

발간등록번호

11-1543000-002762-01

# 포도 및 베리류 기반 건강 뷰티음료 개발 최종보고서

2019. 6. 14.

주관연구기관 / 김재식헬스푸드(주)  
협동연구기관 / 경북대학교 산학협력단  
협동연구기관 / 한약진흥재단

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “포도 및 베리류 기반 건강뷰티음료 개발”(개발기간 : 2016. 07. 07 ~ 2018. 12. 31) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 06. .

주관연구기관명 : 농업회사법인 김재식헬스푸드 주식회사 (대표자) 김재식 (인)

협동연구기관명 : 경북대학교산학협력단 (대표자) 임 기 병 (인)

협동연구기관명 : 한약진흥재단 (대표자) 이 응 세 (인)

주관연구책임자 : 김재식

협동연구책임자 : 김정상

협동연구책임자 : 김효정

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의  
합니다.

## 보고서 요약서

과제고유번호	314051-3	해당 단계 연구 기간	2018.01.01.~ 2018.12.31	단계 구분	3/3
연구사업명	단위사업	농식품기술개발사업			
	사업명	고부가가치 식품기술개발 사업			
연구과제명	대과제명	(해당 없음)			
	세부과제명	포도 및 베리류 기반 건강뷰티 음료 개발			
연구책임자	김재식	해당단계 참여 연구원 수	총: 13명 내부: 13명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부: 160,000천원 민간: 54,000천원 계: 214,000천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 19명 내부: 19명 외부: 0명	총 연구개발비	정부: 400,000천원 민간: 135,000천원 계: 535,000천원
연구기관명 및 소속부서명	제1세부: 농업회사법인 김재식헬스푸드 주식 회사(구.경북대학교포도마을)/과일가공연구소 제1협동: 경북대학교산학협력단 / 식품공학부 제2협동: 한약진흥재단 / 한의식약팀			참여기업명 (해당없음)	
위탁연구	연구기관명: (해당 없음)			연구책임자:(해당 없음)	
요약	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 포도 과피에 함유된 레스베라트롤의 추출을 극대화하기 위한 효소처리 조건을 확립하고, 건강 뷰티 활성을 갖는 지역 한약재 추출물을 혼합한 피부 건강을 강조한 드링크를 개발하여 상품화</li> <li>○ 레스베라트롤의 함량을 높이기 위하여 과피를 효소처리하여 추출률을 유의적으로 증가시킴</li> <li>○ 한약진흥재단이 확보하고 있는 피부 미백 및 안티에이징 관련 한약원료로부터 효능성분을 추출하여 과일음료에 믹싱하는 기술을 개발</li> <li>○ 개발 제품의 in vivo 효능을 평가하여 홍보가 가능하도록 국제우수논문예 게재</li> <li>○ 건강뷰티 관련 드링크 2품목 개발 및 상품화 (미백, 안티에이징 제품)</li> </ul>			보고서 면수 258	

## 국문 요약문

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<p>○ 포도 과피에 함유된 레스베라트롤의 추출을 극대화하기 위한 효소처리 조건을 확립하고, 건강 뷰티 활성을 갖는 지역 한약재 추출물을 혼합한 피부 건강을 강조한 드링크를 개발하여 상품화</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 폐사에서 생산하고 있는 포도 및 베리 기반 항산화 주스를 개량하여, 레스베라트롤의 함량을 높이기 위하여 과피를 효소처리하여 추출물을 유의적으로 증가시킴</li> <li>2. 대구 소재 한약진흥재단이 확보하고 있는 피부 미백 및 안티에이징 관련 한약 원료로부터 효능성분을 추출하여 과일음료에 믹싱하는 기술을 개발</li> <li>3. 개발 제품의 in vivo 효능을 평가하여 홍보가 가능하도록 국제우수논문에 게재</li> </ol>					
연구개발성과	<p>○ 건강뷰티 관련 드링크 2품목 개발 및 상품화 (미백, 안티에이징 제품)</p> <p>○ 레스베라트롤 고함유 제품 개발 공정 개발 및 국내 및 PCT 특허 1건 출원</p> <p>○ 과일베이스 음료에 한약재 추출물을 믹싱하는 기술 개발 및 특허 획득</p> <p>○ SCI급 논문 출판 (게재 완료 1건, 투고 완료(심사중) 2건)</p>					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<p>○ 기 개발하여 중국과 수출 계약을 마친 ‘미세먼지 대응음료’ 및 ‘항산화 음료’의 후속 제품으로 중국을 비롯한 동남아 시장을 타깃으로 수출 확대</p>					
중심어 (5개 이내)	건강뷰티 드링크	지역 한방원료	레스베라트롤	미백 및 안티에이징	미용 음료	

## < SUMMARY >

		코드번호	D-02			
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Establish the optimum processing conditions of resveratrol extraction from grape or its peel</li> <li>○ Development of inner beauty drinks by combining grape juice enriched with resveratrol and medicinal herbal extracts                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Improvement of resveratrol extraction from grape or its peel by pretreatment of grape</li> <li>- Screening of herbal extracts with anti-skin aging and skin whitening effects and application to developing inner beauty drinks</li> <li>- Publication of <i>in vivo</i> efficacy of selected ingredients or products in internationally recognized journal(s)</li> </ul> </li> </ul>					
Results	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Development of 2 kinds of inner beauty products and commercialization (anti-skin aging product, skin whitening product)</li> <li>○ Development of resveratrol-enrichment technology (application of 1 domestic and 1 PCT patent)</li> <li>○ Development of mixing fruit-based beverage with herbal extracts</li> <li>○ Publication of papers in SCI(E) journals (1 paper published, 2 papers under review)</li> </ul>					
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Exporting of developed inner beauty drinks to Southeast Asian countries as well as launching the product for domestic market</li> </ul>					
Keywords	inner beauty drink	resveratrol	beauty beverages	local oriental herbal	whitening and anti-aging	

## 영문목차

1. Overview of the project .....	7
2. Current technological status in Korea and other countries .....	14
3. Results .....	19
4. Achievements and contribution to industry .....	244
5. Plan to use research results .....	247
6. Global scientific and/or technological information collected during project period .....	248
7. Security clearance of study results .....	249
8. Facilities and equipments purchased .....	250
9. Safety measures taken for the project .....	251
10. Representative research achievements .....	254
11. Other remarks .....	256
12. References .....	257

## < 목 차 >

1. 연구개발과제의개요 .....	7
2. 국내외 기술개발 현황 .....	14
3. 연구수행 내용 및 결과 .....	19
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	244
5. 연구결과의 활용계획 등 .....	247
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	248
7. 연구개발성과의 보안등급 .....	249
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황 .....	250
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	251
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	254
11. 기타사항 .....	256
12. 참고문헌 .....	257

<별첨> 자체평가의견서

# 1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

## 1-1. 연구개발 목적

■ 최종 목표 : 포도 및 베리류 기반 피부 건강 증진 뷰티 음료 개발 및 상품화

■ 세부 목표

- ▶ 포도가공부산물(과피 및 씨)에 함유된 기능성 성분(레스베라트롤 등)의 추출을 극대화하기 위한 효소처리 조건 확립
- ▶ 건강 뷰티 활성을 갖는 지역 한약재 추출물을 혼합하여 피부 건강 증진 효능 증대
- ▶ 피부 건강 증진에 도움을 주는 기능성 드링크 제품을 개발하여 상품화

■ 연구개발 개요

- 천연물 유래 기능성 건강 뷰티식품소재는 웰빙, 뷰티, 한류 등과 맞물려 매우 희망적인 사업 및 연구 분야임.
- 국내 뷰티관련 화장품 시장은 9.2조원 규모이고 건강 기능식품 시장은 2010년 4조원을 넘어섰으며 뷰티관련 제품이 국내건강기능식품의 20%를 차지하며 매년 13~15% 성장세를 보이고 있으며 ‘이너뷰티’라는 제품군으로도 소개되어 있음. (2012년 총 시장 4,000억원) (그림 1 참고)

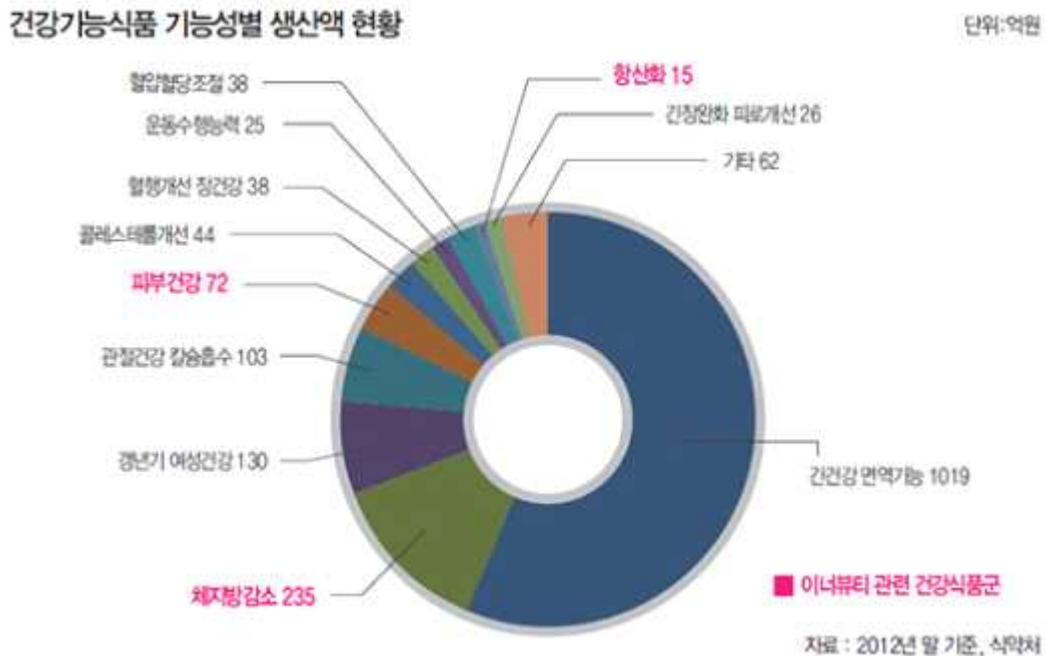


그림 1. 건강기능식품 기능성별 생산액 현황

- 국내에서 이너뷰티 (천연물유래 기능성 건강뷰티식품)는 화장품과 식품의 중간성격을 띠며 건강기능식품으로도 많이 개발되고 있으며 주요 성분은 비타민, 단순항산화 과일, 콜라겐 등 안티에이징



관련 성분으로 주로 피부노화방지보습, 거친 피부재생에 효과가 있는 것으로 나타남 (그림 2).



그림 2 건강뷰티식품의 분류와 작용

○ 경북지역은 해양자원, 임산자원, 농산자원, 수변자원이 풍부함으로 인해 이를 이용한 건강 뷰티소재 발굴을 통해 우리나라 고유브랜드 제품을 개발하고 또한 세계화 전략의 신 모델을 제시할 수 있음.

○ 다시 말하면 경상북도에서 생산되는 과채류·한방소재를 중심으로 미백효과, 항산화효소 유도 기능이 있는 소재를 *in vitro* 분석을 통해 선별함. 즉, 노화 및 자외선 노출 등으로 인한 피부손상, 갈변을 재생 또는 억제하는 것은 Nrf2 신호전달경로를 통하여 조절되는 항산화효소계의 유도 (그림 3) 및 tyrosinase 효소활성 또는 melanocyte (예, B16 세포)의 멜라닌 색소 생성

저해를 통하여 상당부분 극복할 수 있으므로, 1차적으로 지자체내 천연자원에서부터 항산화 효소계를 유도하고 B16세포에서 melanin 색소형성 및 tyrosinase 효소활성을 저해하는 소재를 탐색하고, 활성 성분을 규명하고자 함.

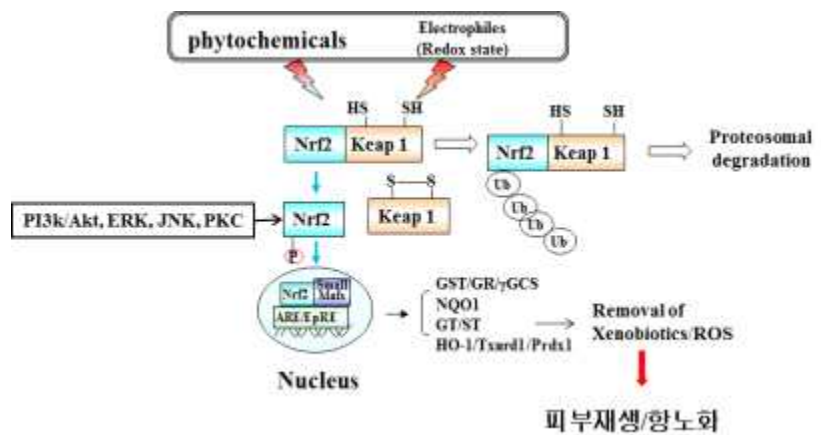


그림 3. Nrf2 신호전달경로의 활성화와 피부건강과의 관계.

- 그중에서도 경상북도는 국내 주요 한약재배 단지로서, 지황, 시호, 산약, 작약, 백출, 오미자, 고본, 구절초, 복분자, 속단, 세신, 오가피, 대추, 홍화 등을 주로 생산하고 있다. 이 가운데, 피부미용효과 (에스트로젠 유사활성, 항산화 활성, 항염증 활성 등)가 예상되면서, 음료로의 가공이 상대적으로 용이한 품목들은 **오미자, 산수유, 복분자, 대추, 모과, 홍화** 등 임 (표1). 그 외, 예비실험에서 항염증 활성 또는 tyrosinase 저해활성을 보인 인삼, 지각, 치자, 황기, 어성초, 원지 등에 대해서도 세포 모델계 활용 다면 평가를 실시하여 음료개발에 활용할 것임.
- 따라서 본 연구에서는 **경북지역에서 생산되는 한약재에 대한 건강뷰티 활성에 대한 효능을 탐색하여 database를 구축**함과 동시에, 표 1에 열거된 5~6가지 원료를 중심으로 **건강뷰티 음료 2종 (미백효능 음료 1종, 안티에이징 음료 1종)을 개발하고자 함.**

표 1. 음료화가 용이한 주요 한약재 원료의 주요 약효성분 및 효능

한약재(열매)	주요 약효성분	효능	주요재배지역 (경상북도 내)
오미자( <i>Schisandra chinensis</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ligans</li> <li>• schisandrin</li> <li>• schisantherin B</li> <li>• schisandrol B</li> <li>• gomisin A, D, E, K1</li> </ul>	항산화, 항노화 인지기능 개선	문경
산수유( <i>Cornus officinalis</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• morroniside</li> <li>• loganin</li> <li>• ursolic acid</li> <li>• irridoid</li> </ul>	항산화, 항염증, 간보호, 항노화	의성
대추( <i>Ziziphus jujuba</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ziziphin</li> <li>• triterpenic acids</li> <li>• adenosine 3',5'-cyclic monophosphate</li> <li>• guanosine 3',5'-cyclic monophosphate</li> </ul>	스트레스 완화, 항염증, 항궤양, 불임억제	경산
복분자( <i>Rubus coreanus</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 23-Hydroxytormentonic acid</li> <li>• nigaichgoside f<sub>1</sub></li> <li>• cyanidin-3-glucoside (C3G)</li> <li>• gallic acid</li> </ul>	항산화, 골다공증, 항비만, 항염증, 항피로, 정자운동성	고령, 예천
모과( <i>Pseudocydonia sinensis</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3-caffeoylquinic acid</li> <li>• 4-caffeoylquinic acid</li> <li>• procyanidin</li> <li>• limonene, linalol, vomifoliol, toluene, β-ionone, α-terpineol</li> </ul>	항산화, 항염, 항알레르기, 류마티스 관절염	자성
홍화씨( <i>Carthamus tinctorius</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• quinochalcone c-glycoside</li> <li>• hydroxysafflor yellow A</li> <li>• N-(p-Coumaroyl)serotonin</li> <li>• N-feruloylserotonin</li> </ul>	항염증, 심장병예방, 생리불순, 복통, 장출혈	전국1위

- 기존 개발된 건강뷰티 음료는 주로 식이섭유함유 음료로서 항비만 또는 변비개선에 초점이 맞춰져 있어, 실제적인 효능발현이 어렵고, 이에 따라 미백, 안티에이징 (피부산화방지) 등 뷰티 효능에 대한 소비자들의 신뢰를 얻지 못해 뷰티 음료시장 확대에 한계가 있음. 반면, 본 연구에서는 **체계적이고 과학적인 tool을 이용하여 효능발현 가능성을 극대화 할 것이며, 동시에 식품의 가장 중요한 요소인 관능적 특성(맛, 풍미)을 최상으로 유지하여 제품화를 성공시킬 것임.**

○ 본 과제 수행을 위한 핵심개발기술은 다음과 같음.

탐색 기술	in vitro, in vivo 유효성/위해성 평가기술	활성산소제거 식품, 멜라닌 생성 억제제품, 피부영양, 보습 식품소재 및 제품, 아토피 관련소재 및 제품 등
	생체 내 활성발현 기작규명	
소재화 기술	제품생산수준의 추출 및 정제기술	
	화학적, 효소적 전환(합성) 기술	
	고순도 제품화 기술	
제품화 기술	다기능제품개발	
	최종제품의 인체전 유효성/위해성 평가기술	
	맞춤형 제품개발	

○ 과제 수행을 위한 본 연구팀의 역량

- 본 연구팀은 지난 2-3년간의 유사연구를 통하여 항산화 음료 및 잼, 미세먼지 대응 음료 등을 개발하여, 시장에 성공적으로 출시한 바 있으며, 수십 종의 과일, 채소, 한방소재에 대한 항산화, 항염증 활성에 대한 데이터베이스를 확보하고 있어 본 연구를 성공적으로 이끄는 데 유리한 위치에 있음. (Seo *et al.*, Development of low-sugar antioxidant jam by a combination of anthocyanin-rich berries. Applied Biological Chemistry (2016)59:305, Jang *et al.*, In Vitro and In Vivo Anti-inflammatory Activity of Mixed Fruit and Vegetable Juice. Food Science and Biotechnology June 2016).
- 또한 본 연구팀은 예비연구를 통하여 감초에 존재하는 dehydroglyasperin C가 Nrf2의존성 항산화효소계를 유도함으로써 체내 활성산소 소거 효능이 우수한 것을 확인하여 특허를 등록한 바 있음 (등록번호:10-1066457-0000; Seo *et al.*, J Agric Food Chem 2010). Nrf2 의존성 항산화효소계는 자외선에 의하여 유도되는 sun-burn, 피부노화, 염증 등으로부터 피부를 보호해주는 것으로 잘 알려져 있음. (Beyer *et al.* Cell Death and Differentiation 2007;14:1250-54)

○ 사업화와 관련된 부분은 연구단계에서부터 각종 공영매체 홈쇼핑 제작자 및 딜러들과 협의하여 판매와 홍보에 유리한 제품을 개발하며 연구기간 2년 6개월 안에 반드시 출시하여 초기연도 8억 원 최종 3년 이후 42억 원의 매출액을 달성하고자 함.

## 1-2. 연구개발의 필요성

- 최근 피부 건강 및 이너뷰티에 대한 소비자들의 관심이 증가하고 있고, 관련 드링크 상품이 제한된 상황에서 본 회사의 특·장점인 과일음료가공 기술과 첨단 피부 건강 효능 기술을 접목한 제품을 개발하는 것은 국내 건강 뷰티 식품 확장을 위해 중요한 개발연구로 판단함.
- 포도에 함유되어 있는 레스베라트롤과 배당체 piceid는 그 피부건강 기능성이 잘 알려져 있는 소재로 해외에서는 다양한 제품으로 상품화되어 있으나, 국내의 경우 학문적인 연구성과를 사업화로 translation하는 단계가 미흡한 상태인데, 본 연구를 통하여 (piceid의 resveratrol로 전환) 국제 경쟁력을 갖는 생체이용률이 높은 레스베라트롤을 유효농도로 함유한 포도기반 피부건강 음료를 개발하는 것은 국내 기능성 음료 개발 기술과 관련 시장 규모를 국제적 수준으로 끌어올리는데 기여할 것으로 봄.

- 한약진흥재단이 확보하고 있는 수천종의 소재로부터 피부건강 효능 발현가능성이 높은 원료를 발굴하여 대량소비가 가능한 음료로 개발하고 관련 공정을 구축하는 것은 국내 한약원료재배 산업 활성화에 크게 도움이 될 것으로 봄.
- 본 연구에서 효능평가에 사용할 모델시스템은 이미 학문적으로 충분한 검토가 이뤄져 있고, 인체 내 효능 발현가능성이 높은 소재 발굴이 가능하도록 된 것으로, 본 연구에서 개발될 제품의 품질은 무늬만 뷰티건강 식품인 기존 제품과는 차별이 있음.
- ㈜경북대포도마을은 우리나라 포도 주산지인 영천에 위치해 있으면서 매년 영천포도를 대량 구매하여 지역재배 농가에 경제적으로 기여하는 바가 크며, 과일음료 제조사가운데서는 첨단 기술집약적 공법을 이용하여 제품을 개발하는 몇 안되는 기업으로 자평함. 특히 정부용역 과제를 100% 상품화로 연결시켜 왔으며, 지난해는 농리부 과제를 통하여 ‘미세먼지 대응 음료’를 개발하여 중국기업과 MOU를 통하여 대량으로 수출할 수 있는 판로를 확보한 바 있음.

**1-3. 연구개발 범위**

**가. 1차년도**

구분	개발 목표	개발 내용 및 범위
주관기관 (경북대학교포도마을(주))	선정된 과일류 및 한방자원의 추출 조건 및 공정조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 지역주요 과일류 및 한방자원의 선정</li> <li>• 활성 소재의 추출조건 확립 및 최적화</li> <li>• 포도껍질, 씨로부터 레스베라트롤 및 카테킨 추출 조건 확립</li> <li>• 포도껍질에 존재하는 piceid의 생물전환 기술 확립 (cellulase 효소 등)</li> <li>• 대규모 추출 조건 설정</li> <li>• 관능검사</li> </ul>
참여기관 1 (경북대학교)	소재선정 및 선정소재의 항산화 활성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 지역주요 과일류 및 한방자원의 선정</li> <li>• 다양한 추출물 및 원료 베리류 유래 기능성 성분의 세포모델계 항산화 (효소계) 유도활성 평가 (Nrf2, HO-1, NQO1등)</li> <li>• 생물전환 포도시료, 한방소재 및 1차 개발음료의 항산화 활성 및 세포모델계 안티에이징 효과 및 항산화 효소계 유도 활성 검증</li> <li>• 1차 recipe 결정</li> </ul>
참여기관 2 (한약진흥재단)	소재선정 및 선정소재의 미백 활성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 지역주요 과일류 및 한방자원의 선정</li> <li>• 선정된 지역한방자원 및 생물전환 한방자원의 미백 활성 평가 (사람 피부 조직 유래 세포 활용)</li> <li>• 활성 소재의 미백 관련 작용 기전 규명</li> </ul>

나. 2차년도

구분	개발 목표	개발 내용 및 범위
주관기관 (경북대학교포도마 을(주))	건강부티음료 레시피 개발 및 자동화 공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 최대효능 발현을 위한 레시피 설정</li> <li>• 자동화 공정 최적화</li> <li>• 시제품 개발</li> <li>• 제품화 기술개발</li> </ul>
참여기관 1 (경북대학교)	항노화(안티에이징) 활성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 세포모델계 실험결과 기반 건강부티음료 레시피 set up</li> <li>• 다양한 건강부티 음료 레시피에 대한 항산화효소 유도활성 및 안티에이징 지표 변화 평가 (세포 및 동물모델)</li> <li>•苦味 제거 기술 개발 (레시피 조절-관능평가 포함, 나노에멀전 검토)</li> </ul>
참여기관 2 (한약진흥재단)	미백·피부혈행개선 활 성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 혈행개선 활성평가</li> <li>• 한방자원 또는 생물전환 한방자원의 배합비 설정</li> <li>• 배합비에 따른 효능 평가 (미백활성 및 혈행개선활성)</li> <li>• 유효성분 분석</li> </ul>

다. 3차년도

구분	개발 목표	개발 내용 및 범위
주관기관 (경북대학교포도마을(주))	건강뷰티음료 디자인 개발 및 상품화	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 건강뷰티음료 제품화 컨셉 구체화 및 제형 개발</li> <li>• 디자인 개발 및 상품화</li> <li>• 제품 마케팅 및 수출 활성화</li> <li>• 제품출시</li> </ul>
참여기관 1 (경북대학교)	출시제품의 항노화 활성 유효성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 최종 제품의 유효성 전임상 평가 (시판 타사 제품과 비교 평가 포함, 임상평가 예비 단계) - 본 사업 이후, 건기식 완성이 최종목표임.</li> <li>• 생체 내 활성 발현 기작 규명 (효능관련 신호전달 경로 규명 및 대사체 분석을 통한 활성성분 프로파일 분석)</li> <li>• 최종제품에 대한 안티에이징 및 항산화 효소 유도 활성 확인 (동물 모델)</li> </ul>
참여기관 2 (한약진흥재단)	출시제품의 미백 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 인체피부모델계를 이용한 (시)제품의 효능 검증 및 응용평가 (인체피부조직 모사 3D 모델포함)</li> <li>• 동물모델계를 이용한 시제품의 효능 검증 (Zebra fish 및 혈전 동물 모델)               <ul style="list-style-type: none"> <li>- in vivo Zebrafish 멜라닌 생합성 저해활성 조사</li> <li>- Collagen 에 의해 유도된 rat 혈소판응집 저해능 평가, FeCl<sub>3</sub> 에 의해 유도된 rat 경동맥 혈전 형성 저해능 평가</li> </ul> </li> </ul>

## 2. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

### 가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

#### ○ 기술현황

- 포도주스 제조후 남은 부산물 (주로 과피, 씨)에는 상당량의 resveratrol, piceid, catechins 등과 같은 건강기능성성분이 함유되어 있으나 현재는 활용도가 낮은 상태임. (대부분 폐기되거나 사료, 퇴비 등으로 활용되고 있음). 따라서 본 포도 착즙과정이나 착즙후 효소처리를 통하여 기능성성분을 최대한 추출하여 피부건강 드링크 개발에 활용하고자 함.
- 포도주스에 함유된 resveratrol과 piceid함량은 각각 0.56, 4.17 mg/L로서 대부분이 resveratrol의 배당체인 piceid 형태로 존재함 (Romero-Pérez et al, J Agric Food Chem 1999).
- 포도과피에 함유된 resveratrol과 piceid 함량은 평균적으로 각각 200 및 300 µg/g 정도인데, 이 가운데 piceid는 resveratrol 배당체로서 생체이용률이 매우 낮아 실제적으로 생체내에서 거의 기능성을 발휘하지 못함. 미국 등 선진국에서는 레스베라트롤을 활용하여 피부미용관련 음료가 개발되어 시판되고 있으나, 국내에서는 포도에 함유되어 있는 레스베라트롤 배당체 piceid의 생체이용률 향상이나 추출을 제고를 위한 연구가 이뤄져 있지 않음.
- **Resveratrol은** 항노화활성(LDL산화 억제, COX저해, 항치매화활성, 항암활성, sirtuin 활성화), 특히 높은 항산화 및 항염증 활성으로 인하여 **유망한 피부보호 효능 소재**로 알려져 있음.
- 한방소재에 대한 개별적인 피부건강 효능에 대한 평가는 활발하게 이뤄지고 있으나, 이를 활용하여 소비자들이 쉽게 접근할 수 있는 제품(예, 드링크 등)개발로 이어지고 있지 않음.
- 최근 항산화효소계의 피부건강에서의 중요성이 부각되고 있으나, 이를 어너뷰티 식품으로 개발하는 노력은 제한적임.

#### ○ 시장현황

- 시판중인 대부분의 포도주스는 포도를 단순 착즙하여 제조한 것임.
- 뷰티 건강 음료로 현재 시판중인 음료로서는 CJ의 Inner-b, 풀무원의 슬림업, 돌코리아 ‘알로에 슬라이스’ 17종, 롯데칠성음료 ‘이너뷰티 플래너’ 2종, 한국야쿠르트 ‘하루야채 뿌리채소’, 휴엔의 아로니아美 등이 있음.
- 시판중인 피부미용관련 음료는 엄격한 과학적인 효능 검증을 거친 제품이 극소수이며, 대부분 효능이 예상되는 소재를 활용하여 개발된 제품임.

#### ○ 경쟁기관현황

- 포도의 기능성을 증강시킨 제품은 국내에서 출시된 바 없음
- 건강뷰티 음료는 콜라겐 함유 제품, 식이섬유 함유 제품이 주종을 이루고 있음 (예, CJ, 롯데칠성, 한국야쿠르트, 풀무원 등)

#### ○ 지식재산권현황

- 레스베라트롤의 피부 미용 개선 기능과 관련한 특허 출원 등록 건수는 252건이며, 이 가운데, 음료 또는 드링크로 등록된 특허건수는 극소수임.

- ① 레스베라트롤을 생산하는 벼 유래 캘러스의 나노분말을 포함하는 피부미백용 조성물 (공개)
- ② 땅콩새싹의 레스베라트롤 함량 증대 방법 및 땅콩새싹의 레스베라트롤 함유 식품 (공개)
- ③ 혼합 생약재 추출물을 유효성분으로 포함하는 노화방지, 피부미백용 조성물 (등록)
- 피부 미용 음료로 검색할 경우, 846건의 특허가 등록된 것으로 나타났음. 과일을 이용한 피부 미용 제품관련 특허는 430건 임. 가장 많이 활용된 소재는 콜라겐, 녹차, 인삼, 한방소재 등 순임. 그러나 포도를 주원료로 사용경우는 1건임.
- ① 적포도잎 추출물, 베리 혼합물 및 셀레늄을 함유하는 항산화용 조성물 (등록)
- 피부 미용음료가운데 한약소재를 활용한 특허 등록, 공개 경우는 202건이며, 과즙과 혼합하여 제조한 경우는 86건 이었음. 포도과즙을 활용한 경우는 검색되지 않음.

○ 표준화 현황

기술	관련업체 (국내)	국내전문가 및 연구기관	국내 연구인프라 수준	국내 표준화 수준
생물전환 기술 (polydatin으로부터 resveratrol 생성)	해당없음	-생명공학연구원 이우송 박사 - 전남대학교 김영민 교수팀	- 전반적인 생물전환 기술은 선진국의 60~70% 수준이나 polydatin 등 beta-glucoside를 제거하여 aglycones으로 만드는 효소의 분리, 특성연구 등은 아직 미약한 상태임	해당없음
안티에이징 분석 기술 (생체 모델계 항산화 효소계 유도활성 평가 등)	(주)아모레퍼시픽, (주)더마프로, 한국피부임상과학연구소	- 서울대학교 약학대학 (서영준 교수연구팀) - 서울대학교 농생명과학대학 이기원 교수팀 - 한국	- 선진국 (미국, 일본)의 80% 수준으로 평가됨 - 단순 분석은 선진국과 유사한 수준이나 기전을 밝히는 연구는 다소 낮은 편임 (예, 특정 유전자의 knockout model 동물의 제조)	- 물리적인 평가지표 등은 개발되어 있음 - 분자생물학적 기전관련 지표 및 분석 방법도 대체로 확립되어 있음.
미백효능 평가 기술	(주)아모레퍼시픽, (주)더마프로, 한국피부임상과학연구소	- 경희대학교 피부생명공학센터	- 선진국 수준과 대등함	- 효능 평가지표, 지표 성분 분석방법, 효능평가 방법 등이 확립되어 있음
과일 음료에 한방 소재 접목 기술	(주)풀무원 (주)인성제약		-제품개발 자체는 국내 최고 수준이나 최종제품의 효능을 고려한 제품으로 보기 어려움	

나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

- 국외에서는 포도 껍질이나 땅콩껍질에 함유된 piceid (polydatin)으로부터 포도당을 제거하여 resveratrol을 생산하는 기술이 개발되어 상용화되어 있음 (Chen *et al.*, Bioprocess Biosyst 2014; Kuo *et al.*, Catalysts 2016).
- 레스베라트롤이 피부건강에 유효하다는 증거는 많은 연구에서 확인되었으며, 특히 레스베라트롤의 항산화, 항염증, 항균 활성, 항암활성 등이 피부건강 (안티에이징, 피부암 예방)과 연



관이 깊은 것으로 보고됨 (Baxter RA, J Cosmetic dermatol, 2008). 특히 여러 연구에서 자외선에 의한 피부 손상을 억제하는 활성이 높은 것으로 보고되었음.

- 한약원료로부터 안티에이징, 미백 효능 등 뷰티 건강 활성을 나타내는 소재 또는 성분을 탐색하는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 이를 통하여 *Sophora japonica* (회화나무), 나팔꽃, 밀화두(密花豆) 추출물이 tyrosinase 저해활성 높은 것으로 보고되었으며 (Wang et al, J Ethnopharmacol 2006), 안티에이징 효과가 있는 식물성 성분으로 aoin, ginsenoside, curcumin, epicatechin, asiaticoside, ziyuglycoside I, magnolol, gallic acid, hydroxychavicol, hydroxycinnamic acids, hydroxybenzoic acids 등이 잘 알려져 있음 (Mukherjee *et al.*, Phytomedicine, 2011).

표 1. 안티에이징 효능이 보고된 식물 종류

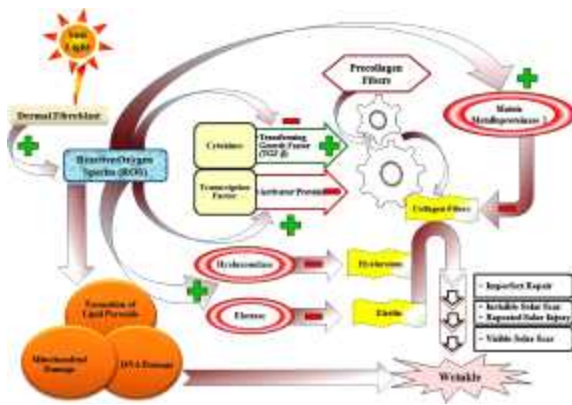


그림 4. 피부노화 기전 (Mukherjee *et al.*, Phytomedicine, 2011).

S. no.	Name of the plants and family	Part used	Possible mechanism of action
1.	<i>Azadirachta indica</i> L. (Simarubaceae)	Leaves	Caenosis contraction factor
2.	<i>Aloe vera</i> (Liliaceae)	Gel	Inhibit stimulated granulocyte MMPs, inhibit tyrosine hydroxylase and 3- $\alpha$ -hydroxycholesterone oxidase, increase the content of hyaluronic acid, increase the cellular expression of telomerase, reverse transcriptionase
3.	<i>Asparagus membranaceus</i> (Fisch.) Kuntze (Liliaceae)	Leaves	Inhibited expression of MMP-9 and suppress TNF- $\alpha$ induced IL-6 expression
4.	<i>Avicennia officinalis</i> DC. (Berberidaceae)	Berries	Type-1 procollagen expression increased
5.	<i>Calceola affinis</i> L. (Asteraceae)	Flower	Control the activity/increase of MMP-2 and MMP-9
6.	<i>Camellia japonica</i> L. (Theaceae)	Oil	Induce type-1 procollagen synthesis and inhibit MMP-1 activity
7.	<i>Camellia sinensis</i> L. (Theaceae)	Leaves	Suppress UV irradiation induced osteonecrosis, thickening of the epidermis, overexpression of DCX, CK18, MMP-2, MMP-9
8.	<i>Centella asiatica</i> L. Urban. (Umbelliferae)	Whole plant	Improvement of the clinical score for dry and superficial wrinkles, suppress freckles, rhytides and skin erythema, induce type-1 collagen synthesis
9.	<i>Citrus sinensis</i> L. (Rutaceae)	Fruit	NF- $\kappa$ B and AP-1 translocation and procaspase-3 cleavage
10.	<i>Curruligo-archivalis</i> G. (Hydrocotylaceae)	Rhizome	Inhibited MMP-1 expression
11.	<i>Cyclocarya baigi</i> L. (Zingiberaceae)	Rhizome	Inhibited MMP-2 expression
12.	<i>Cyclocarya wankhensis</i> Rehd. (Zingiberaceae)	Rhizome	Inhibited MMP-1 expression
13.	<i>Dioscorea oppositifolia</i> L. (Dioscoreaceae)	Rhizome	Increase bromodeoxyuridine uptake and intracellular cAMP level in keratinocytes
14.	<i>Fimbristylis indica</i> L. (Euphorbiaceae)	Fruit	Inhibited type-1 collagen, increase MMP-1 level
15.	<i>Ficus religiosa</i> L. (Moraceae)	Leaves	Decreased the MMP-1 mRNA expression
16.	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L. (Fabaceae)	Seeds	Inhibit melanosome pigmentation. Prevented the activation of caspase-3 pathway
17.	<i>Aspergillus perakensis</i> Rehd. (Trichothecaceae)	Rhizome	Inhibition of UV induced phosphorylation of tyrosine activated protein kinases
18.	<i>Labiata perfoliata</i> (Lamiaceae)	Root	Inhibition of TRP- $\alpha$ , COX-2, MMP-1 and MMP-9 expression

○ 시장현황

- 글로벌 미용음료 시장은 2015~2019년 기간 동안 연평균 11% 안팎의 높은 성장세를 이어갈 수 있을 것으로 전망됨. 따라서 2015년에 글로벌 미용음료 시장이 총 50억 달러 규모의 시장을 형성한 것으로 잠정 추정됨.
- 프랑스 음료회사 SBED社가 지난해 선보인 미용음료 ‘아무르 보떼 아르모니’(Amour Beaute Harmonie)는 구기자, 아세로라, 파인애플, 당근, 체리, 키위 등의 추출물과 콜라겐을 주성분으로 함유해 피부의 보습도 및 탄력을 높이고 주름을 개선해 주는 제품으로 여성들에게 크게 어필했음. (<http://www.beautynury.com/m/news/view/70778>)
- 미용음료 시장이 빠르게 성장하는 데 추진력을 제공해 줄 핵심적인 요인으로 조기(早期) 노화 경향을 꼽힘. 특히 갈수록 악화되고 있는 공기오염과 함께 뻑뻑하고 스트레스로 가득찬 현대인들의 라이프스타일이 조기노화를 가속화시키고 있고, 실제로 지금까지 진행된 연구결과들에 따르면 공기오염은 대기 중 퀴논(quinones) 성분을 수치를 높여 반응성 산소종 또는 활성산소의 생성이 촉진되고, 이로 인해 노화가 가속화될 수 있다는 사실이 입증된 바 있음.
- 다국적 시장조사/컨설팅기관 테크나비오社(Technavio)는 소비자들 사이에서 천연물 기반 뷰티음료를 선호하는 경향이 부각되고 있는 현실도 시장이 볼륨을 확대하는 데 호재로 작용하고 있다고 평가하였음.
- 유형별로 볼 때 단백질 기반 미용음료가 지난 2014년도에 전체 시장의 45%를 차지해 최대의 시장 세어를 점유했고, 단백질 기반 미용음료 시장 가운데서도 가장 높은 시장점유도를 기록한 것은 피부를 환하고 탄력있게 유지하도록 돕는 콜라겐 기반

미용음료이었음.

- 글로벌 마켓에서 주요 미용음료 소재는 collagen, aloe vera, **resveratrol**, omega-3 fatty acids, vitamin E, lutein, lycopene, green tea extract, antioxidants, peptides 등 임.

○ 경쟁기관현황

- Preventiv Water's 의 'EVR'음료는 적포도주 1병에 함유된 양과 같은 양의 resveratrol을 함유하도록 개발되었음 (2010).
- Glanbia Nutritionals 은 비타민, 무기질 등을 베이스로 각종 피부 미용관련 기능성 원료를 혼합한 premix를 판매하고 있음.
- 안티에이징 소재를 활용하여 히트를 치고 있는 FIX 제품은 특허를 받은 choline-stabilized orthosilicic acid (ch-OSA)를 주원료로 하고 있음.
- Skinade 제품은 collagen, vitamin C, B vitamins, omega-3, 6 지방산을 함유하고 있으며, 동 사의 Fountain Beauty Molecule 제품은 항산화성분으로 '건강과 장수'를 도모하는 resveratrol을 함유하고 있는 것을 강조함.



○ 지식재산권현황

- 레스베라트롤의 피부 미용 개선 기능과 관련한 특허 출원 등록 건수는 6,349건이며, 이 가운데, 음료 또는 드링크로 등록된 특허건수는 686건으로 국내 수준과는 대조적임.
  - ① DIETARY SUPPLEMENT DRINK FOR DELIVERY OF RESVERATROL AND OTHER POLYPHENOLS (레스베라트롤과 다른 폴리페놀의 전달을 위한 건강 보조 식품 음료) (PCT 특허, 2010)
  - ② RESVERATROL AND/OR GRAPE LEAF EXTRACT AS I. A. ENDURANCE IMPROVER, ANTI-AGING AGENT, MUSCLE STRENGTH IMPROVER (I. A. 내구력 개량하는 사람으로서의 레스베라트롤 그리고/또는 포도잎 추출, 항노화제, 근육강도 개량하는 사람) (미국 특허, 2009)
  - ③ FUNCTIONAL HEART-HEALTHY DRINK CONTAINING WINE AND EXTRACTS OF HOPS (홉의 포도주와 추출을 포함하는 기능적 심장 건강 음료) (PCT 특허, 2012)
- 피부 미용 음료로 검색할 경우, 25,687 건의 특허가 등록된 것으로 나타났음. 과일을 이용한 피부미용 제품관련 특허는 8,497 건 임. 가장 많이 활용된 소재는 콜라겐, 녹차, 인삼, 한방소재 등 순임. 그러나 포도를 주원료로 사용경우는 3,349 건임. 가장 많이 활용된 소재는 베리 녹차, 인삼, 선인장, 석류, 아세로라 등임.
  - ① Dietary supplements containing dehydrated cactus fruit juice and ginseng berry juice (탈수 선인장 열매즙과 인삼 장과 즙을 포함하는 건강 보조 식품)

- 피부 미용음료 가운데 과일과 한약소재를 활용한 특허 등록, 공개 경우는 2,150 건이며, 포도과즙을 활용한 경우는 999건으로 검색됨.

### 3. 연구수행 내용 및 결과

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	코드번호	
			D-05	
			연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2016)	제1세부 가공처리 공정기술 개발 및 건강뷰티음료 제품화	선정된 과일류 및 한 방자원의 추출 조건 및 공정조건 확립	지역주요 과일류 및 한방자원의 선정	지역주요 과일류 7종 및 한방자원 384종 선정
			활성 소재의 추출조건 확립 및 최적화	활성 소재의 추출조건 확립 및 최적화 완료
			포도껍질, 씨로부터 레스베라트롤 및 카테킨 추출 조건 확립	포도껍질, 씨로부터 레스베라트롤 및 카테킨 추출 조건 확립
			포도껍질에 존재하는 piceid의 생물전환 기술 확립 (cellulase 효소 등)	포도껍질에 존재하는 piceid의 생물전환 기술 확립 (cellulase 효소 등)
			대규모 추출 조건 설정	대규모 추출 조건 설정 완료
			관능검사	1차 recipe 관능검사 완료
	제1협동 항산화·항노 화 활성 평가 및 기전 규명	소재선정 및 선정소재 의 항산화 활성 평가	지역주요 과일류 및 한방자원의 선정	지역주요 과일류 7종 및 한방자원 384종 선정
			다양한 추출물 및 원료 베리류 유래 기능성 성분의 세포모델계 항산화 (효소계) 유도활성 평가 (Nrf2, HO-1, NQO1등)	다양한 추출물 및 원료 베리류 유래 기능성 성분의 세포모델계 항산화 (효소계) 유도활성 평가 (Nrf2, HO-1, NQO1등)
			생물전환 포도시료, 한방소재 및 1차 개발 음료의 항산화 활성 및 세포모델계 안티에이징 효과 및 항산화 효소계 유도 활성 검증	생물전환 포도시료, 한방소재 및 1차 개발 음료의 항산화 활성 및 세포모델계 안티에이징 효과 및 항산화 효소계 유도 활성 검증
			1차 recipe 결정	1차 recipe 완료
	제2협동 한약재 건강뷰티음료 의 미백 및 혈행개선 활성 연구	소재선정 및 선정소재 의 미백 활성 평가	지역주요 과일류 및 한방자원의 선정	지역주요 과일류 7종 및 한방자원 384종 선정
			선정된 지역한방자원 및 생물전환 한방자원의 미백 활성 평가 (사람 피부 조직 유래 세포 활용)	선정된 과일류 및 한방자원의 미백활성평가를 통해 4종의 후보소재 선정
활성 소재의 미백 관련 작용기전 규명			후보소재의 미백 작용기전 (melanogenesis 저해기작) 규명을 통한 후보소재의 효능 확인	

			코드번호	D-05
구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
2차 년도 (2017)	제1세부 가공처리 공정기술 개발 및 건강뷰티음료 제품화	건강뷰티음료 레시피 개 발 및 자동화 공정 확 립	• 최대효능 발현을 위한 레 시피 설정	- 최적레시피 설정 (주름방지, 미백 외 3종)
			• 자동화 공정 최적화	- LAN standard process 확립 및 자동화 공정 최적화
			• 시제품 개발	- 시제품 개발 (주름방지, 미백 외 3종)
			• 제품화 기술개발	- 제품화 및 전시회 홍보
	제1협동 향산화·항노 화 활성 평가 및 기전 규명	항노화(안티에이징) 활 성 평가	• 세포모델계 실험결과 기반 건강뷰티음료 레시피 set up	- 효소처리한 포도과피를 이용하여 음료 제조 (레스베라트롤 강화된 음료 제조)
			• 다양한 건강뷰티 음료 레 시피에 대한 향산화효소 유도활성 및 안티에이징 지표 변화 평가 (세포 및 동물모델)	- 포도과피로부터 레스베라트롤 생산 및 추출방법 확립 (SCI급 논문투고 완료, 특허출원 1건) - 세포, 동물모델계 포도과피 추출물, 레스베라트롤의 안티에이징 효능 평가 완료 (논문 투고중)
	제2협동 한약재 건강뷰티음료 의 미백 및 혈행개선 활성 연구	미백·피부혈행개선 활 성 평가	• 苦味 제거 기술 개발 (레 시피 조절-관능평가 포함, 나노에멀전 검토)	- 과즙첨가를 통한 고미소재 혼합시 제거 방법 개발 진행 중 (포도, 배, 블루베리 등)
			• 혈행개선 활성평가	- 한약재(복분자, 현초, 호도육, 계지, 단삼)의 미백 및 혈행개선 효능확인
			• 한방자원 또는 생물전환 한방자원의 배합비 설정	- 한방자원의 배합비 설정
				• 배합비에 따른 효능 평가 (미백활성 및 혈행개선활 성)
• 유효성분 분석				- 유효성분 분석
3차년도 (2018)	제1세부	건강뷰티음료 디자인 개발 및 상품화	- 디자인 2종 (미백,주름,동안)	- 디자인 3종 완료
			- 제품 2종 (미백,주름,동안)	- 제품 2종 (영업 미팅중) 제품 1종 (OEM 판매중)
			- 전시회 참가 2회	- 전시회 참가 2회
	제1협동	출시제품의 항노화 활 성 유효성 평가	- 출시제품에 대한 효능평가 (혈액 샘플의 항산화능 25% 이상 증가)	- 출시제품에 효능평가 및 타사 제품과 비교평가
			- 시판 타사 제품과 비교평가	-SCI급 논문 2건(심사중)
	제2협동	출시제품의 미백 효능 평가	학회참가 및 학회지 논문 투고	미백효능관련 보고서 1건을 제출하고, 학회에 관련주제로 1건 발표함

# 세부 연구 수행 결과

## [제1세부: 김재식헬스푸드(주)]

### I. 건강뷰티음료 레시피 개발 및 자동화 공정 확립

#### 1. 최대 효능발현을 위한 레시피 설정

##### 1.1. 건강뷰티음료 최적 레시피 설정을 위한 brain storming

( 10人 참석: 학계2, 업계3, 소비자5 )

##### 1.1.1 Brain storming 및 소비자 평가 분석

- 1) 건강뷰티: 말만 뷰티. 해독효과. 뷰티효과가 있을 것처럼 현재 보충되고 있으며 심리적 효과에 크게 기여. 이거 먹으면 건강 뷰티 될 것이다.
- 2) 의사 : 건강 뷰티. 신선한 과일 야채
- 3) 날것으로 먹는 것이 반드시 많은 영양소를 내포하는 것이 아님.
- 4) Formulation  
 목적 上. 좋다. 화장실에서 편하다  
 生食이다. 개운하다 등 직접적인 건강뷰티에 효과적인 요소가 다분해
- 5) 소화 잘 되는데 위가 아프다.  
 여성호르몬에 좋은 거 같다는 적극적인 표현도 다수
- 6) 인기 ↑이유  
 건강뷰티 : 식습관 불균형, 심리적 효과,  
 건강뷰티음료 주스 수율이 높다. 기술서 광고 회사에서 행할 필요가 있음
- 7) 다양한 과일 · 채소의 혼합보다는 주름방지, 미백, 동안의 효능 추출물을 협동기관에서 개발하고 이를 Base로 맛과 색, 점도 중심의 원료로 혼합하여 완성하는 것이 가장 좋겠음.

##### 1.1.2 시판뷰티음료분석

#### 1) 사용원료 分析(시판제품)

원료	빈도	원료	빈도	원료	빈도	RANK	
						원료	빈도
사과	34	코코넛워터	2	정제수	11	사과	34
토마토	9	바닐라빈	1	꿀	1	당근	17
당근	17	꿀	3	양파	1	배	16
브로콜리	7	케일	9	매실액	1	파인애플	15
바나나	6	햄프시드	1	오이	2	양배추	10
밀싹	6	갈라만시	2	자몽	1	토마토	9

레몬	12	마키베리	1	메이플시럽	1	케일	9
파인애플	15	카카오닙스	1	카오페퍼	1	비트	9
딸기	3	비트	9	저지방우유	1	브로콜리	7
오렌지	4	적채	1	계피가루	1	생강	7
배	16	블루베리	4	VitC	4	바나나	6
시금치	5	생강	7	신선초	1	밀싹	6
양배추	10	핑거루트	1	파슬리	1	시금치	5
콜리플라워	1	치아씨드	1	두유	1	블루베리	4
라즈베리	1	골드키위	2	서리태	1	오렌지	4
크렌베리	3	망고	2	흑임자	1	VitC	4
샐러리	3	파프리카	2			딸기	3
아몬드	1	아로니아	2			크렌베리	3
						샐러리	3
						꿀	3

- ① 뷰티음료 사용 원료 중 가장 빈도수가 높은 것은 사과>당근>배>파인애플>양배추 등의 순
- ② 사과의 경우 피부미용에도 좋으며 가격도 1,000원/kg 미만으로 사용 소재로는 매우 우수
- ③ 보통 뷰티음료의 경우 당도가 8~15 정도이므로 평균 당도 13~14인 국내산 사과의 경우 단맛 소재로도 가장 우수
- ④ 기타 채소 건강 이미지의 당근, 양배추가 많이 사용되었으며
- ⑤ 수입산 소재의 경우 단맛, 색으로 인해 파인애플이 가장 빈번하게 사용됨.

2) 건강뷰티음료 시판 색 & 대표상품의 이화학적 분석 및 관능 검사상 문제점 보완

색	당도	주원료	대표상품	관능 검사상 문제점 보완
적색	8.6	비트	Juice.CO	점도↓, 생강향, 흠맛, 조청, 맛없다
주황색	12.9	당근.토마토	커버스핏클렌저	인공맛, 파인애플, 박카스맛, 맛있다, 시원한 주스의 뷰티음료아님
노랑색	15.0	파프리카, 사과, 호박, 꿀, 파인애플	참들	바나나, 배 곶죽
초록색	9.1	브로콜리, 밀싹, 시금치, 케일, 양배추	FRANK	색 좋음, 달다, 파인애플소스,
보라색	13.8	블루베리, 크렌베리, 딸기, 아로니아, 포도	클렌즈퍼플	그런대로 향↑, 오이 포도베이스 곶죽, 아로니아가루맛, 일반적인맛, 위험 why, 농도good
흰색1	14.7	코코넛밀크, 우유, 꿀, 계피	FRANK	코코넛+ 우유(저지방), 꿀,
흰색2	13.9	코코넛밀크, 우유, 꿀, 계피		너무 달다. White Juice 맛있다 아이스크림(바닐라아이스크림) 아몬드고소한맛, 쿠키

시판 뷰티음료로는 적색부터 초록, 보라, 흰색까지 다양한 색상을 나타내었으며 당도도 8-15 정도로 마시기에 너무 달지도 않고 적당한 수준이었다.

### 3) 시판제품의 판매 단가 분석

제 품 명	100ml당/단가(원)
아침대용식클렌즈주스 plan D (피부미용)	1,446
휴롬클렌즈주스 프로그램 (피부미용)	2,550
한솔 바이오한방	1,326
푸드앤비	2,550
참들	2,150
올인원 클렌즈 주스 (피부미용)	1,520
해피스무디	1,895
프랭크주스 클렌즈 DAY (피부미용)	1,656
커피스 핏 클렌즈 주스(피부미용)	1,973
주스엔코	2,290



### 1.1.3 최적 레시피 설정

#### 1) 음료소재 특성

- 사과, 배, 파인애플 ... 단맛
- 당근 ... 색↑,맛→채소의 대표
- 녹색 ... 브로콜리, 케일, 시금치, 양배추, 밀싹
- 바나나 ... 점도↑,맛↑(당도), 맛 조화
- 레몬 ... 신맛↑, 색 유지(like vit c)
- 딸기, 오렌지 ... 큰 특색 없음
- 샐러리 ... 향
- 빨간색 ... 비트
- 노란색 ... 파프리카(유기농,무농약)

#### 기능별 음료 소재 구성 예)

- Dite(노랑) ... 깔라만시, 치아씨드, 파인애플, 햄프씨드, 자몽, 사과, VitC, 오렌지
- 미세먼지(보라) ... 베리base, 연구개발품, 블루베리↑
- 변비(연두/초록) ... 바나나, 당근, 비트, 토마토,꿀
- 숙면(붉은계열) ... 상추, 브로콜리, 시금치, 양배추, 밀싹, 케일, VitB, 체리, 바나나, 생강, 파인애플
- 흰색 ... 모방

#### 2) 레시피 설정 및 제품개발 주요 Point

- 당도 9~13Brix
- 산도. 살균가능. 사과이상 esp, 채소음료의 경우 과일혼용으로 ph3-4정도의 위치
- 점도↑ juice plan~클렌즈 엘로우
- 제품종류 : 커브스핀클렌저, 엘로우튜브, 주스플렌, 뷰티엘로우, 밀싹주스, 주스에코, 커브스 깔라만시, me오렌지, 참들 화이트주스, 참들 뷰티블루
- 주름방지, 미백, 동안 등의 효능 추출물을 Base로 하여 일반적인 과일과 채소를 사용.

#### 3) Formulation

- 충분리 많으면 안됨, 5~8개 종류별로 Formulation, 3개 공통 생산 Recipe로 사용
- 중복되는 원료가 많음

#### 4) 각사별 3가지 선별 (각자 관능검사)

관능요원	BEST 3 선정
김재식	커브스핀뷰티(오렌지), 옐로우튜브,쥬스플랜 (글로시리프)
최규현	뷰티 옐로우, 커브스핀뷰티(오렌지), 커브스핀뷰티(옐로우)
김은정	커브스핀뷰티(오렌지), 밀싹주스, 쥬스플랜(글로시리프)
오은영	쥬스에코(얼그린),쥬스플랜 (옐로우), 커브스 깔라만시
수연	me오렌지, 참들 뷰티(블루), 참들 (화이트)

5) 용량

250ml~300ml 가 가장 먹기에 부담스럽지 않고 손에 들고 다니기 좋은 것으로 분석, 답변.

6) 뚜껑 : 검정색 선호

## 1.2 Recipe for 건강뷰티음료

### 1.2.1 1차 Recipe for 건강뷰티 (주름방지, 미백기능 추출물 제외)

NO	I	II	III	IV	V
원 료	다이어트	주름방지	변비	숙면	화이트
	노란색	검정/짙은보라색	적색	연두	흰색
호박	12				
사과	38		19	9	
레몬	4				
망고				5	D
치아씨드					O
파인애플	9		3	10	U
오렌지	15				B
크렌베리		3			L
VitC	0.1		15		E
배		37			
복분자		2			B
대추		3			E
MBA					A
캠벨		15			N
오미자		1			S
블루베리		14			
마늘					C
도라지추출액		5			O
바나나	2	20	15	10	P
당근			15		Y
비트			3		
토마토			15		
백포도농축액			10		
상추				2	
브로콜리				3	
시금치					
오이				10	
양배추			5	48	
밀싹					
케일				3	
계	100.1	100	100	100	

## 1.2.2. 제조 Process (LAB)

### 1) 표준 제조 Process의 개발

원료

- 파쇄
- cellulase 0.02%, pectinase 0.01%
- 50°C/1hr
- 10 mesh
- 살균
- 병입

### 2) 제조 방법 상세 설명

원료

- 파쇄...껍질 썰 파쇄, 시금치/케일-85°C/2분 데치기
- cellulase 0.02%, pectinase 0.01%, vitC 0.1%(w/w) 원료 중량 대비
- 55°C/30분...가온
- 20 mesh screening
- 콜로이드밀 (미분쇄)
- 75°C/병입 or 75°C/pouch 충전
- 실온 냉각
- m/o 및 관능검사, 수율 check

### 3) 건강뷰티음료 관능검사

- 다이어트 : 1.선명한 노란색 부족 2.오렌지에 의한 쓴맛
- 주름방지 : 색이 좀 더 선명하게
- 변비 : 이상한 흠 맛
- 숙면 : 물맛

## 1.3 건강뷰티음료 Recipe 개선 및 최대효능 관능검사 발현

### 1.3.1 색 개선 (2차 Recipe) : 주름방지, 미백기능 추출물로 보완

- 레드 - 푸룬농축액이 색을 탁하게 함  
딸기의 비율을 올리고 푸룬농축액을 뺐

NO	I	II	III	IV	V
원 료	다이어트	변비	숙면	주름방지	미백
	노랑색	빨강색	초록색	보라색	오렌지색
사과	50	40	40	28	30
배	20	29	29	40	38
오렌지	15				
레몬	4		5		
파인애플	10	10	20		
갈라만시농축액	1				
비트		5		5	
레즈베리		5			
딸기		11			
케일			2.5		
시금치			2.5		
토마토					20
당근					5
바나나					5
포도				15	
블루베리				10	
허브추출액			1		
미백추출액					2
주름방지추출액				2	
계	100	100	100	100	100

\* 각기 추출액의 Recipe 는 아직도 실험중이며 보완성 수록 않음.



2차 Recipe 실험을 통한 색 개선 실험으로 완성된 건강뷰티음료.

### 1.3.2 맛개선(3차 Recipe)

- 맛이 전반적으로 달아서 파인애플 함량을 조정
- 사과, 배 함량이 비슷하여 비율 조정 함

NO	I	II	III	IV	V
원 료	다이어트	변비	숙면	주름방지	미백
	노랑색	빨강색	초록색	보라색	오렌지색
사과	53	33	42	40	30
배	22	42	30	30	38
오렌지	17				
레몬	5		8		
파인애플	3	3	5		
갈라만시농축액	5				
비트		5		5	
레즈베리		2			
딸기		15			
케일			5		
시금치			10		
토마토					20
당근					7
바나나					5

포도				15	
블루베리				10	
허브추출액			5		
미백추출액		5			5
주름방지추출액				5	
계	105	105	105	105	105

### 1.3.3 효능개선

1) 미백효능원료 쓴맛(한약재) test...Threshold Value 결정

- 한약재의 쓴맛은 효능과 농도를 고려하여 적절한 재료를 선택하고, 향의 첨가나 차폐는 하지 않는 것으로 한다. 다만, 효능이 좋으며 색과 향이 강한 과일을 차선택으로 택한다.

미백효능원료	농도(%)			
	0.01	0.1	0.2	1
복분자추출물		-	-	+
현초추출물		-	+	+
계지추출물	-	+	+	+
호도육추출물		-	+	+

- 각 구성 원료의 쓴맛 Threshold Value 결정(미백효능원료)

미백효능원료	쓴맛 Threshold Value
복분자추출물	0.1%
현초추출물	0.2%
계지추출물	0.1%
호도육추출물	0.2%

2) Threshold Value에 입각한 미백추출물의 Recipe 예.

미백효능원료	%
복분자(냉동)	0.6%
복분자추출액	0.2%
현 초	0.1%
계 지	0.01%
호도육	0.1%

3) 주름방지효능의 추출물 recipe 생략

1.3.4 각 뷰티음료의 살균조건 극명

→호박즙 base 뷰티음료 살균조건 극명

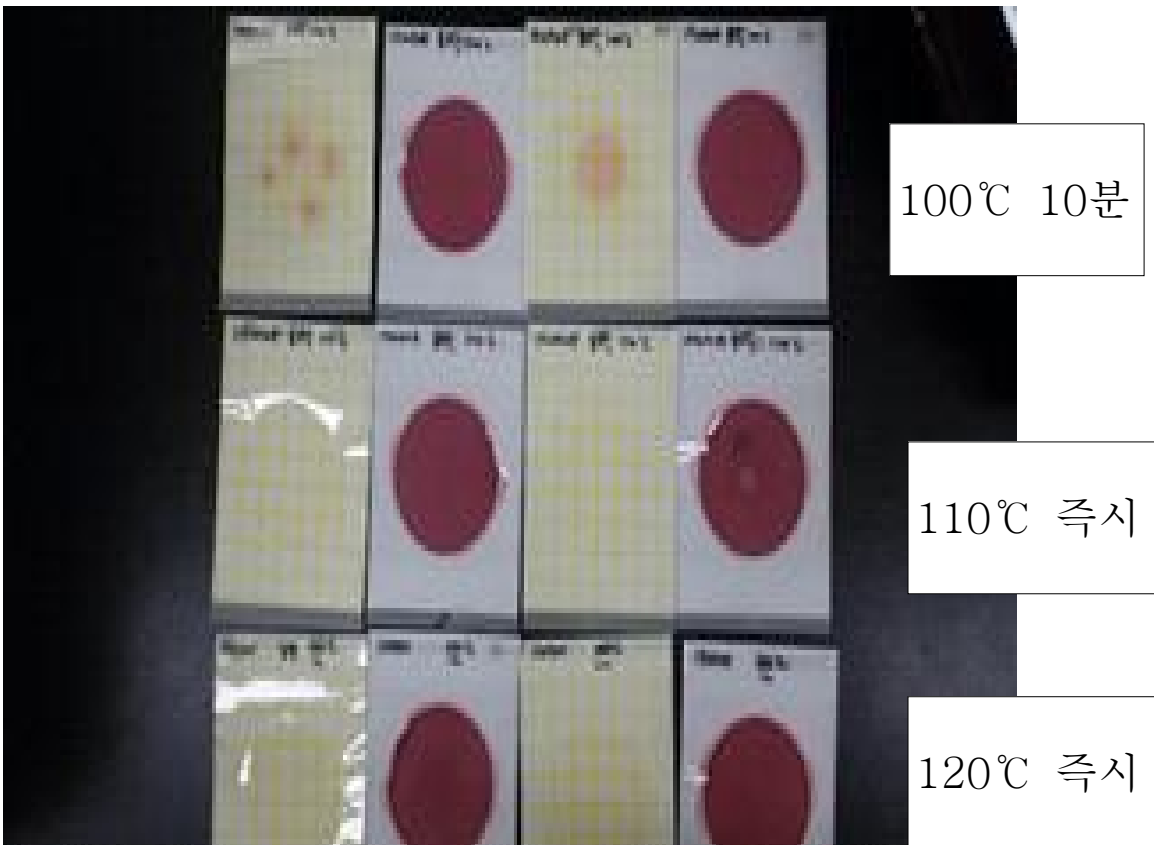
호박즙 (Auto Clave) 조건에 의한 공정 살균 조건 극명

실험1...100℃, 10분 - 일반세균 검출

실험2...110℃, 즉시 - 미검출

실험3...120℃, 즉시 - 미검출

→Test 결과 (3M Paper 사용)



이상의 결과로 100℃ 미만의 일발살균조건하에서는 채소 Base뷰티음료는 미생물살균이 불충분하였고 110℃ 이상의 가압조건하에서만 살균이 가능 하였으며 뷰티음료의 살균에는 HTST 나 UHT 설비가 필요함을 알 수 있었다



### 1.3.5. 최대효능발현을 위한 최종 Recipe (4차)

#### 1) 최대효능발현을 위한 최종 Recipe

NO	I	II	III	IV	V
원 료	다이어트	변비	숙면	주름방지	미백
	노랑색	빨강색	초록색	보라색	오렌지색
사과	56	31	42	30	30
배	22	42	30	40	38
오렌지	17				
레몬	2		8		
파인애플	3	3	5		
깔라만시액	5				
비트		5		5	
레즈베리		2			
딸기		15			
케일			5		
복분자		2	10		
시금치					
토마토					20
당근					7
바나나					5
포도				15	
블루베리				10	
허브추출액					
미백추출액		5	5		5
주름방지추출액				5	
<b>계</b>	<b>105</b>	<b>105</b>	<b>105</b>	<b>105</b>	<b>105</b>

#### 2) 제조 방법

원료

→과쇄...껍질 껌 과쇄, 시금치/케일-85℃/2분 데치기

→cellulase 0.02%, pectinase 0.01%, vitC 0.1%(w/w) 원료 중량 대비

→55℃/30분...가온

→20 mesh screering

- 콜로이드밀 (미분쇄)
- 75℃/병입 or 75℃/pouch 충전
- 실온 냉각
- m/o 및 관능검사, 수율 check

2) 상기 Recipe alc 제조방법으로 시제품 5종을 Lab에서 완성하였으며 각종 식품전시회의 Sample 로 사용하였으며 시음을 적극적으로 실시하였다.



미백 의 시제품 5종



‘독일국제식품전 아누가2017’ 참가

## 2. 자동화 공정 최적화

각 원료의 해동, 가온조건, 효소사용비율, 착즙수율, 살균 등 각 제조 공정별 최적화 실험은 본 과제 1차연도에서 실험을 종료하였으며 1차연도 중간 보고서에 기술 한 바있으며 LAB 및 PILOT Scale 상의 최적화 조건을 1차연도 보고서에서 발췌하여 도식화 하면 아래와 같다.

자동화공정	최적화	적용방법
해동 및 원료전처리	-3℃	봄·가을 : 익일해동 여름 : 당일해동 겨울 : 익일 해동 30L 해동용기 사용
세척 및 파쇄	Ø 1mm Nozzle	3단 세척 및 Hammer 파쇄 Ø1mm Nozzle로 목적 분쇄 도달
가 온	60℃, 1시간 75℃, 10분	각 온도 각시간 방치
효소 분해	cellulase 0.02% Pectinase 0.01% α-amylase 0.01% β-glucanase 0.01% (β-glucanase는 resveratrol의 경우만 사용)	원료무게대비 각 효소 w/w 비율 가온전 T/K 투입
착즙 및 여과	press 방식 screen sieve 방식	30mesh후 미분쇄
살균	과일 base 80~85℃, 20~30분 채소 base 85~90℃, 30~40분	후살균 or 전살균 공히 시행

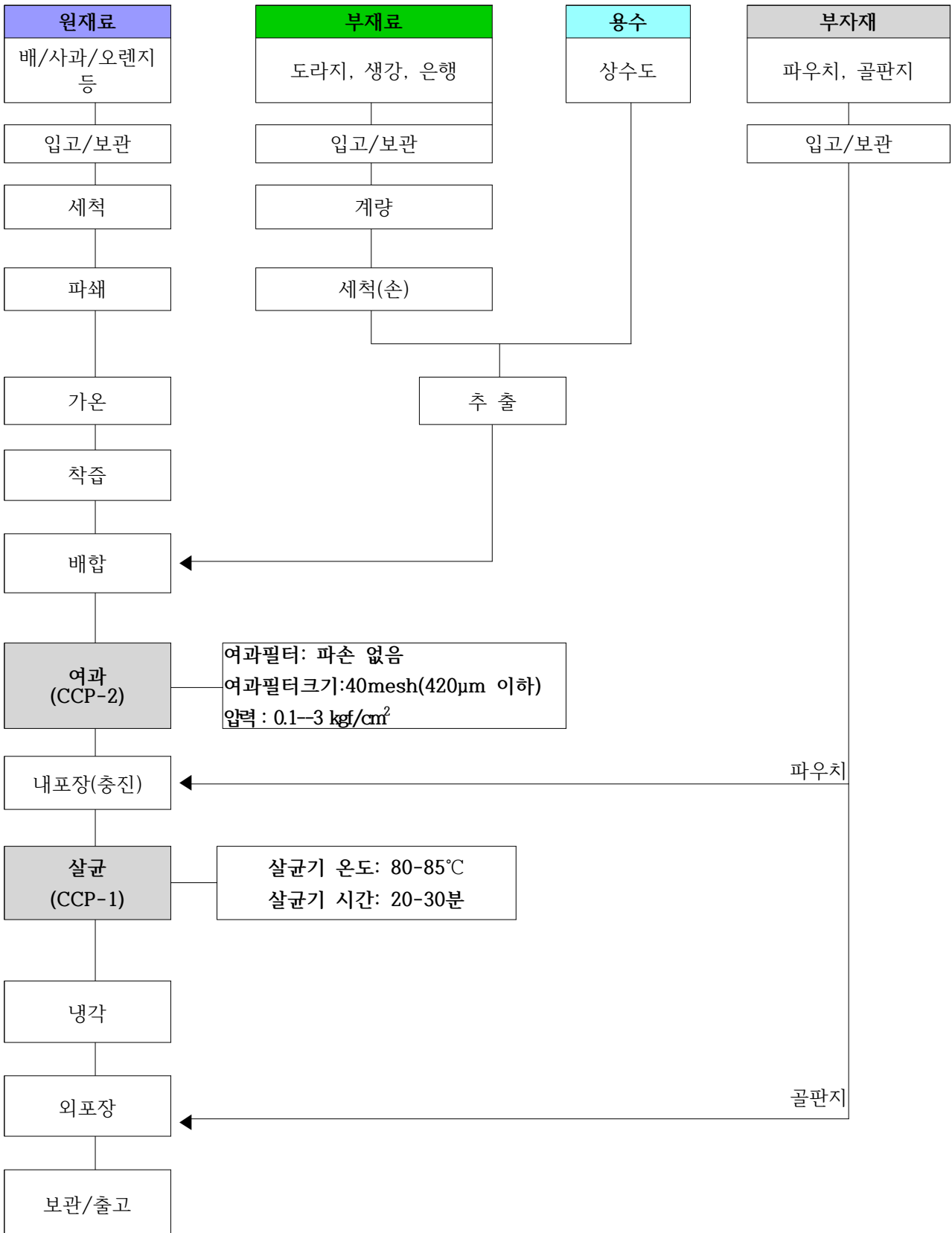
### 2.1. 제품 포장종류별 제조 공정도

- 상기 최적화 제조공정에 의거하여 건강뷰티음료의 시제품 및 상품화 제품의 제조공정도는 파우치 제품과 병·pet 제품으로 나누어 도식하면 아래와 같다.

#### 2.1.1 뷰티 음료 파우치 시제품 제조 공정도

## 2. 자동화 공정 최적화 (자동화공정) : PILOT Scale

### 뷰티음료

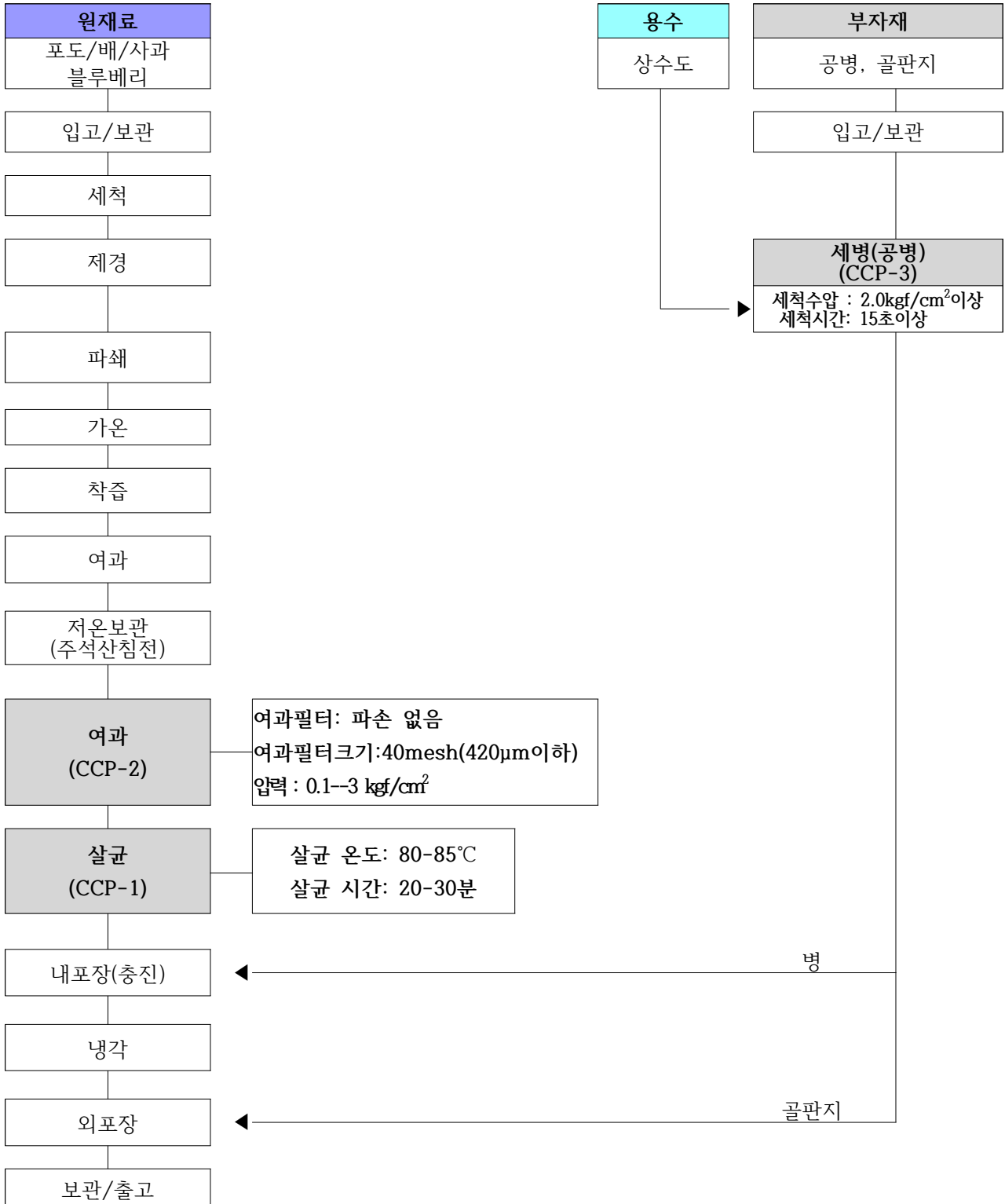


2.1.2 공정별 가공방법 세부설명 (파우치 시제품) : PILOT Scale

일련번호	공정명	제조·가공방법	주요설비/도구
1	원료입고	이송차량의 청결상태 확인, 이물질 확인, 수량확인, 입고전 검사 실시	전자저울
	포장재입고	표시사항 확인, 규격 확인	전자저울
	부자재입고	이송차량의 청결상태 확인, 이물질 확인, 수량확인, 입고전 검사 실시	전자저울
2	세척	1시간전 세척라인에 미리 물을 채워놓고, 계속 물 틀어놓기, 도라지, 생강등은 손으로 세척	세척라인
3	파쇄	파쇄 확인	파쇄기
4	추출	탱크에 승온 및 유지 (부원료 2시간이상 추출)	탱크; 내부 순환 pump,
5	가온	저온 70°C가열 온도확인, 가열시간 30분 확인	탱크
6	착즙	착즙기를 이용하여 착즙	착즙기
7	배합	이물질 혼입확인	비커
8	여과	여과망과 여과 필터를 통해 여과(CCP-2) 후 저장 탱크로 이송 후 가온 (58-60°C)	진동채, 저장탱크, 여과기
9	내포장-파우치	무게확인	포장라인
10	살균	80-85°C, 20~30분 온도 및 시간 확인(CCP-1)	살균조
11	Box 포장	무게 확인	전자저울
12	보관	1일 이상	상온 창고

## 제조공정도

### 과 · 채주스(병, pet 제품)



2.1.3 공정별 가공방법 세부설명 (병 · pet 제품) : 병, Pet 제품 PILOT Scale

일련번호	공정명	제조·가공방법	주요설비/도구
1	원료입고	이송차량의 청결상태 확인, 신선도 및 수량확인, 잔류농약검사성적서 확인, 입고 검사 실시	계근대
	포장재입고	표시사항 확인, 규격 확인	
2	세척	1시간전 세척라인에 미리 물을 채워놓고, 계속 물 틀어놓기	세척라인
3	제경	제경기에서 나온 포도 줄기는 외부로 빼내고 잔여 알맹이는 사용, 제경 하며 이물질 제거	제경기
4	파쇄	껍질과 알맹이가 적당히 분리 확인	파쇄기, Mono-pump
5	가온	저온 70°C가열, 가열시간 30분 확인	가온탱크
6	착즙	빠져나온 액에서 이물질 확인하고 실온에서 냉각한다.	착즙기, 진공솔, 탱크
7	여과	생수통보관전에 타공망으로 여과한다	여과집합조
8	생수통 투입/보관	생수통 투입하여 포장해서 저온 창고 온도유지(0°C), 위생상태 확인	생수통, 냉장창고
9	여과	여과망과 여과 필터를 통해 여과(CCP-2) 후 저장 탱크로 이송 후 가온 (58°C-60°C)	진동채,저장탱크, 여과기
10	포장-파우치	용량 확인	당도계, 포장라인
11	살균	80~85°C에서 20~30분간 살균 (CCP-1)	살균조
12	보관	1일 이상	상온 창고
13	Box 포장	무게 확인	전자저울

## 2.2 실제 제조과정 및 제조 과정 사진 (제1세부 : 주관기관)



(1) 구역별 복장 및 제조 환경 점검

깨끗한 제조 환경을 위해 세척 및 에어살균 등 체계적인 위생 관리법으로 복장을 점검합니다.



(2) 원재료 입고

신선한 원재료로 인정받은 유명한 국내외 지역의 농가들로부터 품질이 좋은 석류만을 입고합니다.



(3) 삼단계 세척

버블세척, 에어세척, 정수세척 등 3단계로 분리된 세척조에서 모든 이물질을 깔끔하게 제거합니다.



(4) 파쇄

파쇄 과정을 통해 과일 색소 추출을 용이하게 하는 롤러 압착 방식으로 제조를 위한 준비를 마칩니다.



(5) 저온 처리

맛과 영양소 파괴를 최소화하는 **특허 제 0341875호로 등록된 공법**으로 엄격하게 온도를 관리하여 단시간 저온 처리합니다.



(6) 착즙

신선한 맛을 보존하기 위해 시골에서 참기름을 짜는 방식인 압착 기술로 착즙합니다.





**(7) 당도 검사**

저온 착즙한 원액을 확인 후 당도 검사를 거쳐 미갈변된 원액을 NR 자동검사기로 선별합니다.



**(8) 충전**

원료 그대로의 영양분과 맛 그대로 한 팩 안에 들어가도록 자동 포장합니다.



**(9) 위생 살균**

저온 추출되어 위생적으로 포장된 제품은 소비자에게 전달되기 전 마지막으로 파우치 상태로 위생 살균 과정을 거칩니다.



**(10) 포장 및 출고**

살균 과정까지 마친 제품은 주문 수량에 따라 정리 후 포장되어 출고됩니다.

### 3. 시제품 개발

#### 3.1. 시제품제조를 위한 최종 Recipe : PILOT & Commercial scale



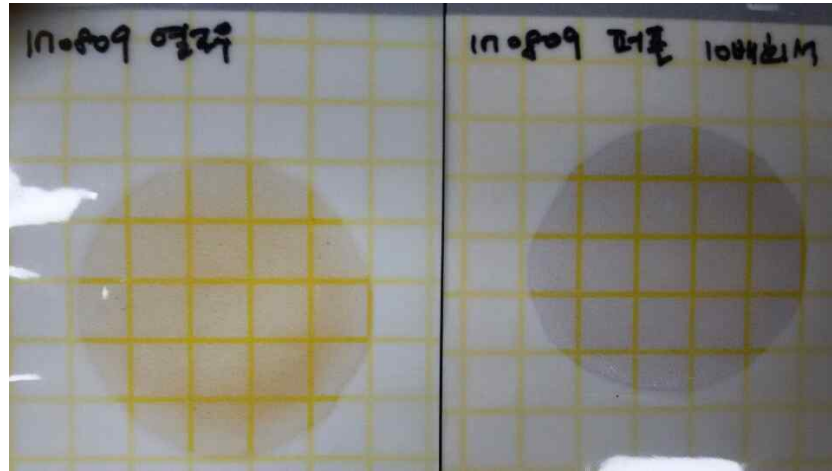
※ 동안Recipe는 3차년도 수행

#### 3.2 제조 방법

원료

- 과쇄...껍질 짜 과쇄, 시금치/케일-85℃/2분 데치기
- cellulase 0.02%, pectinase 0.01%, vitC 0.1%(w/w) 원료 중량 대비
- 55℃/30분...가운
- 20 mesh screering
- 콜로이드밀 (미분쇄)
- 75℃/병입 or 75℃/pouch 충전
- 실온 냉각
- m/o 및 관능검사, 수율 check

#### 3.3 최종 시제품의 미생물검사



공정대로 만든 결과 미생물 검출 안됨

### 3.4 이화학적 분석

	다이어트	변비	숙면	주름방지	미백
	노랑색	빨강색	초록색	보라색	오렌지색
당도(Brix)	11.2	11.5	9.5	13.2	13.8
수율(%)	93	92	87	92	91
ph	3.33	4.04	3.63	4.04	4.48
산도(%)	10	3.4	6.8	2.9	2.5

### 3.5 관능 검사(1차 10명 대상: 통계처리는 수행 않음)

대 상	다이어트	변비	숙면	주름방지	미백
	노랑색	빨강색	초록색	보라색	오렌지색
1	4	4	3	4	4
2	3	4	4	4	4
3	4	3	3	3	4
4	3	4	4	3	3
5	4	4	4	3	4
6	3	4	4	4	4
7	4	3	4	3	4
8	4	4	3	4	4
9	4	3	3	4	4
10	4	4	3	4	4
평균	3.7	3.7	3.5	3.6	3.9

※ 5점 척도법 (1:가장 나쁨~5:가장 좋음)

#### 4. 미백·주름방지·동안음료의 최적화

##### 4.1. 미백·주름방지·동안음료 추출액의 제조

1) 2차년도 연구 결과인 한약재료 중의 미백기능 효과가 있는 것으로 증명된 복분자, 현초, 계지, 호도육을 사용하여 각각의 미백 추출액과 주름방지 추출액을 제조하였으며 그 사용 recipe와 제조 방법은 아래와 같다.

##### 4.1.1 미백, 주름방지, 동안 음료 추출액의 Recipe 및 제조방법

###### 1) 미백추출액

미백추출액 원료	함량(%)
복분자(냉동)	0.6
복분자 추출액	0.2
현초 추출액	0.1
계지 추출액	0.01
호도육 추출액	0.1
물	98.99
	100

###### ▷ 제조방법

- 건조 복분자, 현초, 계지, 호도육
- 파쇄
- 중탕, 100℃에서 24시간 추출 (필요한 경우 EtOH)
- 40mesh 여과
- 핫필링 90℃
- 병입
- 미백추출액

###### 2) 주름방지 추출액

주름방지 추출액 원료	함량(%)
복분자	10
MBA	21
대추	5
오미자	4
오디	5
크렌베리	5
배	30
동안 추출액	20
	100

▷ 제조방법

- Vit C 0.1%, Cellulase 0.05%, Pectinase 0.025%
- 파쇄, 60℃/ 30분
- 20mesh 여과
- 핫필링 90℃
- 포장

3) 동안 추출액

동안 추출액 원료	함량(%)
도라지	40
생강	20
포도씨	1
황기	3
감초	2
계피	20
곰보배추	1
은행	5
대추	8
	100

▷ 제조방법

- 물넣고 2시간 끓이기
- 40mesh 여과

- 다시 물 넣고 1시간 끓이기
- 40mesh 여과



## 4.2. Microencapsulation을 통한 추출액의 쓴맛 감소

미백기능의 복분자, 현초, 계지, 호도육 추출 분말은 각각의 특이한 쓴맛으로 인해 음료에 그냥 첨가해서는 관능검사상 목표치인 3.8이하에 도달하였다. 다양한 Capsule 내지는 Binding 방법으로 이들 물질의 해리를 막고 쓴맛의 정도를 줄여보고자 아래 2가지 방법으로 제조검토하였다.

### 4.2.1 Microcalated Extract (MCE)

복분자, 현초, 계지 호도육 등 쓴맛 추출 물질의 표면은 k-Carrageenan 이나 agar 등으로 Coating 하고 방법으로 실제 예비 실험에서 시행해 본 결과 수용성 물질의 용출이 심하고 음료의 색이 검붉은 갈색으로 변하는 바 채택하기 어려운 점이 있었다.

### 4.2.2 Microencapsulated Extract (MEE)

미백 기능성의 복분자, 현초, 계지, 호도육 등 쓴맛 추출물질을 옥수수 단백질인 zein 등을 사용하고 완전히 싸는 방식으로 아래 자세한 제조과정을 나타내었다.

- 단삼추출분말 4g → 관능검사 (A)
- 옥수수단백질 zein 20% 0.8g (case1)
- 옥수수단백질 zein 100% 4g (case2)


- 200ml 60% E+ OH에 녹임
- Vacuum evaporation (농축기)
- Powder → 굽어서
- 관능검사(B)
- ⇒ A:B의 쓴맛 비교 = 제품에 적용하기 힘들
- 농축기에서 파우더 굽어내기 힘들 ⇒ 60% ethanol 100ml 부어서 ⇒ 배양기에 (case 1)



### 4.3. 미백, 주름방지, 동안음료의 제조

#### 4.3.1 제조메뉴얼

	미백	주름방지	동안
미백추출물	17 (물:미백추출물=16:1)		13.5%
주름방지추출액		18	14.4 (미백:동안추출액=16:1)
아로니아		2	0.4
복분자	3	4.5	0.8
라즈베리		4.5	0.4
크랜베리		3	4
블루베리	80	68	12
석류			54.4
Vti C			0.1
<b>계</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
Cellulase	0.2%		
Pectinase	0.1%		
당도 (brix)	11.3	11.9	13.1
수율 (%)	77	73	67

착즙박량(%)	12	13	15
로스(%)	11	14	18
사진			
관능검사	신맛. 미백추출액을 물로 희석을 많이 하여 멩멍한 맛이 남.	한방 맛이 살짝 느껴지고 신 맛도 살짝 강하게 남. 뭉지 모르게 약간 뽀은 맛이 느껴짐	한방 맛이 강하고, 석류의 새콤한 맛이 진하게 느껴짐

각 원료를 파쇄기 혹은 믹서기로 파쇄하여 가운 T/K로 옮긴다

pectinase 와 Cellulase를 각각 원료 무게의 0.1~0.2%씩 첨가하고 60℃에서 30분간 효소 분해시킨다.

80℃로 승온하면서 잔여 유용물질을 추출하고 효소를 실활시키며 40mesh 채로 여과하여 각각의 미백, 동안, 주름방지 음료를 제조하고 pet, 병, 스파우트로 각각 충전하고 스파우트의 경우 후살균을 실시하여 시제품으로 제조하였다.



이상의 결과에서 관능검사를 실시하였으며 관능검사 결과 5점 척도 기호에서 평균 3.5~3.9점



의 점수를 획득하였다.

## 5. 제품화 기술개발

### 5.1. 시제품 디자인 개발

#### 1) 브랜드 네이밍

전문가가 만들어 믿을 수 있는 제품임을 보여주는 스토리텔링 :

농림축산식품부 지원 연구결과물,  
전문가, 식품공학박사, 착즙 주스

뷰티음료에서 나아가 건강주스로 확장성을 가지는 브랜드 포지션 :

뷰티음료는 전체 주스 시장 점유율이 낮으며 사업의 경쟁력과 확장성을 고려하여 전체 주스 시장을 바탕으로 브랜드



#### 2) 디자인

**미백 Orange**

- 사과, 배, 토마토, 당근, 바나나, 미백성분(추출액)

주스를 통해 피부가 좋아짐을 표!

영양성분	총 100g (100%)
에너지	410Kcal (100%)
탄수화물	100g (100%)
단백질	2g (2%)
지방	0g (0%)
포화지방산	0g (0%)
당류	100g (100%)
총 지방산	0g (0%)
나트륨	2g (2%)

**김재식연구소**  
**컬러클렌징**  
**WHITENING ORANGE**

**미백 효과**    150 KCAL    500ML

내용량 100% 순수 착즙주스

**김재식연구소**  
**컬러클렌징**  
**WHITENING ORANGE**

**미백 효과**    150 KCAL    500ML

내용량 100% 순수 착즙주스



## 5.2. 시제품 홍보

개발된 제품에 대해서 전시회 참가시 각 연령층에 대해 소비자 기호도 조사를 시행 후, 양산할 예정입니다.

### 1) 해외 전시 참가

- 일본 외식비즈니스위크 참가  
2017. 8. 29~ 8. 31



2) 최종 상업화 제품 사진

- 2018. 1월경 미백.주름방지 제품 출시예정



- 2017 퀴른 국제 아누가 식품박람회

2017. 10. 07~ 11



건강뷰티음료



## 6. 제품 제형개발

- 미백음료 주름방지 음료의 병/pet 제품 제형개발 (Commercial scale)

### 6.1. Commercial scale로 미백음료, 주름방지음료의 제조

#### 1) 미백음료

원료명	합량		미백추출액*	합량(%)
	%	kg		
사과	30	750	복분자	0.6
배	38	950	복분자 추출액	0.2
토마토	20	500	현초 추출액	0.1
당근	7	175	계지 추출액	0.01
바나나	5	125	호도육 추출액	0.1
미백추출액*	5	125	물	998.99
	105	2,625		1,000

#### 2) 주름방지 음료

원료명	합량		도라지추출액*	합량(%)
	%	kg		
복분자	10	200	도라지	40
MBA	21	420	생강	20
대추	5	100	포도씨	1
오미자	4	80	황기	3
오디	5	100	감초	2
크렌베리	5	100	계피	20
배	30	600	곰보배추	1
도라지추출액*	20	400	은행	5
			대추	8
			물	
	100	2,000		86

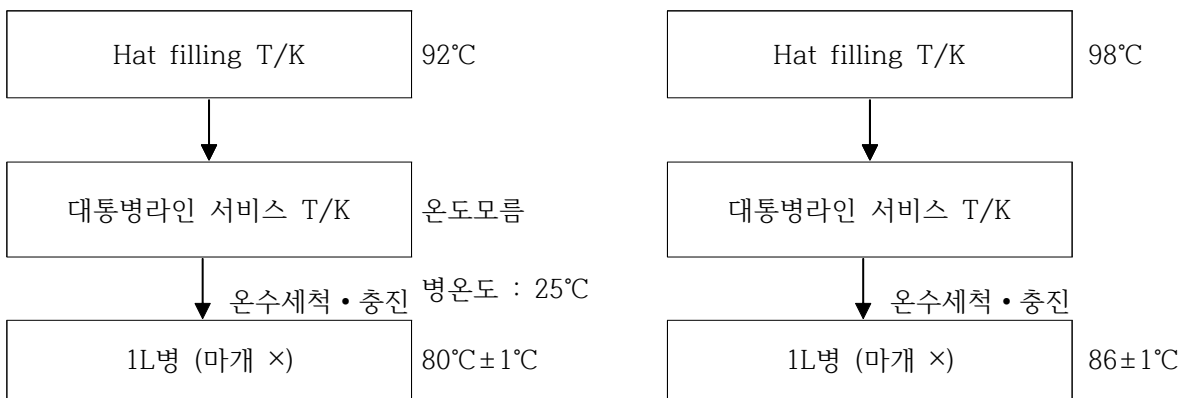
## 6.2. 병제품 공정 Test

### 1) Cloud type 제형 충전 Test

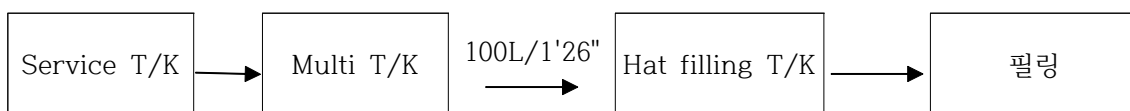
[1차]

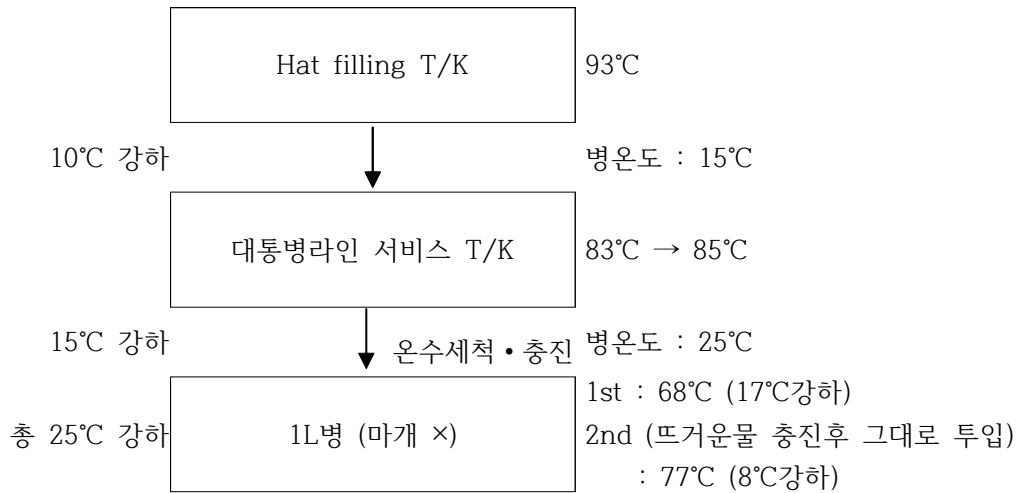
1. 대통병라인 Service T.K : 가온상태

2.



[2차 실험]





[ 결론 ]

pet/병 제품의 Clout type 제형 Test에서 만족할 만한 제형 실험과 더불어 아래와 같은 결론을 얻었으며 스탠딩 파우치(리팩)와 비교하여 아래 요약하였다.

## 7.2. 제품화 기술개발

### 7.1. 클렌징 주스



## 7.2. 미백, 동안, 주름방지음료



### 7.3. 포도씨 포도즙 & 포도씨 블루베리제품의 출시

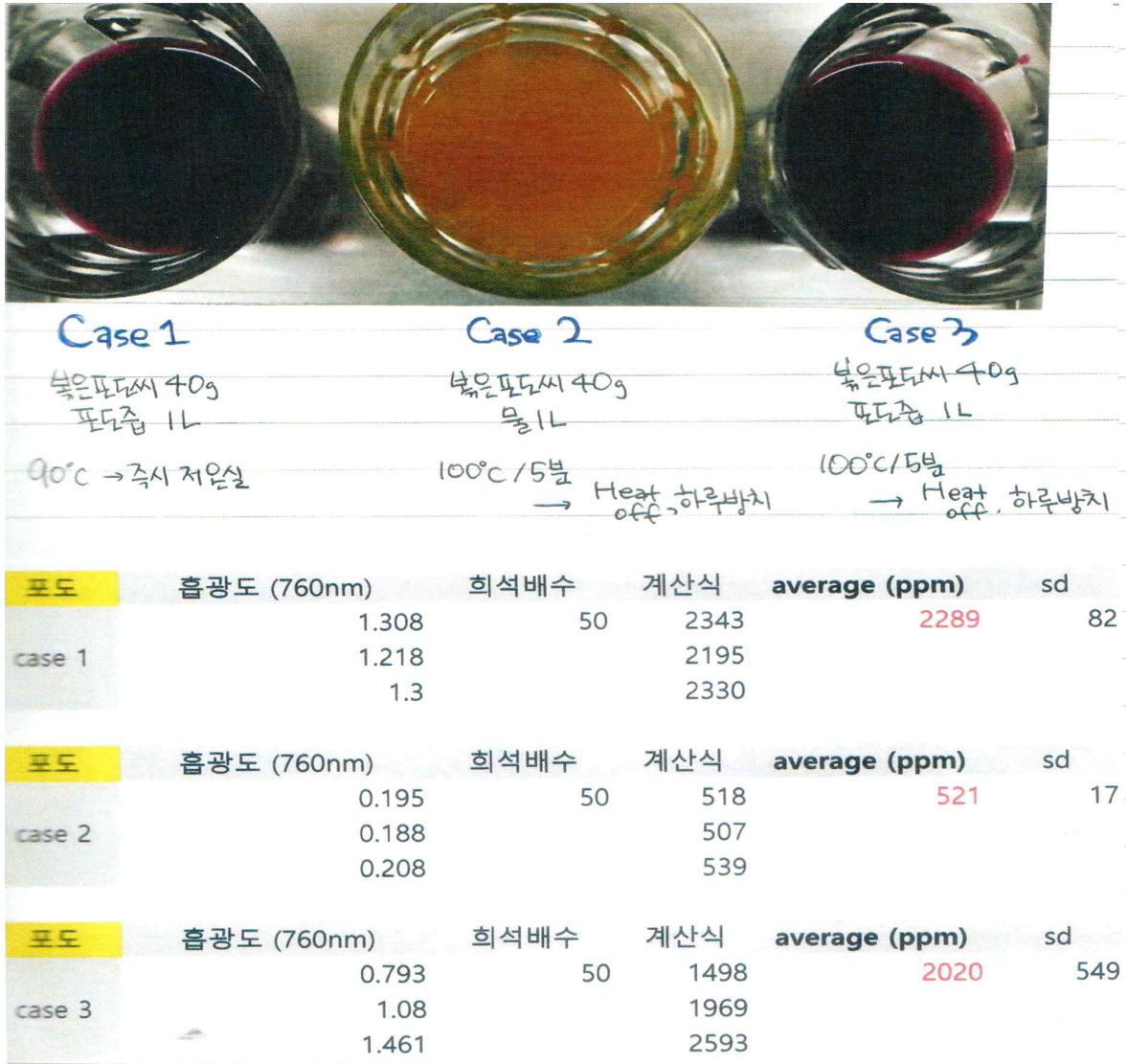
주름방지음료 및 주름방지 추출액의 기능을 포도즙에 접목하여 포도씨포도즙과 포도씨블루베리 제품을 출시하였으며 아래 개발 제품의 특성을 요약하였다.

