           |
| 천마         | 전라남도 무주           |

(2) 할랄 인증 완료

① 화장품 : PURESHE MISCELLA CLEANSING WATER 포함 115종

|    | 제품 명칭  | 유형       |
|----|--|----------|
| 1  | PURESHE MISCELLA CLEANSING WATER   | CLEANSER |
| 2  | PURESHE PREGNA CARE ANTI STRETCHMARK BODY OIL (Pregna Care Body Massage Oil) | OIL      |
| 3  | PURESHE PREGNA CARE BODY CLEANSER  | CLEANSER |
| 4  | PURESHE PREGNA CARE BODY MOISTURIZER   | EMULSION |
| 5  | PURESHE PREGNA CARE FOAM CLEANSER  | CLEANSER |
| 6  | PURESHE PREGNA CARE HAIR SHAMPOO   | SHAMPOO  |
| 7  | PURESHE PREGNA CARE INNER CLEANSER   | CLEANSER |
| 8  | PURESHE 2-LAYER BODY LOTION  | EMULSION |
| 9  | PURESHE ANTI WRINKLE TONER(H)  | TONER    |
| 10 | PURESHE ANTI OXIDANT CONCENTRATION-IDEBENONE                                 | ESSENCE  |
| 11 | PURESHE ANTI WRINKLE BIO CELL MASK   | MASK     |
| 12 | PURESHE ANTI WRINKLE CREAM (H)   | CREAM    |
| 13 | PURESHE ANTI WRINKLE CREAM (M)   | CREAM    |
| 14 | PURESHE ANTI WRINKLE EMULSION  | EMULSION |

|    |   |           |
|----|---|-----------|
| 15 | PURESH ANTI WRINKLE ESSENCE                                   | ESSENCE   |
| 16 | PURESH ANTI WRINKLE EYE CREAM                                 | CREAM     |
| 17 | PURESH ANTI WRINKLE TONER(M)                                  | TONER     |
| 18 | PURESH CE FERULIC ESSENCE                                     | ESSENCE   |
| 19 | PURESH GOLD CREAM   | CREAM     |
| 20 | PURESH GOLD ESSENCE   | ESSENCE   |
| 21 | PURESH GOLD EYE CREAM   | CREAM     |
| 22 | PURESH MILD BABY CERAMIDE LOTION                              | EMULSION  |
| 23 | PURESH MILD BABY SUN CREAM                                    | CREAM     |
| 24 | PURESH MOISTURING ESSENCE                                     | ESSENCE   |
| 25 | PURESH MOISTURIZING BIO CELL MASK                             | MASK      |
| 26 | PURESH MOISTURIZING CREAM (H)                                 | CREAM     |
| 27 | PURESH MOISTURIZING CREAM (M)                                 | CREAM     |
| 28 | PURESH MOISTURIZING EMULSION                                  | EMULSION  |
| 29 | PURESH MOISTURIZING EYE CREAM                                 | CREAM     |
| 30 | PURESH MOISTURIZING TONER (H)                                 | TONER     |
| 31 | PURESH MOISTURIZING TONER (M)                                 | TONER     |
| 32 | PURESH MULTI BALM   | BALM      |
| 33 | PURESH OIL MIST   | MIST      |
| 34 | PURESH PURE VITAMIN C ESSENCE                                 | ESSENCE   |
| 35 | PURESH SKIN PEELING EMULSION                                  | EMULSION  |
| 36 | PURESH UV PROTECTOR SPF35 PA++                                | SUN CREAM |
| 37 | PURESH UV PROTECTOR SPF40 PA++                                | SUN CREAM |
| 38 | PURESH VITAMIN C CREAM  | CREAM     |
| 39 | PURESH VITAMIN C ESSENCE                                      | ESSENCE   |
| 40 | PURESH WHITENING BIO CELL MASK                                | MASK      |
| 41 | PURESH WHITENING CREAM (H)                                    | CREAM     |
| 42 | PURESH WHITENING CREAM (M)                                    | CREAM     |
| 43 | PURESH WHITENING EMULSION                                     | EMULSION  |
| 44 | PURESH WHITENING TONER (H)                                    | TONER     |
| 45 | PURESH WHITENING TONER (M)                                    | TONER     |
| 46 | PURESH WHITENING EYE CREAM                                    | CREAM     |
| 47 | PURESH WHITENING ESSENCE                                      | ESSENCE   |
| 48 | DESSERT TABLE H BIOLABEL MIST RECIPE PREMIUM (FOR DAY TIME)   | MIST      |
| 49 | DESSERT TABLE H BIOLABEL MIST RECIPE PREMIUM (FOR NIGHT TIME) | MIST      |
| 50 | DESSERT TABLE H BIOLABEL ALL-IN-ONE MASK                      | MISK      |
| 51 | DESSERT TABLE H BIOLABEL ANT-AGING EYE CREAM RECIPE           | CREAM     |
| 52 | DESSERT TABLE H BIOLABEL ANTI-AGING MASK                      | MISK      |
| 53 | DESSERT TABLE H BIOLABEL BB CREAM RECIPE I                    | CREAM     |
| 54 | DESSERT TABLE H BIOLABEL BB CREAM RECIPE II                   | CREAM     |
| 55 | DESSERT TABLE H BIOLABEL CLEANSING RECIPE                     | CLEANSER  |
| 56 | DESSERT TABLE H BIOLABEL CREAM RECIPE I                       | CREAM     |
| 57 | DESSERT TABLE H BIOLABEL CREAM RECIPE II                      | CREAM     |
| 58 | DESSERT TABLE H BIOLABEL LIP CARE BALM RECIPE                 | BALM      |
| 59 | DESSERT TABLE H BIOLABEL LOTION RECIPE I                      | EMULSION  |
| 60 | DESSERT TABLE H BIOLABEL LOTION RECIPE II                     | EMULSION  |
| 61 | DESSERT TABLE H BIOLABEL MOISTURIZING MASK                    | MASK      |
| 62 | DESSERT TABLE H BIOLABEL SHAMPOO RECIPE                       | SHAMPOO   |
| 63 | DESSERT TABLE H BIOLABEL SOOTHING MASK                        | MASK      |
| 64 | DESSERT TABLE H BIOLABEL SUN SCREEN RECIPE                    | SUN CREAM |

|     |   |          |
|-----|---|----------|
| 65  | DESSERT TABLE H BIOLABEL SUPER SERUM RECIPE I         | ESSENCE  |
| 66  | DESSERT TABLE H BIOLABEL SUPER SERUM RECIPE II        | ESSENCE  |
| 67  | DESSERT TABLE H BIOLABEL TONER RECIPE I               | TONER    |
| 68  | DESSERT TABLE H BIOLABEL TONER RECIPE II              | TONER    |
| 69  | DESSERT TABLE H BIOLABEL WHITENING MASK               | MASK     |
| 70  | DESSERT TABLE H BIOLABEL MIST RECIPE(DRY SKIN TYPE)   | MIST     |
| 71  | DESSERT TABLE H BIOLABEL MIST RECIPE OILY SKIN TYPE). | MIST     |
| 72  | JNH HALAL ANTI WRINKLE CREAM (H)                      | CREAM    |
| 73  | JNH HALAL ANTI WRINKLE ESSENCE SKIN (H)               | TONER    |
| 74  | JNH HALAL ANTI WRINKLE EYE CREAM                      | CREAM    |
| 75  | JNH HALAL ANTI WRINKLE SERUM                          | ESSENCE  |
| 76  | JNH HALAL BRIGHTENING ESSENCE SKIN (H)                | TONER    |
| 77  | JNH HALAL BRIGHTENING CREAM (M)                       | CREAM    |
| 78  | JNH HALAL BRIGHTENING SERUM                           | ESSENCE  |
| 79  | JNH HALAL HYDRA CREMA (M)                             | CREAM    |
| 80  | JNH HALAL HYDRA ESSENCE SKIN(H)                       | TONER    |
| 81  | JNH HALAL HYDRA SERUM                                 | ESSENCE  |
| 82  | JNH HALAL ROYAL FACIAL FOAM                           | ESSENCE  |
| 83  | FLODY SAFE GUARD BALANCING SHAMPOO                    | SHAMPOO  |
| 84  | FLODY SAFE GUARD FRESH SHAMPOO                        | SHAMPOO  |
| 85  | FLODY SAFE GUARD NOURISHING SHAMPOO                   | SHAMPOO  |
| 86  | FLODY TRUE BERRY ANTI-WRINKLE MASK                    | MASK     |
| 87  | FLODY TRUE FLOWER SOOTHING MASK                       | MASK     |
| 88  | FLODY TRUE HERB PEELING MASK                          | MASK     |
| 89  | FLODY TRUE LEMONIA BRIGHTENING MASK                   | MASK     |
| 90  | FLODY TRUE NATURAL FRESH MASK                         | MASK     |
| 91  | FLODY TRUE SWEET MOISTURE MASK                        | MASK     |
| 92  | FLODY HAND CREAM                                      | CREAM    |
| 93  | PURESH ALOE SOOTHING GEL                              | GEL      |
| 94  | PURESH ANTI OXIDANT CONCENTRATION - ASTAXANTHIN       | ESSENCE  |
| 95  | PURESH ANTI OXIDANT CONCENTRATION - CO-ENZYME Q10     | ESSENCE  |
| 96  | PURESH ANTIOXIDANT CONCENTRATION - PURE VITAMIN C     | ESSENCE  |
| 97  | PURESH ANTI OXIDANT CONCENTRATION - RESVERATROL       | ESSENCE  |
| 98  | PURESH ANTI OXIDANT CONCENTRATION - RETINOL           | ESSENCE  |
| 99  | PURESH ANTI POLLUTION BODY CLEANSER                   | CLEANSER |
| 100 | PURESH ANTI POLLUTION BODY MOISTURIZER                | LOTION   |
| 101 | PURESH ANTI POLLUTION CLEANSING FOAM                  | CLEANSER |
| 102 | PURESH ANTI POLLUTION CREAM                           | CREAM    |
| 103 | PURESH ANTI POLLUTION ESSENCE                         | ESSENCE  |
| 104 | PURESH ANTI POLLUTION HAIR SHAMPOO                    | SHAMPOO  |
| 105 | PURESH ANTI POLLUTION MASK                            | MASK     |
| 106 | PURESH ANTI POLLUTION MIST                            | MIST     |
| 107 | PURESH ANTI POLLUTION MOISTURIZER                     | EMULSION |
| 108 | PURESH BODY MIST (EAU DE TOILETTE)                    | PERFUME  |
| 109 | PURESH CENTELLA ASATICA 80 MIST                       | MIST     |
| 110 | PURESH LUBRICANT                                      | GEL      |
| 111 | PURESH MAKEUP CLEANSING GEL                           | CLEANSER |
| 112 | PURESH MILD BABY DIAPER CREAM                         | CREAM    |
| 113 | PURESH MILD BABY LOTION                               | EMULSION |
| 114 | PURESH MILD BABY SHAMPOO & BODYWASH                   | CLEANSER |
| 115 | PURESH MILD BUBBLE CLEANSER                           | CLEANSER |

② 식물 소재 : ddL-AC-Complex 포함 8종

|   |   |              |
|---|---|--------------|
| 1 | DDLC DDL-AC-COMPLEX                       | RAW MATERIAL |
| 2 | DDLC DDL-CAMELLIA SINENSIS LEAF EXTRACT   | RAW MATERIAL |
| 3 | DDLC DDL-MAGNOLIA OFFICIALIS BARK EXTRACT | RAW MATERIAL |
| 4 | DDLC DDL-CENTELLA ASIATICA EXTRACT        | RAW MATERIAL |
| 5 | DDLC DDL-MTIC SYSTEM                      | RAW MATERIAL |
| 6 | DDLC DDL-MULTI-CORP SYSTEM                | RAW MATERIAL |
| 7 | DDLC DDL-NPC COMPLEX                      | RAW MATERIAL |
| 8 | DDLC DDL-PORTULACA EXTRACT                | RAW MATERIAL |

- ③ 할랄 인증서  
① 회사 인증




## شهادة الحلال الطيب Halal en Tayyiben Certificate Helal ve Tayyib Sertifika

هذه الشهادة تفيد بأن قائمة المنتجات المذكورة أدناه قد استوفت شروط الحلال الطيب وفقاً للإسلام  
*GIMDES Halal en Tayyiben Products Research Institute of Turkey Hereby certifies that the products listed below have met the Halal requirements in accordance with Islam*  
*GIMDES telah menyetujui dan mengesahkan bahwa produk - produk yang tertera di bawah ini telah memenuhi persyaratan Halal menurut hukum Islam*  
 Bu belge ile aşağıda belirtilen ürünlerin İslam dinine göre Helal ve Tayyib şartları sağladığı GIMDES tarafından onaylanmaktadır.

