

발 간 등 록 번 호

11-1543000-000342-01

**제주 유래 신다리 및 오메기술 공법을 응용한  
제주산 특용작물의 화장품 소재 사업화**

(The development on the cosmetic raw materials of medicinal herbs using  
the Jeju-originated ShinDaRi and OMe traditional techniques)

(주)코씨드바이오팜

농림축산식품자료실



0004410

농 립 축 산 식 품 부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “제주 유래 쉰다리 및 오메기술 공법을 응용한 제주산 특용작물의 화장품 소재 사업화에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2014년 01월 10일

주관연구기관명 : (주)코씨드바이오팜

주관연구책임자 : 박성민

연 구 원 : 이정노

연 구 원 : 최수연

연 구 원 : 이누림

위탁연구기관명 : 대구한의대학교

위탁연구책임자 : 박종필

# 요 약 문

## I. 제 목

제주 유래 쉰다리 및 오메기술 공법을 응용한 제주산 특용작물의 화장품 소재 사업화  
(The development on the cosmetic raw materials of medicinal herbs using the Jeju-originated ShinDaRi and OMe traditional techniques)

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 기술연구의 최종목표는 제주민간에서 전래되는 전통발효공법인 쉰다리와 오메기술 공법의 우수기술을 기반으로 제주산 특용작물의 과학적 검증을 통하여 새로운 기능성 화장품 소재를 개발함으로써, 실용화 되지 못한 민간유래의 유용자원의 1차 생산성 향상과 2차 연구개발 사업 활성화로 인한 청정 제주 이미지에 부합한 뷰티산업의 고부가가치 상품을 산업화함으로써 농산업의 소득 증대와 민간 우수기술의 활성화에 기여하여 하는 새로운 사업화 모델을 확립하고자 함.

## III. 연구개발 내용 및 범위

- 본 연구의 개발 내용은 제주산 특용작물로부터 제주 전통발효공법인 쉰다리와 오메기술 공법의 기술적 응용을 통해, 피부의 세포활성과 장수유전자(sirtuin, 시르투인)를 활성화 시켜 피부장벽기능을 강화한 기능성 화장품 소재를 개발하는 것임.
- 제주산 특용작물(삼백초, 대황, 호장근, 뽕나무 등)에 다량 함유된 식물성 배당체를 제주 전통발효공법과 주관기관에서 보유하고 있는 특허균주인 (붉은덕다리버섯, 잎새버섯) 균사체 배양기술을 접목하여, 생리활성 및 생체흡수능이 우수한 비배당체(resveratrol, fisetin, quercetin 등)의 생물전환(bioconversion) 소재를 개발하는 것임.
- 새로운 피부효능 평가법을 표준화하여 피부 저자극성 비배당체의 피부 세포활성과 장수유전자(sirtuin) 활성화의 과학적 효능을 검증하고, 피부장벽기능이 획기적으로 개선된 고기능성 화장품 소재를 산업화하는 것임.

## IV. 연구개발결과

제주산 특용작물의 화장품소재로의 이용을 확인하기 위하여 중금속 시험을 거쳐 안전하다는 것을 확인 하였다. 이어 제주 쉰다리 누룩으로 생물전환 기술을 이용하여 얻은 발효물에 대한 분석결과 총 9종의 균이 발견 되었고, 동정 결과 1개의 신규 균을 확인 할 수 있었다. 발효물의 이용을 위하여 beta-glucosidase의 함량을 분석한 결과 유의한 결과를 얻을 수는 없었지만 추후에 누룩균의 최적 배양조건을 연구할 필요성을 갖게 되었다. 또한 beta-glucosidase는 배당체를 비배당체로 변환하는 효소로 작은 분자의 비배당체를 생물유효성분으로 이용할 수 있게 해주는 역할을 한다. 이의 필요성으로 자사에서 특허로 보유하고 있는 균주인 붉은덕다리 버섯균사체로 배양한 결과 beta-glucosidase에 의해 배당체가 비배당체로 생물전환이 이루어져 작은분자인 비배당체의 이용이 가능하다는 것을 확인하였다. 또한 제주산특용작물인 대황 및 호장근을 이용하여 화장품으로의 이용가치를 확인하였다. 발효물의 분석을 통하여 유효 물질의 함량을 확인하였으며 화장료로서의 세포 평가를 하여 항노화 및 보습에 효능이 있는 것을 확인하여 화장품 소재로서의 이용가치를 확인 할 수 있었다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

○ 기술적, 경제적 기대효과 : 제주 전통 쉰다리, 오메기술 공법의 단순 체험문화를 벗어나 첨단 발효공법과 과학적 검증을 통한 농업현장의 활용도를 높이고, 1차 산업의 제주산 특용작물의 생산성 향상과 수요처 확보와 동시에 화장품 산업 및 관련 제품은 제주도가 추진하고 있는 건강뷰티 생물산업과의 연계가 가능하므로, 연구 인프라 구축 및 산업화, 마케팅 등의 상호 지원 및 공유가 용이함.

○ 상품화 및 수요처 기대효과 :

- 국내 주요 화장품 업체와의 기술이전 및 수입원료 대체효과와 수출상품 개발
- 국내 화장품 업체(주요거래처; 한불, 사임당, 두리, LG생활건강 등)의 기능성원료(주름개선효과) 및 효능원료(피부장벽강화, 보습 등)로 공급
- 해외 화장품 업체(주요거래처; 이스트힐/일본, 코스맥스/중국공장 등) 피부진정, 보습, 탄력증진 등의 소재로 수출 공급
- 국내 생활용품 업체(주요거래처; LG, 아모레퍼시픽, 코스맥스)의 헤어 제품에 공급

# 목 차

- 제 1 장 연구개발과제의 개요
- 제 2 장 국내외 기술개발 현황
- 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과
- 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도
- 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획
- 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보
- 제 7 장 연구시설·장비 현황
- 제 8 장 참고문헌

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 1. 기술의 개요

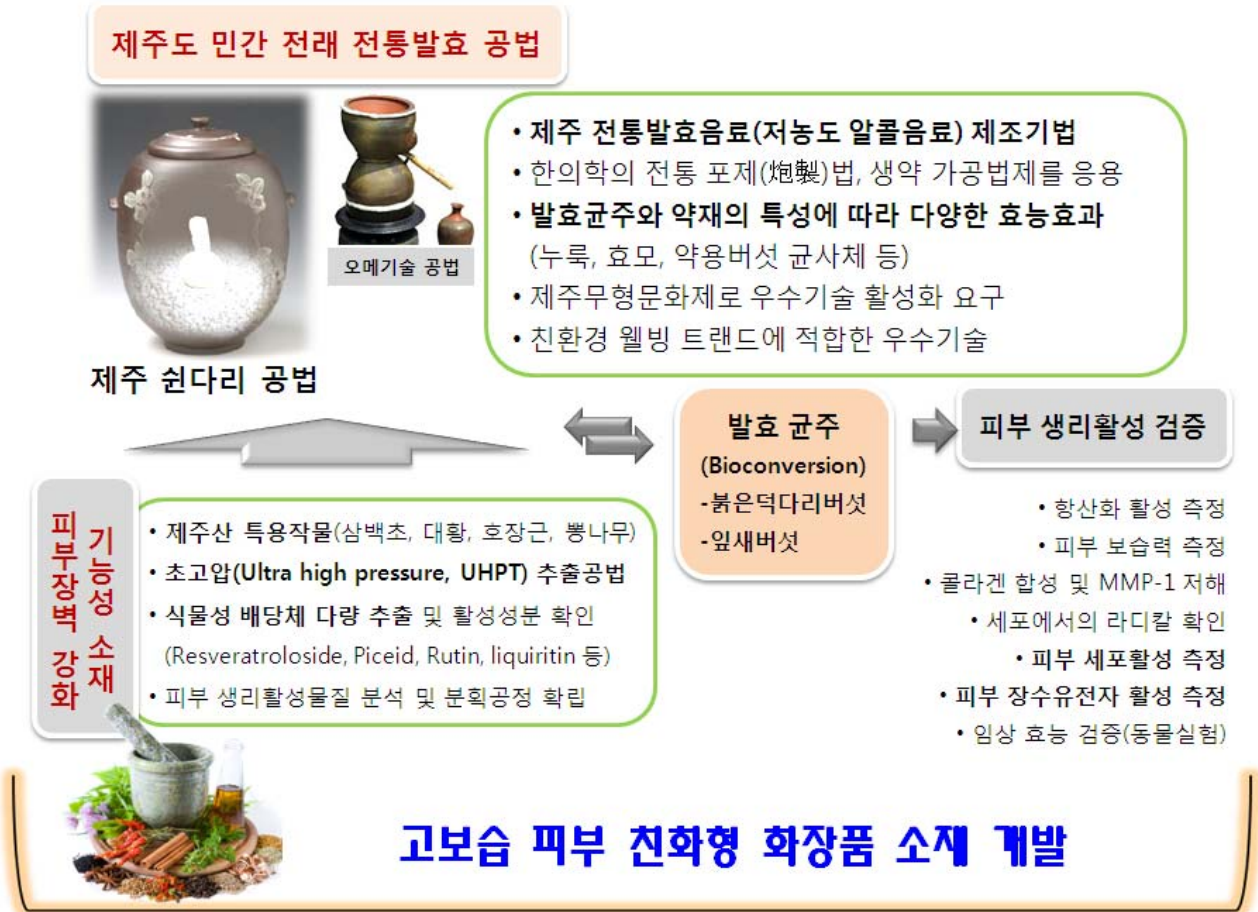


그림 1. 과제의 기본 개념도

## ● 기술개발의 궁극적인 목표

본 기술연구의 최종목표는 제주민간에서 전래되는 전통발효공법인 쉰다리와 오메기술 공법의 우수기술을 기반으로 제주산 특용작물의 과학적 검증을 통하여 새로운 기능성 화장품 소재를 개발함으로써, 실용화 되지 못한 민간유래의 유용자원의 1차 생산성 향상과 2차 연구개발 사업 활성화로 인한 청정 제주 이미지에 부합한 뷰티산업의 고부가가치 상품을 산업화함이며 농산물의 소득 증대와 민간 우수기술의 활성화에 기여하여 하는 새로운 사업화 모델을 확립하고자 함.

## ● 기술개발의 기반성

제주도는 천혜의 자연과 한방자원이 풍부하고 한약재의 생산과 유통 등 한방산업의 인프라가 잘 형성되어 있으며, 산·학·연 한방산업 클러스터의 최적의 여건을 갖추고 있으나, 천연 한방자원의 단순추출 또는 구체적인 활용방안이 부족한 현실에서 이렇다 할 부분을 산업화하지 못하여, 한방자원의 활용 영역을 넓히고 제주 건강 뷰티 생물산업과 관광산업과의 연계를 통해 경쟁력이 있는 고부가가치의 산업화가 필요함.

## ● 기술개발의 부합성

이러한 문제를 해결하기 위하여 주관기관인 (주)코씨드바이오팜은 충북 제천에 위치한 전통의 약산업센터와 한방임상지원센터 등과 연계되어 상호 연구와 학술활동을 주도하고 있으며, 당사가 보유한 첨단 발효공학기술과 제주 민간유래 우수기술 그리고 풍부한 천혜의 한방자원을 결합시킨 새로운 연구-산업화 모델을 구상하고 있어 본 연구과제가 농림수산식품부에서 제시하는 지역 현장우수기술발굴 모델의 단초가 될 수 있음.

## ● 기술개발의 핵심성

- 본 연구의 개발 내용은 제주산 특용작물로부터 제주 전통발효공법인 쉰다리와 오메기술 공법의 기술적 응용을 통해, 피부의 세포활성과 장수유전자(sirtuin, 시르투인)를 활성화 시켜 피부장벽기능을 강화한 기능성 화장품 소재를 개발하는 것임.
- 제주산 특용작물(삼백초, 대황, 호장근, 뽕나무 등)에 다량 함유된 식물성 배당체를 제주 전통발효공법과 약용버섯(붉은덕다리버섯, 잎새버섯) 균사체 배양기술을 접목하여, 생리활성 및 생체흡수능이 우수한 비배당체(resveratrol, fisetin, quercetin 등)의 생물전환 소재를 개발하는 것임.
- 새로운 피부효능 평가법을 표준화하여 피부 저자극성 비배당체의 피부 세포활성과 장수유전자(sirtuin) 활성화의 과학적 효능을 검증하고, 피부장벽기능이 획기적으로 개선된 고기능성 화장품 소재를 산업화하는 것임.