#### 7.3.1. 포도씨 포도즙 제품

제품명	이미지	폴리페놀 량 (ppm)	당도 (brix)
포도한송이		1,771	15
구)포도한송이		1540	14.6
포도씨포도즙		1557	14.5
포도씨추출액		상등액 1598	-
		섞어서 1895	-
3배 농축 포도씨추출액		5470	-

### 7.3.2. 포도씨 블루베리 제품의 제조

#### 1) 포도씨 추출액의 폴리페놀 함량 비교



#### 2) 포도씨 블루베리즙의 제조 및 관능검사

- ① A. 블루베리즙 90% + 포도즙으로 추출한 포도씨 추출액 10%  
 (포도즙 1400ml + 포도씨 100g)  
 => 그냥 블루베리즙 맛. 포도가 살짝 섞여있는. / 당도는 14.2
- ② B. 블루베리즙 90% + 포도즙으로 추출한 포도씨 추출액 20%  
 => 약간 짙고 신 맛. 당도 15.0brix



	Total polyphenol
물	0
포도즙	400
포도씨 추출액 (물)	900
포도씨추출액 (포도)	920
블루베리	
A	
B	





7.3.3 사업화 ( 최근 1년간 매출액 )

제품종류	품목	사진		매출액 (백만원, 18.02~19.01)
클렌징 주스	변배해결 미세먼지 클렌징 다이어트 숙면 미백		개발종료	0
미백 주스 동안 주스 주름방지 주스	미백 주스 동안 주스 주름방지 주스		개발종료	0
포도씨 응용 제품	포도씨포도즙 ----- 포도씨까지 추출한 블리베리즙		판매개시	201 ----- 158
계				359 백만원

증빙자료

-유명 인스타터가 판매한 “포도씨까지 추출한 블리베리즙” 세금계산서

전자세금계산서					승인번호	20190228-10000000-69123928					
공급자	등록번호	505-81-36735		중사업장번호	공급자	등록번호	505-81-75188		중사업장번호		
	상호(법인명)	법인회사법인 김재식힐스 푸드 주식회사		성명		김재식	상호(법인명)	주식회사 자임트리		성명	김재식
	사업장주소	경상북도 영천시 대항면 봉암길 22				사업장주소	경북 영천시 대항면 봉암길 22				
	업태	제조업	종목	과일류, 과일절		업태	도소매업	종목			
	이메일	podomau2003@naver.com				이메일	ymh3900@hanmail.net				
이메일				이메일	ddaejy@hanmail.net						
작성일자	공급가액		세액	수정사유	비고						
2019-02-28	71,159,272		7,115,928	해당없음							
월	일	품목	규격	수량	단가	공급가액	세액	비고			
02	28	리얼호박씨호박즙				43,077,464	4,307,746	일괄리			
02	28	포도씨까지 추출한 블리베리즙				26,061,818	2,808,182	일괄리			
합계금액		현금	수표	어음	외상미수금	이 금액을 (영수) 함					
78,275,200											

본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 발급 또는 전송 입력된 전자(세금)계산서입니다.  
 발급사실 확인은 상기 홈페이지의 "조회/발급" <전자세금계산서> 제3자 발급사실 조회 "를 이용하시기 바랍니다.

전자세금계산서					승인번호	20181231-10000000-20773426					
공급자	등록번호	505-81-36735		중사업장번호	공급자	등록번호	505-81-75188		중사업장번호		
	상호(법인명)	법인회사법인 김재식힐스 푸드 주식회사		성명		김재식	상호(법인명)	주식회사 자임트리		성명	김재식
	사업장주소	경상북도 영천시 대항면 봉암길 22				사업장주소	경북 영천시 대항면 봉암길 22				
	업태	제조업	종목	과일류, 과일절		업태	도소매업	종목			
	이메일	podomau2003@naver.com				이메일	ymh3900@hanmail.net				
이메일				이메일	ddaejy@hanmail.net						
작성일자	공급가액		세액	수정사유	비고						
2018-12-31	185,320,818		18,532,082	해당없음							
월	일	품목	규격	수량	단가	공급가액	세액	비고			
12	31	호박씨 블리베리즙				185,320,818	18,532,082	일괄리			
합계금액		현금	수표	어음	외상미수금	이 금액을 (영수) 함					
203,852,900											

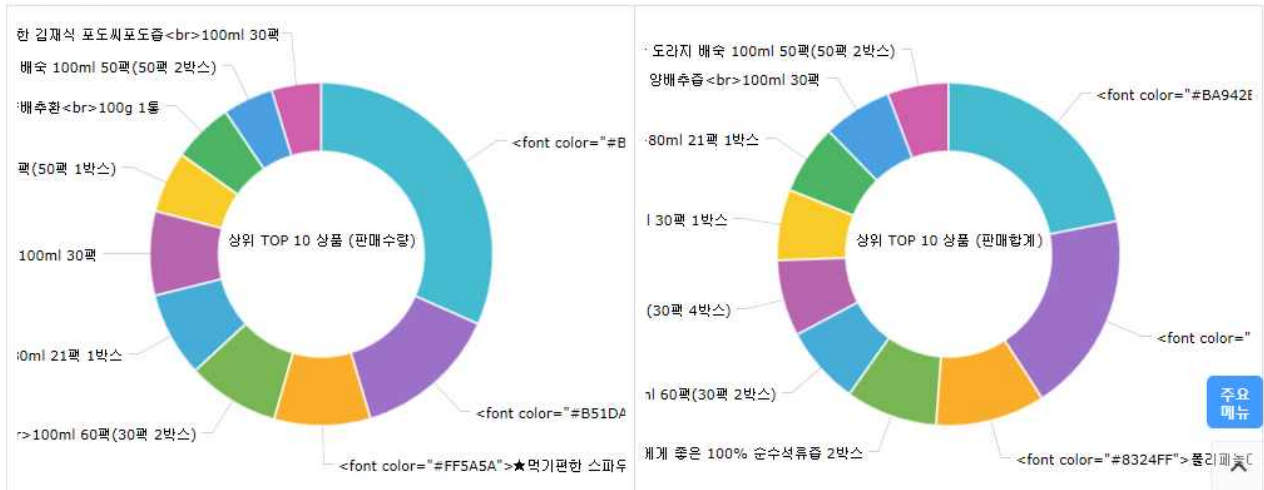
본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 발급 또는 전송 입력된 전자(세금)계산서입니다.  
 발급사실 확인은 상기 홈페이지의 "조회/발급" <전자세금계산서> 제3자 발급사실 조회 "를 이용하시기 바랍니다.

- 당사 홈페이지에서 2019년 1월 한달간 포도씨포도즙 판매 내역 캡처

기간	오늘 3일 7일 1개월 3개월 6개월 2019-01-01 ~ 2019-01-31
상품분류	-대분류 선택 - -중분류 선택 - -소분류 선택 - -상세분류 선택 - <input type="checkbox"/> 하위분류 포함검색
상품	상품명 <input type="text"/> 상품검색
상품 판매가	0 ~ 0
쇼핑몰 구분	<input checked="" type="radio"/> 전체 <input type="radio"/> PC 쇼핑몰 <input type="radio"/> 모바일 쇼핑몰
배송 구분	<input checked="" type="radio"/> 전체 <input type="radio"/> 국내배송 <input type="radio"/> 해외배송

검색

통계 그래프



판매상품 순위 내역

순위	상품코드	상품명/옵션	판매가	재고	결제 수량	환불 수량	판매 수량	판매합계
1	P00000IG	호박은 원래 노랗다 김재식 호박씨호박즙 100ml 30팩 - 선택하세요 : 호박씨호박즙	42,000	-101	635	8	627	26,334,000
2	P00000HM	플리페놀 기준보다 2배! 포도씨를 두번 착즙한 김재식 포도씨포도즙 100ml 60팩 (30팩 2박스)	84,000	-	279	8	271	22,764,000
3	P00000LM	★먹기편한 스파우트 출시★ 미세먼지 해독 특허를 받은 목이 편한 도라지 배숙 100ml 30팩 1박스	45,000	-	188	9	179	8,055,000

# 세부 연구 수행 결과

## [제1협동: 경북대학교]

### 4. 1차년도

#### ■ 세부연구목표 : 소재 선정 및 선정 소재의 항산화 활성 평가

##### 1. 지역 주요 과일류 및 한방 자원의 선정

○ 주관기관의 1차년도 보고서 항목 1.1 지역주요 과일류 및 한방자원의 선정의 수행내역과 중복되고 본 항목을 참여 3개 기관이 공동으로 수행한 관계로 여기서는 보고 생략.

##### 2. 다양한 추출물 및 원료 베리류 유래 기능성 성분의 세포모델계 항산화 (효소계) 유도 활성 평가 (Nrf2, HO-1, NQO1 등)

###### 2.1. 포도 과피의 처리 조건 확립 (항산화 활성 극대화)

###### 2.1.1 포도 과피의 추출조건별 항산화 활성

- 포도 품종별, 주정(에탄올) 농도별 항산화 활성 (그림 1)
  - 캠벨 품종이 MBA 보다 항산화 활성이 높았음.
  - 추출용매로써 주정 농도 60% > 40% > 20% 순으로 추출효율이 높았음.
  
- 효모에 의한 발효가 항산화 활성에 미치는 영향 (그림 1)
  - 효모로 발효하는 경우, 포도 과피 추출물의 항산화 활성이 증가함.

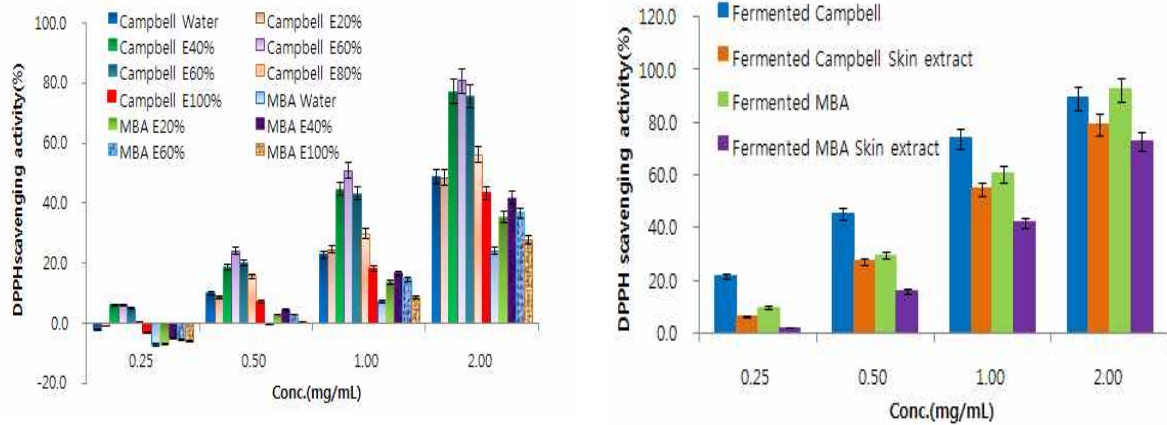


그림 1. Changes in DPPH radical scavenging activities of MBA and Campbell grape skin extracts from various extraction conditions.

### 2.1.2 발효과정 중 설탕 함량이 포도껍질 추출물의 항산화에 미치는 영향

○ 캠벨, MBA 두 품종 모두 발효액 중 설탕농도가 0.5%일 때, 과피 추출물의 항산화 활성이 가장 높았음 (그림 2).

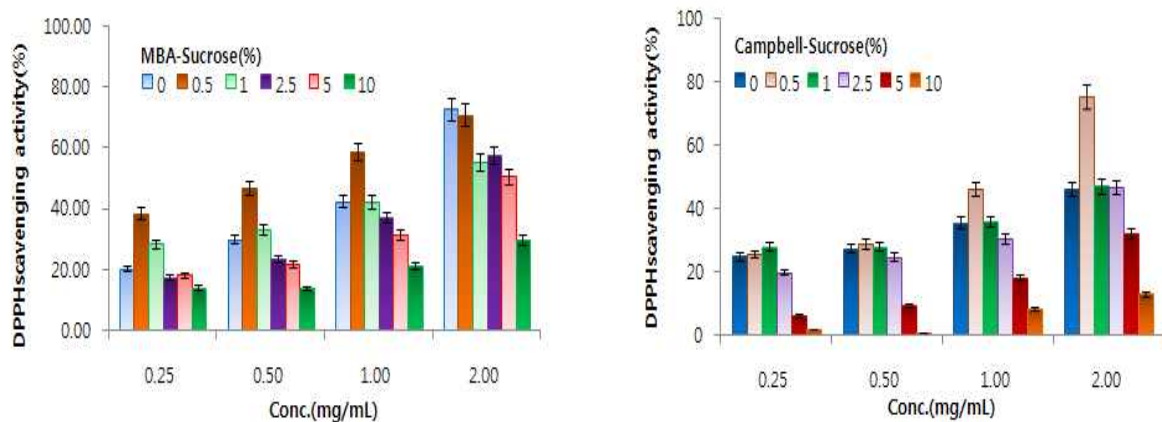


그림 2. Changes in DPPH radical scavenging activities of fermented MBA and Campbell grape skin with different sucrose concentrations.

### 2.1.3 포도 과피의 효모 발효 중 당 종류별 항산화 활성

○ 사용당은 sucrose(설탕), maltose, galactose, lactose, fructose, glucose 등 6가지 종류이며 당을 넣지 않은 것을 control로 하였음.

○ 포도 과피 발효에 사용된 6가지 당류 가운데 설탕을 사용한 경우가 과피 추출물의 항산화 활성이 가장 높았음 (그림 3).

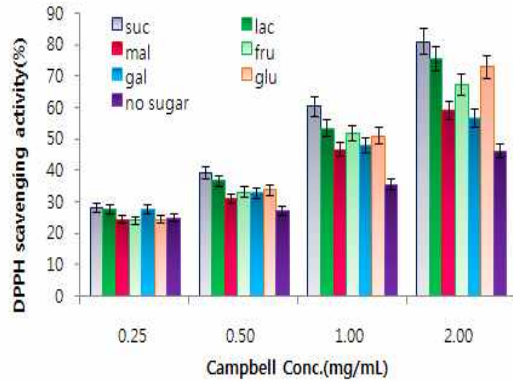
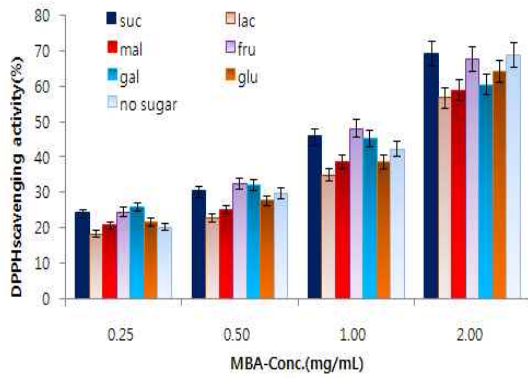


그림 3. Changes in free radical DPPH scavenging activities in fermented MBA and Campbell grape skin with different sugar.

#### 2.1.4 효모투여량에 따른 포도 과피의 항산화 활성 및 알콜 생성함량

○ 전체적으로 과피의 항산화 활성이나 알콜 생성량은 발효에 사용한 효모량에 따라 유의적인 변화는 없었음 (그림 4).

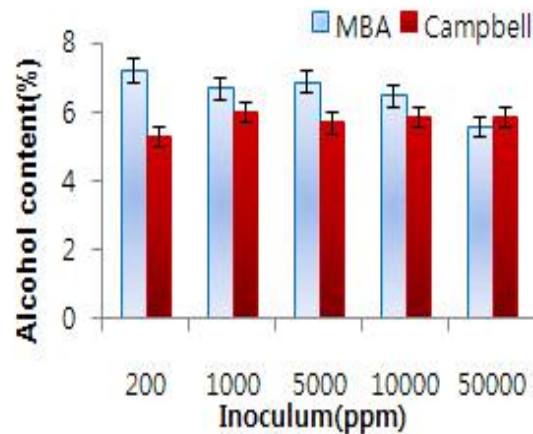
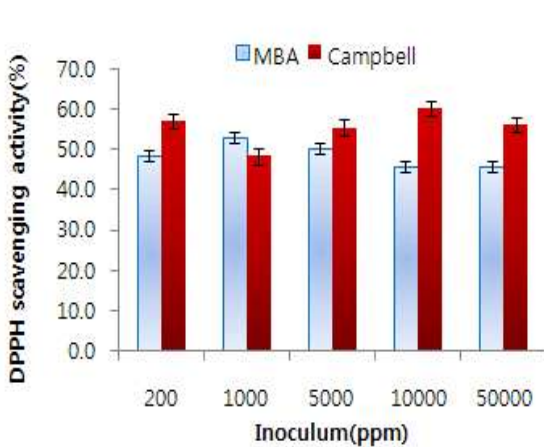


그림 4. Changes in free radical DPPH scavenging activities in fermented MBA and Campbell grape skin with different sugar.

#### 2.1.5 발효과정 중 설탕농도에 따른 총페놀 함량 변화

○ 포도 과피 추출물의 총페놀함량이 발효중 사용한 설탕농도가 2.5%까지는 큰 변화가 없었으나, 이후 감소하는 경향을 보였음. 그러나 총 페놀함량보다는 항산화활성이 중요한 지표이므로 설탕농도를 0.5% 사용하는 것이 권장됨 (그림 5).

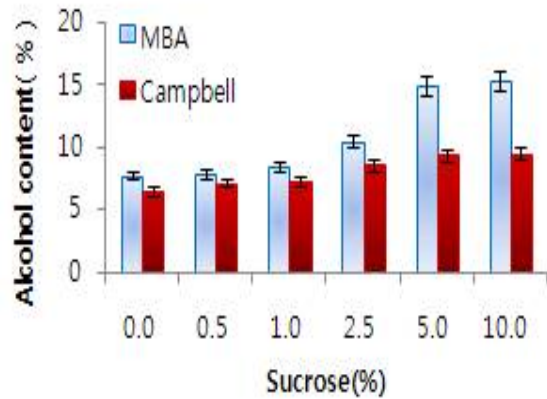
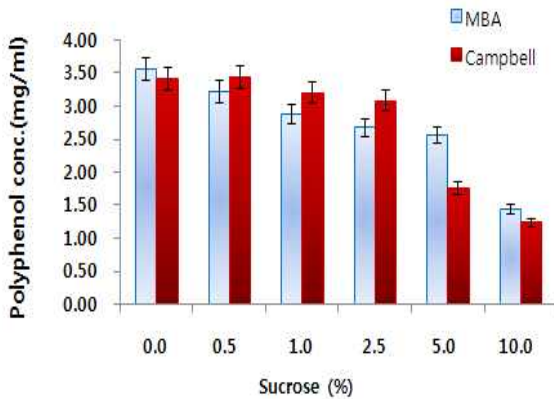


그림 5. Changes of total polyphenol and alcohol contents during fermentation of MBA and Campbell grape skin with different sucrose concentration.

### 2.1.6 포도 과피 발효과정 중 설탕농도에 따른 총페놀 함량 변화

○ 발효과정에 사용한 설탕의 농도별 포도 과피 추출물의 총플라보노이드 함량은 차이가 없었음. 따라서 설탕 함량 0.5%를 유지하는 것이 바람직함 (그림 6).

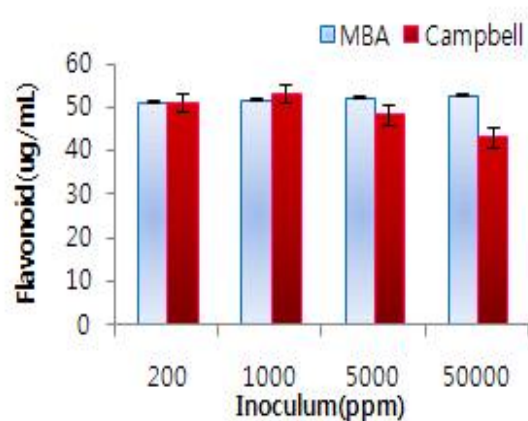
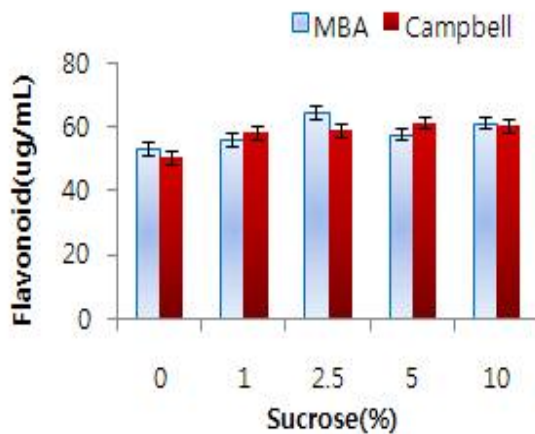


그림 6. Total flavonoid contents in MBA and Campbell grape skin fermented with different sugar and inoculum contents (v/v).

○ 위의 결과를 정리하면,

- (1) 포도품종 가운데 캠벨의 과피가 항산화활성이 MBA보다 높았으며,
- (2) 효모를 이용하여 알콜 발효를 할 경우, 항산화활성이 높아졌고,
- (3) 발효시 탄소원으로 설탕을 사용한 경우가 항산화활성이 가장 높았음.



○ 따라서 포도 껍질을 발효 또는 효소처리하여 piceid (배당체)로부터 resveratrol(비배당체)로 전환하는 연구를 수행하여, 비배당체로의 전환률이 최대가 되면서, 산업적으로 경쟁력이 가장 높은 처리 조건을 확립함 (관련 내용을 정리하여 특허 출원함).

## 2.2. 항산화 활성 유도 소재 선별

○ 환경적 영향 또는 생체 대사활동의 결과물로서 생성되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 노화의 주요 원인임 (그림 7-8).

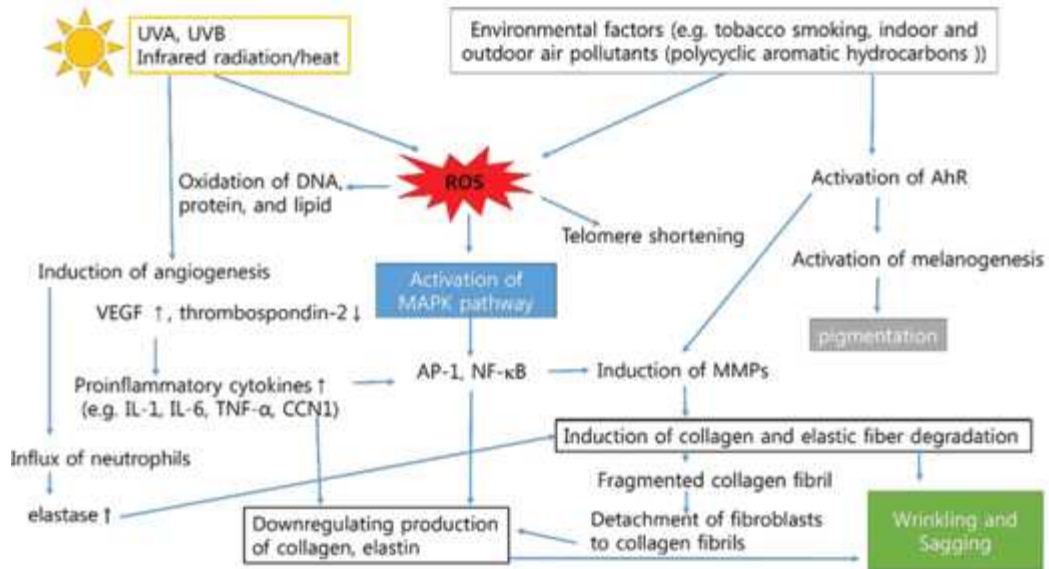


그림 7. ROS에 의한 노화 기전 (Kim and Park, InTech, 2016).

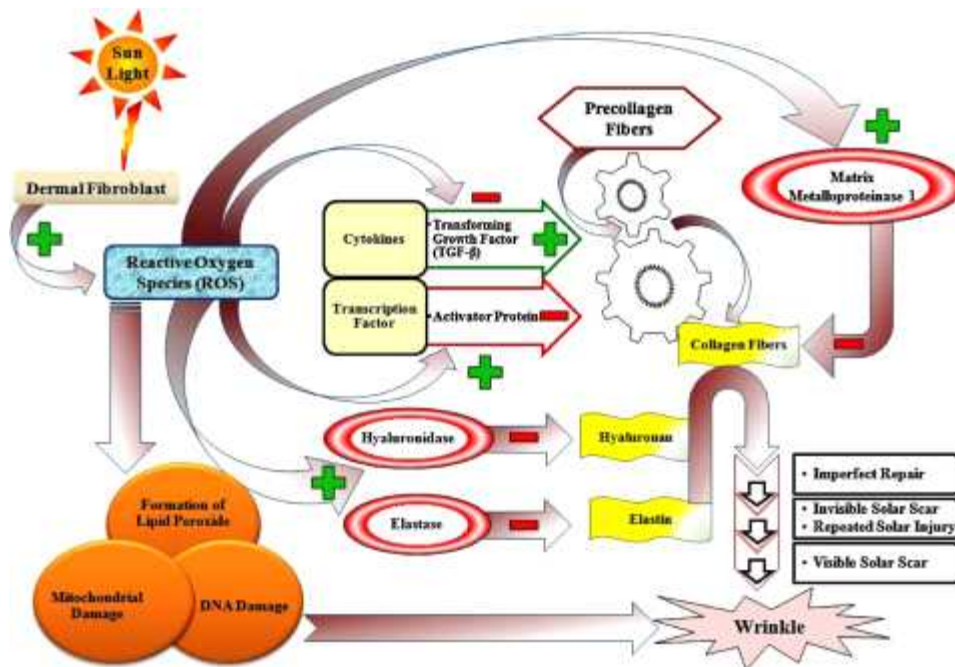


그림 8. 피부노화 기전 (Mukherjee *et al.*, Phytomedicine, 2011).

○ Nuclear factor erythroid 2 [NF-E2]-related factor (Nrf2)는 항산화 효소계 (HO-1, NQO1 등)의 발현을 유도하는 전사인자로서, 활성 억제 분자인 Keap1에서 분리되어 핵 내로 이동한 후, DNA의 antioxidant response element (ARE)라는 위치에 결합하여 항산화 효소 유전자의 발현을 개시함 (그림 9).

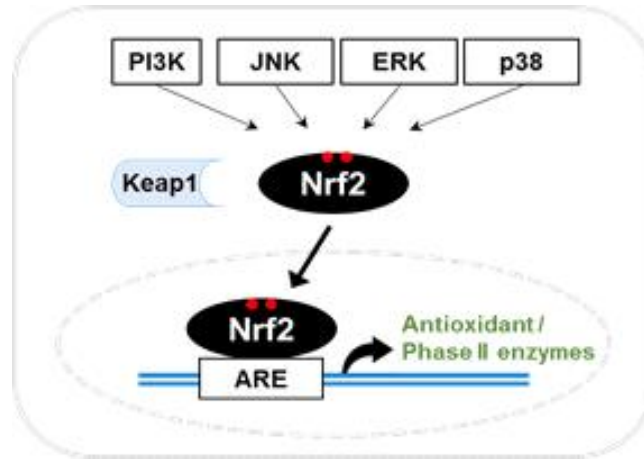


그림 9. Nrf2-mediated antioxidant system (Seo et al. J Agric Food Chem, 2016).

### 2.2.1 세포모델계에서 항산화 유도 활성 평가를 위한 antioxidant response element (ARE) 활성 측정

○ ARE 활성 측정 원리 : luciferase reporter system을 활용하여, ARE에 결합하는 Nrf2의 활성을 측정함으로써, 항산화 효소계의 발현 유도 여부를 판단함 (그림 10).

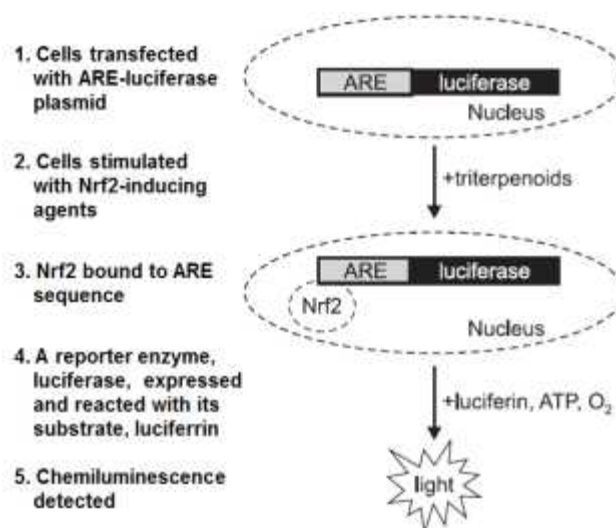


그림 10. Schematic representation of the procedure of Nrf2 activity assessment (Loboda et al. Biomol Ther (Seoul). 2012).

○ ARE 활성 측정 방법 : ARE-luciferase construct로 transfection하여 제조된 세포를 6-well plate ( $5 \times 10^5$  cells/well)에 seeding하고, 16시간 동안 배양함. 0.5% FBS를 함유한 배지로 교환하고 12시간 후에 시료를 처리하여 12-24시간 배양함, Luciferase activity는 Promega에서 제시한 방법에 따라 분석함.

### 2.2.2 ARE의 활성화를 유도하는 한방 소재 선별

○ 사람의 간 세포(HepG2 cells)에 ARE-luciferase reporter construct가 도입하여, luciferase의 활성을 측정함으로써 ARE 활성화 정도를 정량화함 (그림 10).

○ 총 288종의 한방 소재를 대상으로, DNA 상의 항산화 효소계 유도를 위한 전사인자의 결합 부위인 ARE의 활성화 정도를 세포모델계에서 평가함 (그림 11).

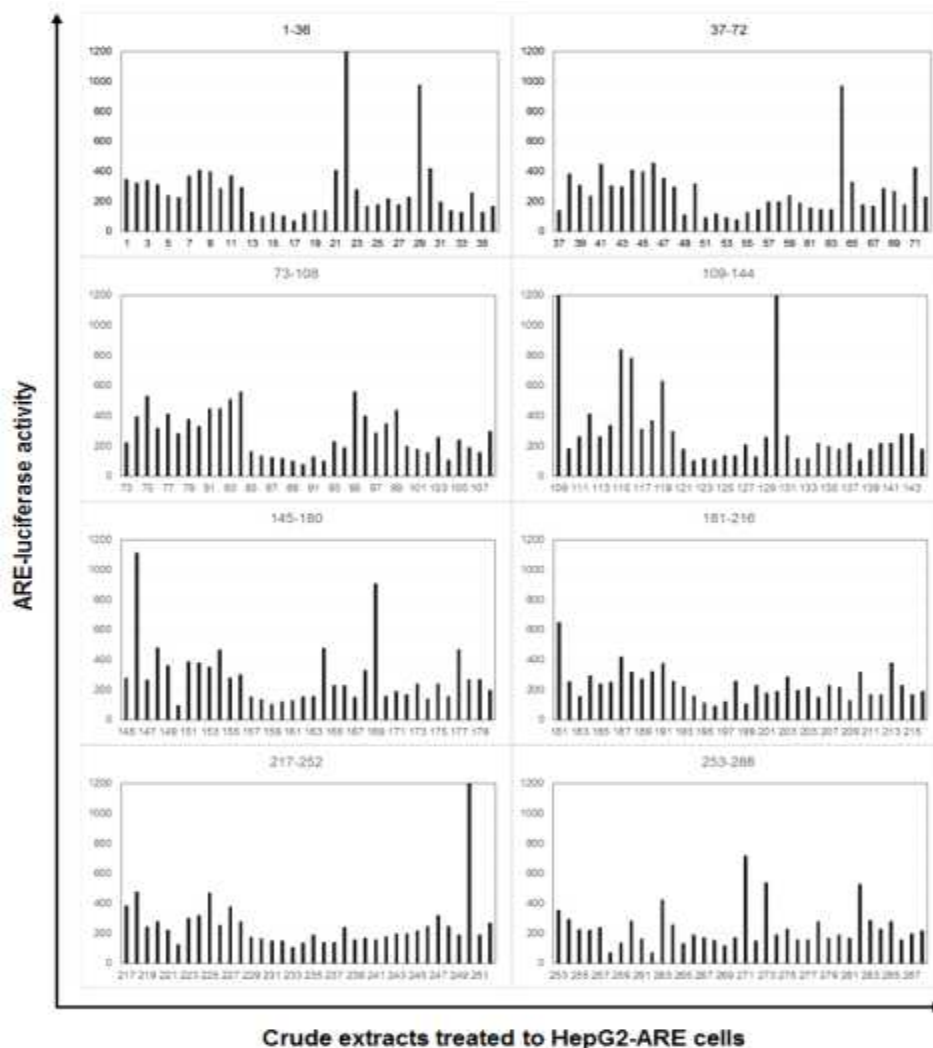


그림 11. Total 288 kinds of herbal extracts screened for antioxidant enzyme-inducing (ARE-luciferase) activity in HepG2 cells.

○ ARE-luciferase reporter의 활성의 증가를 유도하는 29종의 한방 소재 (감송향, 감수, 견우자, 구맥, 구아바, 구절초, 금전초, 누로, 도경, 목향, 비해, 백미, 삼백초, 수오등, 야교등, 영로, 영릉향, 오배자, 원화, 음양곽, 조협, 조휴, 지룽, 청호, 측백엽, 파두, 학슬, 한련초, 한인진)를 선별함 (그림 11)

○ 이들 소재 중, 강력한 활성을 보이는 11종(감송향, 견우자, 구맥, 구아바, 금전초, 도경, 영릉향, 야교등, 오배자, 조협, 백미)을 대상으로, 농도별 ARE 활성 유도능을 분석하여, 구맥을 제외한 10종의 소재가 강력한 ARE 활성 유도능이 있음을 관찰함 (그림 12).

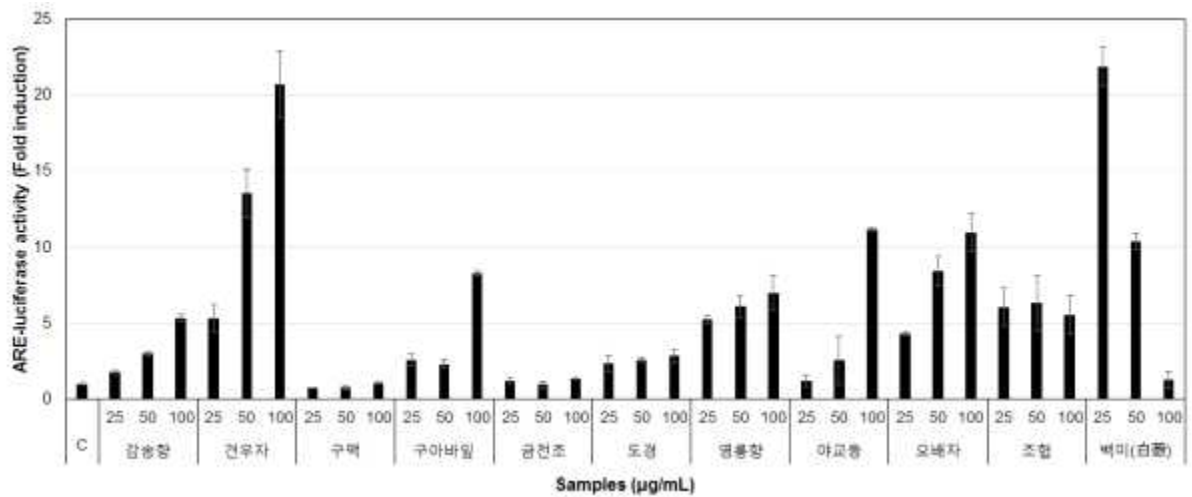


그림 12. Selected herbal extracts highly activating ARE-luciferase activity in HepG2-ARE cells.

○ 향노화 뷰티 음료 제품 개발을 위해, ARE 활성 유도능을 가질 뿐만 아니라 식품 원료로 활용될 수 있는 소재를 선별해야 할 필요성에 의해, 기 선정된 29종의 소재에 대하여 식약처 규정 상 식품원료로 사용할 수 있는 소재를 선정함.

### 2.3. 식품원료로 활용될 수 있는 과일 소재 및 한방 소재의 항산화 활성 유도 평가

○ 식약처, 「식품의 기준 및 규격」(제2016-43호, 2016.05.31.)에 의거, 식품원료로 활용될 수 있는 소재 중, 항산화 활성을 유도하는 한방 소재 10종(구아바, 금전초, 누로, 도경, 야교등, 조협, 조휴, 청호, 학슬, 한인진) 및 과일 소재 7종(밀감, 배, 복분자, 블루베리, 사과, 오디, 포도)을 선별함.

○ 선별된 17종의 소재의 세포모델계에서의 항산화 효소계 유도 활성을 분석함 (그림 13).

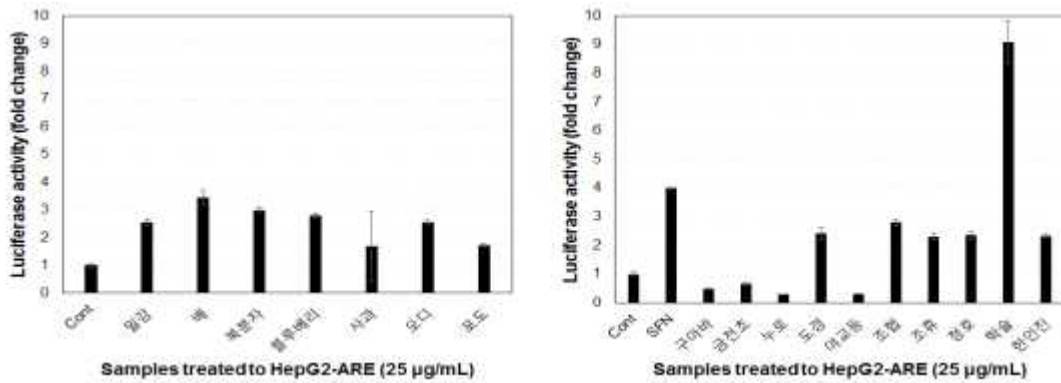


그림 13. Herbal and fruit extracts activating ARE-luciferase activity in ARE-transfected HepG2 cells.

○ 배>복분자>블루베리>오디>밀감>포도 등의 과일 소재와 학슬>조협>도경>조휴>청호 등의 한방 소재가 ARE-luciferase reporter 활성 유도능으로 평가한 항산화 활성이 높은 것으로 나타남 (그림 13).

○ 이상의 결과로 이들 과일소재와 한방소재가 주름방지, 미백효능의 건강뷰티음료 소재로 사용될 수 있음을 1차적으로 알 수 있었음.

○ 위의 소재들이 간 세포 내 ARE 활성 유도능이 높으므로, Nrf2 매개 항산화 효소의 발현 및 활성 유도능이 높을 것으로 예상되는 바, 주요 항산화 효소인 NQO1의 활성을 평가함.

## 2.4. 선별된 소재의 NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) 활성 유도 평가

○ 제2상 항산화 효소계의 지표 효소인 NQO1의 활성을 간 세포에서 평가함으로써, 선별된 소재의 항산화 활성을 평가함.

○ NQO1 활성은 Hepa1c1c7 세포에서 dicoumarol 과 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP)를 이용하여 측정함 (그림 14). 세포는 Tris buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4 and 2 mM EDTA)를 이용하여 수거하고, ice-cold PBS로 세척 후, 세포를 현탁하여 4시간 동안 반응시킴. 원심분리하여 상등액을 수거하여, 20 mM dicoumarol 이 포함된 혼합물과 혼합한 후, 40 mM DCPIP 를 첨가함. 600 nm에서 20 mM dicoumarol 유무에 따라 반응하고 NQO1의 활성을 측정하였음.

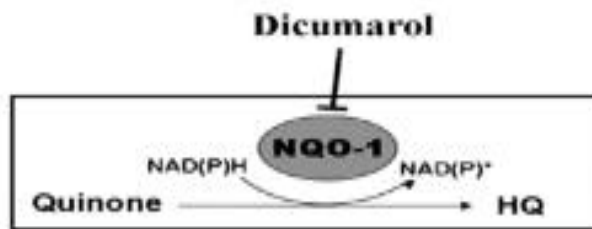


그림 14. Schematic role of NQO1.

○ 과일 시료 7종에 대해, NQO1 활성 유도 정도를 세포모델계에서 평가함 (그림 15).

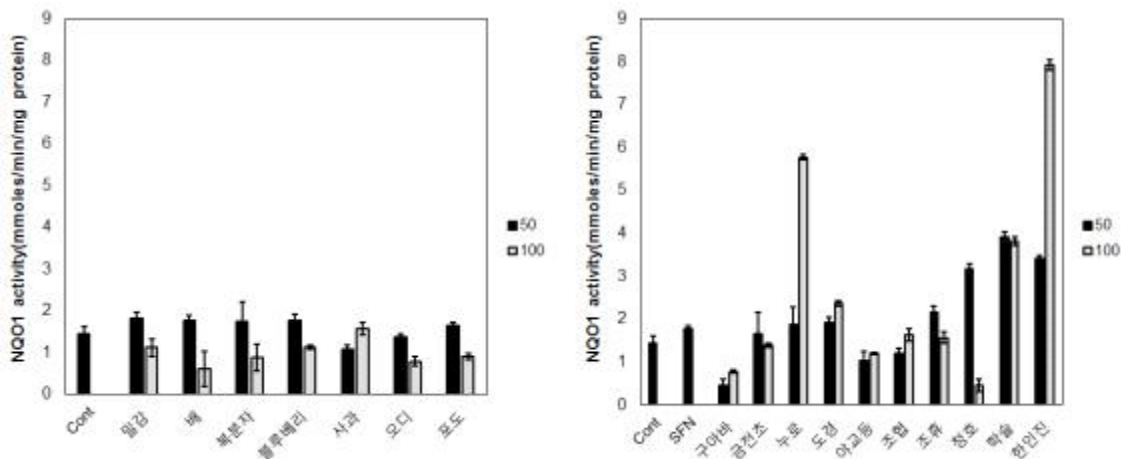


그림 15. The activity of NQO1, one of the phase 2 antioxidant enzymes, examined in the presence of each sample in Hepa1c1c7 cells.

○ 과일 소재 중, 밀감, 배, 복분자, 블루베리, 오디, 포도 (사과 제외) 추출물이 유사한 정도로 항산화효소 NQO1 유도하였음.

○ 선별된 10종의 한방 소재 중, 누로, 도경, 학슬, 한인진이 간 세포 내에서 NQO1 활성을 유도함.

## 2.5. 선별된 과일 소재 및 한방 소재의 세포모델계 항산화 효소 발현 유도 활성 평가

### 2.5.1 과일 소재의 항산화 효소계 유도 활성 및 작용기전

○ 선별된 7종의 과일 소재의 간 세포 내 항산화 효소 발현 유도 활성을 Western blot analysis로 평가함.

○ 과일 소재가 처리된 간 세포에서 항산화 효소계의 발현이 한방소재에 비하여 낮은 수준으로 발현되었으나, 블루베리, 복분자, 사과가 가장 활성이 높은 것으로 관찰되었음 (그림 16-17).

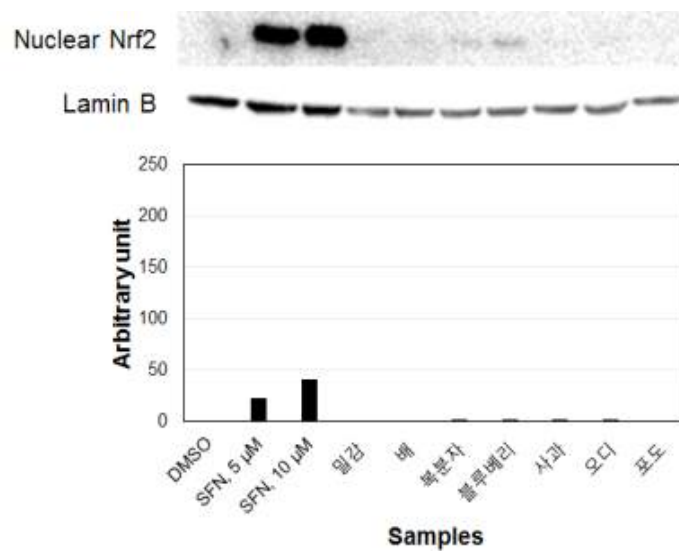


그림 16. Nuclear Nrf2 levels in Hepa1c1c7 cells after fruit sample treatment.



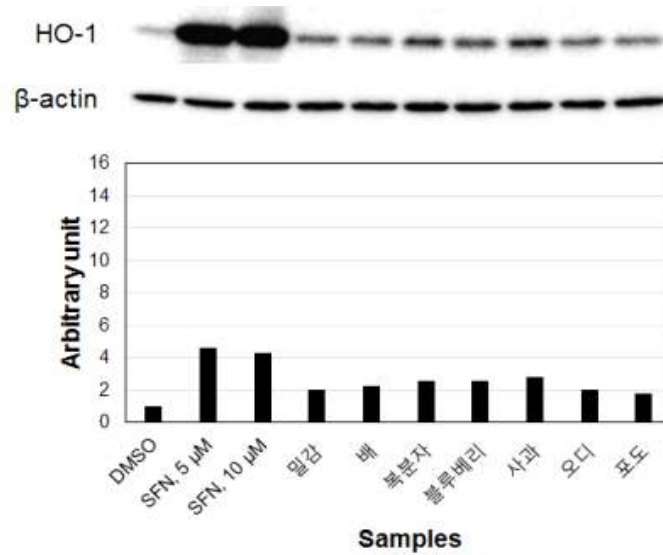


그림 17. Cytosolic HO-1 levels in Hepal1c7 cells after fruit sample treatment.

### 2.5.2 한방 소재의 항산화 효소계 유도 활성화 및 작용기전

○ 선별된 10종의 한방 소재의 간 세포 내 항산화 효소 발현 유도 활성을 Western blot analysis로 평가함 (그림 18-19).

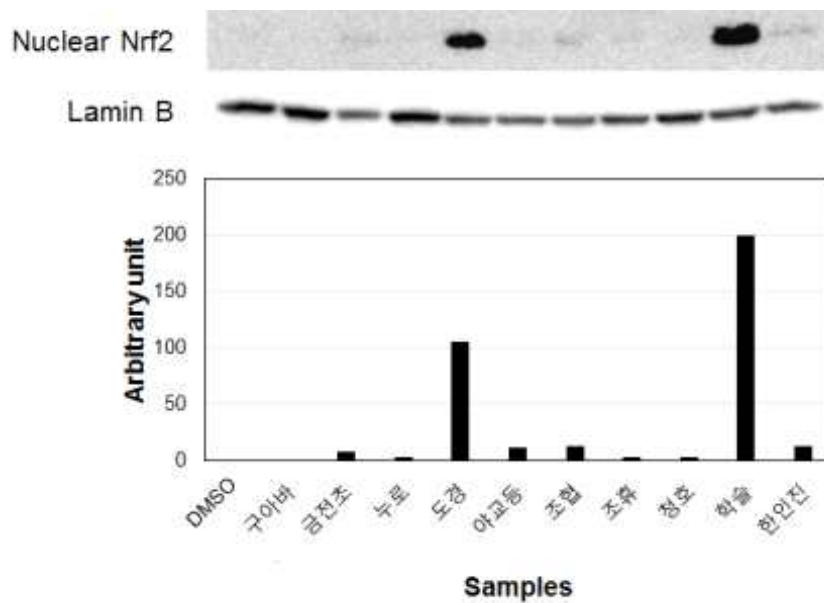


그림 18. Nuclear Nrf2 levels in Hepal1c7 cells after herbal sample treatment for 8 hours.

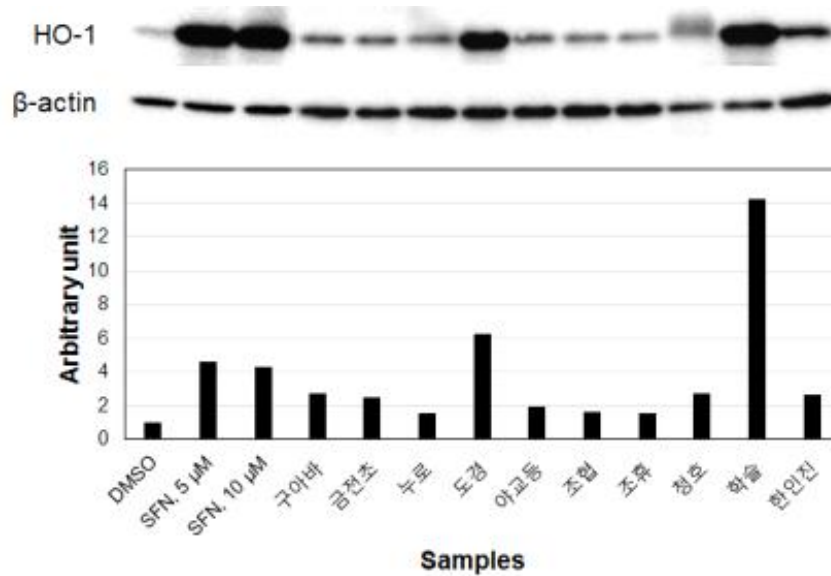


그림 19. Cytosolic HO-1 levels in Hepal1c7 cells after herbal sample treatment for 8 hours.

○ 한방 소재 가운데 도경, 학슬이 항산화 효소계 발현 유도를 위한 전사인자인 nuclear factor erythroid 2 [NF-E2]-related factor (Nrf2)의 핵 내 축적을 현저하게 증가시킴 (그림 18).

○ 또한 대표적인 항산화효소 Heme oxygenase-1 (HO-1)의 발현을 현저하게 증가시킴 (그림 19). 즉, 생체 내 항산화효소 유도능이 커서, 안티에이징 효능 발현 가능성이 큼.

- 즉, 다양한 과일 소재 및 한방 소재의 항산화 효소계 유도 활성을 평가한 결과,
- (1) 누로, 도경, 학슬, 한인진 등의 한방 소재와
  - (2) 블루베리, 복분자 등의 베리류 과일 추출물의 항산화 효소계 유도 활성이 높은 것으로 관찰되어,
  - (3) 안티에이징 활성을 나타낼 가능성 큰 것으로 판단됨.

3. 생물전환 포도시료, 한방소재 및 1차 개발 음료의 항산화 활성 및 세포모델계 안티에이징 효과 및 항산화 효소계 유도 활성 검증

3.1. 선별된 소재의 피부 세포모델계 항산화 효소계 유도 활성 분석

3.1.1 과일 소재의 피부 세포 내 항산화 유도 활성

○ 선별된 과일 소재의 피부 세포 (각질형성세포, human keratinocyte HaCaT cells) 내 항산화 효소 발현 유도 활성을 Western blot analysis로 평가함 (그림 20-21).

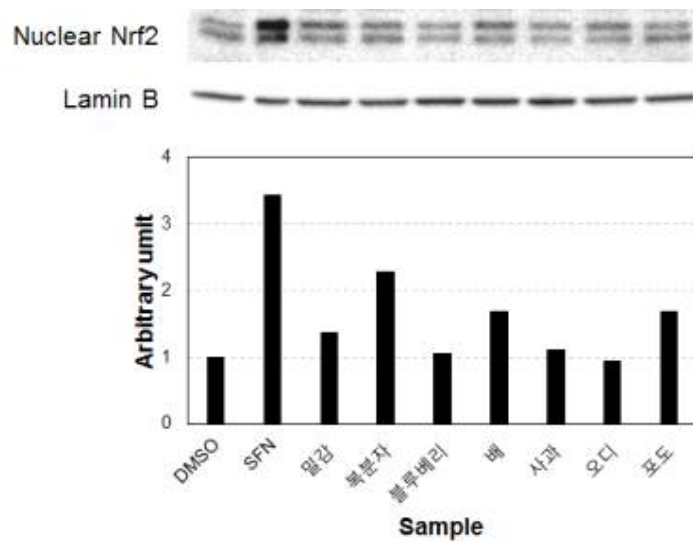


그림 20. Nuclear Nrf2 levels in HaCaT cells after fruit sample treatment.

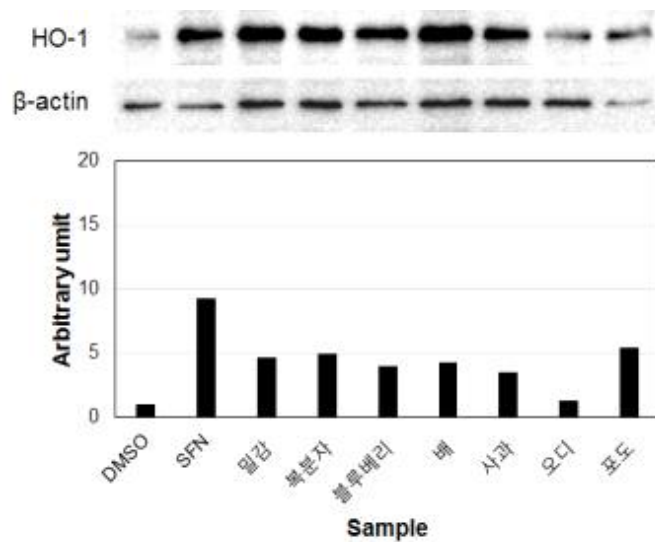


그림 21. Cytosolic HO-1 levels in HaCaT cells after fruit sample treatment.

○ 복분자, 포도, 밀감, 블루베리, 배 등 과일 소재가 피부 세포 (HaCaT cell)에서 항산화 효소계의 발현을 유도함을 관찰함 (그림 20-21).

○ 이는 복분자, 포도 블루베리 등 베리류 과일 소재가 간세포 뿐만 아니라, 피부세포에서도 항산화 효소계의 발현을 촉진함으로써, 항노화 효능을 나타낼 가능성이 높음을 보여줌. 또한 뷰티음료로의 개발 가능성을 한층 높임.

### 3.1.2 한방 소재의 피부 세포 내 항산화 유도 활성

○ 선별된 한방 소재의 피부 세포 내 항산화 효소 발현 유도 활성을 Western blot analysis로 평가함.

○ 도경, 학슬 (한인진, 누로) 등 한방 소재가 피부 세포에서 항산화 효소계의 발현을 유도함을 관찰함 (그림 22-23).

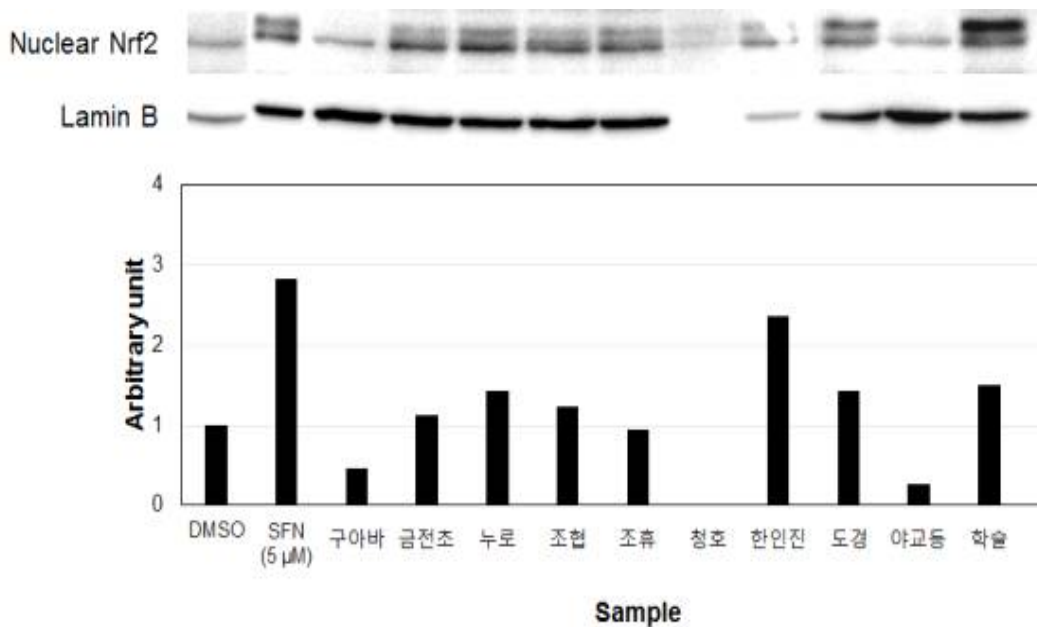


그림 22. Nuclear Nrf2 levels in HaCaT cells after herbal sample treatment for 8 hours.

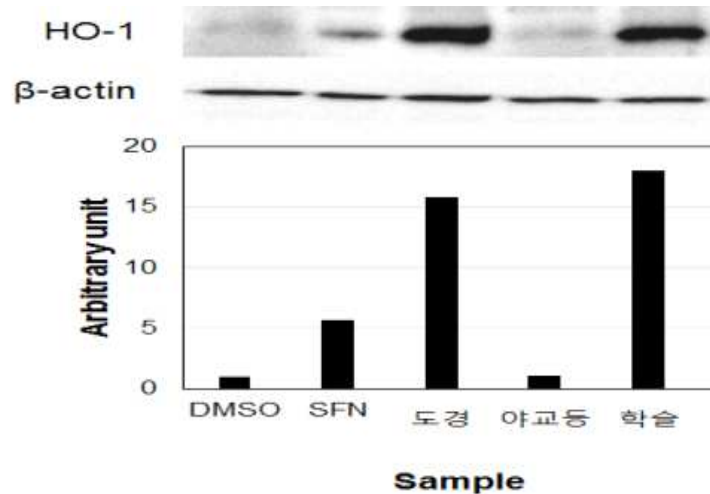


그림 23. Cytosolic HO-1 levels in HaCaT cells after herbal sample treatment for 8 hours.

### 3.2. 1차 개발 음료의 피부 세포모델계 항산화 효소계 유도 활성 분석

○ 1차 개발 음료 처리군에서 ARE-luciferase reporter 및 NQO1의 활성이 유도됨 (그림 24).

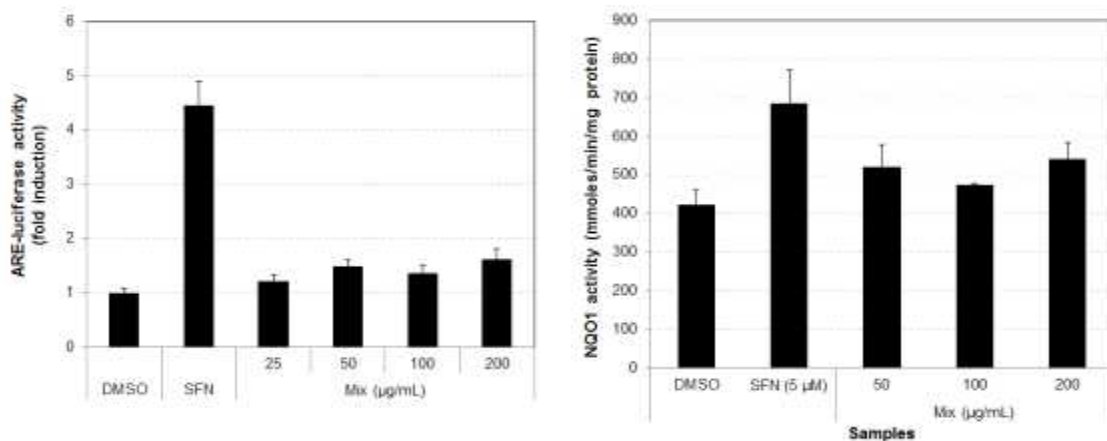


그림 24. Antioxidant activities of first trial product. (Left) ARE-luciferase activity-inducing capability in HepG2-ARE cells; (Right) NQO1-activating capability in the immortalized human keratinocytes, HaCaT cells.

○ 위의 결과를 정리하면,

- (1) 한방 원료 가운데서는 도경, 학슬이 피부 세포모델계에서 항산화효소 유도활성이 가장 높았으며, 안티에이징 및 동안 음료의 부원료로 적당한 것으로 판단됨.
- (2) 1차 개발 음료가 피부 세포모델계에서 항산화 효소계 유도 활성이 있으므로, 현 레시피를 일부 수정 및 부원료 추가를 통해 안티에이징 효능을 발현하는 최적 레시피를 설정하고자 함.

## 4. 1차 배합비 설정

### 4.1 건강뷰티음료 1차 배합비 설정 과정

- 최종 뷰티음료 상품화 전단계의 1차 레시피 설정
- 소재 선정 및 선정소재의 항산화 활성 및 미백 활성평가에 의거하여 Recipe 및 Formulation
- 1차 레시피에서 원가, 관능검사, 소비자 Test, 효능평가 등을 거쳐 2차→3차→최종 레시피 및 시제품으로 발전
- 현 단계에서는 최종 레시피가 아닌 본격적인 연구 전단계의 예비 레시피임.

#### 4.1.1. 미백효능 레시피

##### [Formulation 이유]

- 각질제거성분+미백성분이 Good
- 미백성분
  - Hydroquinone, HQ: tyrosinase의 활성 억제(멜라닌 형성에 중요한 역할):  
DNA와 RNA합성에 부정적 영향, 세포대사과정의 reversible inhibition(세포독성나타냄), 외래성측갈증 (exogenous ochronosis)이 HQ의 부작용  
예) 4% 사용, 유럽 피부 과색소침착치료제 → HQ사용금지
  - Hydrocortisone, Tretinoin, Retin-A :  
아젤레산(azelaic acid): 말라세시아균으로부터 분리된 dicarboxylic acid, tyrosinase의 competitive inhibitor 과민반응 多
  - 코직산 (kojic acid): 티로시나아제 활성을 억제하여 멜라닌 합성 억제
  - 알부틴 (Albutin): 포도당에 결합된 HQ, tyrosinase 활성 억제
  - 멜라토닌(melatonin): 송과선에서 분비되는 호르몬으로 도라퀸 이후 생합성 조절
  - 아스코르빌 인산마그네슘(ascorbyl magnesium phosphate): 비타민 C의 안정된 유도체
- 본 과제에서 미백효능평가를 1차와 2차에 걸쳐 실시한 결과 과일중에서는 복분자, 한방원료 중에서는 개자, 현초, 호도육의 미백개선효과가 가장 뛰어난 것으로 판단되어 미백레시피에 반영하였으며 세부적인 내용은 제 3절에 자세히 기재하였다.

[1차 미백 레시피]

표 1. 1차 미백 레시피

성분	합량
녹차추출물(EGCG)	3
포도종자추출물	17
미니사과 착즙액	10
검은콩추출물	5
소나무껍질추출물	5
아스코빌인산 마그네슘	1
사과/복분자	19
당근	10
꿀	20
한방원료추출물(개자, 현초, 호도육)	10
계	100

4.1.2. 주름개선 레시피

[Formulation 근거]

- 레티노익산: 수개월~1년 피부에 바르면 주름살 개선, 피부탄력↑, 화장품 원료X, 의사처방이 필요한 전문의약품, 먹는 약으로도 사용하나 심각한 부작용 多

- 레티놀: 비타민 A의 전구체, 화장품 원료로 사용 可, 주름개선 화장품의 주성분, 콜라겐 합성↑, MMP 발현억제→ 콜라겐 양 증가, 피부 튼튼

- 부작용: retinoic 0.01%, 레티놀 0.1% 이상 농도→ 피부에 심한 자극, 염증 자극이 없는 농도에서 발 라야 함

- 녹차추출물 EGCG (epigallocatechin gallate) : 노인피부에 녹차성분인 EGCG를 장기적으로 바르면 피부의 콜라겐 합성을 증가시켜 주름살 개선

- COX-2 저해제 : PGE2 합성저해 → 염증질환치료제나 피부 주름살 형성억제제

- 3가지 대표적 천연 항산화 물질 함유하는 배합 지향

- Vit C, Vit E, glutathione이 많이 함유된 과일, 채소 섭취 시 그 양이 조직 多 → 조직에서 활성산소에 의한 손상방지→ 자외선에 의한 피부손상을 감소.
- 노화가 진행되면서 catalase감소 → 조직(세포)내 과산화수소 → MMP효소 증가→ collagen 변성 ← EUK-134(항산화효소유사체):화장품원료로 사용
- EPA, DHA(오메가-3-지방산), MMP효소의 발현 억제, 콜라겐의 합성 증가) + PPAR-

$\alpha$ (불포화지방산 수용체, 세포질→핵→전사인자로 됨, 자외선으로 감소)

- PPAR- $\alpha$  감소 → catalase 감소 → 과산화수소 증가 → MMP효소 증가 → collagen감소
- Anthocyanin
  - ☞ 강한 항산화성에 기인한 건강 기능성
  - ☞ 식품, 의약품, 화장품 등에 많이 이용 잠재력
  - ☞ 낮은 수율과 상대적인 불안정성으로 사용에 제한
  - ☞ 식물의 꽃, 과일, 채소류에 존재하는 빨간색, 자색 또는 청색의 수용성 색소
  - ☞ 색소로는 비교적 안정성이 낮고 바람직하지 않은 냄새나 향기

표 2. 안토시아닌이 풍부한 식품원료

과일	블루베리 크랜베리 라즈베리 복분자 오디 체리	적포도 멀베리 블랙커런트 오렌지(Blood) 엘터베리
채소	검정콩 검정쌀 가지 자색양파 순무	자색양배추 펜넬 자색양상치 자색감자 자색고구마

○ 본 과제에서의 항산화 효소계의 발현을 유도하는 원료로 복분자, 포도, 밀감, 블루베리, 배 등의 과일원료와 도경, 학술 등의 한방원료가 선정되었으며 자세한 내용은 제 2절의 연구내용에 수록하였다.

### [1차 주름개선 레시피]

표 3. 1차 주름개선 레시피

성분	함량 (%)
블루베리	20
크랜베리	5
라즈베리	5
복분자	5
오디	2
멀베리	5
포도	50
블랙커런트	8
계	100



### 4.1.3. 동안 (童顔) 레시피

#### [Formulation 이유]

- Oligomeric proanthocyanin 포함
  - 주름방지 + 혈류개선을 통한 피부그늘음↓, 눈가 검은 기미 개선, 멜라닌 색소 생성억제
- Oligomeric proanthocyanin 고 함유 식품 소재
  - ☞ 미니사과
  - ☞ 소나무껍질추출물
  - ☞ 포도종자추출물
  - ☞ 포도잎추출물
  - ☞ 적포도주추출물
  - ☞ 블루베리와인추출물
  - ☞ 사과폴리페놀
- 엽록소는 콜라겐합성을 증가시키며 피부주름살을 줄이고 피부탄력을 유지시키는 효능이보고
- 녹차추출물 속의 EGGC(epigallocatechin gallate)는 강력한 항산화물질로 자외선에 의한 피부손상억제효능, 멜라닌 색소합성억제효과 등이 있으며 콜라겐 합성을 증가시키며 MMP 합성을 억제하는 파비노화 (주름)억제 효과를 같이 보유
- 식물성 estrogen(석류 등)은 콜라겐합성촉진 효능 및 탄력섬유재생효능이 있음.
- 미백과 주름방지 효능이 결국 동안을 가져다주므로 앞의 미백과 주름방지 효능의 재료를 동안레시피에 전부 반영하며 자세한 내용은 제2절과 제3절에 전부 기술하였다.

#### [1차 동안 레시피]

표 4. 1차 동안 레시피

성분	함량 (%)
녹차추출물	2
스피룰리나	1
미니사과/포도/밀감/배/귤/당근 착즙액	25
포도종자추출물	5
홍삼추출물	5
포도잎추출물	2
적포도주추출물	10
블루베리와인추출물	10
석류추출물	10
토마토/올리브 분해물	20
한방원료추출물(개차, 현초, 호도육, 도경., 학슬)	10
계	100

## 5. 2차년도

■ 세부연구목표 : 건강뷰티 음료 소재에 대한 항산화 및 항노화(안티에이징) 활성 평가

1. 포도 과피로부터 항산화 성분 최적 추출 조건 확립 (관련 연구 결과를 Journal of the Science of Food Chemistry 저널에 투고함)

○ Resveratrol은 베리류에 풍부히 함유되어 있고 다양한 생리활성이 보고되어 있음. Piceid (polydatin)는 resveratrol 배당체로서 포도 과피에 함유되어 있음 (그림 25). 따라서 포도 과피로부터 항산화 성분의 추출을 극대화하기 위하여, piceid의 탈당화를 촉진하여 resveratrol 추출을 유도함으로써 포도 과피 추출물의 항산화 활성을 향상시키고자 함.

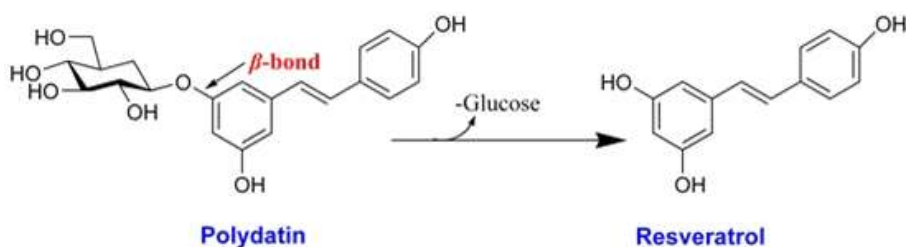


그림 25. Deglycosylation of piceid (polydatin) to resveratrol.

### 1.1. 최적 추출 용매 선정

○ 포도 과피로부터 piceid 및 resveratrol을 최대 추출할 수 있는 용매를 선정함.

○ 포도 과피를 균질화한 후, 0% 에탄올(100% 정제수), 50% 에탄올(50% 정제수), 80% 에탄올(20% 정제수), 100% 에탄올로 추출하여, LC-MS/MS 분석으로 통해 piceid 및 resveratrol의 함량을 측정함 (그림 26).

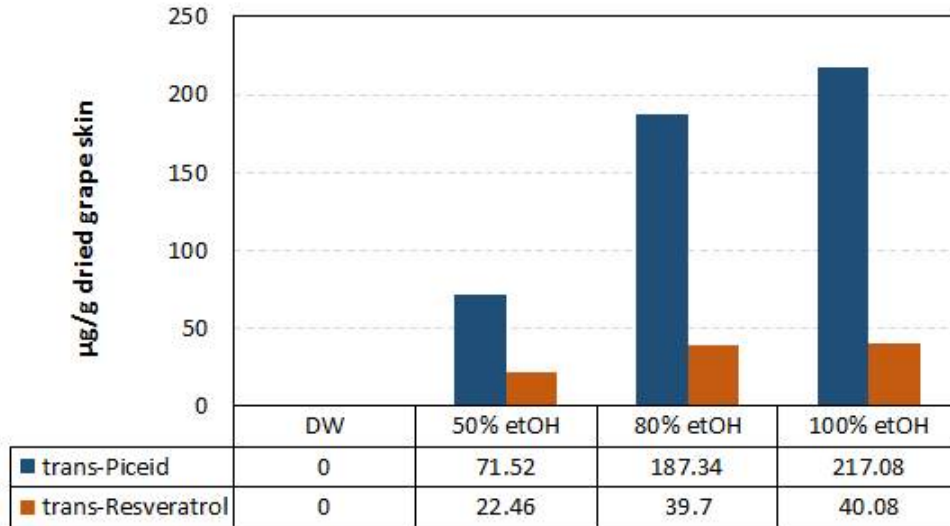


그림 26. Effect of ethanol concentration on extraction rate of piceid and resveratrol from grape skin.

○ 물 또는 50% 에탄올 추출물에서보다 80%와 100% 에탄올 추출물에서 piceid와 resveratrol이 더 잘 추출됨. 따라서 이후 추출은 80% 에탄올에서 진행함.

## 1.2. Piceid 및 resveratrol 추출 극대화를 위한 효소 선정

○ Piceid로부터 resveratrol로의 생물전환을 유도하기 위해 탈당화(deglycosylation)를 촉진하는 효소를 선정함.

○ 문헌을 참고하여 4종의 효소 - cellulase, pectinase (Viscozyme<sup>®</sup>), glucosidase, glucanase (VinoTaste<sup>®</sup> Pro) - 를 택하여 전환 효율이 높은 효소를 스크리닝함. Piceid 표준품에 각 효소를 처리한 후 HPLC 분석으로 반응물 내 resveratrol 함량을 측정함 (그림 27).

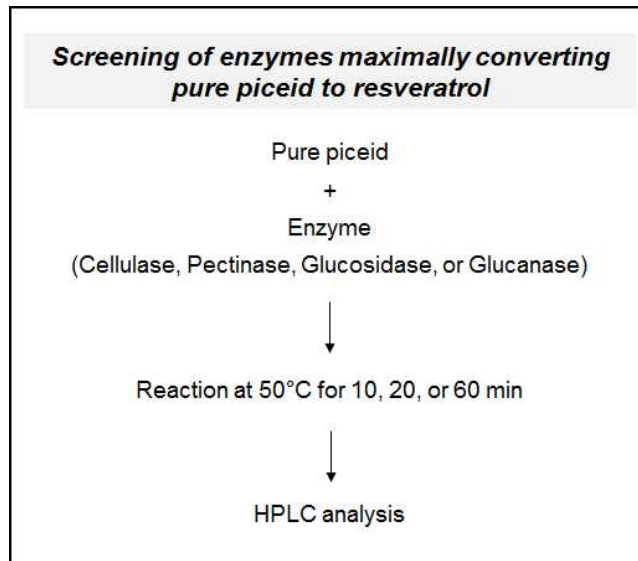


그림 27. Scheme for screening the enzyme that is maximally converting piceid to resveratrol.

### 1.2.1. HPLC 분석

○ Piceid 표준품에 4종의 효소 각각을 처리하여 시간별로 반응 후 HPLC로 분석함 (그림 28-29).

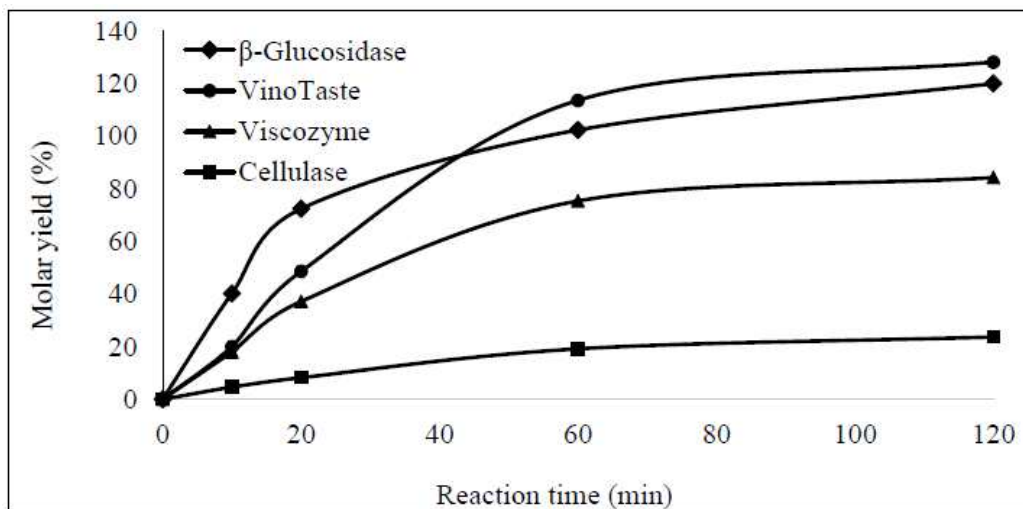


그림 28. Bioconversion of pure piceid to resveratrol by different enzymes. Molar yield of conversion by HPLC analysis. Piceid dissolved in 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) was separately treated with  $\beta$ -glucosidase (0.2%, w/v), VinoTaste® Pro (0.2%, w/v), Viscozyme (2%, w/v), or cellulase (2%, w/v), at 40°C for the designated reaction times.

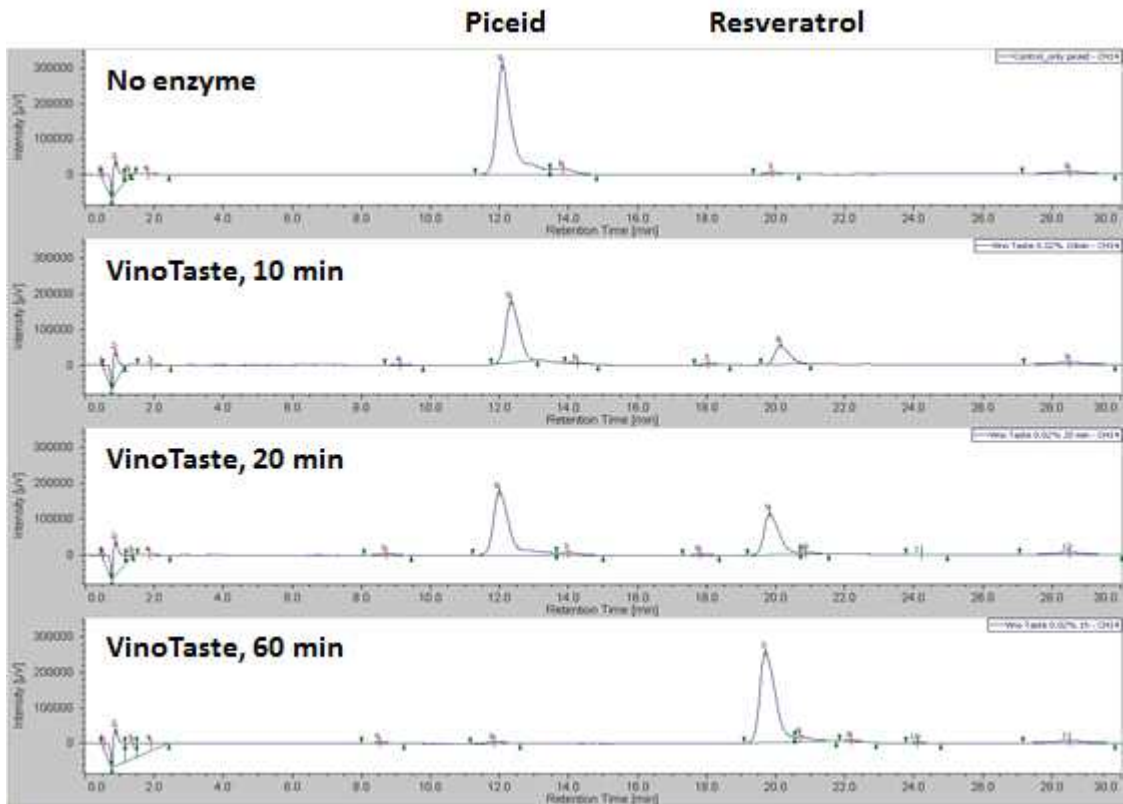


그림 29. Representative chromatograms showing the conversion of pure piceid to resveratrol using VinoTaste® Pro at various reaction times. Piceid was fully converted to resveratrol after incubating with VinoTaste® Pro for 60 min.

- VinoTaste® Pro ( $\beta$ -1,3-glucanase + polygalacturonase)와  $\beta$ -glucosidase가 다른 2종의 효소(cellulase과 Viscozyme)에 비해 piceid의 resveratrol로의 전환 효율이 더 높았음.
- 따라서 생물전환 효소로써 VinoTaste와  $\beta$ -glucosidase를 선정하였음.

### 1.2.2. 포도 껍질에 선별된 효소를 처리하여 piceid 및 resveratrol를 추출

- 포도 껍질에 VinoTaste® Pro 또는  $\beta$ -glucosidase를 처리 후 LC-MS/MS 분석으로 piceid 및 resveratrol의 함량을 측정함 (표 5; 그림 30)

표 5. 효소 처리된 포도 과피에서 추출된 piceid 및 resveratrol의 함량

Samples	Piceid** µg/g dried skin		Resveratrol** µg/g dried skin	
	Control	15.40 ± 6.90	16.89 ± 1.55	
Unheated	β-Glucosidase	16.47 ± 11.50	11.45 ± 7.17	
	VinoTaste Pro	26.81 ± 10.18	13.13 ± 8.74	

\*nd – not detected    \*\*Results are obtained from three independent trials.

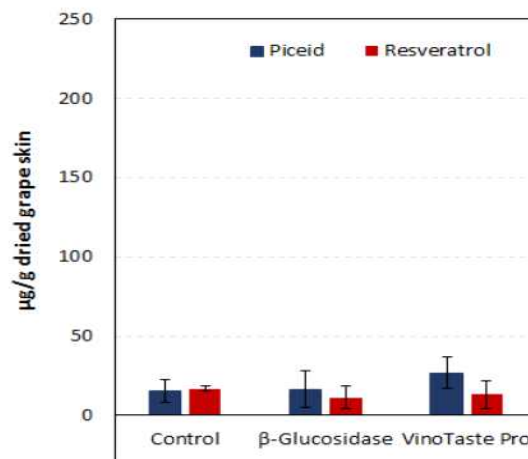


그림 30. Effect of enzyme treatment on extraction rate of piceid and resveratrol from grape skin.

- 선정된 효소를 처리하였으나 대조구에 비해 piceid 및 resveratrol 함량이 크게 증가하지 않았음.
- 효소 처리 전 포도 과피의 texture를 연하게 하기 위해 열을 가하는 방법을 추가하기로 함.

### 1.3. 포도 과피로부터 piceid 및 resveratrol 추출 극대화를 위한 열 처리 조건 확립

○ 효소 활성을 높이기 위해 포도 과피에 열을 가해 전처리함 (그림 31).

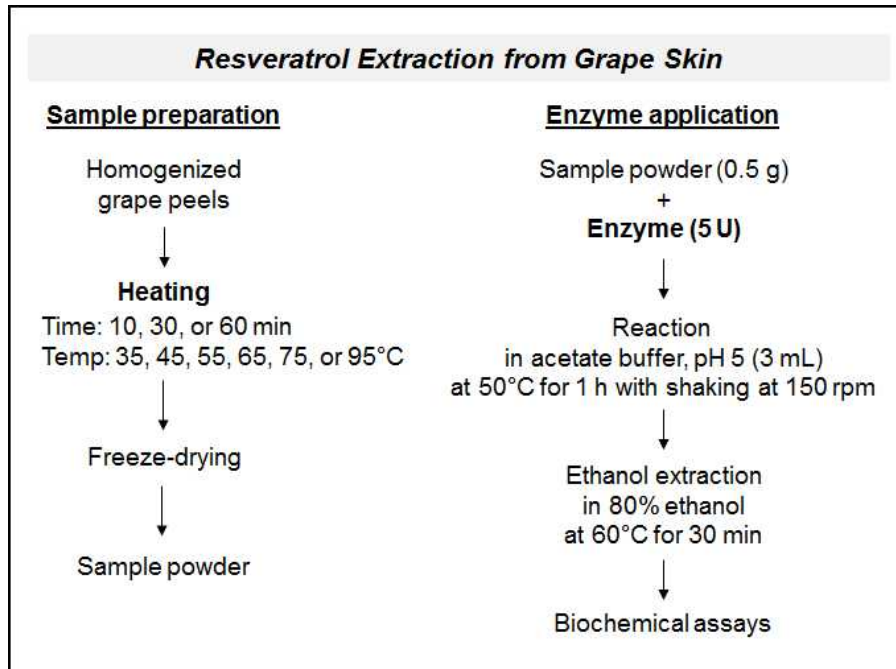


그림 31. Pre-heating procedure prior to enzyme treatment.

#### 1.3.1. 최적 처리 시간

○ 균질화된 포도 과피를 95°C에서 0, 10, 30, 60분간 열 처리한 후, HPLC 분석을 통해 piceid 및 resveratrol의 함량을 측정함 (그림 32).

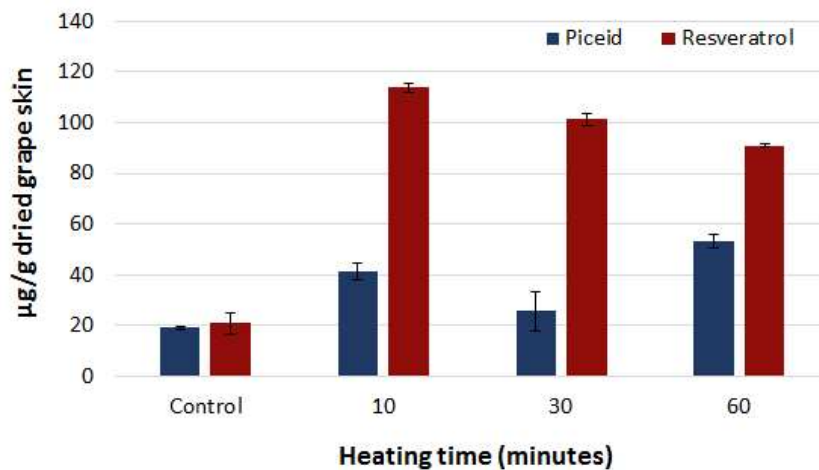


그림 32. Effect of heating period at 95°C on extraction rate of piceid and resveratrol from grape skin.

○ 10분간 열 처리 시 piceid 및 resveratrol의 추출 효율이 크게 증가하였음.

### 1.3.2. 최적 처리 온도

○ 균질화된 포도 과피를 35, 45, 55, 65, 75, 95°C에서 10분간 열 처리한 후, HPLC 분석을 통해 piceid 및 resveratrol의 함량을 측정함 (그림 33).

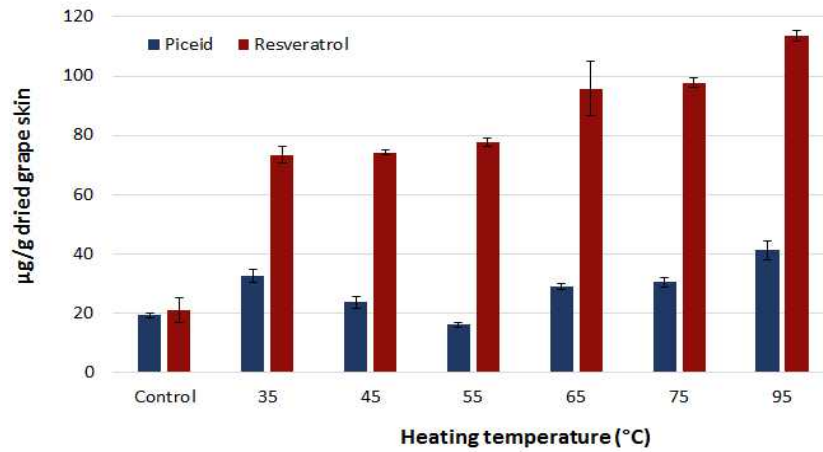


그림 33. Effect of heating temperature on extraction rate of piceid and resveratrol from grape skin.

○ 95°C에서 10분간 열 처리 시 piceid 및 resveratrol의 추출 효율이 크게 증가하였음.

#### 1.3.2.1. DPPH 또는 ABTS 라디칼 소거능 분석

○ 열 처리된 포도 과피 추출물의 항산화 활성을 측정하기 위해, 라디칼 소거능을 측정함 (그림 34).

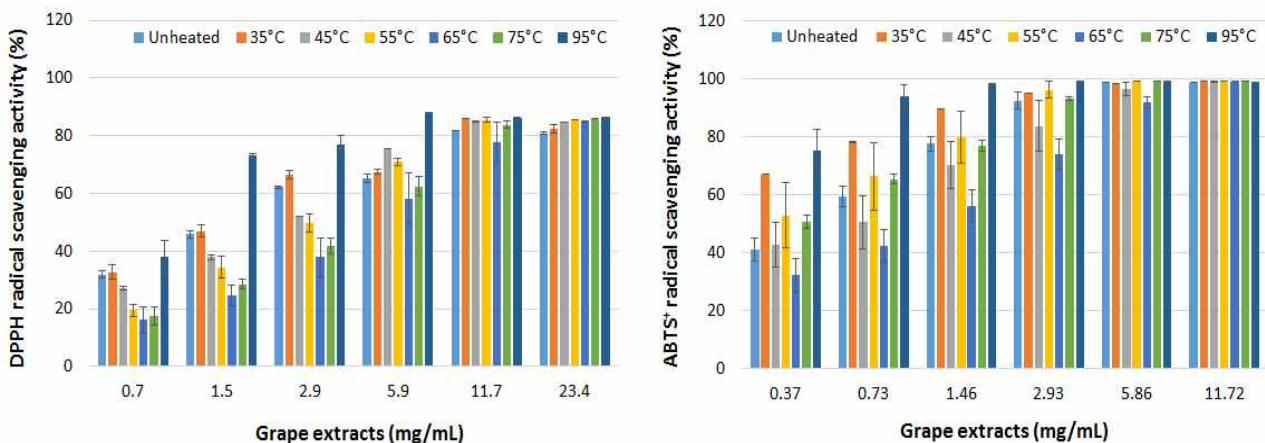


그림 34. Antioxidant activity of extracts from grape skin preheated at various temperatures.



○ 모든 시료에서 농도 의존적인 항산화 활성을 보였지만, 95°C에서 10분간 열 처리된 포도 과피 추출물이 더 낮은 온도에서 열 처리된 추출물보다 항산화 활성이 유의적으로 높았음.

### 1.3.2.2. 총 페놀, 총 플라보노이드, 총 안토시아닌 함량 분석

○ 열 처리된 포도 과피 추출물의 총 페놀, 총 플라보노이드, 총 안토시아닌 함량을 분석함 (표 6).

표 6. Effect of preheating temperature on levels of total anthocyanins, total phenolics, and total flavonoids extracted from grape skin

Temperature (°C)	Total Anthocyanins <sup>1</sup>	Total Phenolics <sup>2</sup>	Total Flavonoids <sup>3</sup>
Control	125.35 ± 3.48 <sup>*a</sup>	48.97 ± 1.37 <sup>a</sup>	167.50 ± 7.89 <sup>a</sup>
35	213.10 ± 11.13 <sup>c</sup>	77.23 ± 0.89 <sup>b,c</sup>	297.30 ± 8.62 <sup>c</sup>
45	175.37 ± 3.77 <sup>b</sup>	82.14 ± 0.58 <sup>c</sup>	279.35 ± 5.21 <sup>c</sup>
55	240.20 ± 7.67 <sup>d</sup>	80.93 ± 1.01 <sup>c</sup>	413.46 ± 15.33 <sup>e</sup>
65	144.81 ± 4.89 <sup>a</sup>	72.54 ± 2.13 <sup>b</sup>	219.74 ± 8.56 <sup>b</sup>
75	189.87 ± 8.81 <sup>b</sup>	78.25 ± 1.79 <sup>c</sup>	334.82 ± 18.68 <sup>d</sup>
95	390.62 ± 9.56 <sup>e</sup>	92.71 ± 2.58 <sup>d</sup>	630.03 ± 10.20 <sup>f</sup>

<sup>1</sup>mg cyanidin 3-glucoside/g dried grape skin as measured by the pH differential method and detected at 510 nm.

<sup>2</sup>µg gallic acid/g dried grape skin as measured by the Folin-Ciocalteu method and detected at 655 nm.

<sup>3</sup>µg quercetin/g dried grape skin as measured by the aluminum chloride colorimetric assay and detected at 415 nm.

\*Data are mean ± S.D. values of three replicates.

Values in the same column not sharing identical letters indicate significant differences from each other (at  $p < 0.05$ ), as evaluated by one-way ANOVA followed by the Duncan multiple-range test.

○ 95°C에서 10분간 열 처리된 포도 과피 추출물이 더 낮은 온도에서 열 처리된 추출물보다 총 안토시아닌, 총 페놀, 총 플라보노이드 함량이 유의적으로 높았음.

○ 따라서, 효소 처리 전 95°C에서 10분간 열 처리를 통해 효소 활성을 높임으로써, piceid로부터 resveratrol로의 전환율을 증진시킬 수 있을 것이라 판단함.

#### 1.4. 효소 처리 전 열 처리를 통한 포도 과피로부터 piceid 및 resveratrol 추출 극대화

##### 1.4.1. LC-MS/MS 분석을 통한 piceid 및 resveratrol 함량 측정

○ 포도 과피를 95°C에서 10분간 열 처리한 후, VinoTaste 또는 β-glucosidase으로 생물전환을 유도하였음. 80% 에탄올로 추출한 후 LC-MS/MS 분석으로 piceid 및 resveratrol의 함량을 측정함 (표 7; 그림 35).

표 7. The levels of piceid and resveratrol in extracts prepared by pre-heating and enzyme treatment of grape skin

Samples		Piceid** µg/g dried skin	Resveratrol** µg/g dried skin
Unheated	Control	15.40 ± 6.90	16.89 ± 1.55
	β-Glucosidase	16.47 ± 11.50	11.45 ± 7.17
	VinoTaste Pro	26.81 ± 10.18	13.13 ± 8.74
Heated	Control	56.27 ± 12.34	72.35 ± 12.80
	β-Glucosidase	16.88 ± 8.21	139.05 ± 28.79
	VinoTaste Pro	nd*	205.27 ± 31.73

\*nd – not detected    \*\*Results are obtained from three independent trials.

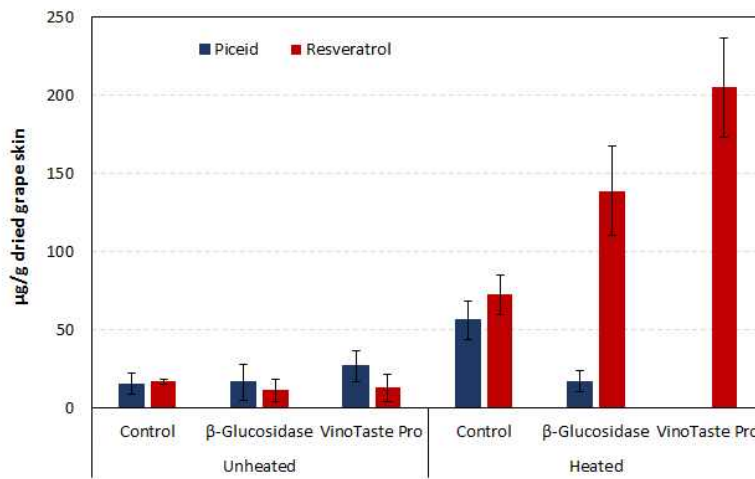


그림 35. Contents of piceid and resveratrol extracted from heat and enzyme-treated grape skin.

○ 열 처리에 의해 piceid 추출이 증가되었고, 열 처리 후 효소 처리에 의해 resveratrol의 생산 및 추출률이 크게 증가하였음. 특히 VinoTaste® Pro 처리 시 resveratrol 추출이 더욱 증가하였음.

### 1.4.2. 라디컬 소거능 분석

○ 열 처리 및 VinoTaste® Pro 처리된 포도 과피 추출물의 항산화 활성을 측정하기 위해 DPPH 또는 ABTS 라디컬 소거능을 분석함 (그림 36).

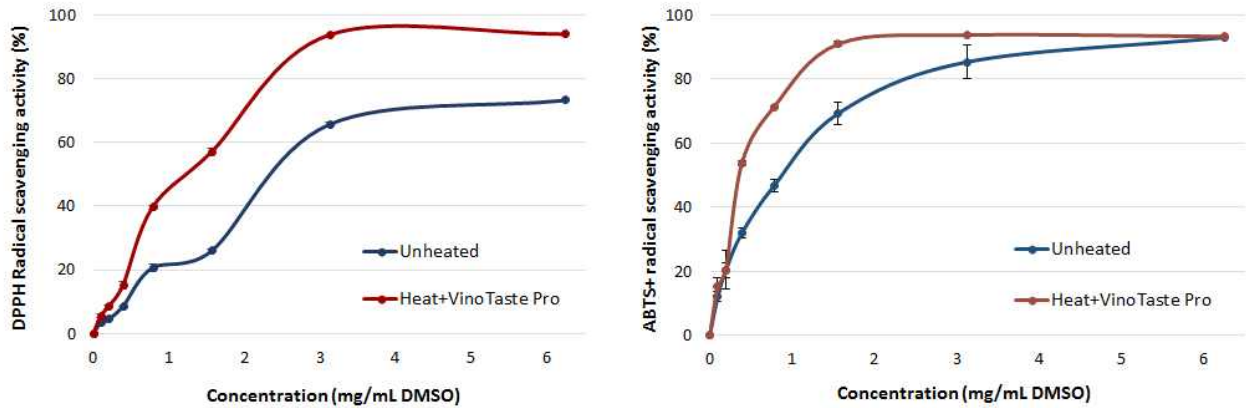


그림 36. Radical scavenging capability of extracts from grape skin preheated at 95°C for 10 min followed by enzyme treatment with VinoTaste® Pro.

○ 열 전처리 및 VenoTaste® Pro 의 첨가 조건에서 항산화 활성이 더 높았음.

### 1.4.3. 총 페놀, 총 플라보노이드 함량 분석

○ 열 처리된 포도 과피 추출물의 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량을 분석함 (표 8).

표 8. Effect of preheating temperature on extraction of total phenolics and total flavonoids from grape skin

Condition		Total Phenols <sup>*A</sup>	Total Flavonoids <sup>*B</sup>
Unheated	Control	52.65 ± 2.80	202.63 ± 13.44
	β-Glucosidase	80.72 ± 6.30	557.87 ± 12.73
	VinoTaste Pro	161.66 ± 5.16	782.30 ± 12.66
Heated	Control	110.40 ± 4.46 <sup>a</sup>	613.23 ± 7.85
	β-Glucosidase	119.75 ± 4.91 <sup>a</sup>	869.27 ± 13.15
	VinoTaste Pro	192.30 ± 4.75	1121.8 ± 7.75

<sup>A</sup> μg gallic acid/g dried skin measured by Folin-Ciocalteu's method detected at 655 nm.

<sup>B</sup> μg quercetin/g dried skin measured by aluminum chloride colorimetric assay detected at 415 nm.

\* Data are mean ± SE values of three replicates. Values in a single column sharing identical letters are not significantly different at p < 0.05 as evaluated by one-way ANOVA followed by Duncan multiple-range test.

○ 95°C에서 10분간 열 처리 후 VinoTaste® Pro 처리한 포도 과피 추출물이 열 처리하지 않았거나 효소 처리 하지 않은 추출물보다 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량이 유의적으로 높았음.

○ 따라서, VinoTaste® Pro 처리 시 piceid로부터 resveratrol로의 생물전환이 일어날 수 있고, 특히 포도 과피를 95°C에서 10분간 열 처리하여 효소의 활성을 높일 수 있음을 확인하였음. 즉, 열이 가해진 포도 과피에  $\beta$ -1,3-glucanase와 polygalacturonase를 처리할 때 resveratrol을 포함하는 항산화 성분의 추출을 극대화할 수 있음.

2. 선별된 건강뷰티 음료 소재의 세포모델계 항산화 유도 활성 평가 (관련 연구 결과를 BioMed Research International 저널에 게재함.)

### 2.1. 음료 소재의 세포 독성 평가

#### 2.1.1. 생쥐 간 세포에서 세포 독성 평가

○ Hepal1c1c7 세포에서 음료 소재 시료의 세포 독성 평가 (그림 37)

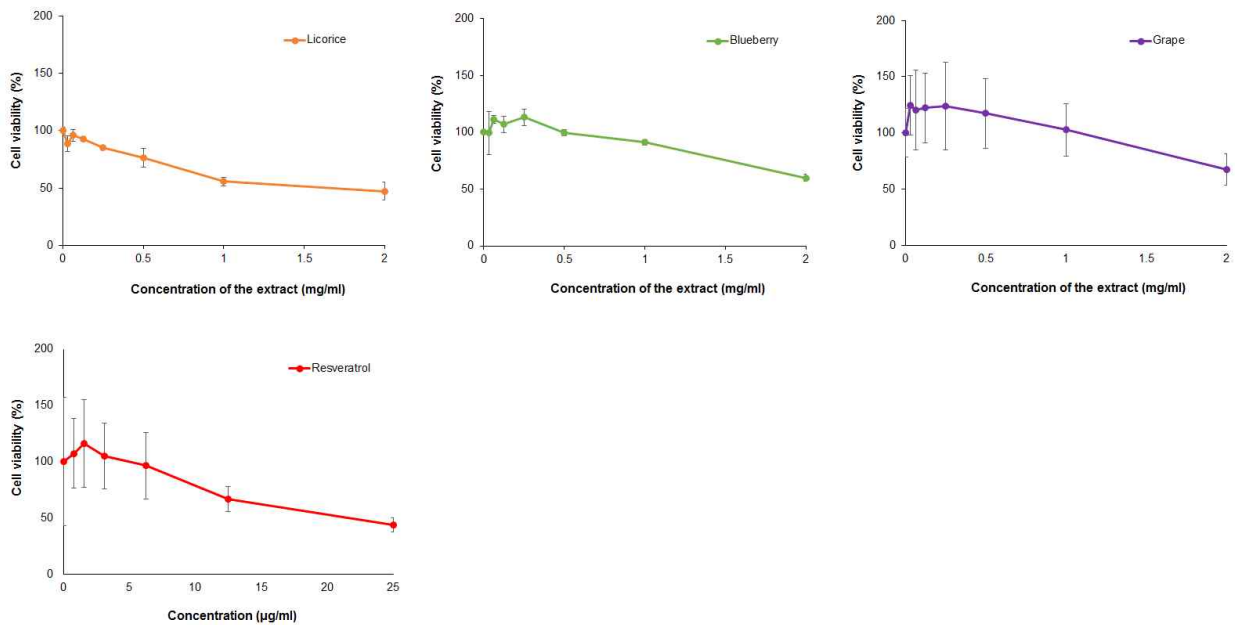


그림 37. Cytotoxicity of resveratrol, herbal and fruit extracts for Hepal1c1c7 cells.

○ 감초, 블루베리, 포도 추출물 0.5 mg/ml 이하 농도에서, 레스베라트롤은 6.25 µg/ml 이하 농도에서 세포 독성이 없는 것으로 나타남.