التاريخ /Date /Tarih: **23 APRIL 2018**      رقم الشهادة /Certificate No /Sertifika No  
 تاريخ انتهاء الصلاحية /Valid Until      **500-754-04-18**  
 Son Geçerlilik Tarihi

اسم وعنوان الشركة: **DAEDUCK LAB. CO., LTD.**  
 Company Name & Adress (305-500), JNH BUILDING, 125-11 TECHNO 2-RO, YUSEONG-GU  
 Firma Ünvanı & Adresi DAEJEON - KOREA

مكان الإنتاج: (305-500), JNH BUILDING, 125-11 TECHNO 2-RO, YUSEONG-GU  
 Manufactured at DAEJEON - KOREA  
 Üretildiği yer

أسماء المنتجات: **Certificated Products are in Halal Certificate Supplements**  
 Name of Product(s)      (8 Pages)  
 Ürün İsimleri

شعار التغليف  
 Packaging Logo  
 Ambalaj Logosu

التوقيع: Dr. Majed ALHARIRI      Dr. Hüseyin K. BÜYÜKÖZER  
 Signature        
 Yetkili İmza      



HANAFI | HANBALI | SHAFII | MALIKI

㉠ 화장품 인증

• 23건



The certificate is framed by an ornate golden border. At the top center is the logo of the Association for the Inspection and Certification of 1500 AAO Jeddah, featuring a green and orange circular emblem with Arabic text. To the right is a blue circular seal with Arabic text. The main title is written in Arabic, English, and Turkish: 'شهادة الحلال الطيب', 'Halal and Tayyib Certificate', and 'Helal ve Tayyib Sertifika'. The certificate number is 500-754-04-18, with a supplement of 1/8. The date of issue is 23 APRIL 2018, and the validity period ends on 23 APRIL 2020. The certifier is DAEDUCK LAB. CO., LTD., located at 305-500, JNH BUILDING, 125-11 TECHNO 2-RO, YUSEONG-GU, DAEJEON - KOREA. The products listed include various Puresh brands such as Puresh Aloe Soothing Gel, Puresh Anti Oxidant Concentration (with Astaxanthin, Co-enzyme Q10, Pure Vitamin C, and Resveratrol), Puresh Anti Pollution Body Cleanser, Puresh Anti Pollution Body Moisturizer, Puresh Anti Pollution Cleansing Foam, Puresh Anti Pollution Cream, Puresh Anti Pollution Essence, Puresh Anti Pollution Hair Shampoo, Puresh Anti Pollution Mask, Puresh Anti Pollution Mist, Puresh Anti Pollution Moisturizer, Puresh Body Mist (Eau de Toilette), Puresh Centella Asiatica 80 Mist, Puresh Lubricant, Puresh Makeup Cleansing Gel, Puresh Mild Baby Diaper Cream, Puresh Mild Baby Lotion, Puresh Mild Baby Shampoo & Body Wash, and Puresh Mild Bubble Cleanser. The certificate is signed by Dr. Majed Alhariri and Dr. Hüseyin K. Beykozler. At the bottom, there are logos for HANAFT, HANBALI, SHAFII, and MALIKI, along with a circular seal for GIMDES (Gıda İslamî Müessesesi) with the number 500-754.

Association for the Inspection and Certification of 1500 AAO Jeddah

شهادة الحلال الطيب  
*Halal and Tayyib Certificate*  
Helal ve Tayyib Sertifika

رقم الشهادة / Certificate No / Sertifika No: 500-754-04-18  
Supplement: 1/8

التاريخ / Date / Tarih: 23 APRIL 2018  
تاريخ انتهاء الصلاحية / Valid Until / Son Geçerlilik Tarihi: 23 APRIL 2020

اسم وعنوان الشركة / Company Name & Adress (305-500), JNH BUILDING, 125-11 TECHNO 2-RO, YUSEONG-GU  
Firma Ünvanı & Adresi DAEJEON - KOREA

أسماء المنتجات / Name of Product(s): **PURESH TRADEMARKED PRODUCTS**

Ürün İsimleri

PURESH ALOE SOOTHING GEL  
PURESH ANTI OXIDANT CONCENTRATION - ASTAXANTHIN  
PURESH ANTI OXIDANT CONCENTRATION - CO-ENZYME Q10  
PURESH ANTI OXIDANT CONCENTRATION - PURE VITAMIN C  
PURESH ANTI OXIDANT CONCENTRATION - RESVERATROL  
PURESH ANTI OXIDANT CONCENTRATION - RETINOL  
PURESH ANTI POLLUTION BODY CLEANSER  
PURESH ANTI POLLUTION BODY MOISTURIZER  
PURESH ANTI POLLUTION CLEANSING FOAM  
PURESH ANTI POLLUTION CREAM  
PURESH ANTI POLLUTION ESSENCE  
PURESH ANTI POLLUTION HAIR SHAMPOO  
PURESH ANTI POLLUTION MASK  
PURESH ANTI POLLUTION MIST  
PURESH ANTI POLLUTION MOISTURIZER  
PURESH BODY MIST (EAU DE TOILETTE)  
PURESH CENTELLA ASATICA 80 MIST  
PURESH LUBRICANT  
PURESH MAKEUP CLEANSING GEL  
PURESH MILD BABY DIAPER CREAM  
PURESH MILD BABY LOTION  
PURESH MILD BABY SHAMPOO & BODY WASH  
PURESH MILD BUBBLE CLEANSER

شعار التغليف / Packaging Logo / Ambalaj Logosu

التوقيع / Signature / Yetkili İmza: Dr. Majed ALHARIRI  
Dr. Hüseyin K. BEYKOZLER

HANAFT | HANBALI | SHAFII | MALIKI



  
**شهادة الحلال الطيب**  
**Halal en Tayyiben Certificate**  
**Helal ve Tayyib Sertifika**



التاريخ /Date /Tarih: **23 APRIL 2018**  
تاريخ انتهاء الصلاحية /Valid Until: **23 APRIL 2020**  
Son Geçerlilik Tarihi: **23 APRIL 2020**

رقم الشهادة /Certificate No /Sertifika No: **500-754-04-18**  
Supplement: **2/8**

اسم وعنوان الشركة: **DAEDUCK LAB. CO., LTD.**  
Company Name & Adress (305-500), JNH BUILDING, 125-11 TECHNO 2-RO, YUSEONG-GU  
Firma Ünvanı & Adresi **DAEJEON - KOREA**

أسماء المنتجات: **PURESH TRADEMARKED PRODUCTS**  
Name of Product(s): **PURESH MISCELLA CLEANSING WATER**  
Ürün İsimleri: **PURESH PREGNA CARE ANTI STRETCHMARK BODY OIL (Pregna Care Body Massage Oil)**  
**PURESH PREGNA CARE BODY CLEANSER**  
**PURESH PREGNA CARE BODY MOISTURIZER**  
**PURESH PREGNA CARE FOAM CLEANSER**  
**PURESH PREGNA CARE HAIR SHAMPOO**  
**PURESH PREGNA CARE INNER CLEANSER**  
**PURESH 2-LAYER BODY LOTION**  
**PURESH ANTI WRINKLE TONER(H)**  
**PURESH ANTI OXIDANT CONCENTRATION-IDEBENONE**  
**PURESH ANTI WRINKLE BIO CELL MASK**  
**PURESH ANTI WRINKLE CREAM (H)**  
**PURESH ANTI WRINKLE CREAM (M)**  
**PURESH ANTI WRINKLE EMULSION**  
**PURESH ANTI WRINKLE ESSENCE**  
**PURESH ANTI WRINKLE EYE CREAM**  
**PURESH ANTI WRINKLE TONER(M)**  
**PURESH CE FERULIC ESSENCE**  
**PURESH GOLD CREAM**  
**PURESH GOLD ESSENCE**  
**PURESH GOLD EYE CREAM**  
**PURESH MILD BABY CERAMIDE LOTION**

شعار التغليف  
Packaging Logo  
Ambalaj Logosu

التوقيع: Dr. Majed ALHARIRI  
Signature  
Yetkili İmza

Dr. Hüseyin K. BÜYÜKÖZER




HANAFI | HANBALI | SHAFII | MALIKI



  
شهادة الحلال الطيب  
*Halal en Tayyiben Certificate*  
*Helal ve Tayyib Sertifika*



التاريخ /Date /Tarih: 23 APRIL 2018  
تاريخ انتهاء الصلاحية 23 APRIL 2020  
Valid Until  
Son Geçerlilik Tarihi

رقم الشهادة /Certificate No /Sertifika No  
500-754-04-18  
Supplement:3/8

اسم وعنوان الشركة: **DAEDUCK LAB. CO., LTD.**  
Company Name & Adress (305-500), JNH BUILDING, 125-11 TECHNO 2-RO, YUSEONG-GU  
Firma Ünvanı & Adresi DAEJEON - KOREA

أسماء المنتجات: **PURESH TRADEMARKED PRODUCTS**  
Name of Product(s) **PURESH MILD BABY SUN CREAM**  
Ürün İsimleri **PURESH MOISTURIZING ESSENCE**  
**PURESH MOISTURIZING BIO CELL MASK**  
**PURESH MOISTURIZING CREAM (H)**  
**PURESH MOISTURIZING CREAM (M)**  
**PURESH MOISTURIZING EMULSION**  
**PURESH MOISTURIZING EYE CREAM**  
**PURESH MOISTURIZING TONER (H)**  
**PURESH MOISTURIZING TONER (M)**  
**PURESH MULTI BALM**  
**PURESH OIL MIST**  
**PURESH PURE VITAMIN C ESSENCE**  
**PURESH SKIN PEELING EMULSION**  
**PURESH UV PROTECTOR SPF35 PA+++**  
**PURESH UV PROTECTOR SPF40 PA++**  
**PURESH VITAMIN C CREAM**  
**PURESH VITAMIN C ESSENCE**  
**PURESH WHITENING BIO CELL MASK**  
**PURESH WHITENING CREAM (H)**  
**PURESH WHITENING CREAM (M)**

شعار التغليف  
Packaging Logo  
Ambalaj Logosu

التوقيع: Dr. Majed ALHARIRI  
Signature  
Yetkili İmza

Dr. Hüseyin K. BÜYÜKÖZER





HANAFI | HANBALI | SHAFII | MALIKI





  
**شهادة الحلال الطيب**  
**Halal and Tayyib Certificate**  
**Helal ve Tayyib Sertifika**



رقم الشهادة / Certificate No / Sertifika No  
**500-754-04-18**  
Supplement: 5/8