## 2. 기술개발의 필요성

### (1) 개발 대상 기술·제품의 개념

- 본 연구의 최종 목표는 민간에서 전래되는 제주 전통발효공법(쥬다리, 오메기술)의 우수 기술을 발굴하여 피부 생리활성이 우수한 제주산 특용작물로부터, 인체의 피부세포(각질 세포, 섬유아세포)를 활성을 증가시키고 세포의 수명연장에 관여하는 장수유전자(sirtuin)를 활성화하여 피부 최외각층의 피부장벽을 강화하여, 활성산소종에 대응할 수 있는 항산화 활성, 피부 면역 기능을 회복하여 아토피성 피부개선, 피부 염증 반응에 대응할 수 있는 염증 억제 활성, 피부 건조 현상에 대한 보습 기능 및 광노화에 따른 피부 주름 생성 억제능 등 화장품에서 요구되는 다양한 피부 효능을 가지는 피부 친화형 화장품 소재를 개발하는 것은, 국내외 건강·뷰티 산업의 성과 활용과 그 선도물질을 다양한 산업에 적용함으로써 산업화의 가능성을 증대시키고 이를 응용한 복합적 발전을 유도하게 될 것임.
- 본 연구를 통해 제주 전통발효공법의 우수성을 과학적으로 검증하고 나아가 제주산 특용작물로부터 자외선 또는 외부 자극으로부터 손상된 피부를 효과적으로 대응하며, 피부의 염증완화 효과, 수분공급 및 피부 탄력증진 등 피부장벽기능이 강화된 고보습 피부 친화형 화장품 소재를 개발하는 것이 목적임.
- 식물성 바이오플라본(비배당체, aglycones) 중 피부 생리활성이 우수한 비배당체인 resveratrol, quercetin, fisetin 등을 주성분으로 하는 피부장벽기능 강화 소재를 개발하는 것임.

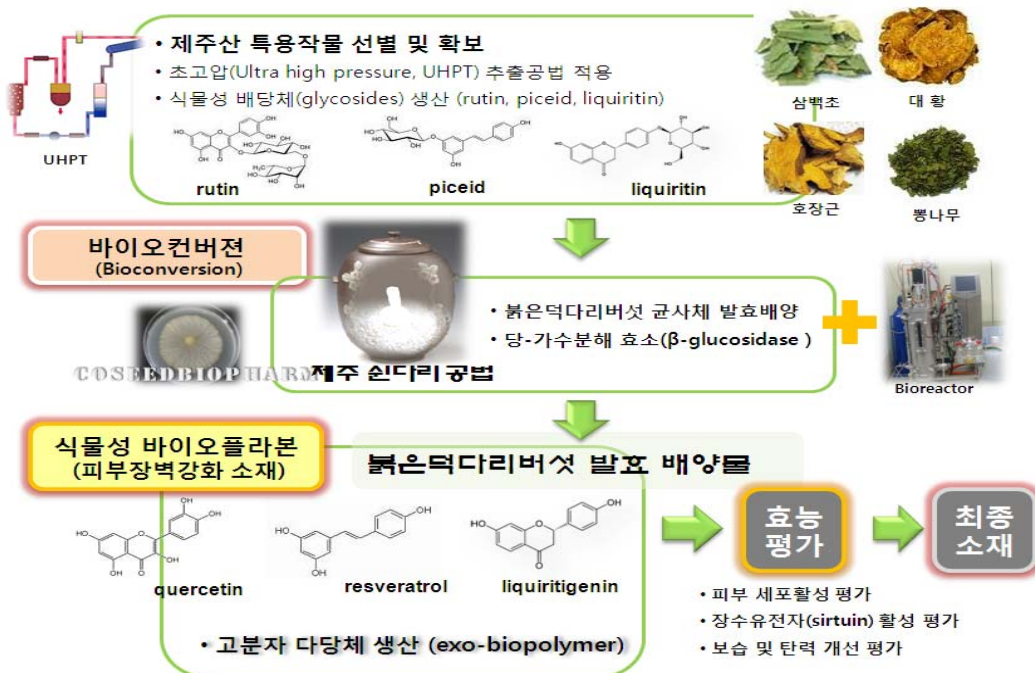


그림 2. 개발 대상 제품의 기술 모식도



## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1. 개발 대상 기술·제품의 개발 배경

- 제주도에 자생하는 식용 및 약용 식물현황을 보면, 제주도는 550여 종류(도감자료 이용 검색 결과)의 다양한 식물이 분포하고 있는 자원의 보고임(양치식물류 43종, 나자식물 6종, 단자엽식물 31종, 쌍자엽식물 370종).
- 환경자원연구원 한라생태환경연구부 조사 결과, 상록성 목본(후박나무 등) 31종, 낙엽수(서어나무등) 105종, 만경류 51종, 초본류 358종, 독성식물(뱀톥, 천남성, 박새 등) 43종, 멸종위기 야생식물 6종(솔잎란, 만년콩, 삼백초, 순채등)등 358종이 보고됨.
- 제주는 관광과 농업 위주의 단순한 산업구조의 한계에 봉착하였고, 세계화 및 지식기반시대를 맞아 대외적 환경이 관광과 농업만으로는 먹고 사는 문제가 해결될 수 없는 상황이 되었기 때문에 그 어느 지역보다 신성장 동력산업 발굴과 기존산업의 업그레이드를 통한 신산업 육성이 시급함.
- 제주도는 공업단지 등의 2차 산업을 유치하지 않고 1차 및 3차 산업 위주로 청정지역으로 유지 보전되고 있는 지역산업 및 정책적 특수성이 있으므로, 1차 산업은 제주지역의 기간산업이 될 수밖에 없음.
- 제주산 식물체 이용한 향장 연구 현황을 보면, 중대거리 나무, 제주조릿대, 제주한란 등 약 54종의 식물을 이용한 연구 개발 사례가 보고되고 있으나 한방 자원에 대한 인식 및 관련 통계, 인프라 등이 현저히 부족함.
- 제주 자생식물의 산업적 활용방안으로 예로부터 전래되는 전통주 제조방식의 원다리공법과 오메기술 방식의 전통발효공법에 약용버섯 균사체를 발효시킨 한방발효 소재를 개발하여, 피부 효능의 과학적 검증을 통하여 화장품 산업에 적용하고자 함.



<원다리 제조>  
사진출처: MBC



<오메기술 제조>  
사진출처: 한국관광공사

그림 3. 원다리공법과 오메기술

제주 특용작물에 대한 연구의 필요성은 제주의 잉여자원이 한약농산물에 대한 새로운 부가가치를 창출하여 농가소득을 증진을 통한 지역경제 활성화

○제주도는 해발 1950m의 한라산을 중심으로 한 지형조건과 특수한 기후조건에 의하여 난대 식물에서부터 온대식물, 고산지대의 한 대식물이 다양한게 분포되어 식물의 보고를 이루며 그 분포도도 뚜렷이 구분되어 있어 생태, 식물학적으로 매우 중요하다. 또한 도사라는 특성상 해양성 기후의 영향과 난대성 기후의 영향으로 아열대성 식물이 분포한다.

따라서 제주지역의 특용작물은 유의적인 효과차이가 있을 것으로 사료 된다.

○제주지역은 국내 타 지역에 비해 농림어업의 비중이 높은 지역으로 국내외적 농수산물 시장 개발(한중, 한미FTA)의 여건에 매우 취약한 산업구조를 갖고 있는 반면, 제주 지역은 타 지역보다 우수한 청정 환경에 기반한 농림순산 자원을 보유하고 있으나 부가가치 창출이나 지역발전 연계적인 면에서 시너지를 창출하지 못하고 있는 실정임

※ 제주 전통 발효주의 종류 및 제조공법 ※

	선다리	오메기술
특징	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 제주 전통 곡물 발효음료</li> <li>▪ 제주에서 쌀밥, 보리밥 또는 약간 쉬기 시작한 밥에 누룩을 넣어 발효시킨 저농도 알콜음료임. 발효기간이 짧고 알콜 도수가 낮아 여름철 음료수용으로 이용하였고 맛은 새콤하고 단맛이 있어 단술이라고 함. 이때 사용된 누룩은 보리누룩이며 통보리를 맷돌에 거칠게 쪼개서 물에 반죽하여 만듦.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 오메기술은 오메기떡을 만들어 빻은 청주를 통칭함. 오메기술을 소주로 내린 게 고소리술이라 하였고, 오메기떡은 술을 빻기 위해 좁쌀을 주로 이용하며 누룩은 보리누룩 사용하여 새콤달콤하며 쓴 맛이 강한 것이 특징임. 색깔은 암갈색을 띠며 술 표면에 기름기가 들고, 한 달 이상 숙성을 하면 술에서 잘 익은 참외 냄새가 남.</li> </ul>
제조공법	<pre> 누룩과 선밥을 섞음 ↓ 누룩과 섞인 밥에 물을 넣음(약30℃내외) ↓ 발효(2-3일) ↓ 여과 ↓ 선다리                     </pre>	<pre> 좁쌀을 빻아 오메기떡 만듦 ↓ 오메기떡을 물에 푼 ↓ 보리누룩을 첨가 ↓ 발효(15일) ↓ 2-3달 방치 ↓ 오메기술(청주)                     </pre>

□ 화장품 산업은 특성상 다품종, 환경친화형, 지식기반산업으로 부존자원이 부족한 국내 여건에서 고부가가치를 창출할 수 있는 산업이며, 기능성 바이오 소재의 제품화가 용이하여 산업화의 성공 가능성이 매우 높은 산업임.

□ 국내 화장품 산업이 대부분의 원재료를 수입에 의존하고 있으나, 두뇌 집약형 산업으로 부존자원이 부족한 우리나라 실정에 가장 국제적 경쟁력이 우수한 산업임.

□ 화장품 산업은 기초과학과 응용기술이 종합적으로 적용되는 BT, NT 산업이며, 화장품 수

출시장은 국가 인지도와 더불어 상승효과가 기대되는 산업이므로 앞으로의 수출주력산업으로 성장할 것으로 예상된다.

- 본 연구에서는 제주 민간에서 전래되는 우수한 전통발효공법을 응용하여, 제주에서 자생하는 식용 및 약용 작물을 대상으로 인체의 피부세포(각질세포, 섬유아세포) 활성을 증가시키고 세포의 수면연장에 관여하는 장수유전자(sirtuin)를 활성화하여 피부 최외각층의 피부장벽을 강화하여, 활성산소종에 대응할 수 있는 항산화 활성, 피부 면역 기능을 회복하여 아토피성 피부개선, 피부 염증 반응에 대응할 수 있는 염증 억제 활성, 피부 건조 현상에 대응할 수 있는 보습 기능 및 광노화에 따른 피부 주름 생성 억제능 등 화장품에서 요구되는 다양한 피부 효능을 가지는 피부 친화형 화장품 소재를 개발하고, 그 기능성을 기존에 1차 가공에 의한 단순추출물과 비교 검증하여, 효능 및 원료에 대한 품질 규격이 동일한 피부 친화형 고기능성 화장품 소재를 개발하여 대처하고자 함.

**표 1. 오메기누룩 발효공정 후 기존 제품/소재 보다 우월성**

구분	발효공정 후 우수성	비 고
안전성 증가	발효 미생물의 작용에 의해 약재가 발효되어 독성물질의 분해효과 및 안전한 수취법	
효능효과 증가	약효성분의 체내 흡수율과 생체 이용률의 극대화로 기존에 추출물에 비해 우수한 효능효과 나타냄	
유효성분의 변화 및 농도 증가	인체에 유익한 미생물이 한약을 이용해 생성시킨 대사산물로 인해 기능성 효능성분의 농도 증가	

○오메기누룩을 추출하여 항염(NO, COX-2)과 항산화효과(DPPH)를 비교한 결과 우수한 효능을 확인함.

○원다리 오메기술공법으로 1차 발효 후 추출물한 추출물의 경우 발효하지 않은 추출물에 비해 항산화, 항염, 항노화등에서 생물학적으로 유의한 증가를 확인 하였음,

○또한 발효전후 추출물에 대한 미생물에 대한 저항성을 알아본 결과 발효물의 챌린지 시험결과에서도 미생물에 대한 저항성이 좋은 것을 확인하였음.

○또한 피부 안전성 시험결과 오메기원다리 발효 추출물의 피부 안전성 시험결과 보다 우수함을 확인함

**표 2. 제주 자생 특용작물의 한방발효 제품화 시 유리한 부분**

**2. 개발 대상 기술·제품의 경제·산업적 측면에서의 중요성**

- 현재 전국의 각 지자체에서는 지역에 맞는 특화작물을 선정하여 지자체의 소득원으로 활용하고 있음.

구분	제품화 시 기대효과	비 고
시장	청정 제주 자생식물을 이용한 피부장벽 보호의 기능성 신소재의 개발과 화장품 적용은 장기적으로 매출을 신장시키고 한방 브랜드 파워를 강화시켜 수입브랜드의 시장 잠식을 극복.	
효능	화학적 합성성분이 함유되어 있는 화장품 및 도시화에 따른 각종 오염물질 등 외부 스트레스가 심화되고 있어 천연식물에서 추출된 편안하고 안전한 고기능성 생리활성 물질의 필요성에 부합.	
제품개발	본 과제 수행결과 개발될 한방발효 소재는 생체막, 액정, 나노 시스템 등의 신제형 기술에 적용되어 피부 보호막 형성 및 보습 기능뿐만 아니라 각종 수용성, 유용성 약효성분들의 보존 안정성 향상 및 그 효과적 전달 매체로서 폭넓게 응용 될 것으로 전망됨.	
부가효과	최종적으로 BT 기술에 근간을 둔 독창적인 한방발효 소재의 개발과 NT 기술을 이용한 화장품 제형 내에서의 안정화 및 피부내로의 흡수 조절이라는 두 가지 차원의 기술개발로 제제화의 체계적 연구를 위한 다양한 기술 축적과 연구 인프라가 구축되어 기능성 화장품 개발 기술의 선도적 역할을 수행할 것으로 전망됨.	