#### 2.1.2. 사람 간 세포에서 세포 독성 평가

○ HepG2 세포에서 음료 소재 시료의 세포 독성 평가 (그림 38)

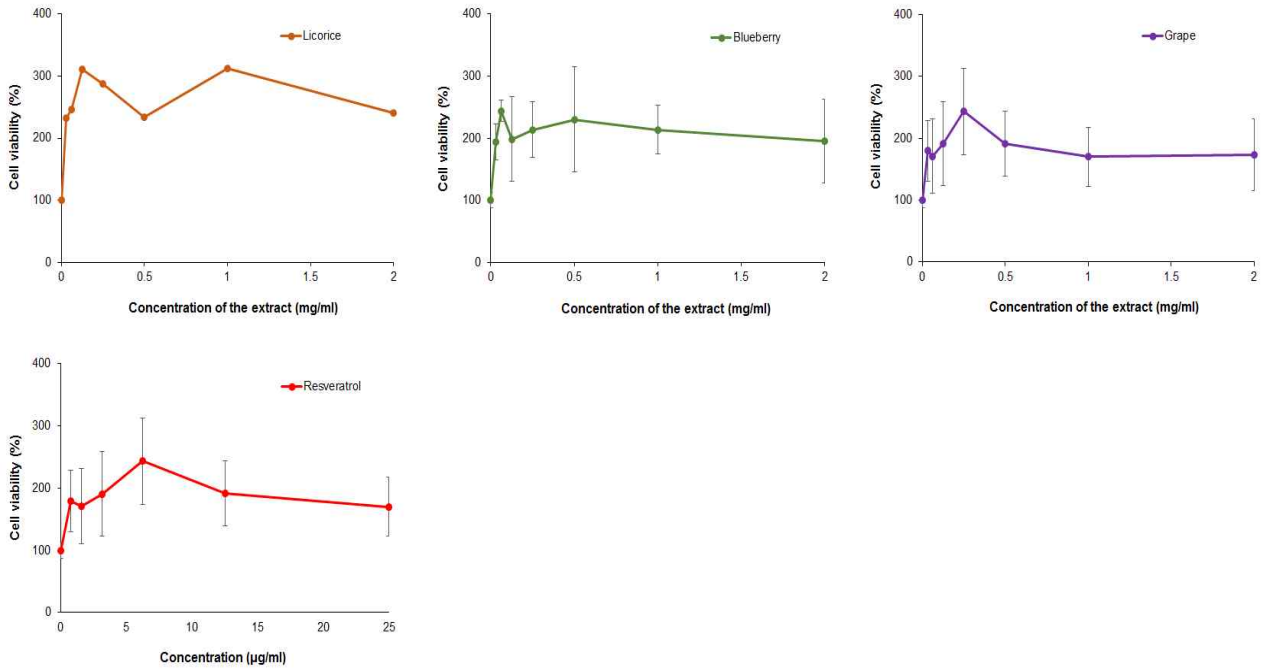


그림 38. Cytotoxicity of resveratrol, herbal and fruit extracts for HepG2 cells.

○ 감초, 블루베리, 포도 추출물 2 mg/ml 이하 농도에서, 레스베라트롤은 25 µg/ml 이하 농도에서 세포 독성이 없는 것으로 나타남.

## 2.2. Resveratrol 처리된 사람 피부각질세포(keratinocytes)의 UVB 노출에 대한 저항성 평가

○ 피부각질세포인 HaCaT cells을 resveratrol로 전처리 후 자외선(UVB)에 노출하여, resveratrol 또는 resveratrol을 포함하는 포도 과피의 전처리가 자외선에 노출된 피부세포에 산화적 스트레스에 대한 저항력을 줄 수 있는지 평가함 (그림 39).

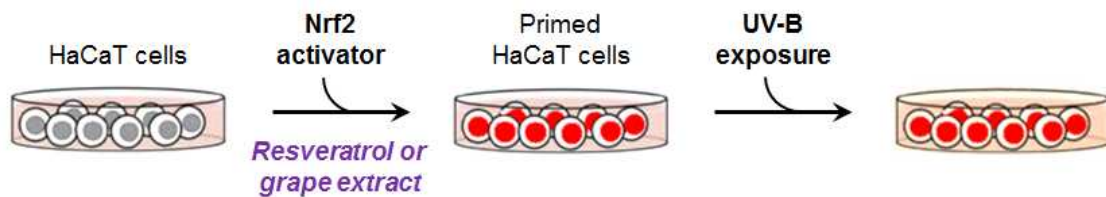


그림 39. Schematic illustration of cell treatment with resveratrol followed by UV irradiation.

○ HaCaT cells에 resveratrol (0, 2, 10 µM)을 전처리하고 UVB (1, 25, 50 mJ/cm<sup>2</sup>)를 조사한 후, Western blotting 분석을 통해 항산화 효소계의 발현량을 측정함 (그림 40).

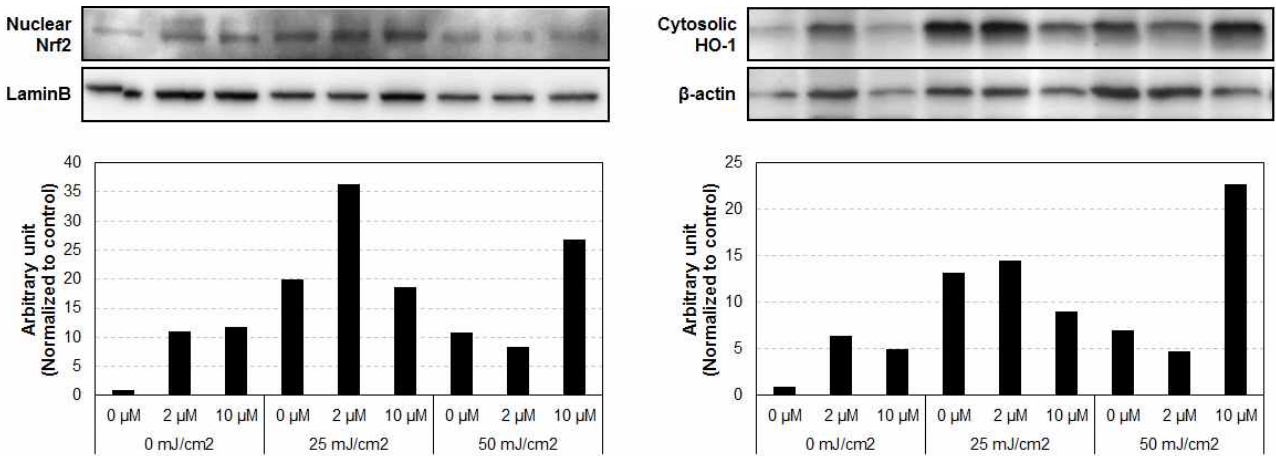


그림 40. Effect of resveratrol on the levels of nuclear Nrf2 and cytosolic HO-1 in HaCaT Cells exposed to UVB.

○ 피부각질세포를 50 mJ/cm<sup>2</sup>로 조사한 경우, 세포 사멸이 관찰되었음. 그러나 25 mJ/cm<sup>2</sup>로 조사한 경우 세포 사멸이 관찰되지 않았을 뿐만 아니라, 2 μM resveratrol이 전처리된 경우, 항산화 효소인 Nrf2 및 HO-1의 발현량이 대조구에 비해 상당히 증가하였음.

○ 포도 과피 추출물 또는 resveratrol은 항산화 효소계 발현 증진 효능이 있어, 과피 추출물 또는 resveratrol로 전처리 시 피부세포는 UVB 노출에 의한 산화적 스트레스에 저항성을 가질 것으로 판단됨.

○ Resveratrol의 최적 추출 조건을 확립하여 과피 추출물 시료를 확보한 만큼, 음료 제품의 원료 소재로 활용될 resveratrol을 함유하는 과피 추출물의 효능도 당해연도 연구기간 내 평가할 예정임.

### 3. 선별된 건강뷰티 음료 소재의 동물모델계 항산화 유도 활성 및 항노화 지표 변화 평가

○ 본 실험은 식품의약품안전처 발행 「건강기능식품 기능성 평가 가이드 '피부건강에 도움을 줄 수 있음'편」 (2014)와 「주름개선에 도움을 주는 기능성화장품의 유효성평가를 위한 가이드라인」 (2005)에 의거하여 진행함.

#### 3.1. 동물모델계에서 피부 노화 유도

○ 6주령의 ICR mice에 음료 제품의 소재 후보인 블루베리, 포도, 감초의 에탄올 추출물을 5주에 걸쳐 경구 투여함. 동시에 자외선의 세기를 증가시키며 조사하여 피부 광노화를 유도하였음 (그림 41).

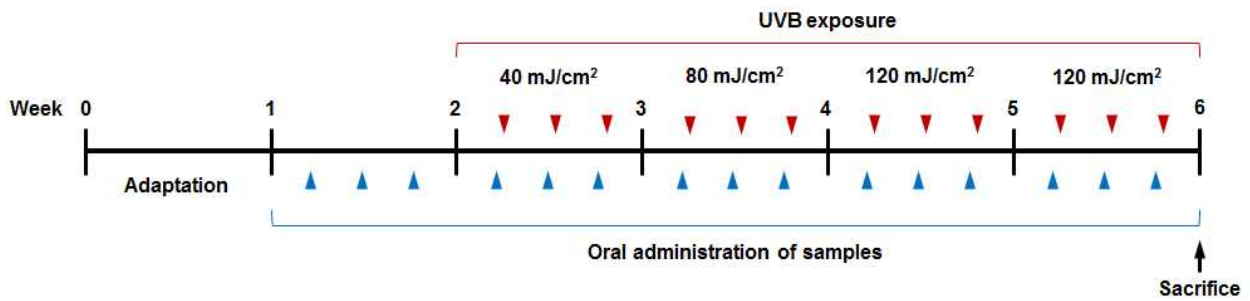


그림 41. Experimental design for animal study

○ 시료 처리 농도 및 실험 동물 그룹별 체중 변화는 다음과 같았음 (그림 42). 각 그룹당 8마리 (총 80마리)의 생쥐를 이용하여 실험을 진행함. 실험 기간 동안 그룹별 유의한 체중 변화는 없었음.

	Sample treatment (mg/kg BW)	UV exposure
Control	None	No
Vehicle	10% v/v Ethanol and 10% v/v Tween 80 in drinking water	Yes
Resveratrol	2	Yes
Resveratrol	10	Yes
Resveratrol	50	Yes
Licorice (감초)	1000	Yes
Blueberry (블루베리)	1000	Yes
Blueberry (블루베리)	2000	Yes
Grape (포도)	1000	Yes
Grape (포도)	2000	Yes

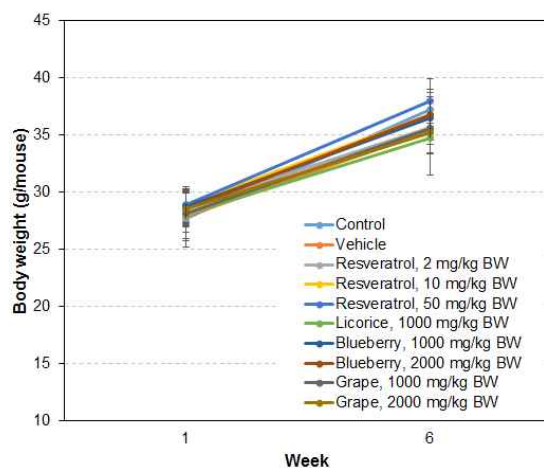


그림 42. Body weight change of experimental groups

○ 5주간의 실험이 종료된 후, 생쥐의 등부분을 제모하여 피부 손상 및 노화 정도를 분석함 (그림 43).



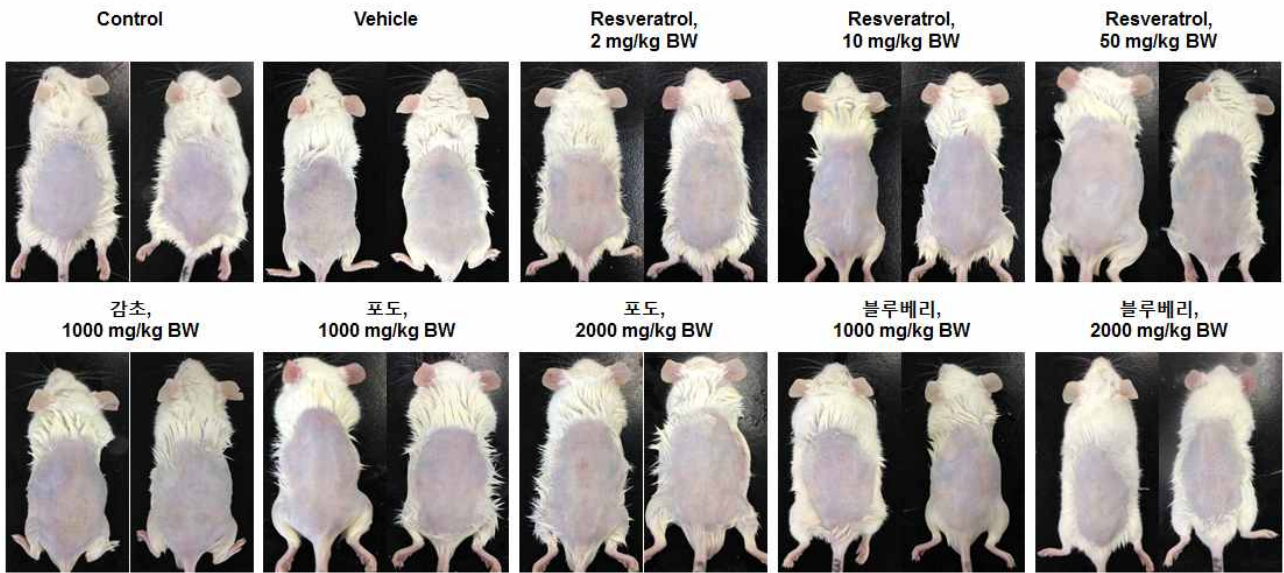


그림 43. Representative photos of ICR mice shaved and depilated prior to the skin replica preparation.

### 3.2. 피부 모사판 분석

○ 피부 손상 정도를 분석하기 위해서, 모든 생쥐의 등부분을 제모하고, Silicon replica material을 이용하여 피부 모사판을 제작하였음 (그림 44).

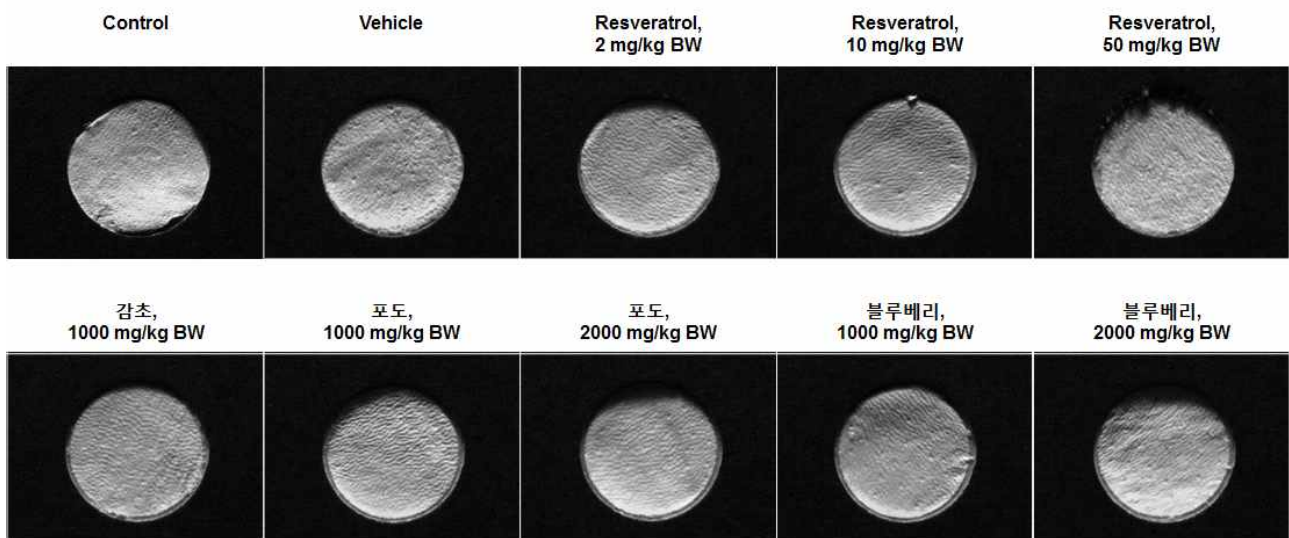


그림 44. Representative skin replicas prepared from skin of mice in different diet groups.

○ Visioline® VL 650 기기(대구테크노파크한방산업지원센터 보유)를 이용하여, 제작한 피부 모사판의 주름 면적, 갯수, 길이, 깊이를 분석함 (그림 45-47).

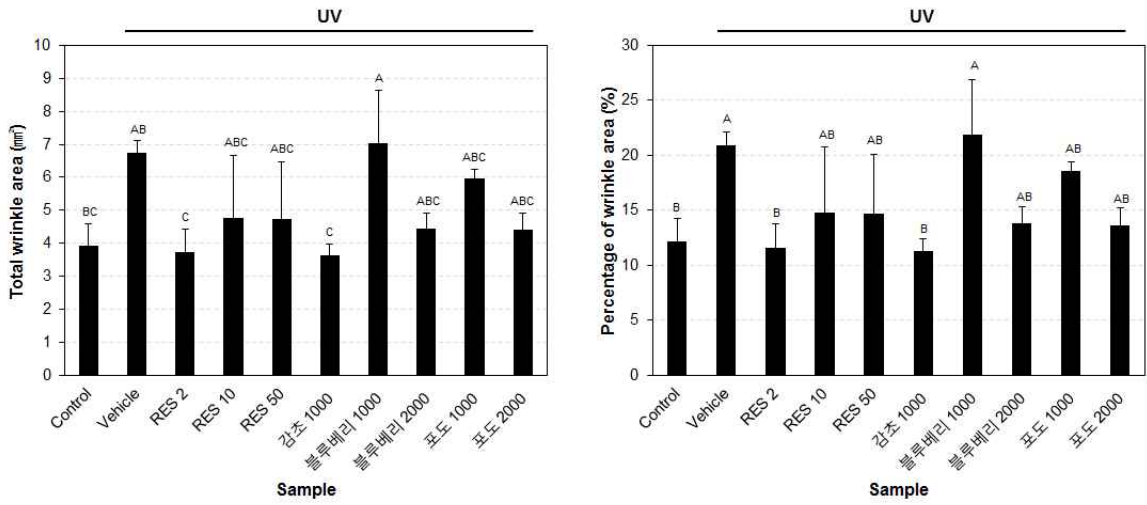


그림 45. Total wrinkle area and percentage of wrinkle area.

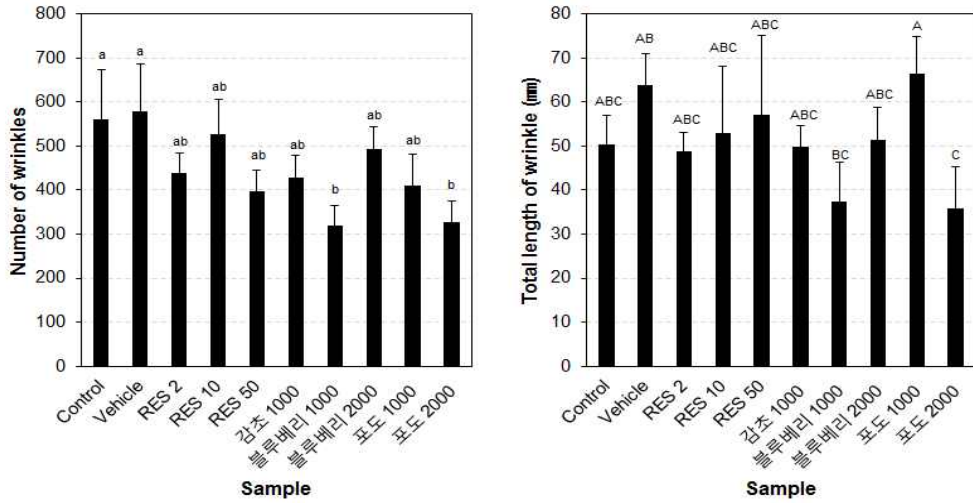


그림 46. Number of wrinkles and total length of wrinkle.

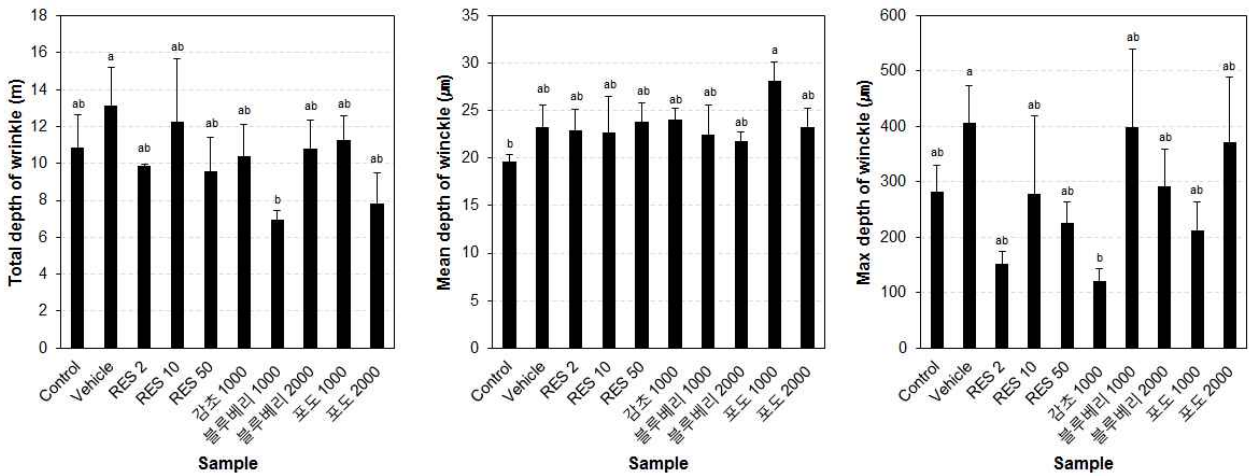


그림 47. Total depth of wrinkle, mean depth of wrinkle, and max depth of wrinkle.

○ UV가 조사되지 않은 대조구에 비해, UV가 조사된 피부에서 주름 면적과 깊이가 더 넓고 깊게 나타남.

○ 레스베라트롤 2 mg/kg bw 농도로 처리된 그룹에서는 주름의 면적과 깊이가 대조구와 비슷한 수준이었음. 감초 1000 mg/kg bw 농도로 처리된 그룹에서는 주름의 면적, 깊이, 개수에서 대조구와 비슷한 수준이었음. 블루베리와 포도 역시 주름 개선 효능이 있는 것으로 보였음.

○ 즉, 레스베라트롤 뿐만 아니라, 감초, 블루베리, 포도 추출물의 경구 투여 시, UV 조사에 의한 피부 손상을 억제 (특히 주름 개선)하는 효과가 있었음.

### 3.3. 간 조직에서의 항산화 효소 발현 분석

○ 레스베라트롤 또는 감초, 블루베리, 포도 추출물의 경구 투여가 생쥐 간 조직에서 항산화 효소계에 영향을 미치는지 알아보기 위해, 간 조직 샘플에서 항산화 효소 Nrf2 및 HO-1의 발현량을 측정함 (그림 48-49).

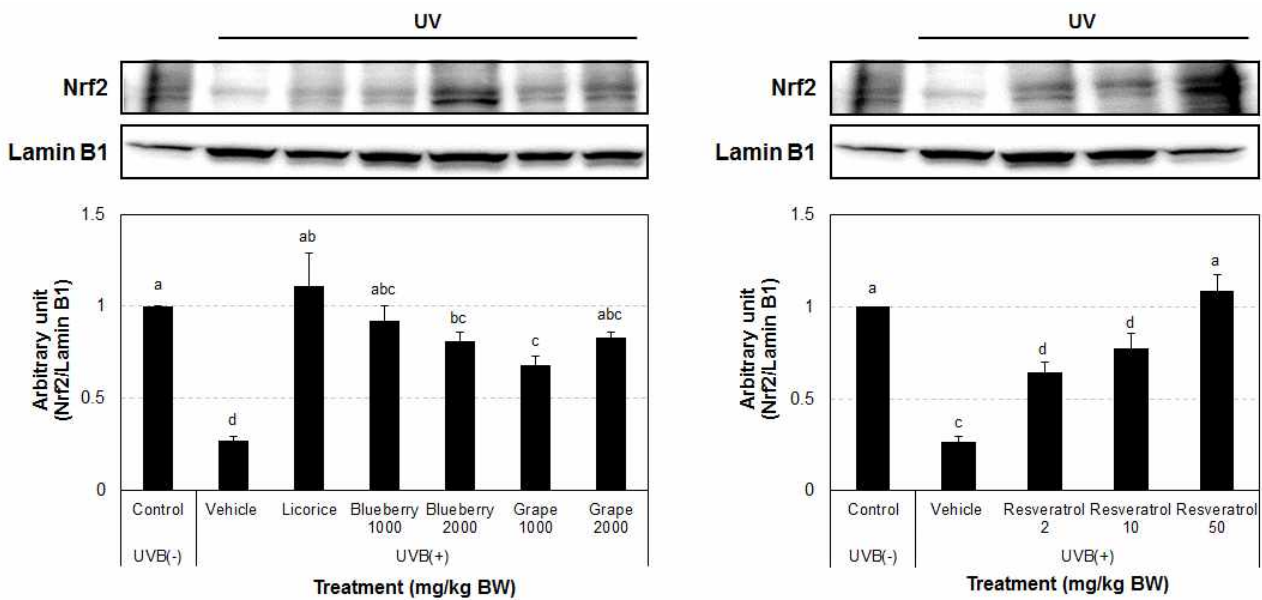


그림 48. Nuclear Nrf2 expression level in liver tissue collected from mice in different experimental groups.

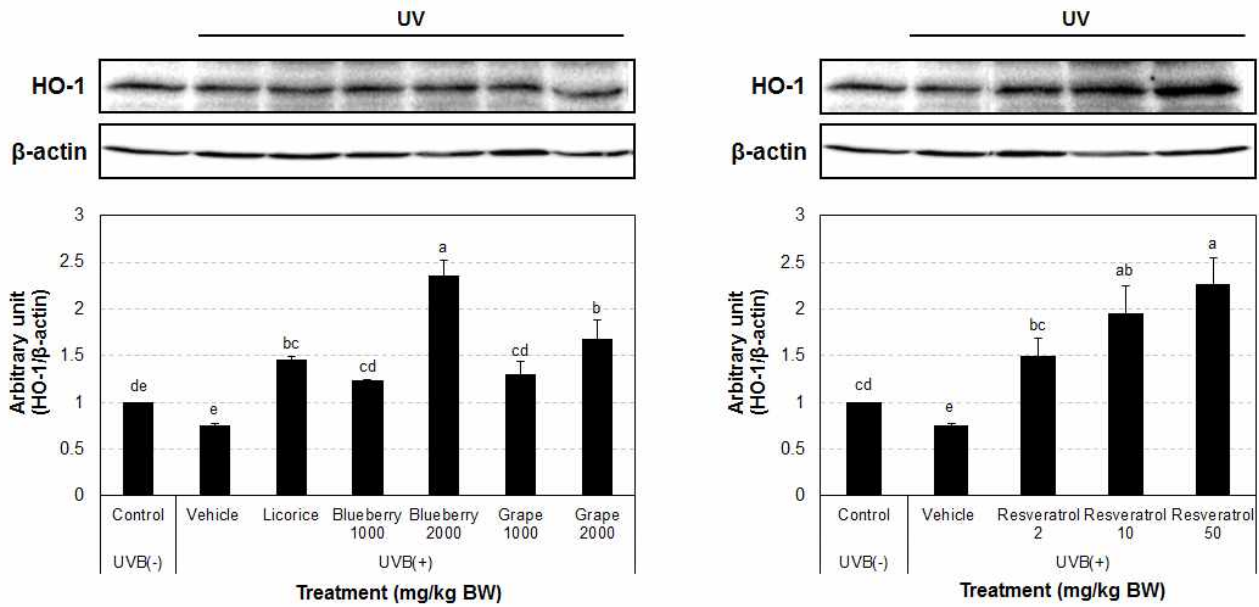


그림 49. Cytoplasmic HO-1 expression level in the liver tissue collected from mice in different experimental groups.

○ 레스베라트롤 또는 감초, 블루베리, 포도 추출물을 경구 투여한 생쥐의 간에서 핵 내 Nrf2와 세포질의 HO-1 단백질의 발현이 농도 의존적으로 증가해 있음을 관찰함.

○ 경구 투여된 시료들은 항산화 활성 및 레스베라트롤 함량이 매우 높고, 생체 내에서 소화 흡수되어 간에서 항산화 활성을 높이는 것으로 판단됨.

### 3.4. 피부 조직에서의 항산화 효소 및 피부 노화 지표 단백질 발현 분석

○ 레스베라트롤 또는 감초, 블루베리, 포도 추출물의 경구 투여가 간 조직 뿐만 아니라, UV 조사에 의한 산화적 스트레스를 완화할 수 있는지 알아보기 위해, 생쥐의 피부 조직에서 항산화 효소 Nrf2 및 HO-1의 발현량을 측정하였음 (그림 50-51).

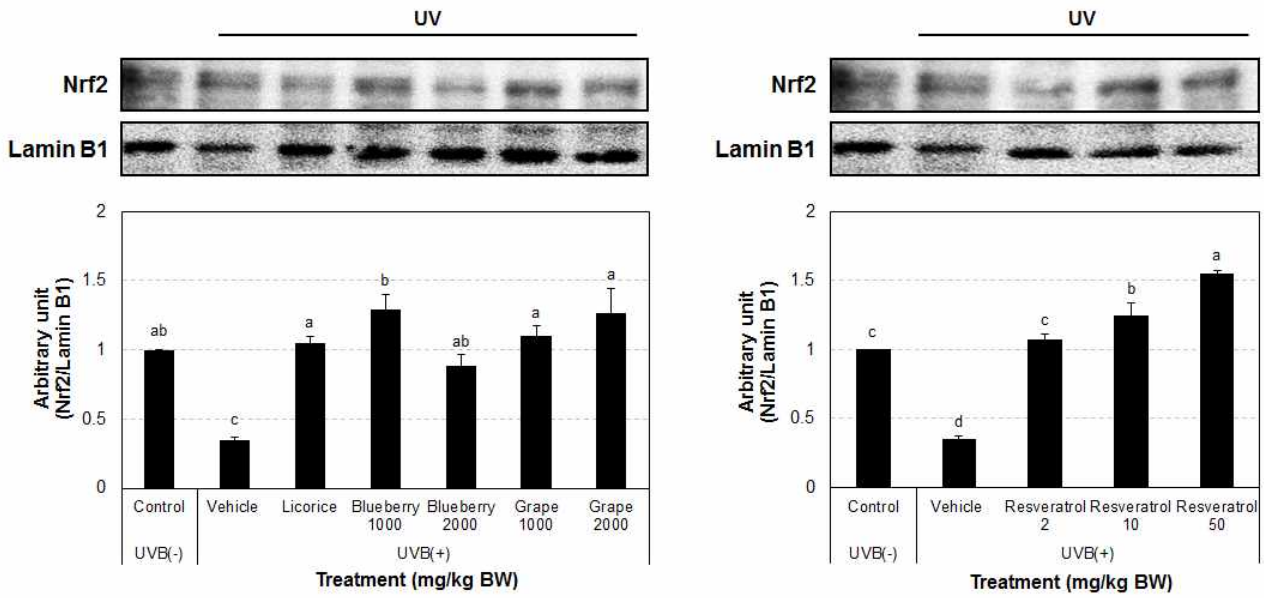


그림 50. Nuclear Nrf2 expression level in the skin tissue collected from mice in different experimental groups.

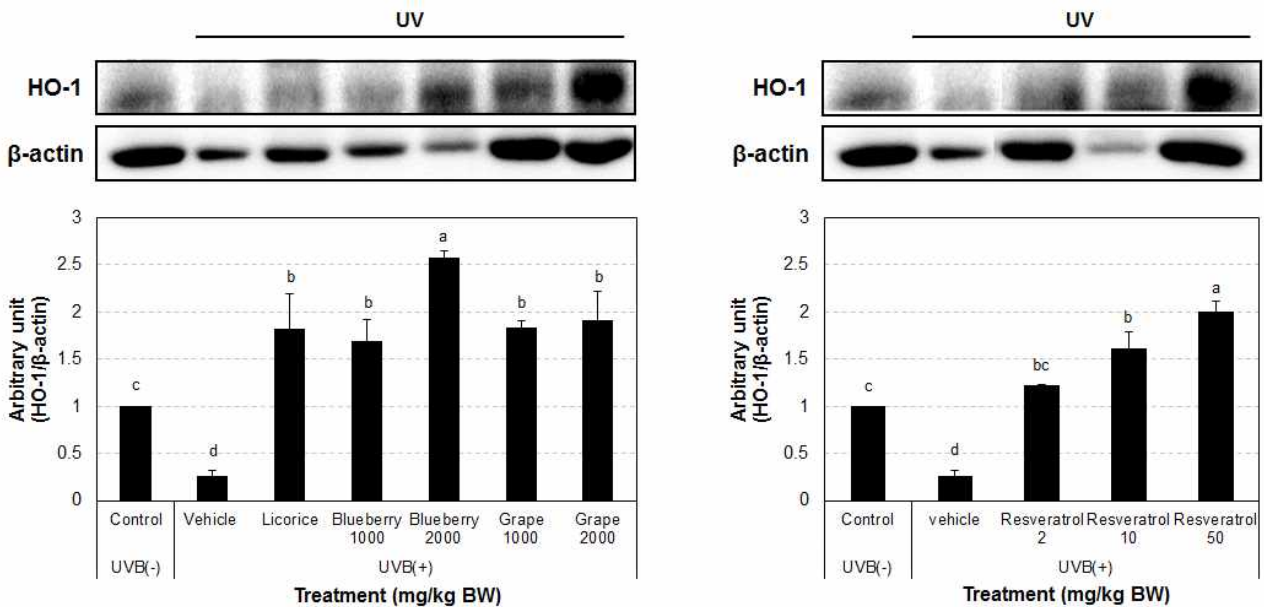


그림 51. Cytoplasmic HO-1 expression level in the skin tissue collected from mice in different experimental groups.

○ UV가 조사된 생쥐의 피부 조직에서 핵 내 Nrf2와 세포질의 HO-1 단백질의 발현이 매우 감소해 있음을 관찰하였음. 그러나 레스베라트롤 또는 감초, 블루베리, 포도 추출물을 경구 투여한 생쥐의 피부 조직에서는 Nrf2와 HO-1의 발현이 감소되지 않거나 대조구보다 더 증가하였음.

○ 피부의 항산화능을 향상시키는 해당 시료의 투여가 피부 손상 및 주름을 개선하는 효과가 있는지 알아보기 위해, 피부 노화 지표인 콜라겐 분해효소 collagenase (MMP-1)과 젤라틴 분

해효소 gelatinase (MMP-9)의 발현양을 분석함 (그림 52-53).

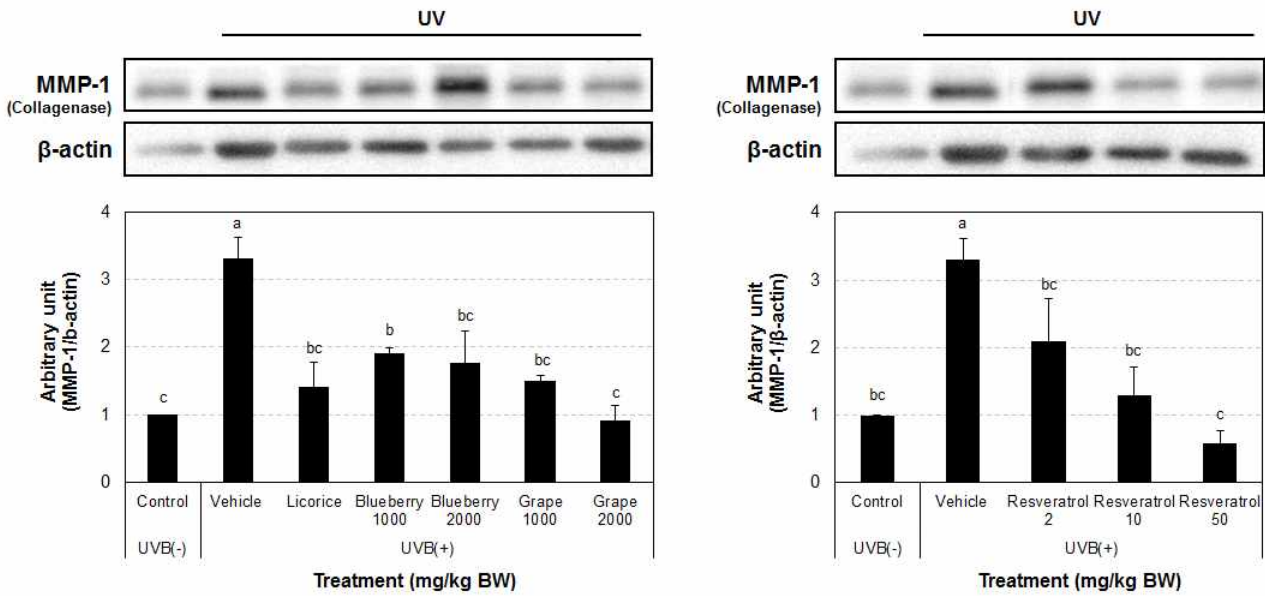


그림 52. Collagenase (MMP-1) expression level in the skin tissue collected from mice in different experimental groups.

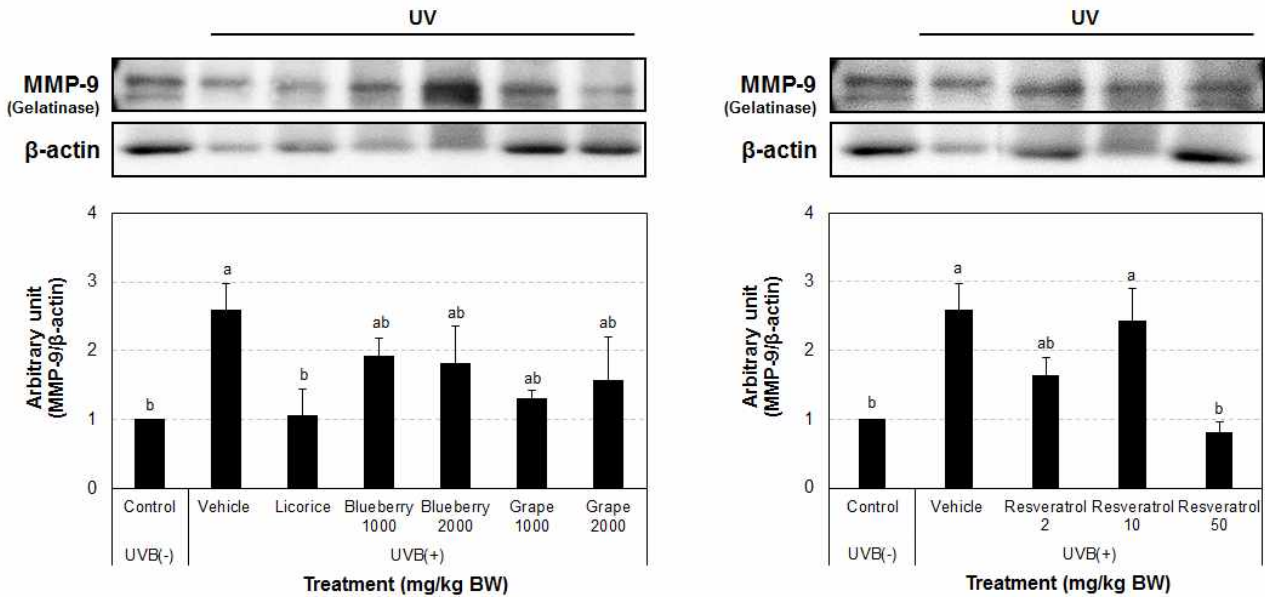


그림 53. Gelatinase (MMP-9) expression level in the skin tissue collected from mice in different experimental groups.

○ 콜라겐과 젤라틴은 피부의 탄력을 유지하는데 중요한 요소임. UV 조사에 의해 이들의 분해 효소인 MMP-1과 MMP-9의 발현이 크게 증가한 반면, 레스베라트롤 및 감초, 블루베리, 포도 추출물을 경구 투여한 그룹에서는 대조구와 비슷한 수준을 보였음.

○ 따라서 이러한 결과는, 항산화 활성 및 레스베라트롤 함량이 높은 추출물을 음용하면, 간

뿐만 아니라 피부 세포 내 항산화 효소의 발현이 증가됨에 따라 UV에 의한 피부 손상을 완화하고 주름을 개선할 수 있음을 뒷받침함.

### 3.5. 조직학적 분석

○ UV 조사 및 시료의 경구 투여가 종료된 후, 제모된 부위의 피부 조직을 절개하여 고정 용액에 fixing, 파라핀에 embedding, vibratome으로 slicing (두께 4 μm) 하여 조직학적 분석을 준비함. 준비된 조직 slices는 haematoxylin and eosin stain 방법으로 염색한 후, 현미경으로 관찰함 (그림 54).

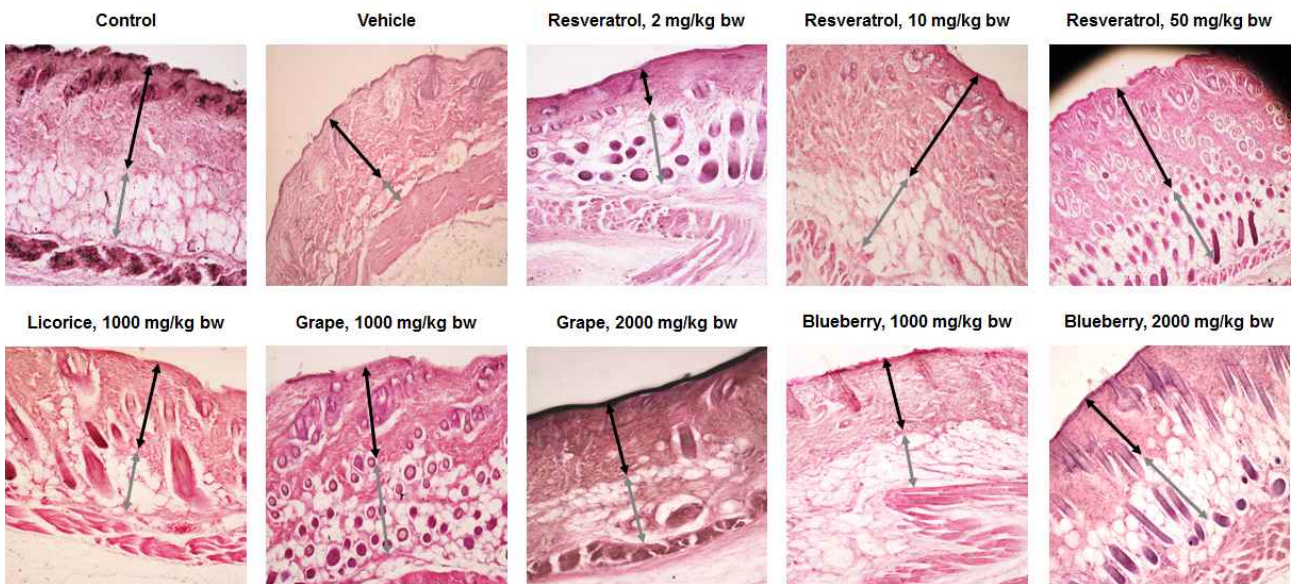


그림 54. Histological analysis by H&E staining for skin tissue collected from mice in different experimental groups.

○ UV 조사된 피부는 epidermis 층이 두꺼워지고 dermis 층과 hypodermis 층은 얇아짐. 그러나 레스베라트롤 및 감초, 포도, 블루베리 투여에 의해 이 같은 변화가 완화되었음을 관찰함.

○ 이와 같이, 피부 모사판 분석, 항산화 효소 발현 분석, 조직학적 분석을 통해, 레스베라트롤, 감초, 블루베리, 포도 추출물을 경구 투여가 간 및 피부 조직의 항산화 효소의 발현을 증가시켜, UV 조사에 의한 피부 조직 내 산화적 스트레스를 완화함으로써 피부 손상 및 주름을 개선하는 항노화 효과가 있음을 확인하였음.

○ 동물 모델계에서 UV 조사에 의한 피부 노화 유도 방법 및 시료 처리 조건을 확립하여 성공적으로 진행하였음. 최종 레시피 결정 후 제품의 항노화 효능을 분석함.

## 6. 3차년도

### ■ 세부연구목표 : 최종 개발 제품의 항노화 활성 유효성 평가

#### 1. 시제품의 유효성 전임상 평가

##### 1.1. 주름방지 주스 시제품

○ 주관기관으로부터 원료농축액 베이스(주름방지 추출액) 및 시제품(주름방지 주스)를 전달 받아, 주름방지 유효성을 평가함.

○ 주름방지 추출액 및 주스의 레시피는 다음과 같았음.

주름방지 추출액		주름방지 주스	
도라지	40	포도	14.25
생강	20	블루베리	9.50
포도씨	1	사과	28.50
황기	3	배	38.00
감초	2	비트	4.75
계피	20	<b>주름방지 추출액</b>	<b>5.00</b>
배추	1	계 (%)	100
은행	5		
대추	8		
계 (%)	100		

○ 주름방지 추출액 및 주스를 동결건조하여 세포 및 동물을 활용한 효능평가에 사용하였음.

##### 1.2. 주름방지 주스 시제품의 세포 독성 평가

○ 사람 피부 각질세포인 HaCaT cells에 24시간 처리한 후, CCK-8 kit를 이용하여 세포생존율(cell viability)을 분석함 (그림 55).

○ 처리한 농도 (최대 1 mg/mL)에서는 시료의 세포 독성이 관찰되지 않았음.



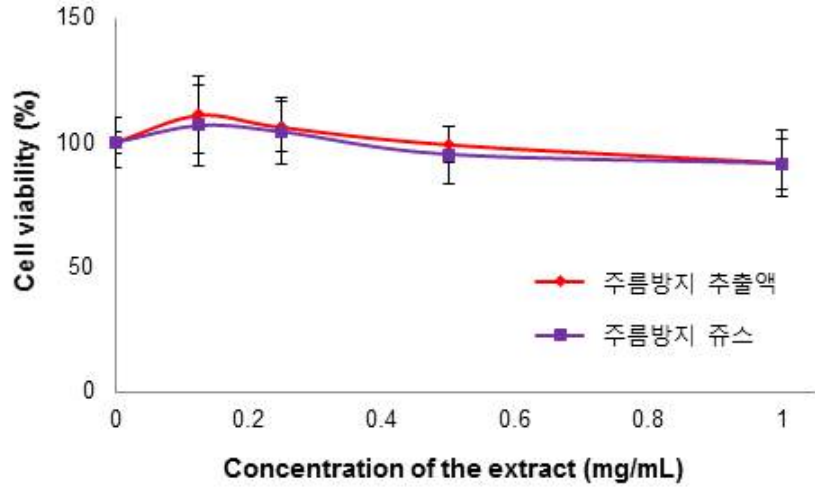


그림 55. Effect of the freeze-dried anti-wrinkle mixture and juice on HaCaT cell viability.

### 1.3. 주름방지 쥬스 시제품의 항산화 활성 평가

#### 1.3.1. 라디칼 소거 활성

○ DPPH 라디칼 소거 활성 측정: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH)에 대한 항산화제의 환원능력을 측정하여 항산화활성을 평가하였음. 50  $\mu$ l의 시료(DMSO에 일정 농도로 녹여진 시료)에 200  $\mu$ l의 0.2 mM의 DPPH 용액을 첨가하고, 37°C에서 30분간 반응한 후 515 nm 파장에서 흡광도를 측정하였음. 515 nm에서 DPPH 용액의 색이 소실되는 정도를 측정하여 남아있는 DPPH의 함량을 계산하였으며, 이는 항산화제 농도와 비례하는 것으로 나타났음. (그림 56)

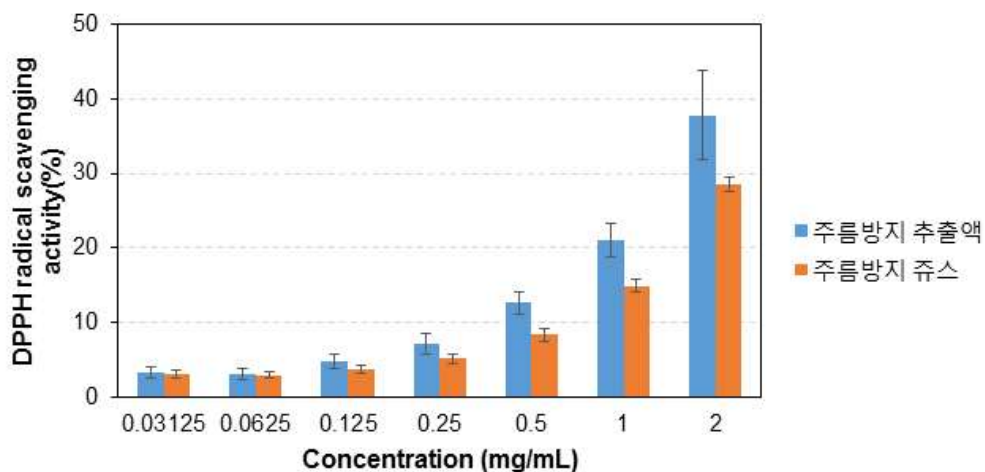


그림 56. DPPH radical scavenging activities of anti-wrinkle mixture and juice.

○ ABTS 라디칼 소거 활성 측정: 2,2-amino bis(3-ethylbenzthiazolilne-6-sulphonic acid) diammonium salt (ABTS<sup>+</sup>)에 대한 항산화제의 환원능력을 측정하였음. 1 mL의 70 mM ABTS 용액, 9 mL 물, 그리고 175  $\mu$ l의 140 mM potassium persulfate를 섞고 어두운 상온에서 12시간 교반한 후, 에탄올을 첨가하여 파장 734 nm에서 흡광도 값이  $0.7 \pm 0.02$ 가 되도록 희석하여 사용하였음. 100  $\mu$ l의 시료(DMSO에 일정 농도로 녹여진 시료)에 900  $\mu$ l ABTS용액을 첨가한 후 5분간 안정화시키고 파장 734nm에서 흡광도를 측정하였음. ABTS cation 라디칼 소거능은 실험구와 음성대조군의 흡광도를 구하여 계산하였음. (그림 57)

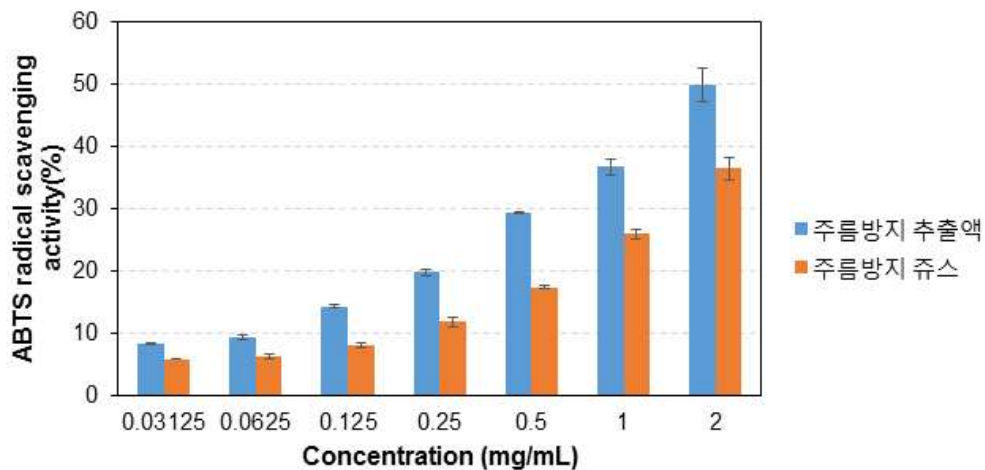


그림 57. ABTS radical scavenging activity of anti-wrinkle mixture and juice.

○ 주름방지 추출액 및 주스 시료가 농도의존적으로 라디칼 소거능이 증가함을 보였음.

### 2.1.3.2. 철이온 환원능

○ 철이온 환원능(Ferric Reducing Antioxidant Power, FRAP) 측정: Ferric 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) 시약이 산화반응에 의하여 2가의 철이 3가로 산화되면서 색을 나타내는 원리를 이용한다. Ferrous sulphate를 사용하여 1 mM의 용액을 제조한 후 표준용액으로 사용하였으며, FRAP 용액은 300 mM acetate buffer (pH 3.6), 10 mM TPTZ, 20 mM FeCl<sub>3</sub> 와 증류수를 섞어 제조하였음. 170  $\mu$ l 물, 7  $\mu$ l 시료 혹은 표준용액, 30  $\mu$ l FRAP 용액을 상온에서 섞어주고 4분 후 파장 593 nm에서 흡광도를 측정하였음. FRAP level은 흡광도 값의 표준용액에 대한 선형회귀분석을 통해 산출하였음.

○ 주름방지 추출물과 이를 이용하여 제조한 주스 모두 농도의존적으로 FRAP활성을 높이는 것으로 나타났음 (그림 58).

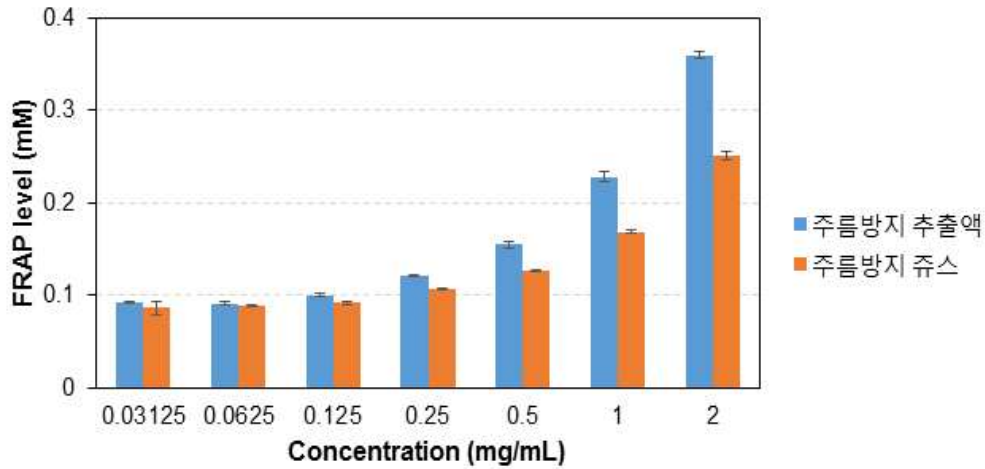


그림 58. Ferric reducing antioxidant power (FRAP) of anti-wrinkle mixture and juice.

### 1.3.3. 총페놀 및 총플라보노이드 함량

○ 총페놀 함량 측정: 총 페놀 함량은 Folin-Ciocalteu assay 방법을 사용했으며, 이 방법은 알칼리 조건에서 phenolic compound가 산화되어  $\cdot O_2^-$ 를 형성하여 molybdate와 반응하여 molybdenum oxide를 형성하는 것을 이용하여 총 페놀을 측정한다. 100  $\mu$ l 시료, 50  $\mu$ l 10% sodium bicarbonate 용액을 넣고 섞은 후, 15  $\mu$ l Folin-Ciocalteu 용액을 첨가하고 상온에서 5분간 안정화한 후 파장 593 nm에서 흡광도를 측정한다. 총 페놀 함량은 gallic acid equivalents (GAE)로 나타내었음.

○ 총플라보노이드 함량 측정: 총 플라보노이드 함량은 비색법을 이용하여 aluminum chloride로 측정했다. 25  $\mu$ l 시료와 75  $\mu$ l 95% 메탄올을 섞는다. 그 다음, 5  $\mu$ l 10%  $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ , 1 M potassium acetate와 140  $\mu$ l 증류수를 첨가한다. 상온에서 40분간 반응시킨 후 파장 415 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 총 플라보노이드 함량은 quercetin 당량(QE)으로 나타내었음.

표 9. 주름방지 추출액과 쥬스 내 총페놀 및 총플라보노이드 함량

	Anti-wrinkle mixture	Anti-wrinkle juice
Total phenols (mg GAE/g)	6779.03 ± 18.73	4906.37 ± 81.63
Total flavonoids (mg QE/g)	847.01 ± 14.28	751.28 ± 105.54

○ 주름방지 추출물의 총 페놀함량이 6778 mg GAE/g이었으며, 총 플라보노이드 함량이 847 mg QE/g 나타났음. 한편 주름방지 추출물을 포함하여 제조한 주름방지 주스는 총 페놀함량이 4906 mg GAE/g이었으며, 총 플라보노이드 함량이 751 mg QE/g 로 나타났음 (표 9).

#### 1.4. 주름방지 주스 시제품의 세포모델계를 활용한 주름방지 효능 평가

##### 1.4.1. 주름방지 추출액 및 주스의 세포 내 항산화효소계 발현 유도 활성

○ 주름방지 추출액 또는 주스의 동결건조 시료를 HaCaT cells에 농도별(0, 0.25, 0.5, 1 mg/mL)로 처리함. 24시간 후, 세포에 UV 광선(UVB, 280-315 nm)을 25 mJ/cm<sup>2</sup> 강도로 조사함. 6시간 후, 세포를 수집하여 세포 내 항산화효소계 발현 정도를 분석하였음 (그림 59-60).

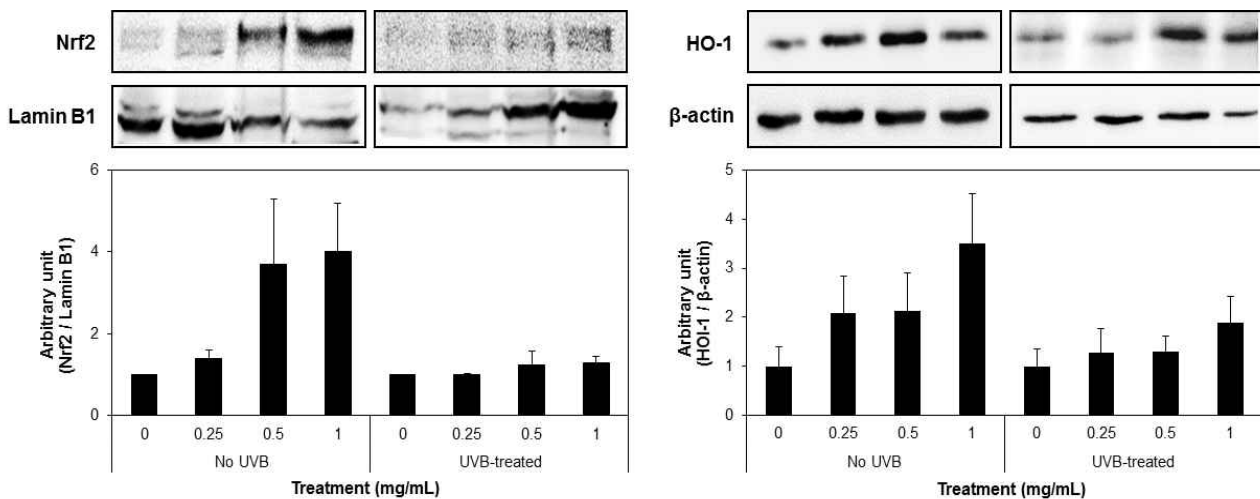


그림 59. Western blot analysis for the expressions of antioxidant proteins including nuclear Nrf2 and cytoplasmic HO-1 in the HaCaT cells pre-treated with **the juice base concentrate (mixture)** at the designated concentrations and subsequently irradiated with UVB at 25 mJ/cm<sup>2</sup>. N=3 for Nrf2; N=2 for HO-1.

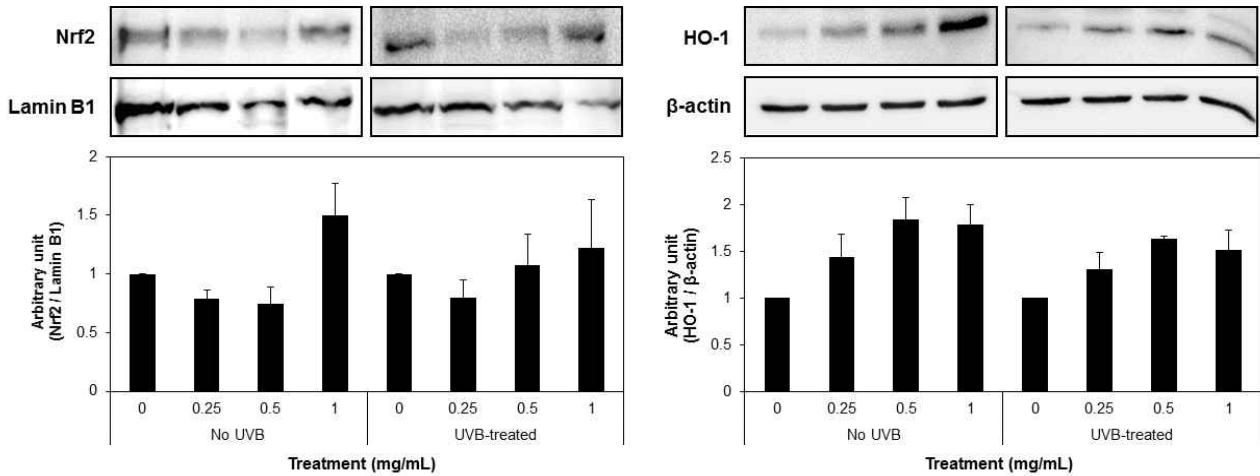


그림 60. Western blot analysis for the expressions of antioxidant proteins including nuclear Nrf2 and cytoplasmic HO-1 in the HaCaT cells pre-treated with the juice at the designated concentrations and subsequently irradiated with UVB at 25 mJ/cm<sup>2</sup>.

N=3 for Nrf2; N=2 for HO-1.

○ 주름방지 추출액 또는 주스는 HaCaT cells의 항산화효소계, 즉, Nrf2 와 그 downstream에 있는 HO-1의 발현을 촉진하였음.

#### 1.4.2. 주름방지 추출액 및 주스의 UVB 조사에 대한 피부세포 사멸 억제 효과

○ 추출액 또는 주스 샘플을 HaCaT cells에 농도별(0, 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 mg/mL)로 24시간 처리한 후, UVB를 조사하여 세포 사멸을 유도함. 24시간 후, 세포 생존율을 분석함 (그림 61).

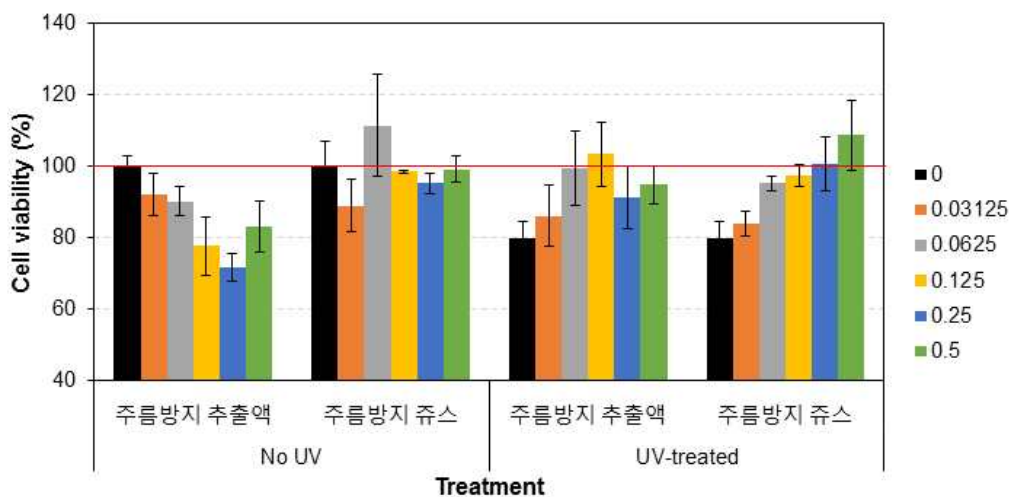


그림 61. Dose-dependent increase in cell viability by the juice or mixture in HaCaT cells treated with UVB.

○ 추출액 또는 주스 샘플은 자외선 처리에 의한 HaCaT 세포 사멸을 방지하는 것으로 나타났음.

○ 즉, 추출물 또는 주스 샘플이 62.5 µg/mL 이상의 농도로 처리되었을 때, UVB 조사에 의한 세포 생존 감소가 억제되었음.

## 1.5. 주름방지 주스 시제품의 동물모델계를 활용한 주름방지 효능 평가

### 1.5.1. 동물실험 디자인

○ 주름방지 추출물 및 주스의 UV 조사에 의한 주름 개선 효능을 평가하기 위해, ICR 마우스(수컷, 5주령)를 구입하여 1주간 적응 후, 실험에 사용하였음 (실험 시작 시, 마우스는 6주령) (그림 62).

○ 실험은 식품의약품안전처 발행 「건강기능식품 기능성 평가 가이드 '피부건강에 도움을 줄 수 있음'편」 (2014)와 「주름개선에 도움을 주는 기능성화장품의 유효성평가를 위한 가이드 라인」 (2005)에 의거하여 진행함.

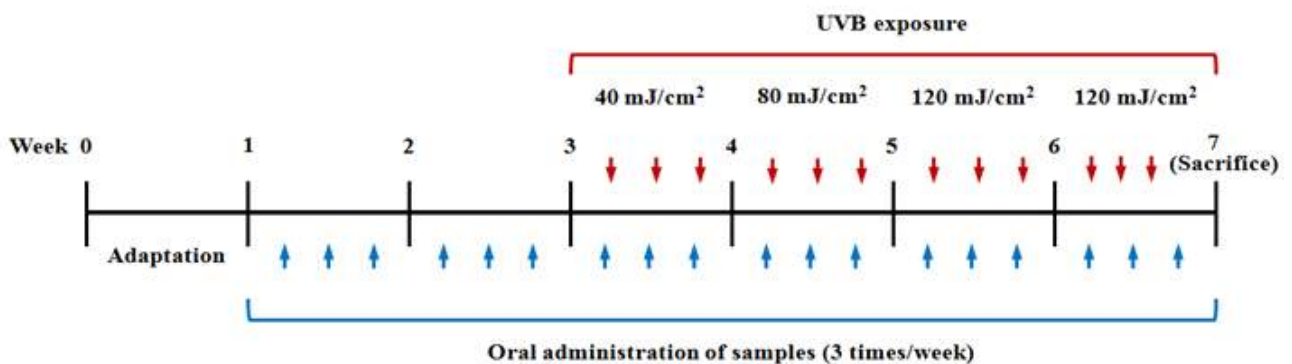


그림 62. Schematic overview of experimental procedure using ICR mice.

○ 동결건조된 추출물 및 주스 시료는 일주일에 3회 총 6주간 경구투여하였고, UV는 실험 종료 전 4주간 조사하였고 그 강도는 일주일 간격으로 증가하여 피부 광노화를 유도하였음 (UV 조사 전, 마우스의 등부분은 제모하여 피부에 UV가 조사되도록 함).

○ 시료는 vehicle에 녹여 경구투여함. Vehicle의 조성은 다음과 같음: 10% (v/v) ethanol and 10% (v/v) Tween 80 in drinking water

○ 마우스는 그룹 당 6-7마리(총 50마리)를 할당하였고, 그룹별 시료 처리 농도 및 UV 조사 유무는 표 10과 같음.

표 10. 그룹별 시료 및 UV 조사 처리 구분

Group	Treatment	Sample treatment (mg/kg BW)	UVB irradiation	Number of mice
Control	No UV	Vehicle	x	6
	UV-treated	Vehicle	○	6
주름방지 추출액	Resveratrol	50	○	6
		100	○	6
		200	○	6
		400	○	6
주름방지 주스	주름방지 주스	1,000	○	7
		2,000	○	7

### 1.5.2. 주름 개선 효능

○ 실험기간 동안 그룹별 유의한 체중 변화는 없었음.

○ 실험 종료 후, 마우스의 등부분을 제모하고 Silicon replica material을 이용하여 피부 모사판을 제작하였음. Visioline® VL 650 기기(대구테크노파크한방산업지원센터 보유)를 이용하여, 주름 형성 면적, 갯수, 길이, 깊이를 분석하였음.

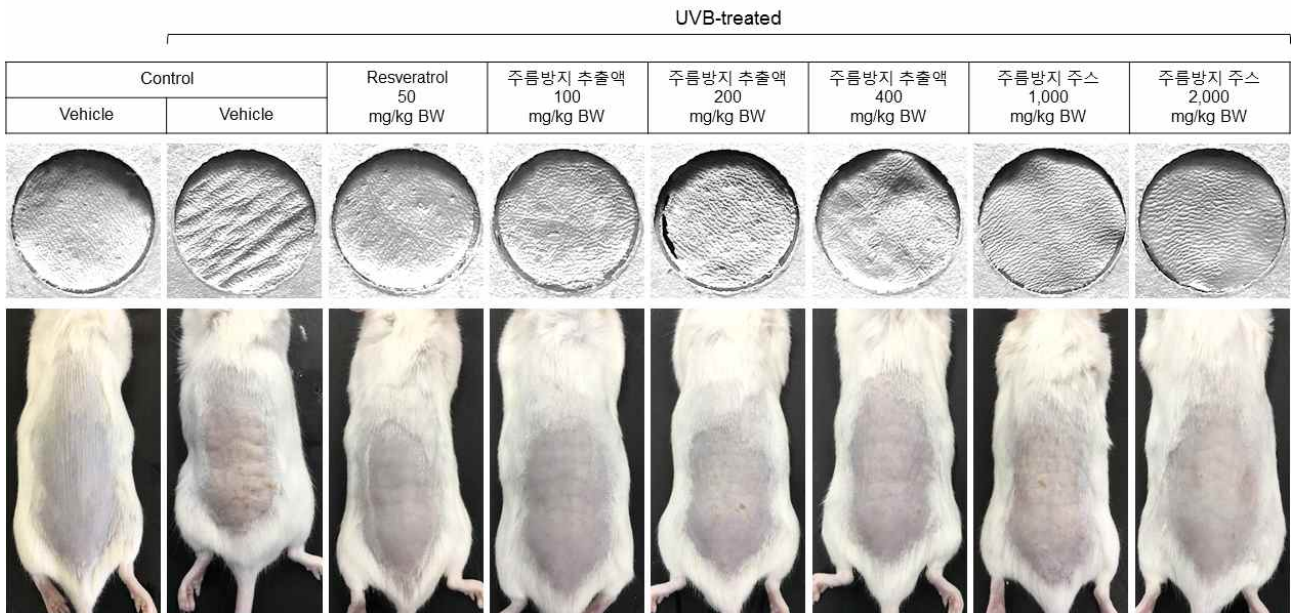


그림 63. Representative photos of ICR mice with shaved dorsal area and the skin replica preparations.

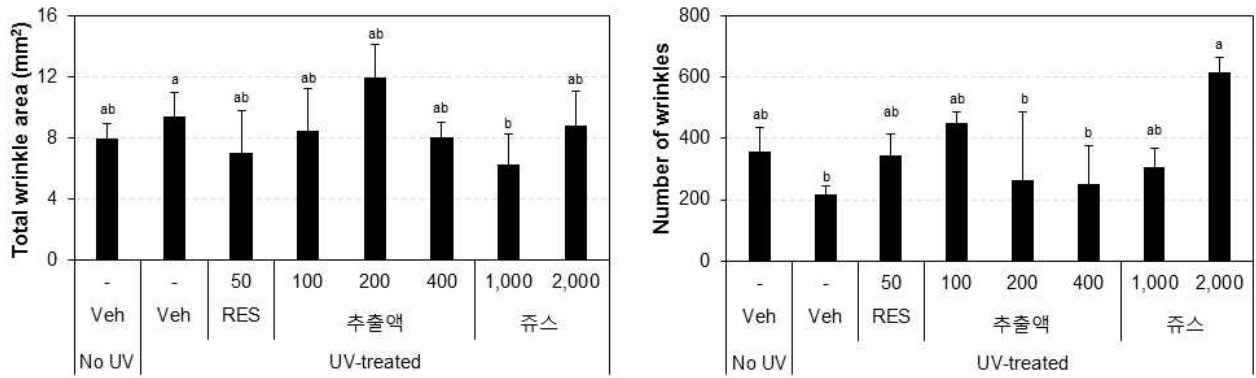


그림 64. Total wrinkle area and number of wrinkles.

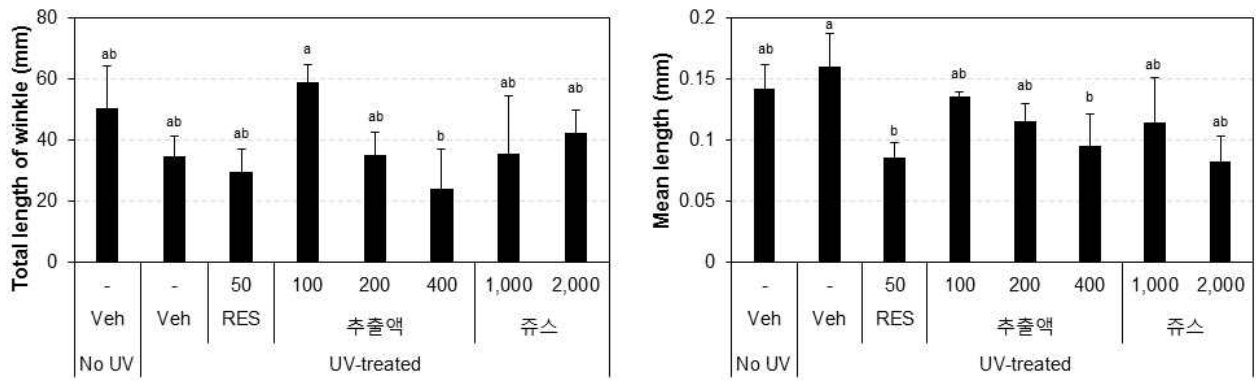


그림 65. Total length and mean length of wrinkles.

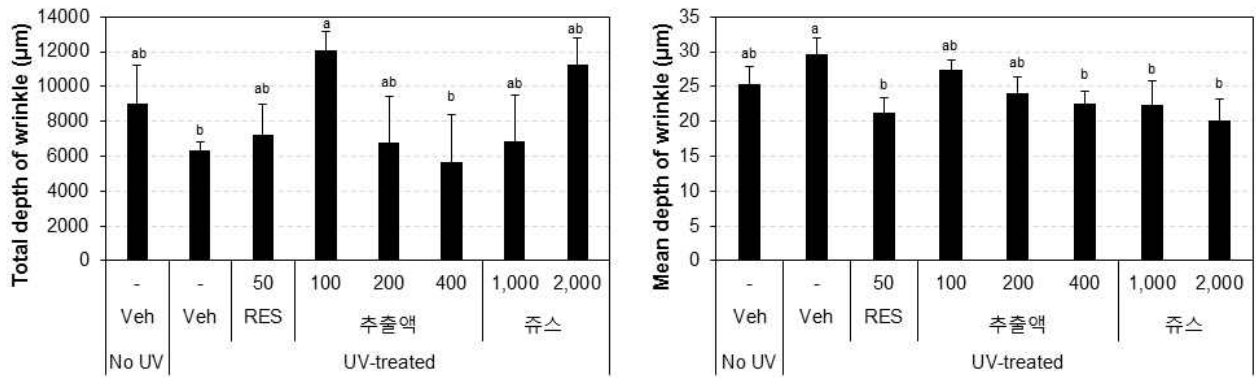


그림 66. Total depth and mean depth of wrinkles.

○ 추출액 또는 주스 시료의 6주간 투여에 따른 주름의 면적, 갯수, 길이, 깊이가 크게 변하지는 않았지만, 주름의 길이와 깊이는 UV 조사 피부에 비해 감소되는 경향을 보였음 (그림 63-66). 해당 시료의 장기 투여 시, 주름의 길이와 깊이가 유의적으로 감소할 여지가 있는 것으로 판단됨.



### 1.5.3. 조직학적 분석

○ UV 조사 및 시료의 경구 투여가 종료된 후, 제모된 부위의 피부 조직을 절개하여 고정 용액에 fixing, 파라핀에 embedding, vibratome으로 slicing (두께 4  $\mu\text{m}$ ) 하여 조직학적 분석을 준비함. 준비된 조직 slices는 haematoxylin and eosin stain 방법으로 염색한 후, 현미경으로 관찰하였음 (그림 67).

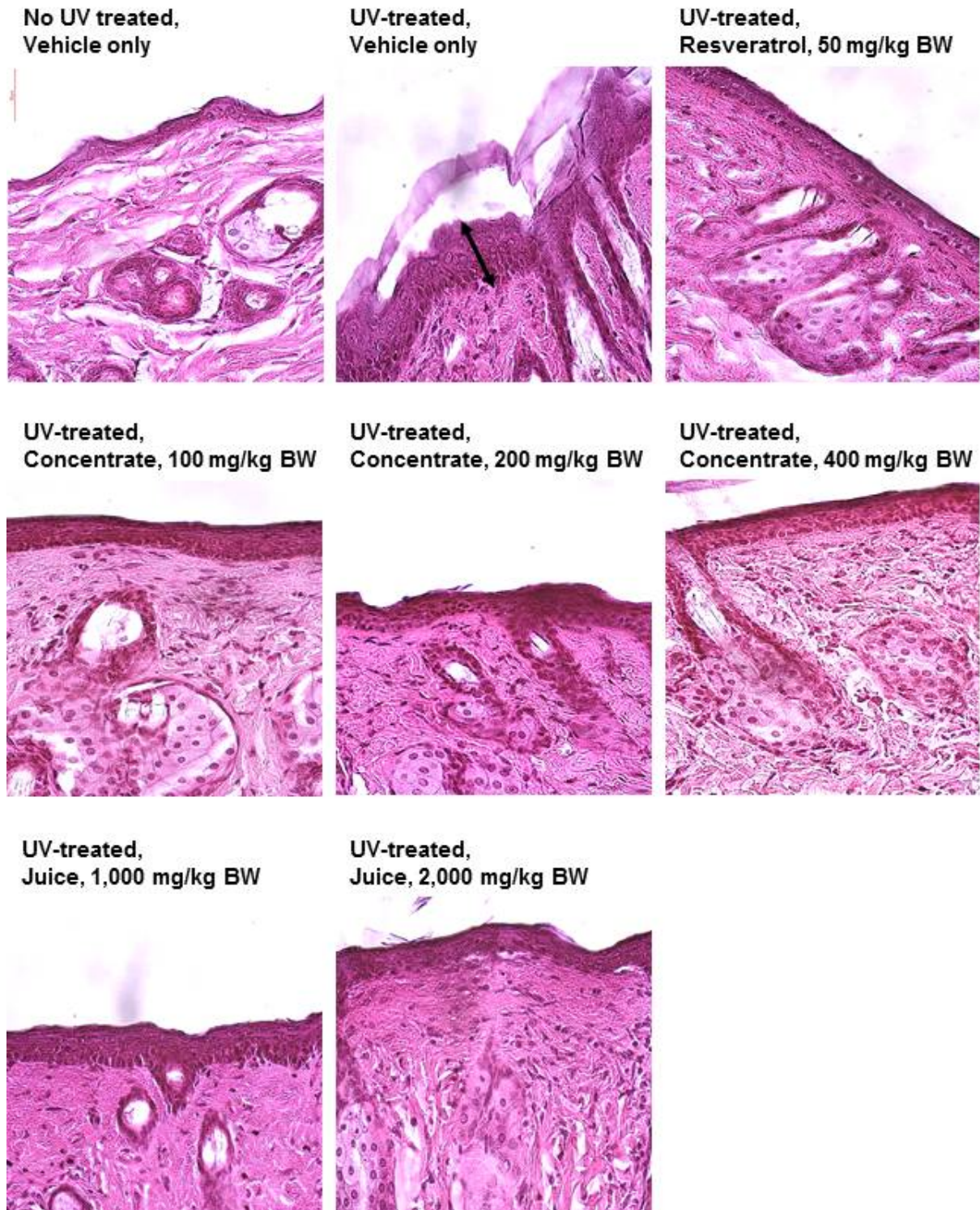


그림 67. Histological analysis by H&E staining for skin tissue collected from mice in different experimental groups.

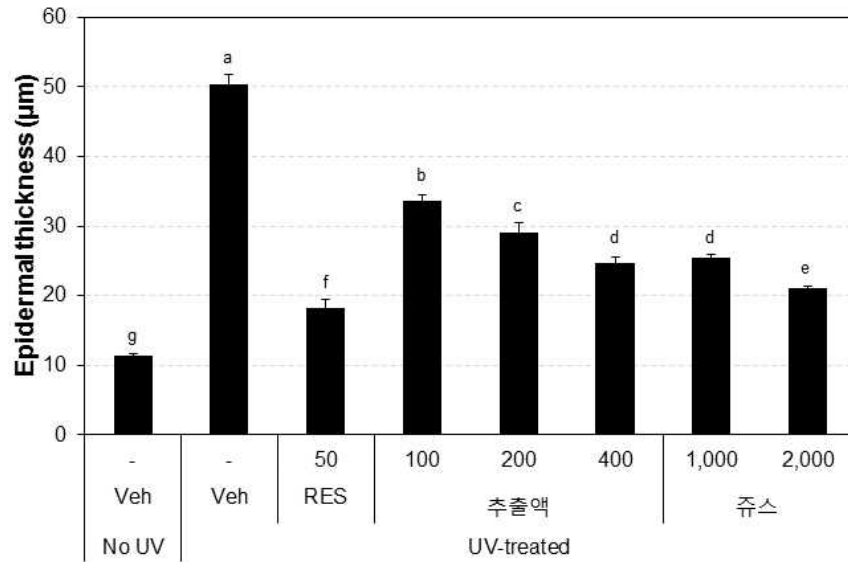


그림 68. Average epidermal thickness of the skin tissues collected from the experimental animals after sacrifice.

○ UV 조사된 피부는 표피층이 두꺼워지고 dermis 층과 hypodermis 층은 얇아진 것이 관찰되었음 (그림 67-68).

○ 레스베라트롤 및 추출액과 주스 시료 투여 시, UVB 조사에 의한 표피층 두께 증가가 완화되었음. 즉, 주름방지 추출액 및 주스 시료의 구강 투여는 UV 조사에 의한 표피층 두께 증가를 억제할 수 있을 것으로 예상됨.

#### 1.5.4. 항산화 및 주름 형성 관련 단백질 발현 분석

○ 주름방지 추출액 및 주스의 구강 투여가 마우스의 피부 및 간 조직에서 항산화 효소계에 영향을 미치는지 평가함.

##### 1.5.4.1. 피부 조직에서의 항산화 효소 발현

○ 피부 조직 샘플에서 항산화 효소 Nrf2 및 HO-1의 발현량을 측정함.

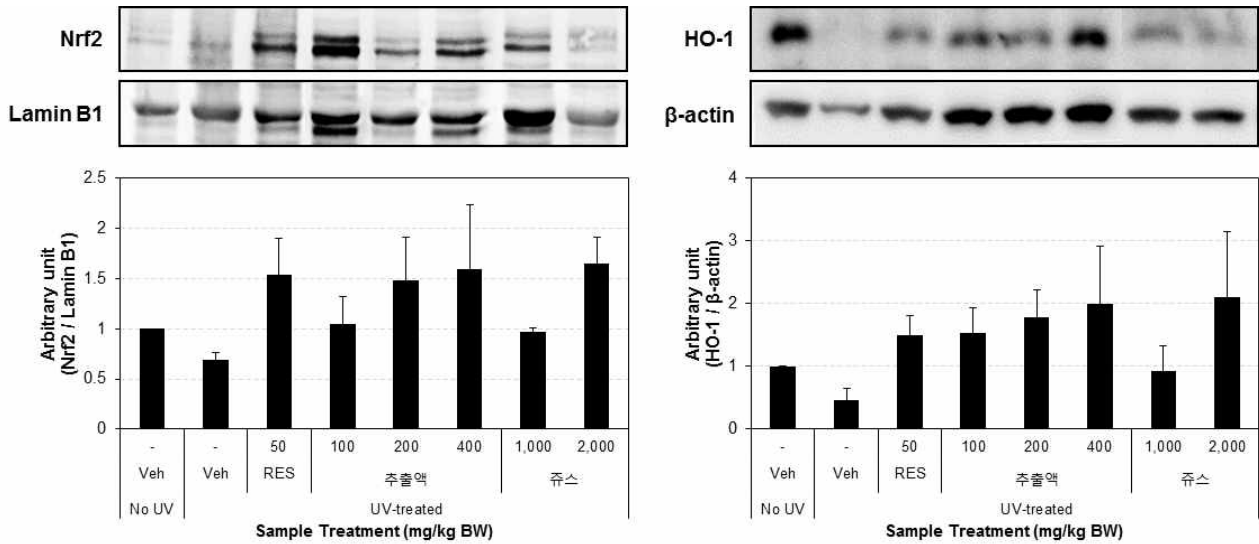


그림 69. Western blot analysis for the expressions of antioxidant proteins including nuclear Nrf2 and cytoplasmic HO-1 in the skin tissues collected from the experimental animals after sacrifice. Error bars, mean  $\pm$  SD (n = 5).

○ UV가 조사된 마우스의 피부 조직에서 핵 내 Nrf2와 세포질의 HO-1 단백질의 발현이 매우 감소해 있음을 관찰하였음 (그림 69). 그러나 주름방지 추출액 또는 쥬스 시료를 경구 투여한 마우스의 피부 조직에서는 UV 처리군에 비해 Nrf2와 HO-1의 발현이 감소되지 않거나 더 증가하였음.

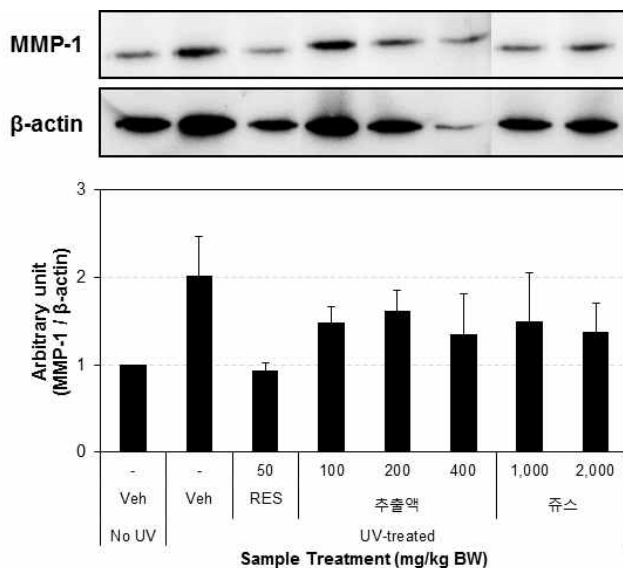


그림 70. Collagenase (MMP-1) expression level in the skin tissue collected from mice in different experimental groups.

○ 콜라겐은 피부의 탄력을 유지하는데 중요한 요소임. UV 조사에 의해 콜라겐 분해효소 collagenase (MMP-1, 피부 노화 지표)의 발현이 크게 증가한 반면, 주름방지 추출액 또는 쥬

스 시료를 경구 투여한 마우스의 피부 조직에서는 MMP-1의 발현이 감소하는 경향을 보였음 (그림 70).

#### 1.5.4.2. 간 조직에서의 항산화 효소 발현

○ 간 조직 샘플에서 항산화 효소 Nrf2 및 HO-1의 발현량을 측정함.

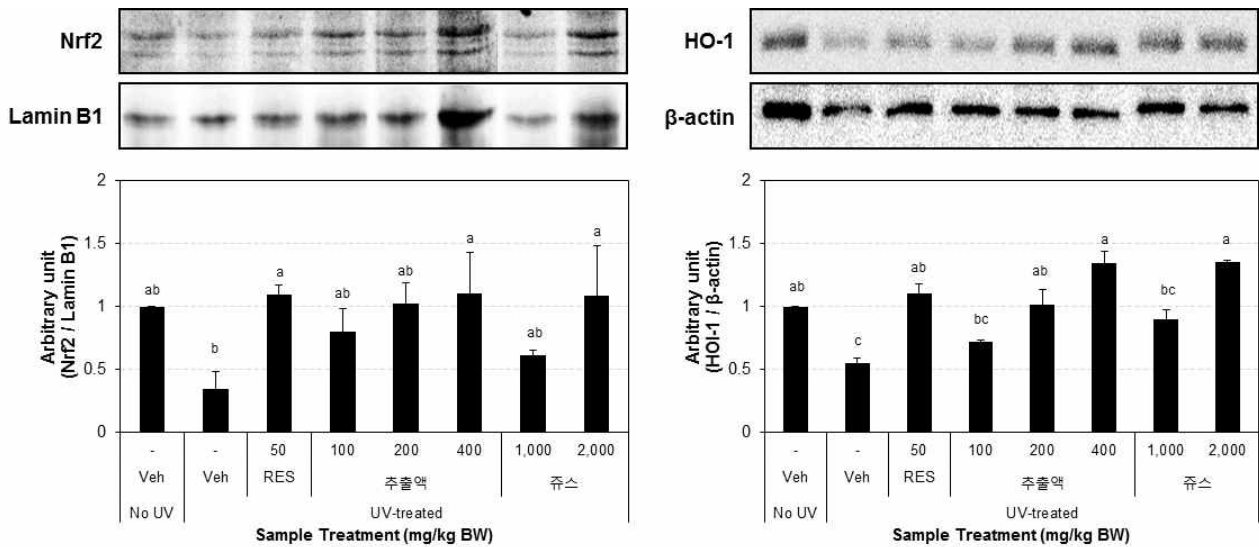


그림 71. Western blot analysis for the expressions of antioxidant proteins including nuclear Nrf2 and cytoplasmic HO-1 in the liver tissues collected from the experimental animals after sacrifice. Error bars, mean ± SD (n = 5).

○ 주름방지 추출액 또는 주스 시료를 경구 투여한 마우스의 간에서 핵 내 Nrf2와 세포질의 HO-1 단백질의 발현이 농도 의존적으로 증가했음을 관찰하였음 (그림 71).

○ 경구 투여된 시료들은 생체 내에서 소화 흡수되어 간에서 항산화 활성을 높이는 것으로 판단됨.

○ 따라서 이러한 결과들은 주름방지 주스를 음용하면 간 뿐만 아니라 피부 조직 내 항산화 활성을 증진시켜 UV 조사에 의한 피부 손상을 완화하고 주름 형성을 개선할 수 있음을 뒷받침함.

## 1.6. 주름방지 쥬스의 관능적 기호 및 기능성 개선

### 1.6.1. 다양한 쥬스 원료 베리류 추출물의 항산화 효능 평가

○ 시제품 레시피를 관능적 및 기능적으로 개선하고자 베리류 추출물 10종에 대해 항산화 활성을 분석함. 베리류 추출물은 다음과 같음: 포도, 포도껍질, 아로니아, 크랜베리, 라스베리, 스트로베리, 블루베리, 복분자, 오미자, 오디 (총 10종)

○ 각 추출물에 대해, DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능, FRAP 활성, 총페놀 및 총플라보노이드 함량을 분석함 (그림 72-74).

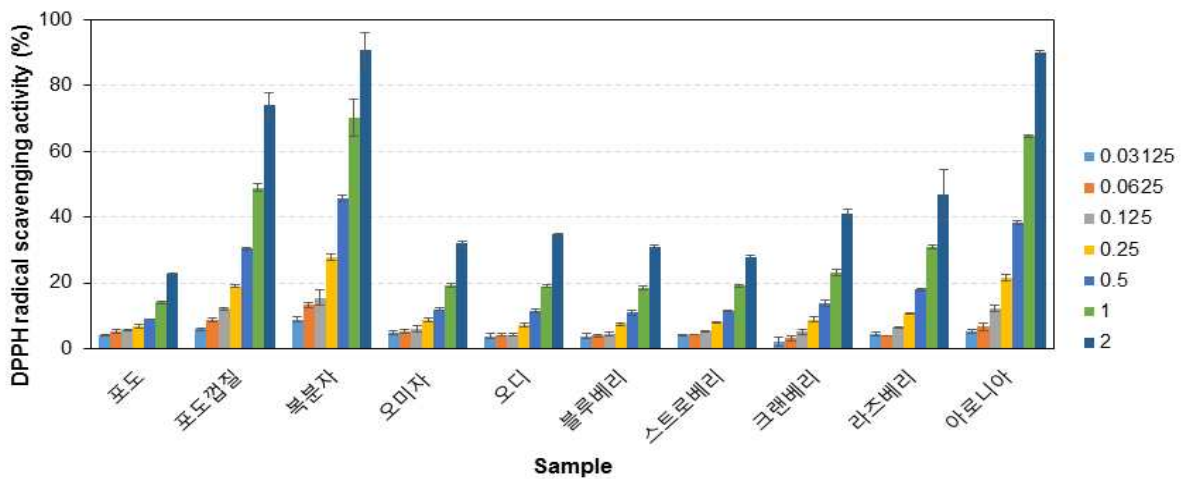


그림 72. DPPH radical scavenging activities of the extract from each of various berries. The unit of concentrations was mg/mL.

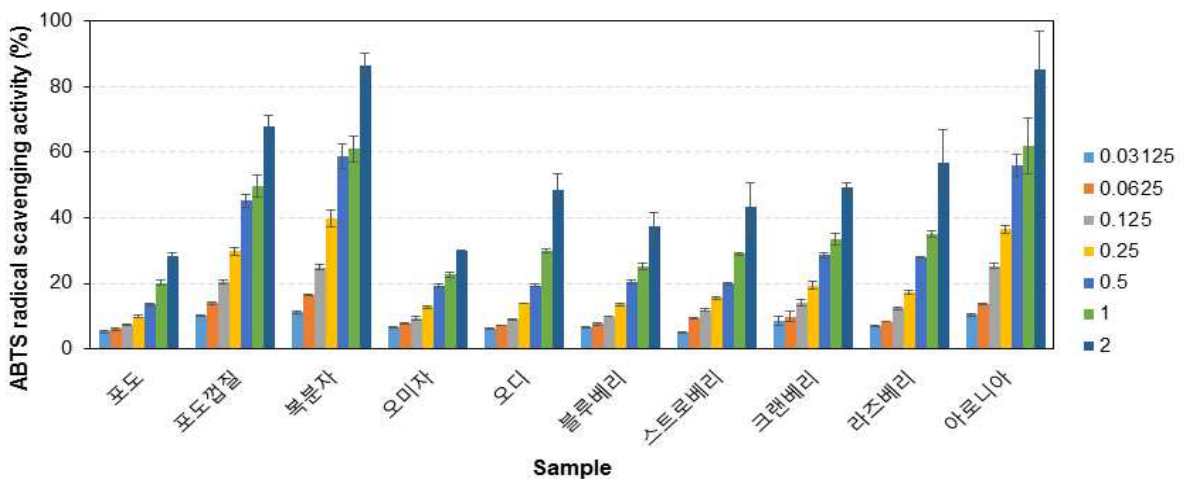


그림 73. ABTS radical scavenging activities of the extract from each of various berries. The concentrations of berry extracts used were 0.03 to 2 mg/mL.

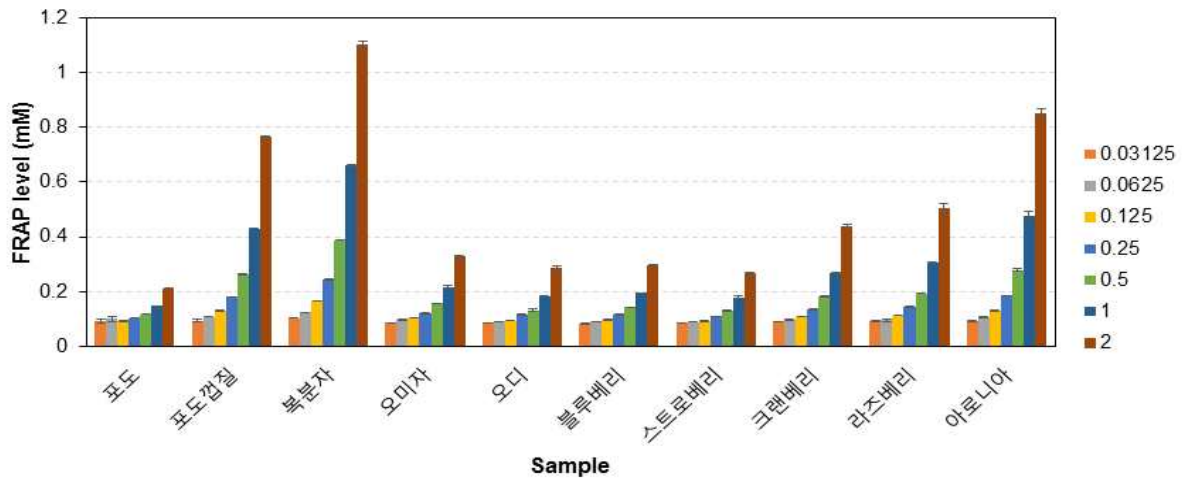


그림 74. Ferric reducing antioxidant power (FRAP) values of the extract from each of various berries. The concentrations of berry extracts used ranged from 0.03 to 2 mg/mL.

### 1.6.2. 다양한 주스 원료 베리류 추출물의 항산화 성분 분석

○ 주스 원료 베리류 추출물 10종 내 총페놀 및 총플라보노이드 함량을 분석하였음.

표 11. 베리류 (10종) 추출물 내 총페놀 및 총플라보노이드 함량

	Total phenols (mg GAE/g)	Total flavonoids (mg QE/g)
포도	4101.12 ± 81.63	474.36 ± 54.30
포도 껍질	13820.22 ± 49.55	1801.71 ± 28.57
복분자	8745.32 ± 18.73	1386.32 ± 6.84
오미자	6441.95 ± 49.55	910.26 ± 34.09
오디	14812.73 ± 99.55	294.87 ± 37.64
블루베리	3726.59 ± 56.18	357.26 ± 75.93
스트로베리	5842.70 ± 67.52	737.61 ± 2.26
크랜베리	4307.12 ± 67.52	245.30 ± 9.86
라즈베리	3951.31 ± 32.44	786.32 ± 3.08
아로니아	15205.99 ± 74.91	1642.74 ± 17.79

○ 아로니아, 오디, 포도껍질 추출물에서 총페놀 함량이 높았고 (>10,000 mg GAE/g), 포도껍질, 아로니아, 복분자 추출물에서 총플라보노이드 함량이 높은 것으로 분석되었음 (>1000 mg QE/g) (표 11).

### 1.6.3. 세포 내 항산화 효소계 유도 활성화

○ 항산화 효소계 유도 활성을 측정하기 위해, HepG2-ARE cells를 활용하였음. Antioxidant response element (ARE)는 항산화 효소계 발현을 유도하는 주요한 전사인자인 Nrf2가 결합하는 DNA 부위로서, ARE-luciferase reporter를 발현하는 세포에 시료를 처리한 후, 세포 내 발현된 luciferase 효소의 활성을 측정함으로써, 특정 시료의 항산화 효소계 유도 활성을 판단할 수 있음.