التاريخ / Date / Tarihi: **23 APRIL 2018**  
تاريخ انتهاء الصلاحية: **23 APRIL 2020**  
Valid Until  
Son Geçerlilik Tarihi

اسم وعنوان الشركة: **DAEDUCK LAB. CO., LTD.**  
Company Name & Address (305-500), JNH BUILDING, 125-11 TECHNO 2-RO, YUSEONG-GU  
Firma Ünvanı & Adresi **DAEJEON - KOREA**

أسماء المنتجات: **DESSERT TABLE H TRADEMARKED PRODUCTS**  
Name of Product(s):  
Ürün İsimleri

DESSERT TABLE H BIOLABEL MIST RECIPE PREMIUM (FOR DAY TIME)  
DESSERT TABLE H BIOLABEL MIST RECIPE PREMIUM (FOR NIGHT TIME)  
DESSERT TABLE H BIOLABEL ALL-IN-ONE MASK  
DESSERT TABLE H BIOLABEL ANTI-AGING EYE CREAM RECIPE  
DESSERT TABLE H BIOLABEL ANTI-AGING MASK  
DESSERT TABLE H BIOLABEL BB CREAM RECIPE I  
DESSERT TABLE H BIOLABEL BB CREAM RECIPE II  
DESSERT TABLE H BIOLABEL CLEANSING RECIPE  
DESSERT TABLE H BIOLABEL CREAM RECIPE I  
DESSERT TABLE H BIOLABEL CREAM RECIPE II  
DESSERT TABLE H BIOLABEL LIP CARE BALM RECIPE  
DESSERT TABLE H BIOLABEL LOTION RECIPE I  
DESSERT TABLE H BIOLABEL LOTION RECIPE II  
DESSERT TABLE H BIOLABEL MOISTURIZING MASK  
DESSERT TABLE H BIOLABEL SHAMPOO RECIPE  
DESSERT TABLE H BIOLABEL SOOTHING MASK  
DESSERT TABLE H BIOLABEL SUN SCREEN RECIPE  
DESSERT TABLE H BIOLABEL SUPER SERUM RECIPE I  
DESSERT TABLE H BIOLABEL SUPER SERUM RECIPE II  
DESSERT TABLE H BIOLABEL TONER RECIPE I  
DESSERT TABLE H BIOLABEL TONER RECIPE II  
DESSERT TABLE H BIOLABEL WHITENING MASK  
DESSERT TABLE H BIOLABEL MIST RECIPE (DRY SKIN TYPE)  
DESSERT TABLE H BIOLABEL MIST RECIPE (OILY SKIN TYPE)

شعار التغليف  
Packaging Logo  
Ambalaj Logosu

التوقيع: **Dr. Majed ALHARIRI**  
Signature  
Yetkili İmza

**Dr. Hüseyin K. BÜNKÖZER**






HANAFI | HANBALI | SHAFII | MALIKI





- Ⓢ 화장품 원료 인증  
• 8건



(3) 국내 농산자원 화장품용 원료의 ICID 등재

① ddL-MTIC System



March 12, 2018

In reference to the INCI application noted above, the International Cosmetic Ingredient Nomenclature Committee (INC) has completed its review of your request. The INCI name assigned to the trade name identified in this application is detailed on the attachment.

Please note, the attachment lists information from your application as it appears in our data base and will be published in the *International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook*, the web-based Dictionary *w/INCI*, and the Council's *On-Line INFOBASE*. If your application indicates the trade name is "not for publication," it is noted on the attachment and the data will not be published.

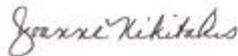
It is important to carefully check the attachment for accuracy and respond to our office promptly with any changes. The INCI name assignment and related company information will be retained in our data base unless we are notified that the product is no longer manufactured. You will be contacted on an approximate annual basis to update the current status of your company listings. This communication will include only trade names and addresses; therefore it is imperative that you maintain accurate records of all INCI name assignments.

To petition for a change in an INCI name assignment, a request to the INC can be sent via email to my attention. The petition should include the current INCI name, trade name, application number, requested revision, and technical rationale to support the petition, e.g., supporting composition information, and/or manufacturing details, and analytical data where appropriate.

In addition, please be advised that INCI names are continually reviewed by the INC for accuracy, and may be subject to change when deemed necessary.

Should you have any questions, please don't hesitate to contact me for further information.

Sincerely,



Joanne M. Nikitakis  
Director, Cosmetic Chemistry  
nikitakisj@personalcarecouncil.org  
Enclosure



March 12, 2018

**Application No. 2-01-2018-7405**

**Manufactured By:**

**Daeduck Lab Co., Ltd.**

125-11 Techno-2 ro, JNH Bldg, Yuseong-gu

Daejeon, 34024

KOREA (SOUTH)

**Trade Name:**

**ddL-MTIC System**

**Assigned INCI Name:**

Water (and) Butylene Glycol (and) Bidens Pilosa Extract (and) Ophiopogon Japonicus Root Extract (and) Prunus Domestica Fruit Extract (and) Ptychopetalum Olacoides Bark/Root Extract (and) Niacinamide

② ddL-Stellera Chamaejasme Extract



February 28, 2018

In reference to the INCI application noted above, the International Cosmetic Ingredient Nomenclature Committee (INC) has completed its review of your request. The INCI name assigned to the trade name identified in this application is detailed on the attachment.

Please note, the attachment lists information from your application as it appears in our data base and will be published in the *International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook*, the web-based Dictionary *w/INCI*, and the Council's *On-Line INFOBASE*. If your application indicates the trade name is "not for publication," it is noted on the attachment and the data will not be published.

It is important to carefully check the attachment for accuracy and respond to our office promptly with any changes. The INCI name assignment and related company information will be retained in our data base unless we are notified that the product is no longer manufactured. You will be contacted on an approximate annual basis to update the current status of your company listings. This communication will include only trade names and addresses; therefore it is imperative that you maintain accurate records of all INCI name assignments.

To petition for a change in an INCI name assignment, a request to the INC can be sent via email to my attention. The petition should include the current INCI name, trade name, application number, requested revision, and technical rationale to support the petition, e.g., supporting composition information, and/or manufacturing details, and analytical data where appropriate.

In addition, please be advised that INCI names are continually reviewed by the INC for accuracy, and may be subject to change when deemed necessary.

Should you have any questions, please don't hesitate to contact me for further information.

Sincerely,

A handwritten signature in cursive script that reads "Joanne M. Nikitakis".

Joanne M. Nikitakis  
Director, Cosmetic Chemistry  
nikitakisj@personalcarecouncil.org  
Enclosure



February 28, 2018

**Application No. 2-01-2018-7406**

**Manufactured By:**

Daeduck Lab. Co., Ltd.  
125-11 Techno-2 ro, JNH Bldg, Yuseong-gu  
Daejeon, 34024  
KOREA (SOUTH)

**Trade Name:**

ddL-Stellera Chamaejasme Extract

**Assigned INCI Name:**

Water (and) Butylene Glycol (and) Stellera Chamaejasme Flower/Leaf/Stem Extract

(4) KFDA 기능성 화장품 인증

① 인증 리스트

|    | 제품 명칭                       | 비고                            |
|----|-----------------------------|-------------------------------|
| 1  | 제이앤에이치할랄 브라이팅 에센스 스킨 (엠)    | 미백, 주름완화 2중 기능성화장품            |
| 2  | 제이앤에이치할랄 브라이팅 세럼            | 미백, 주름완화 2중 기능성화장품            |
| 3  | 제이앤에이치할랄 브라이팅 크림 (엠)        | 미백, 주름완화 2중 기능성화장품            |
| 4  | 제이앤에이치할랄 하이dra 에센스 스킨 (에이치) | 미백, 주름완화 2중 기능성화장품            |
| 5  | 제이앤에이치할랄 하이dra 세럼           | 미백, 주름완화 2중 기능성화장품            |
| 6  | 제이앤에이치할랄 하이dra 크림 (엠)       | 미백, 주름완화 2중 기능성화장품            |
| 7  | 퓨레시 유브이 프로텍터 SPF35 PA+++    | 자외선차단, 미백, 주름완화 3중 기능성<br>화장품 |
| 8  | 퓨레시 모이스처라이징 아이크림            | 주름완화 기능성 화장품                  |
| 9  | 퓨레시 모이스처라이징 크림 (엠)          | 미백, 주름완화 2중 기능성화장품            |
| 10 | 퓨레시 모이스처라이징 크림 (에이치)        | 미백, 주름완화 2중 기능성화장품            |
| 11 | 퓨레시 모이스처라이징 로션 (에이치)        | 미백, 주름완화 2중 기능성화장품            |
| 12 | 퓨레시 모이스처라이징 에센스             | 미백, 주름완화 2중 기능성화장품            |
| 13 | 플로디 트루 레모니아 브라이팅 마스크        | 미백 기능성 화장품                    |
| 14 | 플로디 트루 베리 안티링클 마스크          | 주름완화 기능성 화장품                  |
| 15 | 플로디 트루 내추럴 프레시 마스크          | 미백, 주름완화 2중 기능성화장품            |

② KFDA 인증서

① KFDA-1

[별지 제10호서식]

(앞면)

기능성화장품 심사 제외 품목 보고서 [제조]

|   |                         |                       |             |      |
|---|-------------------------|-----------------------|-------------|------|
| 제조판매업자  | 상 호                     | (주)대덕랩코               | 제조판매업등록번호   | 1138 |
|   | 제조소(원)                  |                       |             |      |
| 보 고 사 항   |                         |                       |             |      |
| 제 품 명   |                         | 제이엔에이치알칼하이드라크림영       |             |      |
| 효 능 · 효 과                                       |                         | 별첨                    |             |      |
| 용 법 · 용 량                                       |                         | 별첨                    |             |      |
| 사용상 주의 사항                                       |                         | 별첨                    |             |      |
| 효능·효과를 나타내는 원료의 종류 및 제형                         |                         | 알파-비사보롤·아데노신 크림제      |             |      |
| 효능·효과를 나타내게 하는 원료의 함량<br>(역제상태인 경우에는 농도)        |                         | 0.50 그램, 0.04 그램      |             |      |
| 제 품 의 pH  |                         | 6.0                   |             |      |
| 「화장품법 시행규칙」 제10조제1항 제1호의 기능성화장품                 | 고시한 기준 및 시험방법           | KFCC 알파-비사보롤·아데노신 크림제 |             |      |
|   | 효능·효과를 나타내게 하는 원료의 규격   | KFCC                  |             |      |
| 「화장품법 시행규칙」 제10조제1항 제2호의 기능성화장품                 | 이미 심사받은 품목의 제품명         |                       |             |      |
|   | 이미 심사받은 품목의 심사번호        | 자외선차단지수(SPF)          |             |      |
|   | 이미 심사받은 품목의 심사결과<br>통지일 | 자외선차단지수(PA)           |             |      |
|   | 활성물질용량                  |                       |             |      |
| 「화장품법」 제4조 및 같은 법 시행규칙 제10조제2항에 따라 위와 같이 보고합니다. |                         |                       |             |      |
| 2015년 10월 30일                                   |                         |                       |             |      |
| 보 고 인 전현표 (서명 또는 인)                             |                         |                       |             |      |
| 식품의약품안전처장 귀하                                    |                         |                       |             |      |
| 첨부서류 : 없음                                       |                         |                       | 수 수 료<br>없음 |      |