- 그러나 이러한 특화작물은 무분별한 식재로 인한 과잉생산, 2차 가공기술의 미비로 인한 제한적 상품화, 마케팅의 부재로 인하여 잉여 특화 작물에 대한 심각한 지역 사회의 문제로 대두되고 있음.
- 국민의 주식인 쌀조차도 수요 공급을 제대로 예측하지 못하여 생산 농가의 이농 현상과 농지 황무지로 인하여 미래 한국의 주식에 대한 심각한 문제점을 드러내고 있는 실정임.
- 이에 따라, 범정부적 차원에서 쌀 소비 촉진을 위한 2차 가공 분야에 산업화를 독려하고 있으나, 아직까지는 실효성이 미비한 실정임.
- 이에 비해 각 지자체의 특화작물의 수급 불균형은 각 지자체가 해결할 수밖에 없어 쌀보다도 더 심각한 지역 사회의 문제점을 내포하고 있음.
- 과잉 생산된 지역특화 소재에 대한 소비를 촉진하기 위해서는 바이오산업 분야에서 다양한 연구와 산업화가 필요함.
- 바이오벤처기업인 (주)코씨드바이오팜은 오랜 경험을 바탕으로 지역특화 소재에 대한 산업화에 선도적 역할을 수행해 오고 있음.
- 특히 지역 내 특화소재에 대한 화장품, 식품 소재로 개발하여 효능을 검증함으로써 연구와 산업화의 시발점 역할을 수행하고 있음.

표 3. 주관기관((주)코씨드바이오팜)이 산업화한 주요 지역특화 소재

지역특화소재	지역	지원기관	효능	수요처
GAP 황기	제천	제천시 충북테크노파크	보습, 탄력, 미백	한불화장품 코스트리 에버코스
대추	보은	지식경제부	미백	본마트 엔터프라이즈(중국)
대추잎	보은	지식경제부	보습, 탄력	이우화학

호두	영동	서원대 BioRIC	모발생장	두리화장품(땀기머리)
월하시(감)	영도	지식경제부	보습, 모공관리	제니코스(땀기머리)
복분자	고창	자체	보습, 혈행개선	이스트힐(일본)
흑마늘	서산	지식경제부	주름개선	코스메카코리아 신생활(중국)
오미자	문경	중소기업기술혁신개발사업	주름개선	한국콜마 포쉬에
오미자	문경	보건산업진흥원 (글로벌코스메틱사업단)	주름개선	한국콜마

### 3. 개발 대상 기술·제품의 지역경제 측면에서의 중요성

- 제주도에서 전래되는 전통발효공법의 쉰다리와 오메기술 제조기법은 제주 사람들의 식생활 문화를 보여주는 산물이며, 지금도 제주 향토음식점에서 볼 수 있는 전통 발효음료로 일찍이 오메기술의 제조공정은 무형문화재로 지정되었음.
- 현재는 관광사업의 일환으로 전통주 제조의 체험문화 형식에 그치고 있는 상황에서 농가 소득에 직접적인 영향을 주지는 못하고 있음.
- 본 연구에서 전통 포제 방식의 쉰다리공법과 오메기술 제조공정을 현대식 첨단발효공법과 접목하여 제주지역에 자생하는 특용작물을 대상으로 피부개선 효능이 있는 한방발효 소재를 개발함으로써, 미래의 가치를 추구하는 환경 친화적, 자연친화적, 새로운 문화형태인 웰빙 트렌드를 선도하는 친인간주의 사업을 추구하고자 함.
- 현재까지 제주산 특용작물 및 한약재의 용도는 식용 또는 단순가공 형태의 1차 제품으로 판매되고 있어 최신 바이오기술 접목에 의한 고부가 가치 창출 제품 개발이 시급함.
- 제주의 천연 식물 자원을 활용한 향장품 등의 소재 및 제품개발을 통한 고부가가치화는 제주의 신산업으로 발전가능성이 매우 높음.
- 제주도는 천혜의 자연환경과 이로 인한 청정 이미지에 대한 소비자의 인지도가 높아, 최근 소비자의 안전성에 대한 의식 고취와 함께 화장품 분야에서 가장 중요한 트렌드로 자리 잡고 있는 자연 친화, 'Natural'을 지향하는 소비자의 경향에 부합할 수 있는 여건을 가지고 있다고 할 수 있음.
- 바이오 기술과 접목하여 개발된 천연 유용작물 유래 화장품 신소재인 경우, 매우 부가가치가 높게 인식되고 있으므로 산업적인 측면에서 매우 매력적인 산업으로 인식되고 있음.
- 화장품 산업의 경우에도 최근, 전통적인 형태의 소재 개발에서 벗어나, 바이오 기술을 접목한 소재 개발이 증가하고 있는 추세이며, 국내업계에서도 각 지역특화 작물을 이용한 신물질 또는 유용성분이 함유된 제품을 출시하고 있음.
- 화장품 산업 및 관련 제품은 제주도가 추진하고 있는 건강뷰티 생물산업과의 연계가 가능하므로, 연구 인프라 구축 및 산업화, 마케팅 등의 상호 지원 및 공유가 용이함.

- 따라서 제주 전통발효공법(쑤다리, 오메기술)과 제주산 특용작물로부터 고기능성 화장품용 소재를 개발하여, 이를 이용한 기능성 화장품을 개발할 경우, 제주도 특용작물과 같은 한방 특산물의 화장품 응용에 의한 특용작물의 수요처 확보와 동시에 화장품산업의 고급화된 이미지를 이용하여, 제주도 자생하는 특용작물과 관련 제품의 이미지를 개선하여 이를 통한 제주도 농산업의 소득증대 활성화 및 지역 산업 발전에 기여할 수 있을 것임.
- 제주도는 연간 500만명 이상의 관광객이 방문하는 국내 최대의 관광지이며, 이러한 관광 인프라를 개발된 화장품 판매에 연계할 수 있음.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### [1] 주관기업 : (주)코씨드바이오팜

본 연구개발사업의 목표를 달성하기 위하여 제주도 생약재와 약용버섯의 균사체를 제주 전통 기법을 접목한 피부장벽개선 효과가 있는 항노화 한방발효 신소재를 개발하는 것임.

본 연구개발사업의 목표를 달성하기 위하여 생리활성이 우수하고 화학적 안정성이 개선된 항노화 소재를 이용하여 피부 안전성 및 세포수준에서의 항산화, 항염, MMP-1 저해 등의 의학 적 효능을 규명하여 소재의 다양한 기능을 검증함으로써 바이오 소재의 기능성 자원화에 대한 선도적 역할을 수행하는 것임.

### 1. 제주 전통발효공법을 응용한 항노화 소재 개발 및 생산

#### 가. 제주 특용작물 스크리닝 및 발효균주 선정

##### (1) 피부장벽개선의 생물전환 소재 확보

화장품 산업에 생물전환 소재는 과학적으로 안전성이 증명된 미생물(효모, 유산균, 바실러스, 약용버섯 등)을 이용해 엄선된 약재와 발효시켜 원래 약재가 가지는 성질과 발효할 때 사용되는 미생물의 성질에 의해서 증강된 약효를 발현하는 것으로서, 미생물은 약재를 분해, 섭취하여 고분자를 저분자로 분해하여 흡수율을 증가시키고 발효에 의한 유용물질들이 피부 깊숙이 진피층까지 도달하게 함으로서 피부재생, 청정효과, 항산화효과, 미백, 영양공급, 보습, 모공수축 등 다양한 효능을 나타내며, 발효기술에 의해 약재의 독성을 제거하고 부작용이 적은 순환 물질로 전환시켜 생체 이용률을 증강시킨다.

##### ① 제주 특용작물 선정 및 실험결과

선험적으로 전해지는 전통 비방 중, 피부 모세혈관의 정상적인 행혈을 촉진하고 각질세포 사이의 지질층을 균일하게 분포 시켜주며, 각질층의 세라마이드 함량을 증가시켜 수분 함유 기능이 향상되고 피부장벽 기능을 회복시켜주며, 피부 손상에 의한 염증유발인자 사이토카인의 발현을 억제함으로써, 피부 혈행촉진, 장벽회복, 피부재생에 효능을 가지는 제주도 내 자생하는 특용작물을 선별하여 아래 표에 정리하였다.

표 4. 제주 후보 특용작물 약재 및 *in-vitro* 항산화·염증완화 실험결과

약재명	추출부분	효능효과	Total flavonoid 함량 (µg/ml)	Total phenol compound 함량 (µg/ml)	In vitro 평가 실험결과(농도 0.15%)		비고 (원산지별)
					Free radical 소거효과(%)	Lipoxygenase 저해효과(%)	
삼백초	전초	혈행촉진	129.48	290.75	55.67	23.02	제주
			125.42	284.45	55.64	22.14	제천
대황	뿌리	피부진정	174.78	245.2	45.52	27.51	제주
			128.68	212.32	34.75	26.41	제천
감초	뿌리	세포재생, 미백, 해독	213.01	427.8	58.25	48.16	제주
			222.45	476.15	66.45	53.21	제천
호장근	뿌리	혈행촉진	10.24	313.65	47.54	28.41	제주
			15.42	285.62	44.21	35.12	제천
뽕나무	잎 전초	항염, 피부진정, 해독작용	77.20	307.7	42.27	39.43	제주
			55.12	210.21	55.21	45.21	제천
진피	껍질	항염, 이뇨작용	7.20	182.55	15.70	42.63	제주
			-	-	-	-	제천

제주산 한약재와 다른 지역의 한약재의 경우 유의한 효과차이를 확인 할 수 는 없었음. 하지만 중금속 측정 결과 극히 소량만의 중금속을 함유하고 있어서 매우 안전한 한약재임을 알 수 있었음. 또한 본과제의 경우 제주지역의 잉여농산물인 제주 한약재의 새로운 부가가치를 높여 농가소득을 증진하는 사업임.

② 천연물 생약재 중금속 검사

약사법 제4조 제 1항의 규정에 의거 생약 (한약재를 포함한다. 이하 같다) 및 생약(한약)제제에 대하여 생약등의 중금속 허용기준 및 시험방법을 다음과 같이 고시하고 있음.

1) 적용범위 및 허용기준 : 생약 및 생약(한약)제제 다만 엑스제·유동엑스제 등 식품의약품 안전청장이 중금속 허용 기준을 별도로 정한 품목의 경우 에는 그 기준에 따른다.

가. 식물성 생약은 납(Pb) 5 mg/kg 이하, 비소(As) 3 mg/kg 이하, 수은(Hg) 0.2 mg/kg 이하, 카드뮴(Cd) 0.3 mg/kg 이하이다

나. 녹용은 비소 3 mg/kg 이하이다.

다. 생약만을 주성분으로 하는 생약(한약)제제 (광물성 생약을 함유한 제제는 제외 한다)는 총중금속 30 mg/kg 이하이다.

## 2) 납, 카드뮴 시험방법

대한약전의 일반시험법 중 원자 흡광광도법에 따라 측정 한다. 시료를 작은 입자로 분쇄하여 0.1 ~ 0.5 g을 정밀하게 달아 고주파 분해기 전용 용기에 넣고 질산 12 mL를 가 한다 산을 넣은 뒤 용기를 후드 안에 정치 시켜 발생 가스를 제거한다. 가스 제거 후 가압 고주파 분해기를 사용하여 분해한다. 분해가 끝난 분해액을 여과지로 여과하여 물로 적절히 표준액의 농도 범위로 희석하여 검액을 만든다. 같은 조작으로 공시험액을 만들어 보정 한다. 원자흡광광도계(AAS)를 이용하여 각 중금속의 원자흡광분석용 표준원액(1000 mg/L)을 0.5 mol/L 질산시액을 사용하여 적정농도로 희석하여 검량선을 작성하고 공시험액으로 보정하여 검액의 흡광도 또는 강도를 측정한다.

측정 기기 : ICP(Optical Emission Spectrometer Varian 720-ES, Varuian, USA)

## 3) 천연물 생약재 중금속 시험결과

본 연구에서 사용되어진 우수한 제주 자생 천연물을 총 6종을 선정하였다. 식약청 「생약 등의 잔류오염물질 기준 및 시험방법」에 따르면 식물성 생약인 경우 납의 허용기준은 5 mg/kg, 카드뮴은 0.3 mg/kg으로 정하고 있다.

이에 본 연구에서 생약재의 품질이 가장 중요한 항목이 되므로 선정 생약재에 포함되어진 중금속 성분 중 납과 카드뮴을 분석한 결과 (표 5), 감초와 진피에서 카드뮴 및 납 성분이 허용 기준보다 낮은 함량을 나타내어 큰 문제는 없을 것으로 사료되며, 나머지 생약재에서는 카드뮴과 납 성분이 검출이 되지 않았다.