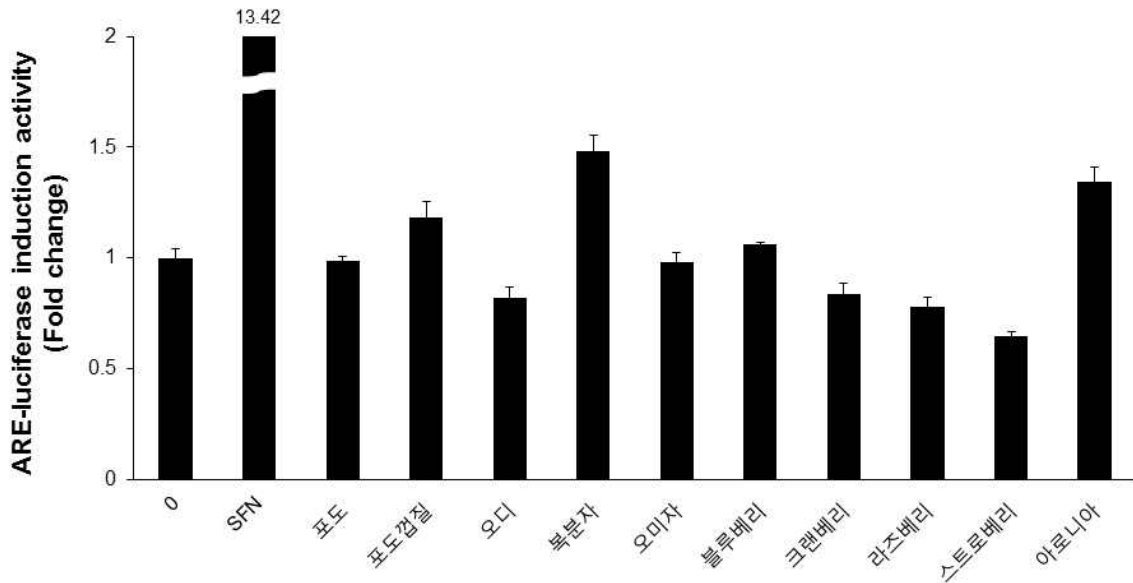


그림 75. ARE-luciferase induction activity of various berries in HepG2-ARE cells. Samples were treated at the concentration of 100  $\mu$ g/mL. SFN, sulforaphane used as a positive control. Error bars, mean  $\pm$  SEM (N = 3).

○ 복분자, 아로니아, 포도껍질 추출물이 ARE-luciferase 유도 활성이 상대적으로 높은 것으로 평가되었음 (그림 75).

○ 각 베리류의 항산화 활성 및 항산화 성분을 고려하여, 주름방지 주스 레시피를 수정하여, 주름방지 및 동안 음료 시제품을 개발하였음.



## 2. 타사 제품과 비교 평가

### 2.1. 시판 타사 제품 확보

○ 주름방지 또는 주름개선 효능을 표시한 타사 제품을 확보하고, 이들 제품과 개발된 음료 시제품의 항산화 활성을 비교 평가하였음.



그림 76. 주름방지 또는 주름개선 효능을 표시한 타사 제품.

표 12. 시판 타사 제품 5종과 개발된 주름방지 및 동안 음료 시제품의 원료

제품명	제조사	성분
슈퍼 콜라겐	레쥬베라	피쉬콜라겐, 히알루론산, 비타민C, 레모주스농축액, 사과농축액, 프락토올리고당, 사과산, 자일리톨, 스테비아효소
마시는 콜라겐 3000	동국제약(주)	정제수, 피쉬콜라겐(피쉬콜라겐 펩타이드, 구연산), 자일리톨, 합성향료, 비타민C, 복합황금추출물 (황금농축액, 감초농축액, 대추농축액, 황기농축액), 인디언구스베리추출물, 히알루론산혼합제제, 효소처리스테리아, 벌꿀추출물
예브리	바이오리	파인애플농축액, 히알루론산, 비타민C, 대추야자농축액, 레몬밤추출물
허니부쉬 깔라만시	(주)휴온스내츄럴 채깁	깔라만시즙, 발효허니부쉬 추출액, 허니부쉬 농축액
The Collagen	SHISEIDO	-
주름방지 음료 시제품	주관기관	베리류 추출물 혼합액, 주름방지 추출액
동안 음료 시제품	주관기관	베리류 추출물 혼합액, 주름방지 추출액, 미백 추출액

## 2.2. 항산화 활성 비교 평가

○ 시판 INNER BEAUTY 음료에 대해 DPPH 또는 ABTS 라디칼 소거능을 비표 평가하였음.

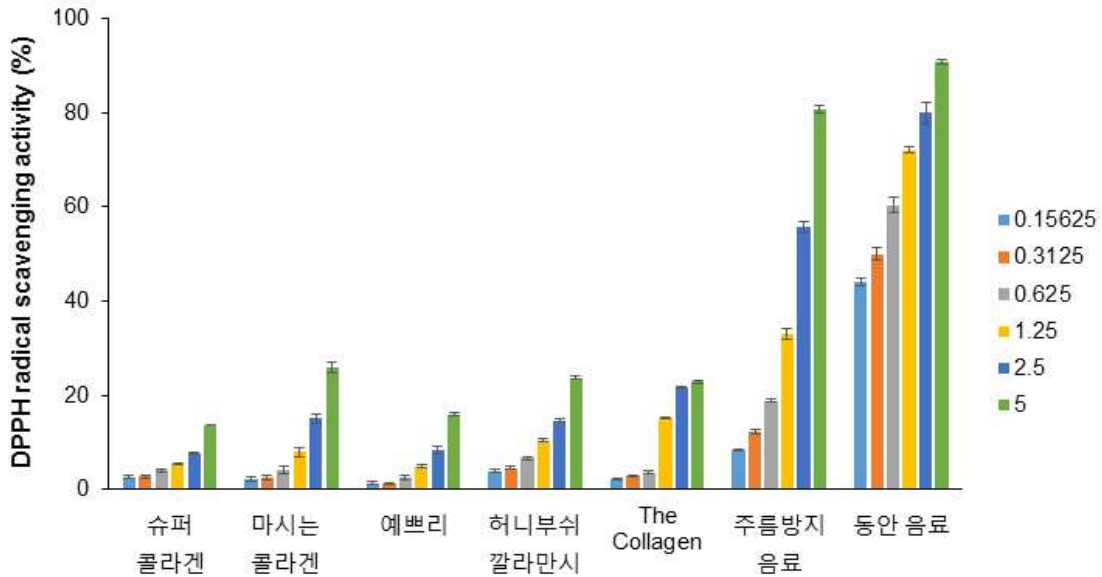


그림 77. DPPH radical scavenging activities of various commercial products. The concentrations of sample extracts used ranged from 0.03 to 2 mg/mL.

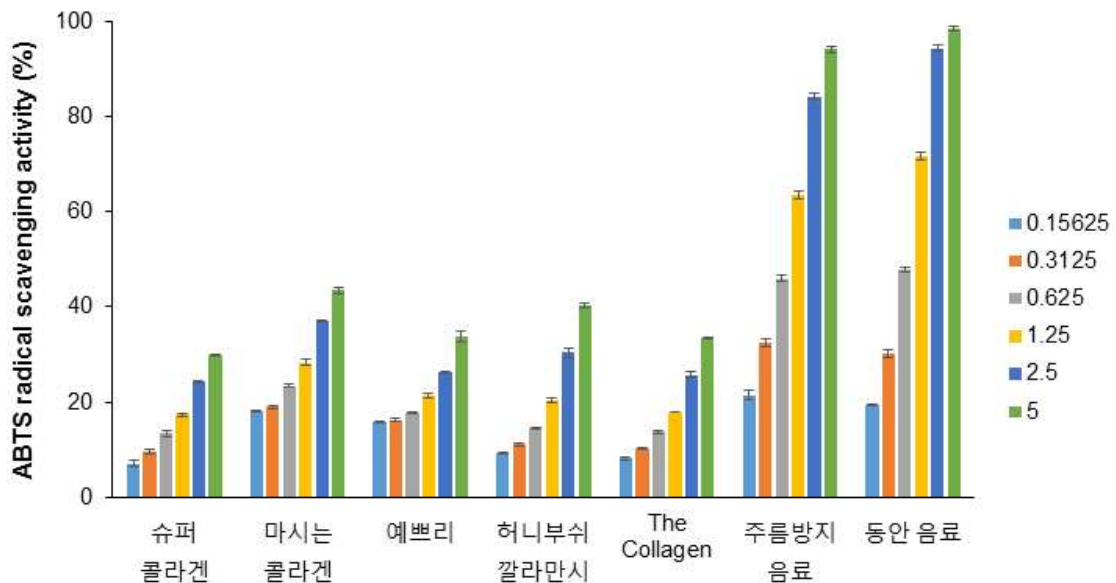


그림 78. ABTS radical scavenging activities of various commercial products. The concentrations of sample extracts used ranged from 0.03 to 2 mg/mL.

○ 시판 타사 제품보다 개발된 시제품의 라디칼 소거능이 월등히 높은 것으로 관찰되었음 (그림 77-78).

○ 세포 내 항산화 효소계 유도 활성을 확인하기 위해, HepG2-ARE cells에 시료를 처리하여, ARE-luciferase activity 유도 활성을 측정하였음.

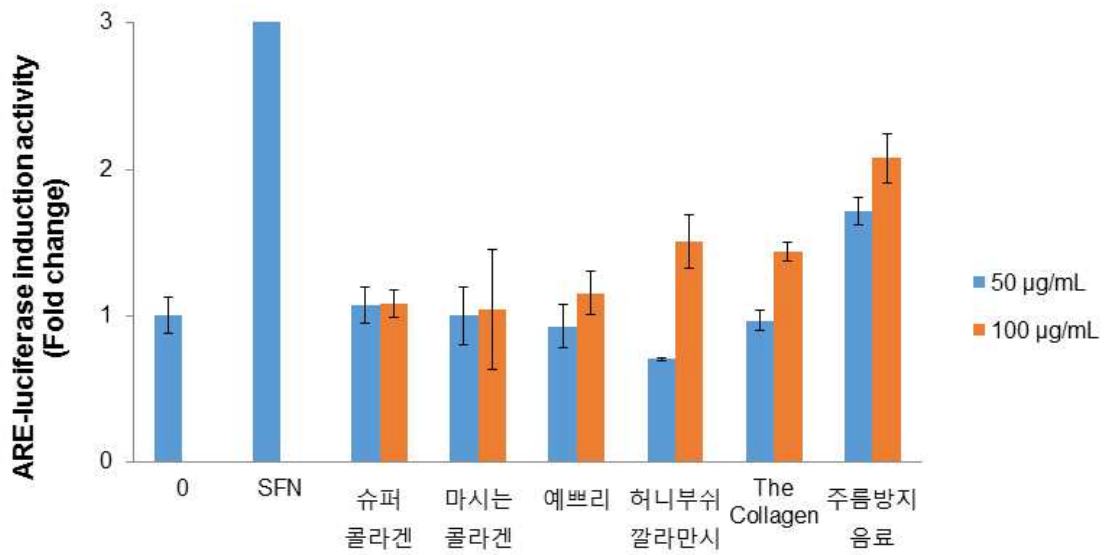


그림 79. ARE activities of various commercial products in HepG2-ARE cells.  
The concentrations of sample extracts used ranged from 0.03 to 2 mg/mL.

○ 본 연구에서 개발된 주름방지 음료가 타사 제품에 비해 항산화 효소계 유도 활성이 높은 것으로 분석되었음 (그림 79).

## 2.3. 최종 제품의 생체 내 항산화 효소 유도 활성 평가 (동물모델 활용)

### 2.3.1. 혈액 샘플의 항산화 활성 증진 효과

○ ICR 마우스(수컷, 6주령)를 구입하여 1주간 적응 후, 실험에 사용하였음 (실험 시작 시, 마우스는 7주령).

○ 대조군 및 실험군은 다음과 같았음.

표 13. 그룹별 시료 및 UV 조사 처리 구분

Group	Treatment	Sample treatment (mg/kg BW)	Number of mice
	Control	Vehicle	5
	Resveratrol	50	5
	주름방지 음료 시제품	2,000	5
	The Collagen (SHISEIDO)	2,000	5
	허니부쉬 갈라만시 (챙김)	2,000	5

○ 마우스에 준비된 시료를 경구 투여함. 2시간 후 혈액을 채취하여, 준비된 HepG2-ARE cells에 동량 (2 mL serum) 처리함. ARE-luciferase 유도 활성을 측정하여, 혈액 샘플의 항산화능을 판단하였음.

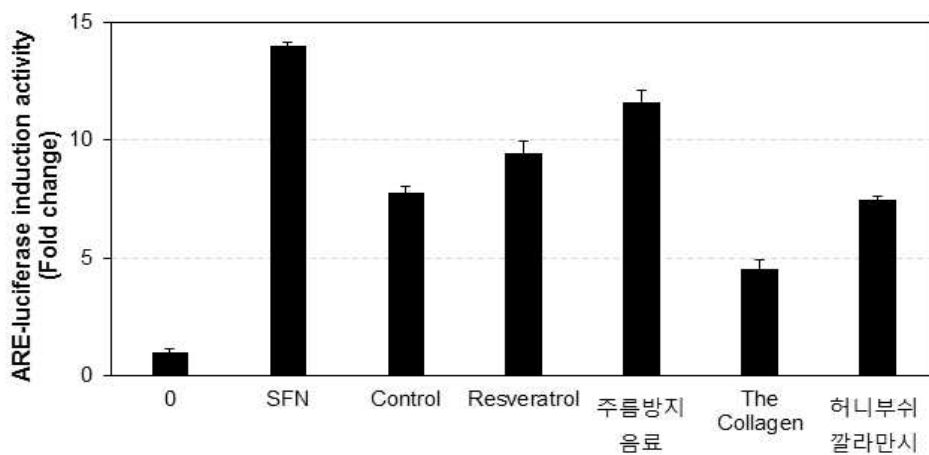


그림 80. ARE-luciferase induction activities of the serum samples collected from the mice administered with freeze-dried juice products on HepG2-ARE cells. SFN, sulforaphane used as a positive control. Error bars, mean  $\pm$  SD (n = 5).

○ The Collagen과 허니부쉬 깔라만시 제품이 경구 투여된 마우스의 혈청은 vehicle만 경구 투여한 대조구와 비슷한 수준을 보인 것에 비해, 주름방지 음료가 경구 투여된 마우스의 혈청은 ARE-luciferase 유도 활성이 가장 높은 것으로 분석되었음 (그림 80).

### 3. 생체 내 항노화 활성 발현 기작 구명

#### 3.1. 포도껍질 추출물 및 레스베라트롤의 주름개선 효능 평가

○ 베리류 기반 주름방지 음료의 생체 내 항노화 및 주름 개선 효능을 평가하기 위해, 베리류에 많이 포함된 기능성 성분인 레스베라트롤 및 레스베라트롤이 특히 많이 함유된 포도껍질 추출물의 주름개선 효능을 평가하였음 (해당 연구 결과는 SCI급 저널에 학술논문으로 투고하였고 현재 심사 중임).

##### 3.1.1. 세포모델계 활용 효능 평가

○ HaCaT cells에 레스베라트롤(RES) 또는 포도껍질 추출물(grape peel extract, GPE)를 처리한 후, UVB를 조사하였음. RES는 2 또는 8  $\mu\text{M}$ , GPE는 156, 313, and 625  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리하였음.

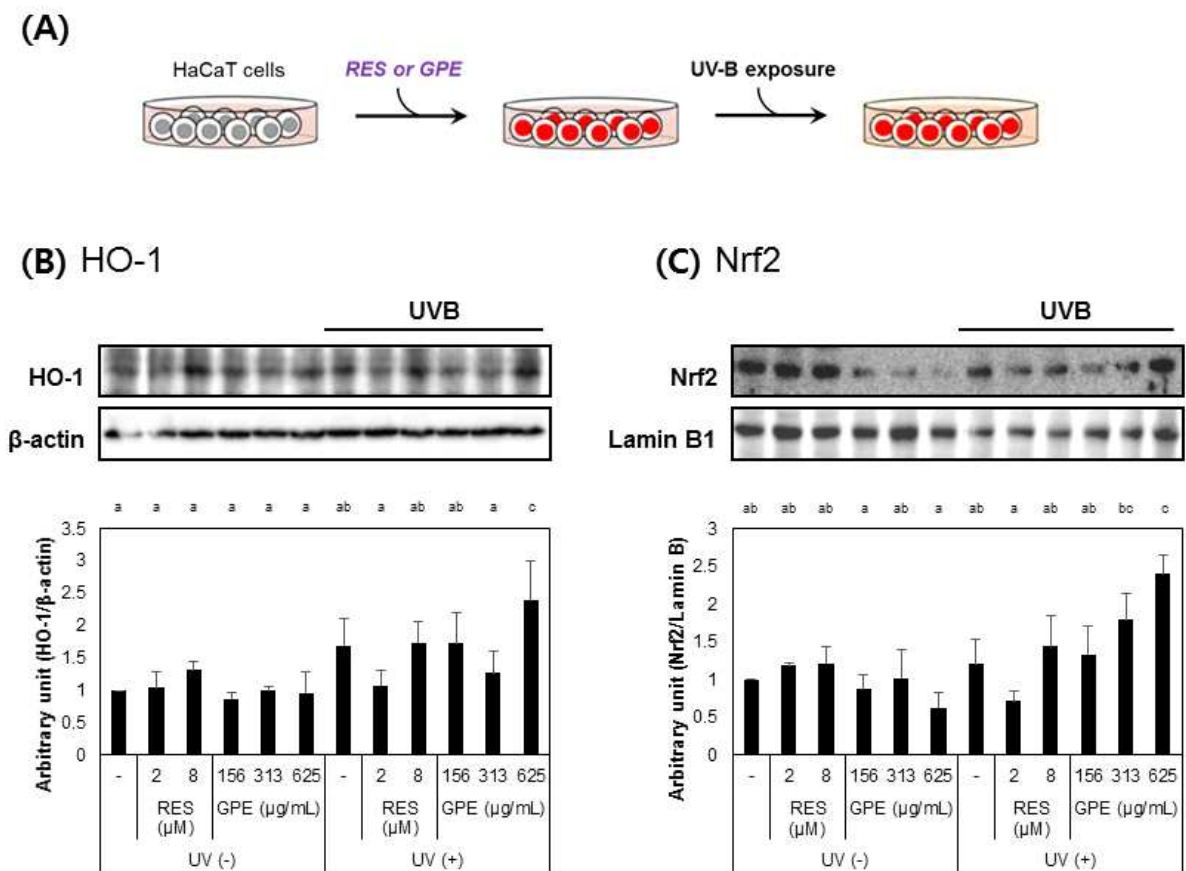


그림 81. Treatment with RES or GPE enhanced HO-1 and Nrf2 expression in UVB-exposed HaCaT human keratinocytes. N = 3; error bars, mean  $\pm$  SEM. Different alphabetical letters indicate significant differences among the conditions ( $p < 0.05$ ).

○ RES 및 GPE 처리에 의해 HaCaT cells의 세포질 HO-1 및 핵 내 Nrf2 단백질의 발현이 농도의존적으로 증가함을 관찰하였음 (그림 81).

### 3.1.2. 동물모델계 활용 효능 평가

#### 3.1.2.1. 실험 디자인

○ 실험은 ‘2.1.5.1. 동물실험 디자인’과 같은 방법으로 수행하였음.

○ 마우스는 그룹 당 8마리(총 56마리)를 할당하였고, 그룹별 시료 처리 농도 및 UV 조사 유무는 다음과 같음. 실험 기간 동안 그룹별 유의한 체중 변화는 없었음.

표 14. 그룹별 시료 및 UV 조사 처리 구분

Group	Treatment	Sample treatment (mg/kg BW)	UVB irradiation	Number of mice
Control	No UV	Vehicle	x	8
	UV-treated	Vehicle	○	8
RES		2	○	8
		10	○	8
		50	○	8
GPE		1,000	○	8
		2,000	○	8

#### 3.1.2.2. 주름 형성 억제 효능

○ 실험 종료 후, 마우스의 등부분을 제모하고 Silicon replica material을 이용하여 피부 모사판을 제작하였음. Visioline® VL 650 기기(대구테크노파크한방산업지원센터 보유)를 이용하여, 주름 형성 면적, 갯수, 길이, 깊이를 분석하였음.

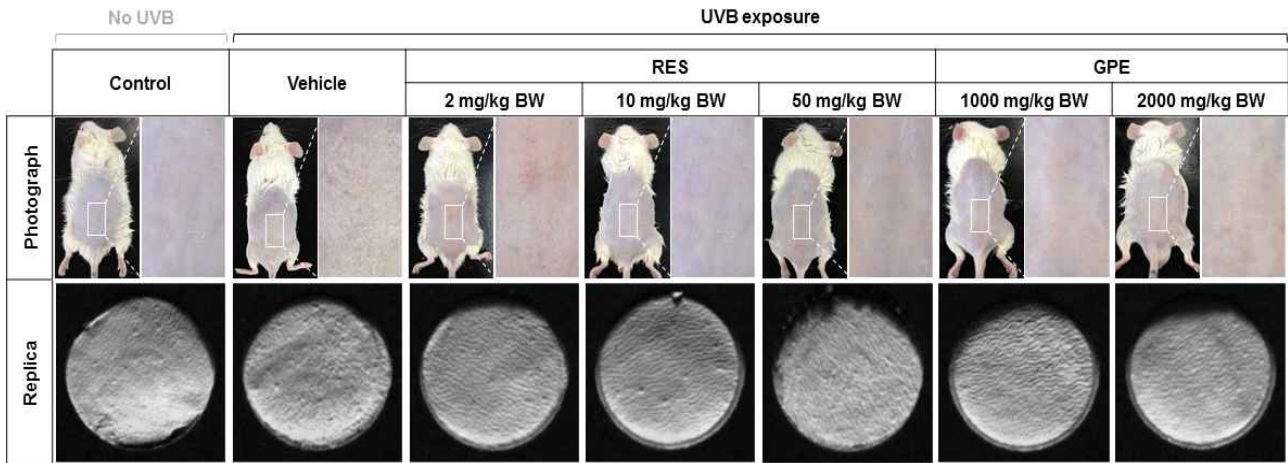


그림 82. Representative photos of ICR mice with shaved dorsal area and the skin replica preparations.

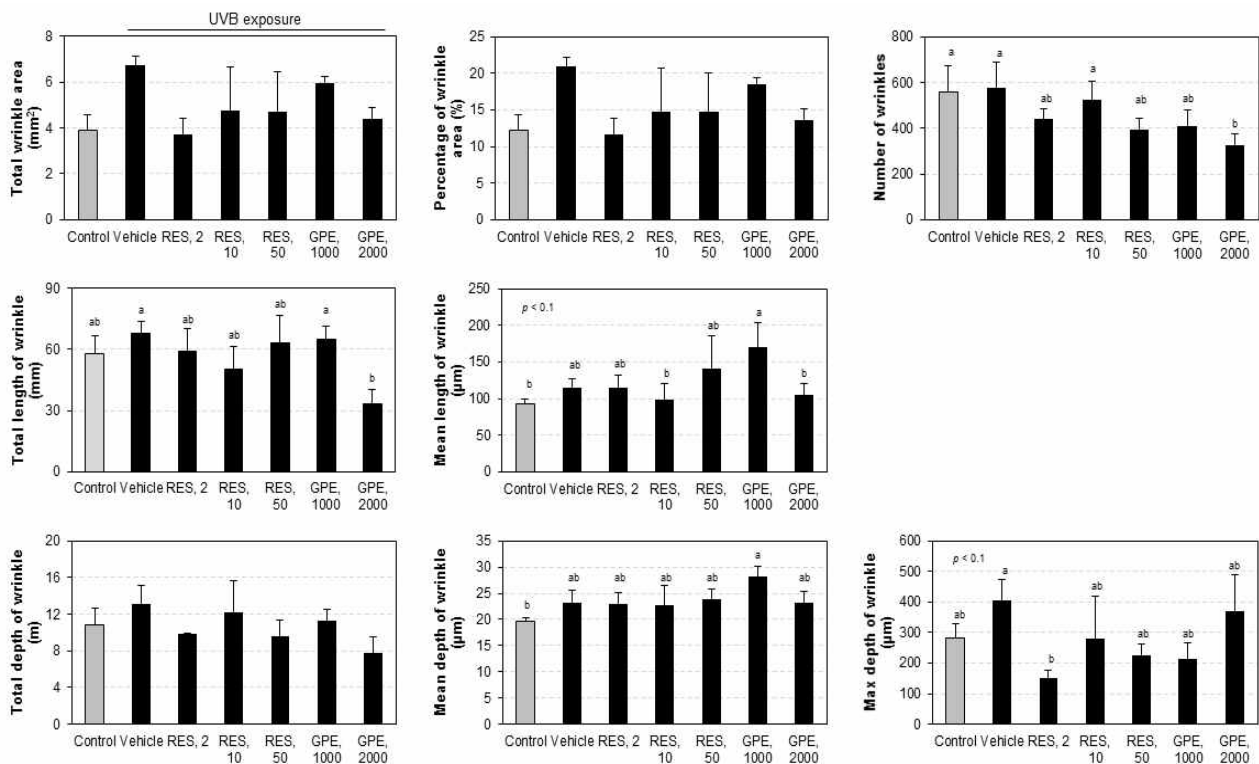


그림 83. Quantitative measures of wrinkle formation, including the number, length, depth, and area of wrinkles, from skin replica analysis. n = 3-4; error bars, mean ± SD. Different alphabetical letters indicate significant differences among the conditions at  $p < 0.05$  unless otherwise specified or  $p < 0.1$  as marked in the graphs.

○ UV 조사에 의해 피부의 주름 개수, 길이, 깊이가 증가하고, RES 또는 GPE 시료의 경구 투여에 의해 감소하는 경향을 보여, 레스베라트롤의 투여가 피부 주름 형성을 억제하는 것으로 판단됨 (그림 82-83).



### 3.1.2.3. 항산화 효소계 발현 촉진 효능

○ 간과 피부 조직 내 항산화 효소인 세포질 HO-1 및 핵 내 Nrf2의 발현 정도를 분석하였음.

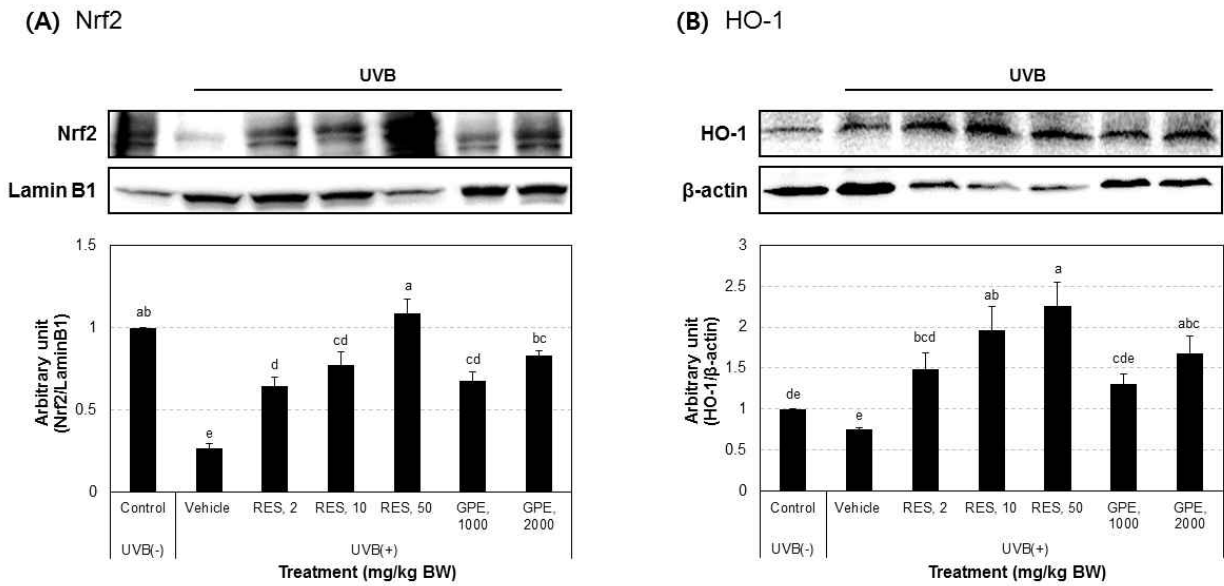


그림 84. Oral supplementation of RES or GPE promoted HO-1 and Nrf2 expression in UVB-exposed mouse liver.

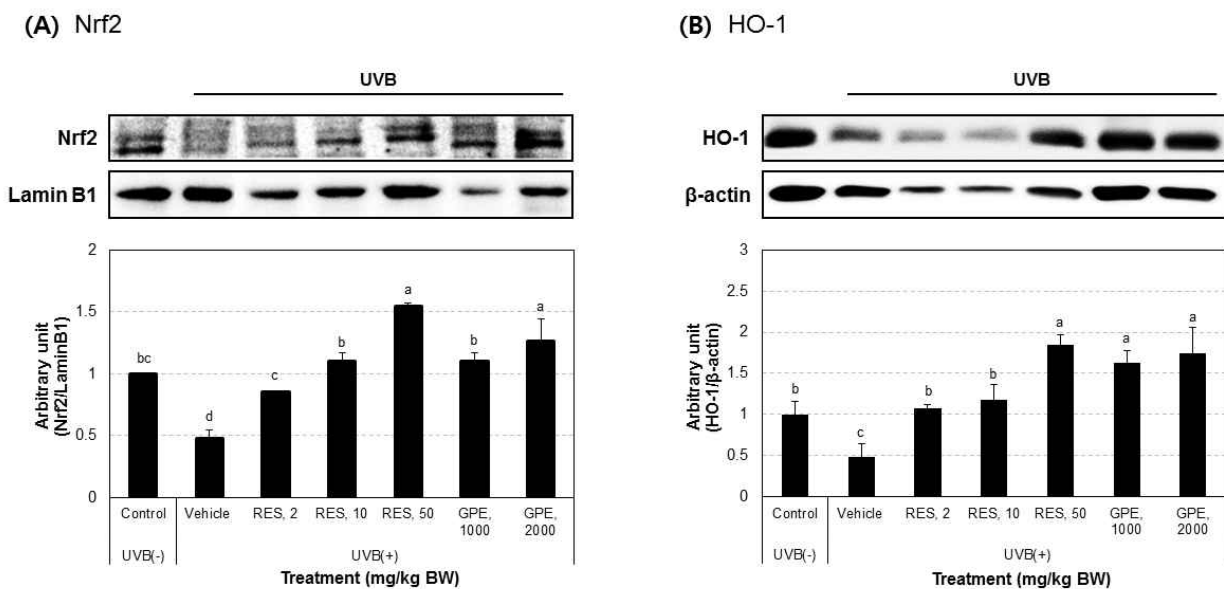


그림 85. Oral supplementation of RES or GPE promoted HO-1 and Nrf2 expression in UVB-exposed mouse skin.

○ 간과 피부 조직 모두, UV가 조사된 그룹에서는 핵 내 Nrf2와 세포질 HO-1의 발현이 감소되었고, RES 또는 GPE가 경구 투여된 그룹에서는 발현량이 증가하였음 (그림 84-85).

○ 즉, 레스베라트롤 및 포도껍질 추출물의 투여는 간과 피부에서 UV 조사에 의해 저해된 항산화 효소계 단백질의 발현을 정상화 또는 증가시킬 수 있음을 나타냄.

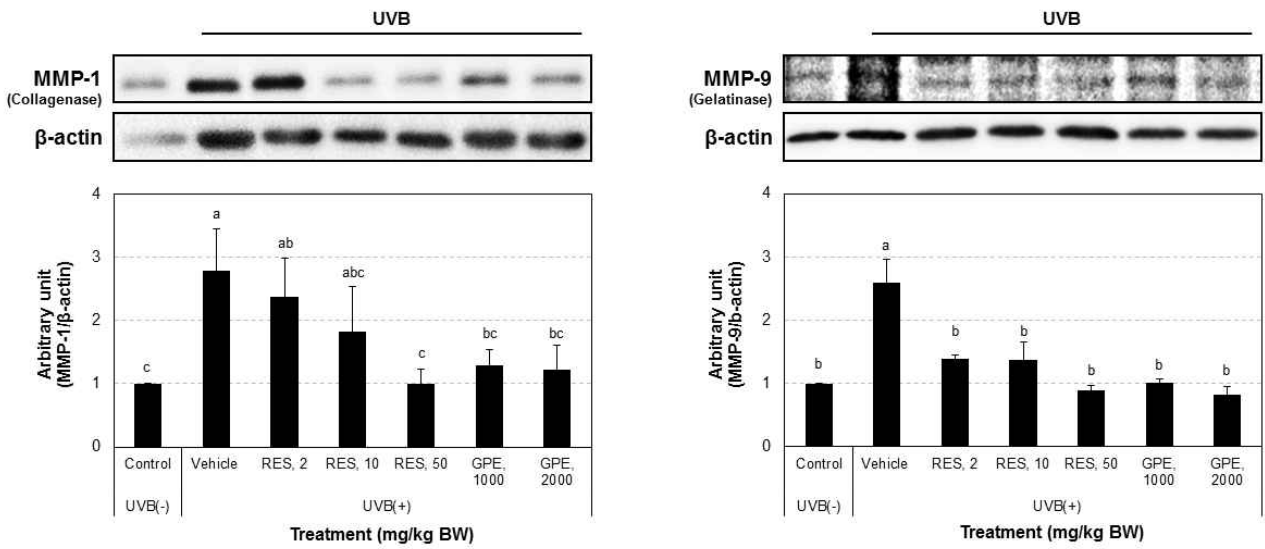


그림 86. Collagenase (MMP-1) and gelatinase (MMP-9) expression levels in the skin tissue collected from mice in different experimental groups.

○ 피부 조직에서는 특히 RES 또는 GPE 경구 투여에 의해, 피부 노화 지표인 콜라겐 분해효소 collagenase (MMP-1)과 젤라틴 분해효소 gelatinase (MMP-9)의 발현이 감소됨을 확인하였음 (그림 86).

### 3.1.2.4. 조직학적 분석

○ UV 조사 및 시료의 경구 투여가 종료된 후, 제모된 부위의 피부 조직을 절개하여 고정 용액에 fixing, 파라핀에 embedding, vibratome으로 slicing (두께 4 μm) 하여 조직학적 분석을 준비함. 준비된 조직 slices는 haematoxylin and eosin stain 방법으로 염색한 후, 현미경으로 관찰함.

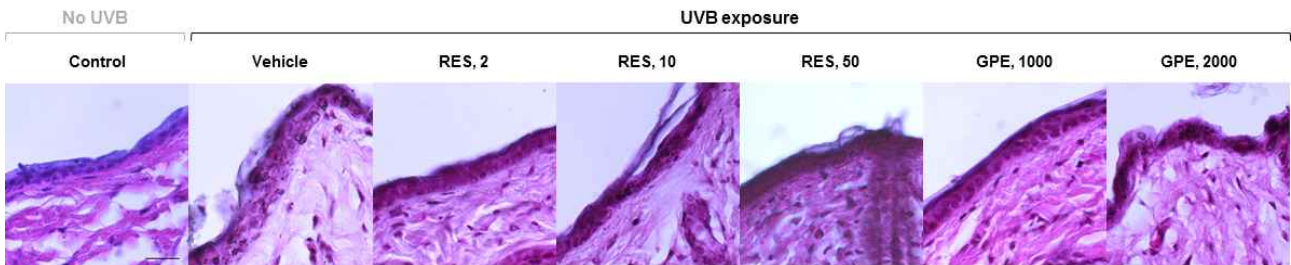


그림 87. Histological analysis by H&E staining for skin tissue collected from mice in different experimental groups.

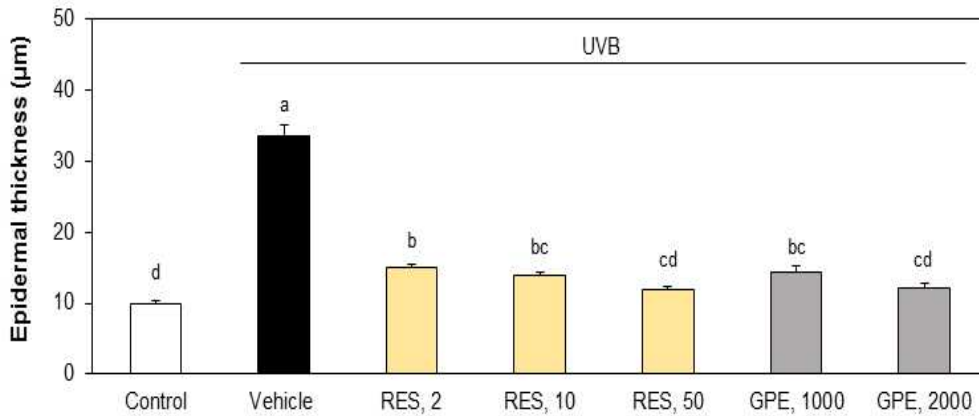


그림 88. Average epidermal thickness of the skin tissues collected from the experimental animals after sacrifice.

○ UV가 조사된 피부는 표피층의 두께가 크게 증가하였으나, RES 또는 GPE가 경구 투여된 그룹의 표피층의 두께는 유의적으로 감소하였음 (그림 87-88).

○ 이와 같이, 피부 모사판 분석, 항산화 효소 발현 분석, 조직학적 분석을 통해, 레스베라트롤 및 포도껍질 추출물의 투여가 간 및 피부 조직의 항산화 효소의 발현을 증가시켜, UV 조사에 의한 피부 조직 내 산화적 스트레스를 완화함으로써 피부 손상 및 주름을 개선하는 항노화 효과가 있음을 확인하였음.

○ 따라서, 포도 및 베리류 기반 주름방지 음료 (시)제품의 주름 개선 효능은 베리류에 함유된 레스베라트롤을 포함한 항산화 성분들의 기능에 기인할 것으로 판단됨.

# 세부 연구 수행 결과

## [제2협동: 한약진흥재단]

### 1. 1차년도 한약진흥재단 연구결과

#### (1) 미백활성평가를 위한 최적시스템 구축

○ UV에 의한 비정상적인 멜라닌색소 침착 관련기전에 있어서, cAMP는 중요한 역할을 함 (서론에 언급). 따라서, 본 연구에서는 forskolin (cAMP activator로 작용하여 melanogenesis를 유도하는 물질)을 이용하여, 대상소재들의 미백활성을 평가하였음.

○ Method : Tyrosinase activity 측정은, 세포에 약물 처치 24 h 후 배양이 끝나면 1%(w/v) triton X-100을 함유한 10 mM phosphate buffer(pH 6.8)를 100  $\mu$ L를 가하고 5분간 shaking 한 후에 세포와 용액을 모두 eppendorf tube로 이전시키고 원심 분리하여 상층액은 tyrosinase 활성과 단백질 정량에 이용하고, cell pellet은 멜라닌 정량에 사용함. 96-well plate에 약물 처치 후 얻은 상층액 40  $\mu$ L를 분주하고 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.2)에 녹인 2 mg/mL L-DOPA 200  $\mu$ L를 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 배양함. Tyrosinase에 의해 생성된 DOPA chrome은 475 nm에서 흡광도를 측정함.

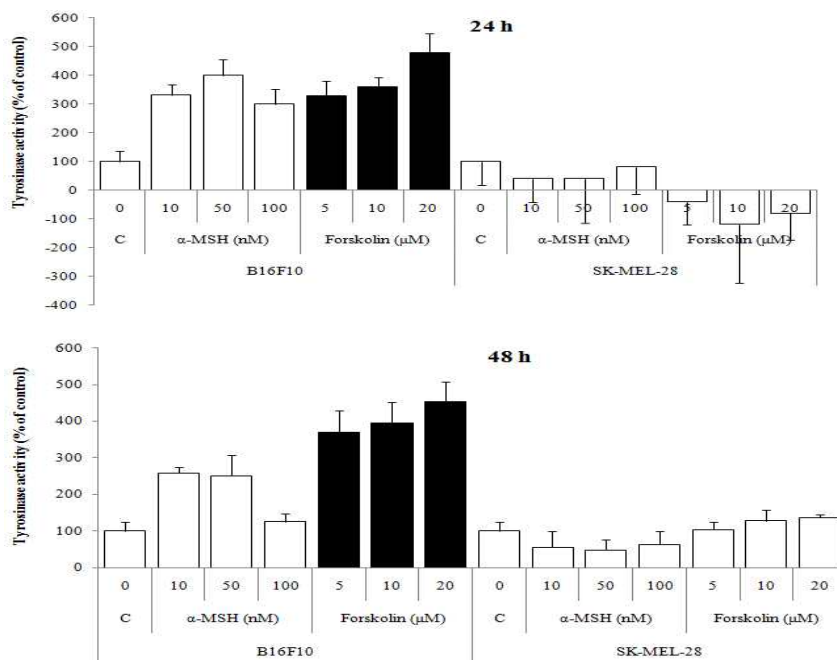
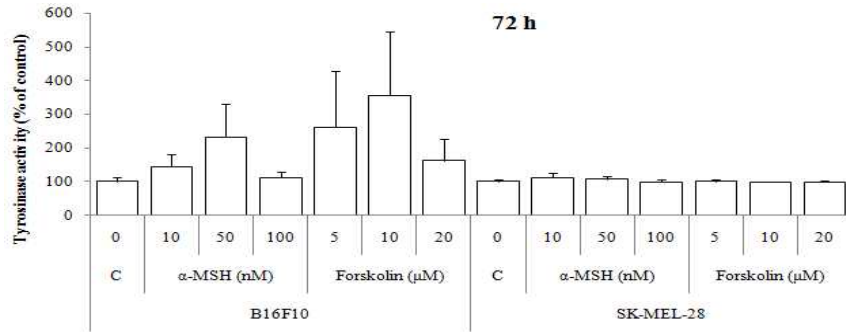


Figure 1. Effects of  $\alpha$ -MSH and forskolinin on induction of tyrosinase activity in B16F10 murine melanoma and SK-MEL-28 human melanoma cells.



(2) B16F10 세포와 SK-MEL-28의 α-MSH과 forskolin에 의한 tyrosinase activity 유도능 비교

○ 결과 및 고찰:

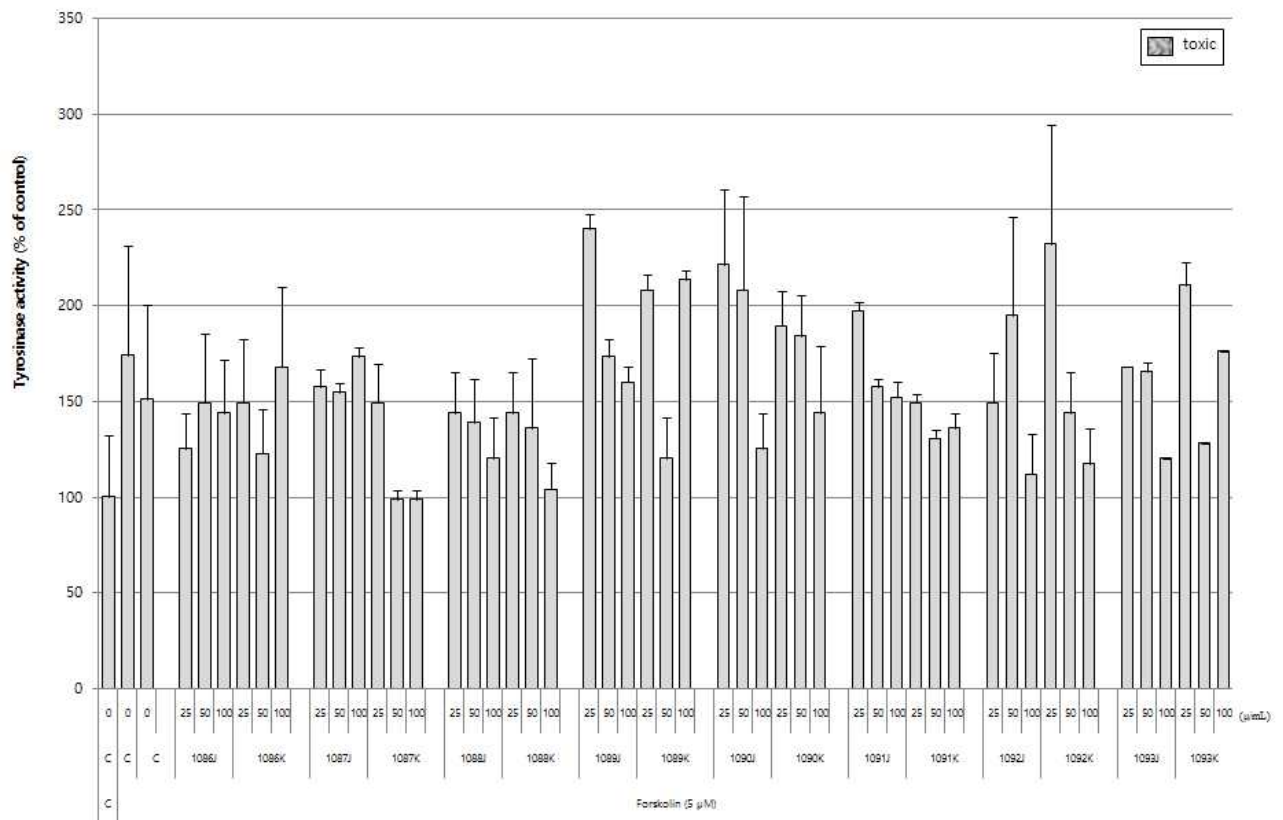
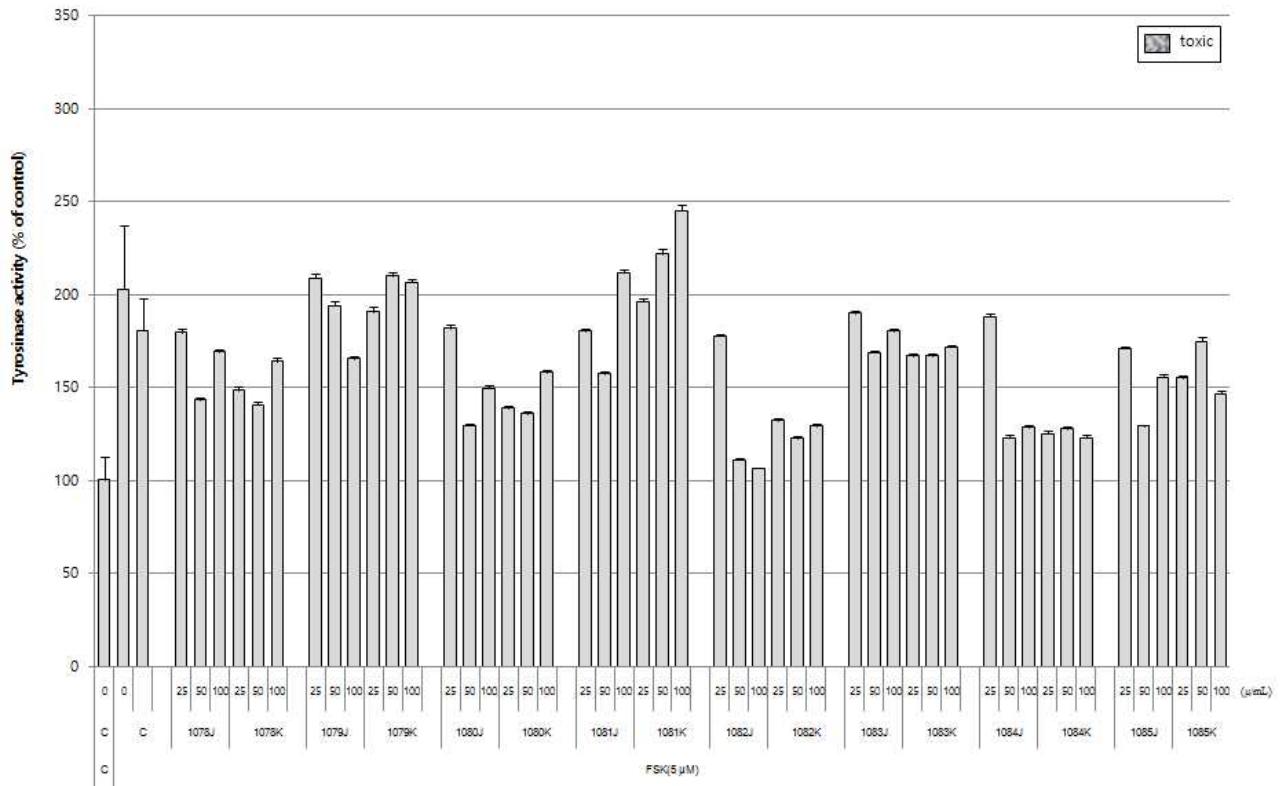
- B16F10 세포와 SK-MEL-28의 α-MSH과 forskolin에 의한 tyrosinase activity 유도능 비교한 결과, forskolin은 24 ~ 48 h까지 tyrosinase activity 유도능이 일정하게 유지되는 데 반해, 72 h에 이르면 그 활성이 감소하는 것으로 나타남. 이는 serum free media에서 72 h 배양시, 장기배양에 따른 세포독성이 유발된 것으로 보임.
- α-MSH 처리 또한, tyrosinase activity를 유도하고, 48 h까지 그 활성을 유지시키지만, forskolin 보다 그 지속력이 약하여, 48시간에는 24 h 처리시보다 낮은 tyrosinase activity를 나타냄.
- Human melanocytes의 경우, α-MSH receptor 발현이 낮은 점을 감안할 때, 추후 human melanocyte 이용한 실험에서 유의한 결과를 유도하기가 쉽지 않을 것으로 예상함.
- 세포별 tyrosinase activity 유도능을 비교해 볼 때, B16F10세포에 반해 SK-MEL-28세포는 tyrosinase activity 유도능이 극히 미약하였으며, 배양시간에 따른 활성변화도 찾아보기 힘들 (Fig. 1).
- 따라서, B16F10 세포에 forskolin을 24h 처리하여 tyrosinase activity를 유도하고, 선정된 소재들의 미백활성을 스크리닝하는 것이 최적일 것으로 판단함.

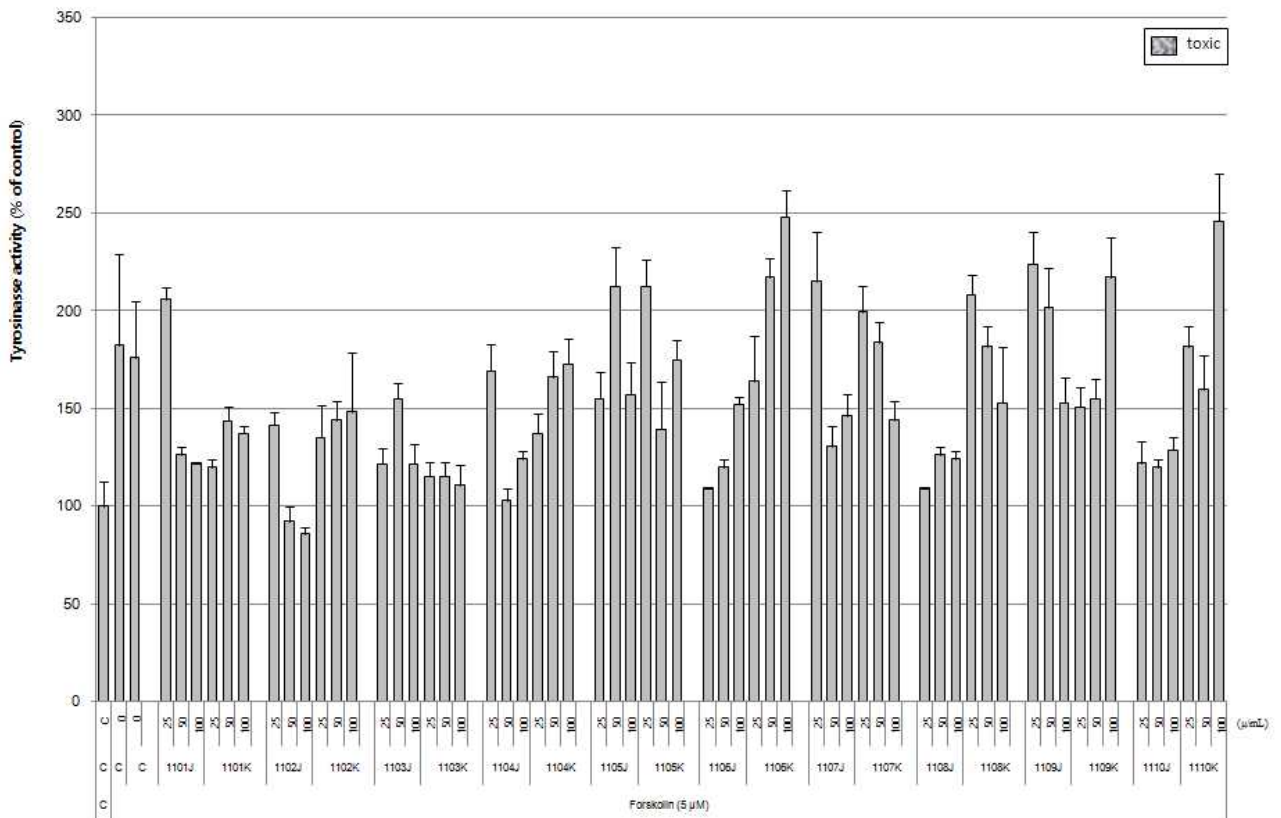
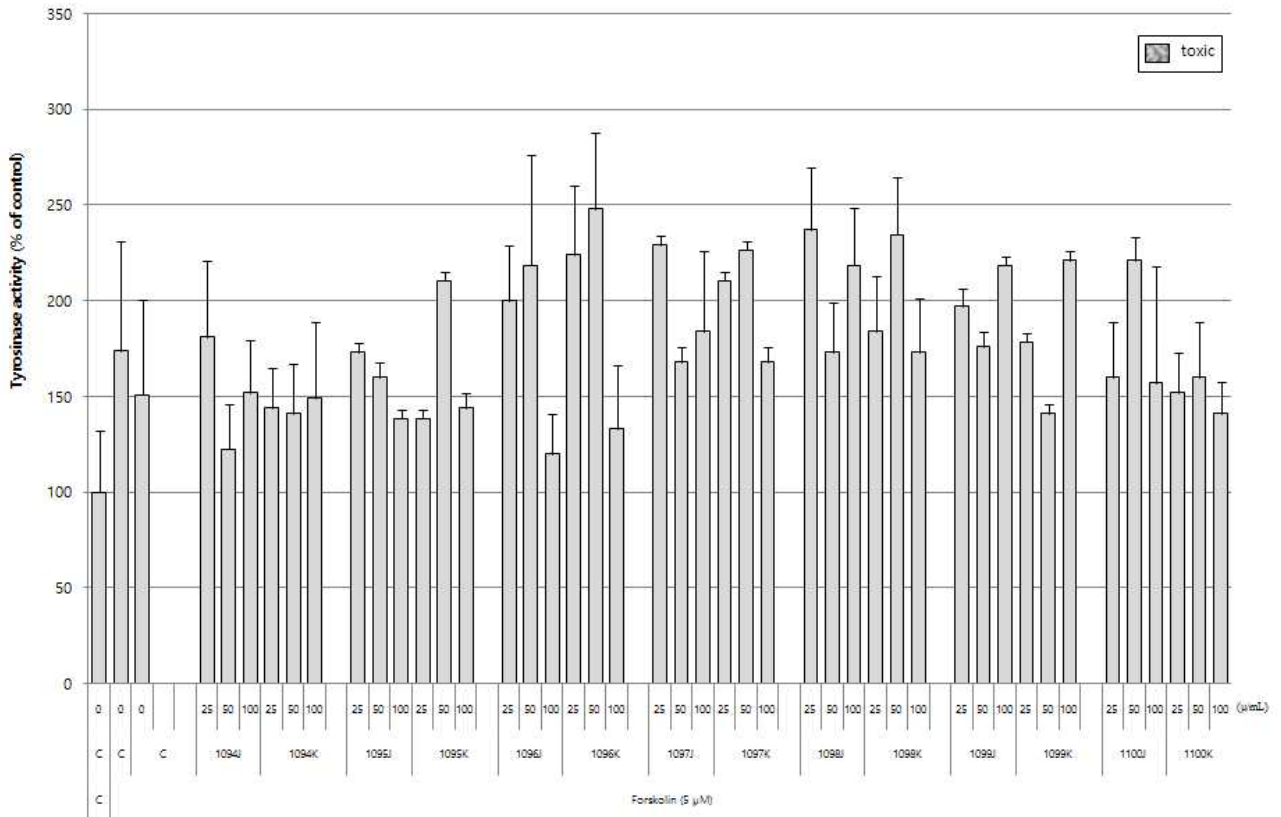
(3) 미백활성평가 소재 (지역과일류 7종과 한방자원 384종)에 대한 미백활성평가

1) 1차 스크리닝

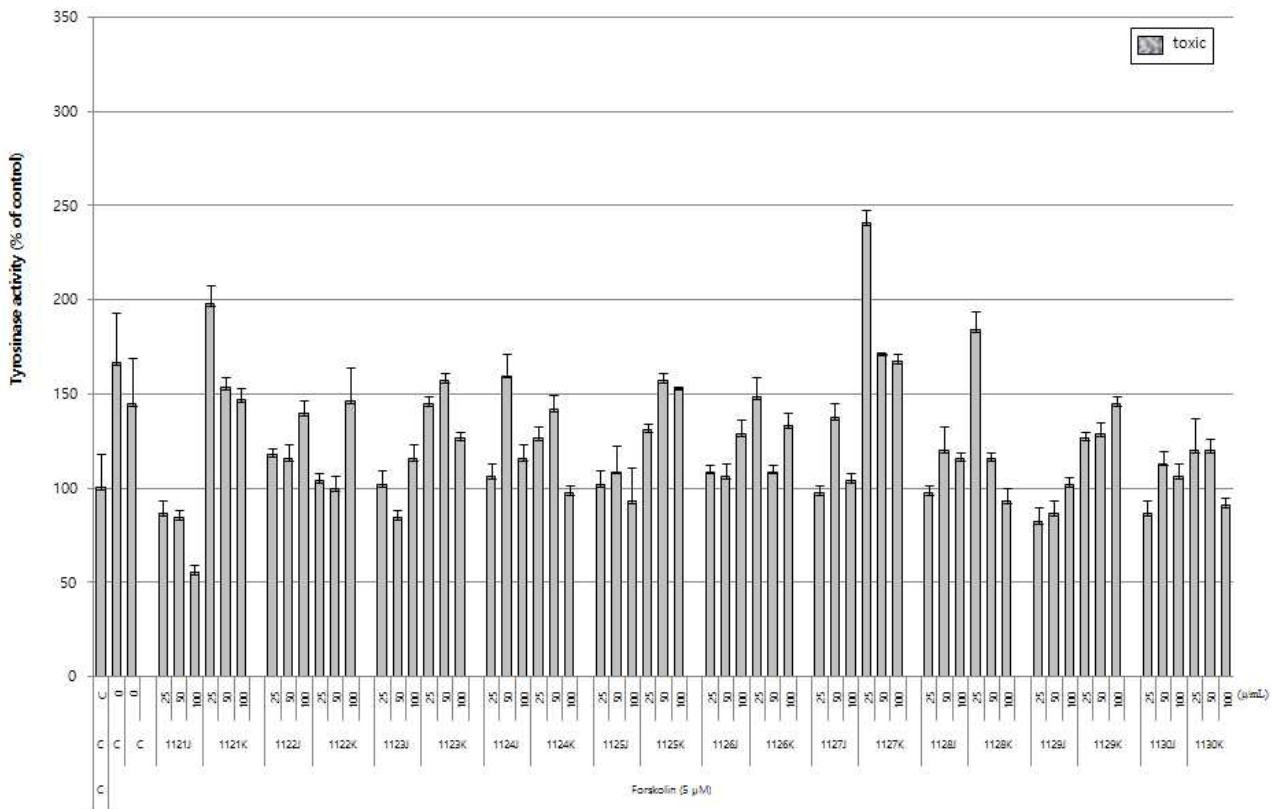
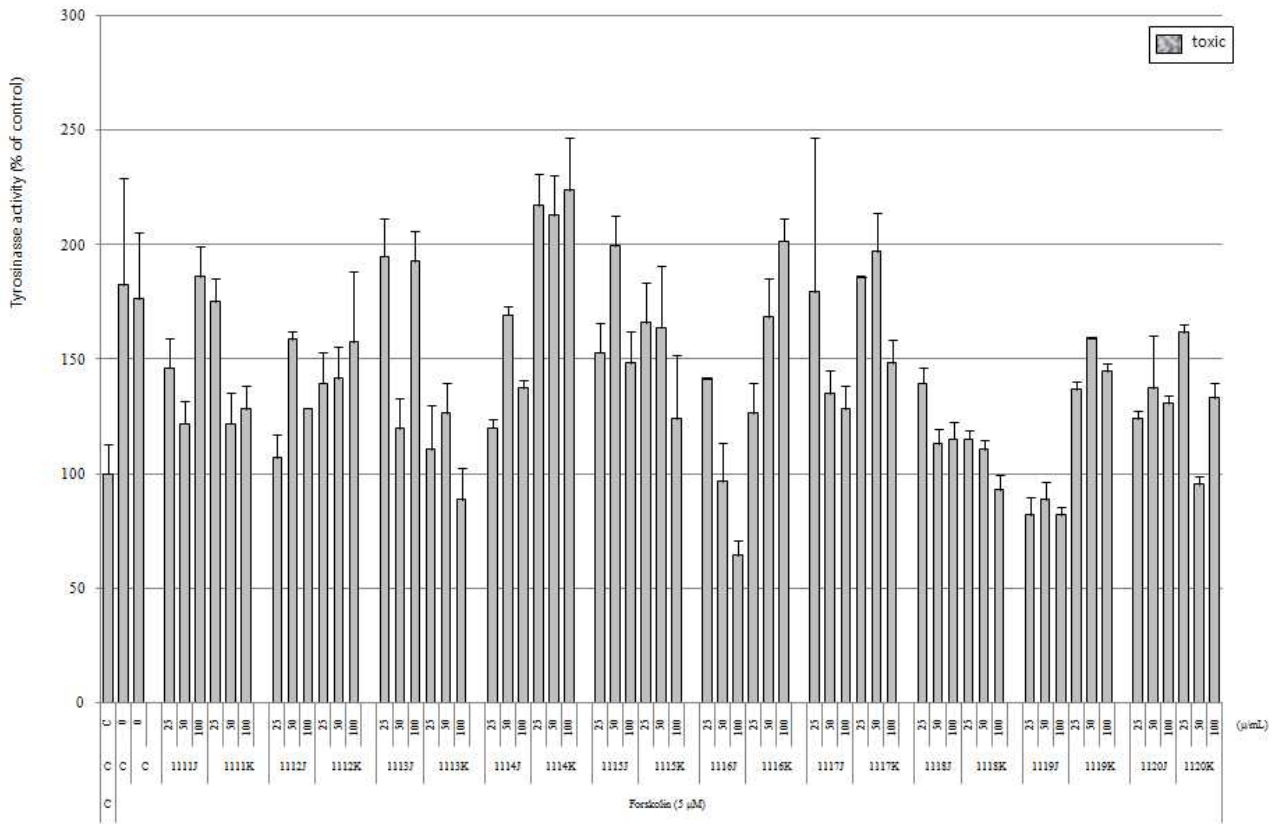
Figure 2. Effects of 7 kinds of fruits extract on forskolin-induced tyrosinase activity in B16F10 murine melanoma cells.

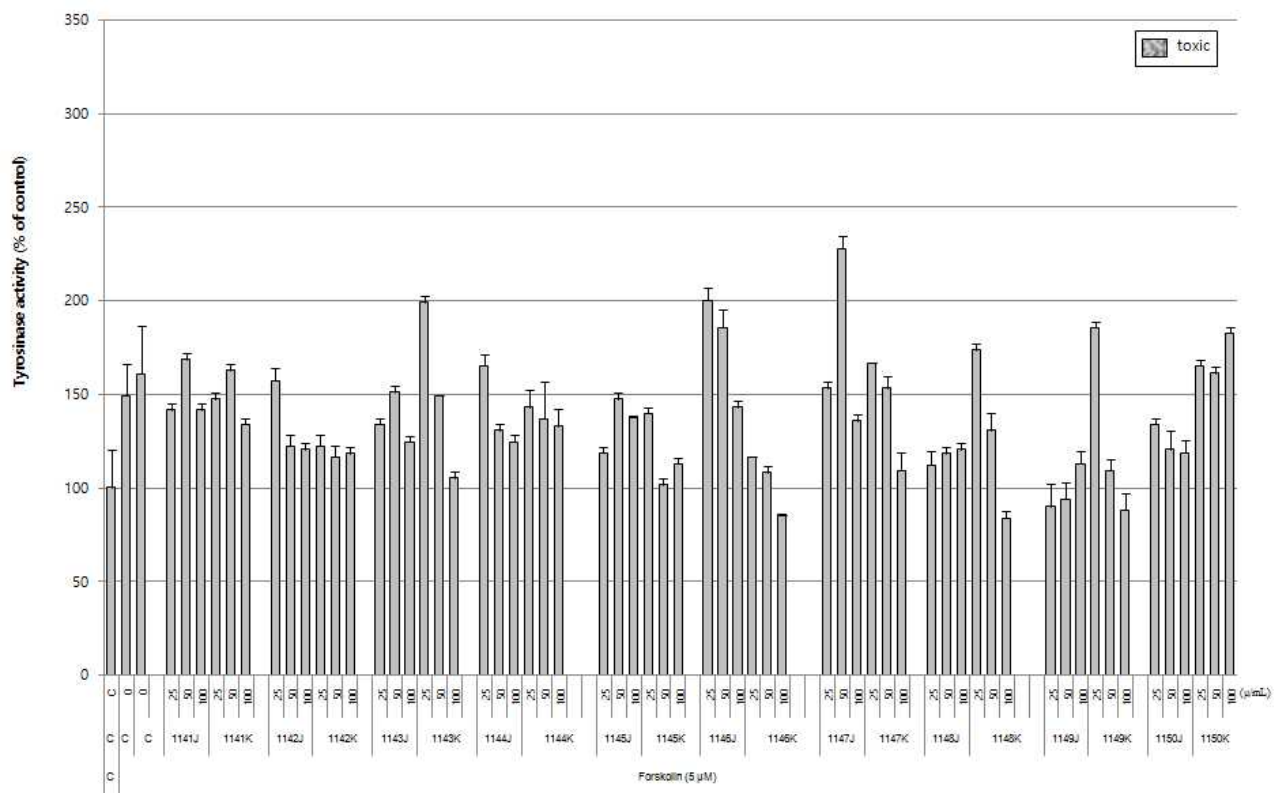
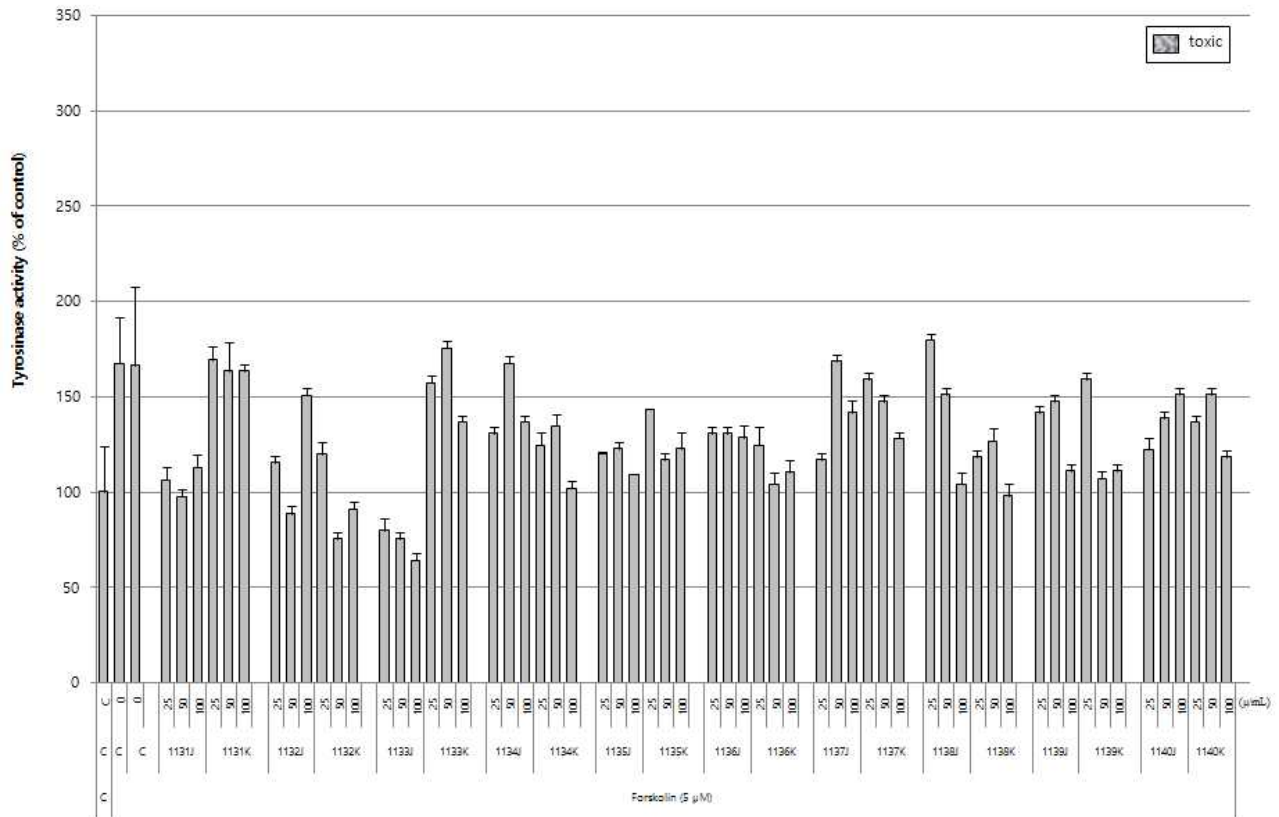


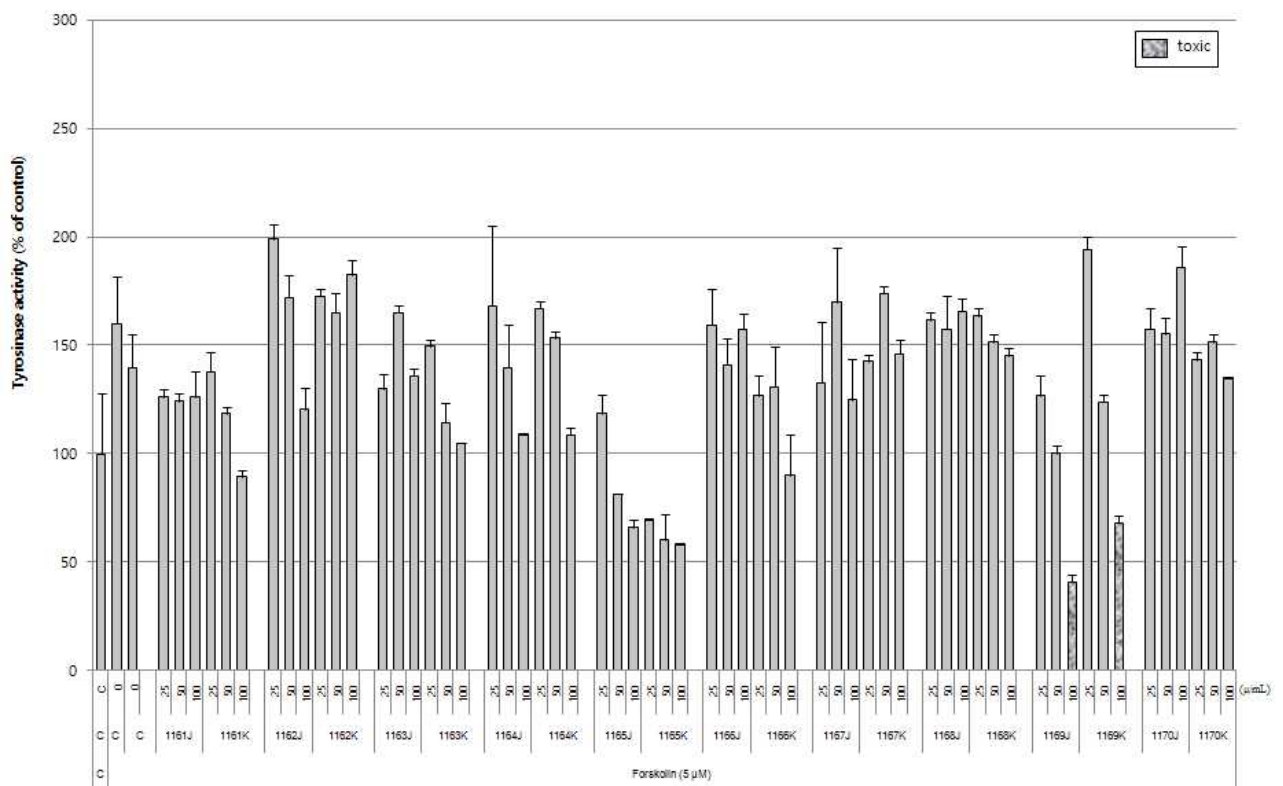
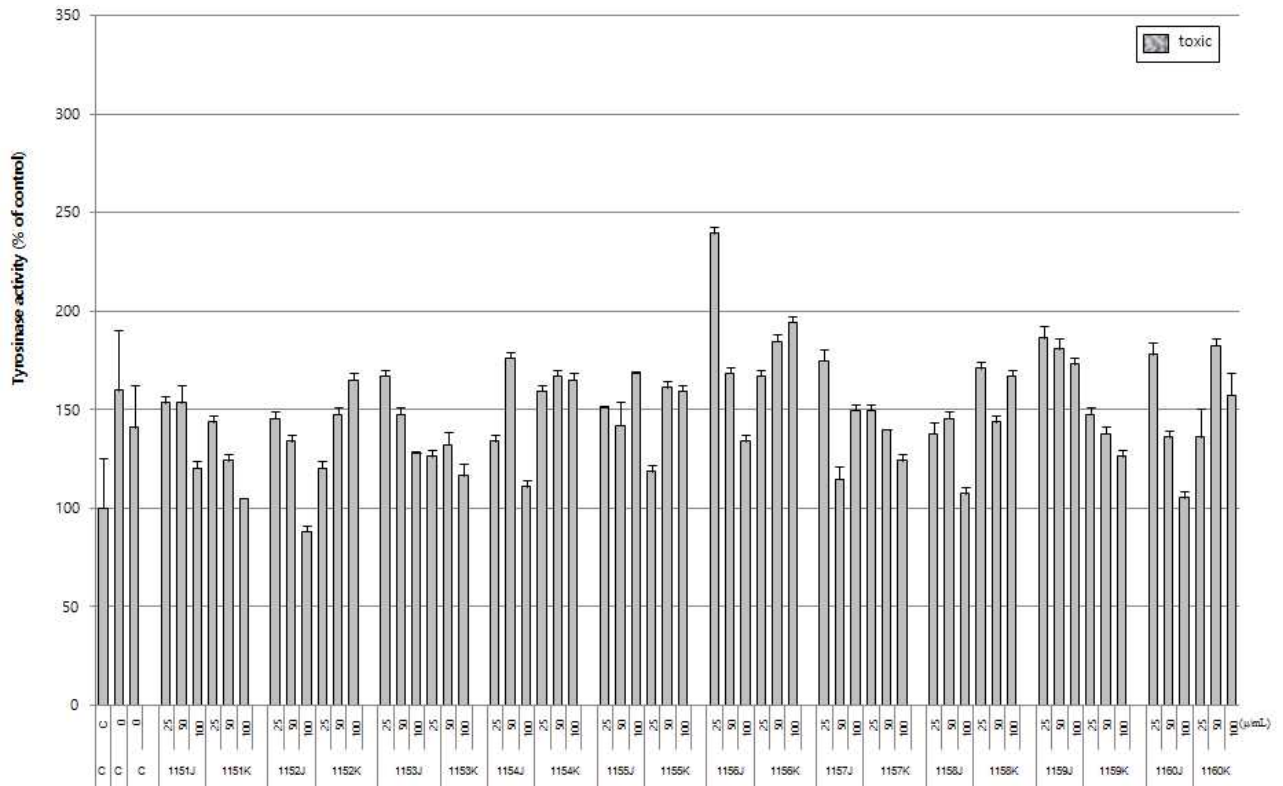


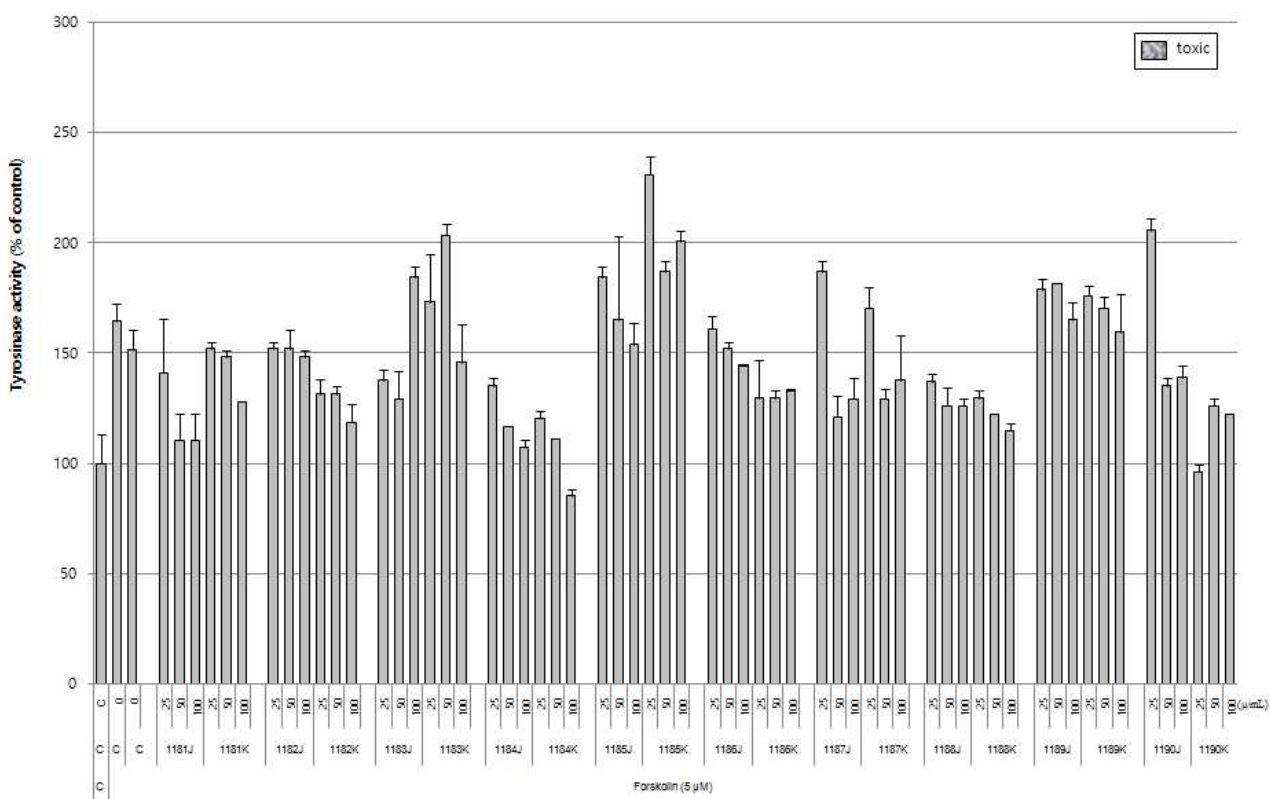
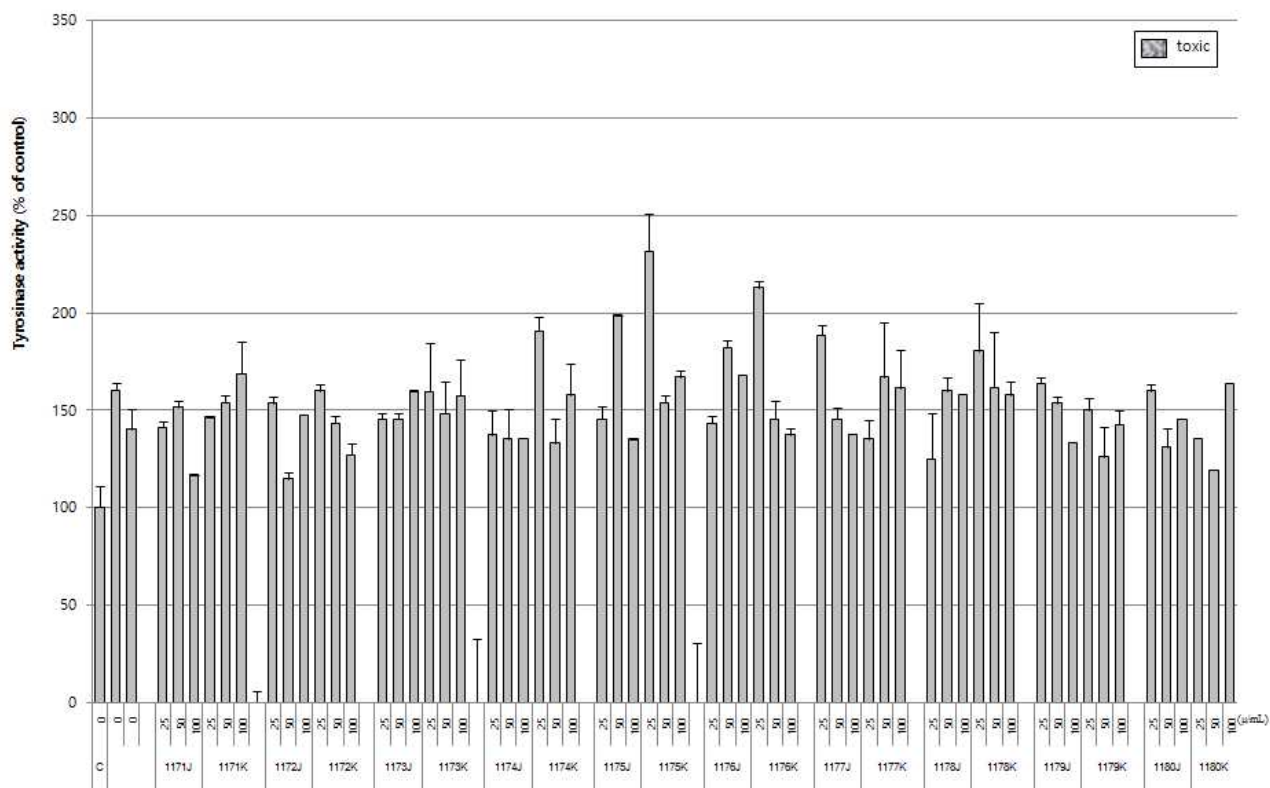


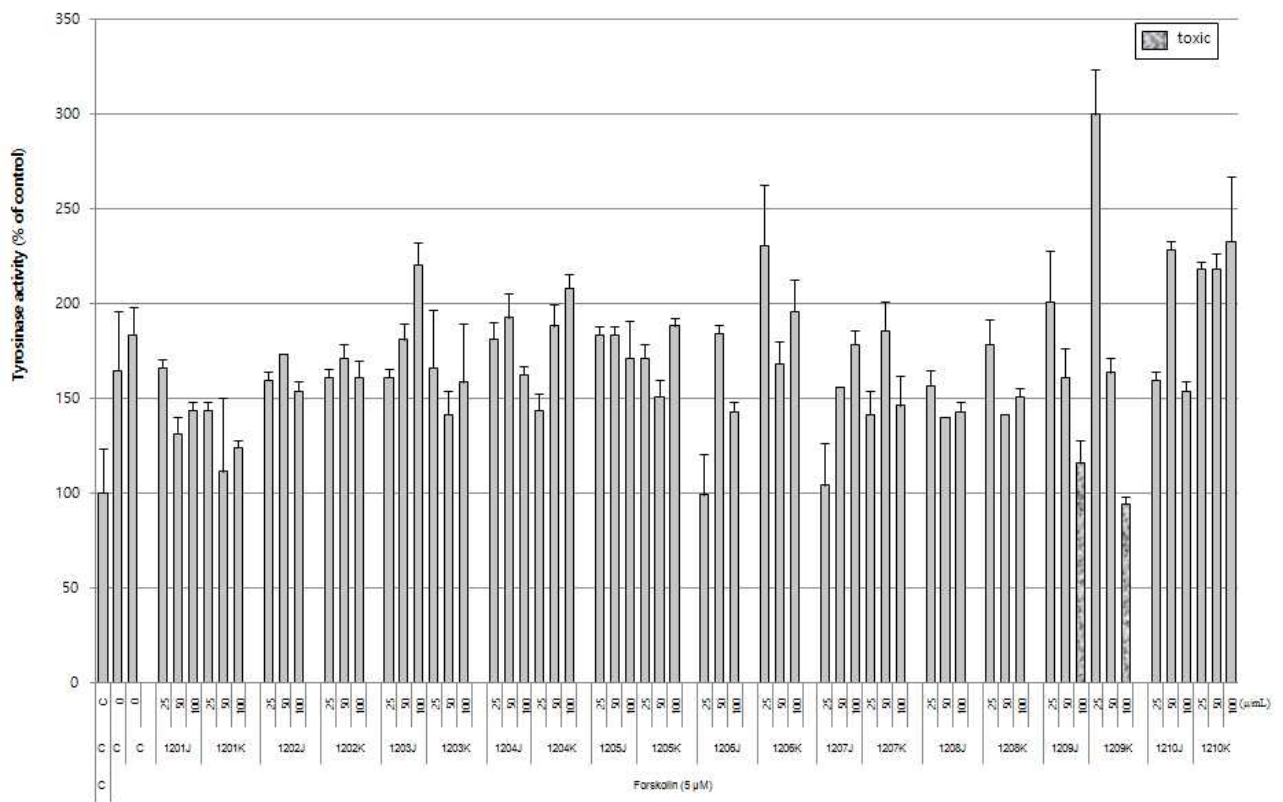
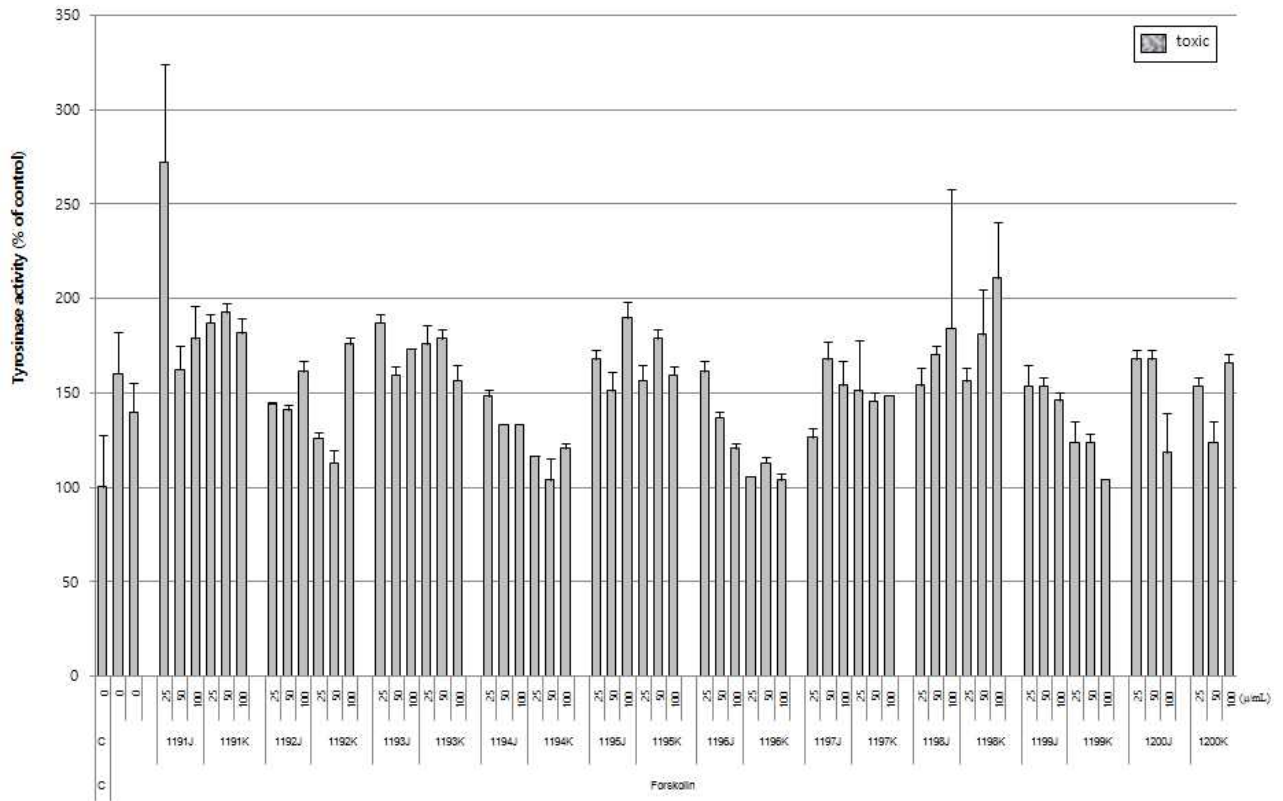


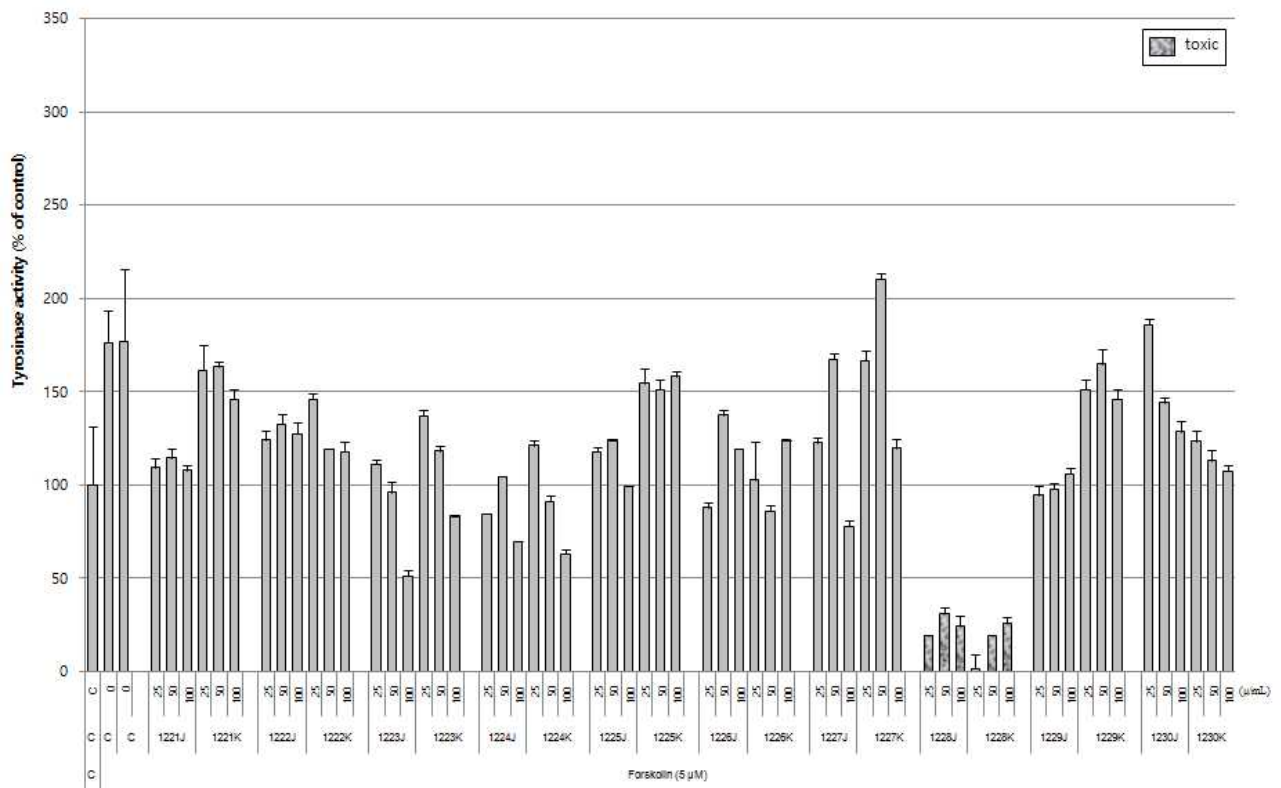
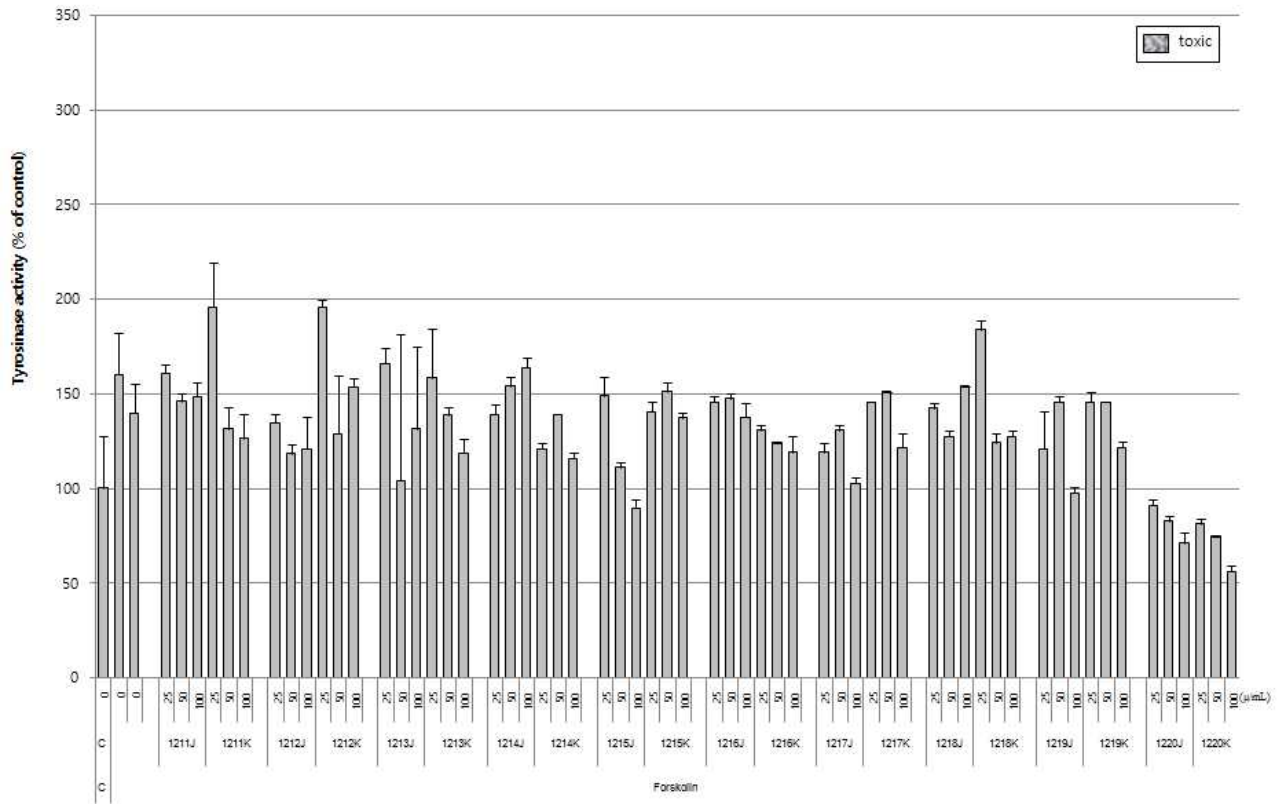


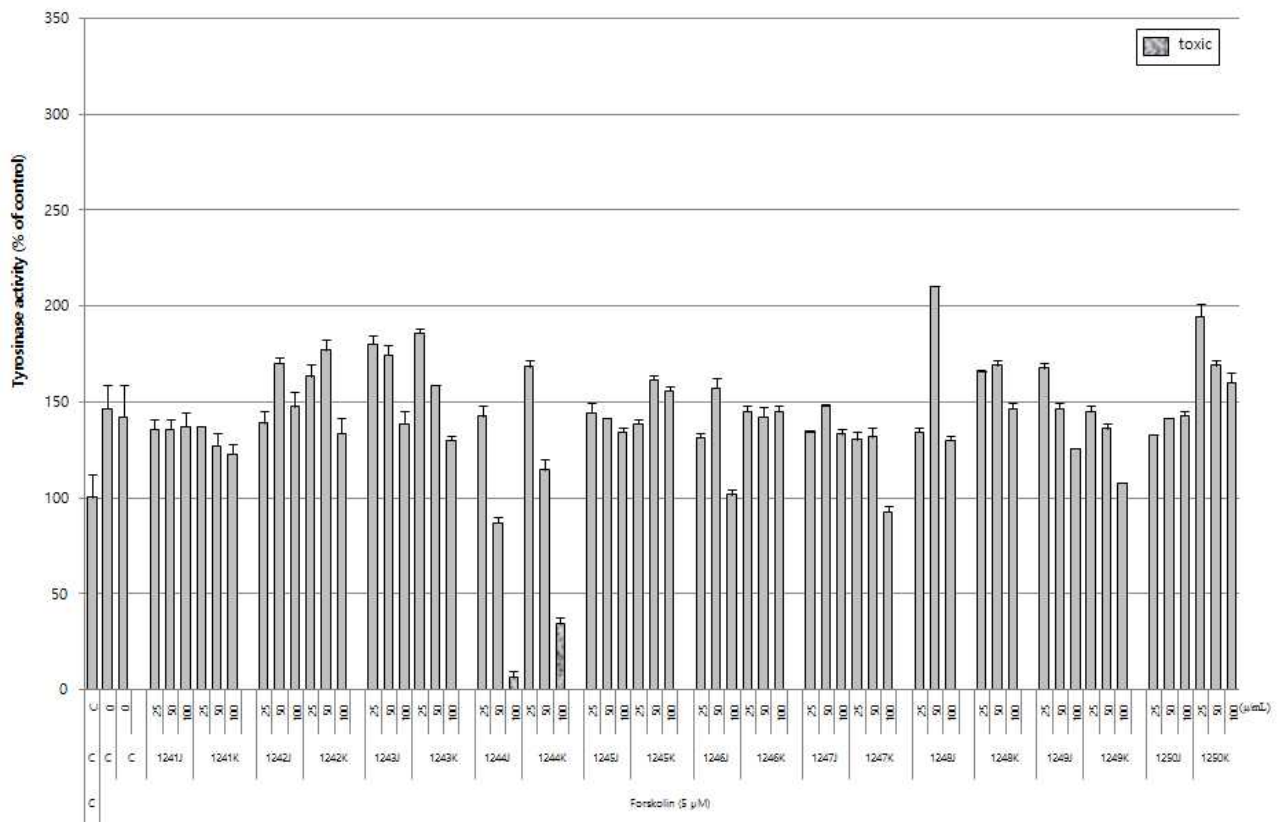
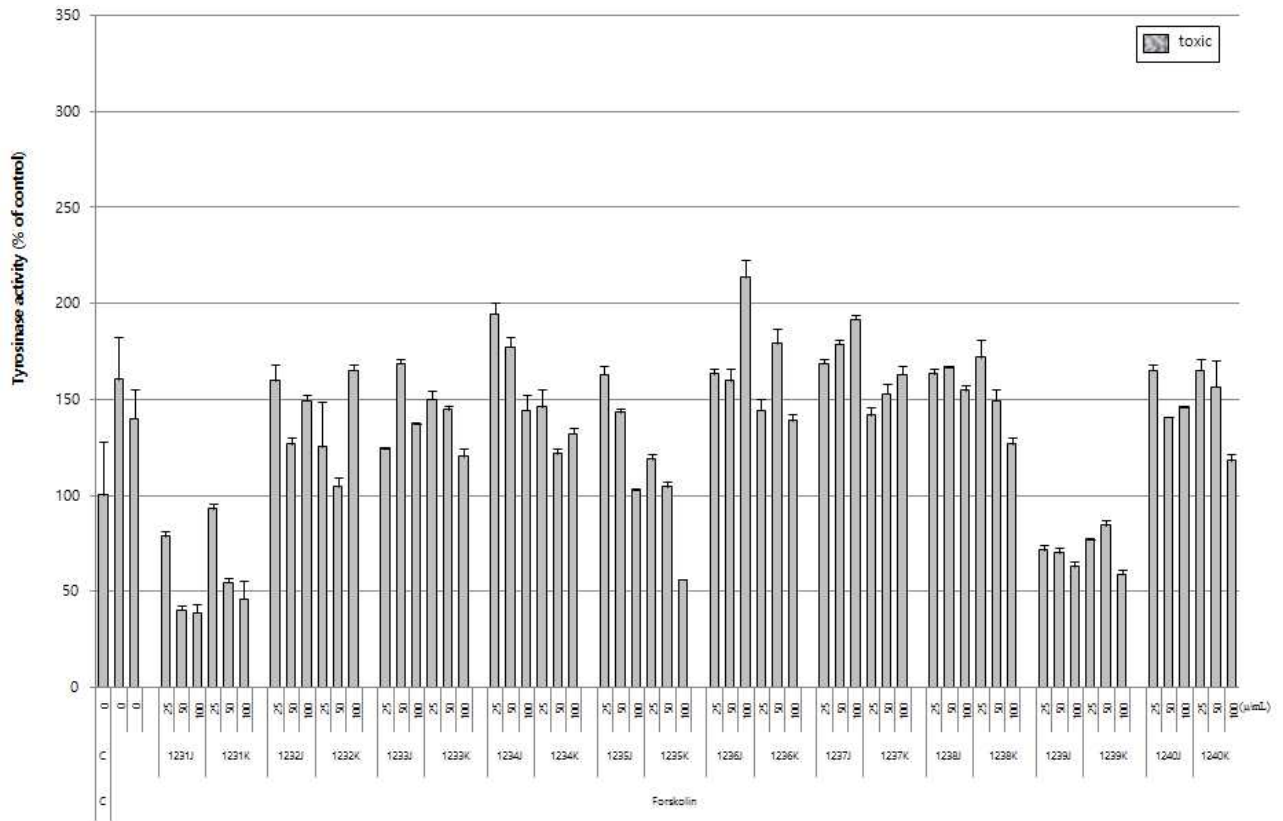