보고번호 : 2015014452

보고원료일 : 2015/10/30

| 기능성화장품 심사 제외 품목 보고서   |                       |                      |           | [제조]      |
|---|-----------------------|----------------------|-----------|-----------|
| 제조판매업자  | 상 호                   | (주)대익랩코              | 제조판매업등록번호 | 1138      |
|   | 제조소(원)                |                      |           |           |
| 보 고 사 항   |                       |                      |           |           |
| 제 품 명   |                       | 제어엔에이치활발브라이트닝세럼      |           |           |
| 효 능 · 효 과   |                       | 별첨                   |           |           |
| 용 법 · 용 량   |                       | 별첨                   |           |           |
| 사용상 주의사항  |                       | 별첨                   |           |           |
| 효능·효과를 나타내게 하는 원리의 종류   |                       | 별첨                   |           |           |
| 효능·효과를 나타내게 하는 원리의 함량<br>(액체상태인 경우에는 부피)  |                       | 별첨                   |           |           |
| 제 품 의 pH  |                       | 6.5                  |           |           |
| 「화장품법 시행규칙」 제10조제1항 제1호의 기능성화장품   | 고시한 기준 및 시험방법         | 알파-비사보롤 · 아미노신 로션제   |           |           |
|   | 효능·효과를 나타내게 하는 원리의 규격 | KFCC                 |           |           |
| 「화장품법 시행규칙」 제10조제1항제2호의 기능성화장품  | 이미 심사받은 품목의 제품명       |                      |           |           |
|   | 이미 심사받은 품목의 심사번호      | 이미 심사받은 품목의 심사결과 통지일 |           |           |
|   | 활성물질용량                |                      |           |           |
|   | 자외선차단지수(SPF)          | 자외선차단지수(PA)          | 내 수 성     |           |
| 「화장품법」 제4조 및 같은 법 시행규칙 제10조제2항에 따라 위와 같이 보고합니다.<br>2017년 09월 01일<br>보 고 인 전현표 (서명 또는 인)<br>식품의약품안전처장 귀하 |                       |                      |           |           |
| 구비서류 : 없음   |                       |                      |           | 수수료<br>없음 |

접수번호 : 2017017127

보고원료일 : 2017/09/01

| 기능성화장품 심사 제외 품목 보고서                             |                          |                      |           | [제조]      |
|---|--------------------------|----------------------|-----------|-----------|
| 제조판매<br>업자                                      | 상 호                      | (주)대익랩코              | 제조판매업등록번호 | 1138      |
|   | 성 명                      |                      |           |           |
|   | 소 재 지                    |                      |           |           |
| 제조소(원)  | 제조회사명                    |                      |           |           |
|   | 소 재 지                    |                      |           |           |
| 보 고 사 항   |                          |                      |           |           |
| 제 품 명   |                          | 제어엔에이치활발브라이트닝에센스스킨영  |           |           |
| 효 능 · 효 과                                       |                          | 별첨                   |           |           |
| 용 법 · 용 량                                       |                          | 별첨                   |           |           |
| 사용상 주의사항  |                          | 별첨                   |           |           |
| 효능·효과를 나타내게 하는 원리의 종류                           |                          | 별첨                   |           |           |
| 효능·효과를 나타내게 하는 원리의 함량<br>(액제상태인 경우에는 부피)        |                          | 별첨                   |           |           |
| 제 품 의 pH  |                          | 6.5                  |           |           |
| 「화장품법<br>시행규칙」<br>제10조제1항<br>제1호의<br>기능성화장품     | 고시한 기준 및 시험방법            | 나이아신아마이드·아데노신 역      |           |           |
|   | 효능·효과를 나타내게 하는<br>원리의 규격 | KFCC                 |           |           |
| 「화장품법시<br>행규칙」 제<br>10조제1항제<br>2호의기능성<br>화장품    | 이미 심사받은 품목의 제품명          |                      |           |           |
|   | 이미 심사받은 품목의 심사번호         | 이미 심사받은 품목의 심사결과 통지일 |           |           |
|   | 활성물질용량                   |                      |           |           |
|   | 자외선차단지수(SPF)             | 자외선차단지수(PA)          | 내 수 성     |           |
| 「화장품법」 제4조 및 같은 법 시행규칙 제10조제2항에 따라 위와 같이 보고합니다. |                          |                      |           |           |
| 2017년 09월 19일                                   |                          |                      |           |           |
| 보 고 인 전현표 (서명 또는 인)                             |                          |                      |           |           |
| 식품의약품안전처장 귀하                                    |                          |                      |           |           |
| 구비서류 : 없음                                       |                          |                      |           | 수수료<br>없음 |

접수번호 : 2017017105

보고원료일 : 2017/09/19

[별지 제10호서식]

(앞면)

기능성화장품 심사 제외 품목 보고서 [제조]

|   |                          |                         |              |      |
|---|--------------------------|-------------------------|--------------|------|
| 제조판매<br>업자  | 상 호                      | (주)대덕랩코                 | 제조판매업등록번호    | 1138 |
|   | 성 명                      |                         |              |      |
|   | 소 재 지                    |                         |              |      |
| 제조소(원)  | 제조회사명                    |                         |              |      |
|   | 소 재 지                    |                         |              |      |
| 보 고 사 항   |                          |                         |              |      |
| 제 품 명   |                          | 제이엔에이치할랄하이dra세럼         |              |      |
| 효 능 · 효 과   |                          | 별첨                      |              |      |
| 용 법 · 용 량   |                          | 별첨                      |              |      |
| 사용상 주의 사항   |                          | 별첨                      |              |      |
| 효능·효과를 나타내는 원료의 종류 및 제형   |                          | 알파-비사보롤 · 아데노신 로션제      |              |      |
| 효능·효과를 나타내게 하는 원료의 함량<br>(액체상태인 경우에는 농도)  |                          | 0.50 그램, 0.04 그램        |              |      |
| 제 품 의 pH  |                          | 6.0                     |              |      |
| 「화장품법<br>시행규칙」<br>제10조제1항<br>제1호의<br>기능성화장품   | 고시한 기준 및 시험방법            | KFCC 알파-비사보롤 · 아데노신 로션제 |              |      |
|   | 효능·효과를 나타내게 하는<br>원료의 규격 | KFCC                    |              |      |
| 「화장품법<br>시행규칙」<br>제10조제1항<br>제2호의<br>기능성화장품   | 이미 심사받은 품목의 제품명          |                         |              |      |
|   | 이미 심사받은 품목의 심사번호         |                         | 자외선차단지수(SPF) |      |
|   | 이미 심사받은 품목의 심사결과<br>통지일  |                         | 자외선차단지수(PA)  |      |
|   | 활성물질용량                   |                         |              |      |
| 「화장품법」 제4조 및 같은 법 시행규칙 제10조제2항에 따라 위와 같이 보고합니다.<br>2015년 10월 30일<br>보 고 인 전현표 (서명 또는 인) |                          |                         |              |      |
| 식품의약품안전처장 귀하  |                          |                         |              |      |
| 첨부서류 : 없음   |                          |                         | 수 수 료<br>없음  |      |

보고번호 : 2015014454

보고완료일 : 2015/10/30

[별지 제10호서식]

(앞면)

| 기능성화장품 심사 제외 품목 보고서 [제조]  |                       |                        |              |      |
|---|-----------------------|------------------------|--------------|------|
| 제조판매업자  | 상 호                   | (주)대덕랩코                | 제조판매업등록번호    | 1138 |
|   | 성 명                   |                        |              |      |
|   | 소 재 지                 |                        |              |      |
| 제조소(원)  | 제조회사명                 |                        |              |      |
|   | 소 재 지                 |                        |              |      |
| 보 고 사 항   |                       |                        |              |      |
| 제 품 명   |                       | 제이앤에이치할랄하이드라에센스스킨에이치   |              |      |
| 효 능 · 효 과   |                       | 별첨                     |              |      |
| 용 법 · 용 량   |                       | 별첨                     |              |      |
| 사 용 상 주의 사 항  |                       | 별첨                     |              |      |
| 효능·효과를 나타내는 원료의 종류 및 제형   |                       | 알파-비사보롤 · 아데노신 역제      |              |      |
| 효능·효과를 나타내게 하는 원료의 함량<br>(액체상태인 경우에는 농도)  |                       | 0.50 그램, 0.04 그램       |              |      |
| 제 품 의 pH  |                       | 5.5                    |              |      |
| 「화장품법 시행규칙」 제10조제1항 제1호의 기능성화장품   | 고시한 기준 및 시험방법         | KFCC 알파-비사보롤 · 아데노신 역제 |              |      |
|   | 효능·효과를 나타내게 하는 원료의 규격 | KFCC                   |              |      |
| 「화장품법 시행규칙」 제10조제1항 제2호의 기능성화장품   | 이미 심사받은 품목의 제품명       |                        |              |      |
|   | 이미 심사받은 품목의 심사번호      |                        | 자외선차단지수(SPF) |      |
|   | 이미 심사받은 품목의 심사결과 통지일  |                        | 자외선차단지수(PA)  |      |
|   | 활성물질용량                |                        |              |      |
| <p>「화장품법」 제4조 및 같은 법 시행규칙 제10조제2항에 따라 위와 같이 보고합니다.</p> <p style="text-align: right;">2015년 10월 30일</p> <p style="text-align: center;">보 고 인    전현표    (서명 또는 인)</p> |                       |                        |              |      |
| 식품의약품안전처장 귀하  |                       |                        |              |      |
| 첨부서류 : 없음   |                       |                        | 수 수 료<br>없음  |      |

보고번호 : 2015014451

보고관료일 : 2015/10/30

| 기능성화장품 심사 제외 품목 보고서                             |                       |                      |                 | [제조]      |
|---|-----------------------|----------------------|-----------------|-----------|
| 제조판매업자  | 상 호                   | (주)대덕랩코              | 제조판매업등록번호       | 1138      |
|   | 성 명                   |                      |                 |           |
|   | 소 재 지                 |                      |                 |           |
| 제조소(원)  | 제조회사명                 |                      |                 |           |
|   | 소 재 지                 | --                   |                 |           |
| 보 고 사 항   |                       |                      |                 |           |
| 제 품 명   |                       |                      | 퓨레시오이스치라이징크림에이치 |           |
| 효 능 · 효 과                                       |                       |                      | 별첨              |           |
| 용 법 · 용 량                                       |                       |                      | 별첨              |           |
| 사용상 주의 사항                                       |                       |                      | 별첨              |           |
| 효능·효과를 나타내게 하는 원료의 종류                           |                       |                      | 별첨              |           |
| 효능·효과를 나타내게 하는 원료의 함량<br>(액제상태인 경우에는 농도)        |                       |                      | 별첨              |           |
| 제 품 의 pH  |                       |                      | 6.5             |           |
| 「화장품법 시행규칙」 제10조제1항 제1호의 기능성화장품                 | 고시한 기준 및 시험방법         | 나이아신아마이드 · 아데노신 크림   |                 |           |
|   | 효능·효과를 나타내게 하는 원료의 규격 | KFCC                 |                 |           |
| 「화장품법 시행규칙」 제10조제1항제2호의 기능성화장품                  | 이미 심사받은 품목의 제품명       |                      |                 |           |
|   | 이미 심사받은 품목의 심사번호      | 이미 심사받은 품목의 심사결과 통지일 |                 |           |
|   | 활성물질용량                |                      |                 |           |
|   | 자외선차단지수(SPF)          | 자외선차단지수(PA)          | 내 수 성           |           |
| 「화장품법」 제4조 및 같은 법 시행규칙 제10조제2항에 따라 위와 같이 보고합니다. |                       |                      |                 |           |
| 2017년 12월 21일                                   |                       |                      |                 |           |
| 보 고 인 전현표 (서명 또는 인)                             |                       |                      |                 |           |
| 식품의약품안전처장 귀하                                    |                       |                      |                 |           |
| 구비서류 : 없음                                       |                       |                      |                 | 수수료<br>없음 |