표 5. 선정된 천연물 생약재의 중금속 실험 결과 (mg/kg, ppm)

생약재명	카드뮴(Cd)	납(Pb)
삼백초	불검출	불검출
대황	불검출	불검출
감초	0.01	0.24
호장근	불검출	불검출
뽕나무	불검출	불검출
진피	0.03	0.22

이처럼 제주산 약제는 청정환경에서 자란 자연적인 여건으로 인해 생약재에 포함된 중금속의 함량이 극히 일부만 검출되어 매우 안전한 한약제임을 알 수 있었다. 하지만 육지한약재의 경우 이러한 중금속으로부터 매우 불안정한게 현실임.

## (2) 발효 균주 선정

발효하고자 하는 소재가 선정이 되면 소재를 보다 효과적으로 발효시키기 위하여 선택된 소재를 잘 분해할 수 있는 발효 미생물을 선정하며, 종에 따라 발효를 통해 얻을 수 있는 물질이 다양한 만큼 중요한 단계라 할 수 있다.

미생물을 이용한 발효 생산 공정은 화학공정에 비해 두드러진 단점은 없으나 오염에 대한 문



제로 인해 전 공정이 무효화 될 수가 있으며, 유산균, 바실러스, 효모와 같이 반응조건과 반응 시간이 민감한 미생물은 반응 최적화의 어려움과 종균의 연속 사용으로 인한 자연적인 균주의 변이 현상을 일으킬 수 있는 단점이 있다.

하지만, 약용 또는 식용버섯의 균사체를 이용한 발효공정은 다른 종균이 가지는 문제점에 비해 외부 저항성이 강하며, 균사체는 영양기관으로서 주요 영양성분과 약효성분은 모두 균사체에 축적되어 있으며, 각종 약용버섯의 균사체를 배양하면서 기질로 약재를 함께 발효시켜 균사체의 약효성분과 약재의 약효성분을 동시에 얻는 한편, 발효과정에서 이들 두 가지 약효성분이 서로 결합된 새로운 기능성 소재를 개발할 수 있다.

① 제주 원다리/오메기 누룩 확보

제주 자생식물의 산업적 활용방안으로 예로부터 전래되는 전통주 제조방식의 원다리공법과 오메기술 방식의 전통발효공법에 대한 전문적인 지식을 습득하고자, 본 기술의 기능 보유자 이신 김을순 여사를 직접 방문하여 기술에 조언을 구함.



<연구책임자 제주 오메기술 현장 방문>



<제주성읍 민속마을 오메기술 인증간판>



김을순 여사(기능보유자) 방문



오메기술 제조

그림 4. 제주 원다리/오메기 기술 보유자(김을순 여사)로부터 기술 자문

② 천연물 생약재의 쉰다리/오메기 기술을 응용한 누룩 배양 시험

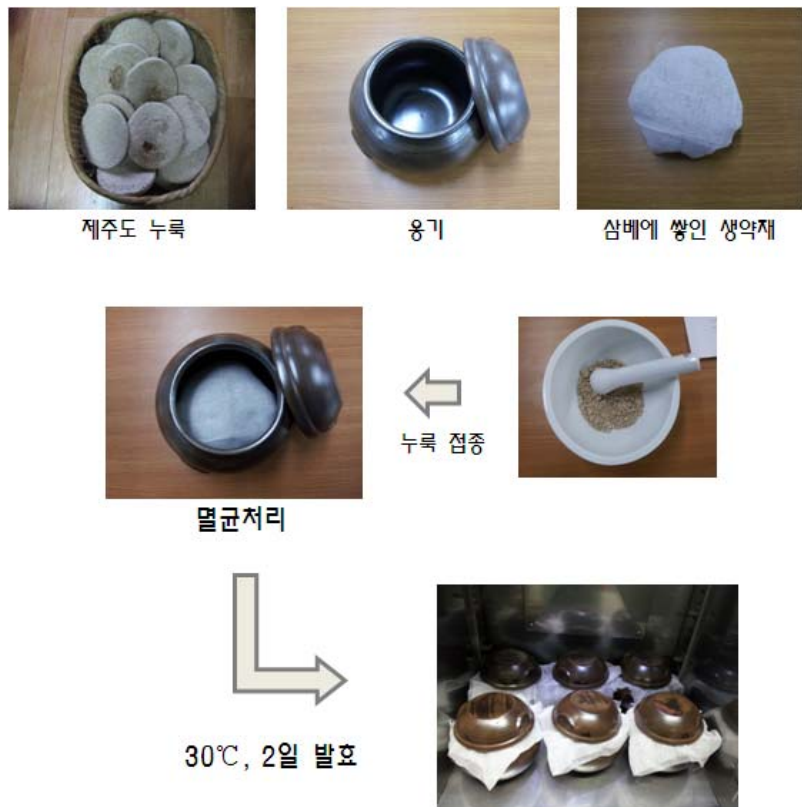


그림 5. 제주 쉰다리/오메기 기술을 응용한 제주 누룩 발효공정(코씨드바이오팜) 및 발효 후의 변화

④ 약용버섯 균사체 선정


본 연구에 사용되는 2종의 약용버섯 균사체의 발효배양에 따른 균사체 및 세포외 다당체의 함량을 그림 6에서와 같이 비교하였다. 균사체 및 다당체 생성을 비교한 결과, 붉은덕다리 버섯 균사체에 비해 잎새버섯 균사체의 성장 속도가 매우 빠르며, 다당체 함량 또한 큰 차이를 나타내는 것으로 확인되었다.

하지만, 항노화 소재 개발을 위해 생약재 발효에 적합한 발효 균주로 천연물로부터 피부장벽 개선에 효능이 있는 활성성분의 생물전환(bio-conversion) 중요한 역할을 하는 당-가수분해효

약재명	발효균주	효능효과	Total flavonoid 함량 (ug/ml)	Total phenol compound 함량 (ug/ml)	In vitro 평가 실험결과(농도 0.15%)		비고
					Free radical 소거효과(%)	Lipoxygenase 저해효과(%)	
삼백초	누룩	혈행촉진	131.25	312.7	63.61	24.27	
대황	누룩	피부진정	178.41	269.3	51.09	26.65	
감초	누룩	세포재생, 미백, 해독	12.86	457.1	59.44	46.08	
호장근	누룩	혈행촉진	26.94	374.4	47.36	17.65	
뽕나무	누룩	항염, 피부진정, 해독작용	77.35	308.02	42.9	42.47	
진피	누룩	항염, 이뇨작용	8.49	197.5	17.82	41.49	

소의 활성이 우수한 붉은덕다리 버섯 균사체로 선정하였다. 이는 일반적으로 천연물에 존재하는 페놀성화합물의 활성성분은 대부분 당이 결합한 배당체(glycoside)의 형태로 존재하므로, 이들의 발효 과정을 통해 활성성분이 보다 우수한 아글리콘(aglycone)을 생산하고자 함이다. (그림 5).

표 6. 발효에 사용되는 버섯 균주

발효균주	특징
<p>붉은덕다리버섯 CS0218 (특허균주, KFCC 11494P)</p>  <p>CS0218BIOPHARM 균사체 사진</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 우리나라에서는 백두산, 월출산, 지리산, 발왕산 등에서 자생하며 세계적으로는 일본 아시아의 열대 지방에 분포함.</li> <li>■ 갓 자실체는 대형이고, 부채형-반원형이며, 갓 끝은 안쪽으로 굽어있으나 성장하면 퍼지고, 다수가 비늘처럼 중복하여 발생함.</li> <li>■ 침엽수의 나무 줄기 가지 또는 썩은 나무위에서 성장.</li> <li>■ 버섯도감에는 맛이 좋은 식용버섯으로 알려져 있으나, 생식으로 이용할 경우 위장장애도 발생함.</li> <li>■ 약성은 건강증진, 항질병이고, 허약체질, 유암, 전립선암에 이용함.</li> <li>■ 최근, 항암제와 인슐린 분비 조절로 알려져 있음.</li> <li>■ 항암효과로는 붉은덕다리버섯의 세포외다당체는 암 전이억제 및 면역력 증강을 나타냄.</li> <li>■ 붉은덕다리버섯 균사체의 세포외다당체는 피부세포 성장인자의 생성을 촉진하고 상처치유 효과 및 피부 보습 효과가 있는 것으로 알려짐.</li> </ul>
발효균주	특징



앞새버섯(*Grifola frondosa*)

- 맛과 향이 뛰어난 구멍장이과의 식용버섯의 일종
- 다당체 성분인 베타글루칸(D-fraction)은 면역시스템 활성화 및 항종양 활성을 가짐
- 균사체 배양액은 고보습력의 다당체를 생산함
- 특허균주: *G. frondosa* HB0071 (KCTC 10337BP, 한불화장품(주))
- 한불화장품(주) / (주)코씨드바이오팜  
- 앞새버섯 HB0071 균주 위탁 분양

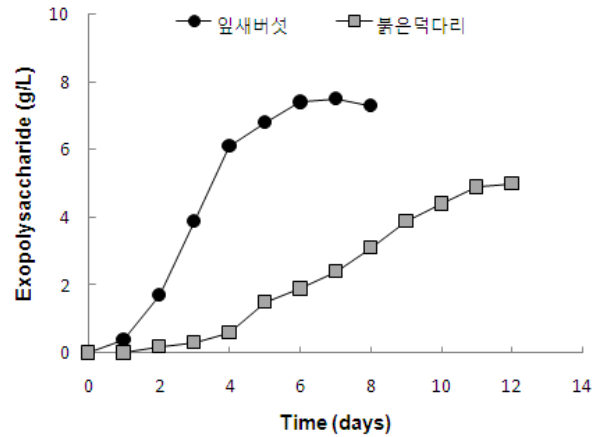
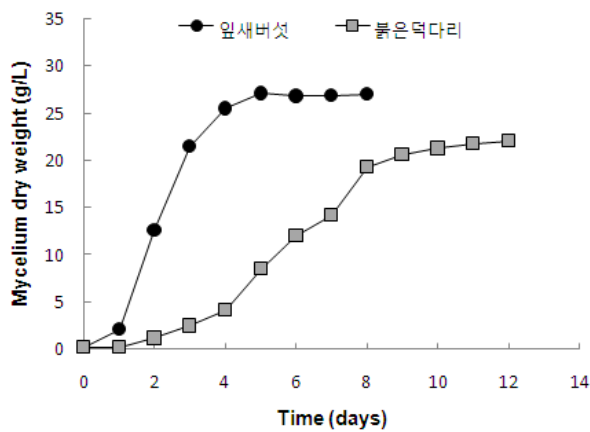


그림 6. 배양시간별 발효균주의 균사체 및 다당체 생성 그래프

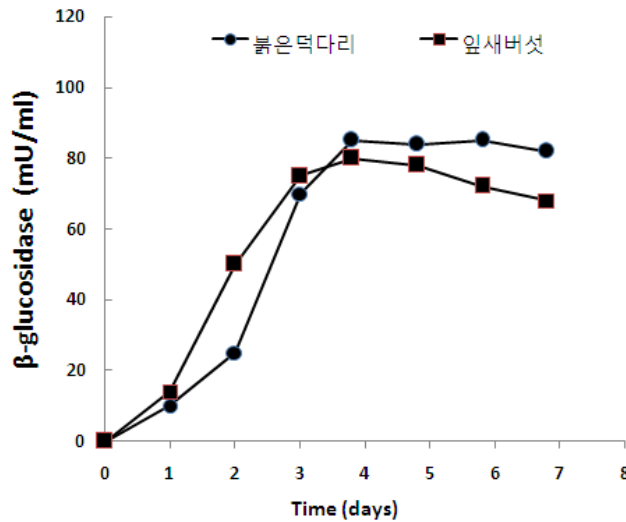


그림 7. 배양시간별 발효균주의  $\beta$ -glucosidase 활성 그래프

(3) 제주 전통발효기법(선다리/오메기)을 응용한 바이오 소재 개발

① 천연물 생약재의 누룩/붉은덕다리 버섯 발효 전, 후 배양물의 특성 비교 연구

민감성 피부를 가진 사람은 정상인 보다 외부환경과 면역학적으로 민감한 반응을 나타내므로 저자극성 생리 활성물질을 요구함. 따라서, 피부 부작용을 최소화하기 위한 방법으로, 유용한 미생물을 이용한 발효(fermentation) 공법을 접목시켜 피부의 부작용을 줄이고 유해물질을 차단하여 발효과정에 의해 바이오컨버전 된 후보물질을 생산하여 피부장벽을 개선하고자 한다. 첨단 발효과학은 미생물을 이용해 천연물을 잘게 분해한 후 피부 깊숙한 곳까지 그 효능을 빠르게 침투 시킬 수 있는 기술로서, 엄선된 제주 생약재를 과학적으로 입증된 인체에 유익한 수준으로 발효시켜 원래 약재가 가지는 성질과 발효할 때 이용되는 미생물의 성질에 의해서 증강된 약효를 발현하는 것임. 주로 저분자 물질을 생성하여 인체 흡수율을 높이고 약재의 독성을 제거, 부작용이 적고 순한 물질로 전환하여 생체 이용률을 극대화 시킨다.