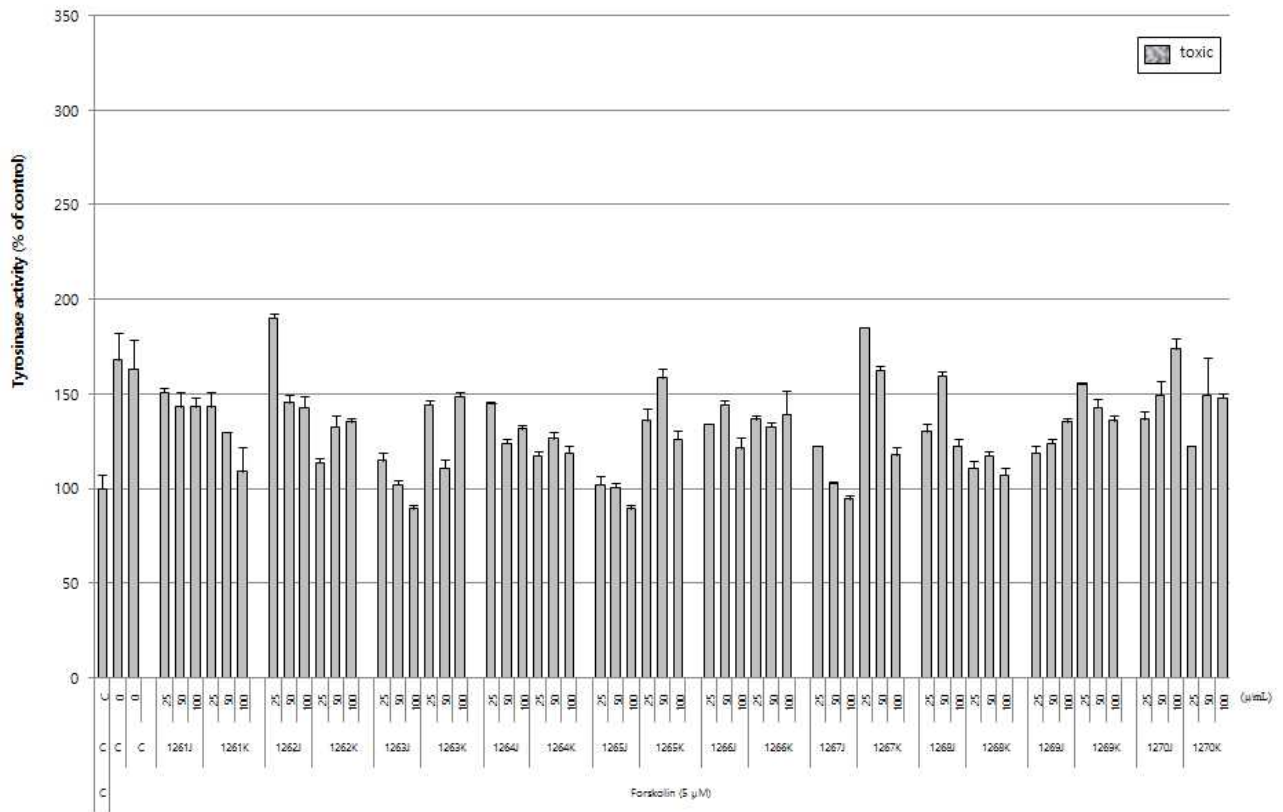
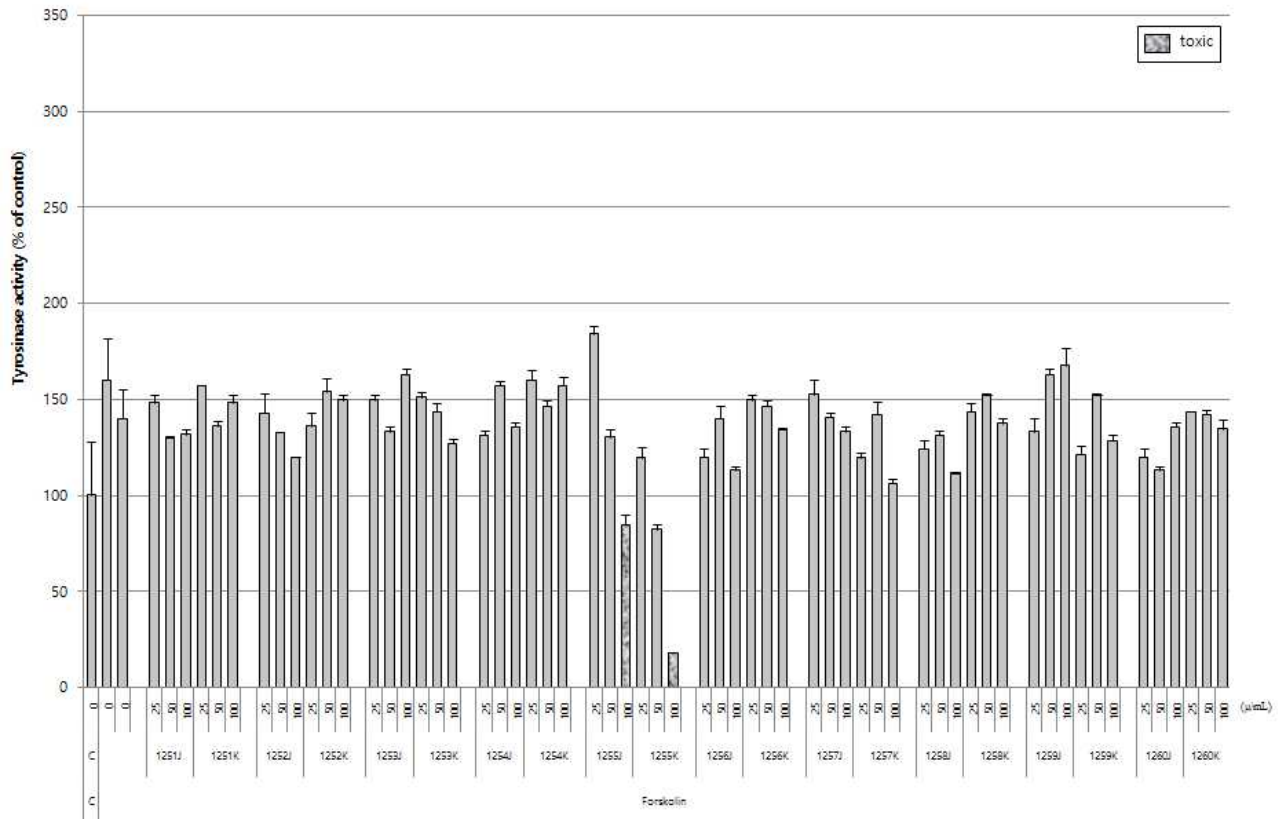




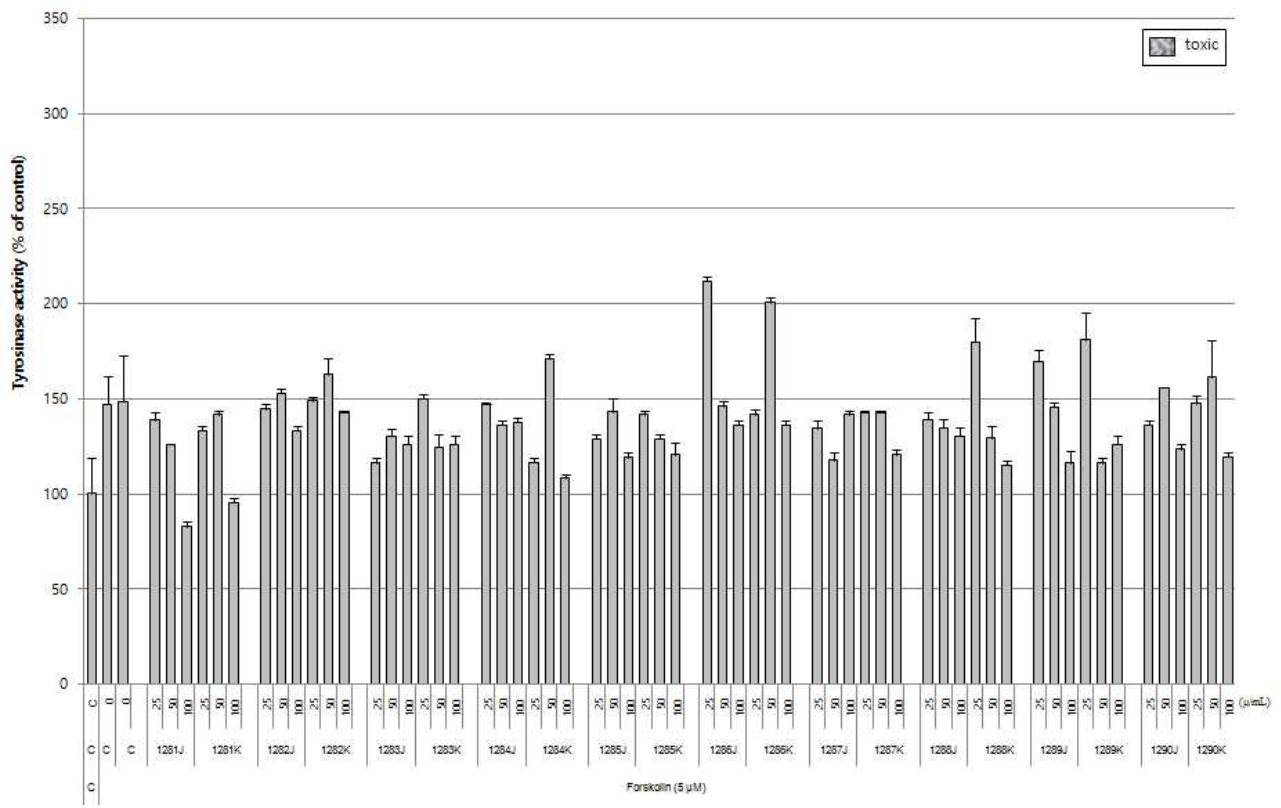
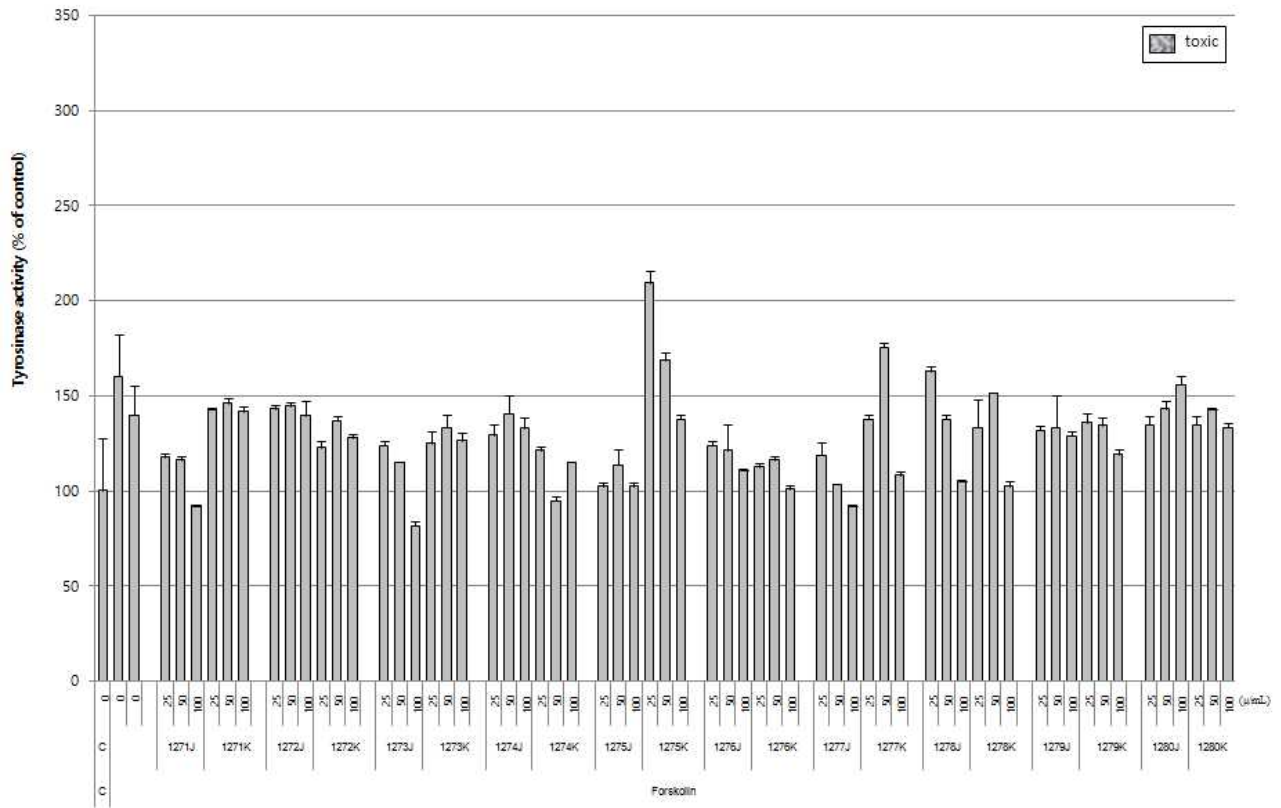


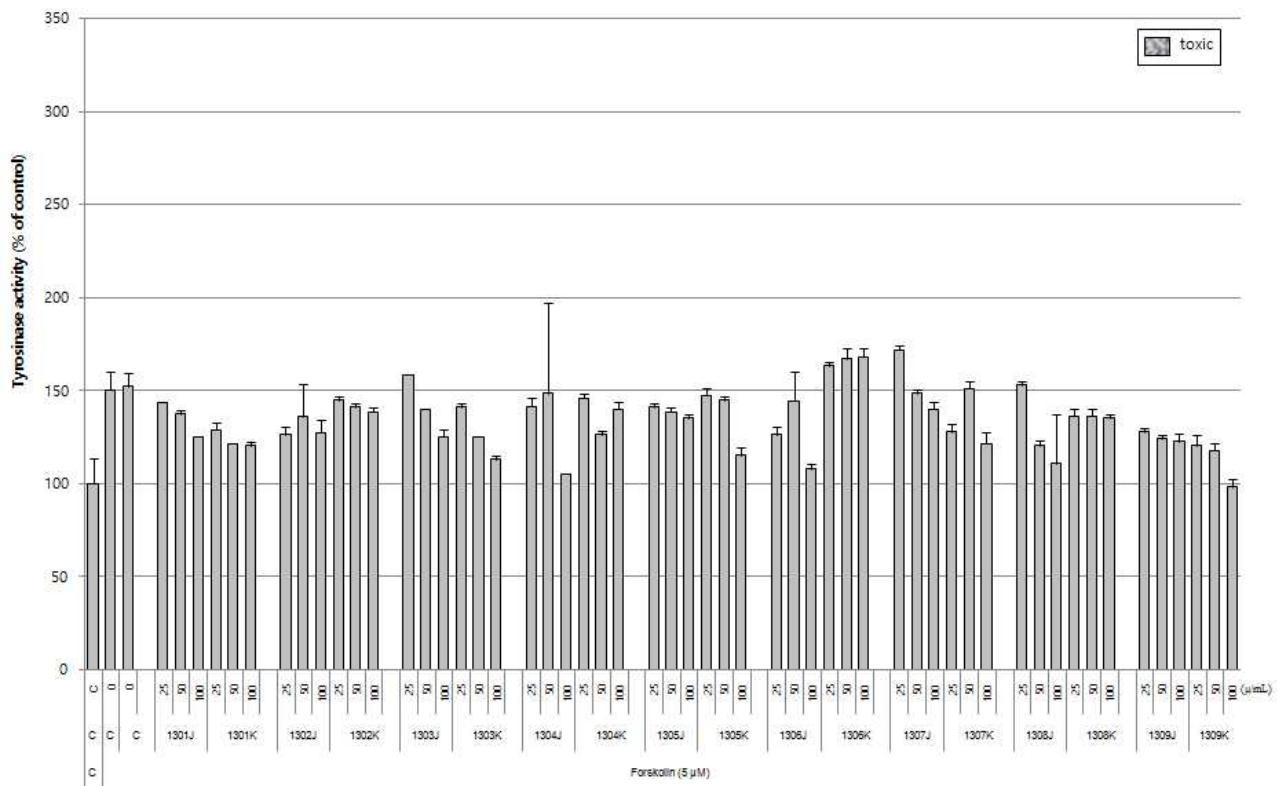
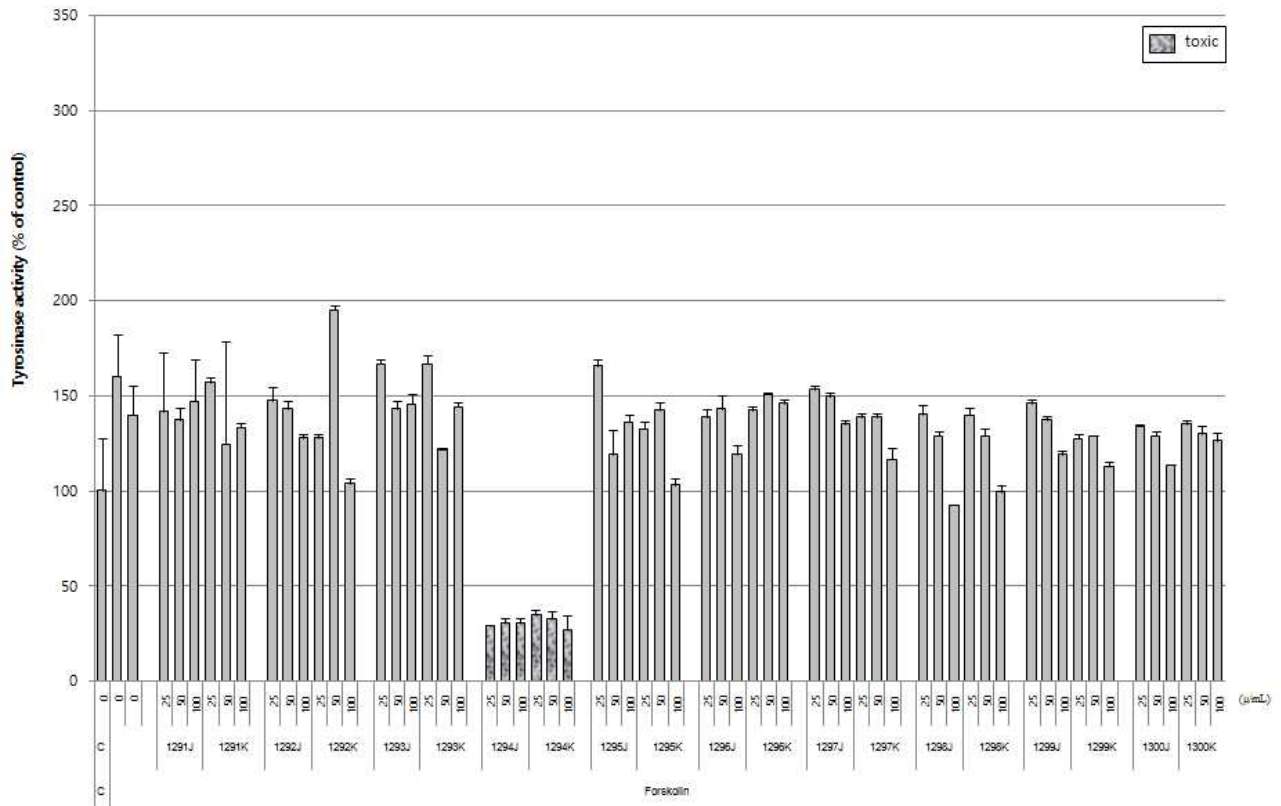


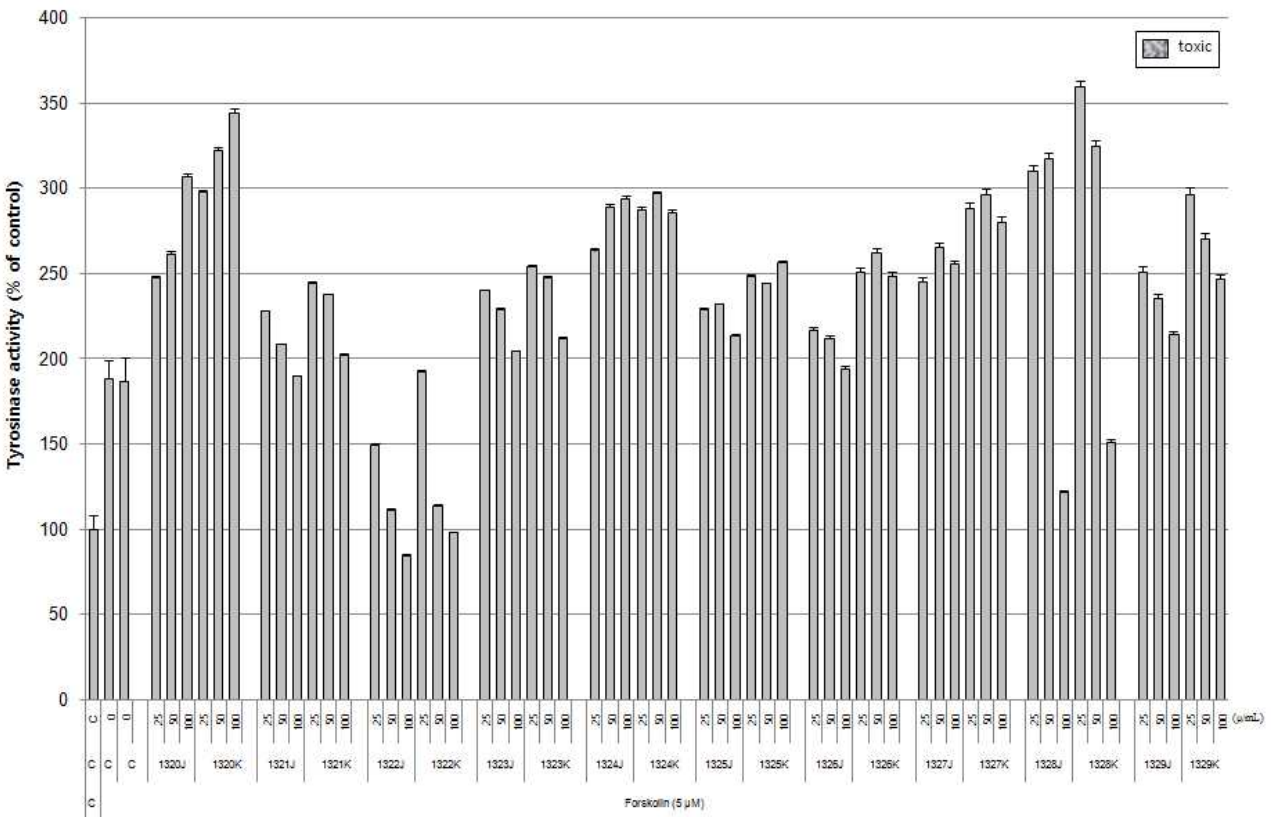
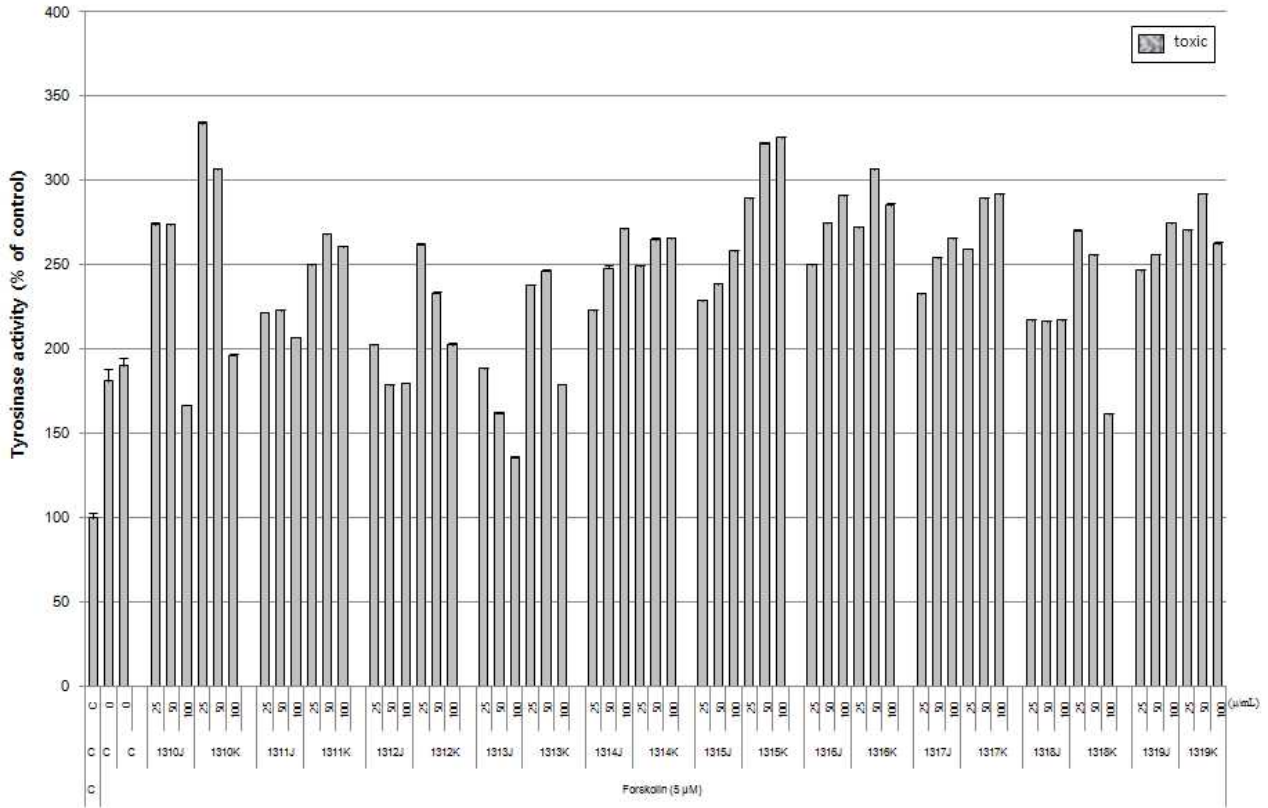


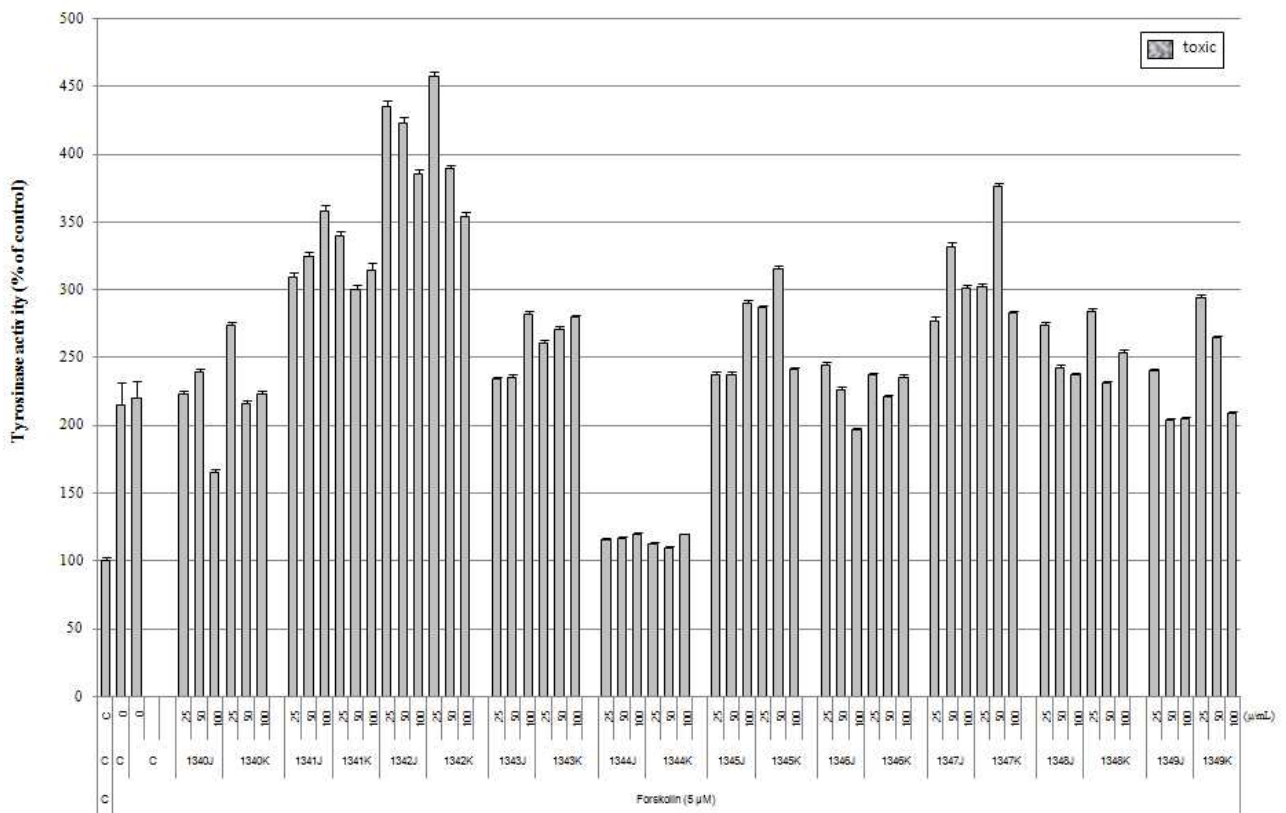
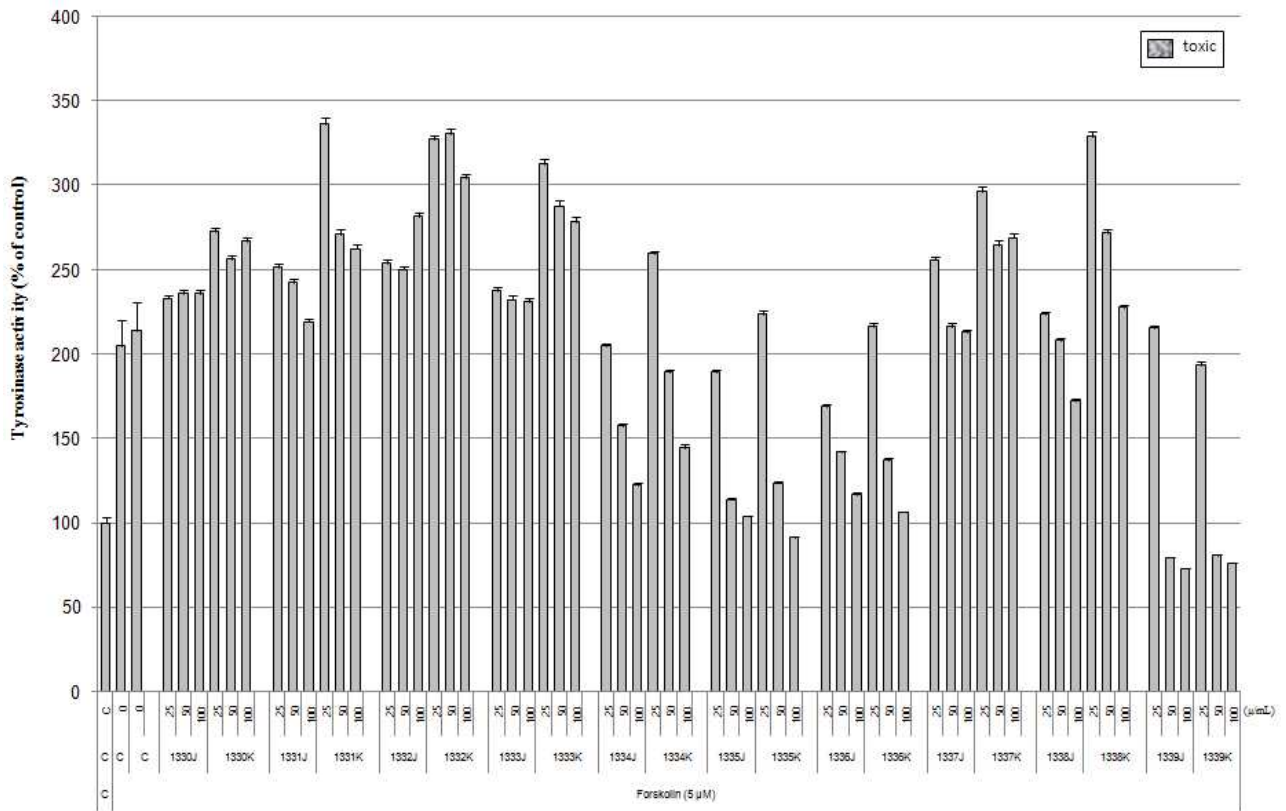


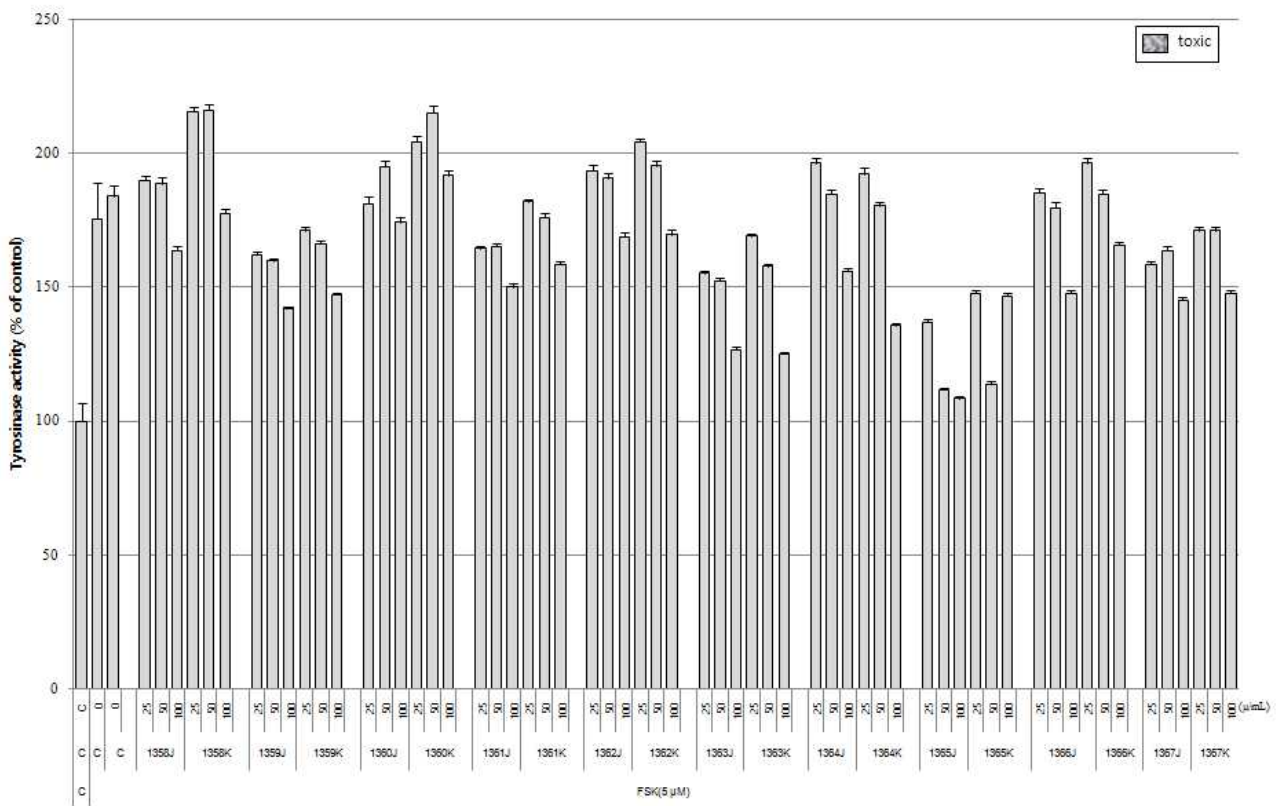
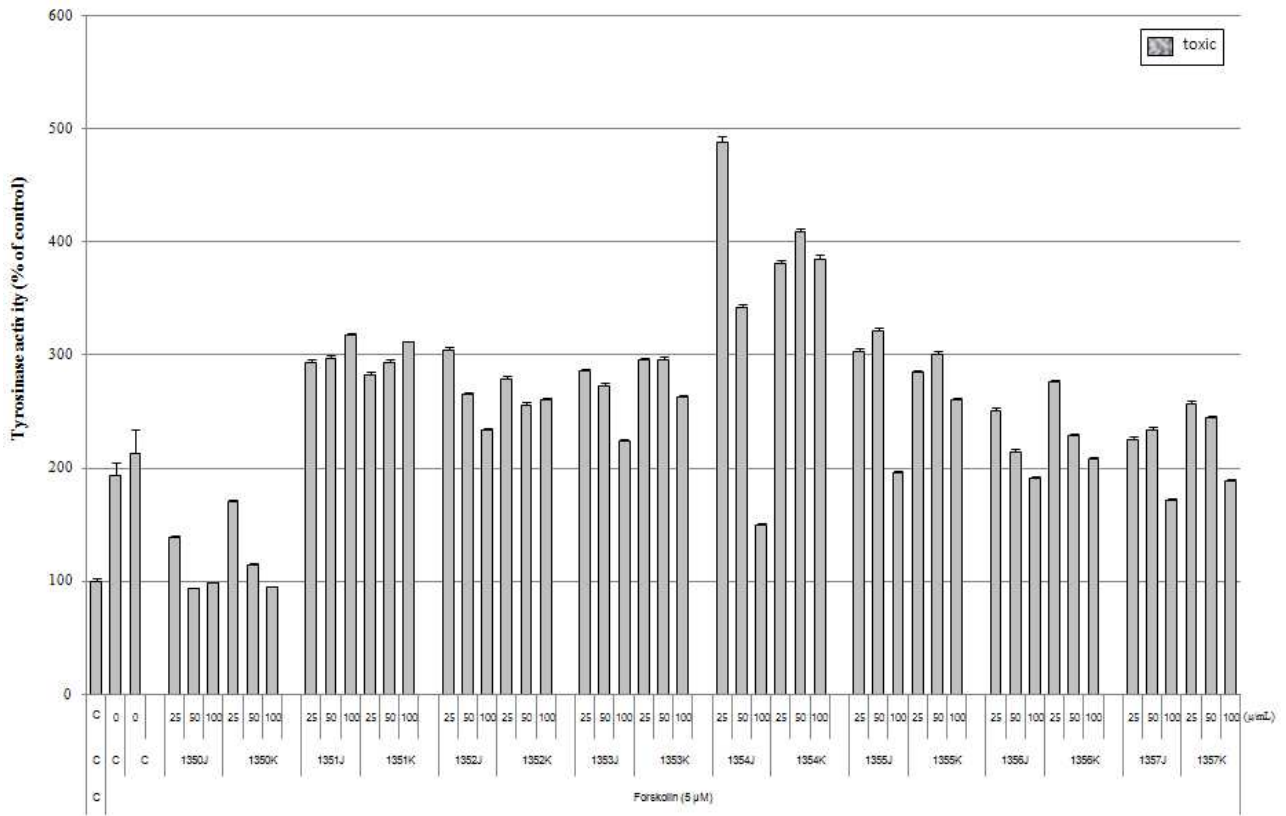


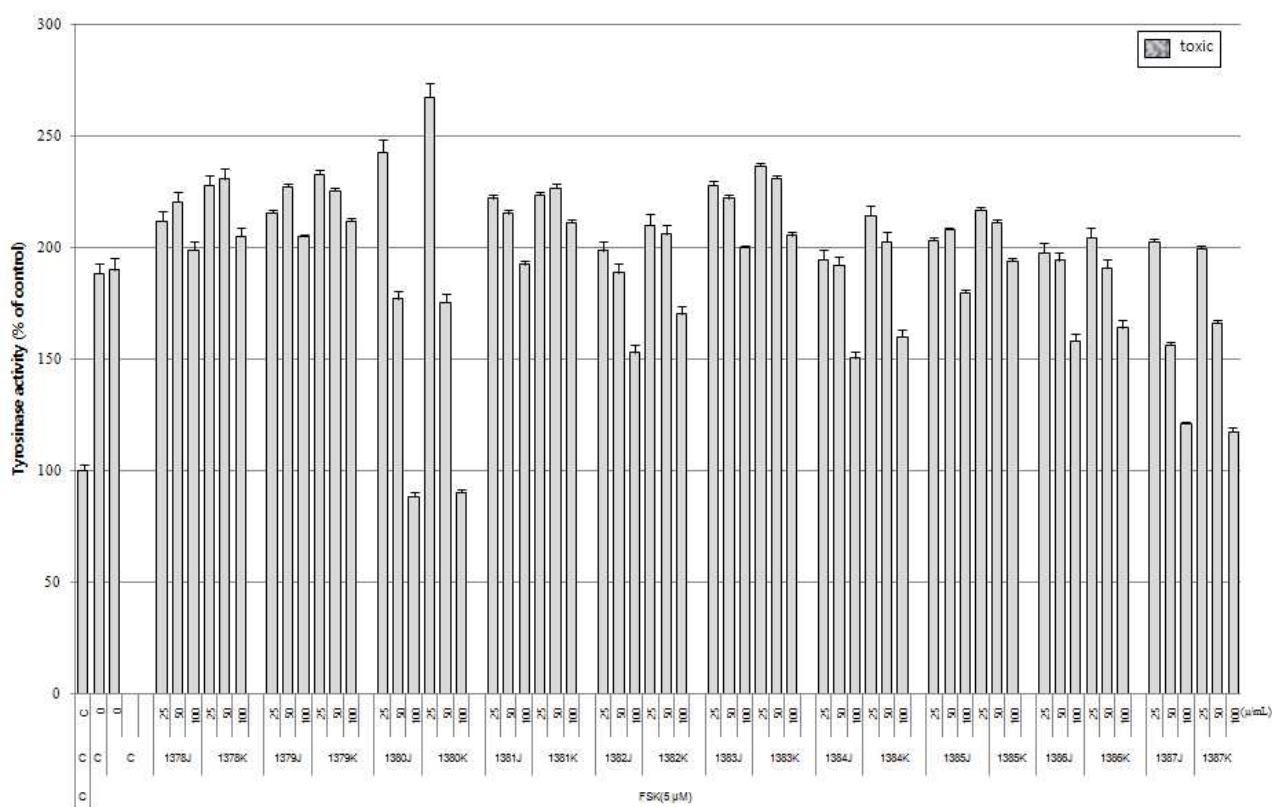
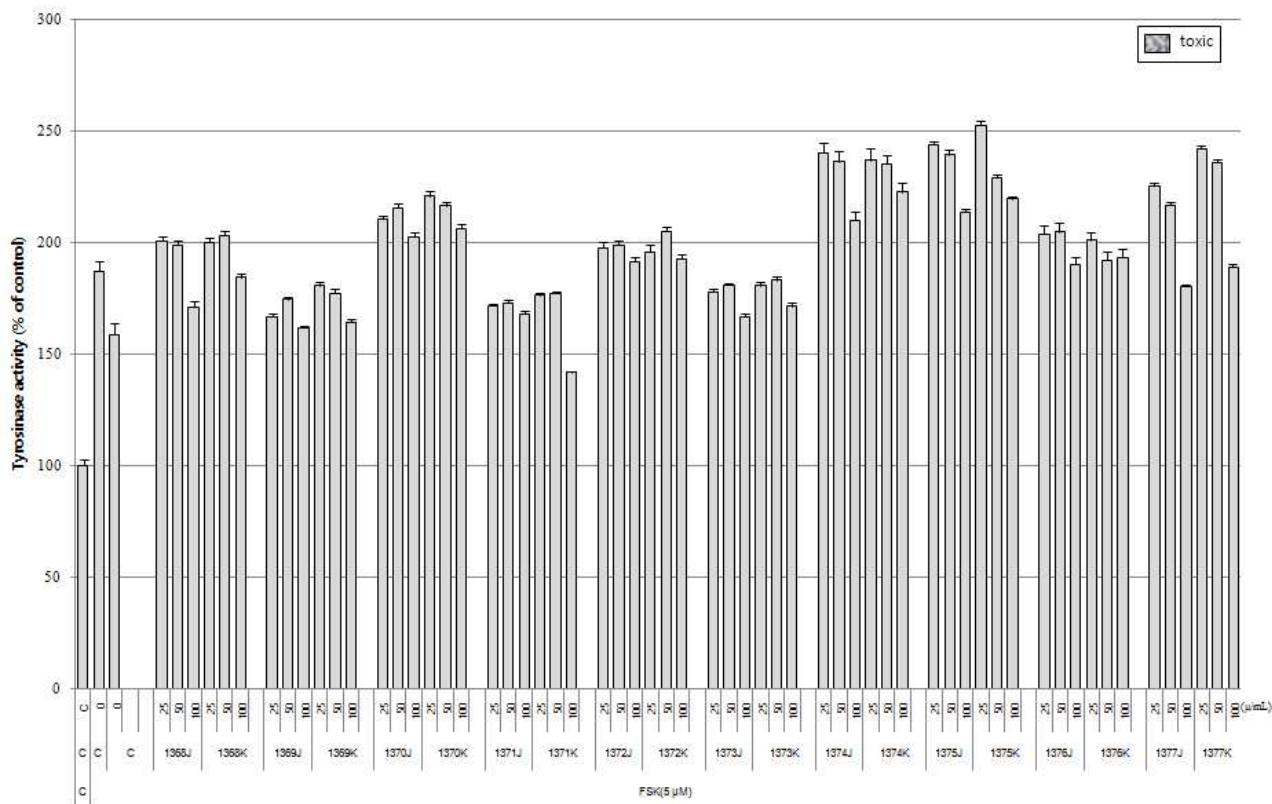


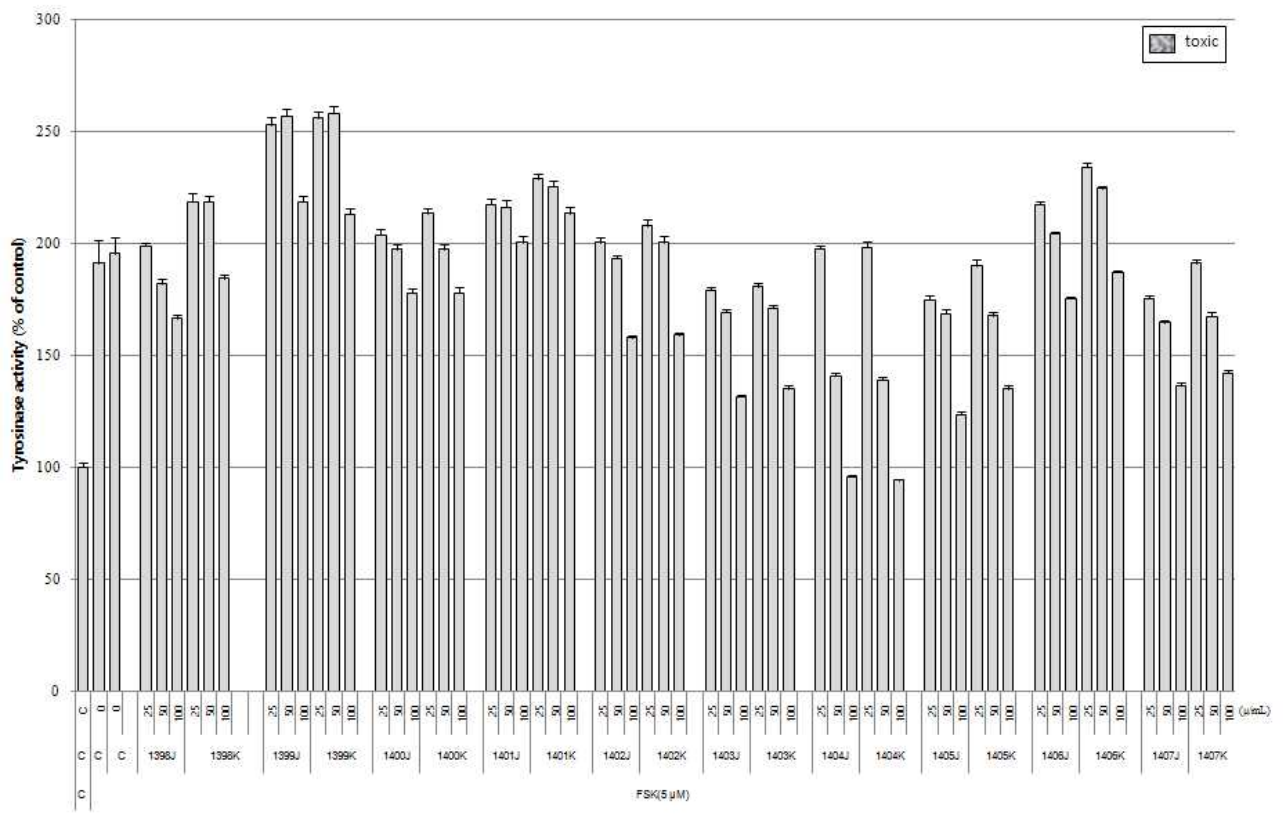
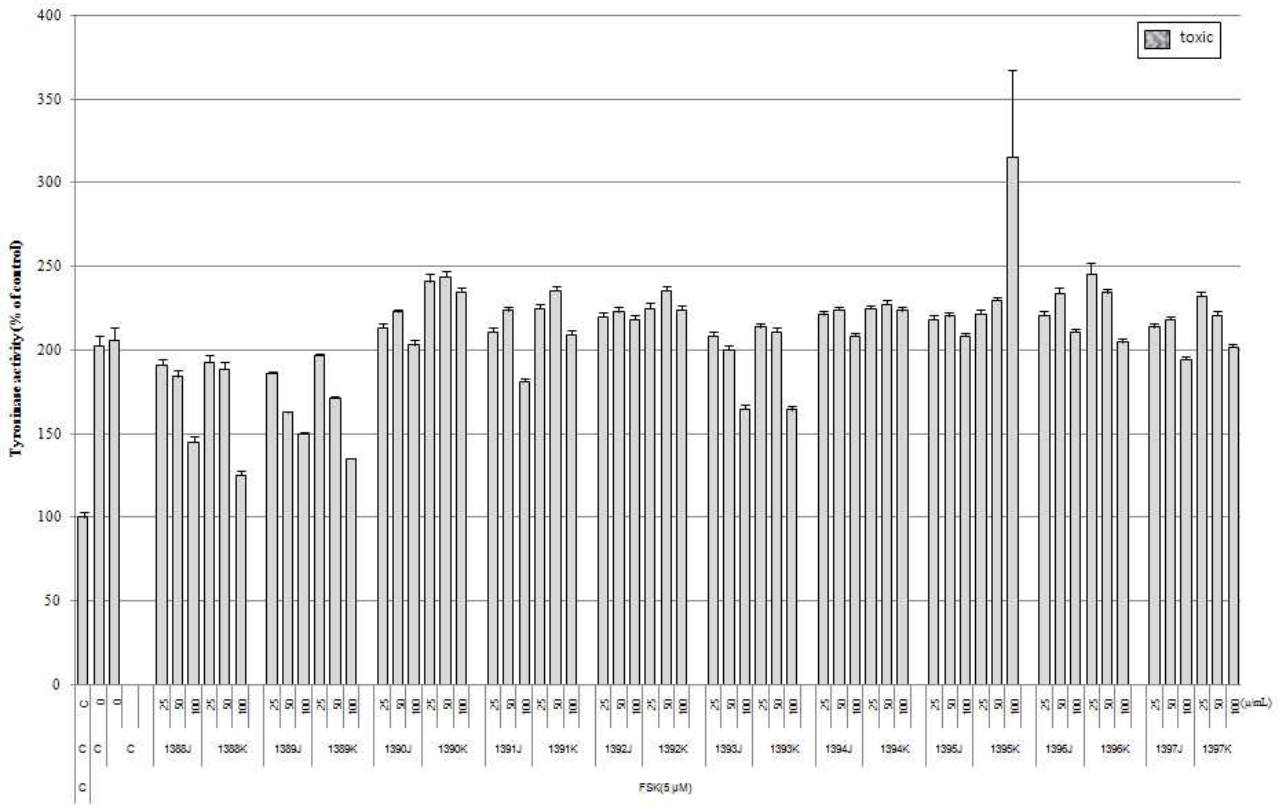


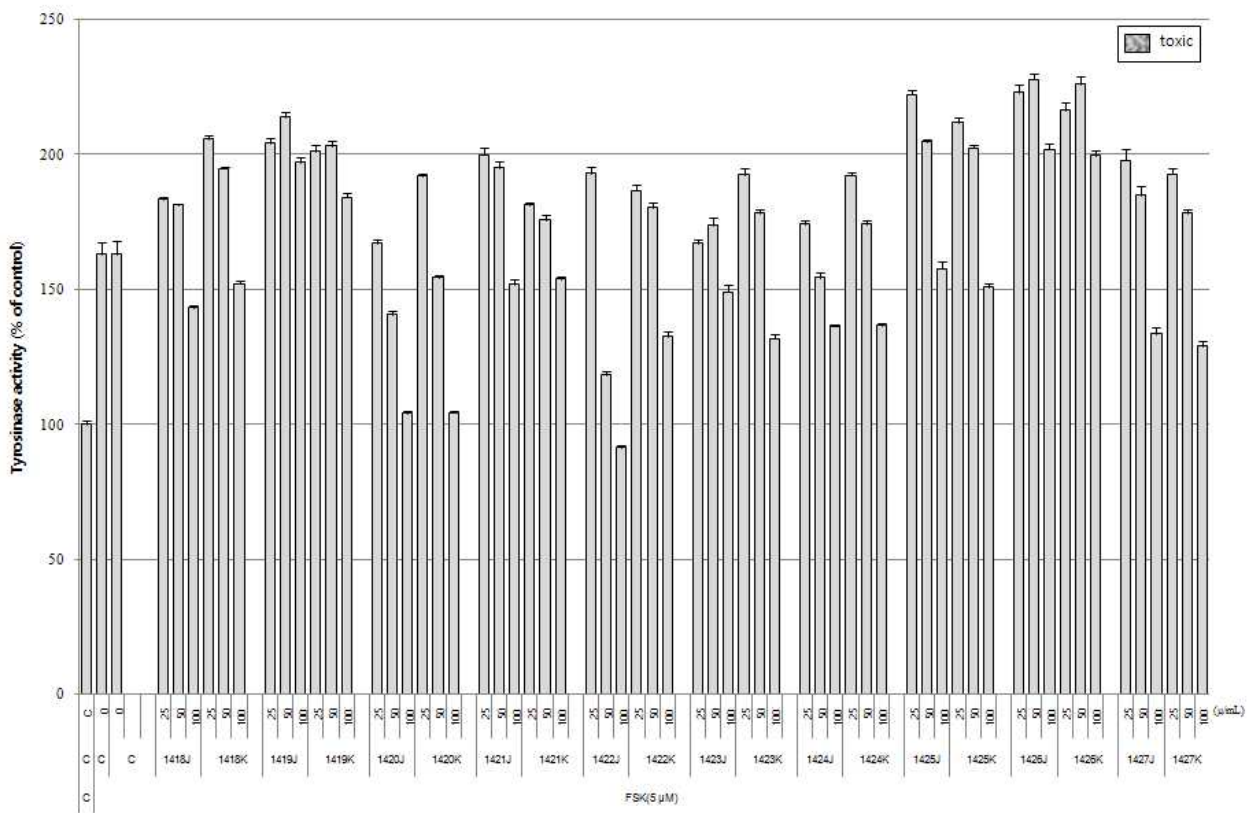
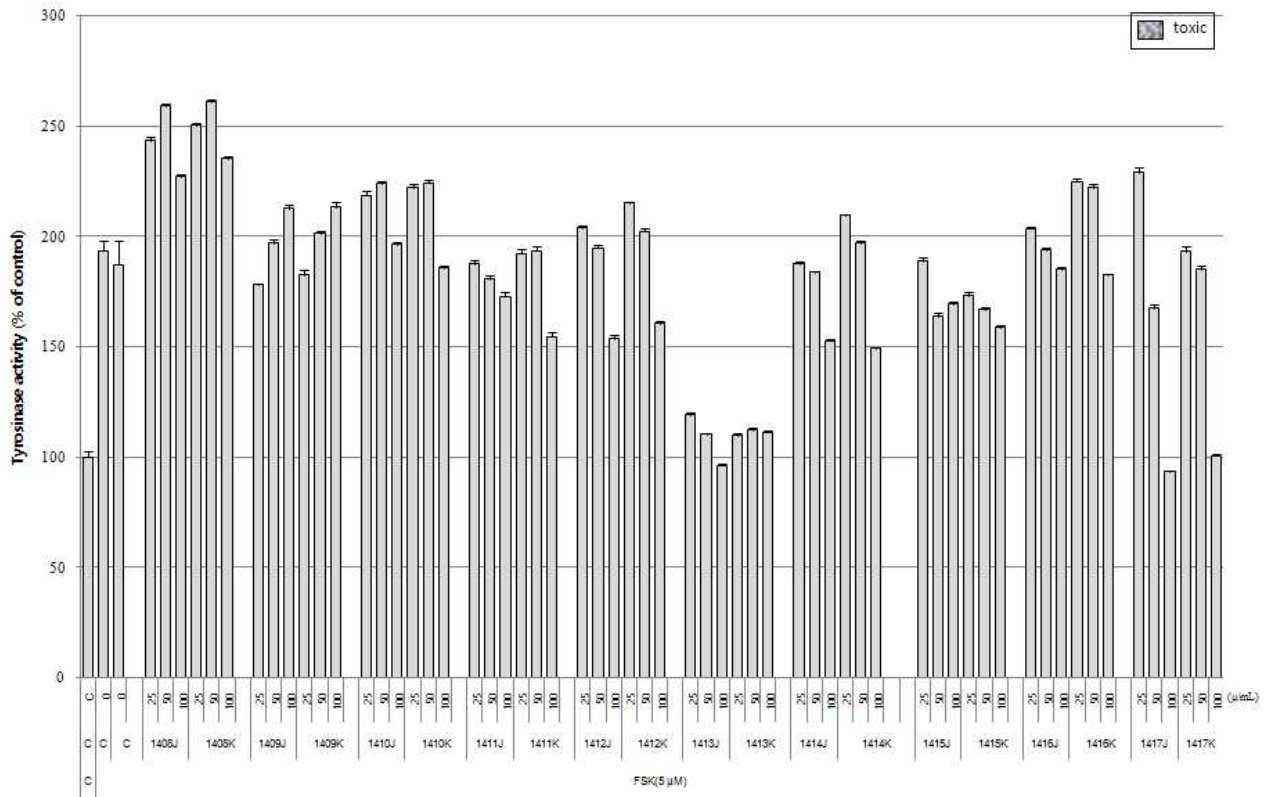




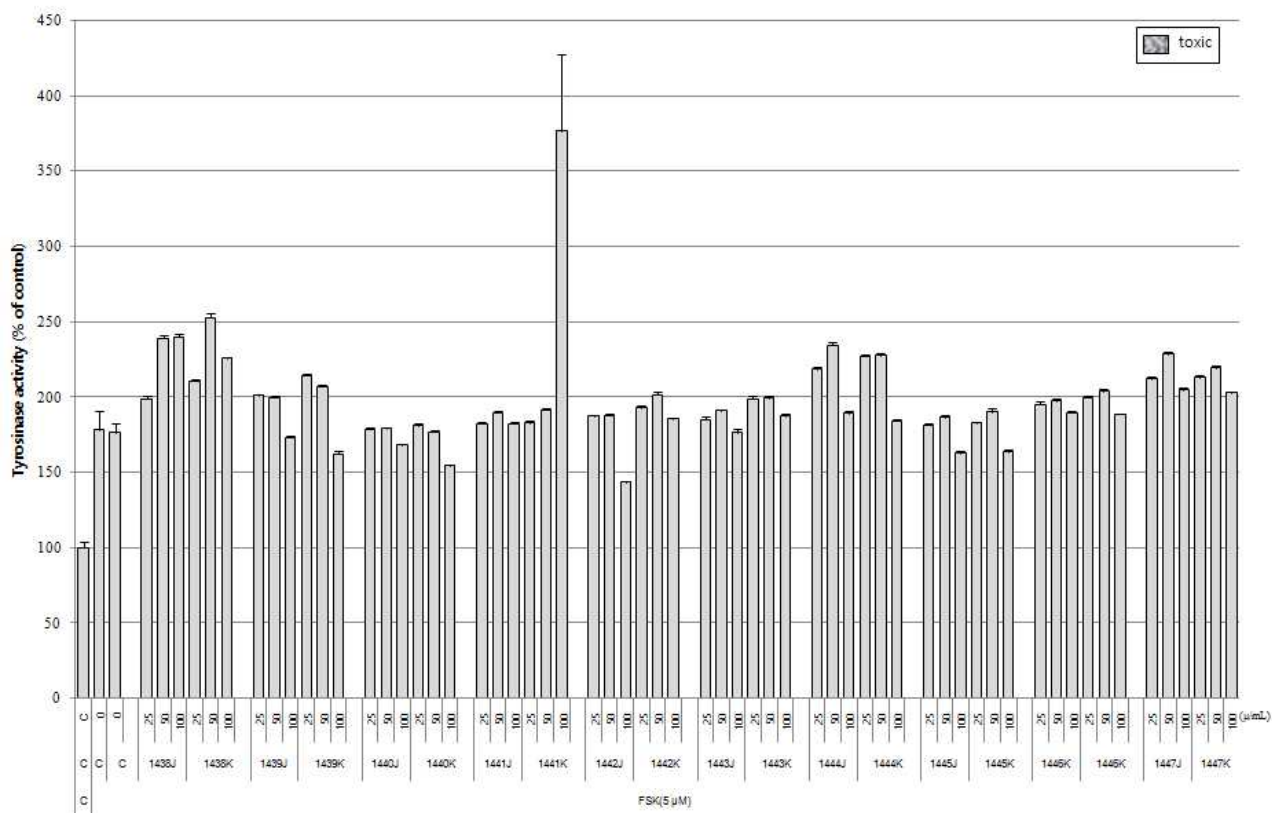
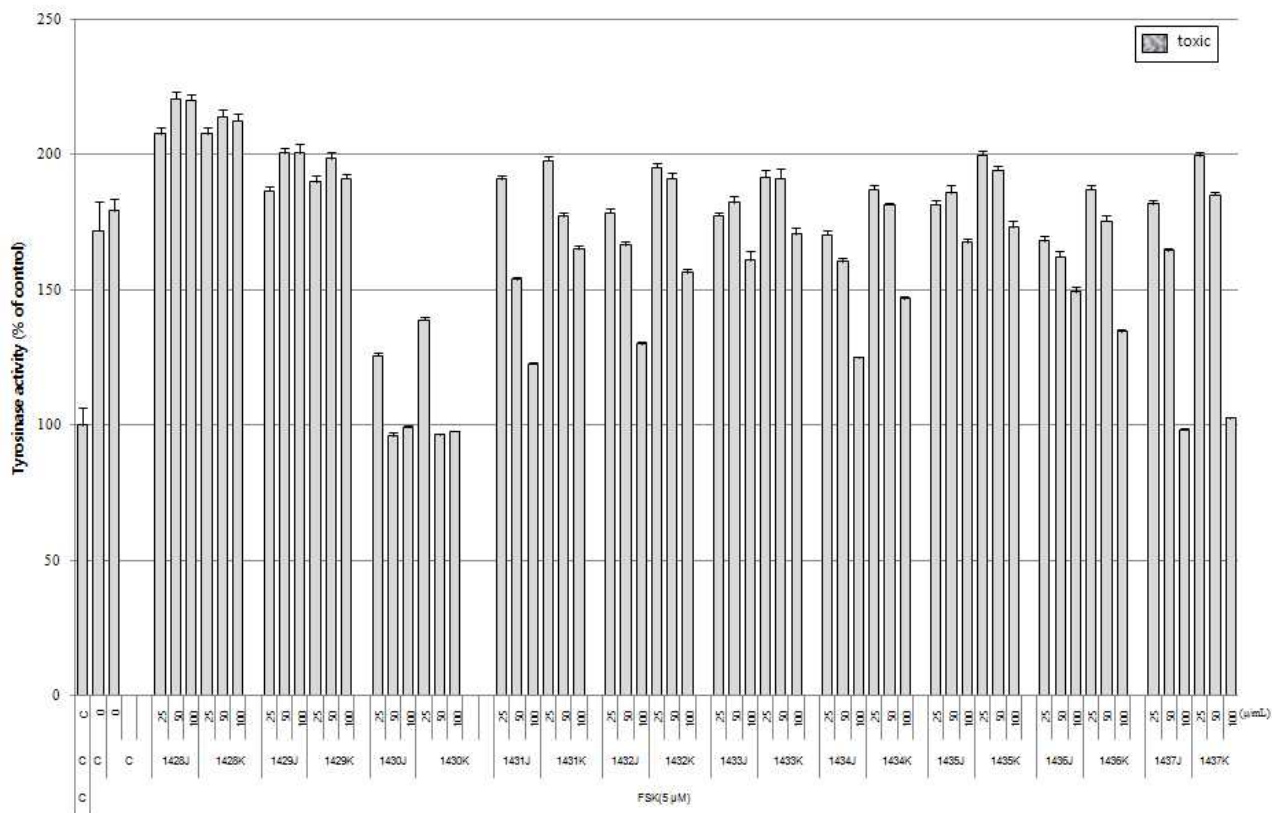












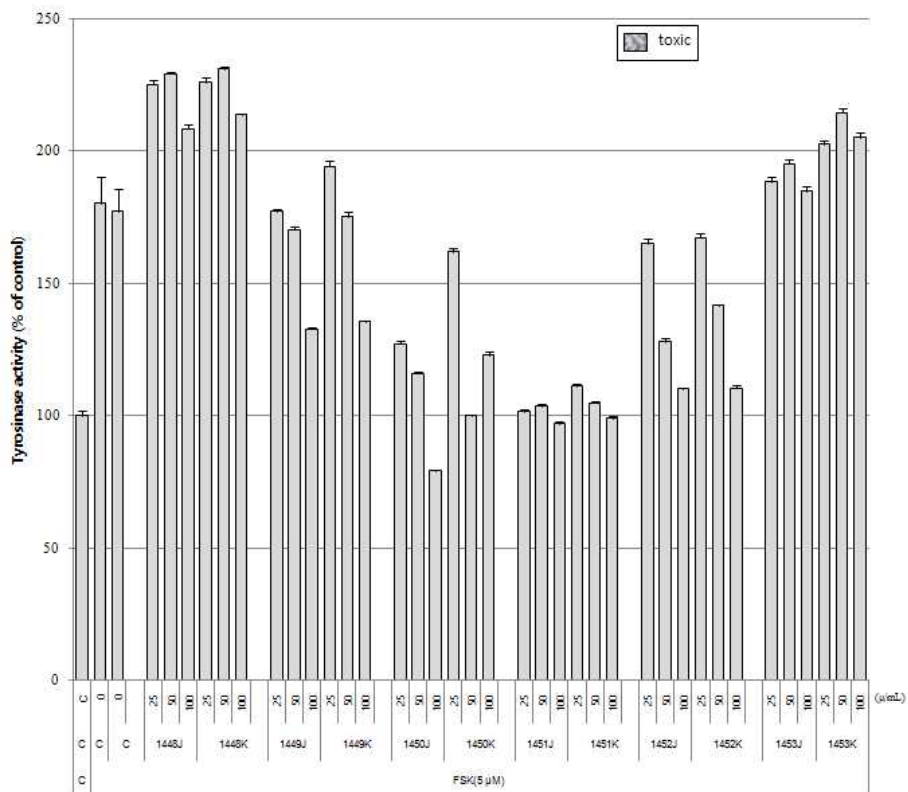


Figure 3. Effects of 384 medicinal plant extracts on forskolin-induced tyrosinase activity in B16F10 murine melanoma cells.

[1차 스크리닝 실험 주요 결과 요약 (1)]

연구내용: 384종 한방자원 및 7종 과일류에 대해 미백활성 평가

○ 과일류추출물 7종의 미백효능 평가 (Fig. 2.)

- 포도 : 농도별 (25, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ )에서는 forskolin에 의해 유도된 tyrosinase activity을 오히려 증가하는 것으로 나타남
- 베리류 (블루베리) : 저해능이 미약함.
- 특산물과일 (사과, 복분자, 밀감, 오디, 포도, 배) : 사과, 밀감, 오디, 포도, 배 : 농도별 (25, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ )에서는 forskolin에 의해 유도된 tyrosinase activity 저해능을 오히려 증가하는 것으로 나타남.
- 포도, 베리류, 특산물과일의 미백효능이 미미하여, 2차 스크리닝을 통해 고농도 (250, 500, 1000  $\mu\text{g/mL}$ )상에서의 저해능을 재확인하기로 함.

○ 한방자원 추출물 384종의 미백효능 평가

- 한방자원 추출물 384종의 미백효능 평가 :

1070(가자), 1071(가지), 1074(갈화), 1076(감송향), 1077(백반), 1078(건율), 1080(결명자), 1082(계지), 1084(고량강), 1085(고련피), 1086(감초), 1087(강향), 1088(강활), 1091(개자), 1094(고목), 1103(골쇄보), 1110(구척), 1125(구아바잎), 1129(급성자), 1130(길경), 1131(남정목), 1132(내복), 1133(내복자), 1135(노박덩굴), 1136(노박열매), 1142(다릅나무), 1145(단삼), 1146(달맞이꽃씨), 1149(영양각), 1159(목과), 1184(마황근), 1196(백화사설초), 1199(방기), 1220(백전), 1221(백지), 1235(비해), 1264(시라자), 1276(여주), 1277(연교), 1313(은행엽), 1332(위령선), 1334(정류), 1335(정향), 1336(정향피), 1339(조협), 1344(백미), 1350(마름열매), 1365(지유), 1380(천련자), 1387(합환피), 1389(해당근), 1403(황련), 1404(칠피), 1405(칠해목), 1413(과두), 1417(패장근), 1420(현초), 1422(혈갈), 1424(호도육), 1430(소백피), 1431(수오등), 1450(천초근), 1451(감수), 1452 (개머루덩굴) (총64종)에서 forskoin에 의해 유도된 tyrosinase activity를 저해함을 확인하였음.

- 선정된 64종 시료를 2차 스크리닝을 통해 저해능이 농도의존적으로 유지되는지 재확인 시도함 (Fig. 3).

- 한방자원 생물전환 시료는 생물전환전 시료와 비료해 볼 때, tyrosinase activity 저해능 상에서 미미한 차이를 나타냄 (Fig. 3).

○ 따라서, 1차 스크리닝 결과 선별된, 65종의 한약재의 생물전환전과 후의 활성차이를 2차 스크리닝을 통해 재탐색함.

## 2) 2차 스크리닝

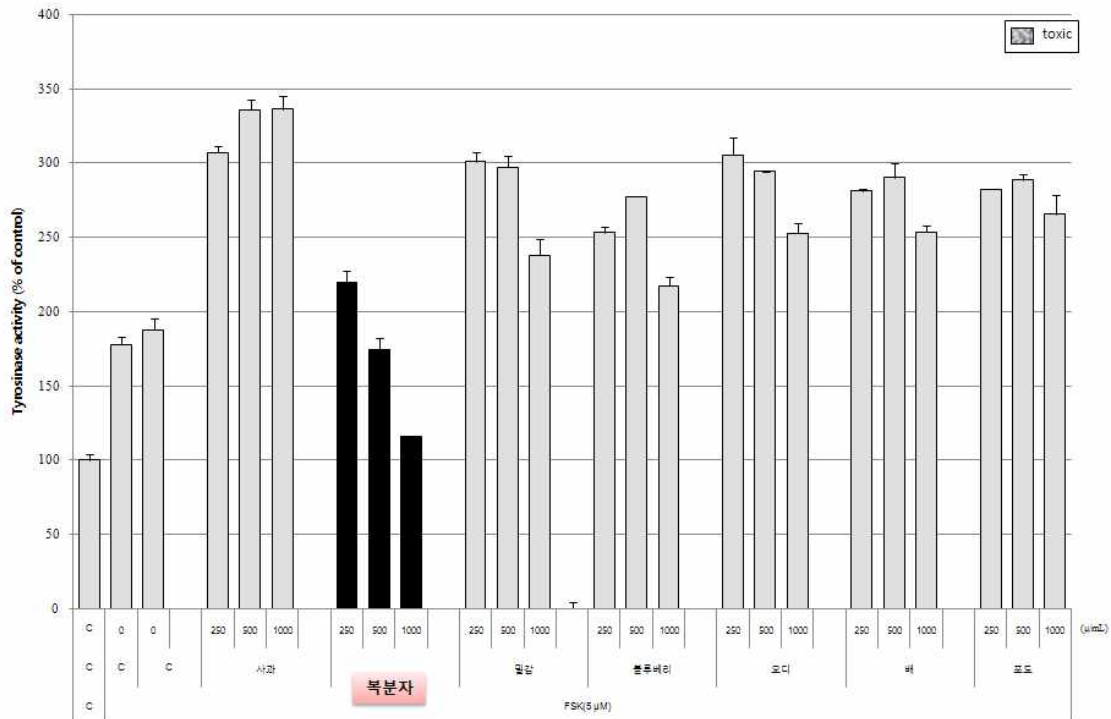
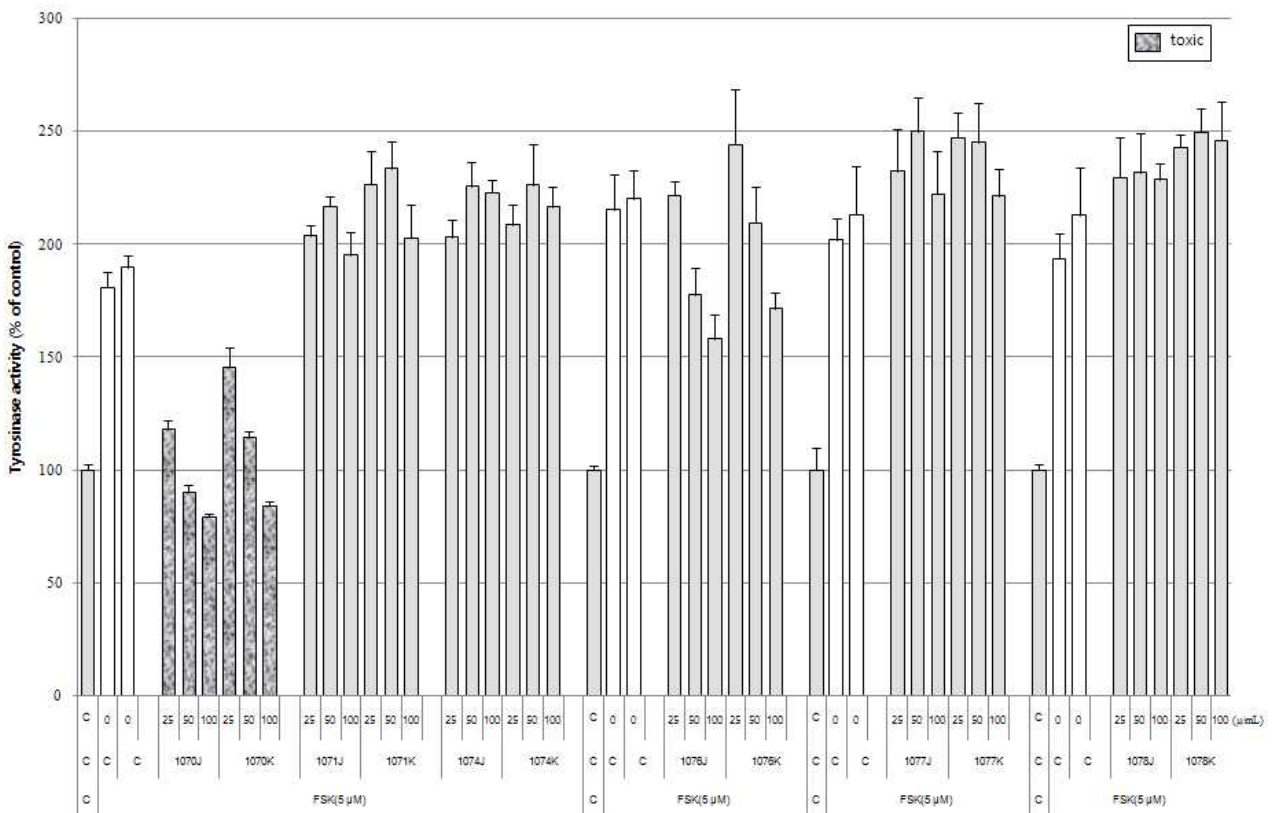
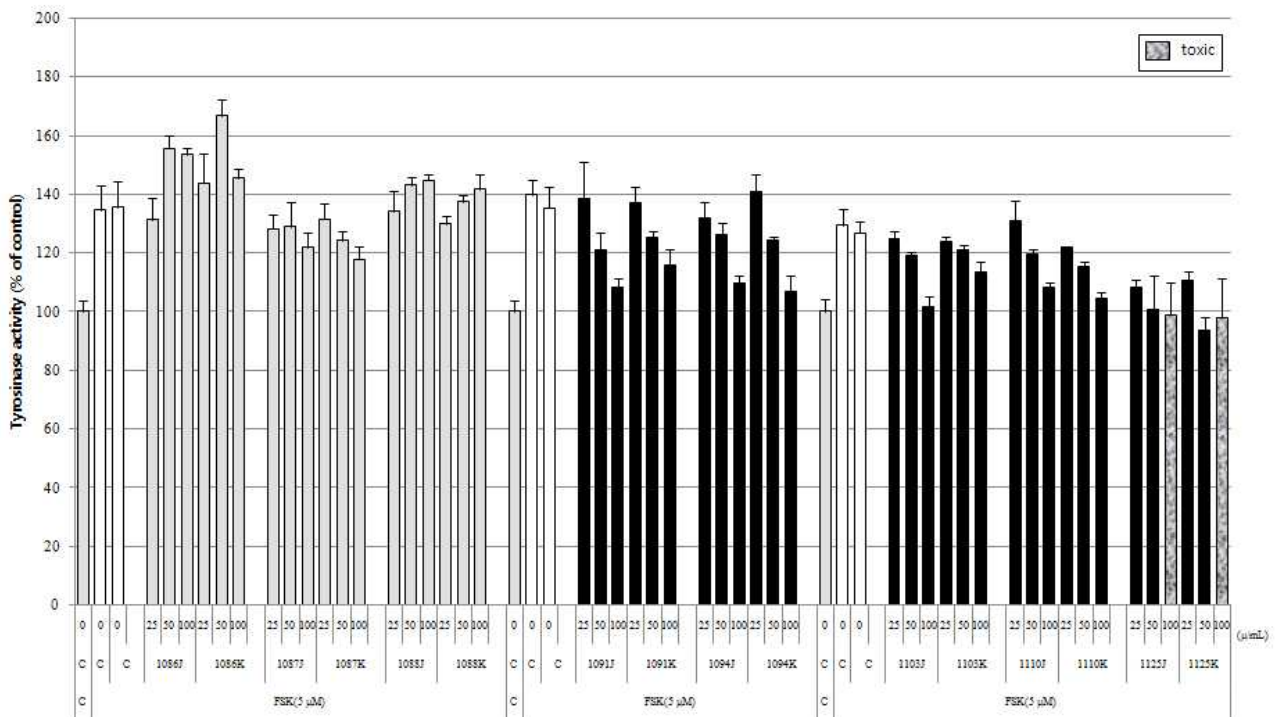
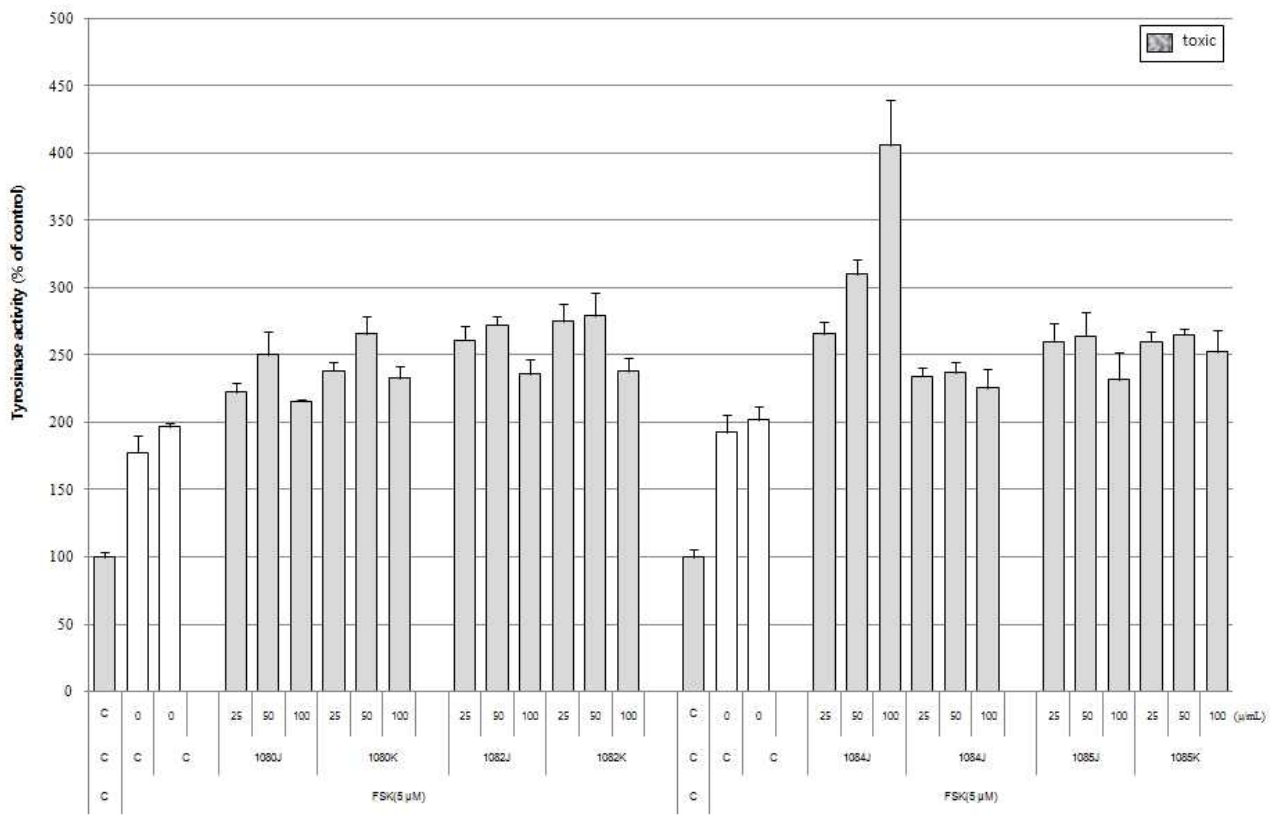


Figure 4. Effects of 7 fruits extracts on forskolin-induced tyrosinase activity in B16F10 murine melanoma cells.





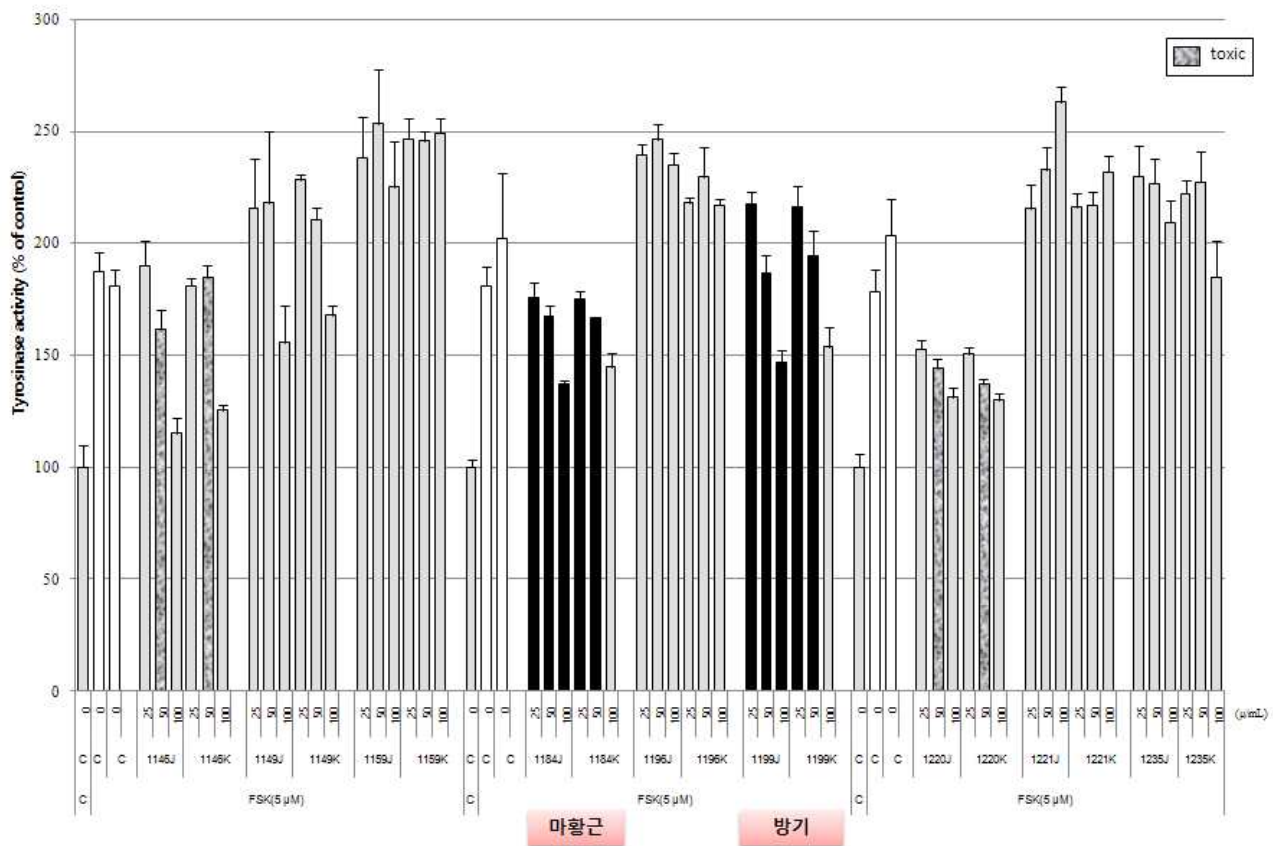
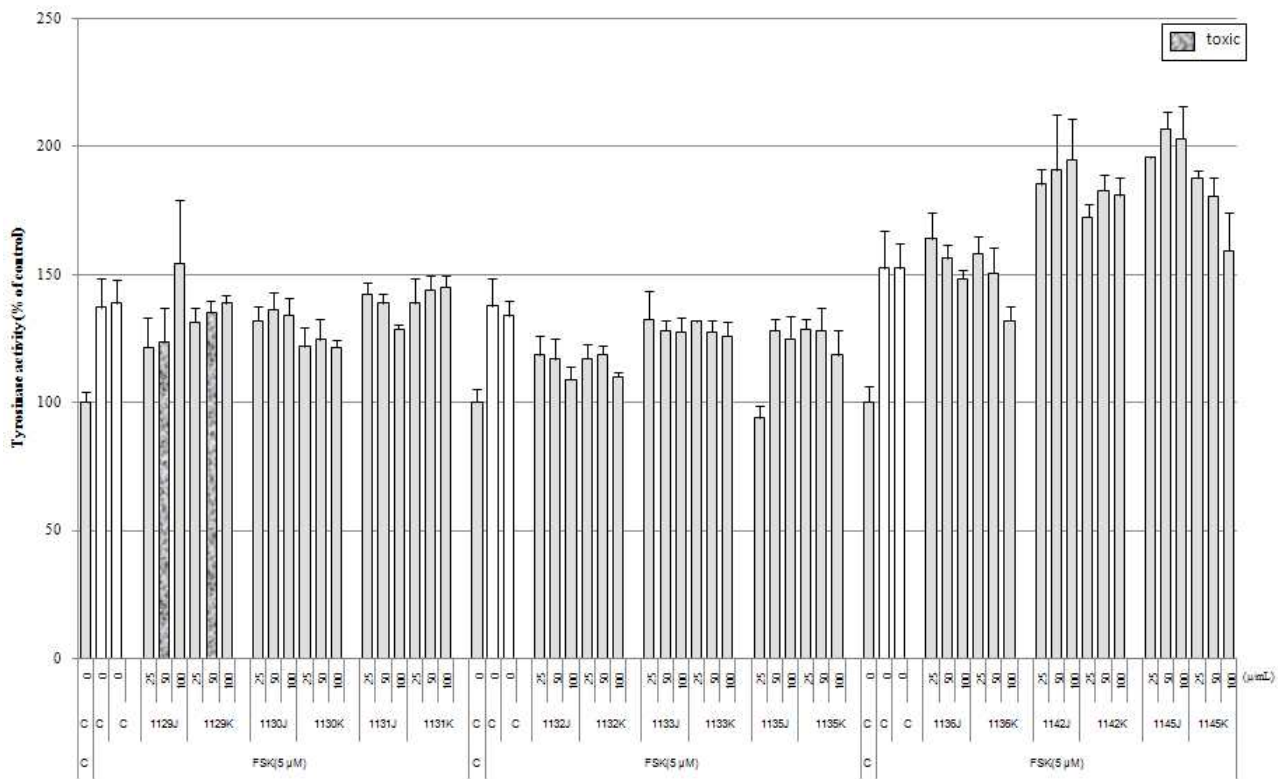
**개자**  
겨자  
갯의 씨

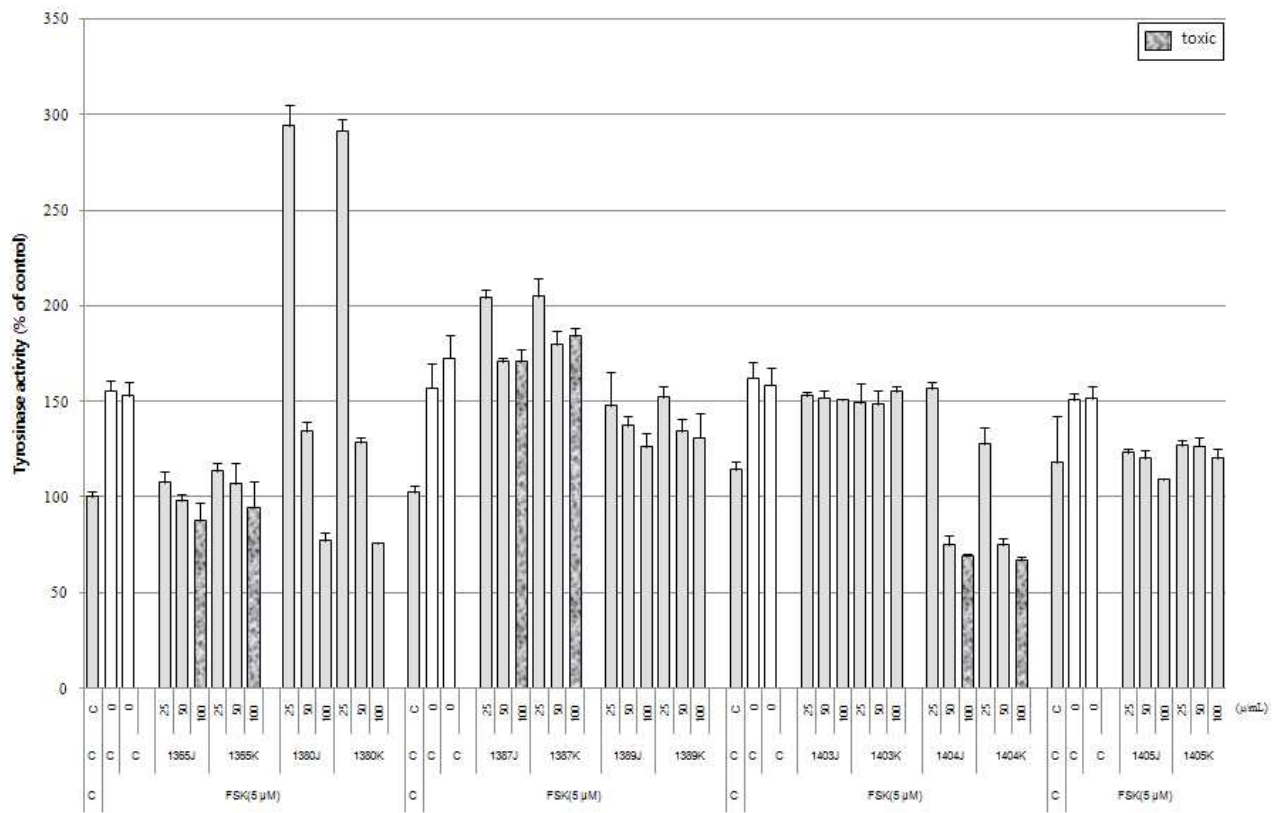
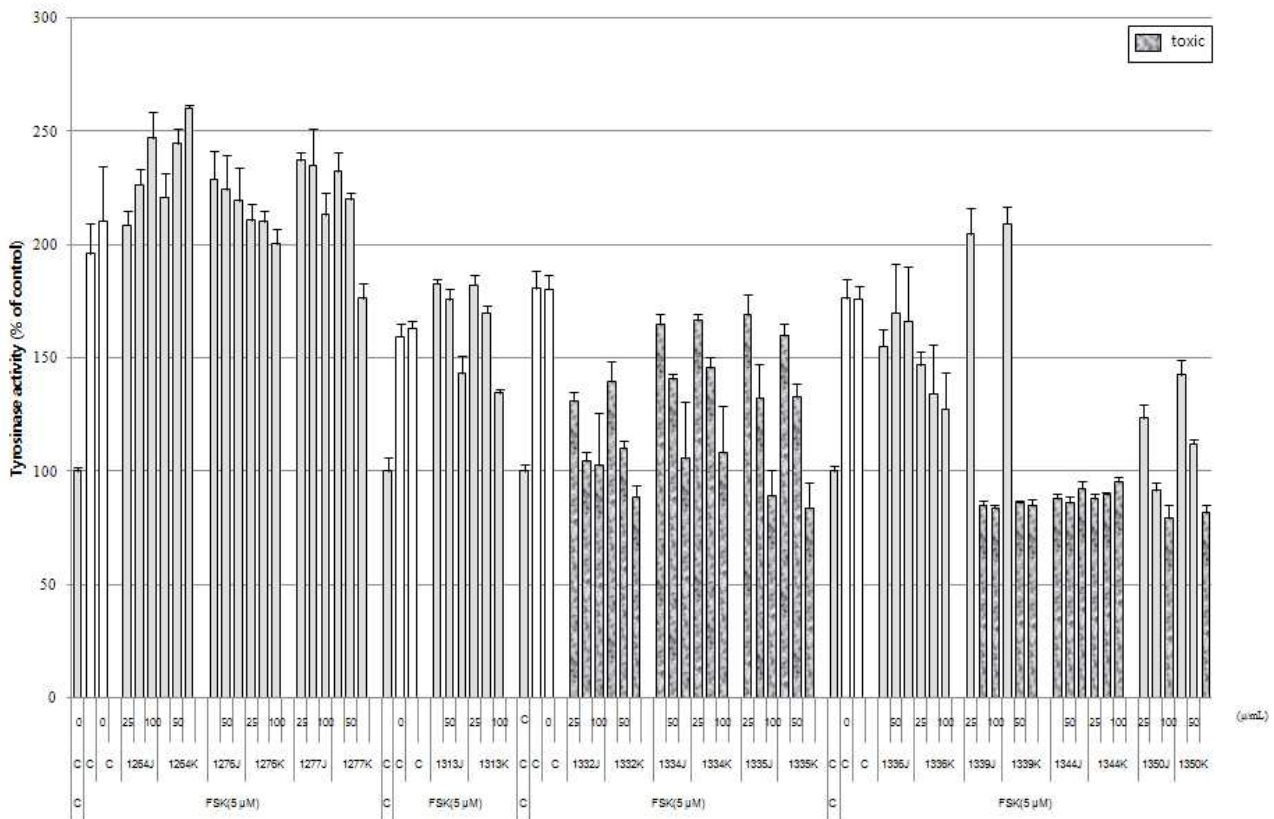
**고목**  
소태나무

**골쇄보**

**구척**

**구아바잎**





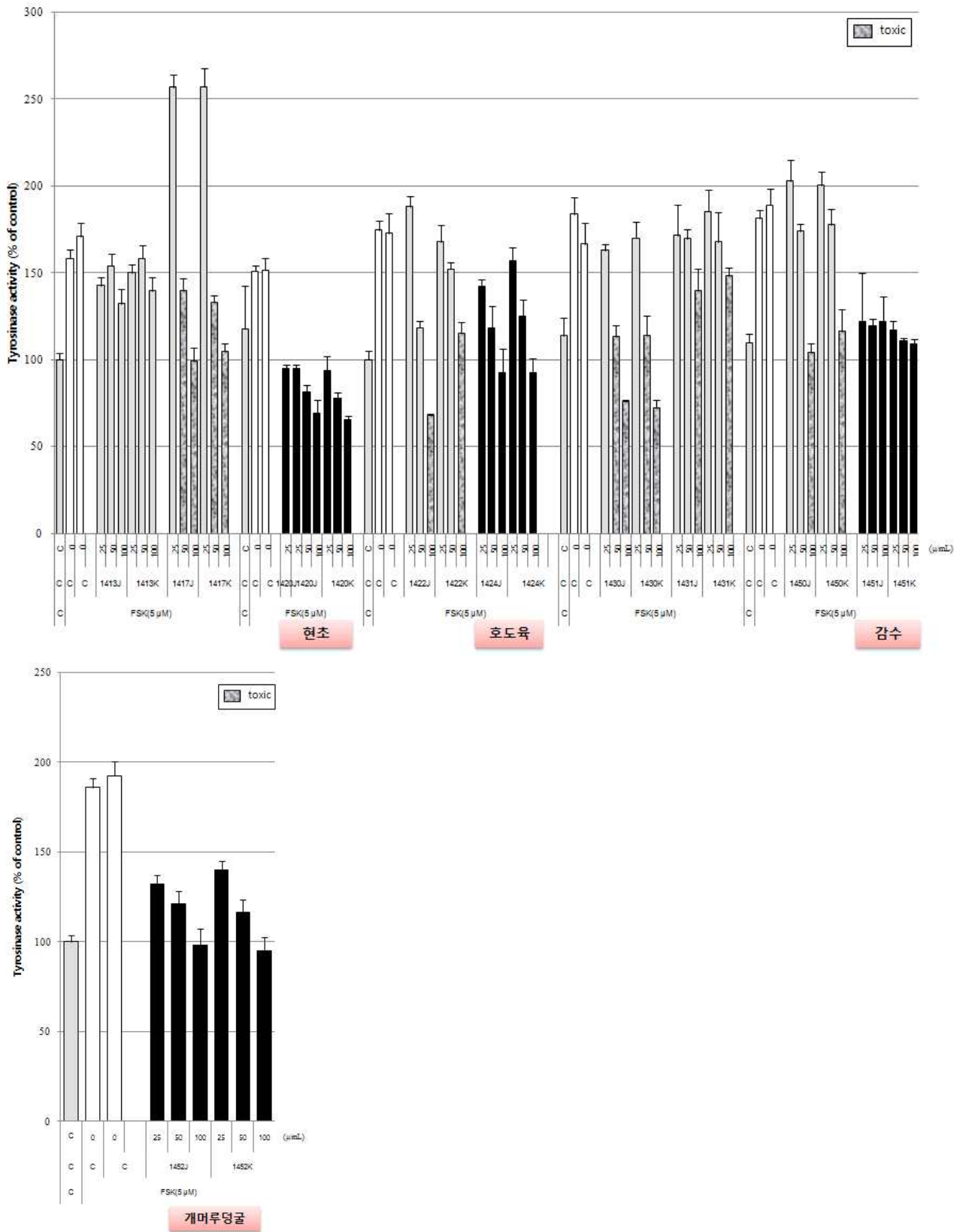


Figure 5. Effects of selected 65 medicinal plant extracts on forskolin-induced tyrosinase activity in B16F10 murine melanoma cells.