접수번호 : 2017025505

보고원료일 : 2017/12/21

| 기능성화장품 심사 제외 품목 보고서                             |                       |                      |           | [제조]      |
|---|-----------------------|----------------------|-----------|-----------|
| 제조판매업자  | 상 호                   | (주)대덕랩코              | 제조판매업등록번호 | 1138      |
|   | 성 명                   |                      |           |           |
|   | 소 재 지                 |                      |           |           |
| 제조소(원)  | 제조회사명                 |                      |           |           |
|   | 소 재 지                 | --                   |           |           |
| 보 고 사 항   |                       |                      |           |           |
| 제 품 명   |                       | 퓨레시오이스치라이징크림형        |           |           |
| 효 능 · 효 과                                       |                       | 별첨                   |           |           |
| 용 법 · 용 량                                       |                       | 별첨                   |           |           |
| 사용상 주의 사항                                       |                       | 별첨                   |           |           |
| 효능·효과를 나타내게 하는 원료의 종류                           |                       | 별첨                   |           |           |
| 효능·효과를 나타내게 하는 원료의 함량<br>(액제상태인 경우에는 농도)        |                       | 별첨                   |           |           |
| 제 품 의 pH  |                       | 5.9                  |           |           |
| 「화장품법 시행규칙」 제10조제1항 제1호의 기능성화장품                 | 고시한 기준 및 시험방법         | 나이아신아마이드 · 아데노신 크림   |           |           |
|   | 효능·효과를 나타내게 하는 원료의 규격 | KFCC                 |           |           |
| 「화장품법 시행규칙」 제10조제1항제2호의 기능성화장품                  | 이미 심사받은 품목의 제품명       |                      |           |           |
|   | 이미 심사받은 품목의 심사번호      | 이미 심사받은 품목의 심사결과 통지일 |           |           |
|   | 활성물질용량                |                      |           |           |
|   | 자외선차단지수(SPF)          | 자외선차단지수(PA)          | 내 수 성     |           |
| 「화장품법」 제4조 및 같은 법 시행규칙 제10조제2항에 따라 위와 같이 보고합니다. |                       |                      |           |           |
| 2017년 11월 30일                                   |                       |                      |           |           |
| 보 고 인 전현표 (서명 또는 인)                             |                       |                      |           |           |
| 식품의약품안전처장 귀하                                    |                       |                      |           |           |
| 구비서류 : 없음                                       |                       |                      |           | 수수료<br>없음 |

접수번호 : 2017024266

보고원료일 : 2017/11/30

| 기능성화장품 심사 제외 품목 보고서                             |                       |         |                  |                      |       | [제조]       |
|---|-----------------------|---------|------------------|----------------------|-------|------------|
| 제조판매업자  | 상 호                   | (주)대익랩코 |                  | 제조판매업등록번호            | 1138  |            |
|   | 성 명                   |         |                  |                      |       |            |
|   | 소 재 지                 |         |                  |                      |       |            |
| 제조소(원)  | 제조회사명                 |         |                  |                      |       |            |
|   | 소 재 지                 |         |                  |                      |       |            |
| 보 고 사 항   |                       |         |                  |                      |       |            |
| 제 품 명   |                       |         | 퓨레시유브아프로락틴       |                      |       |            |
| 효 능 · 효 과                                       |                       |         | 별첨               |                      |       |            |
| 용 법 · 용 량                                       |                       |         | 별첨               |                      |       |            |
| 사 용 상 주의 사항                                     |                       |         | 별첨               |                      |       |            |
| 효능·효과를 나타내게 하는 원료의 종류                           |                       |         | 별첨               |                      |       |            |
| 효능·효과를 나타내게 하는 원료의 함량<br>(액제상태인 경우에는 농도)        |                       |         | 별첨               |                      |       |            |
| 제 품 의 pH  |                       |         | 6.9              |                      |       |            |
| 「화장품법 시행규칙」 제10조제1항제1호의 기능성화장품                  | 고시한 기준 및 시험방법         |         |                  |                      |       |            |
|   | 효능·효과를 나타내게 하는 원료의 규격 |         |                  |                      |       |            |
| 「화장품법 시행규칙」 제10조제1항제2호의 기능성화장품                  | 이미 심사받은 품목의 제품명       |         | 퓨레시유브아프로락틴       |                      |       |            |
|   | 이미 심사받은 품목의 심사번호      |         | 7                | 이미 심사받은 품목의 심사결과 통지일 |       | 2016.09.20 |
|   | 활성물질용량                |         | 질크릭시이드로서 23.04그램 |                      |       |            |
|   | 자외선차단지수(SPF)          | 35      | 자외선차단지수(PA)      | +++                  | 내 수 성 | 없음         |
| 「화장품법」 제4조 및 같은 법 시행규칙 제10조제2항에 따라 위와 같이 보고합니다. |                       |         |                  |                      |       |            |
| 2017년 05월 15일                                   |                       |         |                  |                      |       |            |
| 보 고 인      전현표      (서명 또는 인)                   |                       |         |                  |                      |       |            |
| 식품의약품안전처장 귀하                                    |                       |         |                  |                      |       |            |
| 구비서류 : 없음                                       |                       |         |                  |                      |       | 수수료<br>없음  |

접수번호 : 2017006394

보고완료일 : 2017/05/15

| 기능성화장품 심사 제외 품목 보고서                             |                       |                      |           | [제조]      |
|---|-----------------------|----------------------|-----------|-----------|
| 제조판매업자  | 상 호                   | (주)대덕랩코              | 제조판매업등록번호 | 1138      |
|   | 성 명                   |                      |           |           |
|   | 소 재 지                 |                      |           |           |
| 제조소(원)  | 제조회사명                 |                      |           |           |
|   | 소 재 지                 | --                   |           |           |
| 보 고 사 항   |                       |                      |           |           |
| 제 품 명   |                       | 퓨레시오이스치라이장로션에이치      |           |           |
| 효 능 · 효 과                                       |                       | 별첨                   |           |           |
| 용 법 · 용 량                                       |                       | 별첨                   |           |           |
| 사용상 주의 사항                                       |                       | 별첨                   |           |           |
| 효능·효과를 나타내게 하는 원료의 종류                           |                       | 별첨                   |           |           |
| 효능·효과를 나타내게 하는 원료의 함량<br>(액제상태인 경우에는 농도)        |                       | 별첨                   |           |           |
| 제 품 의 pH  |                       | 6.5                  |           |           |
| 「화장품법 시행규칙」 제10조제1항 제1호의 기능성화장품                 | 고시한 기준 및 시험방법         | 나이아신아마이드 · 아데노신 역    |           |           |
|   | 효능·효과를 나타내게 하는 원료의 규격 | KFCC                 |           |           |
| 「화장품법 시행규칙」 제10조제1항제2호의 기능성화장품                  | 이미 심사받은 품목의 제품명       |                      |           |           |
|   | 이미 심사받은 품목의 심사번호      | 이미 심사받은 품목의 심사결과 통지일 |           |           |
|   | 활성물질용량                |                      |           |           |
|   | 자외선차단지수(SPF)          | 자외선차단지수(PA)          | 내 수 성     |           |
| 「화장품법」 제4조 및 같은 법 시행규칙 제10조제2항에 따라 위와 같이 보고합니다. |                       |                      |           |           |
| 2017년 11월 30일                                   |                       |                      |           |           |
| 보 고 인      전현표      (서명 또는 인)                   |                       |                      |           |           |
| 식품의약품안전처장 귀하                                    |                       |                      |           |           |
| 구비서류 : 없음                                       |                       |                      |           | 수수료<br>없음 |

접수번호 : 2017024280

보고원료일 : 2017/11/30

[별지 제10호서식]

(앞면)

**기능성화장품 심사 제의 품목 보고서 [제조]**

|  |                         |                |              |      |
|--|-------------------------|----------------|--------------|------|
| 상 호  |                         | (주)대덕업코        | 제조판매업등록번호    | 1138 |
| 제조판매업자   | 성 명                     |                |              |      |
|  | 소 재 지                   |                |              |      |
| 제조소(원)   | 제조회사명                   |                |              |      |
|  | 소 재 지                   |                |              |      |
| <b>보 고 사 항</b>   |                         |                |              |      |
| 제 품 명  |                         | 퓨레시모이스처라이징아이크림 |              |      |
| 효 능 · 효 과  |                         | 별첨             |              |      |
| 용 법 · 용 량  |                         | 별첨             |              |      |
| 사 용 상 주의 사 항   |                         | 별첨             |              |      |
| 효능·효과를 나타내는 원료의 종류 및 제형  |                         | 아데노신 크림제       |              |      |
| 효능·효과를 나타내게 하는 원료의 함량<br>(액체상태인 경우에는 농도)   |                         | 0.04 그램        |              |      |
| 제 품 의 pH   |                         | 6              |              |      |
| 「화장품법 시행규칙」 제10조제1항 제1호의 기능성화장품  | 고시한 기준 및 시험방법           | KFCC 아데노신 크림제  |              |      |
|  | 효능·효과를 나타내게 하는 원료의 규격   | KFCC           |              |      |
| 「화장품법 시행규칙」 제10조제1항 제2호의 기능성화장품  | 이미 심사받은 품목의 제품명         |                |              |      |
|  | 이미 심사받은 품목의 심사번호        |                | 자외선차단지수(SPF) |      |
|  | 이미 심사받은 품목의 심사결과<br>통지일 |                | 자외선차단지수(PA)  |      |
|  | 활성물질용량                  |                |              |      |
| <p>「화장품법」 제4조 및 같은 법 시행규칙 제10조제2항에 따라 위와 같이 보고합니다.</p> <p>2015년 11월 06일</p> <p>보 고 인      전현표      (서명 또는 인)</p> |                         |                |              |      |
| <b>식품의약품안전처장 귀하</b>  |                         |                |              |      |
| 첨부서류 : 없음  |                         |                | 수 수 료<br>없음  |      |