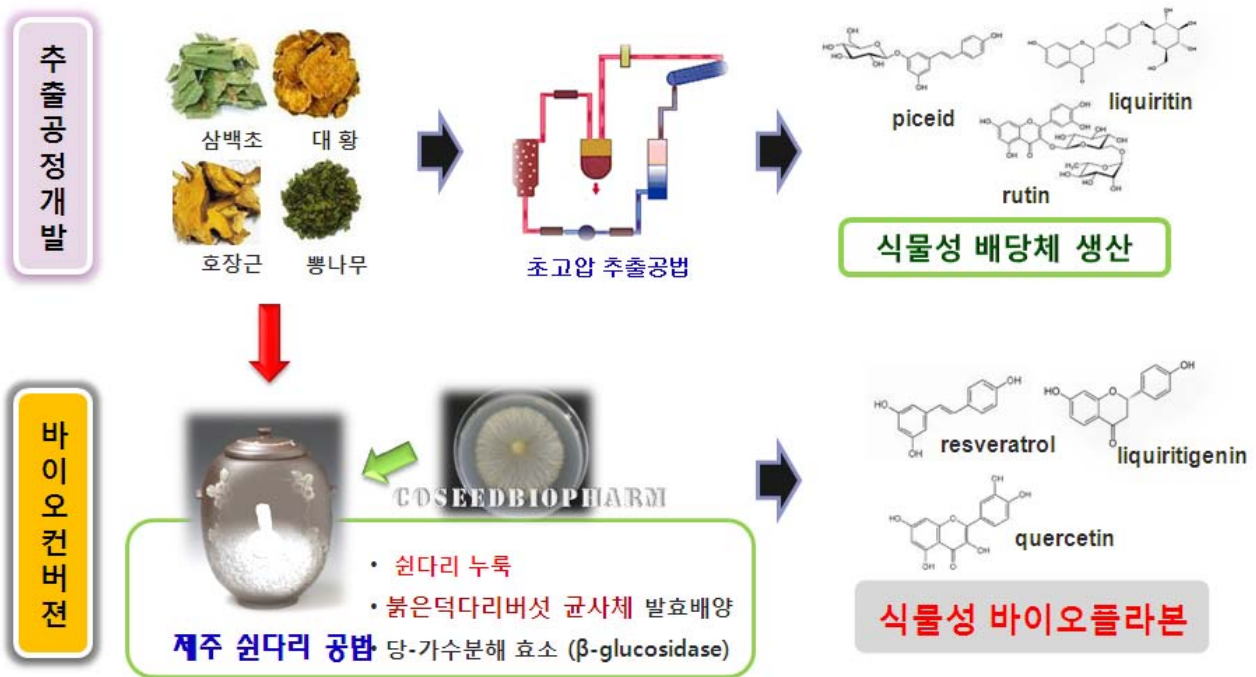


그림 8. 생물전환 소재의 원료화 모식도

표 7. 선정된 6종 생약재의 누룩/붉은덕다리버섯 균사체 발효 후 *in vitro* 실험 결과

약재명	발효균주	Total flavonoid 함량 (μg/ml)	Total phenol compound 함량 (μg/ml)	In vitro 평가 실험결과(농도 0.2%)		비 고
				Free radical 소거효과(%)	Lipoxygenase 저해효과(%)	
삼백초	붉은덕다리버섯 당사특허균주	137.25 (6.4% 증가)	352.45 (18.4% 증가)	80.32 (21.8% 증가)	27.34 (11.1% 증가)	발효 전 후 비교
대황	붉은덕다리버섯 당사특허균주	192.62 (10.4% 증가)	340.70 (18.9% 증가)	62.54 (18.3% 증가)	44.35 (39.9% 증가)	“
감초	붉은덕다리버섯 당사특허균주	12.44 (31.2% 증가)	480.55 (11.2% 증가)	62.05 (4.52% 증가)	54.36 (10.1% 증가)	“
호장근	붉은덕다리버섯 당사특허균주	40.72 (55.1% 증가)	460.10 (36.3% 증가)	68.85 (31.2% 증가)	32.15 (45.1% 증가)	“
뽕나무	붉은덕다리버섯 당사특허균주	79.68 (6.8% 증가)	310.35 (6.5% 증가)	48.54 (11.6% 증가)	45.76 (7.2% 증가)	“
진피	붉은덕다리버섯 당사특허균주	12.07 (0.8% 감소)	196.51 (3.9% 증가)	18.84 (6.34% 증가)	50.35 (17.6% 증가)	“

<표 7>에 나타난 결과처럼, 선정된 6종의 천연 생약재 추출물과 누룩/붉은덕다리버섯 균사체 발효배양 이후, 항산화 및 항염활성이 대부분 다소 증가한 것으로 확인되었으며, 특히 호장근과 대황추출물의 경우 발효 후 항산화 및 항염 활성이 월등히 증가한 것으로 나타났다. 따라서, 향후 누룩/붉은덕다리버섯 발효균주를 이용한 호장근과 대황추출물의 활성성분의 변화와 다양한 효능효과를 검증하고자 한다.

② 천연물 추출물의 고효율 추출공정 개발

1) 목 적 : 항노화 성분의 생물전환 소재를 생산하기 위하여, 천연물 생약재료에 함유된 페놀성 화합물의 배당체(glycosides) 성분의 함량을 증가시키기 위한 최적의 추출공정 확립.

표 8. 추출공법에 따른 생약재 분획의 장단점(예시, 호장근)

구분	초고압추출	물추출	폴리올혼합추출
안전성 증가	매우우수	매우우수	우수
안정성 증가	매우우수	우수	우수
유효성분의 추출효율 증가	매우우수	매우우수	매우우수
화장품 상용성	우수	우수	매우우수

구분	초고압에탄 올추출	초고압폴리 올혼합추출	초고압물 추출	일반용매 추출
안전성 증가	매우우수	우수	매우우수	우수
안정성 증가	매우우수	우수	우수	우수
유효성분의 추출효율 증가	매우우수	매우우수	매우우수	우수
추출수율	<b>3.25%</b>	3.15%	0.78%	1.23%
성상	<b>Dark brown</b>	Dark brown	Dark brown	Dark brown
화장품 상용성	우수	매우우수	우수	우수
용매양	<b>3L</b>	3L	5L	10L
기타		발효안됨	미생물오염	추출용매과 량사용

그림 9. 호장근의 추출공법에 따른 생약재 분획의 장단점

표 9. 추출 용질에 따른 초고압 추출공법에 수율 특징(예시, 호장근)

추출효율	초고압에탄올분획	초고압폴리올분획	물추출분획
Dry content	1.25%	3.25%	0.84%
Brix	35.28	64.3	23.4

#### (4) 제주 생약재 발효배양물로부터 항노화 선도물질 분석 조건 확립

자연계에 존재하는 대부분의 식물들은 플라보노이드(flavonoid)를 포함한 페놀성(phenolic) 화합물은 단일성분의 아글리콘(aglycones) 구조와 같은 불안정한 성분이 아닌 당이 결합된 배당체(glycosides) 형태로 존재함. 하지만, 약리적 효능면에서는 배당체 보다 생체흡수력이 우수한 아글리콘 형태가 효능, 효과 면에서 우수하다.

따라서, 본 연구에 사용된 제주 생약재들의 활성성분의 분포와 종류를 알아보기 위해 HPLC 분석기기를 활용하여 이미 알려진 페놀성 화합물의 배당체와 아글리콘 표준물질들의 연속적으로 분리, 분석 조건을 확립하였다.

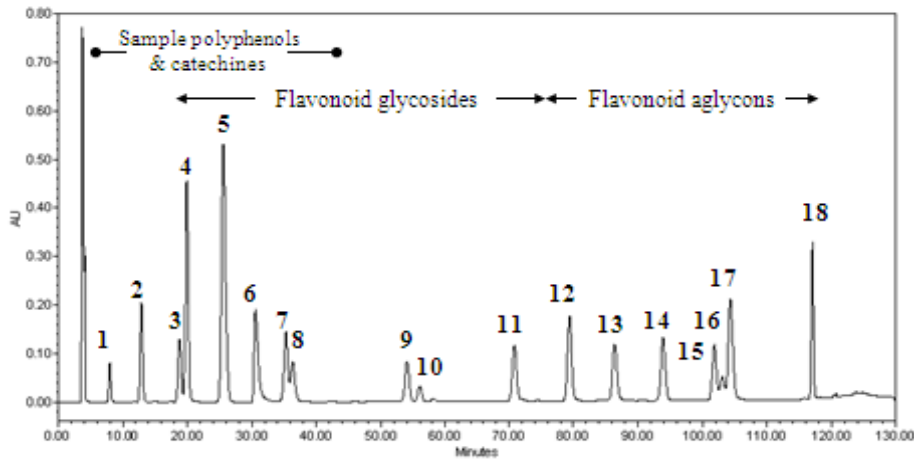


그림 10. 표준 플라보노이드 성분의 HPLC 분석 그래프

Peaks: 1, gallic acid; 2, caffeic acid; 3, (+) catechin; 4, ferulic acid; 5, puerarin; 6, trans-cinnamic acid; 7, diadzin; 8, epigallocatechin gallate; 9, genistin; 10, naringin; 11, rutin; 12, daidzein; 13, myricetin; 14, naringenin; 15, formononetin; 16, genistein; 17, quercetin; 18, apigenin.

화살표는 플라보노이드의 배당체와 아글리콘 분석 영역을 나타냄.

### ① HPLC 분석 결과

- 각 분획물에 함유된 페놀성화합물(플라보노이드 등)과 함량을 확인하기 위해서 HPLC 분석실험을 진행하였음.
- 분석기기는 Waters사의 Sunfire C-18 컬럼을 이용할 수 있으며, 이동상 용매로는 메탄올과 정제수를 gradient 조건으로 분리하였음
- 또한, peak의 끌림(tailing)현상은 buffer를 첨가하여 개선하였다. 플라보노이드 함량은 280 nm로 고정하여 PDA (photodiode array) detector로 분석하였음.

표 10. 발효배양물의 HPLC 분석조건

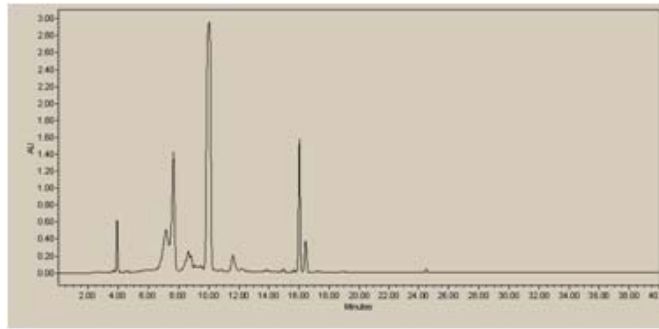
Column	Sunfire C-18 (Waters)
Mobile phase	MeOH : DW: Buffer(Acetic buffer pH 4.8) (20% ->80%)
Flow rate	0.8 mL/min
Temperature	RT
Detection	UV 210 - 550 nm

다음은 <표 10>의 분석조건을 바탕으로 생약재 추출물과 발효배양물의 HPLC 분석 결과를



통하여 발효 전, 후의 주요 활성성분의 변화를 확인하였다.(그림 11 과 12)

(가)



(나)

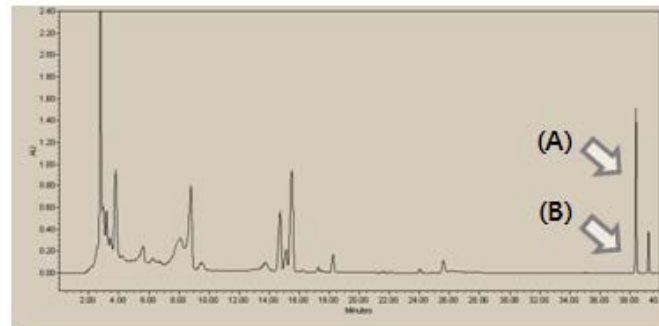
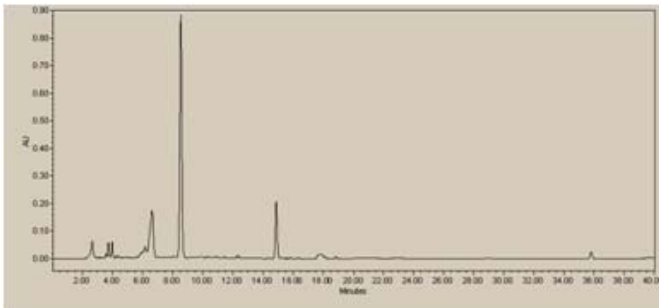


그림 11. 대황 발효배양 전, 후의 HPLC 분석 그래프 (분석파장: 260nm)  
[(가) 대황추출물, (나) 대황 발효배양물- 5일배양]

(가)



(나)

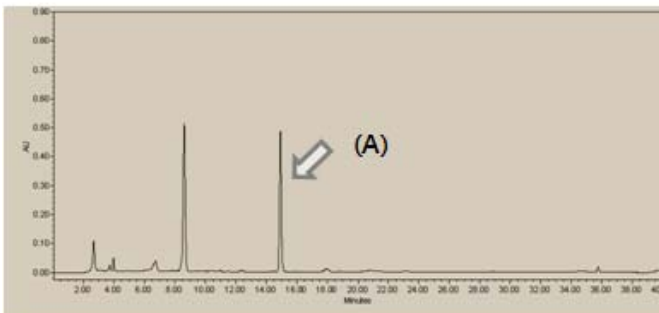


그림 12. 호장근 발효배양 전, 후의 HPLC 분석 그래프 (분석파장: 320nm)  
[(가) 호장근추출물, (나) 호장근 발효배양물- 6일배양]

1) 제주 생약재 발효배양물로부터 항노화 선도물질 분석 조건 확립

본 연구의 목적인 누룩/붉은덕다리버섯 균사체 발효배양을 이용한 제주도 생약재 추출물의 생물전환(bioconversion) 소재의 개발과 피부장벽개선의 유효(지표)물질을 선정하고자 누룩/붉은덕다리버섯 발효배양 후 플라보노이드 배당체로부터 전환된 생물전환 소재 peak (A)(그림 12)를 확인하였다. 호장근추출물 내 주요 활성성분 중 플라보노이드 배당체 인 resveratrol 배당체를 PDA detector를 이용하여 물질이 가지는 고유의 흡수과장값을 비교하여 확인하였다. 따라서, 붉은덕다리버섯 균사체 발효배양을 이용한 호장근추출물의 생물전환(bioconversion) 소재의 개발과 피부 항노화 효능의 유효(지표)물질을 선정하고자 붉은덕다리버섯 발효배양 후 플라보노이드 배당체로부터 전환된 아글리콘(aglycones) 성분의 resveratrol을 확인하였다. 유효성분의 resveratrol의 보다 정확한 분석과 확인을 위하여 분획을 한 후, 표준물질과의 UV 흡광도 및 분자량을 LC-Mass로 비교 분석하고 구조분석을 위한 NMR 분석을 실시하였다.