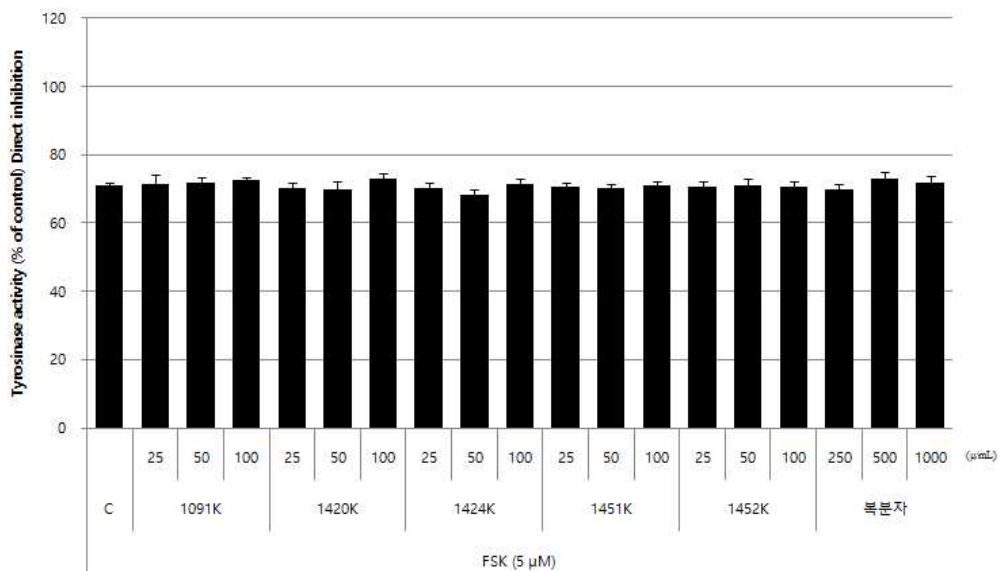
[2차 스크리닝 실험 주요 결과 요약 (2)]

<p><b>연구내용:</b> 과일류추출물 7종 및 한방자원 추출물 65종의 미백효능 평가 (Fig. 4)</p> <p>○ 1차 스크리닝시 사용한 농도보다 높은 농도 (250, 500, 1000 µg/mL)에서 tyrosinase activity 저해능을 재확인 시도함.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>·포도 : 고농도별 (250, 500, 1000 µg/mL)에서도 forskolin에 의해 유도된 tyrosinase activity 저해능이 나타나지 않고, 오히려 tyrosinase activity를 증가시키는 것으로 나타남.</li> <li>·베리류 (블루베리) : 고농도별 (250, 500, 1000 µg/mL)에서도 forskolin에 의해 유도된 tyrosinase activity 저해능이 나타나지 않고, 오히려 tyrosinase activity를 증가시키는 것으로 나타남.</li> <li>·특산물과일 (사과, 복분자, 밀감, 오디, 포도, 배) : 사과, 밀감, 오디, 배는 forskolin에 의해 유도된 tyrosinase activity를 저해하지 않고, 오히려 증가시키는 경향을 나타냄. 반면, 복분자는 500과 1000 µg/mL에서 forskolin에 의해 유도된 tyrosinase activity를 7.1, 38.2% 각각 저해하는 것으로 나타남.</li> </ul> <p>○ 한방자원 추출물 64종의 미백효능 평가 (Fig. 5.)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>·한방자원 : 1차 스크리닝 결과 선별된 65종의 한방자원 중, 1091 (개자), 고목 (1094), 골쇄보 (1103), 구척 (1110), 구아바잎 (1125), 마황근 (1184), 방기 (1199), 현초 (1420), 호도육 (1424), 감수 (1451), 개머루덩굴 (1452)의 총 11종 한약재 추출물에서 tyrosinase activity 저해능을 확인함. 이러한 효과는 농도의존적 저해임을 재확인함.</li> </ul> <p>○ 이들 중, 기존연구에서 미백활성이 밝혀져 있는 일부 한약재 (1091 (개자), 고목 (1094), 골쇄보 (1103), 구척 (1110), 구아바잎 (1125), 마황근 (1184), 방기 (1199)를 제외한 <b>총 6종의 추출물 1091(개자), 1420 (현초), 1424 (호도육), 1451 (감수), 1452 (개머루동굴), 복분자)을 선정하여</b> 미백관련 작용기전을 평가하기로 함.</p>
---

### 3-3. 활성 소재의 미백 관련 작용 기전 규명

#### 3-3-1. Tyrosinase의 직접적 저해능 여부 평가

- Basal level의 tyrosinase activity를 직접적으로 저해하는 후보소재의 경우, hypopigmentation을 유도할 수 있는 부작용이 있다는 점에 착안하여, tyrosinase의 직접적 저해능 여부 평가함.
- 연구방법 : B16F10 cell을 serum free 배지에서 forskolin으로 24 h 처리한 후, Triton x-100 lysis buffer를 이용해 lysis 한 후, 원심분리 (10,000 RPM, 20 min)함. Lysate (tyrosinase 함유)를 시료 농도별로 37℃에서 1 h 반응시킨 후, tyrosinase에 의해 생성된 DOPA chrome은 475 nm에서 흡광도를 측정하였음.



**Figure 6. Effects of selected 5 medicinal plant extracts and 1 fruits extracts on forskolin-induced tyrosinase activity in B16F10 murine melanoma cells.**

#### ○ 결과 :

선정된 6종의 추출물들 모두 forskolin에 의해 유도된 tyrosinase activity를 직접적으로 저해하지 않는 것으로 나타남. 따라서, 각 추출물들은 tyrosinase activity의 basal level에는 영향을 주지 않으므로 hypopigmentation 유도과 같은 부작용 우려는 없을 것으로 판단됨 (Fig. 6).

#### 3-3-2. 추출물의 독성평가

- 시료의 tyrosinase 효능이 세포독성으로 인한 저해능에서 유래한 것인지 확인하기 위하여, 세포독성평가를 실시함.
- 연구방법 : 세포를 serum free 배지상에서 각 시료를 농도별로 처리하여 24 h 배양후, MTT test를 실시함.
- 결과:  
6종의 추출물은 모두 control과 비교하여 유의적으로 세포독성을 유도하지 않는 것으로 나타남

(Fig. 7).

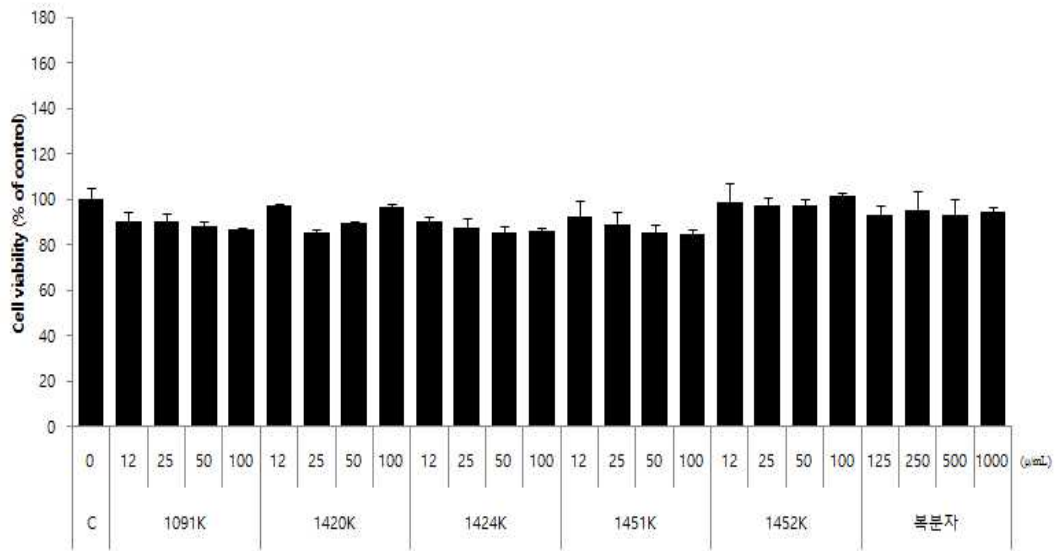


Figure 7. Effects of selected 5 medicinal plant extracts and 1 fruits extracts on cell viability.

### 3-3-3. Melanogenesis 관련 signaling pathway 상에 미치는 영향 평가

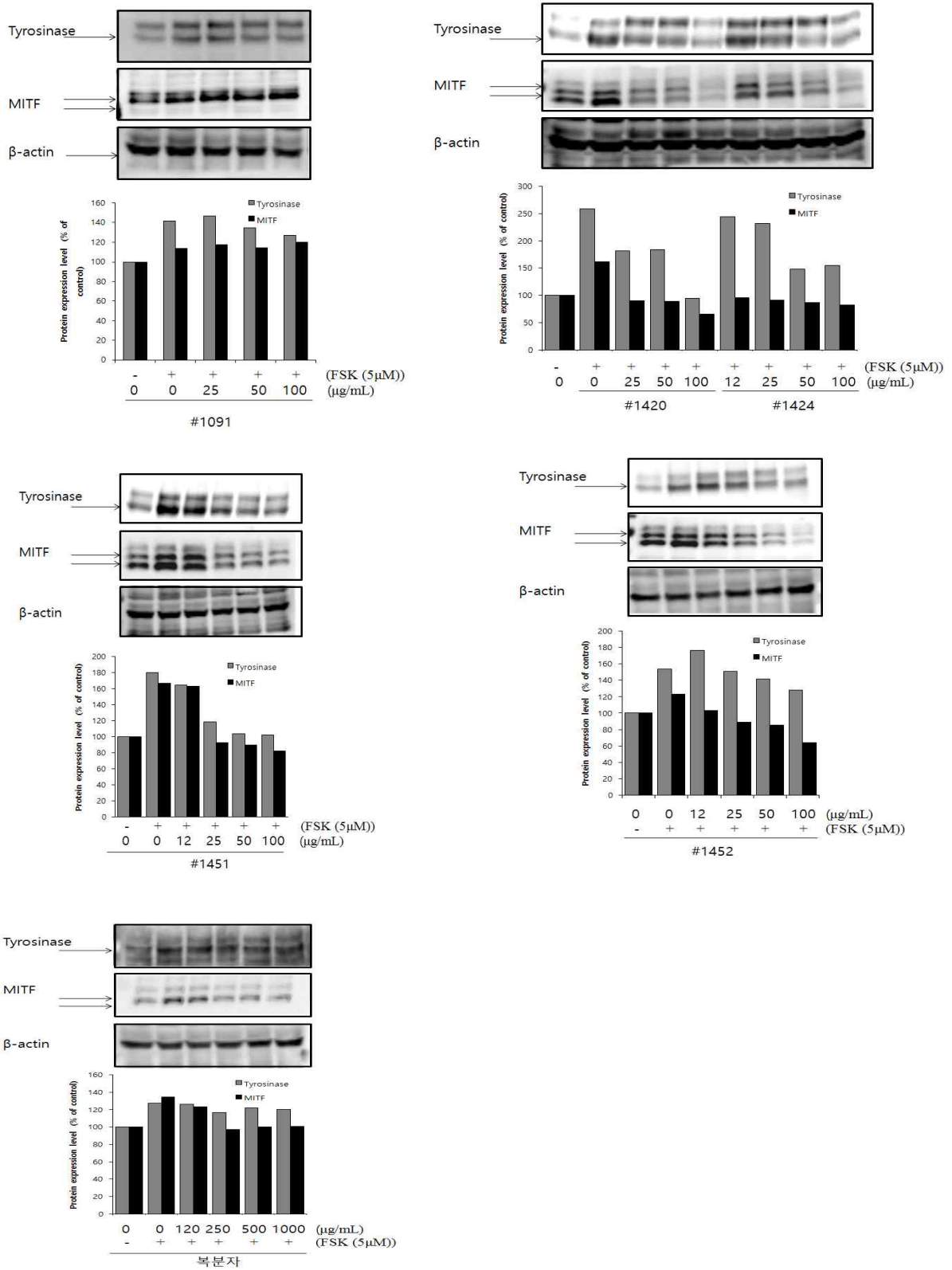


Figure 8. Effects of medicinal plant extracts and fruits extracts on forskolin-induced melanogenic protein expression in B16F10 murine melanoma cells.

○ Forskolin에 의해 유도된 tyrosinase activity를 저해하는 시료가 실제로 melanogenesis관련 신호전달경로 관련된 단백질 발현률에 영향을 미치는지를 조사함.

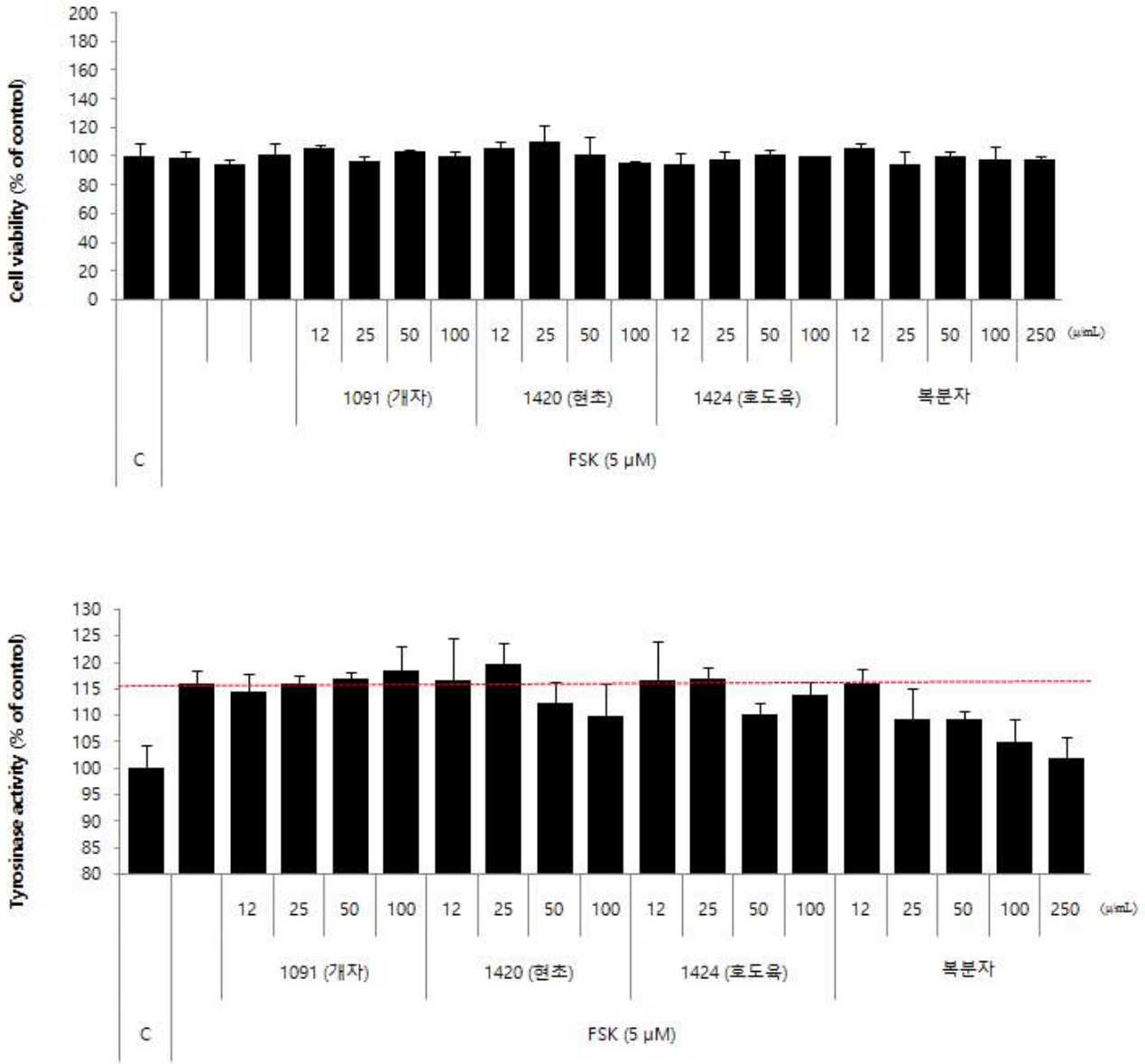
○ 연구방법 (Western blotting) : Serum free 배지에 시료와 ice-cold PBS로 세척, 수거한 후, lysis buffer( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  50 mM, NaF 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  2 mM, HEPES 10 mM, and PMSF 1 mM)를 이용해 단백질을 분리하고, 14,000g에서 10 min동안 원심분리한 후, Laemmli buffer를 이용해 95°C에서 5분간 denaturation시킴. 10% SDS-polyacrylamide gel을 이용해 200 V에서 1시간 동안 전기영동을 실시하고, nitrocellulose membranes(Amersham Biosciences, Freiburg, Germany)으로 transfer하고, membrane은 antibody와 incubation 한 후 chemiluminescence kit(Pierce, Waltham, MA, USA)를 이용해 exposure시킨 후, densitometry analysis를 이용해 band 정량함.

○ 결과

6종의 추출물의 melanogenesis 관련 signaling pathway에서 tyrosinase expression과 MITF expression의 영향을 살펴본 결과, 1091, 1040, 1042, 1451, 1452는 농도의존적으로 forskolin에 의해 유도된 tyrosinase와 MITF expression을 저해하는 것으로 나타남 (Fig. 8). 1091의 경우, tyrosinase expression에서는 저해효능을 나타내나, MITF expression에서는 그 저해효과가 미미하였고, 복분자 또한 MITF expression 상에서는 뚜렷한 저해효능을 나타내나, tyrosinase expression상에서는 그 저해효과가 약하게 나타나, 추후 재확인 실험이 필요함.

### 3-3-4. Normal human melanocyte 에서의 미백효능 평가

○ Normal human melanocyte를 이용하여 스크리닝을 통해 선별된 추출물 (식용가능 한약재 3종, 과일류 1종)의 미백효능을 평가함.



**Figure 9. Effects of selected plant extracts on cell viability and forskolin-induced tyrosinase activity in normal human melanocytes.**

○ Normal human melanocyte상에서 각 추출물의 처리는 유의미한 독성효과를 나타내지 않음.

Forskolin에 의해 유도된 tyrosinase activity상에서 1420, 1424, 복분자 추출물은 농도의존적 저해효능을 나타냄. 1091의 경우에는, murine melanoma cell에서는 미백효능이 뚜렷하였으나, normal human melanocyte에서는 forskolin에 의해 증가된 tyrosinase activity상에서 그 저해작용이 뚜렷이 관찰되지 않음 (Fig. 9).

## 1차년도 연구결과 요약

- 한약재의 65종, 과일 7종의 추출물에 대해서 미백활성을 평가하여, 식용 가능한 활성소재로서 1091(개자), 1420 (현초), 1424 (호도육), 복분자 등 4종을 선발함.
- 이들의 주요 작용기전으로 tyrosinase 및 MITF 발현 저해로 판단됨.

## ○ 향후 연구 방향 :

- 목표: 과일기반 이너뷰티 (미백) 음료 개발
- 추진전략: 과일을 베이스로 하여 관능적으로 우수하면서 미백활성이 우수한 음료를 개발함
- 추진 방법:
  - ▶ 다양한 과일 및 가공처리 전후의 미백활성을 검토하여 우수한 원료 확보
  - ▶ 미백활성이 우수한 식용가능 한방소재를 탐색하여 최종 개발 음료제품의 부원료로 활용함.
  - ▶ 가능한 관능적으로 우수한 소재를 선발하여 상품화 성공가능성을 재고함.

- Murine melanoma cell에서의 미백관련기전 상에서의 효능 재평가
- Normal human melanocyte내 melanogenesis 관련 signaling pathway상에서의 후보소재들의 저해효능을 확인
- 후보소재의 생물전환전과 후 추출물의 미백효능을 비교분석
- 후보소재의 배합비에 따른 미백활성 평가 및 관능평가 실시
- 본 연구는 한약재추출물을 이용하여 음료조성물을 제공함으로써, 맛과 향, 기호도가 좋으면서, tyrosinase activity 저해활성을 높여 피부의 미백효과가 뛰어난 음료조성물을 제공하는 데 그 목적이 있음.
- 종래의 미백용 조성물으로써 한약재를 미백용 음료조성물을 제조하여 티로시네이즈 저해활성이 뛰어난 음료조성물을 제조하는 데는 많은 어려운 문제가 있음.
- 한약재추출물이 화장품로서는 미백효과를 나타내더라도, 음료로서 미백효과를 이끌어내기 위해서는 효능뿐만 아니라, 소비자의 기호도 또한 맞춰야 하는 어려움이 있음.
- 따라서, 본 연구에서는, 한약재 소재의 경우, 우선적으로 식용가능한 한약재를 선택하고, 맛/향/기호도/효능 모두를 만족시킬 수 있는 소재에 우선권을 두었음.
- 추후 실험에서, 음료섭취 후의 관능평가를 통해 그 미백효능 및 기호도를 평가하고자 함.
- 또한, 미백효능 외에도, 한약재 자체가 가진 고유의 생리활성도 유도되어, 고기능성 음료로서의 역할을 할 수 있도록 배합함.

## 2. 2차년도 한약진흥재단 연구결과

### ○ 혈행개선관련 활성평가를 위한 실험방법

#### HMG-CoA reductase 저해활성 평가

콜레스테롤 합성 억제 활성은 HMG-CoA reductase assay kit (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 in vitro에서 측정하였다. 간략하면, HMG-CoA reductase에 의해 HMG-CoA가 mevalonate로 환원될 때 NADPH가 NADP+로 산화되는 정도를 340 nm에서 15분간 흡광도의 변화로 측정하였다(Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA). Pravastatin을 positive control로 사용하여 시료의 저해 활성과 비교하였다. HMG-CoA reductase 활성 저해율(%)은 blank의 흡광도 변화 (100% 활성)에 대한 시료의 흡광도 변화로 계산하였다[저해율 (%) = (1-시료의 흡광도 변화/Blank의 흡광도 변화) × 100].

#### Human LDL 산화 억제효과 측정

Human LDL 0.5 mL (120 µg/mL)에 10mM PBS buffer (pH 7.4)를 1.5 mL, 0.1 mM CuSO<sub>4</sub> 40 및 용매 또는 시료 40 µL를 첨가하여 37°C에서 30분간 배양하였다. 여기에 20% TCA를 1.5mL, 0.05M NaCl에 녹인 0.67% TBA를 1.5 mL 첨가하였다. 반응 혼합액을 90°C에서 45분간 water bath에서 배양하고 차갑게 냉각한 후 2,000xg에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 취하여 기포를 제거한 후 532 nm에서 흡광도를 측정하여 저해율을 구한 후 IC<sub>50</sub> 값으로 환산하였다.

#### 혈관세포 부착능 assay

TNF-α(30 ng/mL) 처리에 의해 유도된 단핵구와 혈관내피세포의 혈관접착능에 미치는 영향을 측정한다. 96-well plate를 사용하여 혈관내피세포에 시료추출물을 농도별로 1시간 전처리하고, TNF-α(30 ng/mL)을 처리해서 18시간 배양한다. 단핵구는 10 µM BCECF-AM을 배양액에 희석해서 1시간 동안 배양하고, PBS buffer로 세 번 washing 한 뒤, 원심분리기 후 suspension해서 혈관내피세포에 넣어서 1시간 동안 함께 배양한다. 부착이 이루어지지 않은 세포를 제거하기 위해서 PBS buffer로 세 번 washing하고 fluorescence microplate reader를 사용하여, excitation 파장 485 nm와 emission 파장 535 nm에서 BCECF 형광도를 측정한다.

#### 혈관부착분자 발현을 측정

혈관내피세포에 TNF-α(30 ng/mL)와 시료를 농도별로 처리하고, 18시간 배양 후, 세포를 RIPA buffer로 lysis하여 western blotting으로 혈관부착분자 발현 평가



## 혈관 평활근세포 배양

Rat 대동맥에서 분리한 primary 혈관평활근세포 이용한다. 혈관평활근세포는 growth supplement가 함유된 DMEM를 이용해, 5% CO<sub>2</sub>와 37°C가 유지되는 incubator에서 배양한다. 실험을 위한 혈관평활근세포는 80-90%의 density 상에서 사용하고, 24시간 동안 starvation으로 성장을 제한한 것을 이용

## DNA synthesis assay

혈관평활근세포를 96well plate에 10,000 cells/well로 seeding후, 10 % FBS-DMEM에서 세포밀도가 80%에 이를 때까지 배양한다. 무혈청 배지로 교환하고, 24시간 다시 배양하고, 시료 및 PDGF(20 ng/mL)를 처리한 세포(n=3)는 20시간 배양 후 BrdU assay kit를 이용해 DNA synthesis량을 측정한다.

## Cell Migration (Wound healing) assay

PDGF-의존적 chemotaxis는 modified boyden transwell chamber를 이용하여 실행한다. 혈관평활근세포(35,000 cells/well)는 transwell의 상층 chamber에 seeding 하고, 하층 chamber에는 실험용 시약으로 채운다. 세포는 24시간 동안 이주할 수 있도록 배양시킨 후, insert를 제거한다. 상층 chamber에서 이주하지 않고 머물러 세포들은 제거하고, bottom membrane에 있는 세포들은 4 µg/mL calcein AM 으로 1시간동안 염색한다. 이주한 세포들의 수는 형광현미경(excitation 485nm, emission 530nm)을 이용하여 염색된 세포의 수를 counting한다.

## Western blotting

PDGF 관련신호전달 경로 관련된 단백질 발현을 조사한다. 혈관평활근세포를 ice-cold PBS로 세척, 수거한 후, lysis buffer(Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O 50 mM, NaF 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM, HEPES 10 mM, and PMSF 1 mM)를 이용해 단백질을 분리하고, 14,000g에서 10 min동안 원심분리한 후, Laemmli buffer를 이용해 95°C에서 5분간 denaturation시킨다. 10% SDS-polyacrylamide gel을 이용해 200 V에서 1시간 동안 전기영동을 실시하고, nitrocellulose membranes(Amersham Biosciences, Freiburg, Germany)으로 transfer하고, membrane은 antibody와 incubation 한 후 chemiluminescence kit(Pierce, Waltham, MA, USA)를 이용해 exposure시킨 후, densitometry analysis를 이용해 band 정량한다.

## 2'7'-dichlorofluorescein(DCF) assay

혈관평활근세포를 glass coverslip(12 mm, dia.)상에 plating(2x10<sup>4</sup> cells)하고, 24시간 후,

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(200 μM)을 2시간 동안 처리한 후 시료를 24시간동안 처리하여 배양한다. PBS로 2번 세척한 후, DCF-DA solution(50 μM)을 세포에 주입하여 37°C에서 30분간 배양한다. PBS로 다시 2번 세척하고, mounting하여 형광현미경을 통해 형광도를 측정한다.

#### ex vivo 혈소판 응집능 평가

콜라겐을 이용하여 랫드 혈소판의 응집을 유도하고, 본 발명의 조성물에서 호장근과 계심의 혼합비율에 따른 혈소판 응집 저해능을 다음과 같이 비교하였다. 실험에는 코아텍에서 분양받은 SD 랫드(Sprague-Dawley rat, male, 220g)를 사용하였다. SD 랫드는 1주간의 적응기를 가진 후, 복대동맥으로부터 혈액을 채취하였다. 채취된 혈액 5ml에 타이로이드 완충액(thyroid buffer; 137mM NaCl, 12mM NaHCO<sub>3</sub>, 5.5mM glucose, 1M MgCl<sub>2</sub>, 1M KCl 및 1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4) 2ml를 첨가하고 1,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 혈구가 제거된 상등액(혈소판부혈장, PRP, Platelet rich plasma)을 800×g에서 15분간 원심분리하고, 침전된 혈소판을 세척 완충액(washing buffer; 137mM NaCl, 2.9mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM glucose, 12mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.34mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1mM EDTA, 20mM HEPES 및 0.25% BSA, pH 7.4)으로 2회 세척한 후 현탁 완충액(suspension buffer; 137 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM glucose, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM HEPES 및 0.25% BSA, pH 7.4)에 현탁시켜 최종 세척혈소판을 얻었다. 얻어진 세척혈소판을 3×10<sup>8</sup> platelet/ml이 되도록 희석하여 분석에 이용하였다. 혈소판은 37°C에서 3분간 인큐베이션한 후 CaCl<sub>2</sub> 1mM을 넣고, 실시예 1의 시료를 최종농도 100μg/ml로 첨가하고 2분간 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 혈소판 응집 유도물질인 콜라겐 2.5μg/ml를 첨가하여 5분간 혈소판의 응집정도를 측정하였다. 랫드(Rat) 혈소판 응집 억제능은 응집측정기(Aggregometer; Chrono-Log Co., Ltd., Havertown, PA. USA)를 이용한 탁도측정법으로 확인하였다.

#### 경동맥 혈전 유발 동물모델에서 혈류변화에 미치는 영향 평가

FeCl<sub>3</sub>로 유도한 경동맥 혈전 유발 동물모델에서 한약재 추출물이 혈류변화에 미치는 영향을 다음과 같이 측정하였다. 실험동물로는, 수컷 SD 랫드(Sprague-Dawley rat, 8주령, 230-250g, 코아텍, Korea)를 구입하고 1주일의 순화기간을 거쳐 실험에 사용하였다. 실험동물에 각 시료를 체중 1kg당 50mg, 100mg 및 200mg을 각각 3일간 경구투여하였으며, 대조군은 동량의 완충액(saline)을 투여하였다. 시험기간 동안 고형사료와 물은 자유로이 섭취하게 하고, 사육환경은 온도 23±0.5°C, 상대습도 50±5%, 12시간 간격으로 명-암(light-dark) 사이클로 자동 유지 유지시켰다. 실험동물의 마취는 럼폰과 졸레틴을 2:3의 비율로 혼합한 마취제를 사용하였다. 실험동물의 경동맥 혈전 유발은 경동맥에 30% FeCl<sub>3</sub> 용액을 적신 여과지(filter paper)(2×2mm)를 3분간 접촉시킨 후 여과지를 제거하고 생리식염수로 닦아낸 다음 탐침(Powerlab/8sp, ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, NSW, Australia)을 설치한 혈류측정기(Laser Doppler Flowmetry (LDF; BFL21, Transonic Instrument, USA)를 사용하여 혈류측정을 시행하였다. FeCl<sub>3</sub> 처리 후 혈전생성은 혈류측정값이 0에 가까이 떨어지는 때를 기준으로 하였고, 정상군의 경우는 40분까지 측정하였다. 정상군(C Basal)에서는 총 40분의 관

찰시간 내에서 혈전이 생성되지 않았으며, FeCl<sub>3</sub> 처리군은 염화철 처리 17분 후에 혈류량값이 0에 이르는 것으로 확인되었다. 시료처리군의 경우, FeCl<sub>3</sub> 처리군과 비교한 혈류량값을 확인하였다.

#### 혈전 유발 동물모델에서 혈관의 조직학적 변화 확인

혈전유발 동물모델에서 혈관의 조직학적 변화를 확인하였다. 경동맥내 혈전생성을 유도한 후 혈전이 생성된 경동맥 부위를 3~4mm 적출하였다. 적출된 경동맥 부위를 10% 중성 파라포름 알데하이드에서 24시간 동안 고정시키고 통상적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀에 포매한 후 절편(4 $\mu$ m 두께)을 만들었다. 만들어진 절편은 헤마톡실린-에오신(hematoxylin-eosin) 염색을 실시하여 광학현미경용 조직표본을 제작하고, 표본을 광학현미경으로 관찰하였다.

#### Arterio-venous shunt thrombosis model (동정맥단락술)을 이용한 혈전 형성 측정

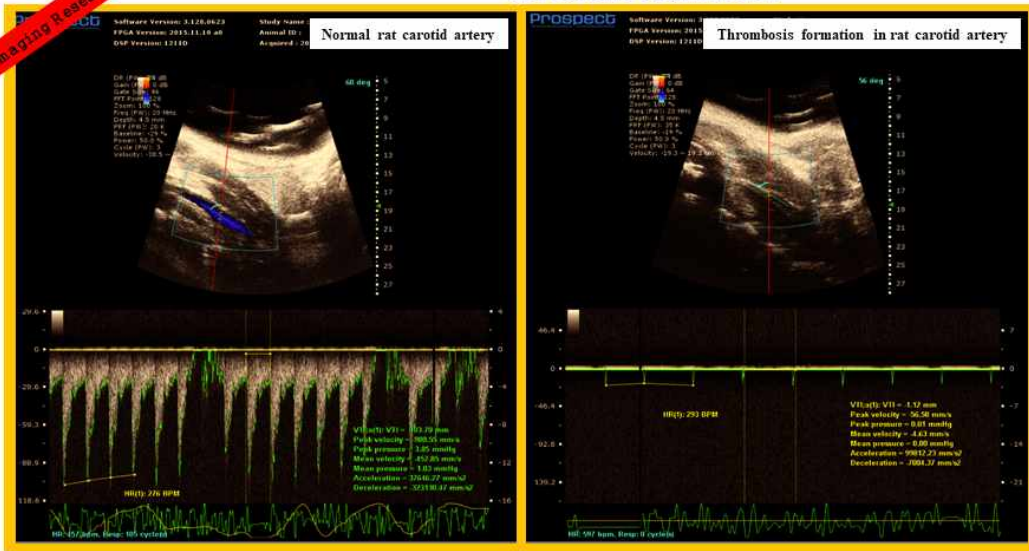
한약재 추출물의 생체 내 항혈전 효과는 rat 동정맥단락술(arterio-venous shunt thrombosis model)을 사용하여 평가하였다. 추출물을 0.25% carboxymethylcellulose CMC; Sigma, USA)에 용해하였으며, rat에 경구로 500mg/kg, 250 mg/kg을 3일간 연속 투여하였다. 마지막 투여 2시간 후 단락술을 이용한 혈전증 실험을 수행하였다. Urethane (1.25 g/kg i.p; Sigma)을 이용해 마취 후, 8 cm polyethylene 관을 왼쪽 경정맥과 오른쪽 경동맥 사이에 삽입하였다. 생리식염수로 채워진 두 개의 polyethylene 관을 5 cm 길이의 무명실(직경 0.25 mm)이 포함된 6 cm 길이의 tygon tube에 연결하였다. 체외 순환은 혈전이 무명실에 부착하는 15분 동안 유지하였다. 실험 종료 후 tube 내의 무명실에 부착된 혈전을 꺼내어 즉시 무게를 측정하였다.

#### Rat 동맥내 혈전형성 모델에서 초음파를 이용한 혈류흐름 평가 시스템 구축

Rat (코아텍, 7주령, male)은 1주일간 적응시킨 후, 한약재 시료를 3일간 경구투여하고, 물과 사료는 자유식이토록 하였다. 시술 당일은 한약재 시료 투여 후 2시간 이내 경동맥내 혈전모델을 유발하였다. 럼푼과 즐레틴을 2:3의 비율로 혼합한 마취제를 사용하여 마취 후, 실험동물의 경동맥 (left carotid artery)에 30% FeCl<sub>3</sub> 용액을 적신 여과지(filter paper)(2 $\times$ 2mm)를 3분간 접촉시킨 후 여과지를 제거하고 생리식염수로 닦아낸 다음 털을 제거하고, 소동물용 초음파기기에서 그 영향을 확인하였다. Rat의 경동맥에 FeCl<sub>3</sub>를 처리하여 15분 이후에 혈관내 혈액량 및 혈액의 흐름을 소동물용 초음파기기를 이용하여 image화 하였다. 정상군과 혈전유도 모델간의 경동맥내 혈류변화를 측정된 결과, 아래 그림과 같은 image를 획득하였다. 정상군은 다량의 혈류가 흐르고 있음을 blue color (혈액)를 통해 시각적으로 확인하였고, 심박동에 따른 혈류량변화는 아래 피크를 통해 확인하였다. 혈전을 유도한 모델에서는, 경동맥내 혈류 흐름을 관찰할 수 없었고, 이와 동일하게 심박동에 따른 그 어떤 혈류의 흐름도 관찰할 수 없었다.

**In vivo model of thrombosis formation : Arterial thrombosis Model**  
**Ultrasound examination**

Animal Imaging Research



○ 실험결과

⊙ 2상해독효소계 유도활성을 갖는 한약재의 혈행개선 관련대사 상에서의 효능 평가

한약재 384종의 2상해독효소계 유도능을 평가한 결과 14종 (감수, 원화, 도경, 목향, 파두, 학슬, 삼백초, 감송향, 측백엽, 청호, 구절초, 한인진)의 농도의존적 증가된 ARE-luciferase 활성을 확인하였다.

이들중, 식품으로 이용가능한 도경의 혈소판 응집 저해능을 평가한 결과, 30, 60, 125 µg/mL 농도에서 증가된 혈소판 응집 저해능을 확인할 수 있었다. 이러한 도경의 효과는, 혈소판 응집 유도자 ADP, collagen, thrombin에 의해 유도된 혈소판 응집 상에서 모두 저해능을 나타내었다 (Fig. 1).

콜레스테롤 합성 효소 HMG-CoA reductase activity는 도경 (50 µg/mL) 처리에 의해 현저히 감소됨을 확인할 수 있었다. 또한, LDL산화 상에서도, 도경은 oxLDL의 생성을 저해시키는 것으로 나타났다 (Fig. 2).

혈관내피세포염증반응에서도, 도경은 TNFα에 의해 유도된 ICAM-1의 발현을 농도의존적으로 저해하였고, 혈관평활근세포의 증식인자 PDGF에 의해 유도된 PDGF 인산화를 도경이 뚜렷이 저해하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

도경의 *in vitro* 상에서의 결과를 근거로, *in vivo* 혈전동물모델에서의 혈전형성지연효과를 평가하였다. 도경을 rat에 경구투여한 결과, FeCl<sub>3</sub>에 의해 유도된 혈전형성으로 인한 혈류흐름 장애는 개선되는 것으로 나타났다. 즉, FeCl<sub>3</sub>에 의한 혈류흐름 감소는 도경처리에 의해 혈류량이 증가되는 나타났다. 또한, rat 경동맥의 조직형태학적 분석을 통해, 도경 처리군이 FeCl<sub>3</sub> 단독처리군에 비해 혈관내 혈전형성부위가 감소된 것을 확인하였다 (Fig. 3).

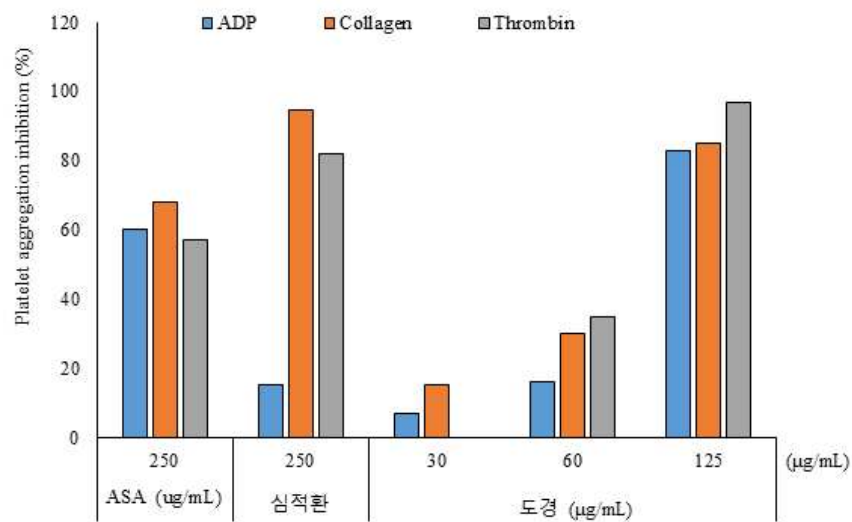
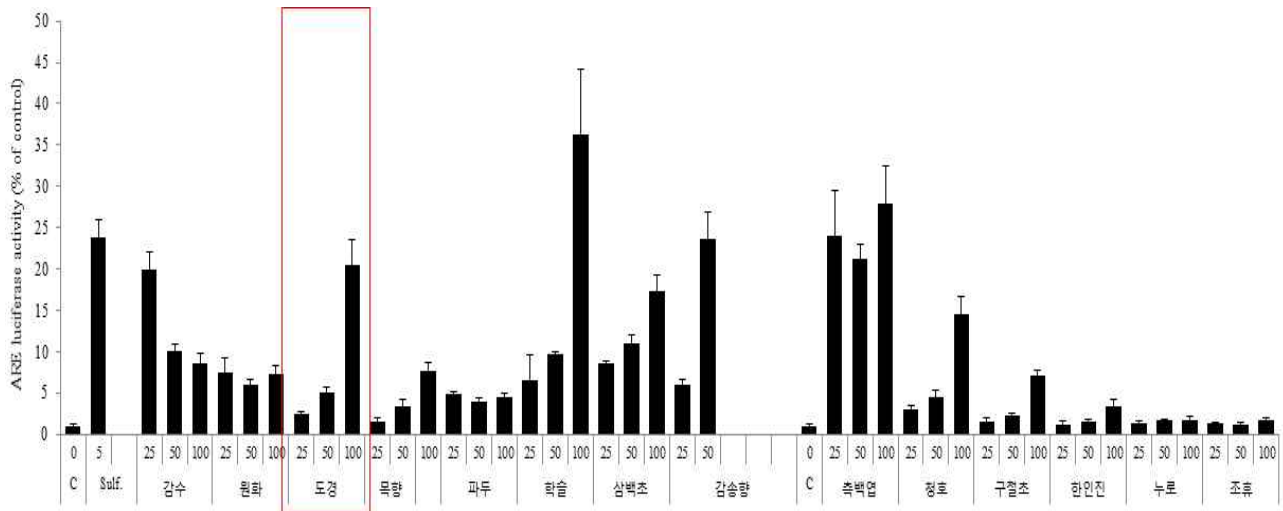


Fig. 1. Effects of herbal medicines on induction of phase 2-detoxifying system and *ex vivo* platelet aggregation.

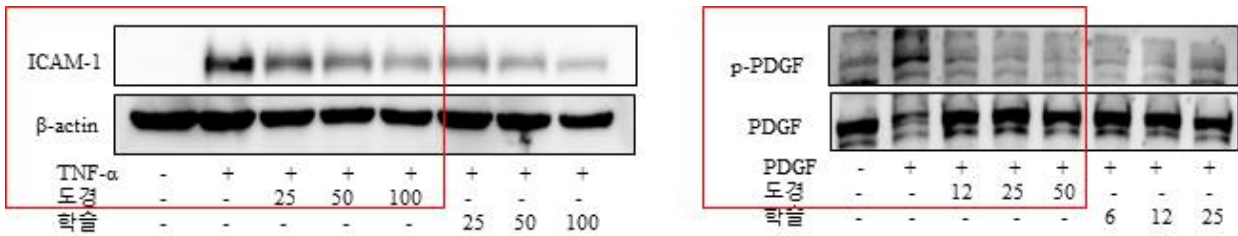
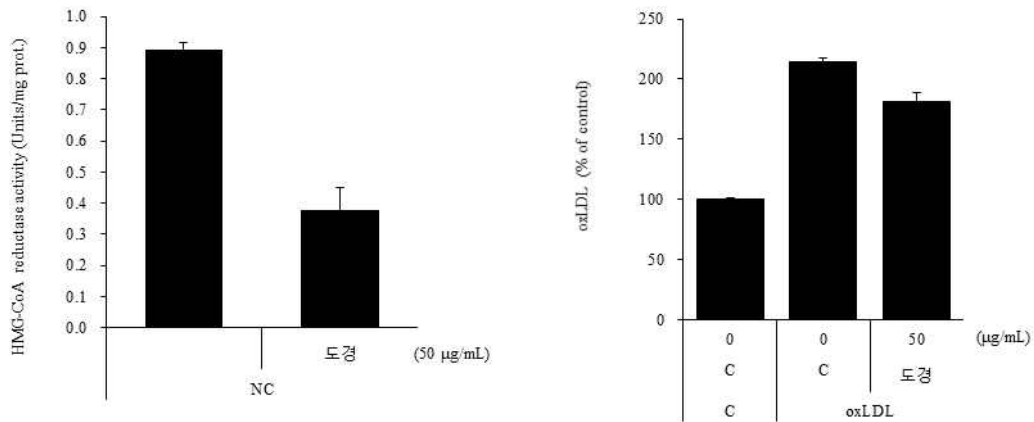
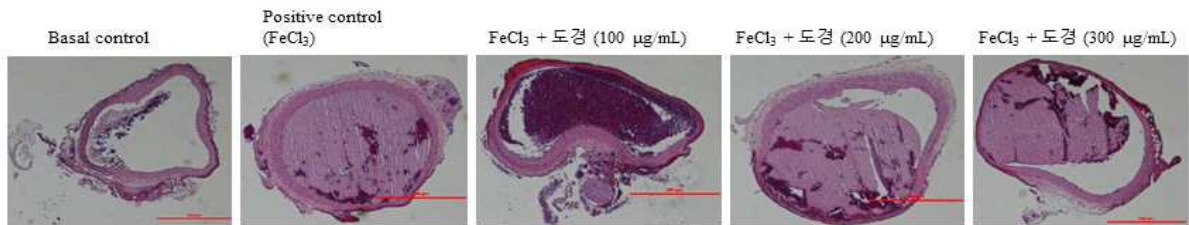


Fig. 2. Effects of herbal medicine on cholesterol synthesis pathway, LDL oxidation, adhesion molecule expression, and PDGF phosphorylation.

A.



B.

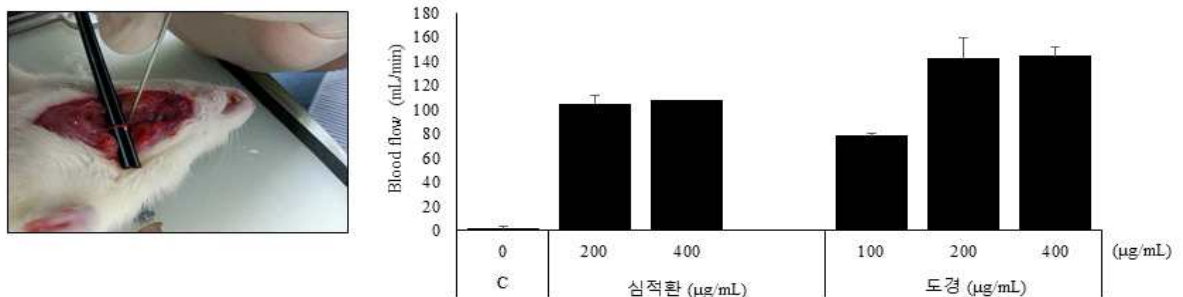


Fig. 3. Effects of herbal medicine on *in vivo* thrombosis model (A, H&E staining; B, Blood flow assessment).

◎ 혈관보호 효능을 갖는 것으로 알려진 한약재의 혈행개선 관련대사 상에서의 효능 평가

예로부터 혈관에 유효한 효능을 가진 것으로 알려진 한약재 16종 (강활, 갈근, 계지, 구인, 만병초, 금은화, 목통, 단삼, 두충)을 선정하여, 이들의 혈행개선 효능을 검증하였다.

결과에서 나타난 바와 같이, 혈소판 응집 저해능 평가에서, 강활, 계지, 만병초, 단삼이 collagen에 의해 유도된 혈소판 응집을 80% 이상 저해하는 것을 확인하였다. 동일농도의 양성 대조군 아스피린 (ASA)보다 우수한 효능을 나타내었다. 따라서, collagen 뿐만 아니라, ADP 또는 thrombin에 의해 유도되는 혈소판 응집 상에서도 강활, 계지, 만병초, 단삼의 저해효능을 탐색하였다. ADP에 의해 유도된 혈소판 응집반응에서, 강활, 계지, 만병초는 그 저해효능이 90%에 이르렀으나, 단삼은 20%의 저해효능을 나타냈다. 반면, thrombin에 의해 유도되는 혈소판 응집상에서는, 계지, 만병초, 단삼이 70%이상의 저해효능을 나타내었다. 강활은 collagen 이란 ADP에 의한 혈소판 응집을 뚜렷이 저해하였으나, thrombin에 의한 혈소판 응집반응에서는 계지, 만병초, 단삼에 비하여 낮은 저해능을 나타내었다 (Fig. 4).

콜레스테롤 합성효소 저해능은, 강활, 계지, 만병초가 60% 이상의 효소활성 저해능을 나타내었고, LDL 산화저해능상에서는, 계지, 만병초, 단삼이 각각 24.8, 25.1, 32.9% 저해하는 것으로 나타난 반면, 강활은 저해효능이 뚜렷하지 않았다.

혈액 단핵구와 혈관내피세포와의 염증반응상에서는, 염증성 사이토카인 TNF- $\alpha$ 에 의해 유도된 세포간 부착을 강활도 저해하는 것으로 나타나나, 계지와 만병초의 저해효능이 시료 농도의존적으로 더 뚜렷이 나타났다. 단삼은 혈관염증반응에서는 그 저해활성이 나타나지 않았다.

혈관세포 부착능에서의 결과와 동일하게, 단삼과 달리, 계지와 만병초는 농도의존적으로 MCP-1 production을 저해하는 것으로 나타났다 (Fig. 5).

DNA synthesis (BrdU incorporation)에서는, PDGF에 의해 증가된 혈관평활근세포 증식은 강활, 계지, 만병초, 단삼 처리군에서 모두 농도의존적 감소되는 것을 확인하였다. 만병초의 경우, 세포 독성이 고농도 (40  $\mu$ g/mL)에서 나타나, 이후 실험군에서는 고농도 처리군은 제외하였다. PDGF에 의해 유도되는 signaling pathway에서는, 계지가 가장 뚜렷한 PDGF 대사 저해능을 보였다. 즉, 계지 처리군은 PDGF에 의한 인산화, PLC $\gamma$  인산화, AKT 인산화, ERK 인산화를 모두 control 수준으로 유지하였다. 단삼은 AKT와 ERK의 activation을 저해하는 기능이 우수한 것으로 나타났다. 반면, 강활은 PDGF에 의한 signaling pathway를 저해하는 효능이 미약하였다 (Fig. 6).

혈관평활근세포의 이주상에서도, PDGF에 의해 유도되는 세포이주에서 계지가 가장 뚜렷이 저해효능 (20, 40  $\mu$ g/mL)을 나타내고, 강활과 단삼 또한 저해효능이 나타나나, 저농도 20  $\mu$ g/mL에서는 계지보다 낮은 저해능을 나타내었다. 만병초도 이주저해능을 나타내나, 세포형태학적 변화가 관찰되어, 후보약재에서는 제외하였다 (Fig. 7).

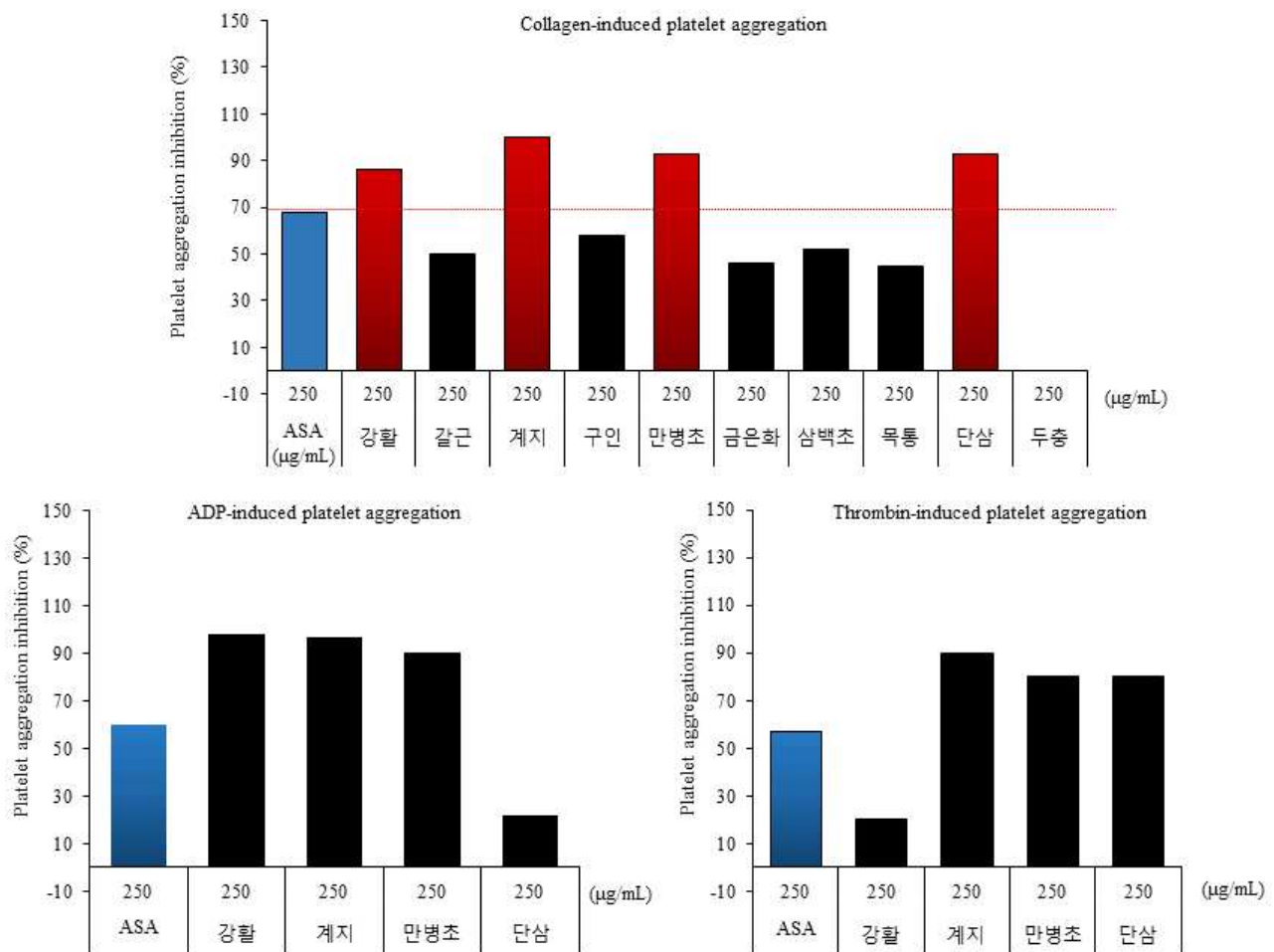


Fig. 4. Effects of herbal medicine on platelet aggregation.



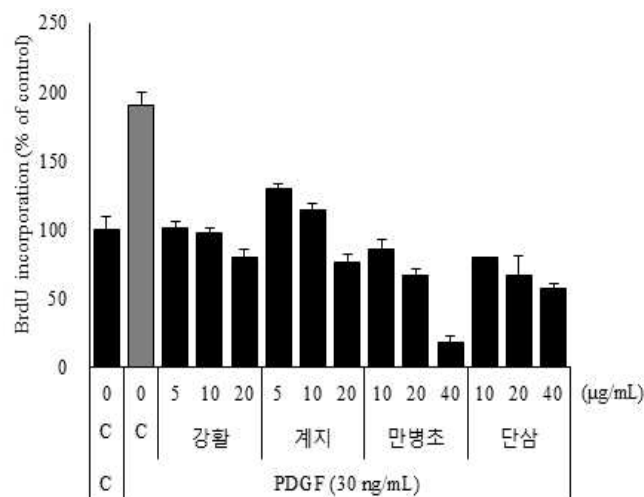
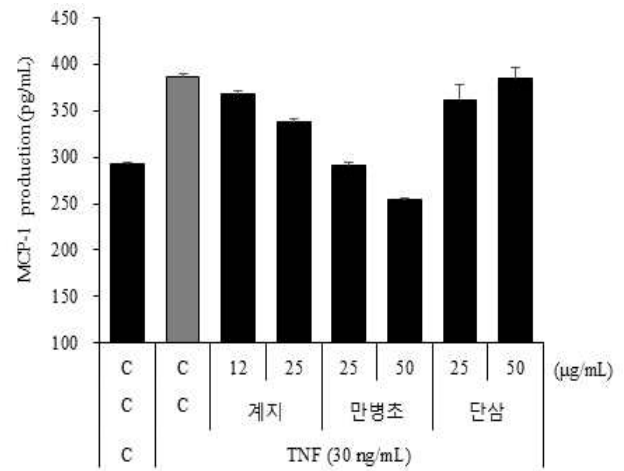
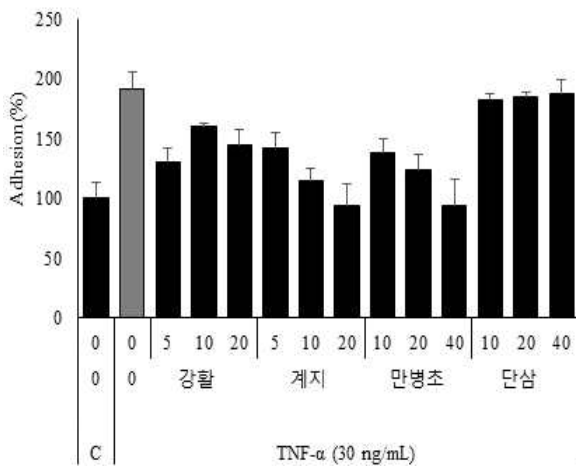
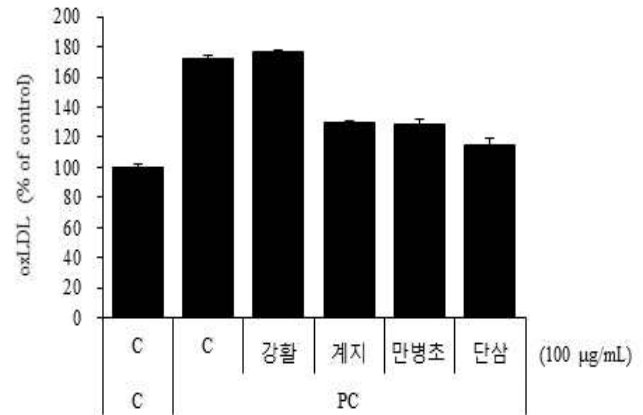
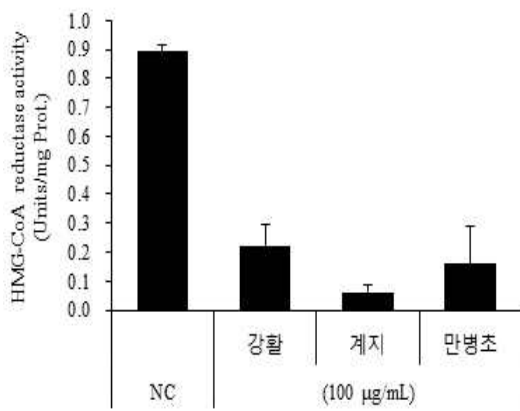


Fig. 5. Effects of herbal medicine on cholesterol synthesis pathway, LDL oxidation, cell adhesion, MCP-1 production, DNA synthesis.

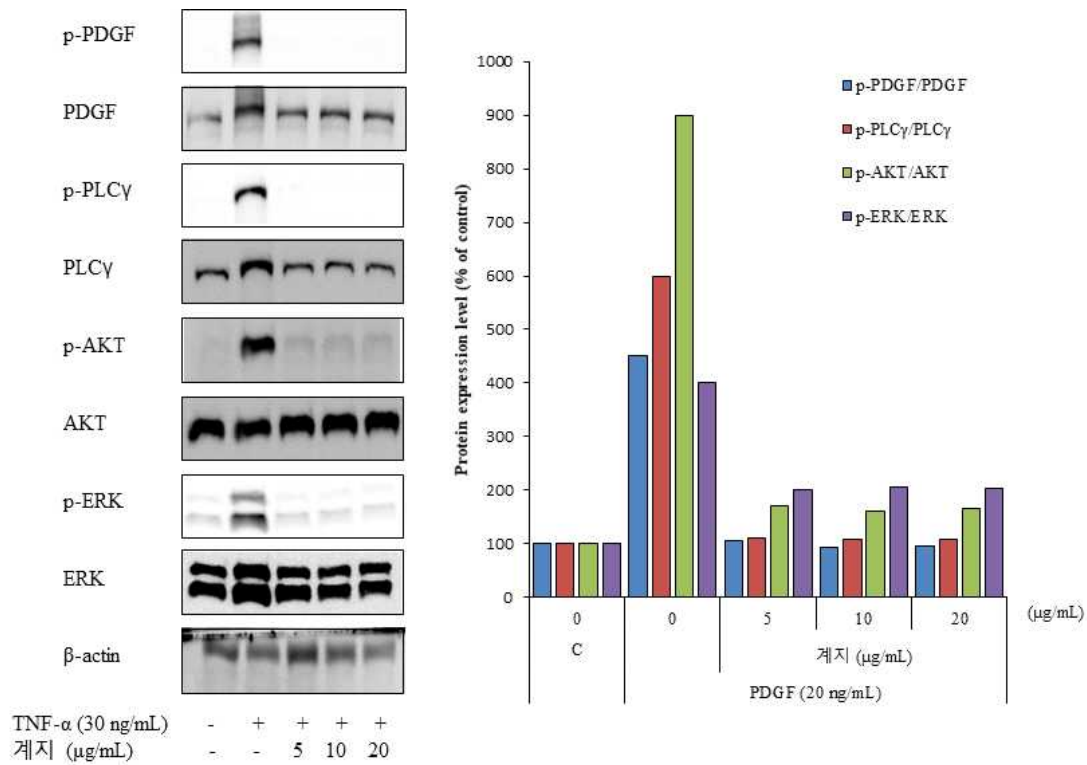
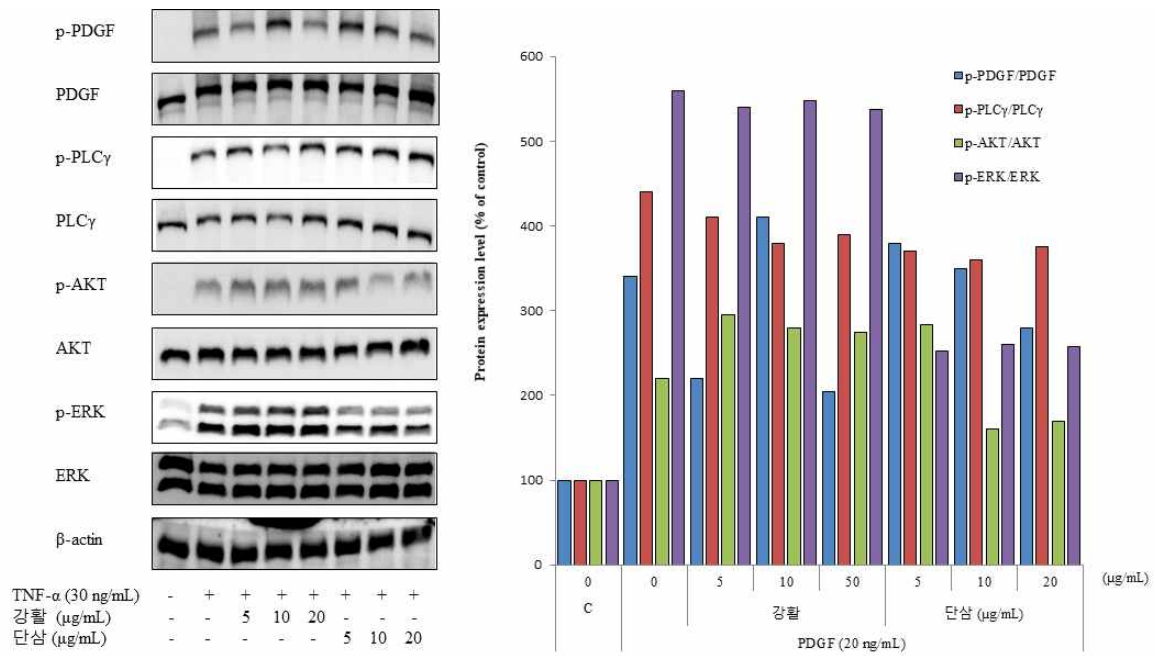


Fig. 6. Effects of herbal medicine on PDGF-induced signaling pathway in rat vascular smooth muscle cells.

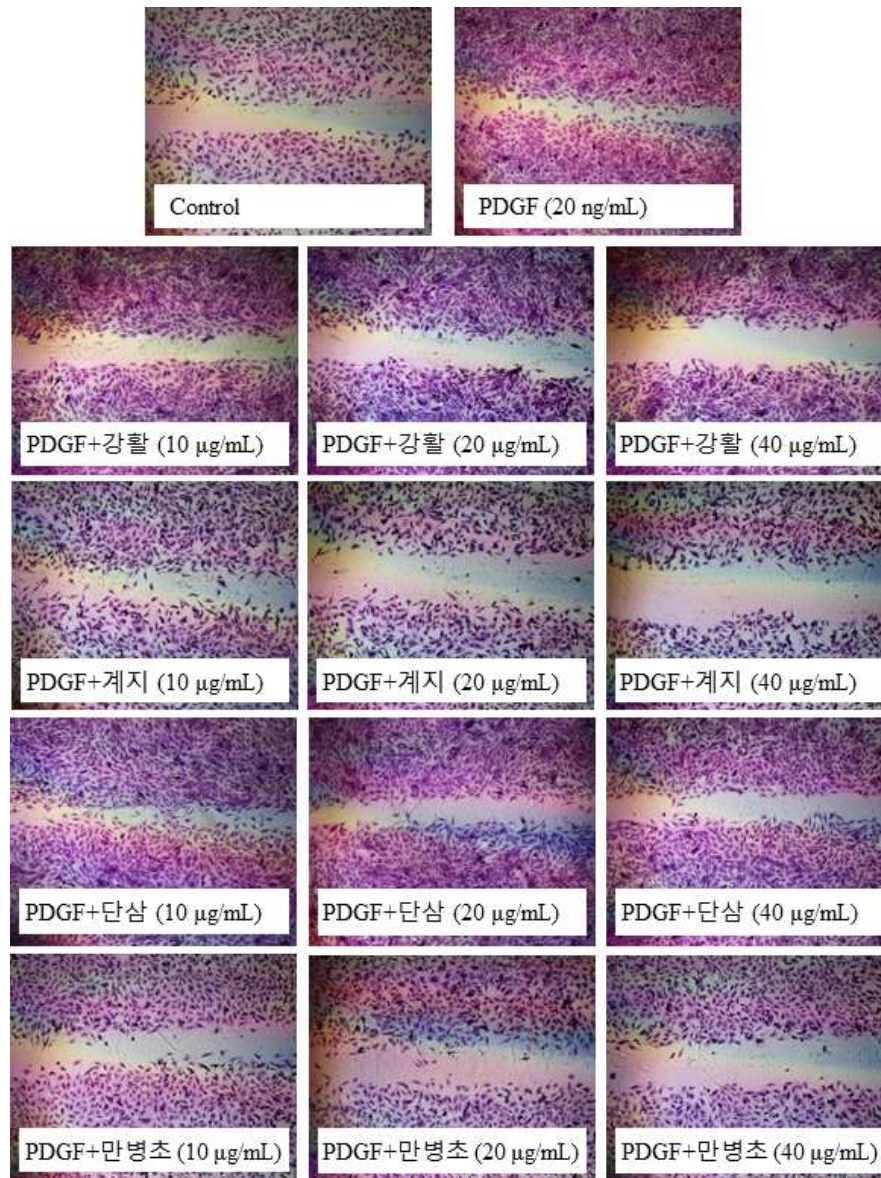


Fig. 7. Effects of herbal medicine on PDGF-induced migration in rat vascular smooth muscle cells.

◎ 미백효능을 가지는 한약재 (복분자, 호도육, 현초)의 혈행개선 관련대사에서의 효능 평가

1차년도에서 미백효능을 갖는 한약재로 선정된 복분자, 호도육, 현초의 혈행개선 관련대사에서의 효능을 검증하였다. 먼저, 혈소판 응집 저해능에서는, 3가지 한약재 모두가 ADP, collagen, thrombin에 의해 일어나는 혈소판 응집을 저해하는 것으로 나타났다. 다만, ADP에 의한 혈소판 응집 반응 저해능 실험에서 현초의 저해능은 60%에 그치는 것으로 나타나지만, 그 외 혈소판 응집 agonist에 대한 저해능은 세가지 한약재 모두가 유사하였다 (Fig. 8).

LDL 산화 저해능은 복분자가 우수하고, 호도육과 현초가 나란히 그 뒤를 이었다. 즉, 50  $\mu$ /mL에서 각각 37.6, 29.8, 29.1%의 저해율을 나타내었다. HMG-CoA reductase activity에서는, 양성대조군 atrovastatin (ATS) 0.01mM에서 뚜렷한 활성저해효능이 나타났으며, 복분자, 호도육, 현초 중에서는 호도육이 저해활성을 나타내었다. 혈중 단핵구세포와 혈관내피세포와의 부착반응은, 시료모두가 농도의존적 저해효능을 나타내었으며, 현초, 호도육, 복분자 순으로 그 저해활성이 뛰어났다 (Fig. 9).

MCP-1 생성은 TNF- $\alpha$  처리군에서 증가가 유도되었으며, 복분자, 호도육, 현초 모두 평균적으로 14% 정도 저해하는 것으로 나타났다. 세포부착 관련 단백질 발현에서도, 복분자, 호도육, 현초는 농도의존적으로 ICAM-1 발현을 저해하였다 (Fig. 10). 부착관련 유전자발현양상도 이와 유사한 결과를 보여주었다. 즉, 혈관내피세포에서 TNF- $\alpha$ 에 의해 유도된 ICAM-1, VAM-1, E-selectin 발현은 한약재 처리에 의해 모두 감소하고, 저해 양상은 VCAM-1에서 가장 뚜렷하게 나타났다 (Fig. 11).

혈관 염증반응은 NF- $\kappa$ B activation과 관련이 있으므로, 한약재가 NF- $\kappa$ B pathway에 미치는 영향을 조사하였다. TNF- $\alpha$  처리는 NF- $\kappa$ B p65의 nuclear translocation과 DNA binding을 증가시키고, 현초추출물은 농도의존적 nuclear translocation과 DNA binding 저해능을 나타내었다 (Fig. 12).

혈관세포내 reactive oxygen species (ROS) 생성은 혈관세포내 손상을 유발하여, 결국 혈행장애를 유발할 수 있는 인자로 작용한다. 현초는 TNF- $\alpha$  또는 hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )에 의해 증가된 ROS 생성을 현저히 낮추는 것으로 나타났다 (Fig. 13).

혈관평활근세포의 증식과 이주로 인한 혈행장애 상에서는, PDGF 에 의해 유도된 혈관평활근 세포 증식 (DNA synthesis)를 현초가 control 수준으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 14). 또한, 복분자, 호도육, 현초 모두 20  $\mu$ g/mL 이상에서 PDGF에 의해 유도된 평활근 세포 이주를 저해하는 것으로 나타났다 (Fig. 15).

PDGF 관련 signaling pathway상에서 한약재 복분자, 호도육, 현초의 저해효능을 비교하였다. Primary

rat aorta smooth muscle cells에서 복분자, 호도육, 현초는 PDGF에 의해 유도된 PDGF/PLC $\gamma$ /AKT/ERK의 인산화를 뚜렷이 감소시켰다 (Fig. 16).

혈관평활근세포내 ROS의 생성은 PDGF 또는  $H_2O_2$ 로 유도하였고, 현초는 ROS 저해능이 뛰어나, 50  $\mu$ g/mL 처리시에는 control 수준의 ROS 생성값을 유지시키는 것으로 나타났다 (Fig. 17).

in vivo 혈전동물모델에서, 현초는 경동맥내  $FeCl_3$  처리로 인한 혈전모델과 AV shunt 모델에

서 모두 혈전형성지연 효과뿐만 아니라, 혈전무게 감소효과를 가져왔다 (Fig. 18, 19). 복분자 역시, 경동맥내 혈전형성 저해하는 효과를 혈관내 조직형태학적 분석결과로 알 수 있었고, AV shunt 모델에서도 혈전무게량을 감소되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 20).

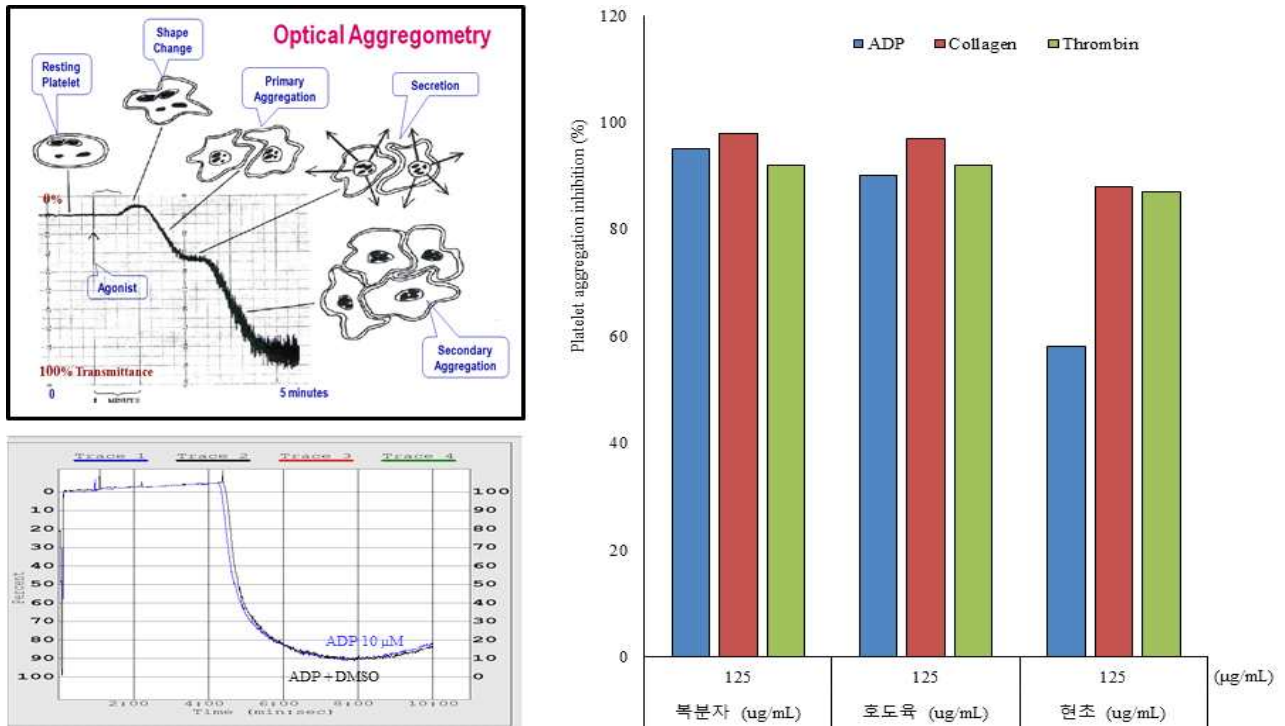


Fig. 8. Effects of herbal medicines on ADP-, collagen- or thrombin-induced platelet aggregation (*ex vivo*).

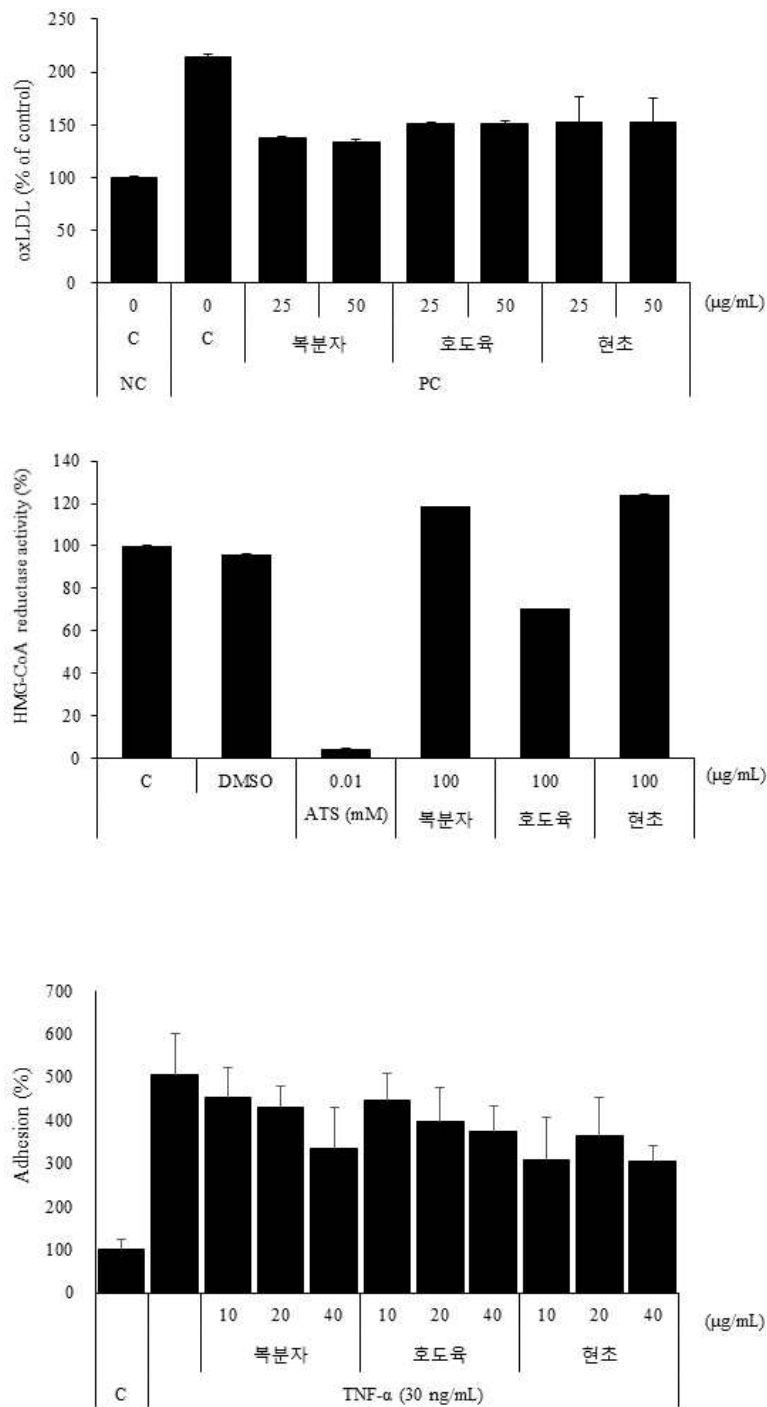


Fig. 9. Inhibitory effect of herbal medicines on LDL oxidation, TNF- $\alpha$ -induced MCP-1 production and adhesion of monocytes THP-1 to human vascular endothelial EA.hy926 cells.

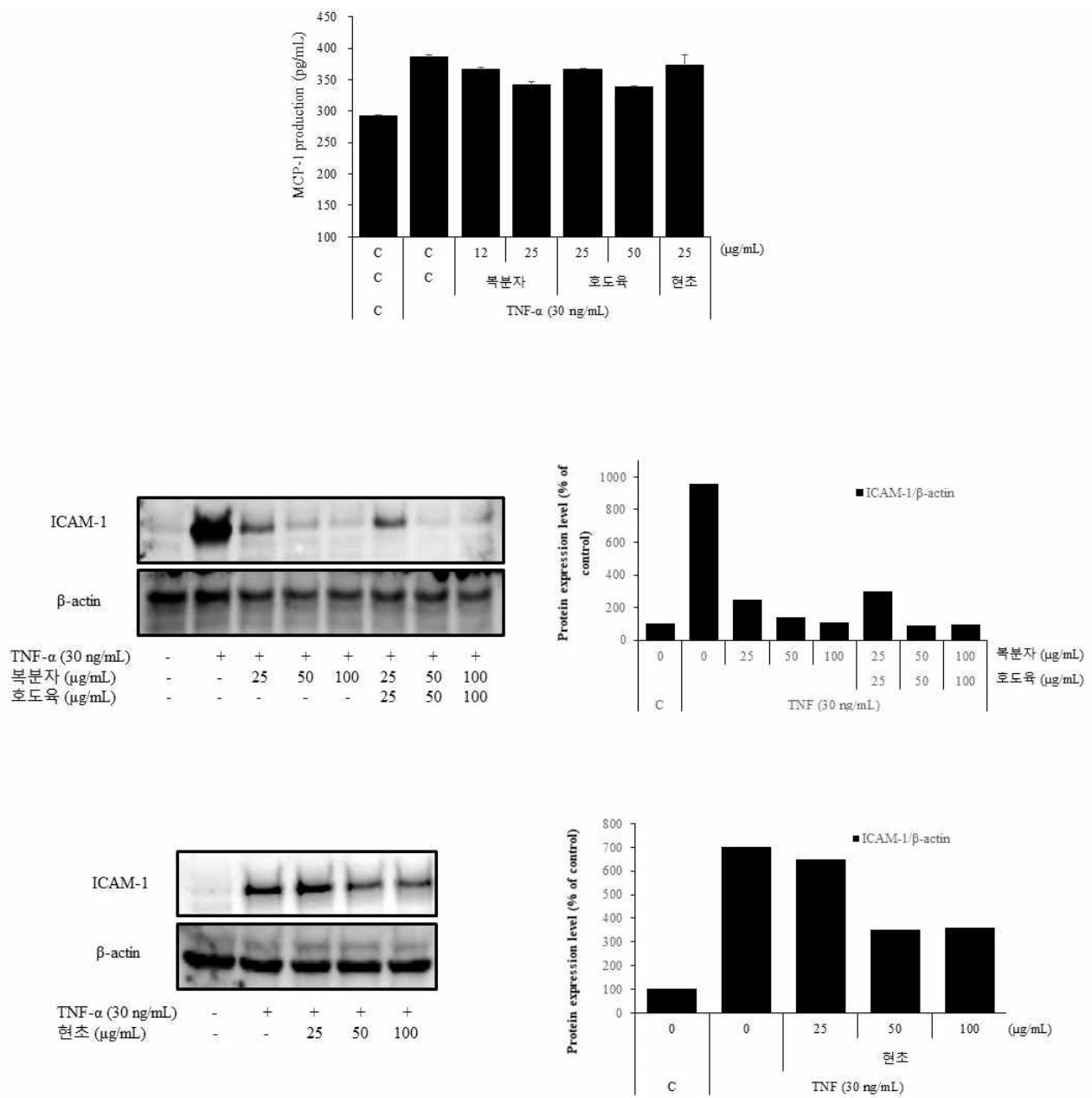


Fig. 10. Inhibitory effect of herbal medicines on TNF-α-induced MCP-1 production and adhesion molecule expression in human vascular endothelial EA.hy926 cells.

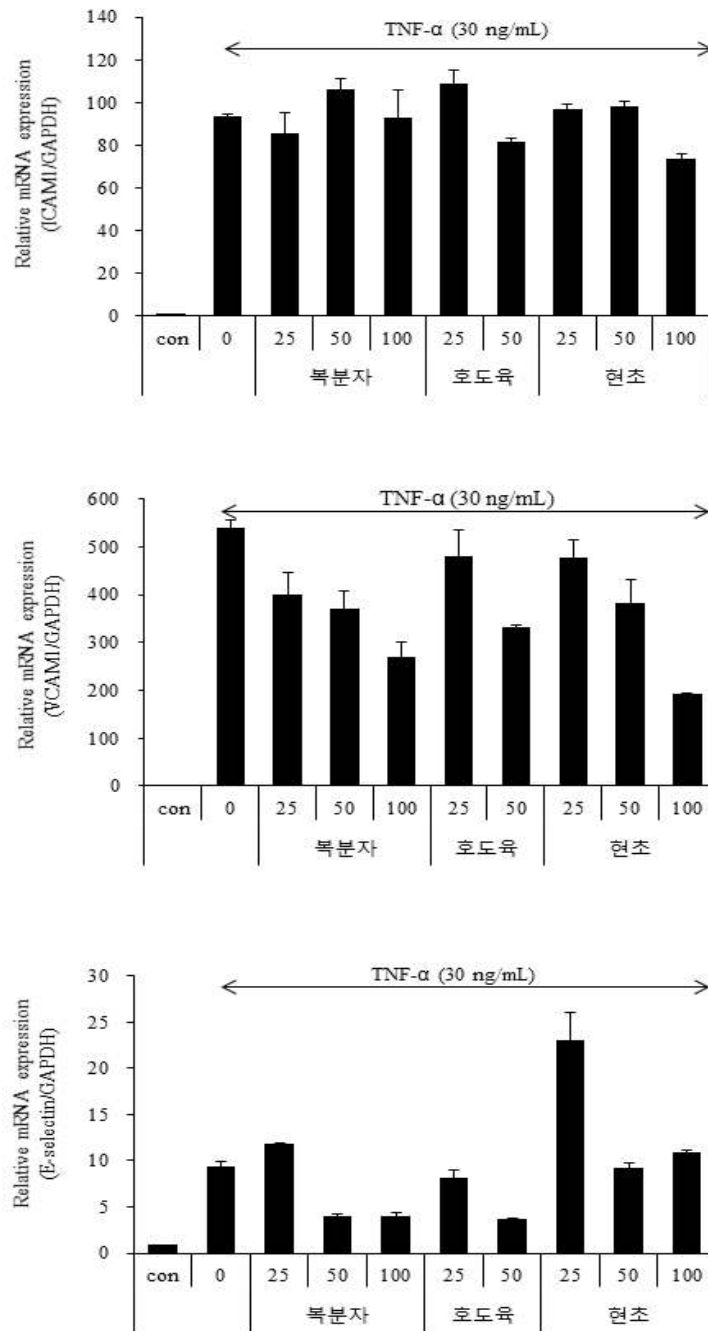


Fig. 11. Effects of herbal medicines on TNF- $\alpha$ -induced gene expression of ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin in EA.hy926 cells



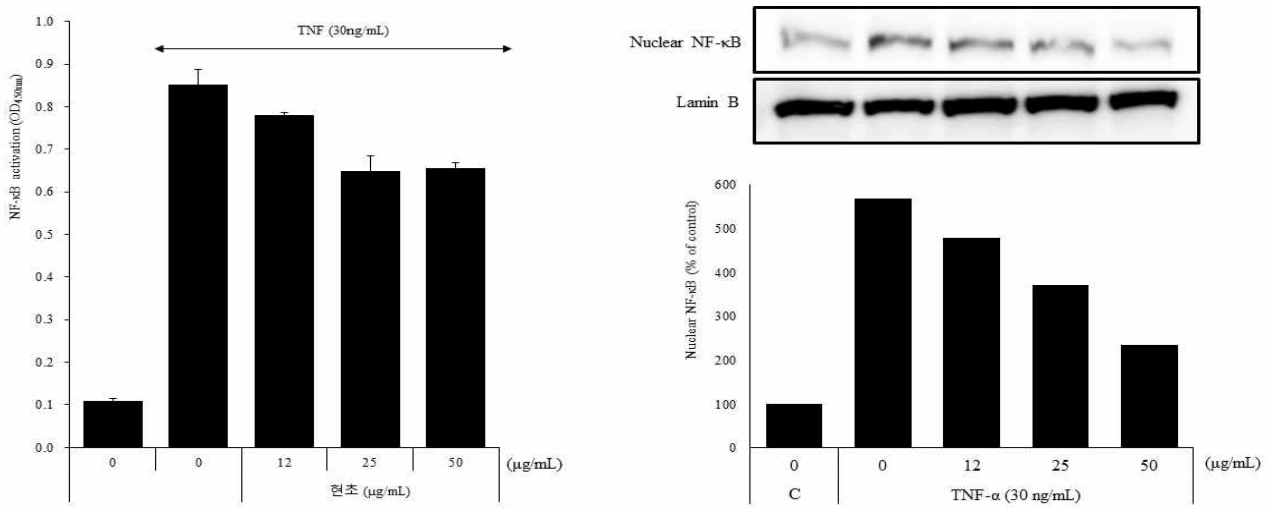


Fig. 12. Effects of GT extract on TNF- $\alpha$ -induced nuclear translocation of NF- $\kappa$ B (p65) in rat vascular smooth muscle cells

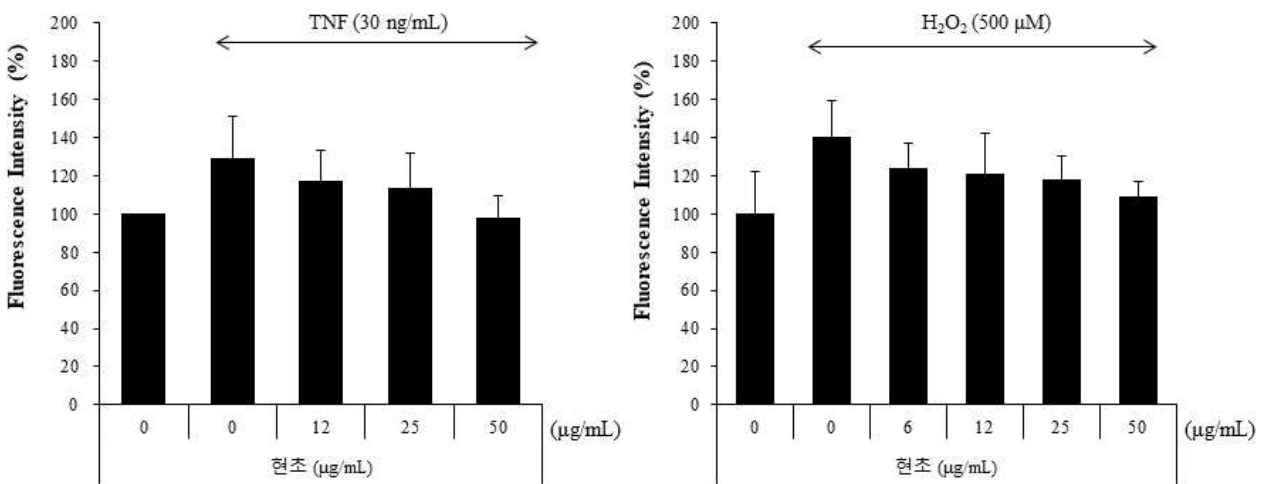


Fig. 13. Effects of herbal medicine on TNF- $\alpha$  or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stimulated reactive oxygen species production in vascular endothelial EA.hy926 cells.

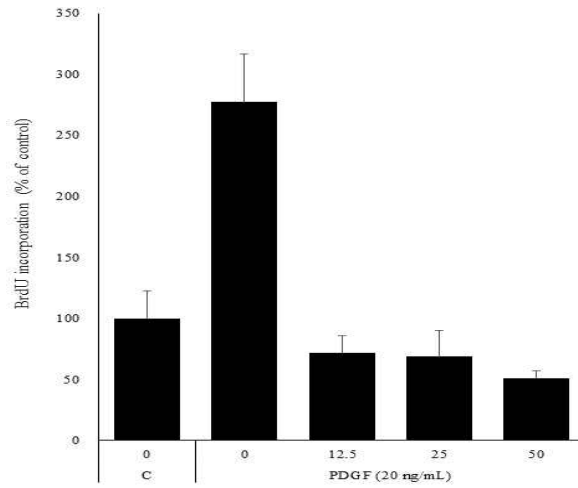


Fig. 14, Effects of herbal medicines on PDGF-triggered proliferation of rat vascular smooth muscle cells



Fig. 15. Effects of herbal medicines on PDGF-triggered migration of rat vascular smooth muscle cells

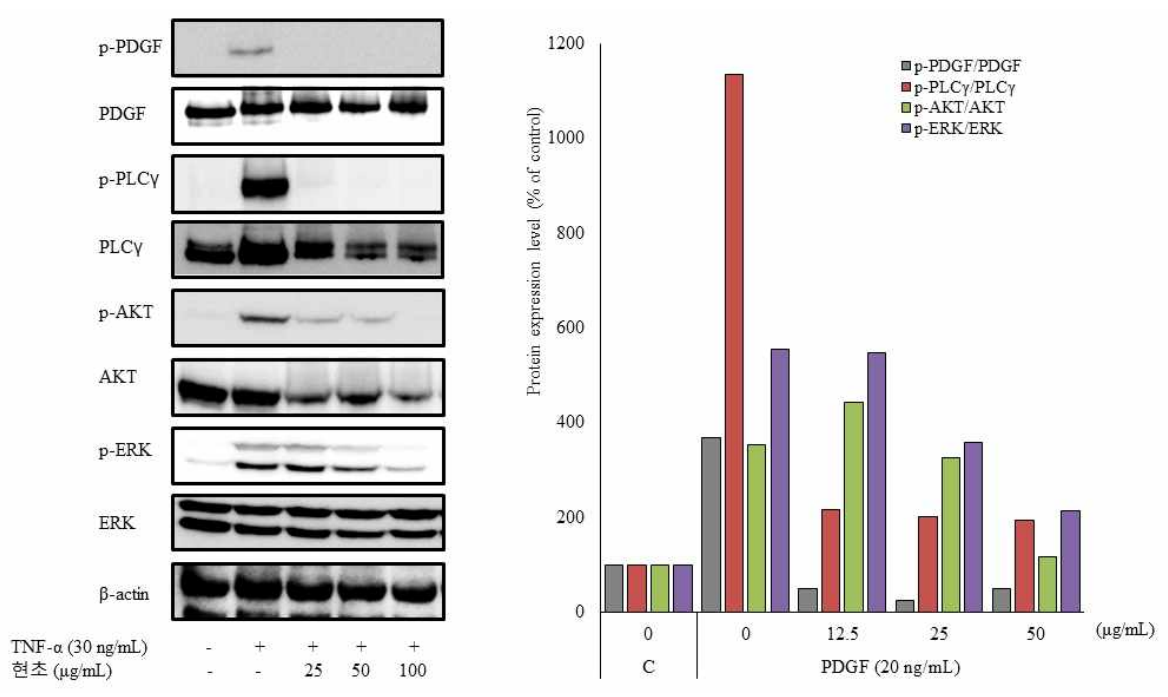
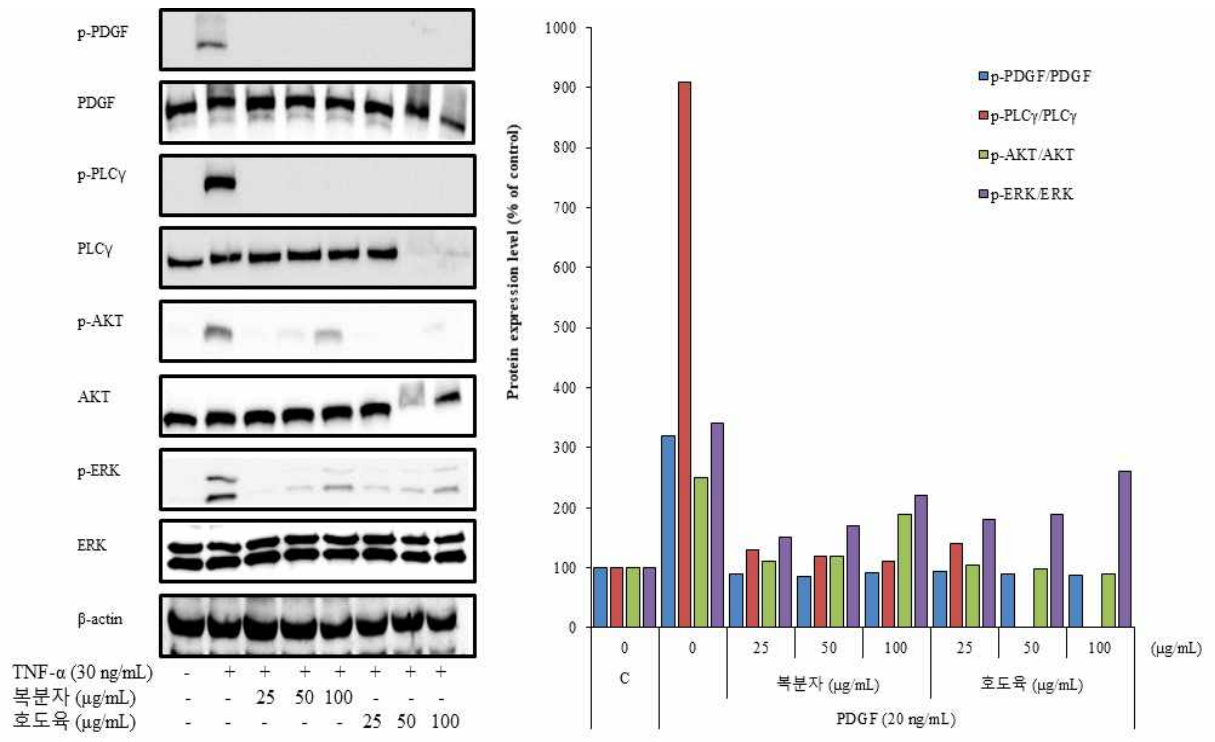


Fig. 16. Effects of herbal medicine on PDGF-induced signaling pathway in rat primary vascular smooth muscle cells.

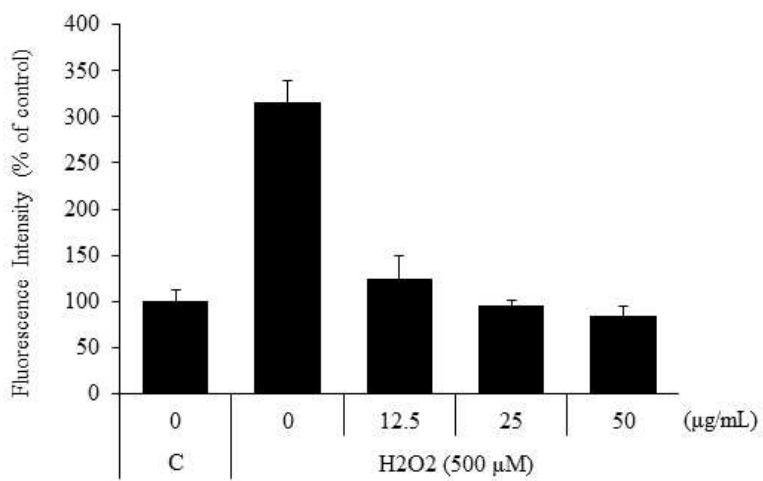
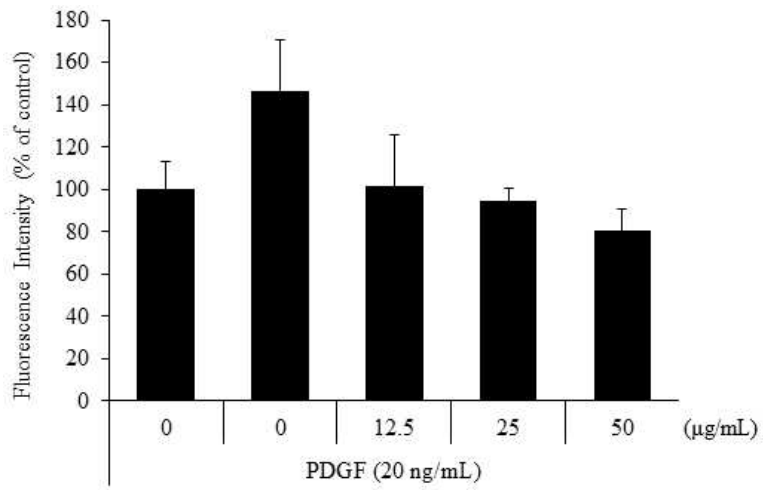


Fig. 17. Effects of herbal meicne on PDGF- or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stimulated reactive oxygen species production in vascular smooth muscle cells.