보고번호 : 2015014689

보고원료일 : 2015/11/06

| 기능성화장품 심사 제외 품목 보고서                             |                       |                      |               | [제조]      |
|---|-----------------------|----------------------|---------------|-----------|
| 제조판매업자  | 상 호                   | (주)대덕랩코              | 제조판매업등록번호     | 1138      |
|   | 성 명                   |                      |               |           |
|   | 소 재 지                 |                      |               |           |
| 제조소(원)  | 제조회사명                 |                      |               |           |
|   | 소 재 지                 | --                   |               |           |
| 보 고 사 항   |                       |                      |               |           |
| 제 품 명   |                       |                      | 퓨레시오이스치라이징에센스 |           |
| 효 능 · 효 과                                       |                       |                      | 별첨            |           |
| 용 법 · 용 량                                       |                       |                      | 별첨            |           |
| 사용상 주의 사항                                       |                       |                      | 별첨            |           |
| 효능·효과를 나타내게 하는 원료의 종류                           |                       |                      | 별첨            |           |
| 효능·효과를 나타내게 하는 원료의 함량<br>(액제상태인 경우에는 농도)        |                       |                      | 별첨            |           |
| 제 품 의 pH  |                       |                      | 6.7           |           |
| 「화장품법 시행규칙」 제10조제1항 제1호의 기능성화장품                 | 고시한 기준 및 시험방법         | 나이아신아마이드 · 아데노신 로션   |               |           |
|   | 효능·효과를 나타내게 하는 원료의 규격 | KFCC                 |               |           |
| 「화장품법 시행규칙」 제10조제1항제2호의 기능성화장품                  | 이미 심사받은 품목의 제품명       |                      |               |           |
|   | 이미 심사받은 품목의 심사번호      | 이미 심사받은 품목의 심사결과 통지일 |               |           |
|   | 활성물질용량                |                      |               |           |
|   | 자외선차단지수(SPF)          | 자외선차단지수(PA)          | 내 수 성         |           |
| 「화장품법」 제4조 및 같은 법 시행규칙 제10조제2항에 따라 위와 같이 보고합니다. |                       |                      |               |           |
| 2017년 11월 30일                                   |                       |                      |               |           |
| 보 고 인 전현표 (서명 또는 인)                             |                       |                      |               |           |
| 식품의약품안전처장 귀하                                    |                       |                      |               |           |
| 구비서류 : 없음                                       |                       |                      |               | 수수료<br>없음 |

접수번호 : 2017024282

보고원료일 : 2017/11/30

| 기능성화장품 심사 제외 품목 보고서                             |                          |         |                          |      | [제조]      |
|---|--------------------------|---------|--------------------------|------|-----------|
| 제조판매<br>업자                                      | 상 호                      | (주)대덕랩코 | 제조판매업등록번호                | 1138 |           |
|   | 성 명                      |         |                          |      |           |
| 제조소(원)  | 소 재 지                    |         |                          |      |           |
|   | 제조회사명                    |         |                          |      |           |
|   | 소 재 지                    |         |                          |      |           |
| 보 고 사 항   |                          |         |                          |      |           |
| 제 품 명   |                          |         | 블로디트루내추럴프레스시마스크          |      |           |
| 효 능 · 효 과                                       |                          |         | 별첨                       |      |           |
| 용 법 · 용 량                                       |                          |         | 별첨                       |      |           |
| 사 용 상 주의 사항                                     |                          |         | 별첨                       |      |           |
| 효능·효과를 나타내게 하는 원료의 종류                           |                          |         | 나이아신아마이드·아데노신 침적마스크      |      |           |
| 효능·효과를 나타내게 하는 원료의 함량<br>(역제상태인 경우에는 농도)        |                          |         | 2 그램, 0.04 그램            |      |           |
| 제 품 의 pH  |                          |         | 6.5                      |      |           |
| 「화장품법<br>시행규칙」<br>제10조제1항<br>제1호의<br>기능성화장품     | 고시한 기준 및 시험방법            |         | KFCC 나이아신아마이드·아데노신 침적마스크 |      |           |
|   | 효능·효과를 나타내게 하는<br>원료의 규격 |         | KFCC                     |      |           |
| 「화장품법시<br>행규칙」 제<br>10조제1항제<br>2호의기능성<br>화장품    | 이미 심사받은 품목의 제품명          |         |                          |      |           |
|   | 이미 심사받은 품목의 심사번호         |         | 이미 심사받은 품목의 심사결과 및 지일    |      |           |
|   | 활성물질용량                   |         |                          |      |           |
|   | 자외선차단지수(SPF)             |         | 자외선차단지수(PA)              |      | 내 수 성     |
| 「화장품법」 제4조 및 같은 법 시행규칙 제10조제2항에 따라 위와 같이 보고합니다. |                          |         |                          |      |           |
| 2016년 10월 04일                                   |                          |         |                          |      |           |
| 보 고 인      전현표      (서명 또는 인)                   |                          |         |                          |      |           |
| 식품의약품안전처장 귀하                                    |                          |         |                          |      |           |
| 구비서류 : 없음                                       |                          |         |                          |      | 수수료<br>없음 |

접수번호 : 2016013342

보고완료일 : 2016/10/04

| 기능성화장품 심사 제외 품목 보고서                             |                       |                      |           | [제조]      |
|---|-----------------------|----------------------|-----------|-----------|
| 제조판매업자  | 상 호                   | (주)대덕랩코              | 제조판매업등록번호 | 1138      |
|   | 성 명                   |                      |           |           |
|   | 소 재 지                 |                      |           |           |
| 제조소(원)  | 제조회사명                 |                      |           |           |
|   | 소 재 지                 |                      |           |           |
| 보 고 사 항   |                       |                      |           |           |
| 제 품 명   |                       | 플로디트루레오니아브라이드닝마스크    |           |           |
| 효 능 · 효 과                                       |                       | 별첨                   |           |           |
| 용 법 · 용 량                                       |                       | 별첨                   |           |           |
| 사용상 주의 사항                                       |                       | 별첨                   |           |           |
| 효능·효과를 나타내게 하는 원료의 종류                           |                       | 나이아신아마이드 침적마스크       |           |           |
| 효능·효과를 나타내게 하는 원료의 함량<br>(액제상태인 경우에는 농도)        |                       | 2.00 그램              |           |           |
| 제 품 의 pH  |                       | 7                    |           |           |
| 「화장품법 시행규칙」 제10조제1항 제1호의 기능성화장품                 | 고시한 기준 및 시험방법         | KFCC 나이아신아마이드 침적마스크  |           |           |
|   | 효능·효과를 나타내게 하는 원료의 규격 | KFCC                 |           |           |
| 「화장품법 시행규칙」 제10조제1항제2호의기능성화장품                   | 이미 심사받은 품목의 제품명       |                      |           |           |
|   | 이미 심사받은 품목의 심사번호      | 이미 심사받은 품목의 심사결과 통지일 |           |           |
|   | 활성물질용량                |                      |           |           |
|   | 자외선차단지수(SPF)          | 자외선차단지수(PA)          | 내 수 성     |           |
| 「화장품법」 제4조 및 같은 법 시행규칙 제10조제2항에 따라 위와 같이 보고합니다. |                       |                      |           |           |
| 2016년 05월 19일                                   |                       |                      |           |           |
| 보 고 인 전현표 (서명 또는 인)                             |                       |                      |           |           |
| 식품의약품안전처장 귀하                                    |                       |                      |           |           |
| 구비서류 : 없음                                       |                       |                      |           | 수수료<br>없음 |

접수번호 : 2016006970

보고원료일 : 2016/05/19

| 기능성화장품 심사 제외 품목 보고서                             |                       |                      |           | [제조]      |
|---|-----------------------|----------------------|-----------|-----------|
| 제조판매업자  | 상 호                   | (주)대덕랩코              | 제조판매업등록번호 | 1138      |
|   | 성 명                   |                      |           |           |
|   | 소 재 지                 |                      |           |           |
| 제조소(원)  | 제조회사명                 |                      |           |           |
|   | 소 재 지                 |                      |           |           |
| 보 고 사 항   |                       |                      |           |           |
| 제 품 명   |                       | 플로디트루베리안티원클림마스크      |           |           |
| 효 능 · 효 과                                       |                       | 별첨                   |           |           |
| 용 법 · 용 량                                       |                       | 별첨                   |           |           |
| 사용상 주의 사항                                       |                       | 별첨                   |           |           |
| 효능·효과를 나타내게 하는 원료의 종류                           |                       | 아데노신 침적마스크           |           |           |
| 효능·효과를 나타내게 하는 원료의 함량<br>(액제상태인 경우에는 농도)        |                       | 0.04 그램              |           |           |
| 제 품 의 pH  |                       | 7                    |           |           |
| 「화장품법 시행규칙」 제10조제1항 제1호의 기능성화장품                 | 고시한 기준 및 시험방법         | KFCC 아데노신 침적마스크      |           |           |
|   | 효능·효과를 나타내게 하는 원료의 규격 | KFCC                 |           |           |
| 「화장품법 시행규칙」 제10조제1항제2호의 기능성화장품                  | 이미 심사받은 품목의 제품명       |                      |           |           |
|   | 이미 심사받은 품목의 심사번호      | 이미 심사받은 품목의 심사결과 통지일 |           |           |
|   | 활성물질용량                |                      |           |           |
|   | 자외선차단지수(SPF)          | 자외선차단지수(PA)          | 내 수 성     |           |
| 「화장품법」 제4조 및 같은 법 시행규칙 제10조제2항에 따라 위와 같이 보고합니다. |                       |                      |           |           |
| 2016년 05월 19일                                   |                       |                      |           |           |
| 보 고 인 전현표 (서명 또는 인)                             |                       |                      |           |           |
| 식품의약품안전처장 귀하                                    |                       |                      |           |           |
| 구비서류 : 없음                                       |                       |                      |           | 수수료<br>없음 |

접수번호 : 2016006975

보고완료일 : 2016/05/19

| <b>기능성화장품 심사 제외 품목 보고서</b>                      |                       |                      |           | [제조]      |
|---|-----------------------|----------------------|-----------|-----------|
| 제조판매업자  | 상 호                   | (주)대익테크              | 제조판매업등록번호 | 1138      |
|   | 성 명                   |                      |           |           |
|   | 소 재 지                 |                      |           |           |
| 제조소(원)  | 제조회사명                 |                      |           |           |
|   | 소 재 지                 |                      |           |           |
| <b>보 고 사 항</b>                                  |                       |                      |           |           |
| 제 품 명   |                       | 제이엔에이치활활브라이드닝크림용     |           |           |
| 효 능 · 효 과                                       |                       | 말청                   |           |           |
| 용 법 · 용 량                                       |                       | 말청                   |           |           |
| 사용상 주의 사항                                       |                       | 말청                   |           |           |
| 효능·효과를 나타내게 하는 원료의 종류                           |                       | 말청                   |           |           |
| 효능·효과를 나타내게 하는 원료의 함량<br>(액제상태인 경우에는 농도)        |                       | 말청                   |           |           |
| 제 품 의 pH  |                       | 6.0                  |           |           |
| 「화장품법 시행규칙」 제10조제1항 제1호의 기능성화장품                 | 고사한 기준 및 시험방법         | 알파-비사보롤 · 아미노산 크림제   |           |           |
|   | 효능·효과를 나타내게 하는 원료의 규격 | KFCC                 |           |           |
| 「화장품법 시행규칙」 제10조제1항제2호의 기능성화장품                  | 이미 심사받은 품목의 제품명       |                      |           |           |
|   | 이미 심사받은 품목의 심사번호      | 이미 심사받은 품목의 심사결과 통지일 |           |           |
|   | 활성물질용량                |                      |           |           |
|   | 자외선차단지수(SPF)          | 자외선차단지수(PA)          | 내 수 성     |           |
| 「화장품법」 제4조 및 같은 법 시행규칙 제10조제2항에 따라 위와 같이 보고합니다. |                       |                      |           |           |
| 2017년 09월 19일                                   |                       |                      |           |           |
| 보 고 인      전현표      (서명 또는 인)                   |                       |                      |           |           |
| <b>식품의약품안전처장 귀하</b>                             |                       |                      |           |           |
| 구비서류 : 없음                                       |                       |                      |           | 수수료<br>없음 |