(가) 붉은덕다리버섯/호장근추출발효물의 생물전환 성분의 NMR, LC-Mass, 구조 분석 결과

① 호장근추출발효물의 생물전환 성분(peak (A)) 구조분석 결과

13- Carbon (ppm)		1-Proton (ppm)
126.82	1	5.95 (1H, J=2.0Hz)
127.45	2	6.10 (1H, J=2.0Hz)
157.14	3	
104.01	4	6.82 (1H,d, J=8.5Hz)
163.24	5	
99.89	6	6.72 (1H,d, J=8.5Hz)
166.06	7	
104.84	8	6.75 (1H,d, J=8.5Hz)
157.82	3'	
105.18	4'	6.36 (1H,d, J=8.5Hz)
105.98	5'	7.39 (1H,d, J=8.5Hz)
161.72	6'	
105.38	7'	7.36 (1H,d, J=8.5Hz)
104.98	8'	6.37 (1H,d, J=8.5Hz)

UV λ max MeOH nm :286, 304. PositiveESI-MS (C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>Si<sub>3</sub>) m/z : 444 [M-H]<sup>+</sup> of TMS- resveratrol

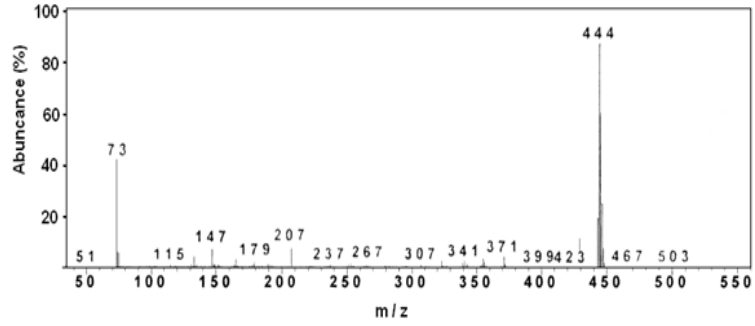


그림 13. 붉은덕다리버섯 발효 분획물 peak (A)의 LS-Mass 그래프

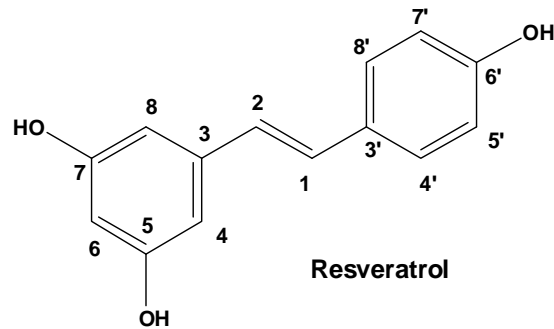
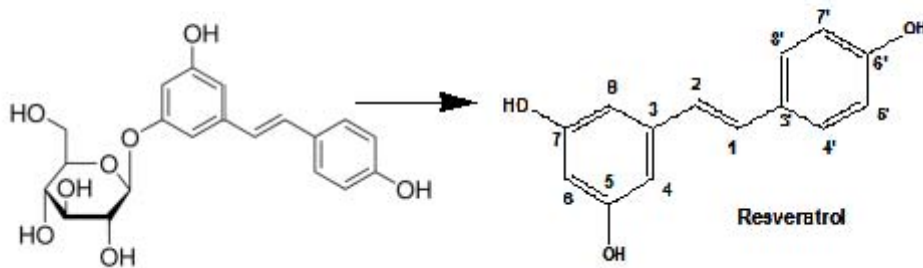
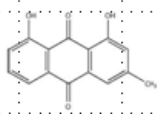
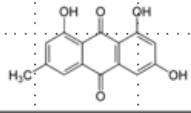
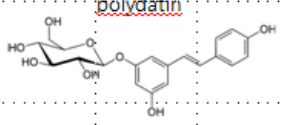
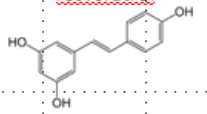
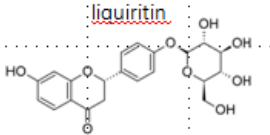
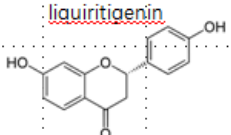


그림 14. Resveratrol 분자 구조

붉은덕다리버섯 발효 배양 후, 생물전환 된 호장근발효 분획물(peak (A))을 구조 분석한 결과, 분자량은 255 (peak (b))로 확인되었고, resveratrol의 분자량과 일치하는 것을 확인했으며, 분자 구조는 NMR 분석을 통하여 구조가 일치 하는 것을 확인하였다.



이는 호장근의 폴리다틴(polydatin, Resveratrol-3-β-mono-D-glucoside, CAS 65914-17-2)성분이 붉은덕다리 버섯 균사체에 의해 글루코스가 대사과정으로 사용된 것으로 추정 된다.

약재명	추출부분	효능효과	발효전 플라보노이드	발효후 플라보노이드
대황	뿌리	피부진정	Chysophanol-glucoside	Chysophanol 
			Emodin-glucoside	emodin 
호장근	뿌리	혈행촉진	polydatin 	resveratrol 
감초	뿌리	세포재생, 미백, 해독	liquiritin 	liquiritigenin 

발효전후의 플라보노이드 성분 변화

(나) 붉은덕다리버섯/호장근추출발효물의 산업용 배양 공정 개발

① 호장근추출물의 붉은덕다리버섯 배양공정 scale-up을 위한 기초실험

Up-scale을 위한 기본 배양 정보를 얻기 위하여 30L 발효기를 이용하여 호장근추출물 배양을 수행하였다. 앞선 실험에서 얻은 5L 발효기 실험 결과를 바탕으로 30L 발효기에서의 운전 조건을 동일하게 설정하였다(표 11).

표 11. Optimized culture conditions (in 30L bioreactor)

Culture conditions	
Inoculum size	5%
Aeration rate	1.5vvm
Agitation speed	150rpm
Initial pH	4.5~5.5
Culture temperature	26℃
Growth medium	TSB medium

그 결과 예상과는 달리 그림 15에 나타낸바와 같이 이전의 5L 배양기를 이용한 배양 결과와 비교하였을 경우 세포 성장 및 균사체 생산성이 30%이상 떨어졌다. 또한 균사체의 초기 적응 시기도 길어졌다는 것을 확인할 수 있다.

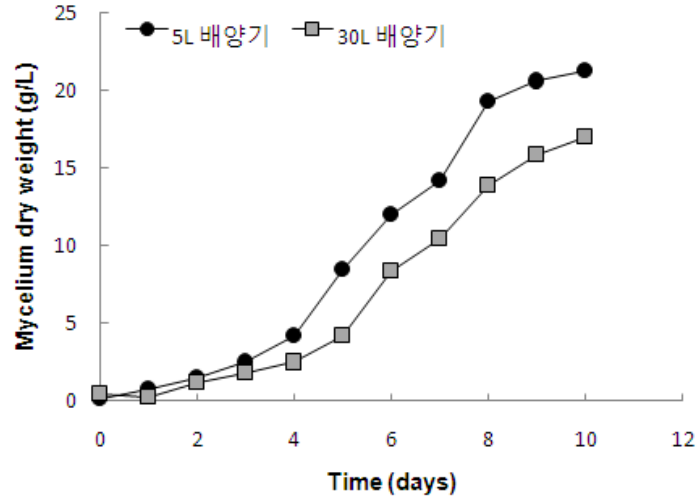


그림 15. 5L와 30L 발효기에서의 붉은덕다리버섯 균사체 생산성 비교 그래프

이전 실험 결과에서 교반속도가 감초배양 초반 균사체의 lag phase를 결정짓는 중요한 원인이었다는 것을 고려해 볼 때 30L 발효기에서의 shear stress는 더욱 크기 때문에 5L 호장근 추출물 배양 시의 발효기 교반속도보다 조금 더 낮추어 배양하면 균사체 적응시기를 줄일 수 있을 것으로 판단된다. 그림 16에 교반속도 조절에 따른 균사체 성장 속도를 나타내었다. 그 결과 예상과 같이 5L 배양 결과와 비교하여 보았을 때 거의 비슷한 생산성을 나타내었다.

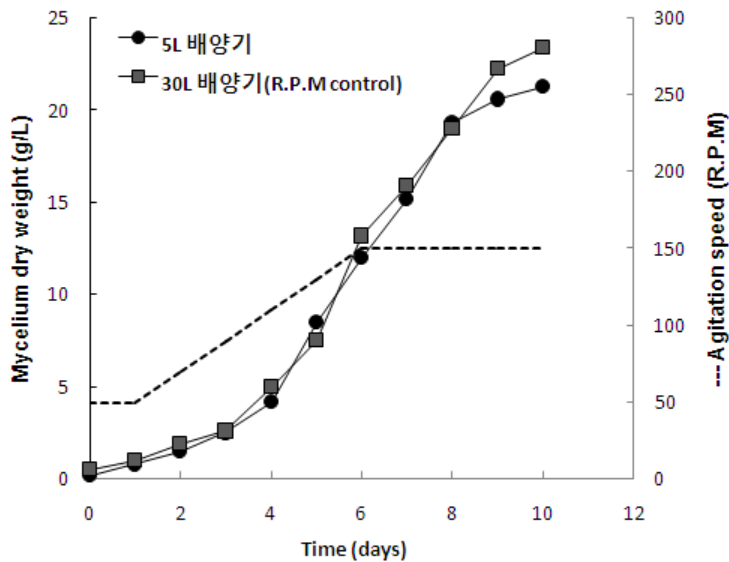


그림 16. 30L 배양기에서 교반속도 조절을 통한 붉은덕다리버섯 균사체 생산 배양

따라서 배양 초반 영양분이 부족한 호장근추출물 배양 배지를 이용한 붉은덕다리버섯 균사체의 액상 배양 시 교반속도에 의한 전단응력 변수를 조절하면 성공적으로 10ton이상의 산업적 규모에서 대량 배양이 가능하리라 사료된다.

② 호장근추출발효물의 물리화학적 안정성

호장근추출발효물에 대한 화장품에 적용 시 그 반응성과 안정도, 사용감 등을 테스트하기 위해 여러가지 화장품 원료와 상용성 테스트를 실시하였으며, 화장품 제형은 스킨, O/W 에멀전 로션, 크림 제형, W/S 에멀전 제형에 첨가 실험을 하였으며, 제품에 투입 온도는 45 - 50 ℃ 로 하고 투입 농도는 5 - 10%로 실시하였다.

추출물 발효배양액과 기존 화장품 원료와의 상용성 테스트 결과를 아래에 나타내었다. 상용성은 주로 원료와 혼합 시 석출이나 분리나, 색상 변화, 용해도 변화 등을 관찰하였다.





그림 17. 호장근추출발효물 원료 사진

표 12. 화장품 원료와의 상용성 테스트 결과

원료의 종류	원료 명	상용성	기타
아미노산 및 단백질류	난각막 추출물, Lysine PCA, 세리신, 수용성 콜라겐 등	○	
해조류	미역, 다시마, 기타 해조추출물	○	
AHA 계열	AHA , BHA, willow bark ext.	○	
기타 식물추출물	너도밤나무,은행잎,금잔화추출물 등	○	
기타 보습제	히아룬산, 키토로오즈 등	○	
Carbopol 수지	Carbopol 940,934,941 등	약간의 점도 저하	
Premulen수지	Permulen TR 2	○	

표 13. 제품 적용 실험 결과

제 형	함유량(%)	성상 변화	비 고
스킨	5 %	변화 없음	
로션 (O/W에멀전)	10 %	점도가 조금 떨어짐. 점도: 2600→2350cps	
크림 (O/W에멀전)	10%	점도가 조금 떨어짐. 점도: 19000→17000cps	

☞ Carbopol 수지의 점도 저하 현상으로 인해 제품에서도 약간의 점도 저하 현상이 나타나나, 성상, pH, 변색, 석출 등에 이상이 없어 표준품과 유사한 제형을 나타냄.