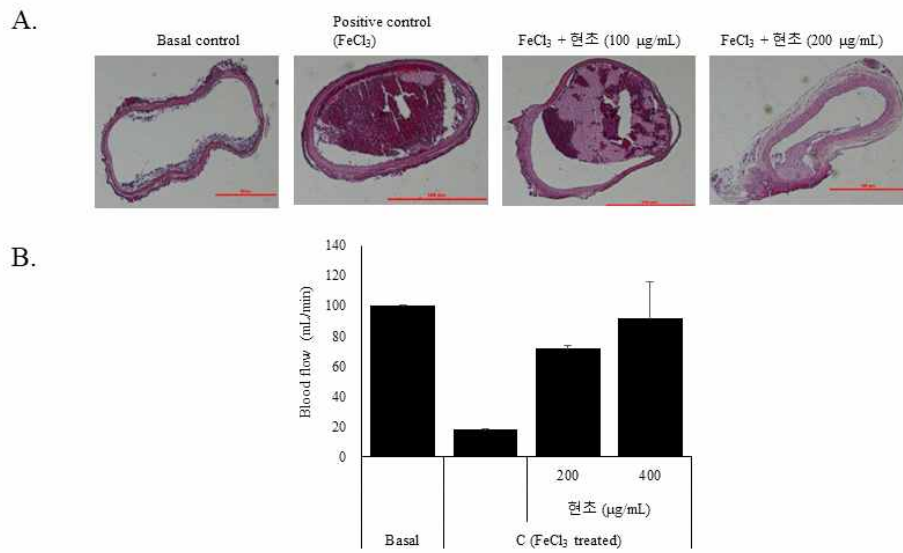


Fig. 18. Effects of herbal medicine on *in vivo* thrombosis model (A, H&E staining; B, Blood flow assessment).

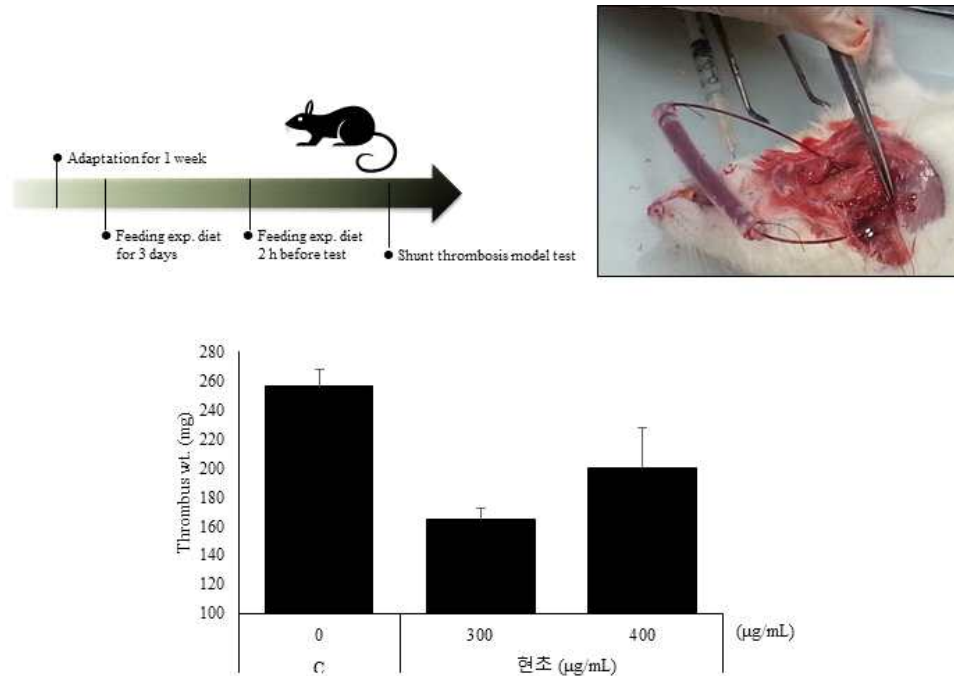


Fig. 19. Effect of herbal medicine on thrombus formation in arteriovenous shunt (AV-shunt) thrombosis model *in vivo*).

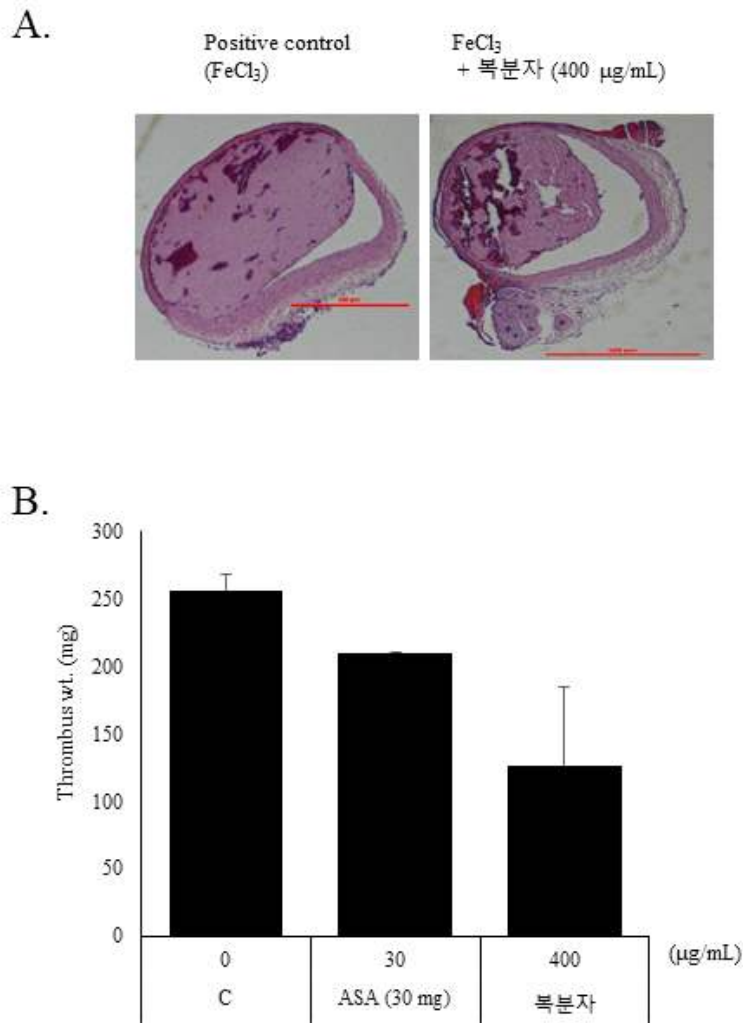


Fig. 20. Effect of herbal medicine on histological examination of FeCl<sub>3</sub>-induced thrombus (A) and thrombus weight of SMT on carotid arterial AV-shunt thrombosis model (B).

◎ 유효성분 분석

미백 및 혈행개선능 (혈관보호능)을 갖는 한약재 6종 (복분자, 현초, 호도육, 계지, 단삼) 의 성분프로파일 (chemical profile)을 조사하였다.

1. 계지 추출물로부터 지표 및 유효성분프로파일 조사

○ 원료의 제조

- (주)휴먼허브(<http://www.humanherb.co.kr/>)에서 구입한 중국산 계지(2.0kg)을 70% 에탄올 6L씩 60℃에서 24시간동안 침지하여 총 3회 반복 추출 시킨 후 실온에서 추출액을 수득하고, 여과한 여과물을 감압 회전농축기 (Vaccum rotary evaporator; 일본 Nihon Seikosa, VR-205c)로 용매를 증발시키는 감압 농축 및 동결 건조 과정을 통하여 원료를 206.6g(수율 10.3%) 수득함.

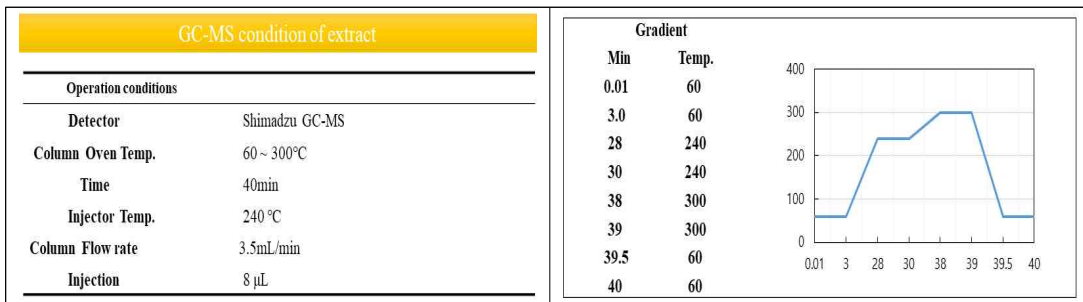
○ 지표 및 유효성분의 성분프로파일 조사

- 원료에서의 지표 및 유효성분의 함량 분석 및 분자량 확인을 위하여 기체크로마토그래피 (GC-MS; 일본 Shimadzu corporation사)를 이용하여 측정함.

1-1. 계지 추출물로부터의 성분프로파일 작성

○ 계지 추출물 성분프로파일 및 함량분석

- 계지 추출물 1.0g을 정밀하게 달아 물-에탄올 혼합액(3:7) 40ml를 넣어 초음파 처리한 다음 정확히 50ml로 하고 0.45µm 이하의 멤브레인필터로 여과하여 검액으로 함. 다음의 조건으로 기체크로마토그래프법에 따라 시험하여 검액의 피크 면적을 측정함.



- 성분비교 분석 결과

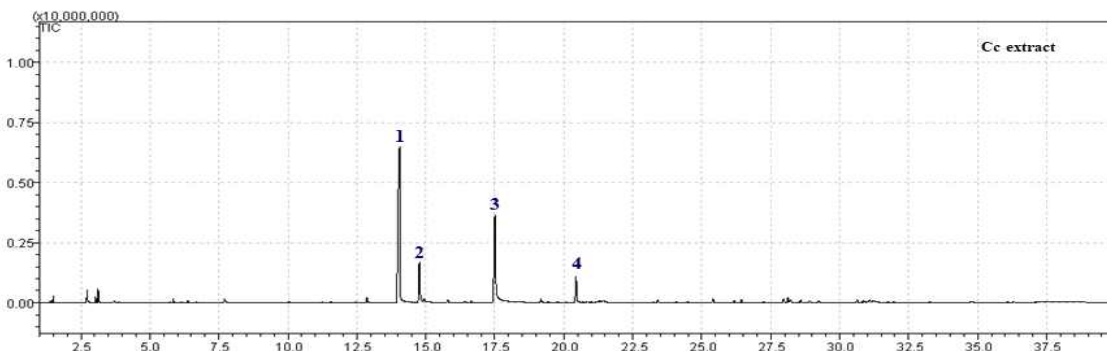
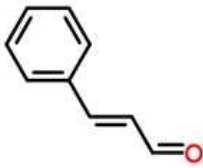


Fig. 1 계지 추출물 성분프로파일

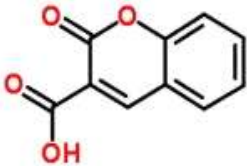
→ 계지 추출물에서 GC Mass spectra를 비교한 결과, 총 4개의 화합물로써 cinnamaldehyde(1), coumarin-3-carboxylic acid(2), benzenepropanoic acid(3),  $\beta$ -sitosterol(4)으로 예측되었으며, 추후 표준품과 GC retention time, MS값 및 NMR을 비교하여 최종 확인할 예정이다.

Compound 1 : Cinnamaldehyde



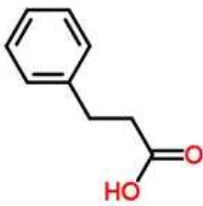
- 알데하이드계열의 화합물
- 분자식 :  $C_9H_8O$
- 분자량 : 132.16 g/mol

Compound 2 : Coumarin-3-carboxylic acid



- 유기산 계열의 화합물
- 분자식 :  $C_{10}H_6O_4$
- 분자량 : 190.15 g/mol

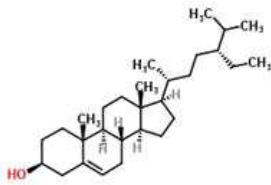
Compound 3 : Benzenepropanoic acid



- 유기산 계열의 화합물
- 분자식 :  $C_9H_{10}O_2$
- 분자량 : 150.17 g/mol

Compound 4 :  $\beta$ -sitosterol





- 스테로이드 계열의 화합물
- 분자식 : C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O
- 분자량 : 414.71 g/mol

→ 계지 추출물에서 GC Mass spectra를 이용하여 확인한 총 4개의 화합물 retention time 11.2분, 13.2분, 16.4분 및 21.2분 때의 피크면적을 측정함.

Table 1. 계지 추출물의 주요 성분 피크면적

구분 (피크면적)	1	2	3	4	비고
계지 추출물	6,832,941 (51.9%)	1,474,546 (11.2%)	4,133,995 (31.4%)	737,273 (5.6%)	

## 2. 단삼 추출물로부터 지표 및 유효성분프로파일 조사

### ○ 원료의 제조

- (주)휴먼허브(<http://www.humanherb.co.kr/>)에서 구입한 중국산 단삼(2.0kg)을 70% 에탄올 6L씩 60℃에서 24시간동안 침지하여 총 3회 반복 추출 시킨 후 실온에서 추출액을 수득하고, 여과한 여과물을 감압 회전농축기 (Vaccum rotary evaporator; 일본 Nihon Seiko사, VR-205c)로 용매를 증발시키는 감압 농축 및 동결 건조 과정을 통하여 원료를 334.2g(수율 16.7%) 수득함.

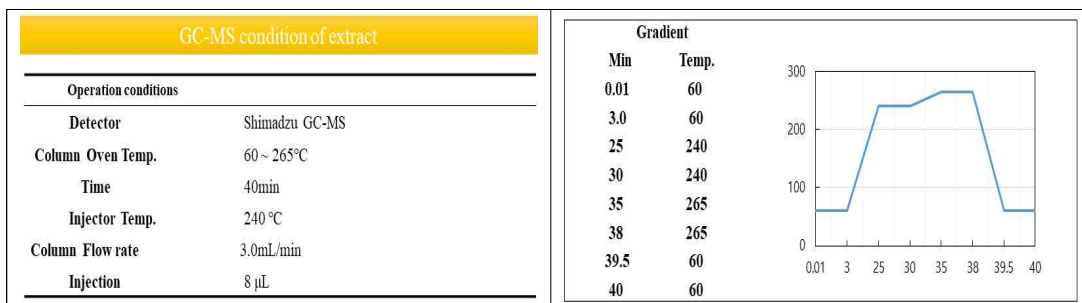
### ○ 지표 및 유효성분의 성분프로파일 조사

- 원료에서의 지표 및 유효성분의 함량 분석 및 분자량 확인을 위하여 기체크로마토그래피 (GC-MS; 일본 Shimadzu corporation사)를 이용하여 측정함.

### 2-1. 단삼 추출물로부터의 성분프로파일 작성

#### ○ 단삼 추출물 성분프로파일 및 함량분석

- 단삼 추출물 1.0g을 정밀하게 달아 물-에탄올 혼합액(3:7) 40ml를 넣어 초음파 처리한 다음 정확히 50ml로 하고 0.45μm 이하의 멤브레인필터로 여과하여 검액으로 함. 다음의 조건으로 기체크로마토그래프법에 따라 시험하여 검액의 피크 면적을 측정함.



- 성분비교 분석 결과

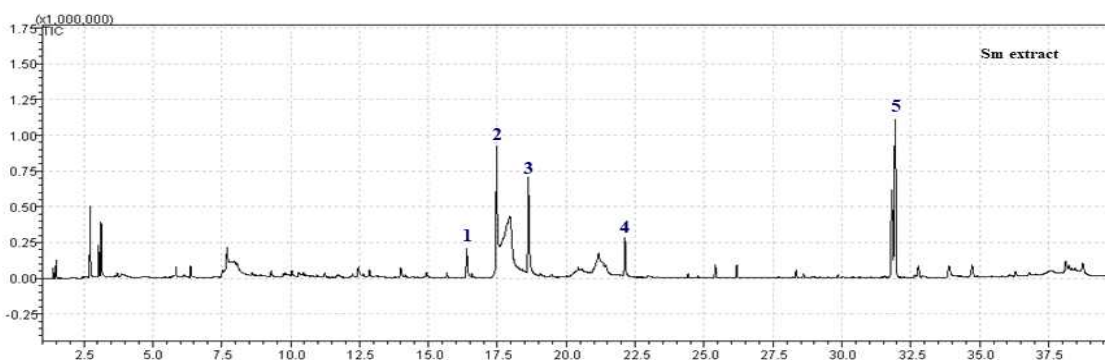
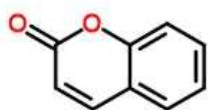


Fig. 1 단삼 추출물 성분프로파일

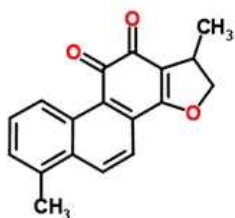
→ 단삼 추출물에서 GC Mass spectra를 비교한 결과, 총 4개의 화합물로서 coumarin(1), dihydrotanshinone(2), cryptotanshinone(3), isocryptotanshinone(4), ferruginol(5)으로 예측되었으며, 추후 표준품과 GC retention time, MS값 및 NMR을 비교하여 최종 확인할 예정이다.

Compound 1 : Coumarin



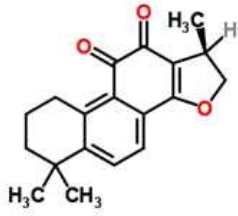
- 헤테로고리계열의 화합물
- 분자식 : C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>
- 분자량 : 146.14 g/mol

Compound 2 : Dihydrotanshinone



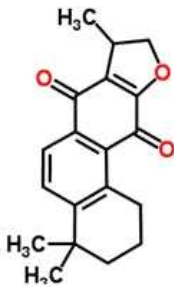
- 테르펜계열의 화합물
- 분자식 : C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>
- 분자량 : 278.30 g/mol

Compound 3 : Cryptotanshinone



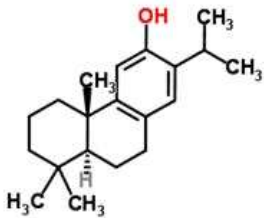
- 테르펜계열의 화합물
- 분자식 : C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>
- 분자량 : 296.36 g/mol

Compound 4 : Isocryptotanshinone



- 테르펜계열의 화합물
- 분자식 : C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>
- 분자량 : 296.36 g/mol

Compound 5 : Ferruginol



- 테르펜계열의 화합물
- 분자식 : C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O
- 분자량 : 192.12 g/mol

→ 단삼 추출물에서 GC Mass spectra를 이용하여 확인한 총 4개의 화합물 retention time 16.3분, 17.5분, 18.6분, 22.2분 및 31.8분 때의 피크면적을 측정함.

Table 1. 단삼 추출물의 주요 성분 피크면적

구분 (피크면적)	1	2	3	4	5	비고
단삼 추출물	717,412 (3.4%)	4,114,569 (19.5%)	4,304,472 (20.4%)	1,329,322 (6.3%)	8,693,345 (41.2%)	

### 3. 복분자 추출물로부터 지표 및 유효성분프로파일 조사

#### ○ 원료의 제조

- (주)휴먼허브(<http://www.humanherb.co.kr/>)에서 구입한 중국산 복분자(2.0kg)를 70% 에탄올 6L씩 60℃에서 24시간동안 침지하여 총 3회 반복 추출 시킨 후 실온에서 추출액을 수득하고, 여과한 여과물을 감압 회전농축기 (Vaccum rotary evaporator; 일본 Nihon Seiko사, VR-205c)로 용매를 증발시키는 감압 농축 및 동결 건조 과정을 통하여 원료를 270.5g(수율 13.5%) 수득함.

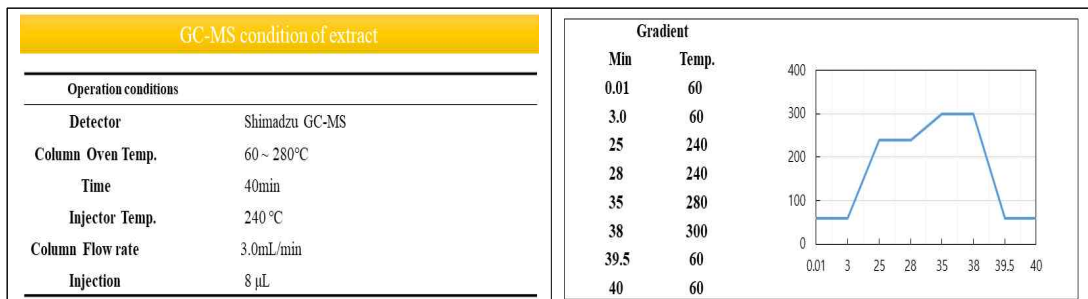
#### ○ 지표 및 유효성분의 성분프로파일 조사

- 원료에서의 지표 및 유효성분의 함량 분석 및 분자량 확인을 위하여 기체크로마토그래피 (GC-MS; 일본 Shimadzu corporation사)를 이용하여 측정함.

#### 3-1. 복분자 추출물로부터의 성분프로파일 작성

##### ○ 복분자 추출물 성분프로파일 및 함량분석

- 복분자 추출물 1.0g을 정밀하게 달아 물-에탄올 혼합액(3:7) 40ml를 넣어 초음파 처리한 다음 정확히 50ml로 하고 0.45 $\mu$ m 이하의 멤브레인필터로 여과하여 검액으로 함. 다음의 조건으로 기체크로마토그래프법에 따라 시험하여 검액의 피크 면적을 측정함.



#### - 성분비교 분석 결과

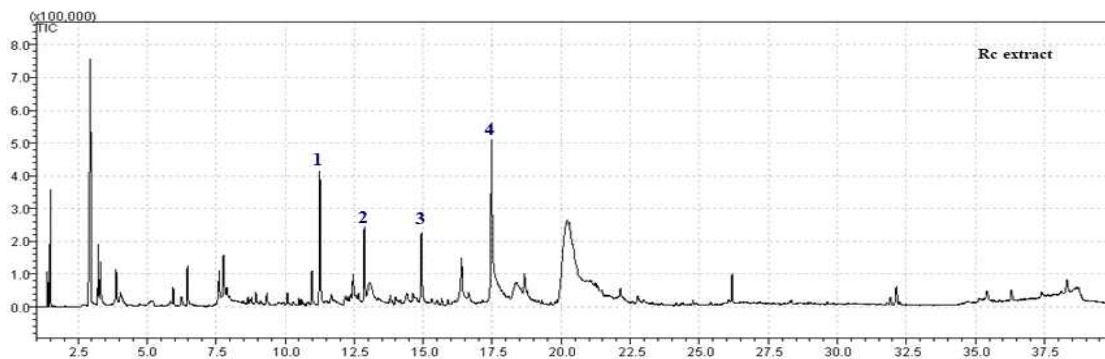
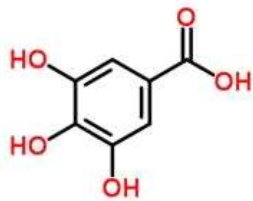


Fig. 1 복분자 추출물 성분프로파일

→ 복분자 추출물에서 GC Mass spectra를 비교한 결과, 총 4개의 화합물로서 gallic acid(1), coumaran(2), 2-methoxy-4-vinylphenol(3), Aromadendrene(4)

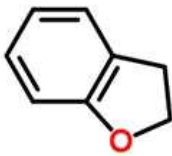
으로 예측되었으며, 추후 표준품과 GC retention time, MS값 및 NMR을 비교하여 최종 확인할 예정이다.

Compound 1 : Gallic acid



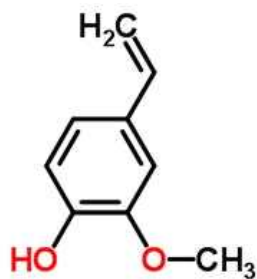
- 유기산 계열의 화합물
- 분자식 :  $C_7H_6O_5$
- 분자량 : 170.12 g/mol

Compound 2 : Coumaran



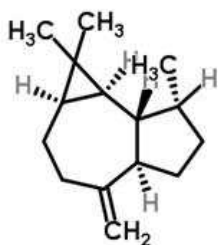
- 헤테로고리계열의 화합물
- 분자식 :  $C_8H_8O$
- 분자량 : 120.15 g/mol

Compound 3 : 2-methoxy-4-vinylphenol



- 벤젠계열의 화합물
- 분자식 :  $C_9H_{10}O_2$
- 분자량 : 150.17 g/mol

Compound 4 : Aromadendrene



- 테르펜계열의 화합물
- 분자식 :  $C_{15}H_{24}$
- 분자량 : 204.35 g/mol

→ 복분자 추출물에서 GC Mass spectra를 이용하여 확인한 총 4개의 화합물 retention time 11.3분, 12.8분, 14.9분 및 17.5분 때의 피크면적을 측정함.

Table 1. 복분자 추출물의 주요 성분 피크면적

구분 (피크면적)	1	2	3	4	비고
복분자 추출물	17,211,676 (18.5%)	5,861,273 (6.3%)	10,047,897 (10.8%)	26,515,285 (28.5%)	

#### 4. 호도육 추출물로부터 지표 및 유효성분프로파일 조사

##### ○ 원료의 제조

- 삼흥건재약업사에서 구입한 미국산 호도육(2.0kg)을 70% 에탄올 6L씩 60℃에서 24시간 동안 침지하여 총 3회 반복 추출 시킨 후 실온에서 추출액을 수득하고, 여과한 여과물을 감압 회전농축기 (Vaccum rotary evaporator; 일본 Nihon Seiko사, VR-205c)로 용매를 증발시키는 감압 농축 및 동결 건조 과정을 통하여 원료를 198.5g(수율 9.9%) 수득함.

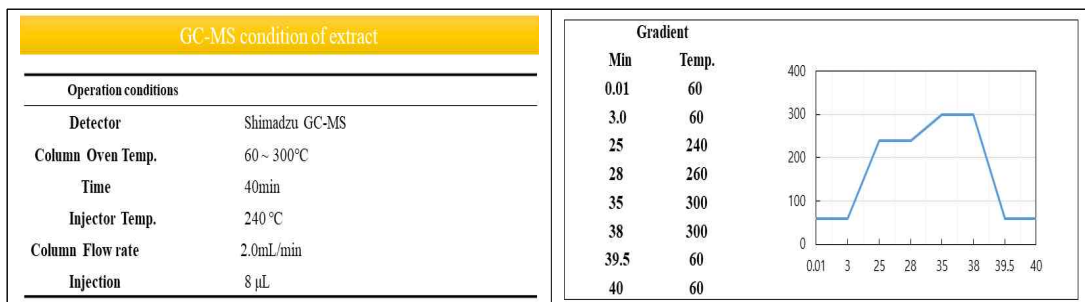
##### ○ 지표 및 유효성분의 성분프로파일 조사

- 원료에서의 지표 및 유효성분의 함량 분석 및 분자량 확인을 위하여 기체크로마토그래피 (GC-MS; 일본 Shimadzu corporation사)를 이용하여 측정함.

#### 4-1. 호도육 추출물로부터의 성분프로파일 작성

##### ○ 호도육 추출물 성분프로파일 및 함량분석

- 호도육 추출물 1.0g을 정밀하게 달아 물-에탄올 혼합액(3:7) 40ml를 넣어 초음파 처리한 다음 정확히 50ml로 하고 0.45 $\mu$ m 이하의 멤브레인필터로 여과하여 검액으로 함. 다음의 조건으로 기체크로마토그래프법에 따라 시험하여 검액의 피크 면적을 측정함.



- 성분비교 분석 결과

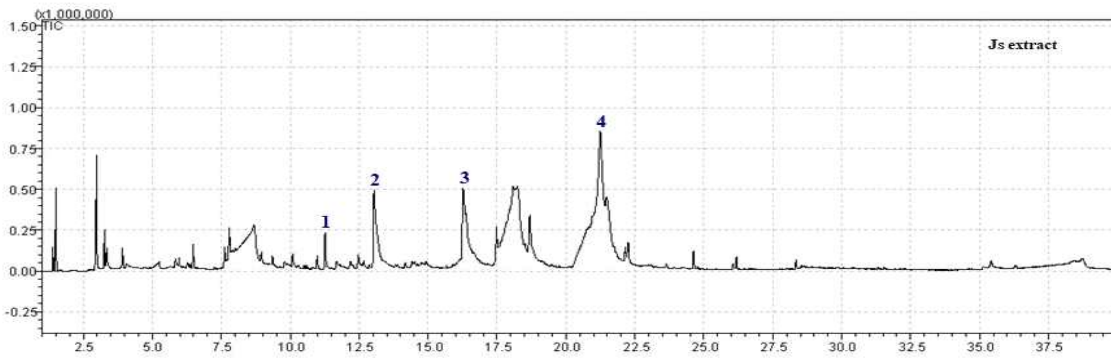
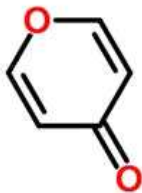


Fig. 1 호도육 추출물 성분프로파일

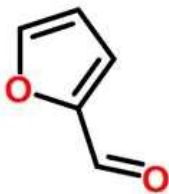
→ 호도육 추출물에서 GC Mass spectra를 비교한 결과, 총 4개의 화합물로서 4H-Pyran-4-one(1), 2-Furancarboxaldehyde(2), pyrogallol(3), α-D-glucopyranoside(4)으로 예측되었으며, 추후 표준품과 GC retention time, MS값 및 NMR을 비교하여 최종 확인할 예정입니다.

Compound 1 : 4H-Pyran-4-one



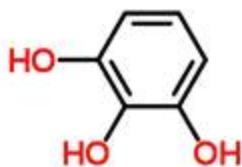
- 헤테로고리계열의 화합물
- 분자식 :  $C_5H_4O_2$
- 분자량 : 96.08 g/mol

Compound 2 : 2-Furancarboxaldehyde(=Furfural)



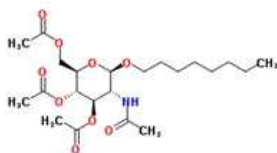
- 알데하이드계열의 화합물
- 분자식 :  $C_5H_4O_2$
- 분자량 : 96.08 g/mol

Compound 3 : Pyrogallol



- 페놀계열의 화합물
- 분자식 :  $C_6H_6O_3$
- 분자량 : 126.11 g/mol

Compound 4 : α-D-glucopyranoside



- 다당류 계열의 화합물
- 분자식 : C<sub>22</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>9</sub>
- 분자량 : 459.53 g/mol

→ 호도육 추출물에서 GC Mass spectra를 이용하여 확인한 총 4개의 화합물 retention time 11.2분, 13.2분, 16.4분 및 21.2분 때의 피크면적을 측정함.

Table 1. 호도육 추출물의 주요 성분 피크면적

구분 (피크면적)	1	2	3	4	비고
호도육 추출물	1,125,749 (2.9%)	4,930,004 (12.7%)	5,162,918 (13.3%)	18,011,984 (46.4%)	

5. 현초 추출물로부터 지표 및 유효성분프로파일 조사

○ 원료의 제조

- (주)휴먼허브(<http://www.humanherb.co.kr/>)에서 구입한 국내산 현초(2.0kg)를 70% 에탄올 6L씩 60℃에서 24시간동안 침지하여 총 3회 반복 추출 시킨 후 실온에서 추출액을 수득하고, 여과한 여과물을 감압 회전농축기 (Vaccum rotary evaporator; 일본 Nihon Seiko사, VR-205c)로 용매를 증발시키는 감압 농축 및 동결 건조 과정을 통하여 원료를 315.8g(수율 15.8%) 수득함.

○ 지표 및 유효성분의 성분프로파일 조사

- 원료에서의 지표 및 유효성분의 함량 분석 및 분자량 확인을 위하여 기체크로마토그래피 (GC-MS; 일본 Shimadzu corporation사)를 이용하여 측정함.

5-1. 현초 추출물로부터의 성분프로파일 작성

○ 현초 추출물 성분프로파일 및 함량분석

- 현초 추출물 1.0g을 정밀하게 달아 물-에탄올 혼합액(3:7) 40ml를 넣어 초음파 처리한 다음 정확히 50ml로 하고 0.45µm 이하의 멤브레인필터로 여과하여 검액으로 함. 다음의 조건으로 기체크로마토그래프법에 따라 시험하여 검액의 피크 면적을 측정함.



GC-MS condition of extract	
Operation conditions	
Detector	Shimadzu GC-MS
Column Oven Temp.	60 ~ 280°C
Time	40min
Injector Temp.	240 °C
Column Flow rate	1.8 mL/min
Injection	8 µL

Gradient	
Min	Temp.
0.01	60
3.50	60
29	240
34	240
37	280
39	280
40	60

- 성분비교 분석 결과

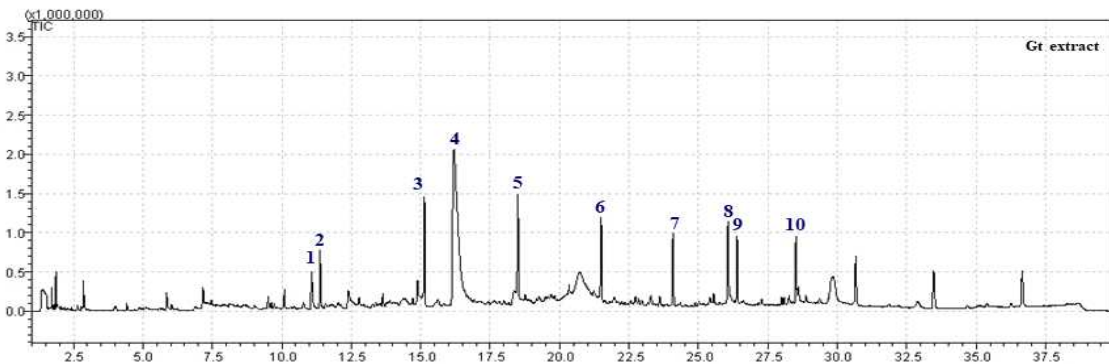
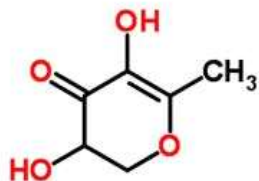


Fig. 1 현초 추출물 성분프로파일

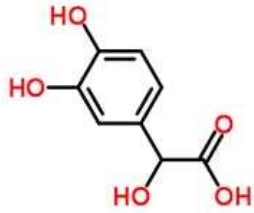
→ 현초 추출물에서 GC Mass spectra를 비교한 결과, 총 10개의 화합물로서 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one(1), 3,4-Dihydroxymandelic acid(2), p-Hydroxybenzoic acid(3), pyrogallol tannin (4), tetradecamethyl cycloheptasiloxane(5), hexadecamethyl cyclooctasiloxane(6), quercetin(7), ascorbic acid(8), kaempferol(9), afzelin(10)으로 예측되었으며, 추후 표준품과 GC retention time, MS값 및 NMR을 비교하여 최종 확인할 예정이다.

Compound 1 : 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one



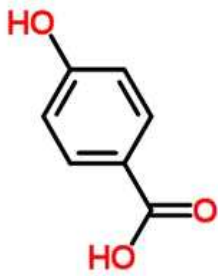
- 사포닌계열의 화합물
- 분자식 : C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>
- 분자량 : 144.13 g/mol

Compound 2 : 3,4-Dihydroxymandelic acid



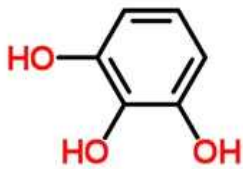
- 페놀계열의 화합물
- 분자식 :  $C_8H_8O_5$
- 분자량 : 184.15 g/mol

Compound 3 : P-Hydroxybenzoic acid



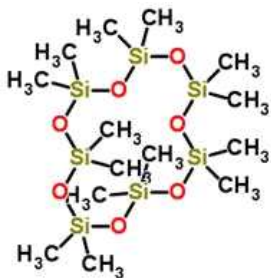
- 페놀계열의 화합물
- 분자식 :  $C_7H_6O_3$
- 분자량 : 138.12 g/mol

Compound 4 : Pyrogallol tannin



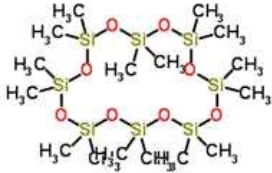
- 탄닌계열의 화합물
- 분자식 :  $C_6H_6O_3$
- 분자량 : 126.11 g/mol

Compound 5 : Tetradecamethyl cycloheptasiloxane



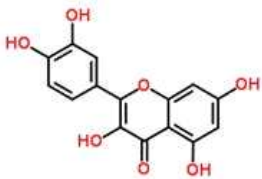
- 유기산 계열의 화합물
- 분자식 :  $C_{14}H_{42}O_7Si_7$
- 분자량 : 519.08 g/mol

Compound 6 : Hexadecamethyl cyclooctasiloxane



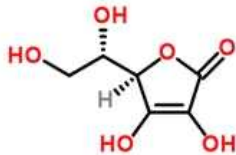
- 유기산 계열의 화합물
- 분자식 :  $C_{16}H_{48}O_8Si_8$
- 분자량 : 593.23 g/mol

Compound 7 : Quercetin



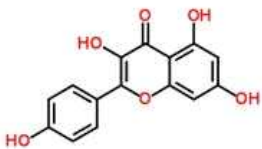
- 플라보노이드계열의 화합물
- 분자식 :  $C_{15}H_{10}O_7$
- 분자량 : 302.24 g/mol

Compound 8 : Ascorbic acid



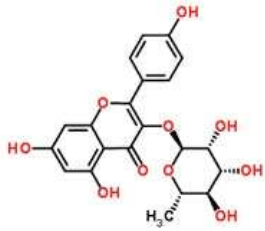
- 유기산 계열의 화합물
- 분자식 :  $C_6H_8O_6$
- 분자량 : 176.12 g/mol

Compound 9 : Kaempferol



- 플라보노이드계열의 화합물
- 분자식 :  $C_{15}H_{10}O_6$
- 분자량 : 286.24 g/mol

Compound 10 : Afzelin



- 플라보노이드계열의 화합물
- 분자식 : C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>10</sub>
- 분자량 : 432.38 g/mol

→ 현초 추출물에서 GC Mass spectra를 이용하여 확인한 총 10개의 화합물 retention time 11.1분, 11.3분, 15.2분, 16.3분, 18.5분, 18.5분, 24.1분, 26.1분, 26.4분, 및 28.4분 때의 피크면적을 측정함.

Table 1. 현초 추출물의 주요 성분 피크면적

구분 (피크면적)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
현초 추출물	1,186,237 (1.5%)	3,005,135 (3.8%)	6,010,270 (7.6%)	30,367,680 (38.4%)	7,512,838 (9.5%)	5,061,280 (6.4%)	3,954,125 (5.0%)	4,982,197 (6.3%)	3,795,960 (4.8%)	3,943,759 (5.0%)

## ○ 연구결과 요약정리

### ◎ 2상해독효소계 유도활성을 갖는 한약재의 혈행개선 관련대사 상에서의 효능 평가

- 한약재 384종의 2상해독효소계 유도능을 평가한 결과 14종 (감수, 원화, 도경, 목향, 파두, 학슬, 삼백초, 감송향, 측백엽, 청호, 구절초, 한인진)의 농도의존적 증가된 ARE-luciferase 활성을 확인함.
- 식품으로 이용가능한 도경의 혈행개선 관련효능 (혈소판 응집 저해, 콜레스테롤 합성효소 활성저해, 산화LDL 생성저해, 혈관내피세포 염증반응 저해, 혈관평활근세포 증식 및 이주 저해, *n vivo* 혈전동물모델에서의 혈전형성지연효과 확인)

### ◎ 혈관보호 효능을 갖는 것으로 알려진 한약재의 혈행개선 관련대사 상에서의 효능 평가

- 혈관에 유효한 효능을 가진 것으로 알려진 한약재 16종 (강활, 갈근, 계지, 구인, 만병초, 금은화, 목통, 단삼, 두충)을 선정하여, 이들의 혈행개선 효능을 검증함.
- 강활, 계지, 만병초, 단삼의 혈소판 응집 저해능이 탁월함을 확인
- 혈행장애를 유발할 수 있는 혈관내 염증반응 및 혈관평활근세포 증식과 이주, 관련대사 상에서 강활, 계지, 단삼의 저해능이 우수함. 만병초의 경우, 고농도에서 독성이 발견되어 제외함, 강활은 약용으로만 가능하여 본 연구의 개발대상에서 제외함.

### ◎ 미백효능을 가지는 한약재 (복분자, 호도육, 현초)의 혈행개선 관련대사에서의 효능 평가

- 1차년도에서 미백효능을 갖는 한약재로 선정된 복분자, 호도육, 현초의 혈행개선 관련대사에서의 효능을 검증함.
- 3가지 한약재 모두 혈소판 응집/LDL산화/콜레스테롤 합성효소 활성/혈관내 염증반응/혈관평활근세포증식 및 이주, 관련대사/ROS 생성/*in vivo* 혈전 상에서의 저해효능이 탁월함.

### ◎ 유효성분 분석

각 한약재 추출물에서 GC Mass spectra를 비교한 결과,

- 계지: cinnamaldehyde, coumarin-3-carboxylic acid, benzenepropanoic acid,  $\beta$ -sitosterol
- 단삼: coumarin, dihydrotanshinone, cryptotanshinone, isocryptotanshinone, ferruginol
- 복분자: gallic acid, coumaran, 2-methoxy-4-vinylphenol, Aromadendrene
- 호도육: 4H-Pyran-4-one, 2-Furancarboxaldehyde, pyrogallol,  $\alpha$ -D-glucopyranoside
- 현초: 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one, 3,4-Dihydroxymandelic acid,

p-Hydroxybenzoic acid, pyrogallol tannin, tetradecamethyl cycloheptasiloxane, hexadecamethyl cyclooctasiloxane, quercetin, ascorbic acid, kaempferol, afzelin

으로 예측되었으며, 이후 표준품과 GC retention time, MS값 및 NMR을 비교하여 최종 확인할 예정입니다.

\*\*\*\* 본 연구를 통하여,

- 한약재의 혈행개선효능을 밝히기 위한 in vivo system 3종을 구축함.  
화합물이 아닌, 한약재 추출물의 효능을 감지하기 위한 최적 실험조건 구축  
인체검사와 동일한 기기 (소동물대상 초음파기기)를 이용한 animal imaging research 시도 및 구축
- 식약처에서 제시한 혈행개선 관련 실험틀 뿐만 아니라, 혈행장애로 나타나는 대표적 만성혈류장애질환을 대상으로 한 한약재의 유효효능 검증
- 식품으로 사용할 수 있는 부위 제한 및 독성 또는 활성이 낮은 한약재는 개발대상에서 제외함 (도경, 강활, 만병초)
- 본 연구개발을 위하여 미백 및 혈행개선용 한약재 5종 (복분자, 호도육, 현초, 계지, 단삼) 최종확정함.
- 관련 한약재 5종 각각의 혈행개선관련 효능은 대부분은 특허로 발표되어 있음.
  - 현초(이질풀): 향동맥경화능 (KR2016-0094073), 항혈전능 (KR2016-0094073)
  - 계지(육계): 향동맥경화능 (KR2016-0129809), 항혈전능 (KR1543761), 혈행개선 (CN104857459)
  - 복분자: 향동맥경화능 (KR1320371), 항혈전능 (KR2014-0002493), 혈행개선 (KR2014-0002493)

단, 각 한약재의 혈행개선 관련대사 상에서의 보호효능은 아직 알려진 바가 없음. 본 연구는

혈행장애 유도 조건에서 각 한약재의 개선효능을 관련대사 상에서도 살펴봄. 따라서, 본 결과는 논문화가 가능하며, 학술대회를 통해서도 발표함.

각 단미별 혈행 및 혈관보호능 관련 효능이 일부 특허화되어 있으나, 각 단미한약재의 효능과 5종이 함유된 복합추출물 (신조성 추출물)의 효능을 비교하여, 복합추출물의 효능이 더 우수함을 증명하고자 함. 단미 대비 복합추출물의 효능이 우수할 경우 특허 등록의 가능성이 높음을 특허사무소를 통해 확인함.

- 한약재 5종 (복분자, 호도육, 현초, 계지, 단삼) 추출물 확보하여 최적 배합비를 이용한 레시피 작성.

최적 배합비를 이용한 레시피의 혈행개선 효능 검증중에 있음.

### 3. 3차년도 한약진흥재단 연구결과

○ 항산화, 미백, 혈행 개선 활성평가를 위한 실험방법

#### 총 페놀 함량 측정

총 페놀 함량의 측정을 위해 Folin-Ciocalteu assay 방법을 사용하였다. 이 방법은 alkali solution (5~10%의 soluble sodium carbonate)에서 tungstate와 molybdate의 혼합물을 이용하는 것으로 phenolic compound는 산화되어  $O_2^-$ 를 형성하여 molybdate와 반응하여 molybdenum oxide ( $MoO_4^{4-}$ )를 형성하는데 이렇게 형성된 물질을 750 nm에서 측정하였으며, gallic acid equivalents (GAE)로 나타내었다.

#### DPPH radical scavenging activity

분석법의 원리는 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazylradical (DPPH\*)에 대한 항산화제의 환원능력을 측정하는 데 근거하고 있다. 515 nm에서 DPPH의 색깔이 소실되는 정도를 측정하여 남아 있는 DPPH의 함량은 다음과 같이 계산하였으며, 이것은 항산화제 농도와 비례한다.

$$\text{환산식: \% DPPH*REM} = 100 \times [\text{DPPH*}]_{\text{REM}} / [\text{DPPH*}]_{\text{T=0}}$$

#### ABTS 라디칼 소거능 측정

7 mM ABTS 용액과 2.45 mM potassium persulfate (final conc.)를 혼합하여 상온, 빛 차단하여 shaking incubator에서 12시간 반응시켜 라디칼을 생성시키고 EtOH로 415 nm 흡광도가  $0.7 \pm 0.02$ 가 되도록 EtOH (100%)로 희석하였다. 250  $\mu$ L ABTS 용액과 28  $\mu$ L sample을 혼합하여 상온에서 5분동안 반응시킨 후, 분광광도계 (750 nm)를 이용해 흡광도를 측정하였다. Trolox를 positive control로 사용하였다.

$$\text{계산식: } I_{ABTS^{o+}}\% = \left[ \frac{A_{control} - (A_{sample} - A_{blank})}{A_{control}} \right] \times 100$$

#### FRAP assay

Ferric 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) 시약이 산화반응에 의하여 2가의 철이 3가로 산화되면서 colored product로 전환되는 원리를 이용한 것이다. 그러나 radical quenching (수소 전이)에 의하여 작용하는 화합물 (예, thiols, 단백질)의 항산화활성을 측정하지 못하는 결점을 가지고 있다. Ferrous sulphate를 사용하여 1 mM 용액 (0.278 g  $FeSO_4 \cdot 7H_2O/L$ )을 제조후 표준 용액으로 사용하였으며, FRAP 용액은 300 mM acetate buffer (pH 3.6) 200 mL, 10 mM TPTZ 용액 20 mL, 20 mM  $FeCl_3$  용액 20 mL, 24 mL 멸균수를 섞어 제조한 37°C를 유지시켜 사용하였다. 96-well plate를 사용하여 well 당 멸균수 170  $\mu$ L, standard와 시료용액 7  $\mu$ L와 30  $\mu$ L FRAP 용액을 섞어준 다음, 4분 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. FRAP level은 흡광도 값의 표준용액에 대한 선형회귀분석을 통해 산출하였다.



## ORAC assay

Peroxy radical의 생성과 소멸에 의한 fluorescent의 감소율 변화를 측정하여 항산화 활성을 평가하는 ORAC( oxygen radical absorbance capacity) assay)을 적용하였다. 본 실험에 사용된 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH), fluorescein 및 trolox는 Aldrich Chemical에서 구입하였고, 검액 및 표준액의 농도 별 회석과 실험용 시액의 제조에는 phosphate buffer를 사용하였다. 형광의 감소량 측정은 37°C에서 60분 동안 2분 간격으로 형광이 95% 감소될 때까지 기록하였으며, 그 측정은 fluorescent microplate reader (Synergy HT plate reader, BIO-TEK)에서 여기 및 방출 파장을 각각 485 nm와 530 nm로 하여 사용하였다.

## 2'7'-dichlorofluorescein (DCF) assay

HepG<sub>2</sub> cell을 glass coverslip (12 mm, dia.)상에 plating ( $2 \times 10^4$  cells)하고, 24시간후, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200  $\mu$ M)을 2시간 동안 처리한 이후에 시료를 24시간동안 처리하여 배양하였다. PBS로 2번 세척한 후, DCF-DA solution (50  $\mu$ M)을 세포에 주입하여 37°C에서 30분간 배양하였다. PBS로 다시 2번 세척하고, mounting하여 형광현미경을 통해 형광도를 측정하였다.

## HepG2-C8 세포에서의 luciferase 유도활성 측정

ARE-luciferase construct로 transfection하여 제조된 세포를 6-well plate ( $5 \times 10^5$  cells/well)에 seeding하고, 16시간동안 배양한다. 0.5% FBS를 함유한 배지로 교환하고 12시간 후에 시료를 처리하여 12-24시간 배양한다. Luciferase activity는 Promega에서 제시한 방법에 따라 분석한다.

## 4-2. 미백 · 피부혈행개선 활성 평가방법

Human normal melanocyte (Life Technology)는 penicillin(100 IU/ml)/ streptomycin(50  $\mu$ g/ml)을 함유한 254 medium (1% human melanocyte growth supplement (HMGS) 포함) 용액으로 37°C로 유지되는 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한다.

## 세포독성 측정

세포( $1 \times 10^4$  cells/ml) 200  $\mu$ l를 96-well plate에 가하고 시료를 처리하고 72시간 배양한 후 배양액을 모두 제거한다. 사용하기 30분 전에 제조한 500  $\mu$ g/ml MTT를 각 well에 200  $\mu$ l씩 가하고, 어두운 곳에서 4시간 배양한다. 배양이 끝난 후 상층액은 버리고, DMSO를 200  $\mu$ l가 하여 생성된 MTT formazan을 완전히 용해시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정한다.

## 기질에 따른 tyrosinase 측정

Tyrosinase 활성 측정 시 기질은 L-tyrosine과 L-DOPA를 사용하였다. L-DOPA를 기질로 사용할 때 반응이 신속하게 일어나므로 효소의 양을 줄여서 실험한다. 기질 농도로

L-tyrosine은 0.3 mg/ml, L-DOPA는 2 mg/ml를 potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.8)로 완전히 녹이고 tyrosinase는 125 units/ml과 25 units/ml 두 농도로 준비한다. L-tyrosine(0.3 mg/ml)과 L-DOPA(2 mg/ml)를 eppendorf tube에 450  $\mu$ l를 가하고 시료를 5  $\mu$ l를 가하여 최종 농도를 조절한다. Tyrosinase(기질이 L-tyrosine일 경우 125 units/ml, 기질이 L-DOPA일 경우 25 units/ml) 50  $\mu$ l를 처치한 후 37°C에서 각각 30분, 1시간 반응시킨 후 475 nm에서 흡광도를 측정한다.

#### 세포 내에서 tyrosinase 활성과 melanin 생성 측정

세포에 약물 처치 후 배양이 끝나면 1%(w/v) triton X-100을 함유한 10 mM phosphate buffer(pH 6.8)를 100  $\mu$ l를 가하고 5분간 shaking 한 후에 세포와 용액을 모두 eppendorf tube로 이전시키고 원심 분리하여 상층액은 tyrosinase 활성과 단백질 정량에 이용하고, cell pellet은 멜라닌 정량에 사용한다. 96-well plate에 약물 처치 후 얻은 상층액 40  $\mu$ l를 분주하고 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.2)에 녹인 2 mg/ml L-DOPA 200  $\mu$ l를 가하여 37°C에서 30분 동안 배양한다. Tyrosinase 에 의해 생성된 DOPA chrome은 475 nm에서 흡광도를 측정한다. Cell pellet은 1N NaOH 100  $\mu$ l와 증류수 200  $\mu$ l를 가하고 60°C에서 1시간 방치하여 melanin을 완전히 녹인 후 96 well plate에 200  $\mu$ l를 옮긴 후 405 nm에서 흡광도를 측정한다. Melanin 표준품으로 얻은 표준 검량 선을 이용하여 각 well에서 생성된 melanin 양을 산출한다.

#### Western blotting

ET-1 신호전달 경로 관련된 단백질 발현률 조사한다. 처리된 세포를 ice-cold PBS로 세척, 수거한 후, lysis buffer( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  50 mM, NaF 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  2 mM, HEPES 10 mM, and PMSF 1 mM)를 이용해 단백질을 분리하고, 14,000g에서 10 min동안 원심분리한 후, Laemmli buffer를 이용해 95°C에서 5분간 denaturation시킨다. 10% SDS-polyacrylamide gel을 이용해 200 V에서 1시간 동안 전기영동을 실시하고, nitrocellulose membranes(Amersham Biosciences, Freiburg, Germany)으로 transfer하고, membrane은 antibody와 incubation 한 후 chemiluminescence kit(Pierce, Waltham, MA, USA)를 이용해 exposure시킨 후, densitometry analysis를 이용해 band 정량한다.

#### 제브라피쉬 사육 및 평가

성숙 제브라피쉬는 14:10 시간의 낮과 밤의 주기로 28.5°C의 수온을 유지, 폐쇄 순환 여과 시스템을 갖춘 수조에서 사육하였다(Kimmel et al., 1995;Westerfield, 1993). 성숙 제브라피쉬는 20 L 수조에 3 ~ 5 마리 넣고 살아있는 브라인 쉬림프 (brine shrimp, San Francisco BayBrand, Inc., Newark, CA, USA)를 하루에 3번 먹이 한다. 적정 생육온도인 28.5°C의 수온을 유지한 어항에서 사육한다. 제브라피쉬 멜라닌 생성 저해 실험성숙 제브라 피쉬 암수를 수정란 채취 전날 수정란 채취용 수조에 넣고 다음날 수정란을 채취하고, 채취 된 수정란은 제브라피쉬 수정란 배양배지 (zebrafish embryo medium, 0.2 g sea salt/ L)에 넣고 24시간 발생 시킨 후, 각 샘플을 농도별로 처리하였다. 샘플 처리 시 코리온 (chorion)의 샘플 투과 정도를 증가시키기 위해 수정란의 코리온을 핀셋으로 구멍을 내어 처리 하고, 샘플 처리 후

24시간 이후 샘플의 독성이 나타난 수정란은 제거 하고, 나머지 수정란의 코리온을 완전 제거 후 다시 동일 농도의 샘플을 처리한다. 샘플 처리 48 시간 이후에 대조구 대비 샘플 처리구의 색소 발생 정도를 실제 현미경 (Leica Microsystems, Ernst-Leitz-Strasse, Germany)으로 관찰하여 확인한다.

#### 인체피부모델계를 이용한 시제품의 효능 검증 (Melanoderm assay)

The Labcyte Melano-Model (Japan Tissue Engineering Co., Ltd. Gamagori, AICHI, Japan)은 human three-dimensional tissue model로써, foreskin-derived human keratinocytes와 melanocytes가 nylon mesh basement membrane에 도포되어있다. Insert 부위에 부착되어 있는 인체유사피부조직은 24-well plate에 장착시킨다. 시료는 DMSO에 녹여 ET-1이 함유된 배지에 최종농도로 희석하여 insert 아래부위에 채워넣고, insert 부위에는 PBS로 채워둔다. 2일마다 배지를 교환시키고, 각 insert마다 사진을 찍어 멜라닌생성 변화를 기록한다. 14일간의 배양이 끝나면, membrane을 분리해내어 MTT assay, melanin content, protein lysis를 위해 사용한다. 사용법은 manual에 따른다.

#### 4-3. 혈행개선관련 활성평가를 위한 실험방법

##### HMG-CoA reductase 저해활성 평가

콜레스테롤 합성 억제 활성은 HMG-CoA reductase assay kit (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 in vitro에서 측정하였다. 간략하면, HMG-CoA reductase에 의해 HMG-CoA가 mevalonate로 환원될 때 NADPH가 NADP+로 산화되는 정도를 340 nm에서 15분간 흡광도의 변화로 측정하였다(Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA). Pravastatin을 positive control로 사용하여 시료의 저해 활성과 비교하였다. HMG-CoA reductase 활성 저해율(%)은 blank의 흡광도 변화 (100% 활성)에 대한 시료의 흡광도 변화로 계산하였다[저해율 (%) = (1-시료의 흡광도 변화/Blank의 흡광도 변화) ×100].

##### Human LDL 산화 억제효과 측정

Human LDL 0.5 mL (120 µg/mL)에 10mM PBS buffer (pH 7.4)를 1.5 mL, 0.1 mM CuSO4 40 및 용매 또는 시료 40 µL를 첨가하여 37°C에서 30분간 배양하였다. 여기에 20% TCA를 1.5mL, 0.05M NaOH에 녹인 0.67% TBA를 1.5 mL 첨가하였다. 반응 혼합액을 90°C에서 45분간 water bath에서 배양하고 차갑게 냉각한 후 2,000 x g에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 취하여 기포를 제거한 후 532 nm에서 흡광도를 측정하여 저해율을 구한 후 IC50 값으로 환산하였다.

##### 혈관세포 부착능 assay

TNF-α(30 ng/mL) 처리에 의해 유도된 단핵구와 혈관내피세포의 혈관접착능에 미치는 영향을 측정한다. 96-well plate를 사용하여 혈관내피세포에 시료추출물을 농도별로 1시간 전처리하

고, TNF- $\alpha$ (30 ng/mL)을 처리해서 18시간 배양한다. 단핵구는 10  $\mu$ M BCECF-AM을 배양액에 희석해서 1시간 동안 배양하고, PBS buffer로 세 번 washing 한 뒤, 원심분리기 후 suspension해서 혈관내피세포에 넣어서 1시간 동안 함께 배양한다. 부착이 이루어지지 않은 세포를 제거하기 위해서 PBS buffer로 세 번 washing하고 fluorescence microplate reader를 사용하여, excitation 파장 485 nm와 emission 파장 535 nm에서 BCECF 형광도를 측정한다.

#### 혈관부착분자 발현을 측정

혈관내피세포에 TNF- $\alpha$ (30 ng/mL)와 시료를 농도별로 처리하고, 18시간 배양 후, 세포를 RIPA buffer로 lysis하여 western blotting으로 혈관부착분자 발현 평가

#### 혈관 평활근세포 배양

Rat 대동맥에서 분리한 primary 혈관평활근세포 이용한다. 혈관평활근세포는 growth supplement가 함유된 DMEM를 이용해, 5% CO<sub>2</sub>와 37°C가 유지되는 incubator에서 배양한다. 실험을 위한 혈관평활근세포는 80-90%의 density 상에서 사용하고, 24시간 동안 starvation으로 성장을 제한한 것을 이용

#### DNA synthesis assay

혈관평활근세포를 96well plate에 10,000 cells/well로 seeding후, 10 % FBS-DMEM에서 세포밀도가 80%에 이를 때까지 배양한다. 무혈청 배지로 교환하고, 24시간 다시 배양하고, 시료 및 PDGF(20 ng/mL)를 처리한 세포(n=3)는 20시간 배양 후 BrdU assay kit를 이용해 DNA synthesis량을 측정한다.

#### Cell Migration (Wound healing) assay

PDGF-의존적 chemotaxis는 modified boyden transwell chamber를 이용하여 실행한다. 혈관평활근세포(35,000 cells/well)는 transwell의 상층 chamber에 seeding 하고, 하층 chamber에는 실험용 시약으로 채운다. 세포는 24시간 동안 이주할 수 있도록 배양시킨 후, insert를 제거한다. 상층 chamber에서 이주하지 않고 머물러 세포들은 제거하고, bottom membrane에 있는 세포들은 4  $\mu$ g/mL calcein AM 으로 1시간동안 염색한다. 이주한 세포들의 수는 형광현미경(excitation 485nm, emission 530nm)을 이용하여 염색된 세포의 수를 counting한다.

#### Western blotting

PDGF 관련신호전달 경로 관련된 단백질 발현을 조사한다. 혈관평활근세포를 ice-cold PBS로 세척, 수거한 후, lysis buffer(Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>10H<sub>2</sub>O 50 mM, NaF 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA 5

mM, EGTA 5 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM, HEPES 10 mM, and PMSF 1 mM)를 이용해 단백질을 분리하고, 14,000g에서 10 min동안 원심분리한 후, Laemmli buffer를 이용해 95°C에서 5분간 denaturation시킨다. 10% SDS-polyacrylamide gel을 이용해 200 V에서 1시간 동안 전기영동을 실시하고, nitrocellulose membranes(Amersham Biosciences, Freiburg, Germany)으로 transfer하고, membrane은 antibody와 incubation 한 후 chemiluminescence kit(Pierce, Waltham, MA, USA)를 이용해 exposure시킨 후, densitometry analysis를 이용해 band 정량한다.

#### *ex vivo* 혈소판 응집능 평가

콜라겐을 이용하여 랫드 혈소판의 응집을 유도하고, 본 발명의 조성물에서 호장근과 계심의 혼합비율에 따른 혈소판 응집 저해능을 다음과 같이 비교하였다. 실험에는 코아텍에서 분양받은 SD 랫드(Sprague-Dawley rat, male, 220g)를 사용하였다. SD 랫드는 1주간의 적응기를 가진 후, 복대동맥으로부터 혈액을 채취하였다. 채취된 혈액 5ml에 타이로이드 완충액(thyroid buffer; 137mM NaCl, 12mM NaHCO<sub>3</sub>, 5.5mM glucose, 1M MgCl<sub>2</sub>, 1M KCl 및 1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4) 2ml를 첨가하고 1,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 혈구가 제거된 상등액(혈소판풍부혈장, PRP, Platelet rich plasma)을 800×g에서 15분간 원심분리하고, 침전된 혈소판을 세척 완충액(washing buffer; 137mM NaCl, 2.9mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM glucose, 12mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.34mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1mM EDTA, 20mM HEPES 및 0.25% BSA, pH 7.4)으로 2회 세척한 후 현탁 완충액(suspension buffer; 137 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM glucose, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM HEPES 및 0.25% BSA, pH 7.4)에 현탁시켜 최종 세척혈소판을 얻었다. 얻어진 세척혈소판을 3×10<sup>8</sup> platelet/ml이 되도록 희석하여 분석에 이용하였다. 혈소판은 37°C에서 3분간 인큐베이션한 후 CaCl<sub>2</sub> 1mM을 넣고, 실시예 1의 시료를 최종농도 100µg/ml로 첨가하고 2분간 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 혈소판 응집 유도물질인 콜라겐 2.5µg/ml를 첨가하여 5분간 혈소판의 응집정도를 측정하였다. 랫드(Rat) 혈소판 응집 억제능은 응집측정기(Aggregometer; Chrono-Log Co., Ltd., Havertown, PA. USA)를 이용한 탁도측정법으로 확인하였다.

#### 경동맥 혈전 유발 동물모델에서 혈류변화에 미치는 영향 평가

FeCl<sub>3</sub>로 유도한 경동맥 혈전 유발 동물모델에서 한약재 추출물이 혈류변화에 미치는 영향을 다음과 같이 측정하였다. 실험동물로는, 수컷 SD 랫드(Sprague-Dawley rat, 8주령, 230-250g, 코아텍, Korea)를 구입하고 1주일의 순화기간을 거쳐 실험에 사용하였다. 실험동물에 각 시료를 체중 1kg당 50mg, 100mg 및 200mg을 각각 3일간 경구투여하였으며, 대조군은 동량의 완충액(saline)을 투여하였다. 시험기간 동안 고형사료와 물은 자유로이 섭취하게 하고, 사육환경은 온도 23±0.5°C, 상대습도 50±5%, 12시간 간격으로 명-암(light-dark) 사이클로 자동 유지 유지시켰다. 실험동물의 마취는 럼폰과 졸레틴을 2:3의 비율로 혼합한 마취제를 사용하였다. 실험동물의 경동맥 혈전 유발은 경동맥에 30% FeCl<sub>3</sub> 용액을 적신 여과지(filter paper)(2×2mm)를 3분간 접촉시킨 후 여과지를 제거하고 생리식염수로 닦아낸 다음

탐침(Powerlab/8sp, ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, NSW, Australia)을 설치한 혈류측정기(Laser Doppler Flowmetry (LDF; BFL21, Transonic Instrument, USA)를 사용하여 혈류측정을 시행하였다. FeCl<sub>3</sub> 처리 후 혈전생성은 혈류측정값이 0에 가까이 떨어지는 때를 기준으로 하였고, 정상군의 경우는 40분까지 측정하였다. 정상군(C Basal)에서는 총 40분의 관찰시간 내에서 혈전이 생성되지 않았으며, FeCl<sub>3</sub> 처리군은 염화철 처리 17분 후에 혈류량값이 0에 이르는 것으로 확인되었다. 시료처리군의 경우, FeCl<sub>3</sub> 처리군과 비교한 혈류량값을 확인하였다.

#### 혈전 유발 동물모델에서 혈관의 조직학적 변화 확인

혈전유발 동물모델에서 혈관의 조직학적 변화를 확인하였다. 경동맥내 혈전생성을 유도한 후 혈전이 생성된 경동맥 부위를 3~4mm 적출하였다. 적출된 경동맥 부위를 10% 중성 파라포름 알데하이드에서 24시간 동안 고정시키고 통상적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀에 포매한 후 절편(4 $\mu$ m 두께)을 만들었다. 만들어진 절편은 헤마톡실린-에오신(hematoxylin-eosin) 염색을 실시하여 광학현미경용 조직표본을 제작하고, 표본을 광학현미경으로 관찰하였다.

#### 통계

모든 자료의 통계분석은 SPSS 17.0(SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA)을 이용하여 일원 배치 분산분석(one-way ANOVA)으로 검정하여 평균  $\pm$  표준오차로 나타내며, 사후 검정은 Tukey's multiple comparison test에 따라  $p < 0.05$  수준에서 검정함.

## ○ 실험결과

### - 한약재 복합추출물의 생리활성평가

미백 및 혈행개선용 추출물(Mix)에 대한 항산화능, 미백효능수준, 혈행개선 정도를 평가하였음 (Fig. 1-13).

#### · 항산화효능

1,2차년도에 미백 및 혈행개선효능을 갖는 한약재를 선별하였고, 이들 한약재들의 복합추출물 (Mix: 복분자, 현초, 호도육, 계지 혼합추출물)의 항산화효능을 평가하였음. DPPH와 ABTS 소거능, FRAP(Ferric reducing/antioxidant power) assay 시행결과, Mix는 농도의존적으로 (12-400 µg/mL) 항산화력이 증가되는 것으로 확인되었음. 이와 동일하게, 페놀함량분석에서도 Mix는 농도증가에 따른 현저히 증가된 페놀함량을 나타내었음.

Rat 간, 신장, 뇌조직에서 FeCl<sub>3</sub>에 의해 유도된 lipid peroxidation 상에서 Mix의 효과를 평가한 결과, 각 조직별에서 Mix의 lipid peroxidation 저해능을 확인할 수 있었음. 조직별로는 간 조직에서 고농도 Mix(400 µg/mL) 처리가 lipid peroxidation을 현저히 감소시킴을 확인하였음.

HepG2세포를 이용한 DCFDA assay에서는, Mix 처리시 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도된 ROS가 control(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>미처리군) 수준으로 감소됨을 확인하였음.

CuSO<sub>4</sub> 처리에 의한 oxLDL 생성 또한, Mix 처리(50, 100 µg/mL)에 의해 감소됨을 확인하였음.

#### · 미백효능

Murine melanoma B16F10 cells을 이용하여 Mix의 미백효능을 평가함. Mix 처리시 세포독성은 유도되지 않았으며, 무독성농도범위(50-400 µg/mL)에서 FSK에 의해 유도된 tyrosinase activity(indirect inhibition)를 감소시킴을 확인함. FSK 처리된 cell lysate를 이용한 tyrosinase direct inhibition을 평가한 결과, Mix는 tyrosinase의 direct inhibition은 유도하지 않는 것으로 나타남. 따라서, Mix는 인체내 존재하는 tyrosinase level 상에는 영향을 주지 않으면서, 외부자극(UV 등)에 의해 비정상적으로 증가된 tyrosinase level에 영향을 미치는 것으로 판단됨.

Mix의 미백효능은, 미백관련기전에서의 저해능을 살펴봄으로써 미백효능을 검증함. Melanogenesis에 관련된 단백질 발현(tyrosinase, TRP1, TRP2) 상에서, Mix는 단독처리시에는 control과 동일한 양상을 나타내었으나(단백질 발현에 영향을 미치지 않음), FSK에 의해 유도된 각 단백질들의 증가된 발현 상에서 현저히 저해하는 효능을 나타냄. 이러한 경향은, tyrosinase, TRP1, TRP2 발현의 upstream에 있는 MITF와 CREB의 인산화에도 영향을 미쳐, Mix는 FSK에 의해 증가된 MITF와 CREB 인산화를 저해하는 것으로 나타남.

· 혈행개선효능

혈관내피세포 EA.hy926세포내 cell adhesion molecule ICAM-1의 발현이 TNF- $\alpha$ (30 ng/mL)에 의해 유도됨. Mix 처리는 TNF- $\alpha$ 에 의한 ICAM-1 발현을 농도의존적으로 감소시킴. ICAM-1을 비롯한 다른 cell adhesion molecules VCAM-1과 E-selectin의 gene expression을 살펴본 결과, TNF- $\alpha$ 에 의해 증가된 각 cell adhesion molecules의 gene expression은 Mix 처리에 의해 현저히 감소됨을 확인함.

RASMC 상에서는, PDGF에 의해 유도된 cell migration이 Mix 처리에 의해 감소되며, 저농도에서도 이미 그 저해효능은 뚜렷하였음. RASMC의 DNA synthesis 상에서도, mix 처리는 PDGF에 의해 유도된 DNA synthesis를 감소시켜 control 군과 동일한 수준으로 유지시켜 줌을 확인하였음. Cell cycle 과 관련된 gene expression(Cyclin E1, CyclinD1, CDK2, CDK4)은 PDGF 단독처리군과 비교해볼 때 Mix와 PDGF와의 동시처리군에서 현저히 감소됨을 확인할 수 있었음.

Rat platelet를 이용한 혈소판응집능 평가에서는, Mix는 collagen으로 유도된 혈소판응집상에서 60%이상의 뚜렷한 저해효능을 나타냈음.

콜레스테롤 합성대사에 관여하는 HMG-CoA reductase의 활성은 양성대조군 심적환을 통해 그 저해효능을 확인하였고, Mix 저농도 처리군 모두에서 저해효능을 나타내었음(1  $\mu$ g/mL,  $80\pm 1.3$ ; 5  $\mu$ g/mL  $57\pm 1.0$ ; 10  $\mu$ g/mL,  $36\pm 5.4$  HMG-CoA reductase activity). 동일농도 10  $\mu$ g/mL에서는, 심적환 대비 Mix가 68.7% 더 우수한 저해효능을 나타내었음(심적환,  $115\pm 3.0$ ; mix,  $36\pm 5.4$  HMG-CoA reductase activity).

인체hyperpigmentation 피부모델(3D Melanoderm®-ME model)에서 Mix의 미백효능을 평가한 결과, melanogenesis가 유도된 control군과 비교할 때, 모든 농도에서 현저한 저해능을 나타내었음 (2.5  $\mu$ g/mL, 45.3% inhibition; 5  $\mu$ g/mL, 41.8% inhibition; 10  $\mu$ g/mL, 58.3% inhibition). Zebrafish를 이용한 미백효능평가에서도 농도의존적으로 감소된 color density를 나타냄.

따라서, 복분자, 현초, 호도육, 계지로 구성된 Mix가 항산화능, 미백효능, 혈행개선능에서 모두 우수한 활성을 나타내므로, 이를 미백 및 혈행개선용 시제품 생산 구성재료로 선정하였음.



· 한약재 복합추출물 (Mix)의 활성평가결과

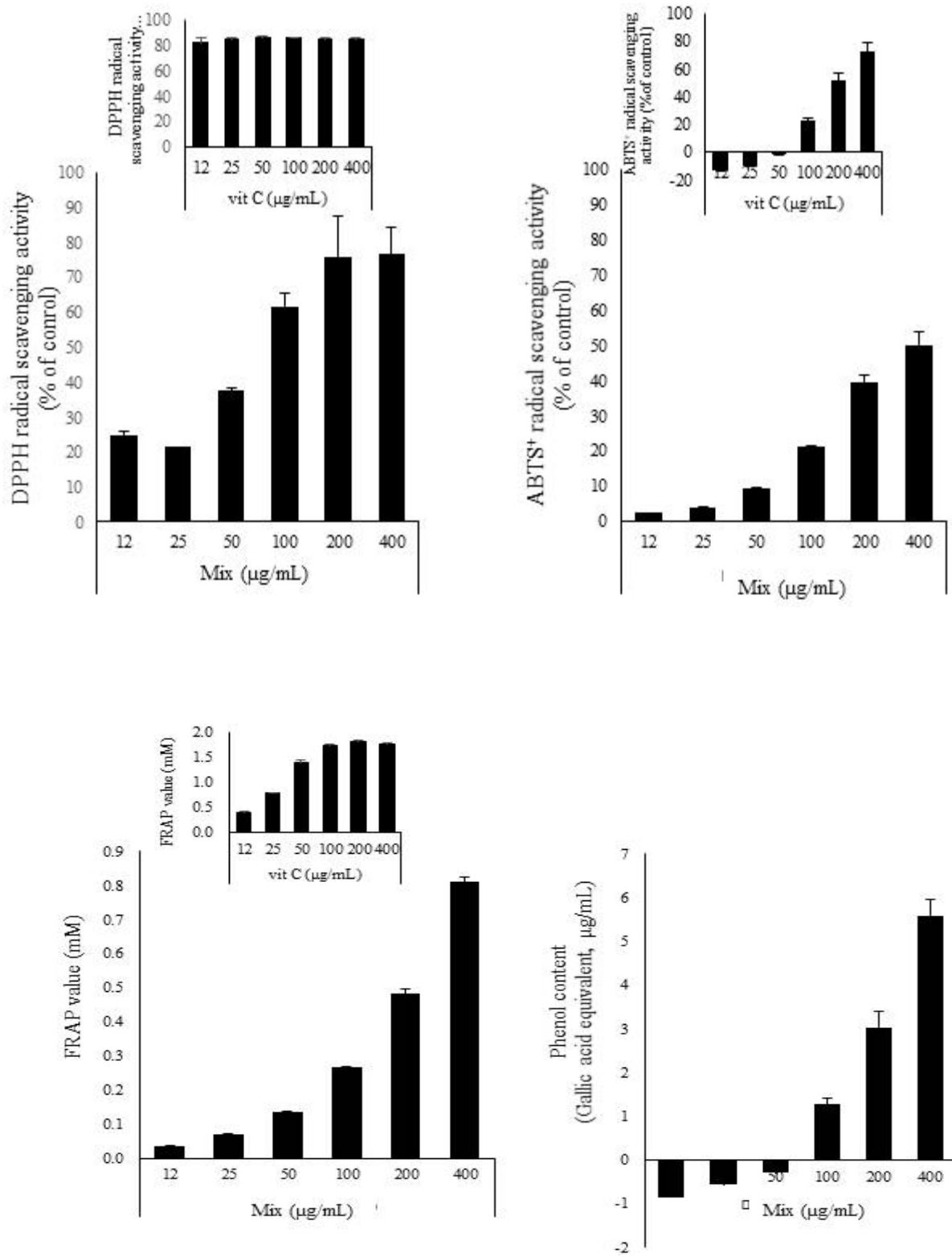


Fig. 1. Antioxidant activities of herbal formula.

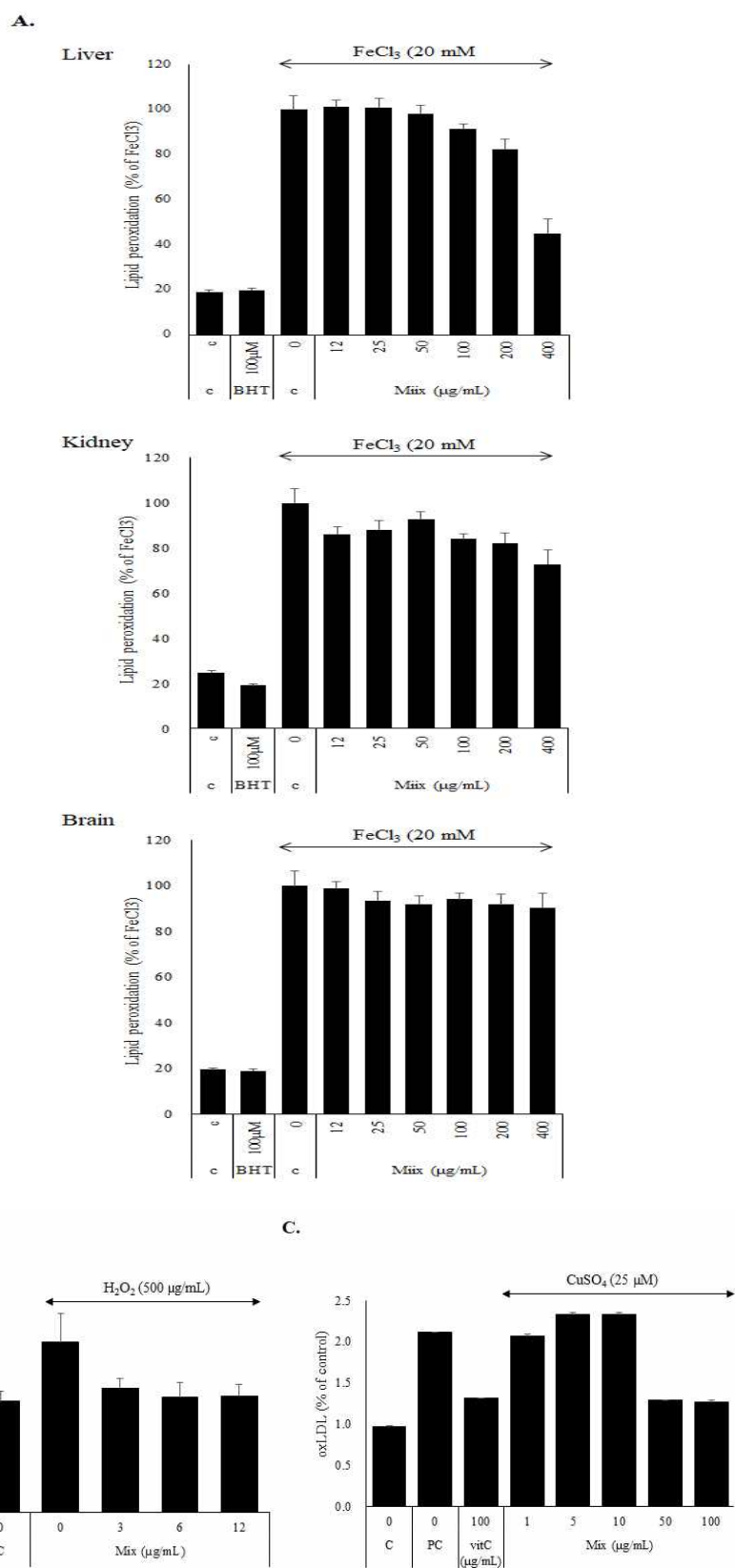


Fig. 2. Antioxidant activities of herbal formula in rat liver, kidney, and brain tissues(A), DCFDA assay(B), and oxLDL production(C).

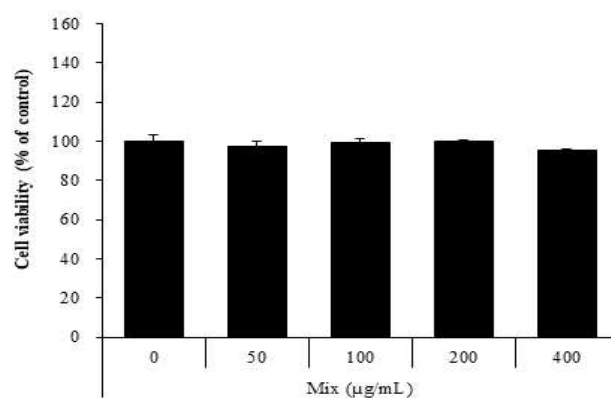
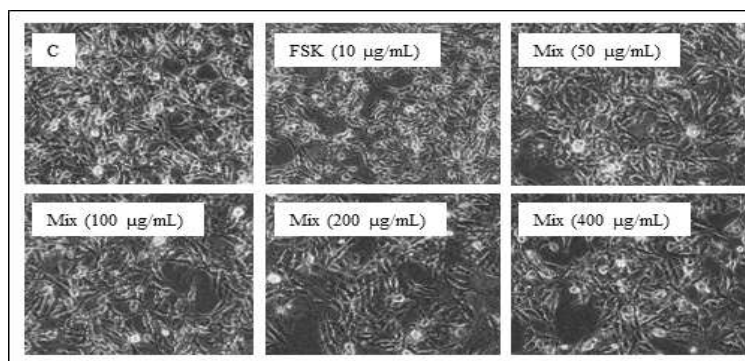


Fig. 3. Effects of herbal formula on cell viability in murine melanoma B16F10 cells.

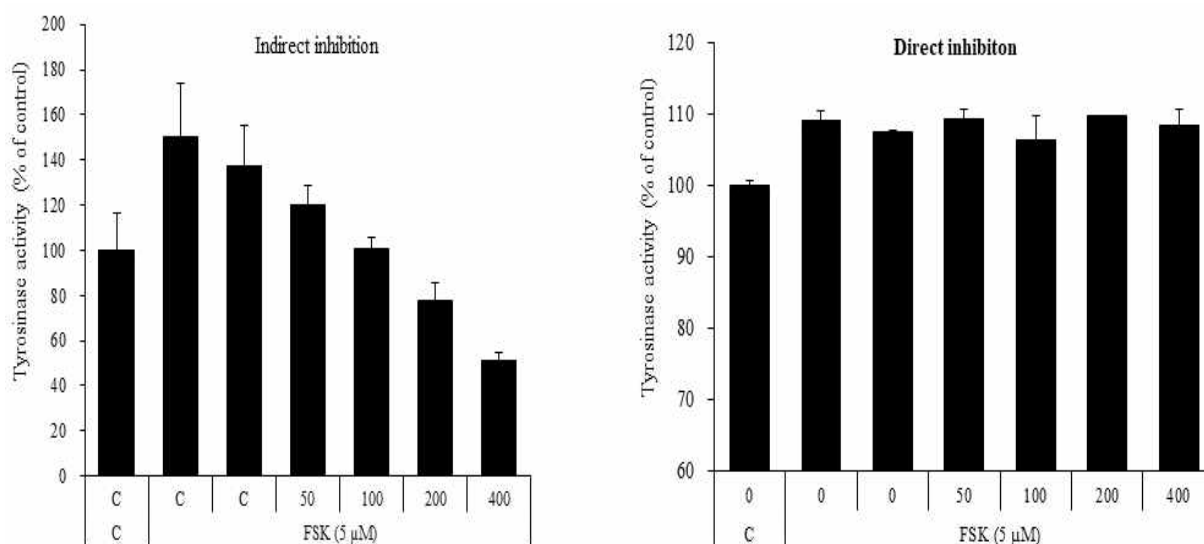


Fig. 4. Effects of herbal formula on cell viability and forskolin-induced tyrosinase activity in murine melanoma B16F10 cells.

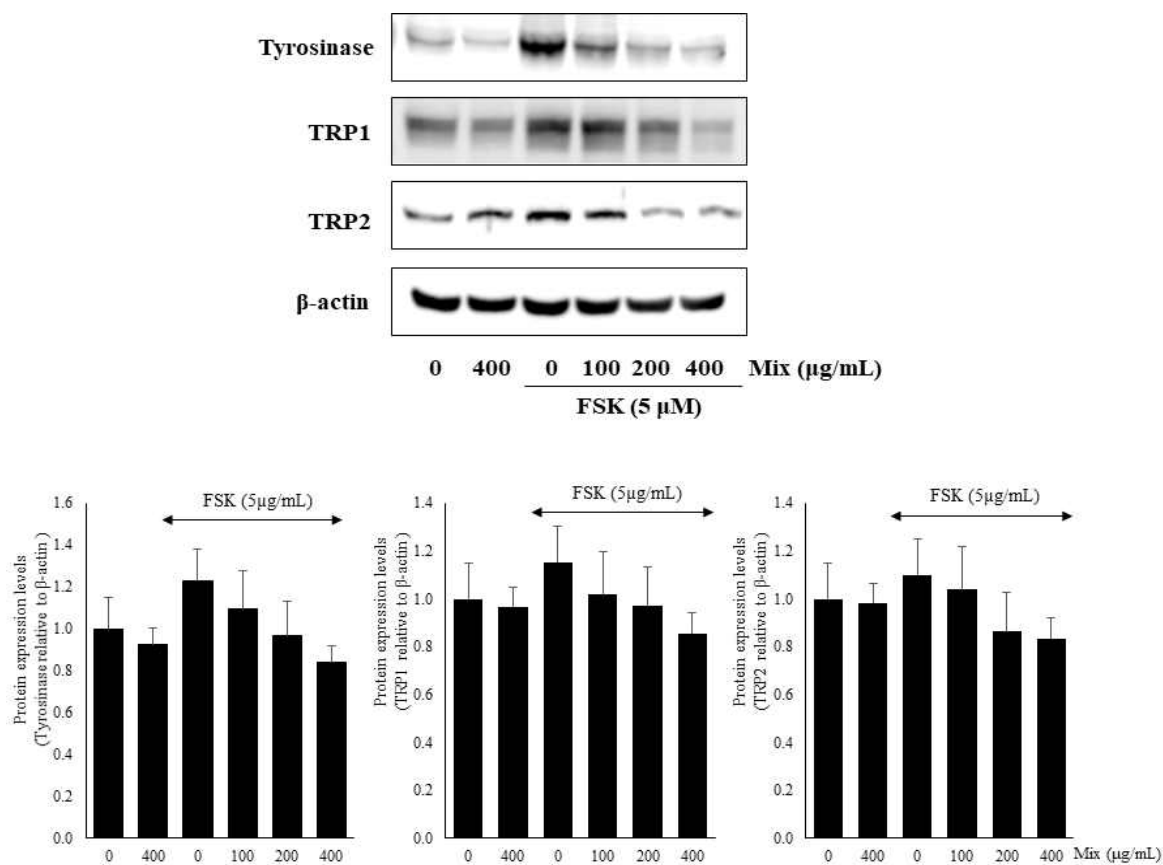


Fig. 5. Effects of herbal formula on melanogenesis-related protein and gene expression in murine melanoma B16F10 cells.

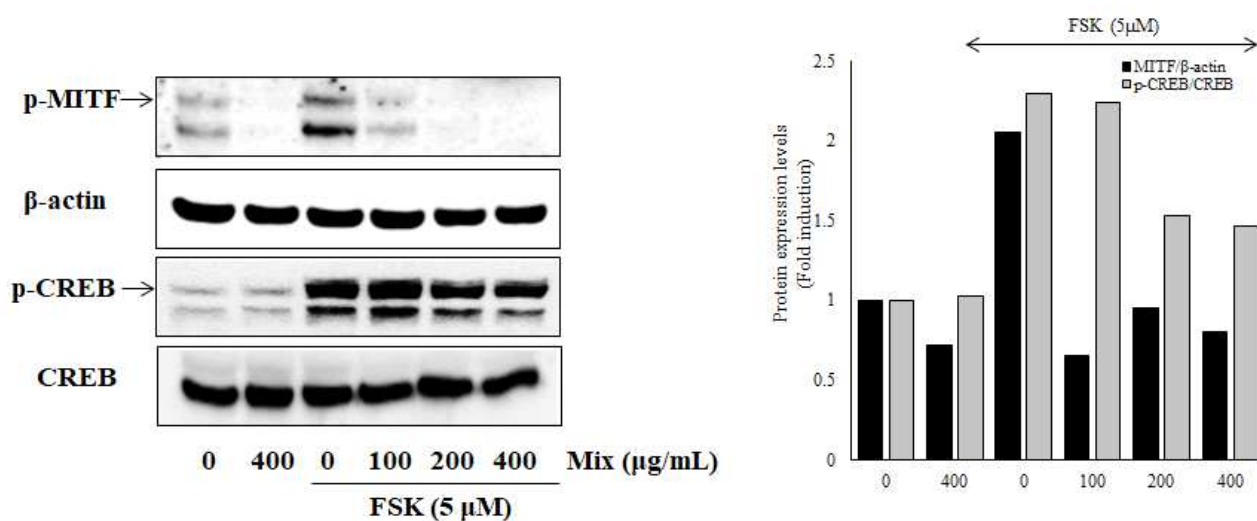


Fig. 6. Effects of herbal formula on phosphorylation of MITF and CREB in murine melanoma B16F10 cells.

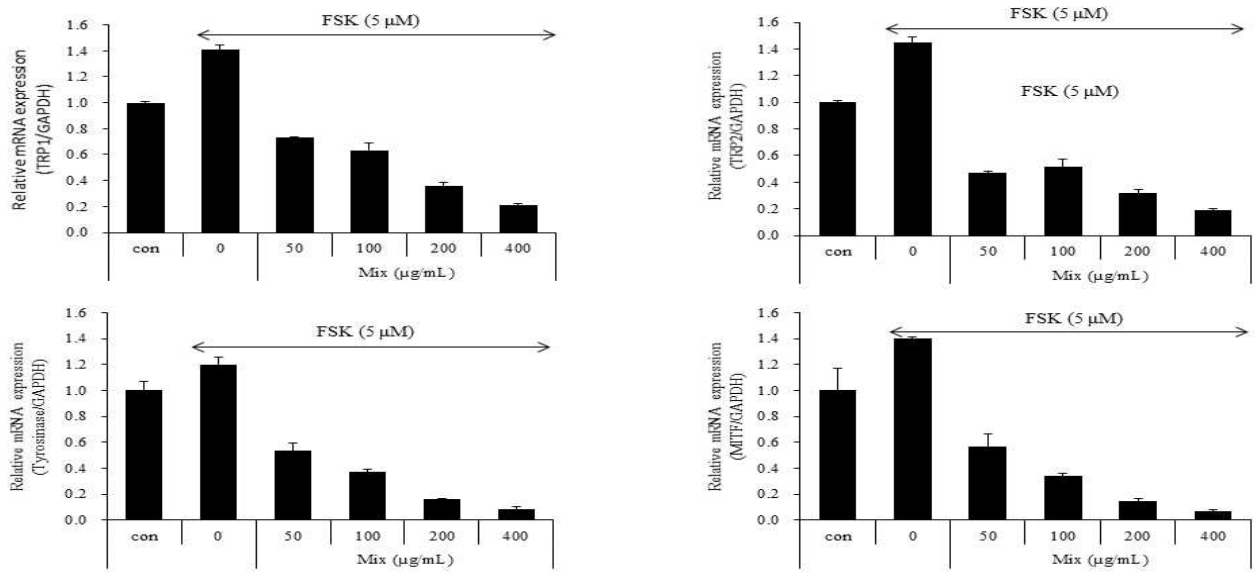
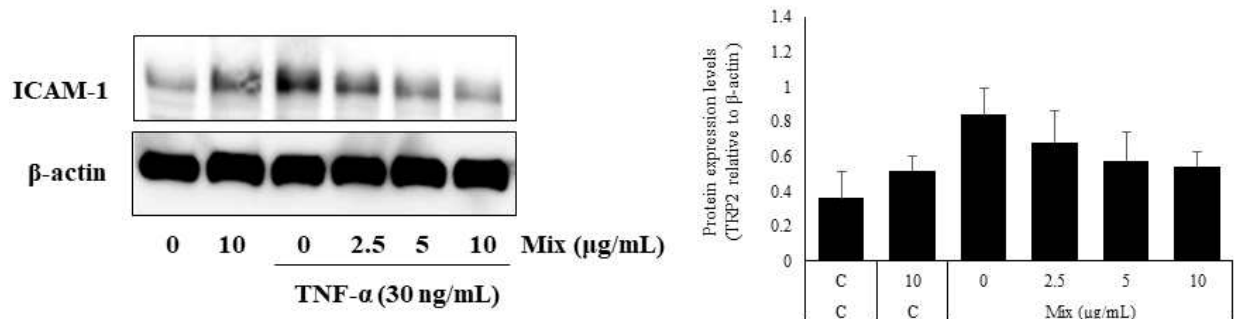


Fig. 7. Effects of herbal formula on melanogenesis-related gene expression in murine melanoma B16F10 cells.

A.



B.

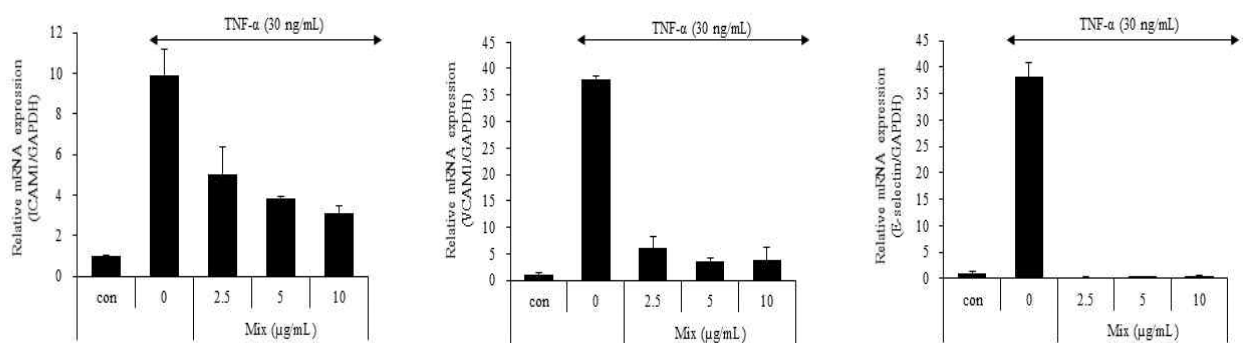


Fig. 8. Effects of herbal formula on protein(A) and gene(B) expression of cell adhesion molecules in EA.hy926 cells.

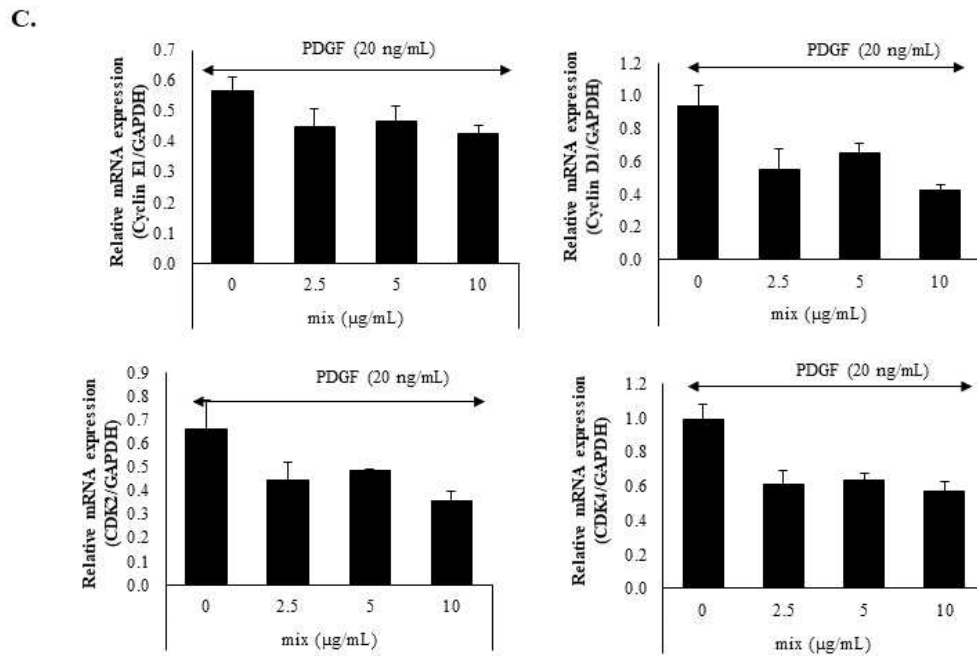
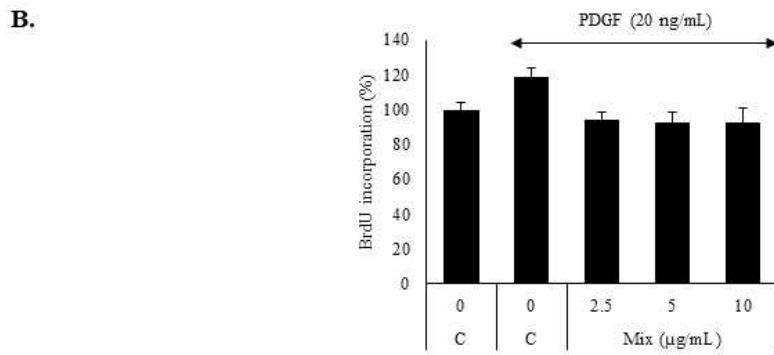
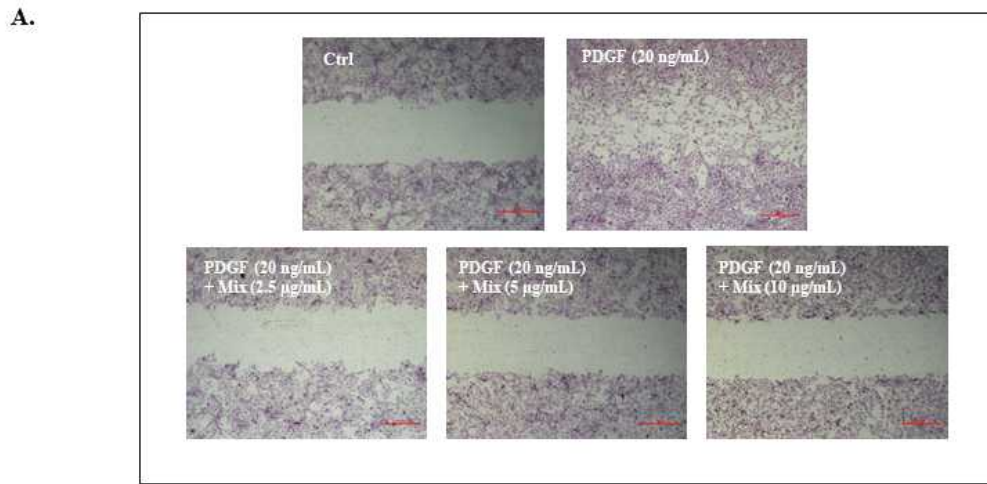
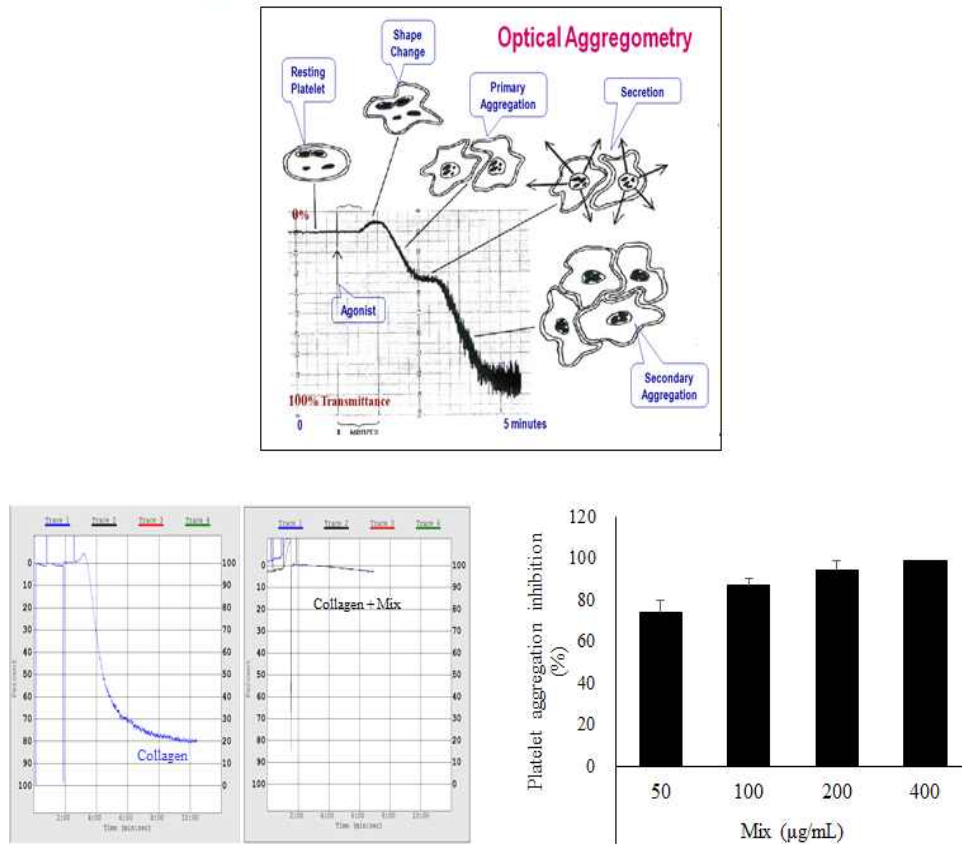


Fig. 9. Effects of herbal formula on cell migration(A), DNA synthesis(B), and cell cycle-related gene expression(C) in rat aortic smooth muscle cells.