접수번호 : 2017018415

보고완료일 : 2017/09/19

(5) 추출물 개발 장비 및 Pilot test 설비 구축



(6) 사업화 성과 및 매출 실적

① 사업화 성과

| 항목        | 세부항목  |       |                        | 성과                         |    |
|-----------|-------|-------|------------------------|----------------------------|----|
| 사업화<br>성과 | 매출액   | 개발 제품 | 개발 후 현재까지              | 2.2 억원                     |    |
|           |       |       | 향후 3년간 매출              | 55 억원                      |    |
|           |       | 관련 제품 | 개발 후 현재까지              | 0.2 억원                     |    |
|           |       |       | 향후 3년간 매출              | 200 억원                     |    |
|           | 시장점유율 | 개발 제품 | 개발 후 현재까지              | 국내 : 13 %<br>국외 : 87 %     |    |
|           |       |       | 향후 3년간 매출              | 국내 : 20 %<br>국외 : 80 %     |    |
|           |       | 관련 제품 | 개발 후 현재까지              | 국내 : 0.01 %<br>국외 : 0.01 % |    |
|           |       |       | 향후 3년간 매출              | 국내 : 0.2 %<br>국외 : 1.0 %   |    |
|           |       |       | 현재 제품 세계 시장 경쟁력 순위     |                            | 3위 |
|           |       |       | 3년후 현재 제품 세계 시장 경쟁력 순위 |                            | 1위 |

② 사업화 계획

| 항목                               | 세부항목           | 성과                 |      |       |     |
|----------------------------------|----------------|--------------------|------|-------|-----|
| 사업화<br>계획                        | 사업화 소요 기간 (년)  | 1년                 |      |       |     |
|                                  | 소요 예산 (백만원)    | 1,000              |      |       |     |
|                                  | 예상매출규모<br>(억원) | 현재까지               | 3년후  | 5년후   |     |
|                                  |                | 2.2                | 55   | 3,000 |     |
|                                  | 시장점유율          | 단위 (%)             | 현재까지 | 3년후   | 5년후 |
|                                  |                | 국내                 | 13   | 20    | 40  |
|                                  |                | 국외                 | 87   | 80    | 60  |
| 향후 관련기술, 제품을 이용한 타모<br>델,제품 개발계획 |                | EWG 1등급 및 천연 제품 개발 |      |       |     |
| 무역수지<br>개선효과                     | (단위 : 억원)      | 현재까지               | 3년후  | 5년후   |     |
|                                  | 수입대체 (내수)      | 1                  | 10   | 30    |     |
|                                  | 수출             | 2                  | 55   | 3,000 |     |

### 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 3-1. 목표 및 달성여부

| 목표 달성                           | 목표    | 달성    | 비중 (%) | 달성도 (%) | 기여도(%) |
|---------------------------------|-------|-------|--------|---------|--------|
| ① 국내 농산 자원의 할랄 인증을 통해 할랄 소재를 개발 | 5종 이상 | 8건    | 10     | 160     | 100    |
| ② 할랄 인증 소재를 이용하여 할랄 화장품 개발 및 인증 | 15건   | 115건  | 10     | 767     | 100    |
| ③ 화장품 소재의 ICID 등재               | 2건    | 2건    | 10     | 100     | 100    |
| ④ 화장품 소재의 KFDA 인증               | 3건    | 15건   | 10     | 500     | 100    |
| ⑤ 매출액                           | 100백만 | 164백만 | 5      | 164     | 100    |
| ⑥ 수출 계약                         | 1건    | 6건    | 5      | 600     | 100    |
| ⑦ 고용창출                          | 4건    | 4건    | 5      | 100     | 100    |
| ⑧ 홍보 및 전시회 참가                   | 4건    | 11건   | 5      | 275     | 100    |
| ⑨ 특허출원                          | 3건    | 9건    | 5      | 300     | 100    |
| ⑩ 특허등록                          | 2건    | 2건    | 10     | 100     | 100    |
| ⑪ 기술 이전                         | 1건    | 1건    | 5      | 100     | 100    |
| ⑫ 논문 게재                         | 4건    | 0건    | 5      | 0       | 0      |
| ⑬ 학술대회 발표 및 수상                  | 6건    | 10건   | 5      | 167     | 100    |
| ⑭ 인력양성                          | 5건    | 17건   | 5      | 340     | 100    |
| ⑮ 교육지도                          | 2건    | 5건    | 5      | 250     | 100    |
| 합계                              |       |       | 100    |         |        |

#### 3-2. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

##### 1. 논문 게재 목표 미달성

- (1) 논문 게재를 위해 항균, 미백, 항염증 총 3개의 주제로 연구를 진행했음
- (2) 효능은 검증하였으나 할랄 소재 개발을 위해 개발한 추출물들이 물추출 시료로 성분 분석 결과 및 분석법(HPLC)이 기논문에 크게 벗어나지 못해 논문평가위원들로부터 새로운 분석법을 이용한 더 정밀한 결과를 요구받음

##### 2. 차후대책

- (1) 따라서 배재대학교에서는 GC-MS/MS를 이용한 실험을 의뢰하여 진행했고 그 결과를 이용하여 투고한 논문을 수정 및 논문 작성 중 임
- (2) 현재 항균 효능 소재 연구결과를 molecules 저널에 투고 완료함(IF : 3.098)
- (3) 미백 효능과 항염증 소재의 연구결과를 IJMS(International journal of molecular sciences)에 투고 예정 중 임

## 4. 연구결과의 활용 계획 등

1. 개발, 생산되는 할랄 소재를 자사 할랄 화장품 원료로 사용 (확실한 판로 확보)
2. 개발, 생산되는 할랄 소재를 화장품 원료로서 판매 (원료 사업)
  - 자사 기술 이전 사업 모델에 활용 (터어키, 브루나이 등)
  - 일반적인 할랄 원료로서 판매 (원료 사업)
3. 청정 천연 소재로서 판매 (원료 사업)
  - ICID에 등재함으로써 일반 화장품 원료로서 판매
4. 할랄 소재 추출 기술 등의 습득으로 추가 소재의 사업화 가능 : 지속적 품목 추가 가능
5. 자체 소재 개발 기술의 습득으로 자사만의 독자 원료 개발 가능 : 차별화 (자체 소재 기술을 갖는 완제품 회사로서의 잇점 확보)
6. 국내 농가 소득의 괄목할만한 효과 기대
7. 화장품 원료 산업 (수출) 효과 : 특히 세계 최초로서의 선도적 지위 확보
8. 수입 대체 효과 : 수입에 의존하는 화장품 원료의 국산화
9. 화장품 완제품 생산의 경제성 부여 및 차별성 부여 (경쟁력 강화)
10. 수출 시장의 개척에 용이함
11. 참여기관인 배재대학교에서 개발한 지유 추출물과 건지황 추출물에 대한 할랄 인증을 준비중임
12. 건지황 추출물은 미백 효능 기능성 화장품으로 KFDA 인증 및 제품화 진행중임
13. 향나무 추출물은 여드름 개선 기능성 화장품으로 KFDA 인증 및 제품화 진행중임
14. 배재대학교에서 보유한 특허 등록 2건의 소유권 이전에 대해 배재대학교 기술이전센터와 세부 조율중이며 12월내에 협약체결할 예정임

## 붙임. 참고문헌

1. Aydemir, E.H. Acne vulgaris. *Turk. Pediatr. Ars.* **2014**, *49*, 13-16.
2. Graham, G.M.; Farrar, M.D.; Cruse-Sawyer, J.E.; Holland, K.T.; Ingham, E. Proinflammatory cytokine production by human keratinocytes stimulated with *Propionibacterium acnes* and *P. acnes* GroEL. *Br. J. Dermatol.* **2004**, *150*, 421-428.
3. Tan, A.U.; Schlosser, B.J.; Paller, A.S. A review of diagnosis and treatment of acne in adult female patients. *Int. J. Womens Dermatol.* **2018**, *4*, 56-71.
4. Zaenglein, A.L.; Pathy, A.L.; Schlosser, B.J.; Alikhan, A.; Baldwin, H.E.; Berson, D.S.; Bowe, W.P.; Graber, E.M.; Harper, J.C.; et al. Guidelines of care for the management of acne vulgaris. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2016**, *74*, 945-973.e33.
5. Alexis, A.F. Clinical considerations on the use of concomitant therapy in the treatment of acne. *J. Dermatolog. Treat.* **2008**, *19*, 199-209.
6. Elston, D.M. Topical antibiotics in dermatology: emerging patterns of resistance. *Dermatol. Clin.* **2009**, *27*, 25-31.
7. Humphrey, S. Antibiotic resistance in acne treatment. *Skin Therapy Lett.* **2012**, *17*, 1-3.
8. Kanlayavattanakul, M.; Lourith, N. Therapeutic agents and herbs in topical application for acne treatment. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2011**, *33*, 289-297.
9. Karkanis, A.; Vellios, E.; Thomaidis, T.; Bilalis, D.; Efthimiadou, A.; Travlos, I. Phytochemistry and biological properties of burnet weed (*Sanguisorba spp.*): A Review. *Not. Sci. Biol.* **2014**, *6*, 395-398.
10. Nguyen, T.T.; Cho, S.O.; Ban, J.Y.; Kim, J.Y.; Ju, H.S.; Koh, S.B.; Song, K.-S.; Seong, Y.H. Neuroprotective effect of *Sanguisorbae radix* against oxidative stress-induced brain damage: *in vitro* and *in vivo*. *Biol. Pharm. Bull.* **2008**, *31*, 2028-2035.
11. Zhang, L.; Koyyalamudi, S.R.; Jeong, S.C.; Reddy, N.; Smith, P.T.; Ananthan, R.; Longvah, T. Antioxidant and immunomodulatory activities of polysaccharides from the roots of *Sanguisorba officinalis*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2012**, *51*, 1057-1062.
12. Cai, Z.; Li, W.; Wang, H.; Yan, W.; Zhou, Y.; Wang, G.; Cui, J.; Wang, F. Anti-tumor and immunomodulating activities of a polysaccharide from the root of *Sanguisorba officinalis* L. *Int. J. Biol. Macromol.* **2012**, *51*, 484-488.
13. Wang, Z.; Loo, W.T.; Wang, N.; Chow, L.W.C.; Wang, D.; Han, F.; Zheng, X.; Chen, J.-P. Effect of *Sanguisorba officinalis* L on breast cancer growth and angiogenesis. *Expert Opin. Ther. Targets* **2012**, *16*, Suppl 1, S79-S89.
14. Shin, J.A.; Kim, J.S.; Kwon, K.H.; Nam, J.S.; Jung, J.Y.; Cho, N.P.; Cho, S.D. Apoptotic effect of hot water extract of *Sanguisorba officinalis* L. in human oral cancer cells. *Oncol. Lett.* **2012**, *4*, 489-494.
15. Choi, E.S.; Kim, J.S.; Kwon, K.H.; Kim, H.S.; Cho, N.P.; Cho, S.D. Methanol extract of *Sanguisorba officinalis* L. with cytotoxic activity against PC3 human prostate cancer cells. *Mol. Med. Rep.* **2012**, *6*, 670-674.