③ 대황추출발효물 및 호장근추출발효물의 기준 및 시험방법

(가) 대황추출발효물의 기준 및 시험방법

원료명 :

Rheum Palmatum Root/Stalk Extract, Aspergillus Ferment, Laetiporus Sulphureus Mycelium Extract

가. 성상

이 원료는 연한 갈색 ~ 갈색의 액상으로 약간의 특이한 냄새가 있다.

나. 순도시험

2-1) 중금속 : 이 원료 1.0 g 을 달아 장원기 일반시험법 중 제2법에 따라 시험한다. 비교액에는 납 표준액 2.0 mL을 넣는다. (10 ppm 이하)

2-2) 비소 : 이 원료 1.0 g을 취하여 장원기 일반시험법 중 제3법에 따라 검액을 만들고 장치 A를 쓰는 방법에 따라 시험한다.(2 ppm 이하)

다. pH : 5.0 ~ 7.0 (1 -> 1)

라. 미생물 : 100 CFU/g 이하

마. 정량법

이 원료 약 10.0 g을 정밀하게 달아 메탄올을 넣어 녹여 50 ml로 하여 검액으로 한다. 따로 에모딘(TCI, Japan 시약, E0500, C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>:270.20) 표준품 20 mg을 정밀하게 달아 메탄올에 녹여 100 ml로 하고, 다시 이 액 5 ml를 정확히 취하여 메탄올을 넣어 50 ml로 하여 표준액으로 한다. 검액 및 표준액 20  $\mu$ l씩을 가지고 다음의 조건으로 고성능액체크로마토그래프법에 따라 시험하여 에모딘의 피크면적 A<sub>T</sub> 및 A<sub>S</sub>를 측정한다.

에모딘의 양(mg)

$$\text{에모딘}(C_{15}H_{10}O_5:270.20) \text{ 표준품의 양(mg)} \times \frac{A_T}{A_S} \times \frac{1}{20}$$

<조작조건>

검출기 : 자외부흡광광도계 (측정 파장 : 254 nm)

칼 럼 : 안지름 약 4.6 mm, 길이 약 250 mm인 스테인레스관에 5  $\mu$ m의 고성능액체크로마토그래프용 옥타데실실릴화한 실리카 겔을 충전한 것

온 도 : 40  $^{\circ}$ C

이동상 : 0.1% 삼불화초산 : 메탄올의 혼합액 (25:75)

유 량 : 1.0 ml/분

(나) 호장근추출발효물의 기준 및 시험방법

원료명 :

Polygonum Cuspidatum Root Extract, Aspergillus Ferment, Laetiporus Sulphureus Mycelium Extract

가. 성상

이 원료는 연한 갈색 ~ 갈색의 액상으로 약간의 특이한 냄새가 있다.

나. 순도시험

2-1) 중금속 : 이 원료 1.0 g 을 달아 장원기 일반시험법 중 제2법에 따라 시험한다. 비교액에는 납 표준액 2.0 mL을 넣는다. (10 ppm 이하)

2-2) 비소 : 이 원료 1.0 g을 취하여 장원기 일반시험법 중 제3법에 따라 검액을 만들고 장치 A를 쓰는 방법에 따라 시험한다.(2 ppm 이하)



다. pH : 5.0 ~ 7.0 (1 → 1)

라. 미생물 : 100 CFU/g 이하

마. 정량법

이 원료 10 g을 정밀하게 달아 메탄올을 넣어 녹여 정확하게 100 ml로 한 후, 0.45  $\mu\text{m}$  필터로 여과한 액을 검액으로 한다. 따로 레스베라트롤 표준품 ( $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_3$ :228.24) 20 mg을 정밀하게 달아 메탄올을 넣어 100 ml로 한다. 이 액 10 ml를 취하여 메탄올을 넣어 100 ml로 한 액을 표준액으로 한다. 검액 및 표준액 10  $\mu\text{l}$ 를 정확히 취해 다음 조건으로 액체크로마토그래프법에 따라 시험하여 레스베라트롤 피크면적 AT 및 AS를 측정한다(레스베라트롤 0.03%).

1) 액체크로마토그래프 조작 조건

컬럼 : 안지름 약 4.6 mm, 길이 약 250 mm의 스테인레스스틸관에 5  $\mu\text{m}$  액체크로마토그래피용 옥타데실실리화한 실리카겔을 충전한다.

컬럼 온도 : 30 $^{\circ}\text{C}$

검출기 : 자외부흡광도계 (측정파장 : 320 nm)

유량 : 1.0 ml / min

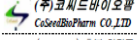
이동상 : 메탄올 · 정제수 혼합액 ( 80 : 20 )

2) 계산식

$$\text{레스베라트롤의 양 (mg)} = \text{레스베라트롤 표준품의 양 (mg)} \times \text{AT/AS} \times 1/10$$

( AT:검액의 면적 , AS:표준액의 면적 )

④ 대항추출발효물 및 호장근추출발효물의 원료 성적서



(주)코시드바이오팜  
CoSeedBioPharm CO., LTD

Page 1 of 1  
Certificate of analysis

---

(363-792) 충북 청원군 강내면 율리길 38 (빌딩 103호) Tel. (043)274-9097 Fax. (043)274-9098

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

PRODUCT : 발효호장근추출물  
 원성분표시명 : 호장근추출물, 아스피질러스발효물, 붉은덕다리버섯균사체추출물  
 INCI Name : Polygonum Cuspidatum Root Extract, Aspergillus Ferment, Laetiporus Sulphureus Mycelium Extract  
 MAKER : CoSeedBioPharm CO., LTD.  
 SUPPLIER : CoSeedBioPharm CO., LTD.  
 LOT No. : CS-130504




ANALYTICAL TESTS	SPECIFICATIONS	RESULTS
성상	연한 갈색 ~ 갈색	연한갈색
냄새	특이취	특이취
pH	5.00 ~ 7.00	6.21
중금속	≤ 10 ppm	불검출
비소	≤ 2 ppm	불검출
강알칼리	≤ 0.1 % (5 g, 600 ℃, 3 hr)	0.005 %
중발산류물	≤ 5.0 % (1 g, 105 ℃, 1 hr)	0.12 %
굴절률(n <sub>D</sub> <sup>25</sup> )	1.300 ~ 1.390	1.365
비중	1.001 ~ 1.020 ((물=1) at 25 ℃)	1.014
미생물		
-Total bacterial count	≤ 100 cfu/ml	불검출
-Yeast & molds	≤ 10 cfu/ml	불검출

38, Woigok-Gil, Gangnae-Myeon, Cheongwon-Gun, Chungbuk, 363-792, South Korea  
 <#103, 3rd building of Business Incubation Center>  
 TEL : +82-43-274-9097 FAX : +82-43-274-9098  
 CoSeedBioPharm, 03, May., 2013

검사

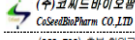
검토

승인

---

자사의 건강기능식품 제조에 필요한 (주)코시드바이오팜 www.coseed.co.kr



(주)코시드바이오팜  
CoSeedBioPharm CO., LTD

Page 1 of 1  
Certificate of analysis

---

(363-792) 충북 청원군 강내면 율리길 38 (빌딩 103호) Tel. (043)274-9097 Fax. (043)274-9098

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

PRODUCT : 발효대황추출물  
 원성분표시명 : 글론대황뿌리/줄기추출물, 아스피질러스발효물, 붉은덕다리버섯균사체추출물  
 INCI Name : Rheum Palmatum Root/Stalk Extract, Aspergillus Ferment, Laetiporus Sulphureus Mycelium Extract  
 MAKER : CoSeedBioPharm CO., LTD.  
 SUPPLIER : CoSeedBioPharm CO., LTD.  
 LOT No. : CS-130503




ANALYTICAL TESTS	SPECIFICATIONS	RESULTS
성상	연한 갈색 ~ 갈색	연한갈색
냄새	특이취	특이취
pH	5.00 ~ 7.00	6.12
중금속	≤ 10 ppm	불검출
비소	≤ 2 ppm	불검출
강알칼리	≤ 0.1 % (5 g, 600 ℃, 3 hr)	0.005 %
중발산류물	≤ 5.0 % (1 g, 105 ℃, 1 hr)	0.12 %
굴절률(n <sub>D</sub> <sup>25</sup> )	1.300 ~ 1.390	1.362
비중	1.001 ~ 1.020 ((물=1) at 25 ℃)	1.014
미생물		
-Total bacterial count	≤ 100 cfu/ml	불검출
-Yeast & molds	≤ 10 cfu/ml	불검출

38, Woigok-Gil, Gangnae-Myeon, Cheongwon-Gun, Chungbuk, 363-792, South Korea  
 <#103, 3rd building of Business Incubation Center>  
 TEL : +82-43-274-9097 FAX : +82-43-274-9098  
 CoSeedBioPharm, 03, May., 2013

검사

검토

승인

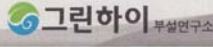




---

자사의 건강기능식품 제조에 필요한 (주)코시드바이오팜 www.coseed.co.kr

⑤ 대항추출발효물 및 호장근추출발효물의 유해 물질분석

(가) 대항추출발효물 및 호장근추출발효물의 중금속 검사 결과


농약시험연구 국가공인인증기관  
상적서 번호: 20121121-201

### 시험 성적서 (Testing Report)

<b>1. 의뢰 내용</b>			
의뢰기관	(주) 코씨드바이오팜	의뢰자	
전화번호	043) 274-9097	주민번호 (법인번호)	
주소	충북 제천시 왕암동 932 전통의약산업센터 106		
시료명	대항, 호장근(선다리)	시험기간	2012.11.21-2012.11.26
생산자		용도	참고용
생산지			

<b>2. 시험 결과</b>	
항 목	결 과
Acetamidiprid 포함 177항목	불 검 출
분 석 방 법	다성분동시분석방법

농산물품질관리법 제 27조 및 동법시행규칙 제 41조의 규정에 의하여 검정한 농산물 중 잔류농약의 분석성적임을 증명합니다.

학 인	기술책임자 김 윤 정 (인)
-----	--------------------

2012년 11월 26일  
**(주)그린하이 대표이사**

○ 본 검정결과는 제출된 시료의 의뢰 성분에만 한정된 성적이며, 이 내용을 광고에 이용하거나 용기·포장 등에 표시할 때는 전문을 광고 또는 표시하여야 함.  
 ○ 본 결과는 의뢰자가 제공한 시료로부터 얻은 것으로 유사 대상 시료에 적용 할 수 없음.  
 ○ 보내주신 분석 시료의 보관 기간은 1개월입니다.

(361-742) 충청북도 청주시 흥덕구 우심사로 241 서원대학교 RIC 제2자연관 213-2호  
Tel : 043)212-3322, Fax : 043)212-3343
www.greenhigh.co.kr

다) 호장근추출발효물의 항노화 유효물질의 생산 조건 확립

붉은덕다리버섯의 생물전환 기술을 통하여 호장근추출물의 유효물질의 함량 변화를 검증 하였다. 이와 함께 발효 전후의 효능을 검증한 결과, 발효 후에 다양한 항노화 기능이 증가되는 것을 확인하였다.

따라서, 호장근추출물의 레스베라트롤(resveratrol)을 발효공정의 최적화를 확립하여 고농도의 대량생산 체계를 확립하고 산업화하는 것을 최종 목표로 하였다.

생물전환(bioconversion) 소재의 최적화 및 대량생산 체계를 확립하기 위하여, 주로 천연 추

출물 내 배당체(glycosides) 형태로 존재하는 화합물을 유효 미생물의 생물전환기술(발효/효소공학)로 피부의 생체이용률과 흡수율이 우수한 아글리콘(aglycones) 형태의 화합물로 전환시키는 기술을 확립하였다. 따라서, 붉은덕다리버섯 균사체 발효배양에서 확인된 바와 같이 호장근추출물의 레스베라트롤과 같은 아글리콘 화합물의 생성은 붉은덕다리버섯 균사체 배양 기간에 생성된  $\beta$ -glucosidase(당가수분해효소)의 활성에 따른 생물전환 소재로 확인되었으며, 배양기간 중  $\beta$ -glucosidase의 유효물질 생산을 위한 최적의 효소활성(enzyme activity)을 확인하였다.