A.



B.

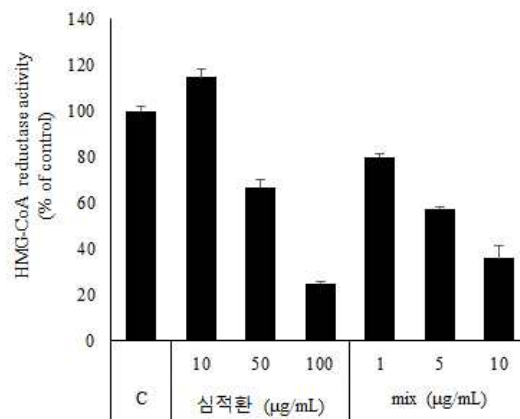


Fig. 10. Effects of herbal formula on on blood circulation (A. Collagen-induced platelet aggregation (*ex vivo*); B. HMG-CoA reductase activity).

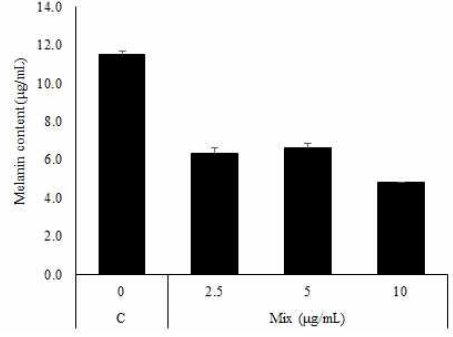
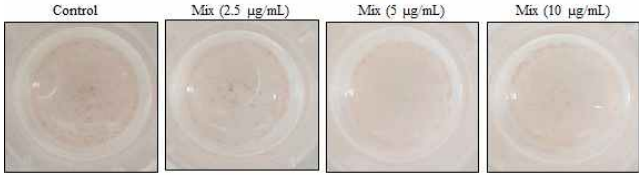
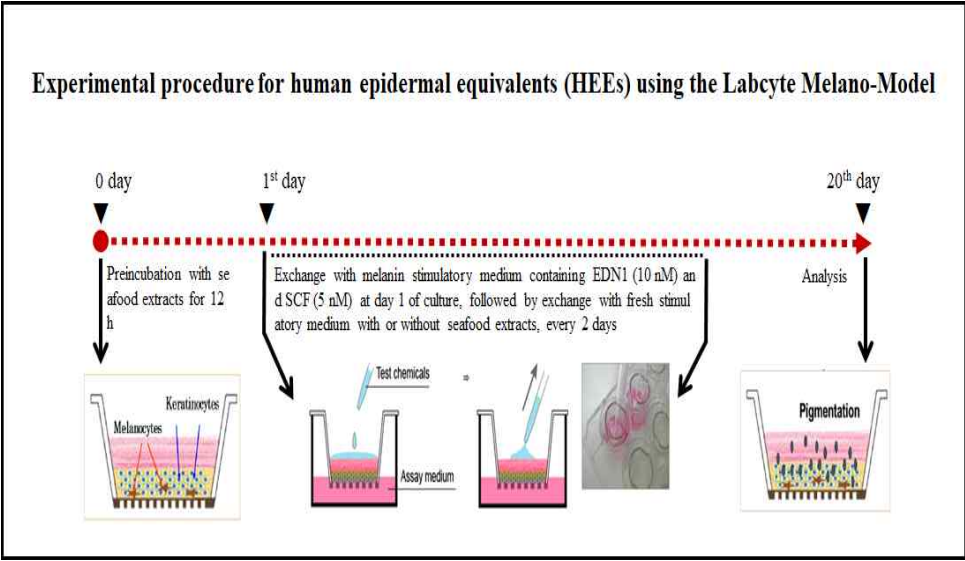
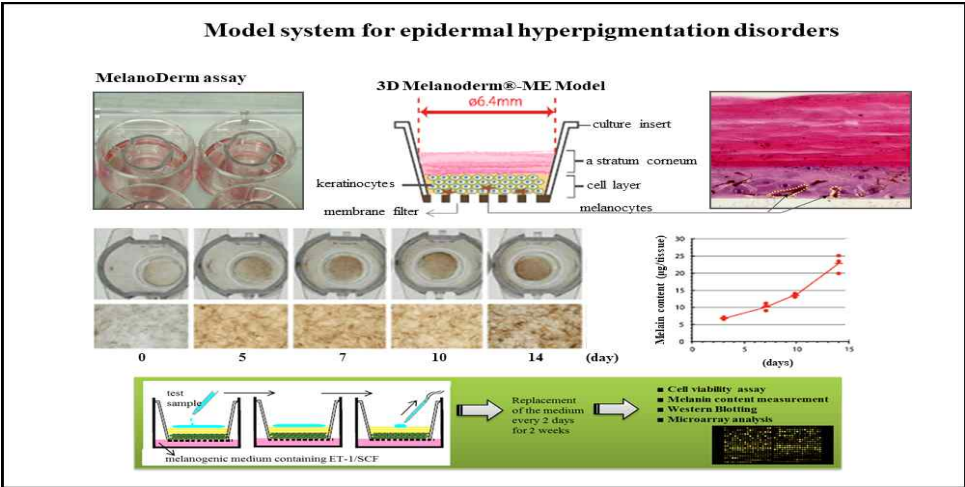


Fig. 11. Effects of herbal formula on 3D Melanoderm®-ME model.



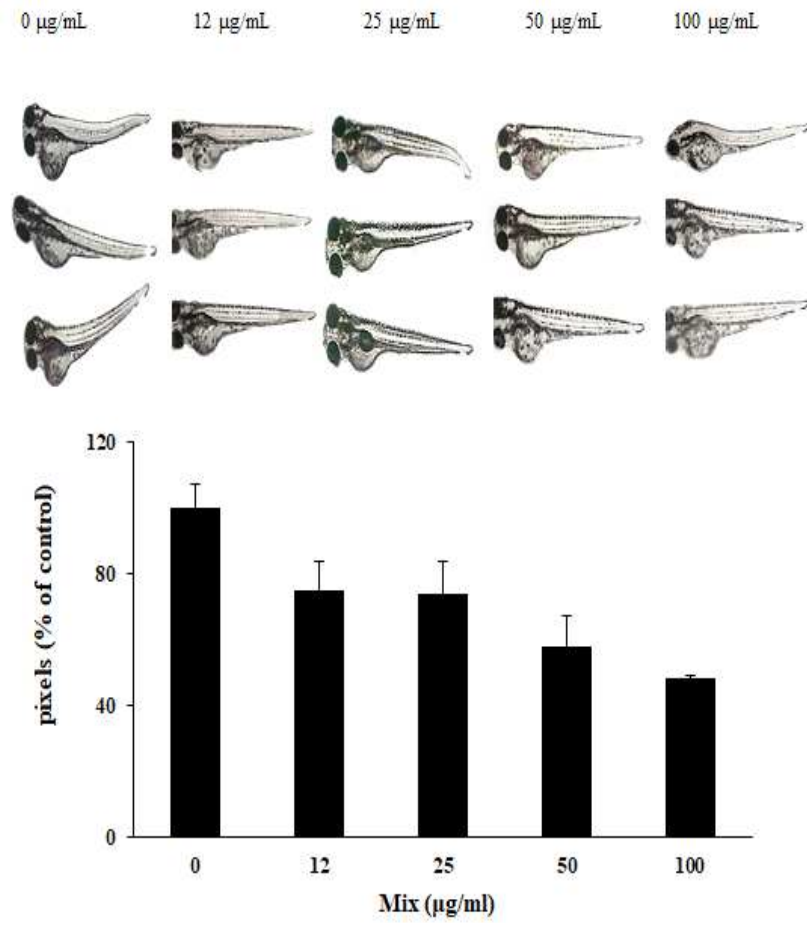


Fig. 12. Effects of mixed herbal formula on pigmentation of zebrafish.

- 시제품의 생리활성평가

미백 및 혈행개선용 추출물(Mix)이 혼합된 시제품 recipe 3종에 대한 항산화능, 미백효능수준, 혈행개선 정도를 평가하였음 (Fig. 14-32).

· 시제품 3종의 조성표

Juice 1		Juice 2		Juice 3	
원료	함량 (%)	원료	함량 (%)	원료	함량 (%)
배	36.2	귤	42	블루베리	80
사과	28.6	사과	40	미백추출물 (복분자,현초,호도육,계지: 동량)	17
토마토	19	토마토	10	복분자	3
당근	6.7	양배추	4	계 (%)	100
바나나	4.8	레몬	3		
미백추출물 (복분자,현초,호도육,계지: 동량)	4.8	Vit C	0.59		
계 (%)	100	복분자 추출물	0.2		
		현초추출물	0.1		
		호도육 추출물	0.1		
		계지추출물	0.01		
		계 (%)	100		

· 항산화효능

시제품 3종 각각의 항산화능은 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능, FRAP value와 phenol 함량 평가로 이루어졌음. 각 시제품 Juice#1, #2, #3중에서, Juice#2의 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능이 Juice#1과 #2에 비해 높게 나타났으나, 시제품 3종 모두의 항산화능은 양성대조군과 비교해서 높은 수준은 아닌 것으로 나타났음.

Rat 간, 신장, 뇌조직내 FeCl<sub>3</sub>로 유도된 lipid peroxidation 상에서는 모든 시제품들에서 lipid peroxidation 저해능이 뚜렷하지 않은 것으로 나타남. 다만 뇌조직에서 Juice#3 고농도 100-400 µg/mL에서 미미한 저해효능이 관찰됨. HepG2 세포에서 Juice#1, #2, #3 모두 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 ROS 생성을 저해하는 것으로 나타났음. CuSO<sub>4</sub>에 의해 유도된 LDL 산화는 Juice#1과 #2에서 감소되는 경향을 나타냄.

· 미백효능

Murine melanoma B16F10 세포에서 Juice#1은 tyrosinase activity를 저해하는 효능이 미미한 것으로 나타났으며, melanogenesis와 관련한 gene expression 상에서도 동일한 양상을 나타냄. 다만, MITF gene expression 상에서는 FSK에 의해 유도된 MITF gene expression을 뚜렷이 농도의존적으로 낮춤. Juice#2는 FSK에 의해 유도된 tyrosinase activity 상에서 농도의존적 감소를 보여 최종 400 µg/mL에서 FSK 단독처리군에 비해 약 20% 감소된 tyrosinase activity를 나타냄. 또한, melanogenesis 관련 gene expression상에서 Juice#2의 저해효능은 뚜렷하지 않은 것으로 나타남. Juice#3(12-50 µg/mL 농도범위에서)은 FSK에 의

해 증가된 tyrosinase activity를 약 30% 저해하는 것으로 나타났으며, tyrosinase gene expression도 뚜렷이 감소하는 경향을 나타내었음. 인체피부모델(3D Melanoderm®-ME model)상에서, 21일간 유도된 melanogenesis는 Juice#3 처리에 의해 control군 대비 49.6% (50 µg/mL 처리군) 감소된 melanin content를 나타냄. Zebrafish를 이용한 미백효능평가에서는, 최고농도 400 µg/mL에서 Juice#1, 2, 3 처리군 각각은 control 대비 48.6±13.7, 61.1±0.6, 52.7±2.3 %의 감소된 color density를 나타냄.

· 혈행개선효능

Juice#1은 혈관내피 EA.hy926 세포내 TNFα에 의해 유도된 ICAM-1 protein expression을 감소시키고, adhesion molecule VCAM-1과 E-selectin의 gene expression 상에서도 동일한 감소효과를 나타내었으며, 특히 E-selectin gene expression 상에서 그 저해 효능은 더 뚜렷하게 나타났음. 혈관평활근세포(RASMC)의 PDGF에 의한 migration 유도 상에서 그 저해능은 미미한 것으로 나타남.

Juice#2는 TNFα에 의해 유도된 ICAM-1 protein expression을 감소시키고, ICAM-1, VCAM-1, E-selectin의 gene expression 모두에서 뚜렷한 저해능을 나타내었음. PDGF에 의한 signaling pathway 상에서도 Juice#2는 PDGF, PLCγ, AKT, ERK의 인산화를 뚜렷이 감소시키는 것으로 나타남. Collagen에 의한 혈소판응집 또한 저해하는 효능이 있음을 확인함. 콜레스테롤 대사 관련 효소 HMG-CoA reductase 활성저해능은 50-100 µg/mL에서 각각 70-80% 뚜렷이 감소되는 것을 확인함.

Juice#3는 TNFα에 의해 유도된 ICAM-1 protein expression과 E-selectin gene expression을 감소시키고, RASMC의 cell migration을 저해시키나, cell cycle관련 gene expression을 저해하는 효과는 없는 것으로 나타남. 그러나, Rat 경동맥 thrombosis 모델상에서 Juice#3은 FeCl<sub>3</sub> 처리군 대비 현저히 개선된 blood flow를 나타냄을 확인하였음. 혈전동물 모델의 혈관구경내 혈전형성 여부를 H&E staining으로 확인한 결과, 혈관내 혈전형성이 Juice#3 투여군에서 FeCl<sub>3</sub> 단독처리군보다 현저히 감소시키는 것을 확인하였음.

따라서, 시제품 3종의 항산화능, 미백효과, 혈행개선효능을 살펴본 결과, Juice#2와 #3의 미백 및 혈행개선 효능이 월등함을 확인하여, 이들을 미백 및 혈행개선 음료개발용 후보 레시피로 선정함.

· 시제품 3종의 항산화, 미백, 혈행개선 활성평가결과

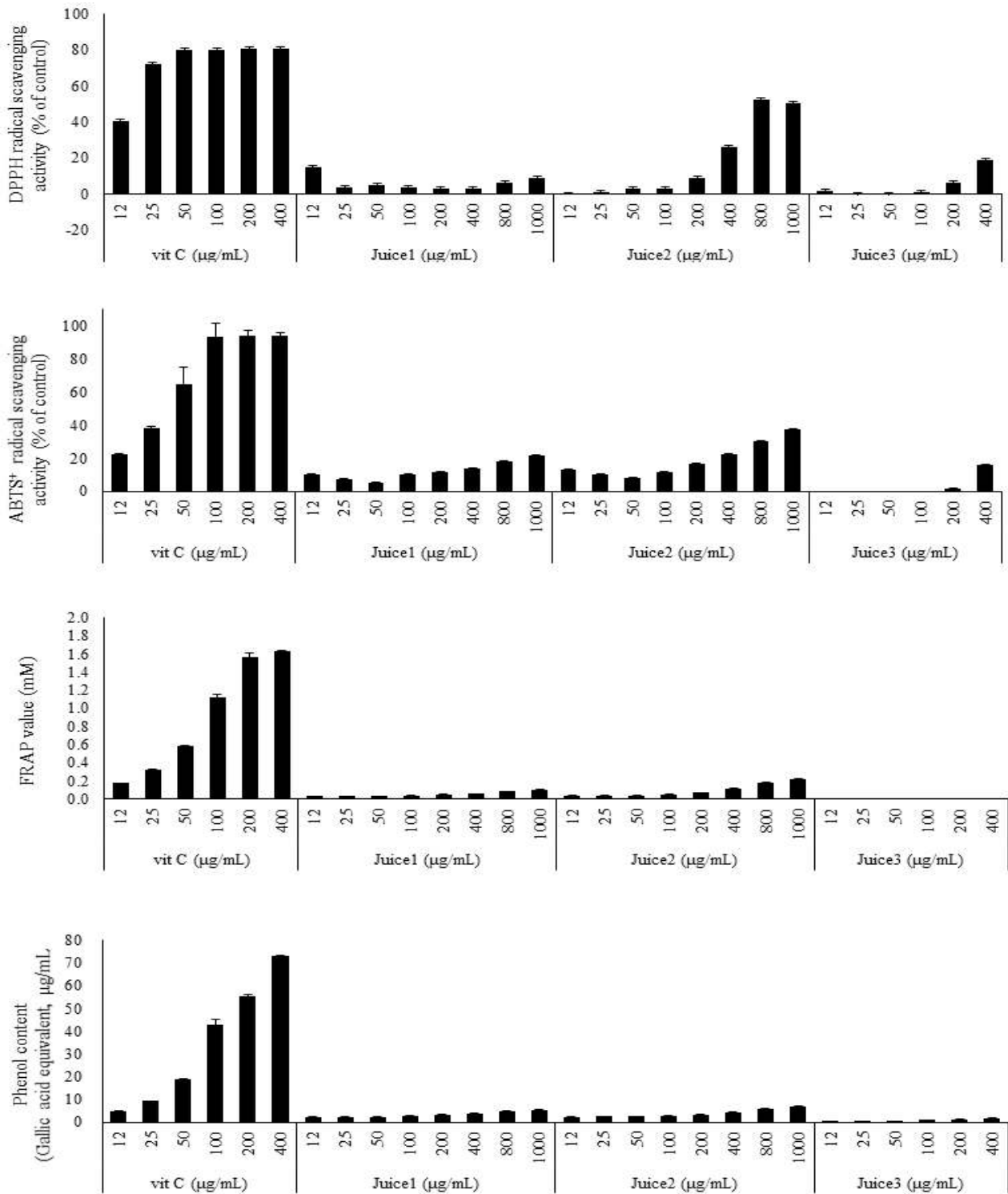


Fig. 13. Antioxidant activities of trial manufactured goods.

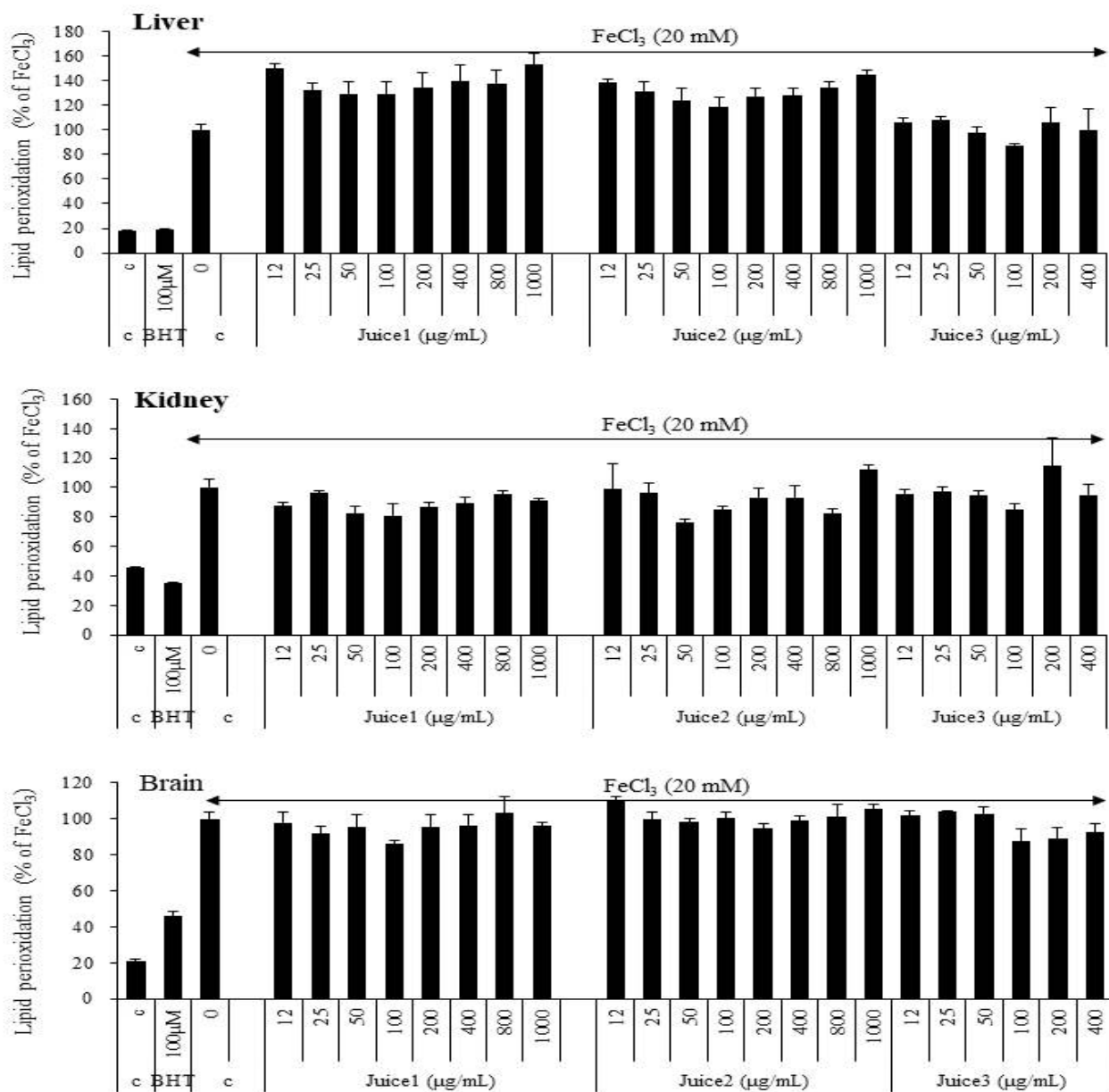


Fig. 14. Antioxidant activities of trial manufactured goods in rat liver, kidney, and brain tissue extracts.

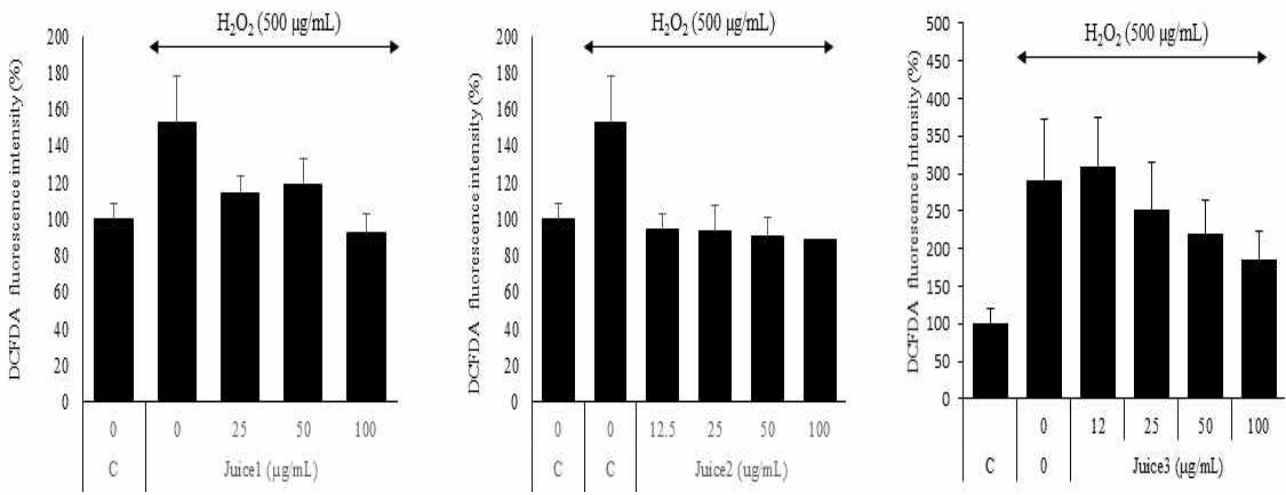


Fig. 15. Effects of trial manufactured goods on DCFDA assay.

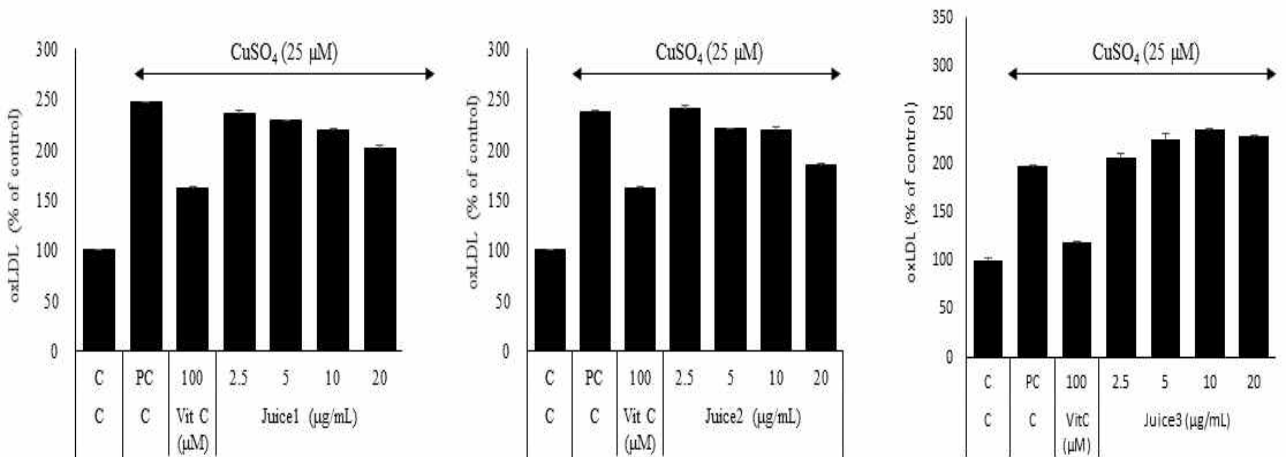


Fig. 16. Effects of trial manufactured goods on LDL oxidation.

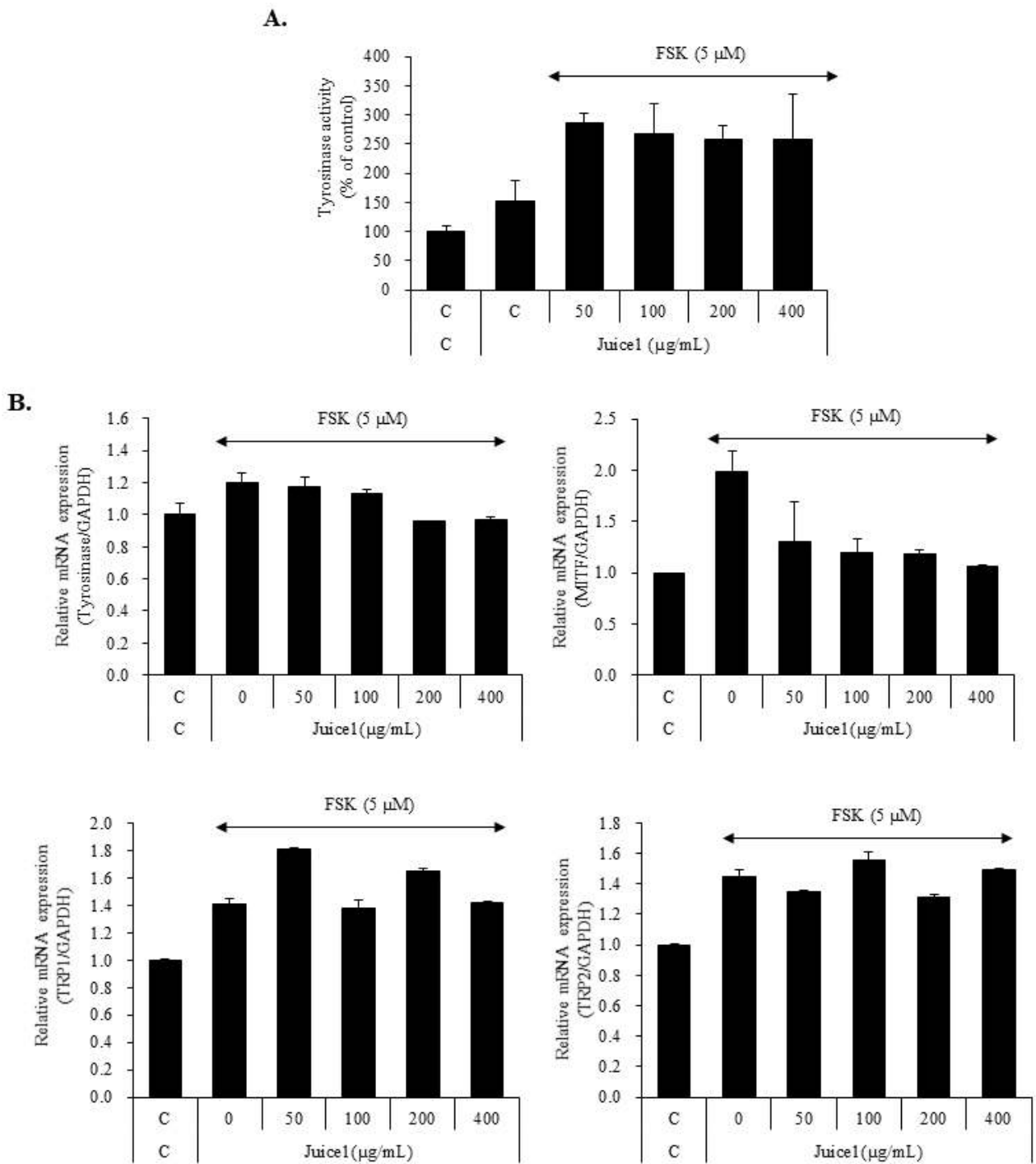


Fig. 17. Effects of trial manufactured good#1 on tyrosinase activity(C) and melanogenesis-related gene expression(B) in murine melanoma B16F10 cells.

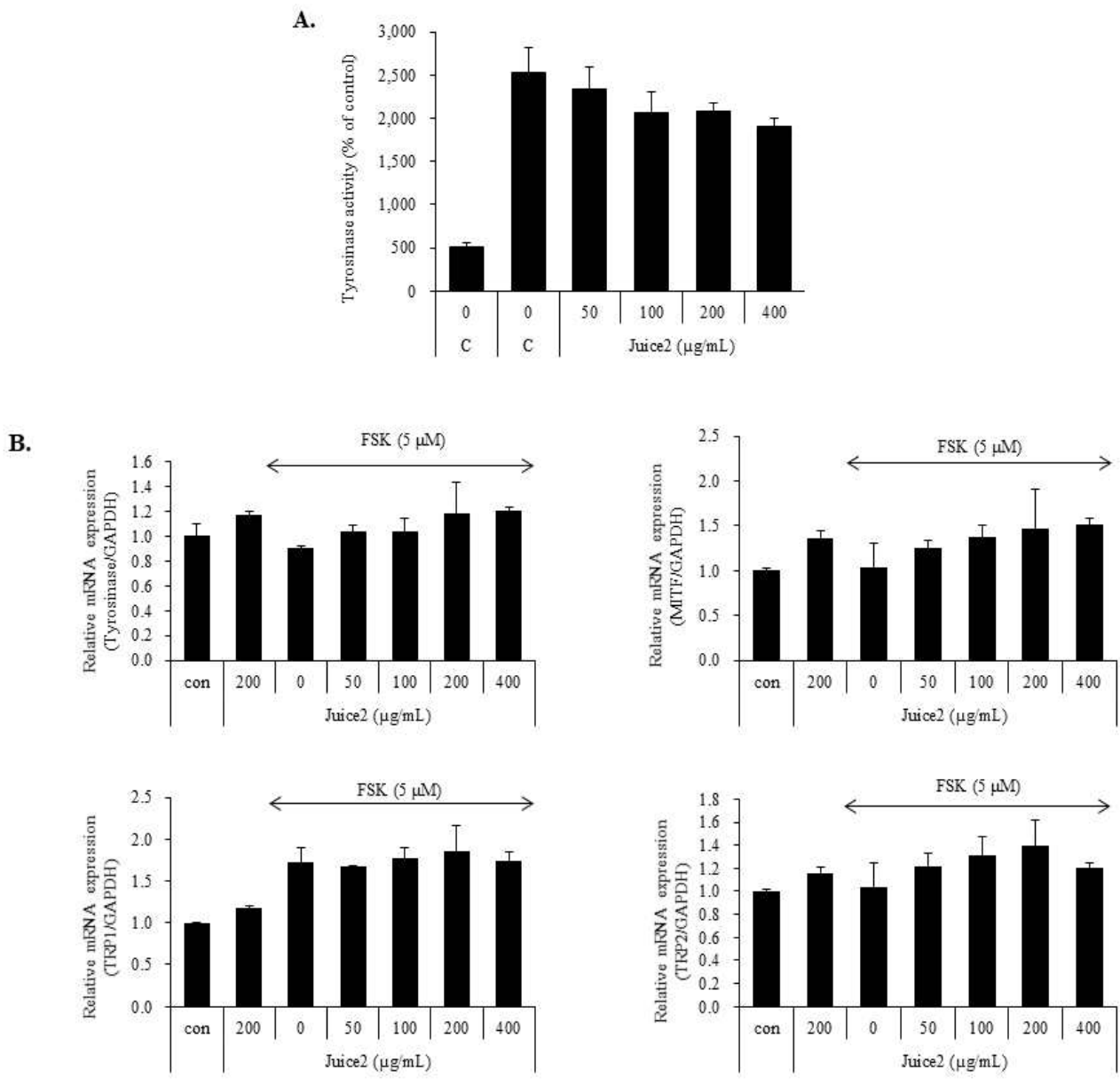


Fig. 18. Effects of trial manufactured good#2 on tyrosinase activity(A) and melanogenesis-related gene expression(B) in murine melanoma B16F10 cells.



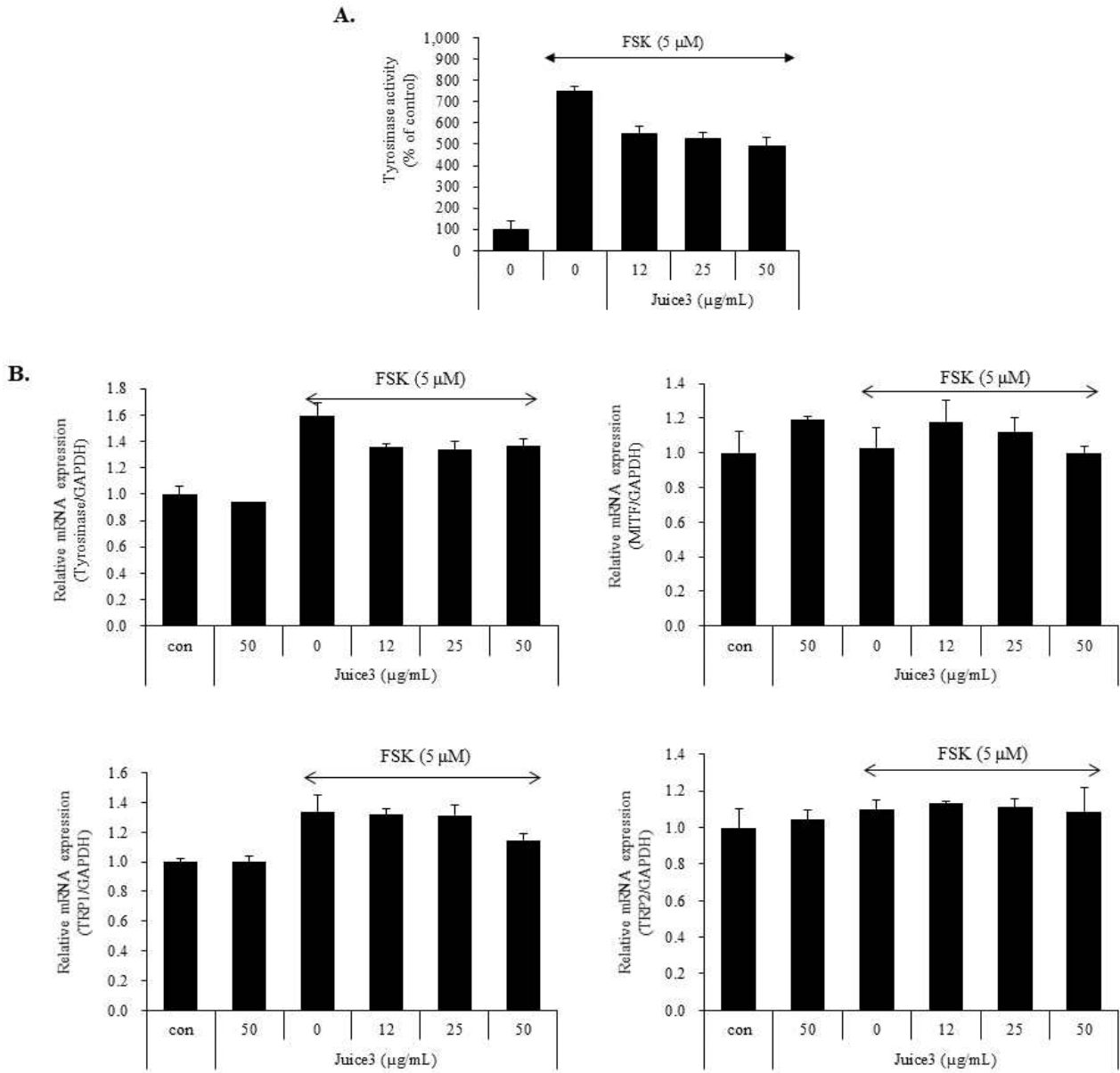


Fig. 19. Effects of trial manufactured good#3 on tyrosinase activity(A) and melanogenesis-related gene expression(B) in murine melanoma B16F10 cells.

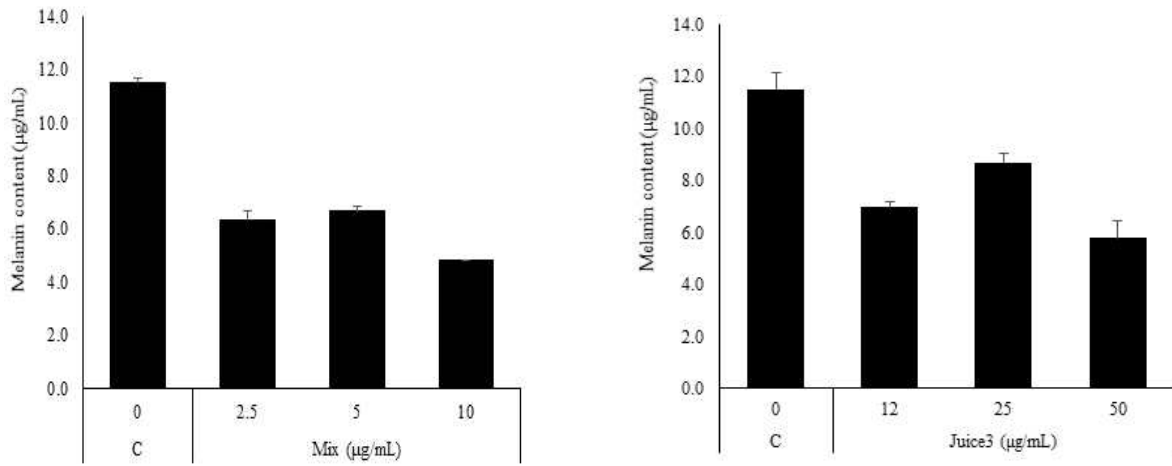


Fig. 20. Trial manufactured good#3 on 3D Melanoderm®-ME model.

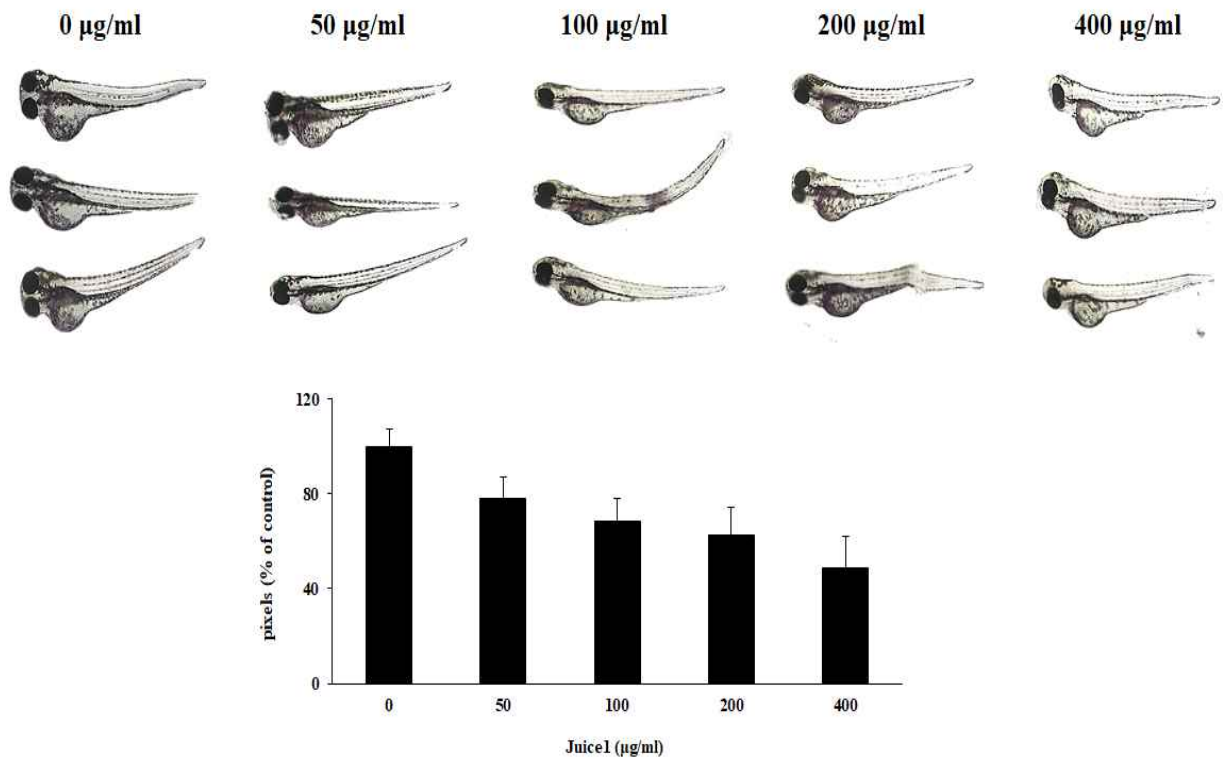


Fig. 21. Effects of trial manufactured good#1 on pigmentation of zebrafish.

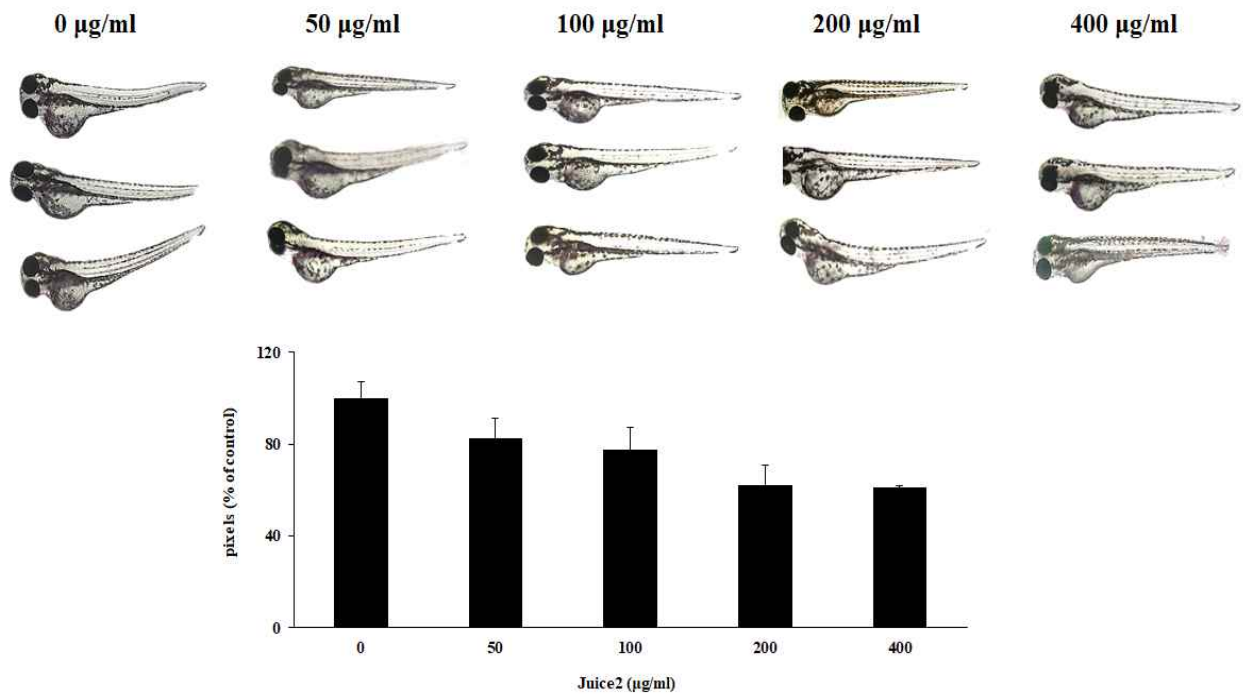


Fig. 22. Effects of trial manufactured good#2 on pigmentation of zebrafish.

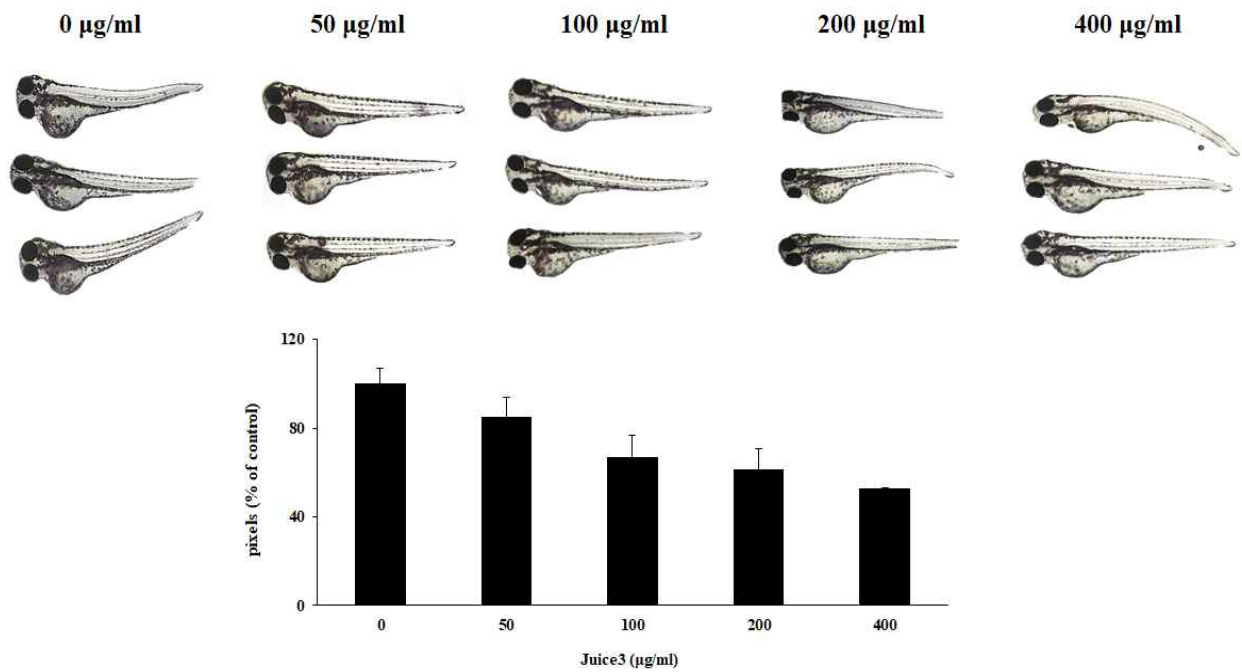


Fig. 23. Effects of trial manufactured good#3 on pigmentation of zebrafish.

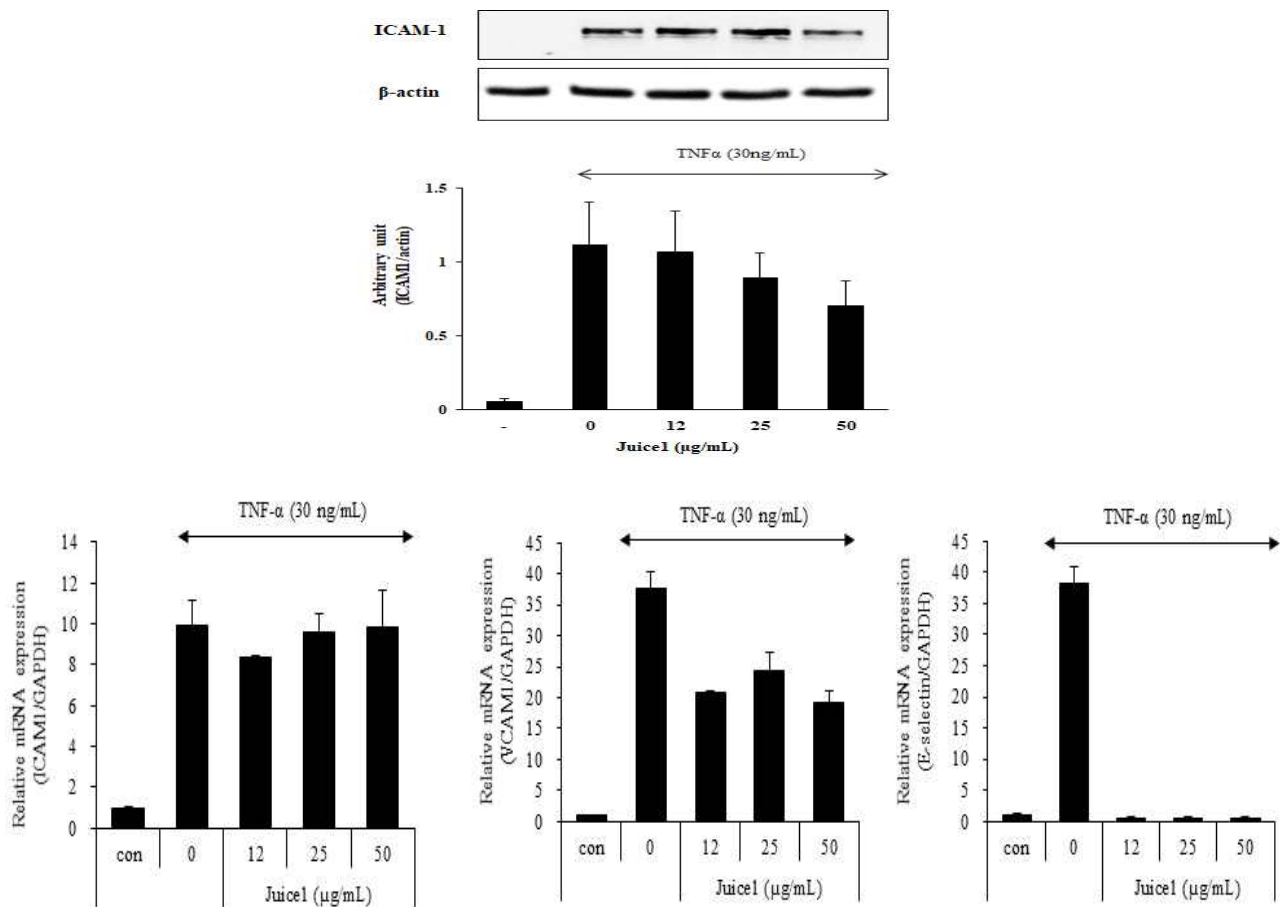


Fig. 24. Effects of trial manufactured good#1 on protein and gene expression of cell adhesion molecules in EA.hy926 cells.

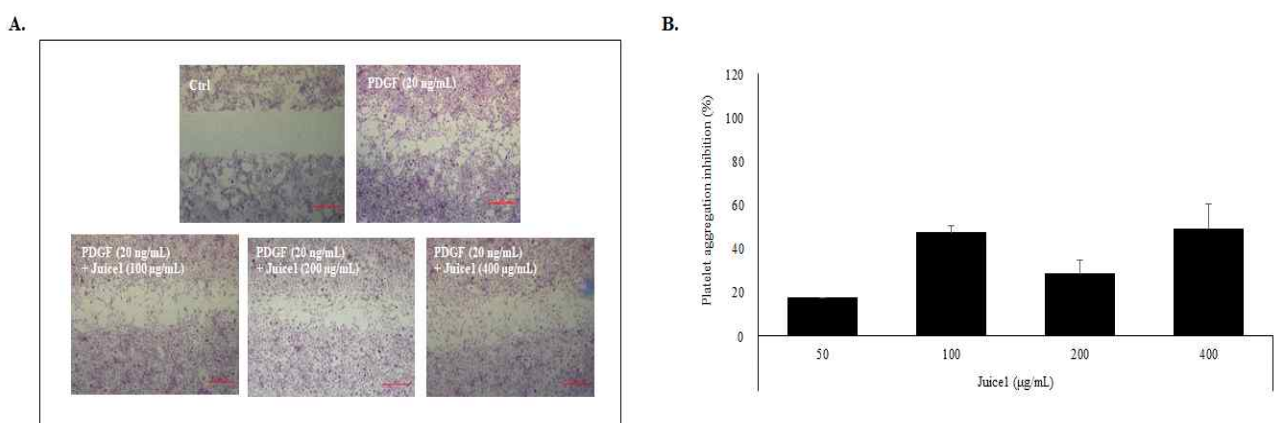


Fig. 25. Effects of trial manufactured good#1 on gene expression of RASMCM migration (A) and collagen-induced platelet aggregation(B).

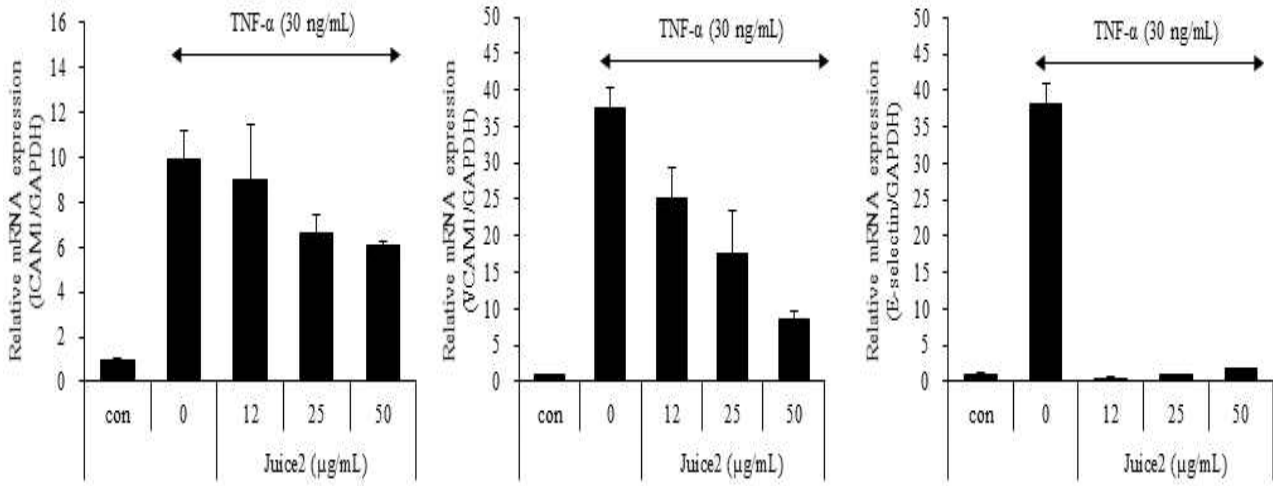
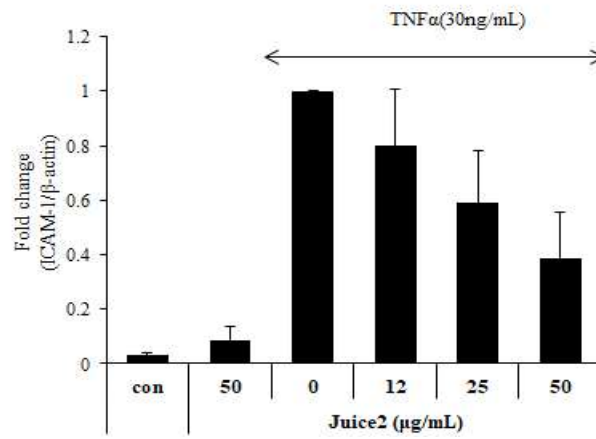


Fig. 26. Effects of trial manufactured good#2 on protein and gene expression of cell adhesion molecules in EA.hy926 cells.

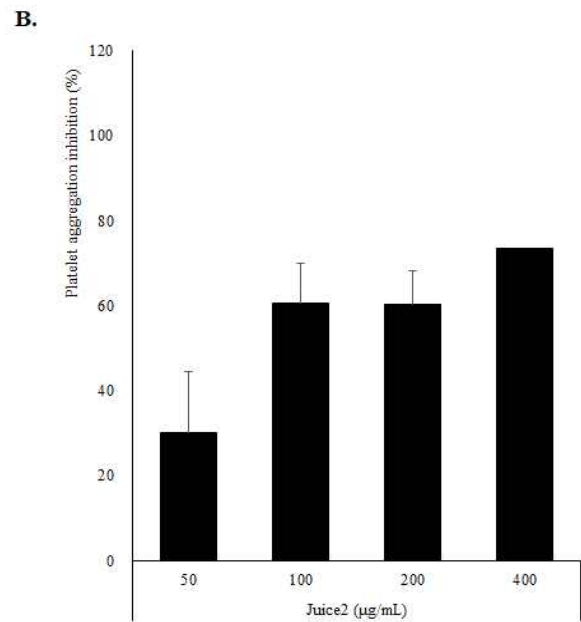
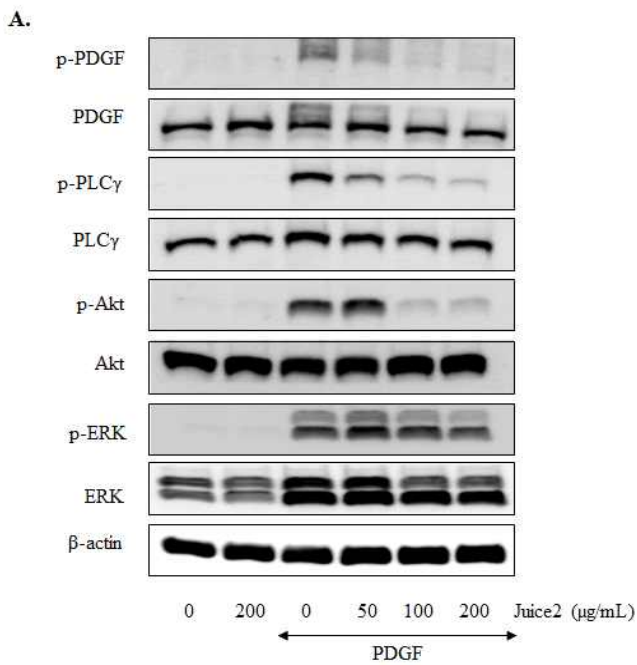
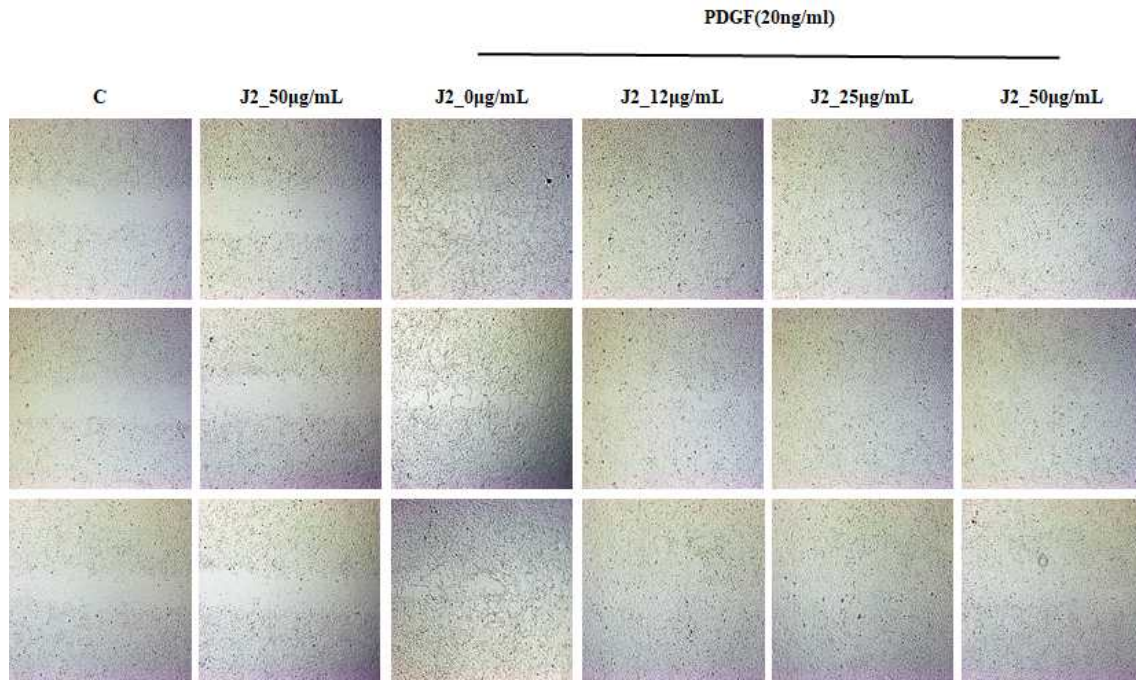


Fig. 27. Effects of trial manufactured good#2 on in RASMC migration, PDGF-induced signaling pathway, and platelete aggregation.

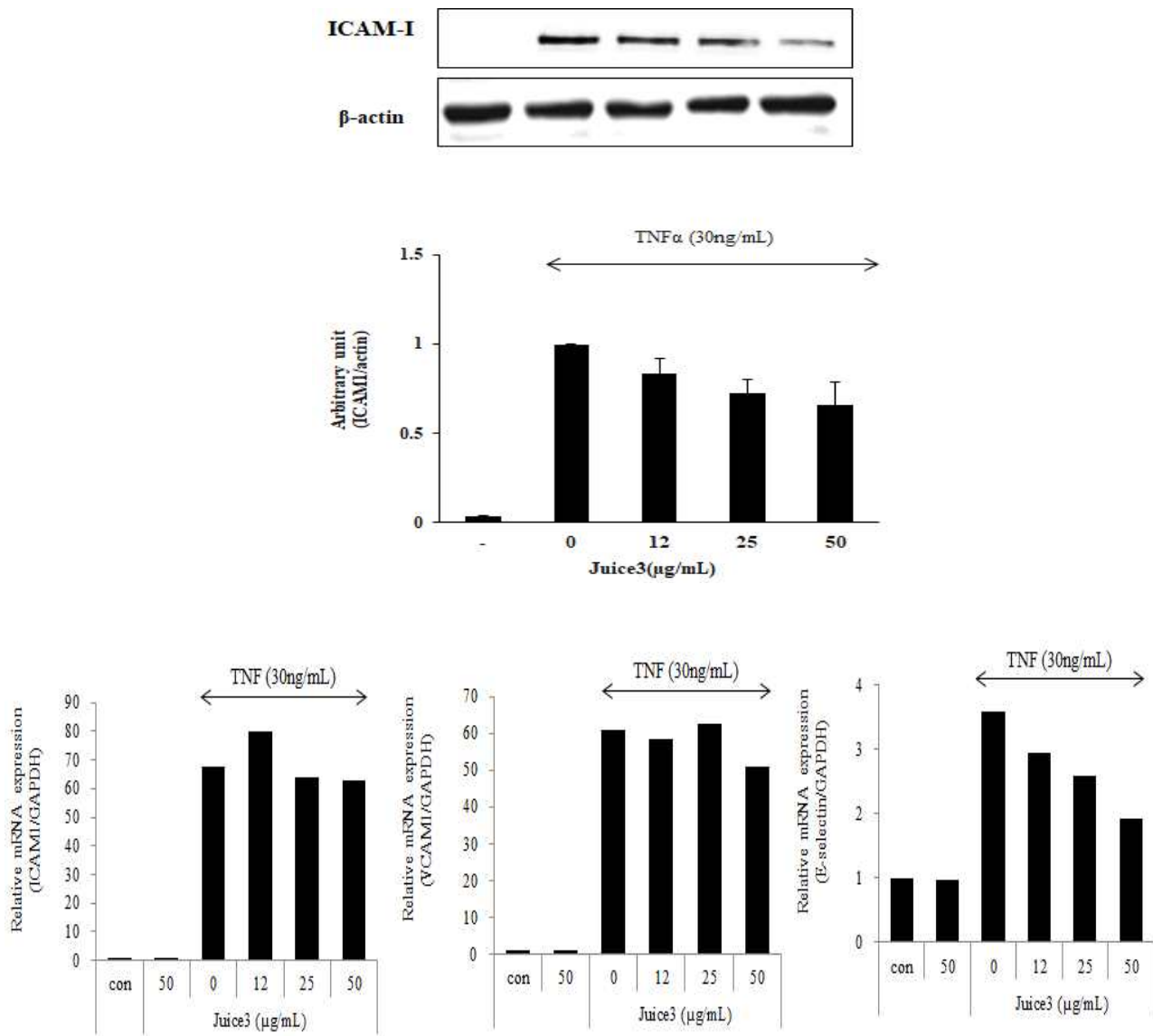


Fig. 28. Effects of trial manufactured good#3 on protein and gene expression of cell adhesion molecules in EA.hy926 cells.

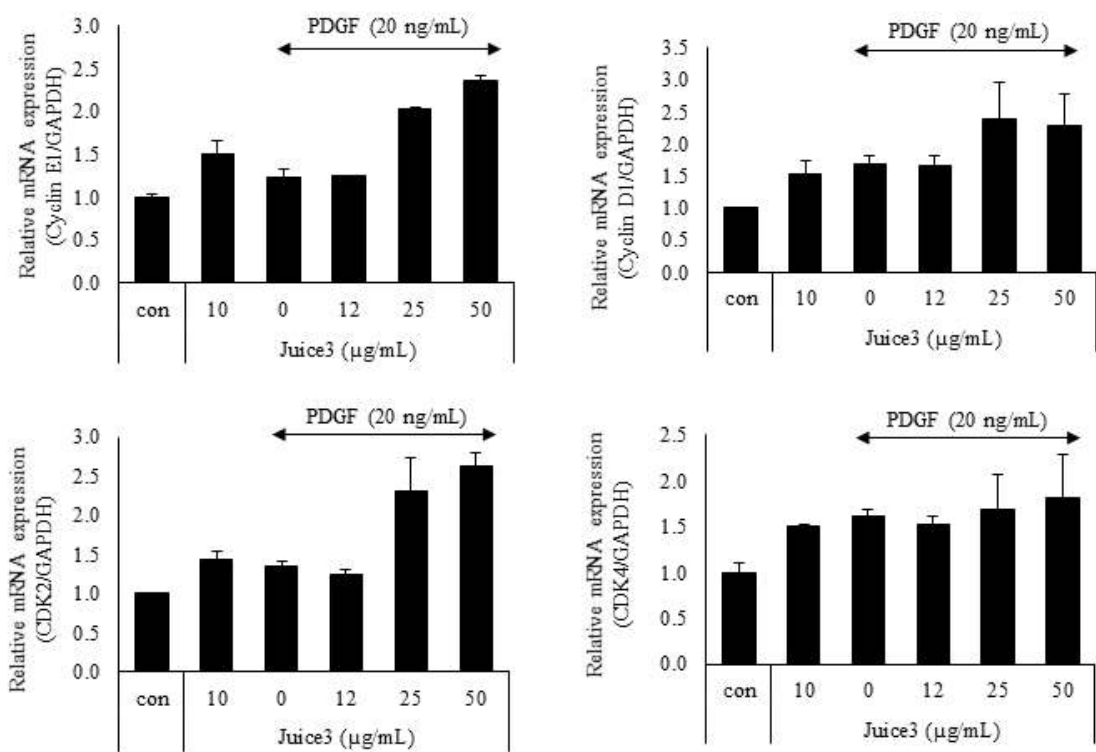
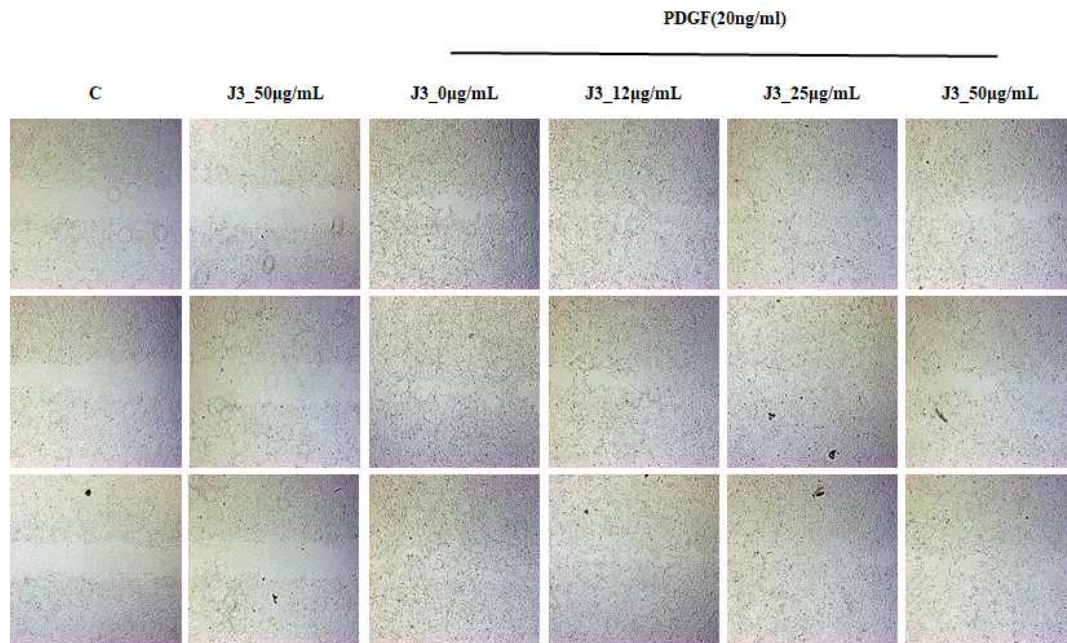
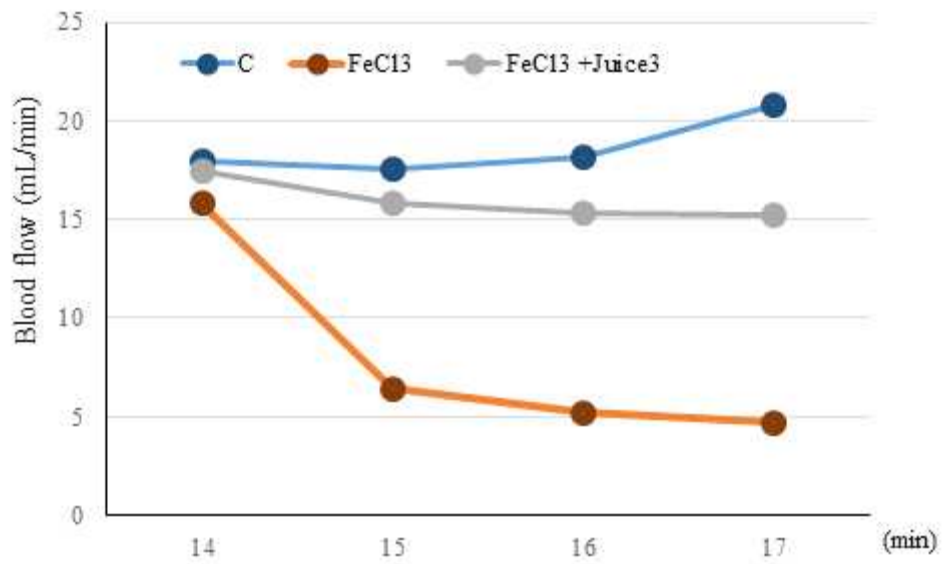


Fig. 29. Effects of trial manufactured good#3 on in cell migration, PDGF-related gene expression in RASMC.



A.



B.

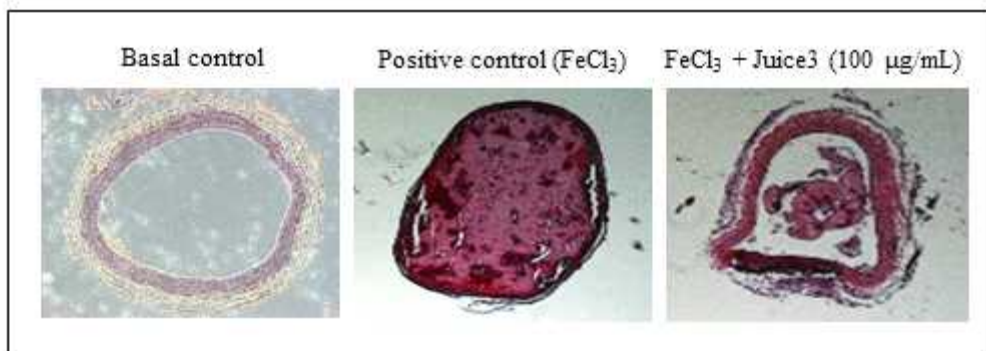


Fig. 30. Effects of herbal medicine and trial manufactured goods #3 on *in vivo* thrombosis model (A, Blood flow assessment; B, H&E staining).

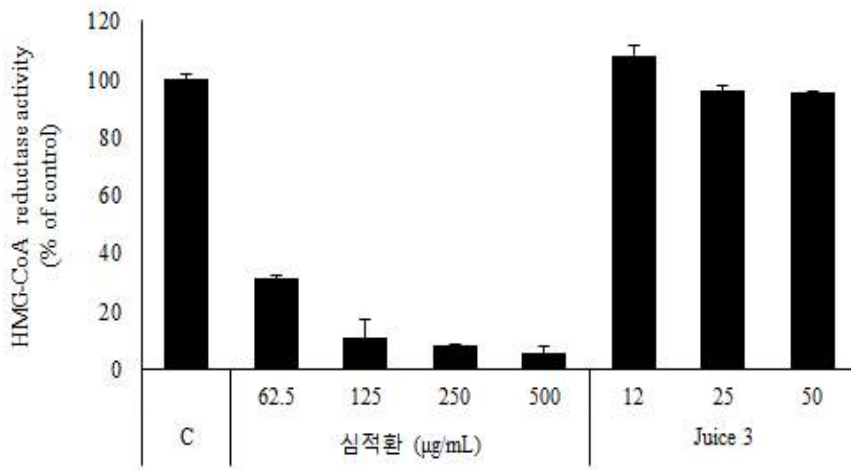
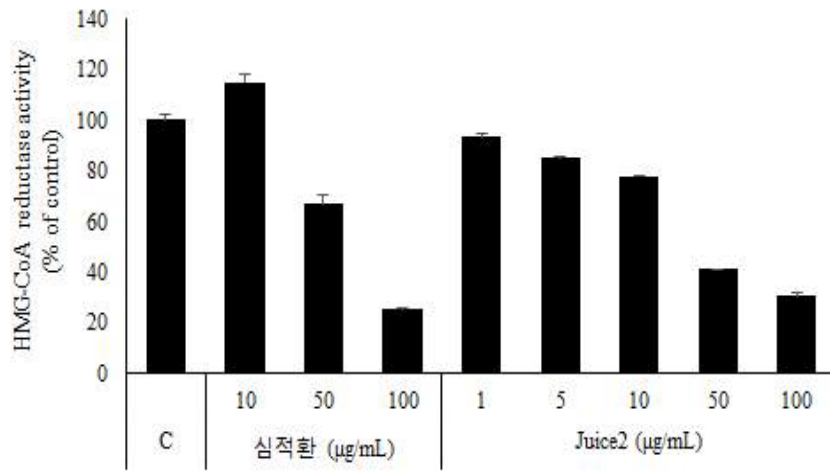
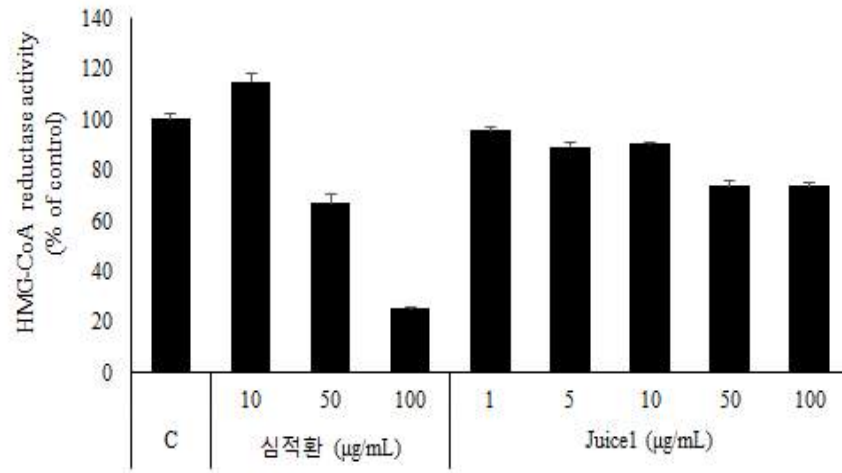


Fig. 31. Effects of trial manufactured goods on HMG-CoA reductase activity.

○ 참고문헌

Marcus AJ. et al.(1993), FASEB J, 7; 516-522.

Packham MA (1994), Can J Physiol Pharmacol 72; 278-284.

Harker LA(1994), N Engl J Med, 330; 1006-1007.

Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. New Engl J Med. 340(2):115-126, 1999

Yang SA. et al., Effect of methanolic extract from *Salvia miltiorrhiza* Bunge on in vitro antithrombotic and antioxidative activities. Korean J. Food Sci. Technol. 39, 83-87. 2007

Guyton, A. C. et al.(2000), In Textbook of Medical Physiology, 152-160, W.W. Saunders Co., Philadelphia

Harrison DG. et al.(1992), Am J Cardiol, 70; 11B-17B.

Leone G. et al.(2001), Haematologica, 86; 1236-1244.

Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. Nat Rev Cancer. 2003;3(10):768-780.

Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. Genes Cells. 2011;16(2):123-140

Blazevic T, Schaible AM, Weinhäupl K, Schachner D, Nikels F, Weinigel C, Barz D, Atanasov AG, Pergola C, Werz O, Dirsch VM, Heiss EH. Indirubin-3'-monoxime exerts a dual mode of inhibition towards leukotriene-mediated vascular smooth muscle cell migration. Cardiovasc Res. 2014;101(3):522-532

Liu Z, Wang J, Huang E, Gao S, Li H, Lu J, Tian K, Little PJ, Shen X, Xu S, Liu P. Tanshinone IIA suppresses cholesterol accumulation in human macrophages: role of heme oxygenase-1. J Lipid Res. 2014;55(2):201-213.

Heiss EH, Schachner D, Werner ER, Dirsch VM. Active NF-E2-related factor (Nrf2) contributes to keep endothelial NO synthase (eNOS) in the coupled state: role of reactive oxygen species (ROS), eNOS, and heme oxygenase (HO-1) levels. J Biol

Chem. 2009;284(46):31579-31586

이상준. 피부 미용 효능을 갖는 신규 식이 천연 소재. Food Science and Industry. 40(4):10-18, 2007.

이숙경. 피부미용과 영양. 서울, 도서출판정담, pp 119-121, 2000.

黃霏莉. 미용중의학. 북경, 과학출판사, pp 79-89, 1999.

채운병, 이승일, 강인정, 이은미. 한방피부미용학 개요. 대한한방피부미용학회, 1(1):145-157, 2005.

김은주, 안성연, 남개원. 적송엽함유 한방화장품이 인체 피부노화에 미치는 영향 연구. 대한본초학회지 21(1):25-31, 2006.

## 4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

			코드번호	D-06	
4-1. 목표달성도					
○					
구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과	달성도
1차 년도 (2016 )	제1세부 가공처리 공정기술 개발 및 건강뷰티음 료 제품화	선정된 과 일류 및 한 방 자 원 의 추출 조건 및 공정조 건 확립	지역주요 과일류 및 한방자원의 선정	지역주요 과일류 7종 및 한방자원 384종 선정	100
			활성 소재의 추출조건 확립 및 최적화	활성 소재의 추출조건 확립 및 최적화 완료	100
			포도껍질, 씨로부터 레스베라트롤 및 카테킨 추출 조건 확립	포도껍질, 씨로부터 레스베라트롤 및 카테킨 추출 조건 확립	100
			포도껍질에 존재하는 piceid의 생물전환 기술 확립 (cellulase 효소 등)	포도껍질에 존재하는 piceid의 생물전환 기술 확립 (cellulase 효소 등)	100
			대규모 추출 조건 설정	대규모 추출 조건 설정 완료	100
			관능검사	1차 recipe 관능검사 완료	100
	제1협동 항산화·항노 화 활성 평가 및 기전 규명	소 재 선 정 및 선정소 재의 항산 화 활성 평 가	지역주요 과일류 및 한방자원의 선정	지역주요 과일류 7종 및 한방자원 384종 선정	100
			다양한 추출물 및 원료 베리류 유래 기능성 성분의 세포모델계 항산화 (효소계) 유도활성 평가 (Nrf2, HO-1, NQO1등)	다양한 추출물 및 원료 베리류 유래 기능성 성분의 세포모델계 항산화 (효소계) 유도활성 평가 (Nrf2, HO-1, NQO1등)	100
			생물전환 포도시료, 한방소재 및 1차 개발 음료의 항산화 활성 및 세포모델계 안티에이징 효과 및 항산화 효소계 유도 활성 검증	생물전환 포도시료, 한방소재 및 1차 개발 음료의 항산화 활성 및 세포모델계 안티에이징 효과 및 항산화 효소계 유도 활성 검증	100
			1차 recipe 결정	1차 recipe 완료	100

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과	달성도
	제2협동 한약재 건강뷰티음 료의 미백 및 혈행개선 활성 연구	소재 선정 및 선정소 재의 미백 활성 평가	지역주요 과일류 및 한방자원의 선정	지역주요 과일류 7종 및 한방자원 384종 선정	100
			선정된 지역한방자원 및 생물 전환 한방자원의 미백 활성 평가 (사람 피부 조직 유래 세포 활용)	선정된 과일류 및 한방자원의 미백활성평가를 통해 4종의 후보소재 선정	100
			활성 소재의 미백 관련 작용기전 규명	후보소재의 미백 작용기전 (melanogenesis 저해기작) 규명을 통한 후보소재의 효능 확인	100
2차 년도 (2017)	제1세부 가공처리 공정기술 개발 및 건강뷰티음 료 제품화	건강뷰티음 료 레시피 개발 및 자동 화 공정 확 립	• 최대효능 발현을 위한 레시피 설정	- 최적레시피 설정 (주름방지, 미백 외 3종)	100
			• 자동화 공정 최적화	- LAN standard process 확립 및 자동화 공정 최적화	100
			• 시제품 개발	- 시제품 개발 (주름방지, 미백 외 3종)	100
			• 제품화 기술개발	- 제품화 및 전시회 홍보	100
	제1협동 항산화·항노 화 활성 평가 및 기전 규명	항노화 (안 티에이징) 활성 평가	• 세포모델계 실험결과 기반 건강뷰티음료 레시피 set up	- 효소처리한 포도과피를 이용하여 음료 제조 (레스베라트롤 강화된 음료 제조)	100
			• 다양한 건강뷰티 음료 레시피에 대한 항산화효소 유도활성 및 안티에이징 지표 변화 평가 (세포 및 동물모델)	- 포도과피로부터 레스베라트롤 생산 및 추출방법 확립 (SCI급 논문투고 완료, 특허출원 1건) - 세포, 동물모델계 포도과피 추출물, 레스베라트롤의 안티에이징 효능 평가 완료 (논문 투고중)	100
			•苦涩 제거 기술 개발 (레시피 조절-관능평가 포함, 나노에멀전 검토)	- 과즙첨가를 통한 고미소재 혼합시 제거 방법 개발 진행 중 (포도, 배, 블루베리 등)	80
	제2협동 한약재 건강뷰티음 료의 미백 및 혈행개선 활성 연구	미백·피부 혈행개선 성 평가	• 혈행개선 활성평가	- 한약재(복분자, 현초, 호도육, 계지, 단삼)의 미백 및 혈행개선 효능확인	90
			• 한방자원 또는 생물전환 한방자원의 배합비 설정	- 한방자원의 배합비 설정	100
			• 배합비에 따른 효능 평가 (미백활성 및 혈행개선성)	- 배합비에 따른 효능 평가 진행 중	100
			• 유효성분 분석	- 유효성분 분석	100

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과	달성도
3차년도 (2018)	제1세부	건강부티음료 디자인 개발 및 상품화	- 디자인 2종 (미백,주름,동안)	- 디자인 3종 완료	100
			- 제품 2종 (미백,주름,동안)	- 제품 2종 (영업 미팅중) 제품 1종 (OEM 판매중)	100
			- 전시회 참가 2회	- 전시회 참가 2회	100
	제1협동	출시제품의 항산화 활성 유효성 평가	- 출시제품에 대한 효능평가 (혈액 샘플의 항산화능 25% 이상 증가) - 시판 타사 제품과 비교평가	- 출시제품에 효능평가 및 타사 제품과 비교평가 - SCI급 논문 2건(심사중)	80
	제2협동	출시제품의 미백 효능 평가	학회참가 및 학회지 논문 투고	미백효능관련 보고서 1건을 제출하고, 학회에 관련주제로 1건 발표함	100

4-2. 관련분야 기여도

- 자사 매출액 증가 (포도씨 응용제품) : 연간 최근 20억
- 포도 부가가치증대 및 가공율 증가로 인한 농가소득 증대
- 동안, 주름, 미백 3종 제품 조만간 출시 및 먹는 화장품 시대 본격화
- 미백 성분의 효능 파악 실험, 연구의 정리
- 주름방지 성분의 효능 파악 실험, 연구의 정리

## 5. 연구결과의 활용계획

코드번호	D-07
------	------

### 5-1. 연구개발 결과의 활용방안

- 우리나라의 해양, 임산, 농산 자원을 활용하여 건강뷰티 영양식품을 개발함에 있어 탐색기술, 소재화 기술, 제품화 기술을 적용하여 연구개발결과물을 도출하고자 한다. 특히 포도가공부산물(과피 및 씨)에 함유된 기능성 성분(레스베라트롤 등)의 추출을 극대화하기 위한 효소처리 조건 확립, 건강 뷰티 활성을 갖는 지역 한약재 추출물을 혼합하여 피부 건강 증진 효능 증대, 피부 건강 증진에 도움을 주는 기능성 드링크 제품을 개발하여 상품화 하고자 하며 두가지 연구개발결과 제품으로 피부노화방지식품(안티에이징)과 미백, 주름방지, 동안식품으로 대별될 수 있으며 개발 후 1차년도에 3.2억, 2차년도 9.0억, 3차년도 160억, 수입대체효과로 30억을 달성하고자 한다.

### 5-2. 기대성과 및 파급효과

- 기술적 측면

이를 위한 핵심개발기술로서

탐색 기술	in vitro, in vivo유효성/위해성 평가기술	활성산소제거 식품, 멜라닌 생성 억제제품, 피부영양, 보습 식품소재 및 제품, 아토피 관련소재 및 제품 등
	생체 내 활성발현 기작규명	
소재화 기술	제품생산수준의 추출 및 정제기술	
	화학적, 효소적 전환(합성) 기술	
	고순도 제품화 기술	
제품화 기술	다기능제품개발	
	최종제품의 인체전 유효성/위해성 평가기술	
	맞춤형 제품개발	

이상의 탐색기술, 소재화기술, 제품화 기술을 핵심적으로 개발하고 뷰티 관련 영양식품 외에 미래응용제품으로 활성산소제거 식품멜라닌 생성 억제제품, 피부영양, 보습식품소재 및 제품, 아토피 관련 소재 및 제품 등도 개발하고자 한다.

- 경제적·산업적 측면

	1차년도(2019)		2차년도(2020)		3차년도(2021)		4차년도(2022)		합 계	
	매출(억원)	고용(명)	매출(억원)	고용(명)	매출(억원)	고용(명)	매출(억원)	고용(명)	매출(억원)	고용(명)
매출액	8	2	16.2	4	25	7	42	10	90.4	23



## 6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08
<input type="radio"/> 해당 없음		

## 7. 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09
○ 일반과제, 「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 해당하지 않음	

## 8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)		
		해	당	없	음			

## 9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
<p>[경북대학교포도마을]</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 해당 연구실 안전점검 및 정밀 안전진단 실시</li> <li>○ 참여 연구원의 교육 훈련 및 건강 검진 실시</li> <li>○ 산재 화재보험 등 보험가입</li> <li>○ 소화기 상시 비치</li> </ul>		
<p>[경북대학교]</p> <p><b>경북대학교 연구실 안전조치 이행계획</b></p>		
<p>1. 담당부서 : 총괄 - 사무국 시설과, 교육 - 환경과학기술연구소</p>		
<p>2. 담당자 : 총괄 - 남경환(053-950-5055)           교육 - 이영호(053-950-6813)</p>		
<p><b>3. 안전조치 이행사항</b></p>		
<p>1) 연구실 안전환경관리자 지정</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 관련근거 : 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 제6조의 2 및 시행령 제5조</li> <li>- 대구캠퍼스 : 남경환, 이영호</li> <li>- 상주캠퍼스 : 김진봉, 이창섭</li> </ul>		
<p>2) 연구실 안전관리규정 비치</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 관련근거 : 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 제6조 및 시행규칙 제2조</li> <li>- 안전관리규정, MSDS, 비상연락망, 연구실 안전수칙 비치 및 게시</li> <li>- 대상 : 923실(자연과학대학, 공과대학, IT대학, 농업생명과학대학, 예술대학, 사범대학, 수의과대학, 약학대학, 생활과학대학, 간호대학, 의학전문대학원, 치의학전문대학원, 공동실험실습관, 생태환경대학, 과학기술대학, 기타 연구시설 등)</li> </ul>		
<p>3) 연구실 안전점검 실시</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 관련근거 : 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 제8조 및 시행령 제7조</li> <li>- 2012년 정기점검 실시(2012.08.01 ~ 10.09) : 1년 1회 실시</li> <li>- 2012년 점검업체 : (주)제이스코리아</li> <li>- 대상 : 923개실</li> <li>- 정기점검 실시 후 연구실 위험 요소, 전기시설 등 보완설치</li> </ul>		
<p>4) 연구실 정밀안전진단 실시</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 관련근거 : 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 제9조 및 시행령 제9조, 시행규칙 제4조</li> <li>- 2011년 정밀안전진단 실시(2011.09.29 ~ 12.07) : 2년에 1회 실시</li> <li>- 2011년 점검업체 : 교육시설 재난공제회</li> <li>- 대상 : A, B등급 600개소</li> </ul>		

- 점검결과 : 1등급(233실) - 문제가 없고 안전성이 유지된 상태  
2등급(201실) - 경미한 결함 일부 보강 필요한 연구실  
3등급(166실) - 전체적인 안전에 크게 영향을 미치지 않는 일부 보강이 필요한 연구실
- 정밀안전진단 진단 결과에 의거 전기 및 안전시설 등 보완설치 진행

**5) 연구실 안전교육 실시**

- 관련근거 : 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 제18조 제2항 및 시행령 제17조, 시행규칙 제9조
- 모든 과학기술분야 연구활동종사자는 월 1시간 이상 안전교육 실시-방학 4개월을 뺀 연간 8시간 이상 집합교육 실시
- 2011년 실시 : 총 4회 집합교육 실시
- 교육일시 : 2011.02.24, 2011.08.22~23, 2011.08.26
- 교육장소 : 정보전산원 1층 세미나실, IT3호관 111호
- 참석인원 : 총 956명 (반도체분야 161명, 기타 과학기술분야 795명)
- 교육기관 : 경북대학교 환경과학기술연구소
- 교육내용

교육과목 및 내용	교육강사	교육시간
등 록	환경과학기술연구소	09:00 ~ 09:30
개인보호구착용	한국3M(주)기술연구소 이상영 책임연구원	09:30 ~ 10:20
생물안전관리	이희일연구관	10:30 ~ 11:20
화학안전관리	인제대학교 한돈희 교수	11:30 ~ 12:20
점 심	-	12:30 ~ 13:30
응급구조 및 처치	대구산업정보대학 김중배 교수	13:30 ~ 15:20
휴 식	-	15:20 ~ 15:40
대학의 실험폐기물 관리	환경과학기술연구소 이영호	15:40 ~ 17:00
연구실 안전 질의 응답 및 설문조사	환경과학기술연구소 박선민	17:00 ~ 17:30

**6) 연구활동종사자 보험 가입**

- 관련근거 : 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 제14조 제1항 및 시행령 제15조 제1항
- 2012년 보험 가입기관 : 교육시설재난공제회
- 가입대상 : 학부생(13,618명), 대학원생(3,365명), 연구원 (325명) 총 17,308명 가입
- 공제가입금액 : 사망 1억원/인당, 부상 1천만원/인당

**7) 연구활동종사자 건강검진**

- 관련근거 : 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 제18조 제4항 및 시행규칙 제10조 제1항
- 2011년 건강검진 기관 : 계명대학교 동산의료원
- 건강검진 대상 : 박사과정(354명), 석사과정(532명), 연구원(229명) 총 1,115명
- 건강검진 종류 : 일반건강검진 + 특수건강검진

**8) 연구실 안전시설 보완**

- 연구실 안전표지판 부착 (808실)
- 연구실 흡후드 배기시설보수(46실)
- 연구실 가연성·독성가스 감지기 및 경보장치 설치(3실)
- 안전자료 보관함 구매설치 예정(923실)
- 비상세안기 구매설치 예정(44실)
- 안전 캐비닛 구매설치 예정(20실)
- 연구실 안전표지판 부착 예정(115실)

## 10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	Antioxidant Potential of Selected Korean Edible Plant Extracts	경북대학교	교신저자 (김정상)	BioMed Research International	2.583	2017.11.06	단독사사	SCI(E)/ 3회인용(G oogle Scholar 기준)
2	논문	Grape Peel Extract and Resveratrol Inhibit Wrinkle Formation in Mice Model through Activation of Nrf2/HO-1 Signaling Pathway	경북대학교	교신저자 (김정상)	Journal of Food Science	2.018	심사 중	단독사사	SCI
3	논문	Improved extraction of resveratrol and antioxidants from grape skin using heat and enzymatic treatments	경북대학교	교신저자 (김정상)	Journal of the Science of Food and Agriculture	2.379	심사 중	단독사사	SCI
4	특허 출원	열 및 효소 처리를 통하여 포도 껍질로부터 레스베라트롤을 추출하는 방법	경북대학교 산학협력 단	발명자 (김정상)	대한민국	-	2017.10.31	단독사사	-
5	국제 학술 대회 발표	Potential Skin Anti-Aging Effects of Korean Medicinal Plant Extracts	경북대학교	제니스 아베릴 라 (발표자)	Experimental Biology 2017	-	2017.04.22. -2017.04.26	단독사사	-
6	국제 학술 대회 발표	Thermal Pre-treatment Facilitates Enzymatic Deglycosylation of Piceid to Resveratrol and Extraction of Essential Antioxidants in Grape Skin	경북대학교	제니스 아베릴 라 (발표자)	International Society for Nutraceuticals and Functional Foods (ISNFF) 2017	-	2017.10.22 -2017.10.25	단독사사	-
7	국제 학술 대회 발표	Protective Effect of Fruit or Herbal Supplementation against UV-induced Skin Damage Cell and Mice Models	경북대학교	김정은 (발표자)	International Society for Nutraceuticals and Functional Foods (ISNFF) 2017	-	2017.10.22 -2017.10.25	단독사사	-
8	국제 학술	Antioxidative effect of resveratrol-enriched	경북대학교	제니스 아베릴	International Conference	-	2018.05.16 -2018.05.18	단독사사	-

	대회 발표	grape peel extract on human keratinocytes		라 (발표자)	on Food Chemistry & Nutrition				
9	국제 학술 대회 발표	Protective Effect of Fruit or Herbal Supplementation against UV-induced Skin Damage in Human Keratinocytes and Mice Model	경북대학교	김정은 (발표자)	2018 KoSFoST International Symposium and Annual Meeting	-	2018.06.27 -2018.06.29	단독사사	-
10	국제 학술 대회 발표	Protective Effect of Resveratrol-Containing Grape Peel Extract against UVB-induced Skin Damage	경북대학교	김정은 (발표자)	2018 KFN International Symposium and Annual Meeting	-	2018.10.31 -2018.11.02	단독사사	-
11	국제 학술 대회 발표	The inhibitory effects of traditional Korean herbal medicines on melanogenesis	한약진흥재단	김효정 (발표자)	2017 Intenational Synposium and Annual Meeting of the KSABC	-	2017.06.15.-2017.06.17	단독사사	-
12	국제 학술 대회 발표	The inhibitory effects of herbal medicine <i>Geranium thunbergii</i> on cell adhesion molecule expression and migration in vascular endothelial and smooth muscle cells	한약진흥재단	김효정 (발표자)	The role of food scientist & food industries for food security	-	2017.06.21.-2017.06.23	단독사사	-
13	국제 학술 대회 발표	The anti-melanogenic activities of herbal formula through CREB-mediated MITF downregulation	한약진흥재단	김효정 (발표자)	2018 KoSFoST International Symposium and Annual Meeting	-	2018.06.27 -2018.06.29	단독사사	-
14	특허 출원	포도 및 베리류를 기반으로 하는 건강뷰티음료 조성물	김재식헬스푸드(주)	발명자 김재식	대한민국	-	2017.11.24	단독사사	-



## 11. 기타사항

코드번호	D-13
<p>○ 없음</p>	

## 12. 참고문헌

코드번호	D-14
Marcus AJ. et al.(1993), FASEB J, 7; 516-522.	
Packham MA (1994), Can J Physiol Pharmacol 72; 278-284.	
Harker LA(1994), N Engl J Med, 330; 1006-1007.	
Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. New Engl J Med. 340(2):115-126, 1999	
Yang SA. et al., Effect of methanolic extract from Salvia miltiorrhiza Bunge on in vitro antithrombotic and antioxidative activities. Korean J. Food Sci. Technol. 39, 83-87. 2007	
Guyton, A. C. et al.(2000), In Textbook of Medical Physiology, 152-160, W.W. Saunders Co., Philadelphia	
Harrison DG. et al.(1992), Am J Cardiol, 70; 11B-17B.	
Leone G. et al.(2001), Haematologica, 86; 1236-1244.	
Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. Nat Rev Cancer. 2003;3(10):768-780.	
Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. Genes Cells. 2011;16(2):123-140	
Blazevic T, Schaible AM, Weinhäupl K, Schachner D, Nikels F, Weinigel C, Barz D, Atanasov AG, Pergola C, Werz O, Dirsch VM, Heiss EH. Indirubin-3'-monoxime exerts a dual mode of inhibition towards leukotriene-mediated vascular smooth muscle cell migration. Cardiovasc Res. 2014;101(3):522-532	
Liu Z, Wang J, Huang E, Gao S, Li H, Lu J, Tian K, Little PJ, Shen X, Xu S, Liu P. Tanshinone IIA suppresses cholesterol accumulation in human macrophages: role of heme oxygenase-1. J Lipid Res. 2014;55(2):201-213.	
Heiss EH, Schachner D, Werner ER, Dirsch VM. Active NF-E2-related factor (Nrf2) contributes to keep endothelial NO synthase (eNOS) in the coupled state: role of reactive oxygen species (ROS), eNOS, and heme oxygenase (HO-1) levels. J Biol Chem. 2009;284(46):31579-31586	
이상준. 피부 미용 효능을 갖는 신규 식이 천연 소재. Food Science and Industry. 40(4):10-18,	

2007.

이숙경. 피부미용과 영양. 서울, 도서출판정담, pp 119-121, 2000.

黄霏莉. 미용중의학. 북경, 과학출판사, pp 79-89, 1999.

채윤병, 이승일, 강인정, 이은미. 한방피부미용학 개요. 대한한방피부미용학회, 1(1):145-157, 2005.

김은주, 안성연, 남개원. 적송엽함유 한방화장품이 인체 피부노화에 미치는 영향 연구. 대한본초학회지 21(1):25-31, 2006.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치 기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산 식품부에서 시행한 고부가가치기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.