16. Liu M.-P.; Liao, M.; Dai, C.; Chen, J.-F.; Yang, C.-J.; Liu, M.; Chen, Z.-G.; Yao, M.-C. *Sanguisorba officinalis* L synergistically enhanced 5-fluorouracil cytotoxicity in colorectal cancer cells by promoting a reactive oxygen species-mediated, mitochondria-caspase-dependent apoptotic pathway. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 34245.
17. Yu, T.; Lee, Y.J.; Yang, H.M.; Han, S.; Kim, J.H.; Lee, Y.; Kim, C.; Han, M.H.; Kim, M.-Y.; et al. Inhibitory effect of *Sanguisorba officinalis* ethanol extract on NO and PGE<sub>2</sub> production is mediated by suppression of NF- $\kappa$ B and AP-1 activation signaling cascade. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *134*, 11-17.
18. Yang, J.H.; Hwang, Y.H.; Gu, M.J.; Cho, W.K.; Ma, J.Y. Ethanol extracts of *Sanguisorba officinalis* L. suppress TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ -induced pro-inflammatory chemokine production in HaCaT cells. *Phytomedicine* **2015**, *22*, 1262-1268.
19. Menković, N.; Zdunić, G.; Šavikin, K.; Stanojković, T.; Juranić, Z.; Janković, T. Preliminary investigation of cytotoxic and antioxidant activity of some medicinal plants growing in Serbia and Montenegro. *Planta Med.* **2007**, *73*, 043.
20. Zhang, S.; Liu, X.; Zhang, Z.L.; He, L.; Wang, Z.; Wang, G.S. Isolation and identification of the phenolic compounds from the roots of *Sanguisorba officinalis* L. and their antioxidant activities. *Molecules* **2012**, *17*, 13917-13922.
21. Seo, C.-S.; Jeong, S.-J.; Yoo, S.-R.; Lee, N.-R.; Shin, H.-K. Quantitative analysis and *in vitro* anti-inflammatory effects of gallic acid, ellagic acid, and quercetin from *Radix Sanguisorbae*. *Pharmacogn. Mag.* **2016**, *12*, 104-108.
22. Kim, T.G.; Kang, S.Y.; Jung, K.K.; Kang, J.H.; Lee, E.; Han, H.M.; Kim, S.H. Antiviral activities of extracts isolated from *Terminalis chebula* retz., *Sanguisorba officinalis* L., *Rubus coreanus* miq. and *Rheum palmatum* L. against hepatitis B virus. *Phytother. Res.* **2001**, *15*, 718-720.
23. Liang, J.; Chen, J.; Tan, Z.; Peng, J.; Zheng, X.; Nishiura, K.; Ng, J.; Wang, Z.; Wang, D.; et al. Extracts of medicinal herb *Sanguisorba officinalis* inhibit the entry of human immunodeficiency virus type one. *J. Food Drug Anal.* **2013**, *21*, S52-S58.
24. Kim, Y.H.; Chung, C.B.; Kim, J.G.; Ko, K.I.; Park, S.H.; Kim, J.-H.; Eom, S.Y.; Kim, Y.S.; Hwang, Y.-I.; Kim, K.H. Anti-wrinkle activity of ziyuglycoside I isolated from a *Sanguisorba officinalis* root extract and its application as a cosmeceutical ingredient. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2008**, *72*, 303-311.
25. Mimaki, Y.; Fukushima, M.; Yokosuka, A.; Sashida, Y.; Furuya, S.; Sakagami, H. Triterpene glycosides from the roots of *Sanguisorba officinalis*. *Phytochemistry* **2001**, *57*, 773-779.
26. Liu, X.; Cui, Y.; Yu, Q.; Yu, B. Triterpenoids from *Sanguisorba officinalis*. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 1671-1679.
27. Sun, W.; Zhang, Z.L.; Liu, X.; Zhang, S.; He, L.; Wang, Z.; Wang, G.-S. Terpene glycosides from the roots of *Sanguisorba officinalis* L. and their hemostatic activities. *Molecules* **2012**, *17*, 7629-7636.

28. Hu, J.; Song, Y.; Li, H.; Yang, B.; Mao, X.; Zhao, Y.; Shi, X. Cytotoxic triterpene glycosides from the roots of *Sanguisorba officinalis*. *Arch. Pharm. Res.* **2015**, *38*, 984–990.
29. Xie, Y.; Yang, W.; Tang, F.; Chen, X.; Ren, L. Antibacterial activities of flavonoids: structure–activity relationship and mechanism. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22*, 132–149.
30. Kim, S.H.; Kim, D.K.; Eom, D.O.; Kim, S.Y.; Kim, S.H.; Shin, T.Y. *Sanguisorba officinalis* inhibits immediate-type allergic reactions. *Nat. Prod. Sci.* **2002**, *8*, 177–182.
31. Shan, B.; Cai, Y.Z.; Brooks, J.D.; Corke, H. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *117*, 112–119.
32. Gawron–Gzella, A.; Witkowska–Banaszczak, E.; Bylka, W.; Dudek–Makuch, M.; Odwrot, A.; Skrodzka, N. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Sanguisorba officinalis* L. extracts. *Pharm. Chem. J.* **2016**, *50*, 244–249.
33. Ginovyan, M.; Petrosyan, M.; Trchounian, A. Antimicrobial activity of some plant materials used in Armenian traditional medicine. *BMC Complement. Altern. Med.* **2017**, *17*, 50.
34. Mierziak, J.; Kostyn, K.; Kulma, A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules* **2014**, *19*, 16240–16265.
35. Akiyama, H.; Fujii, K.; Yamasaki, O.; Oono, T.; Iwatsuki, K. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2001**, *48*, 487–491.
36. Vu, T.T.; Kim, H.; Tran, V.K.; Vu, H.D.; Hoang, T.X.; Han, J.W.; Choi, Y.H.; Jang, K.S.; Choi, G.J.; Kim, J.-C. Antibacterial activity of tannins isolated from *Sapium baccatum* extract and use for control of tomato bacterial wilt. *PLoS One* **2017**, *12*, e0181499.
37. Redondo, L.M.; Chacana, P.A.; Dominguez, J.E.; Fernandez Miyakawa, M.E. Perspectives in the use of tannins as alternative to antimicrobial growth promoter factors in poultry. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 118.
38. Liu, X.; Shi, B.; Yu, B. Four new dimeric triterpene glucosides from *Sanguisorba officinalis*. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 11647–11654.
39. Shin, S.W.; Ghimeray, A.K.; Park, C.H. Investigation of total phenolic, total flavonoid, antioxidant and allyl isothiocyanate content in the different organs of *Wasabi japonica* grown in an organic system. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **2014**, *11*, 38–45.
40. Gálvez, M.; Martín–Cordero, C.; Houghton, P.J.; Ayuso, M.J. Antioxidant activity of methanol extracts obtained from *Plantago* species. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1927–1933.
41. Kokoska, L.; Polesny, Z.; Rada, V.; Nepovim, A.; Vanek, T. Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* **2002**, *82*, 51–53.
42. Lee, H.-A.; Hong, S.; Oh, H.-G.; Park, S.-H.; Kim, Y.-C.; Park, H.; et al. Antibacterial activity of *Sanguisorba officinalis* against *Helicobacter pylori*. *Lab. Anim. Res.* **2010**, *26*,

257–263.

43. Mahboubi, A.; Asgarpanah, J.; Sadaghiyani, P.N.; Faizi, M. Total phenolic and flavonoid content and antibacterial activity of *Punica granatum* L. var. *pleniflora* flowers (Golnar) against bacterial strains causing foodborne diseases. *BMC Complement. Altern. Med.* **2015**, *15*, 366.
44. Mansouri, A.; Embared, G.; Kokkalou, E.; Kefalas, P. Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chem.* **2005**, *89*, 411–420.
45. Hussain, A.I.; Rathore, H.A.; Sattar, M.Z.A.; Chatha, S.A.S.; Ahmad, F.u.d.; Ahmad, A.; Johns, E.J. Phenolic profile and antioxidant activity of various extracts from *Citrullus colocynthis* (L.) from the Pakistani flora. *Ind. Crops Prod.* **2013**, *45*, 416–422.
46. Cai, Y.; Luo, Q.; Sun, M.; Corke, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.* **2004**, *74*, 2157–2184.
47. Abdel-Hameed, E.-S.S. Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. *Food Chem.* **2009**, *114*, 1271–1277.
48. Rebaya, A.; Belghith, S.I.; Baghdikian, B.; Leddet, V.M.; Mabrouki, F.; Olivier, E.; Cherif, J.K.; Ayadi, M.T. Total phenolic, total flavonoid, tannin content, and antioxidant capacity of *Halimium halimifolium* (Cistaceae). *J. Appl. Pharm. Sci.* **2014**, *5*, 52–57.
49. Borges, A.; Ferreira, C.; Saavedra, M.J.; Simões, M. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microb. Drug Resist.* **2013**, *19*, 256–265.
50. Kępa, M.; Mikłasińska-Majdanik, M.; Wojtyczka, R.D.; Idzik, D.; Korzeniowski, K.; Smoleń-Dzirba, J.; Wąsik, T.J. Antimicrobial potential of caffeic acid against *Staphylococcus aureus* clinical strains. *Biomed Res. Int.* **2018**, *2018*, Article ID 7413504.
51. Wang, L.; Yang, X.; Qin, P.; Shan, F.; Ren, G. Flavonoid composition, antibacterial and antioxidant properties of tartary buckwheat bran extract. *Ind. Crops Prod.* **2013**, *49*, 312–317.
52. Lim, Y.H.; Kim, I.H.; Seo, J.J. *In vitro* activity of kaempferol isolated from the *Impatiens balsamina* alone and in combination with erythromycin or clindamycin against *Propionibacterium acnes*. *J. Microbiol.* **2007**, *45*, 473–477.
53. Tada, Y.; Shikishima, Y.; Takaishi, Y.; Shibata, H.; Higuti, T.; Honda, G.; Ito, M.; Takeda, Y.; Kodzhimatov, O.K.; et al. Coumarins and  $\gamma$ -pyrone derivatives from *Prangos pabularia*: antibacterial activity and inhibition of cytokine release. *Phytochemistry* **2002**, *59*, 649–654.
54. Basile, A.; Sorbo, S.; Spadaro, V.; Bruno, M.; Maggio, A.; Faraone, N.; Rosselli, S. Antimicrobial and antioxidant activities of coumarins from the roots of *Ferulago campestris* (Apiaceae). *Molecules* **2009**, *14*, 939–952.
55. Tan, H.; Sonam, T.; Shimizu, K. The potential of triterpenoids from loquat leaves

- (*Eriobotrya japonica*) for prevention and treatment of skin disorder. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1030.
56. Ainsworth, E.A.; Gillespie, K.M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 875–877.
57. Moreno, M.I.N.; Isla, M.I.; Sampietro, A.R.; Vattuone, M.A. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *71*, 109–114.
58. Sun, B.; Ricardo-da-Silva, J.M.; Spranger, I. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4267–4274.
59. Ghorai, N.; Chakraborty, S.; Guichait, S.; Saha, S.K.; Biswas, S. Estimation of total Terpenoids concentration in plant tissues using a monoterpene, linalool as standard reagent. *Protoc. Exch.* **2012**, *5*.
60. Boussaada, O.; Chriaa, J.; Nabli, R.; Ammar, S.; Saidana, D.; Mahjoub, M.A.; Chraeif, I.; Helal, A.N.; Mighri, Z. Antimicrobial and antioxidant activities of methanol extracts of *Evax pygmaea* (Asteraceae) growing wild in Tunisia. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *24*, 1289–1296.
61. Choi, C.W.; Kim, S.C.; Hwang, S.S.; Choi, B.K.; Ahn, H.J.; Lee, M.Y.; Park, S.H.; Kim, S.K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci.* **2002**, *163*, 1161–1168.
62. Shabbir, M.; Khan, M.R.; Saeed, N. Assessment of phytochemicals, antioxidant, anti-lipid peroxidation and anti-hemolytic activity of extract and various fractions of *Maytenus royleanus* leaves. *BMC Complement. Altern. Med.* **2013**, *13*, 143.
63. Hazra, B.; Biswas, S.; Mandal, N. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. *BMC Complement. Altern. Med.* **2008**, *8*, 63.