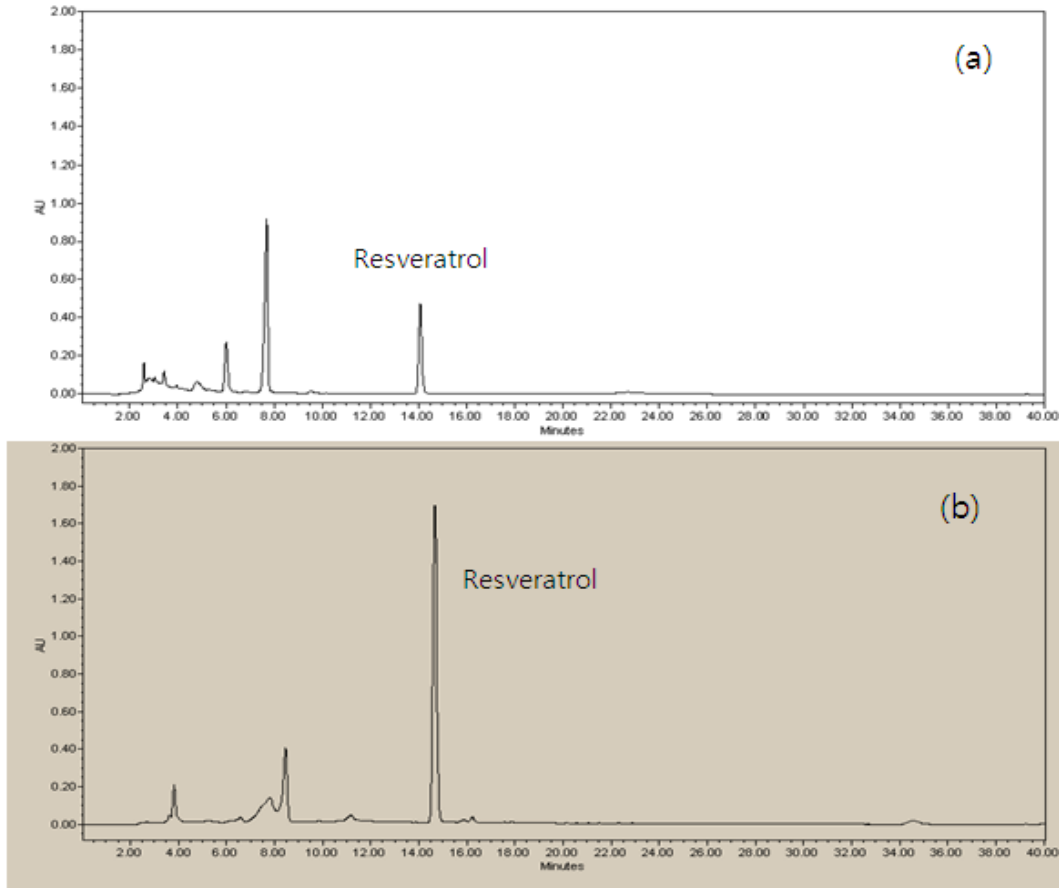


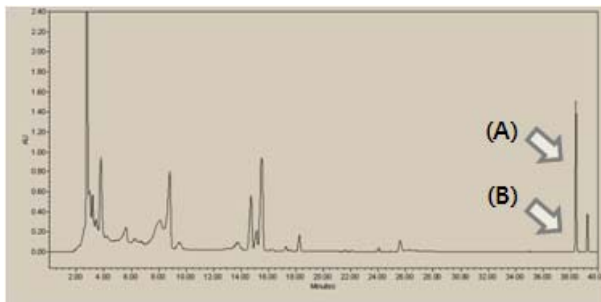
그림 18. 호장근추출발효물의 레스베라트롤(resveratrol) 생성 분석 그래프(UV: 320nm)  
 [(a) 호장근추출물, (b) 호장근추출발효물(붉은덕다리버섯, 6일 배양)]

표 14. 호장근추출발효물의 배양시간별  $\beta$ -glucosidase 활성 및 resveratrol 함량 변화

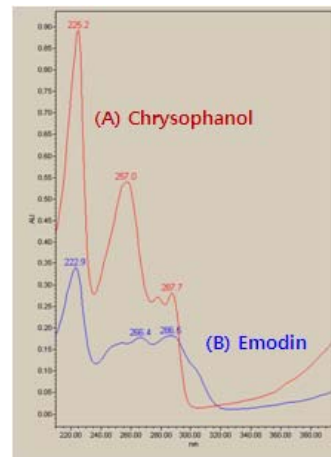
Time (hr)	$\beta$ -glucosidase activity (mU/mL)	resveratrol ( $\mu$ g/mL)
0	0	104.02 $\pm$ 0.01
1	10	103.71 $\pm$ 1.02
2	25	105.01 $\pm$ 0.30
3	70	106.74 $\pm$ 0.51
4	85	230.54 $\pm$ 0.84
5	84	376.20 $\pm$ 0.50
6	87	464.65 $\pm$ 0.50
7	85	404.50 $\pm$ 0.64

항노화 발효소재의 유효물질의 최적화된 대량생산을 확립하기 위해서는, 붉은덕다리버섯 균사체 배양으로부터 생산되는  $\beta$ -glucosidase의 활성이 최대인 배양 6일째 유효물질(resveratrol)의 생산 수율이 높은 것으로 확인하였다.

라) 붉은덕다리/대황추출발효물의 항노화 유효물질의 생산 확인 시험



(a) 대황추출발효물(UV: 260nm)



(b) UV 고유흡수 파장값

그림 19. 대황추출발효물로부터 생성된 생물전환 성분 분석(a) 및 UV 흡수파장값(b) 비교

대황추출물을 기질로 사용하여 붉은덕다리버섯 균사체 배양을 수행한 결과, 그림 19(a)와 같이 대황추출발효물에서 생물전환 성분 (A)와 (B)를 확인할 수 있었다. 여러 연구 문헌을 참조한 결과, 활성성분 (A)는 chrysophanol, (B)는 emodin인 것으로 확인되었으며, 또한 물질이 가지는 고유의 흡수파장값이 각각의 표준물질과 일치하는 것으로 확인되었다.

## (5) 제주 특용작물을 이용한 약용버섯 발효물의 유효성 평가 결과

본 연구개발사업의 목표를 달성하기 위하여 생리활성이 우수하고 화학적 안정성이 개선된 항노화 소재를 이용하여 피부 안전성 및 세포수준에서의 항산화, 항염, MMP 저해 등의 의학적 효능을 규명하여 소재의 다양한 기능을 검증함으로써 바이오 소재의 기능성 자원화에 대한 선도적 역할을 수행하는 것이다.

### 가. 6가지 샘플의 항산화 활성 및 염증완화 평가 결과

제주도 특용작물(삼백초, 대황, 감초, 호장근, 뽕나무, 감귤진피)을 이용하여 제주 전통 누룩과 붉은덕다리버섯 균사체 발효 전,후로 비교 평가하였다.

#### 1) DPPH에 의한 자유라디칼 소거 효과

세포막의 지질과산화의 초기 반응의 억제 정도를 평가 하기 위한 것으로, inhibitor가 안정한 라디칼인 DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical)를 소거하여 탈색되는 정도를 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

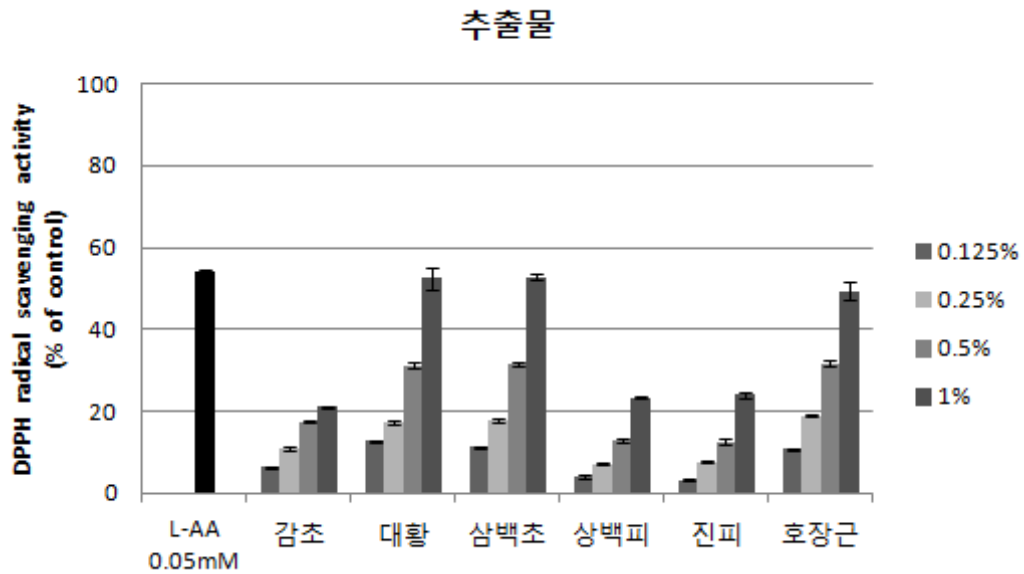


그림 20. 추출물 6가지의 항산화 활성 결과 (DPPH assay)

### 추출물-누룩발효

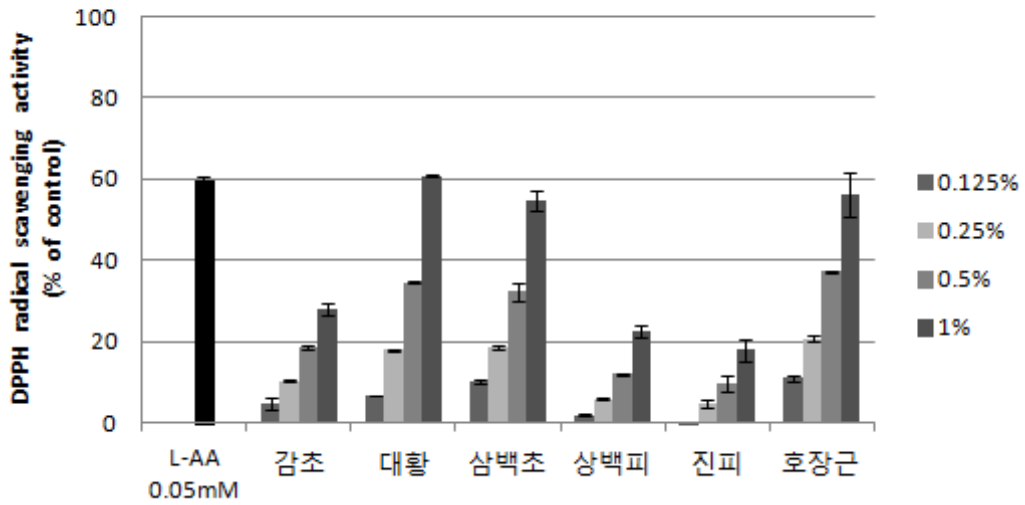


그림 21. 추출물-누룩발효물 6가지의 항산화 활성 결과 (DPPH assay)

### 추출물-누룩발효-균주발효

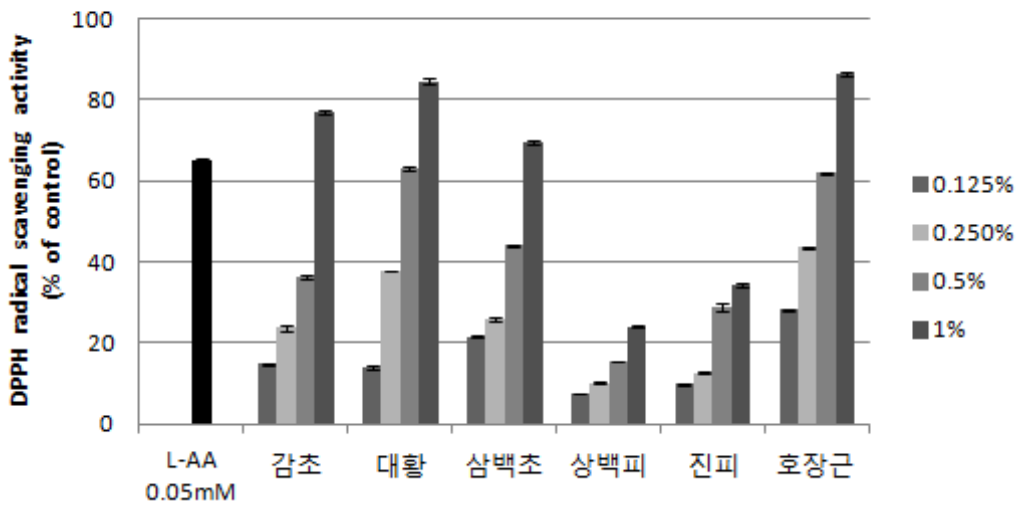


그림 22. 추출물-누룩발효-균주발효물 6가지의 항산화 활성 결과 (DPPH assay)

실험 결과, 6가지 샘플은 농도별로 유의한 DPPH 저해 활성을 나타내었으며, 대황, 호장근, 삼백초 샘플에서 가장 높은 저해 활성을 나타내었다. 또한, 발효 과정이 진행됨에 따라 저해 활성이 더 높아지는 것을 확인할 수 있었다.

2) Superoxide에 의한 자유라디칼 소거 효과(NBT assay)

xanthine oxidase가 xanthine과 반응하여 uric acid로 전환되고 이때 생성되는  $O_2^-$ 를 소거하는 활성을 평가하는 것으로, inhibitor가 소거하지 못한 활성 산소를 nitroblue tetrazolium 이 반응, diformazan으로 전환되는 정도를 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

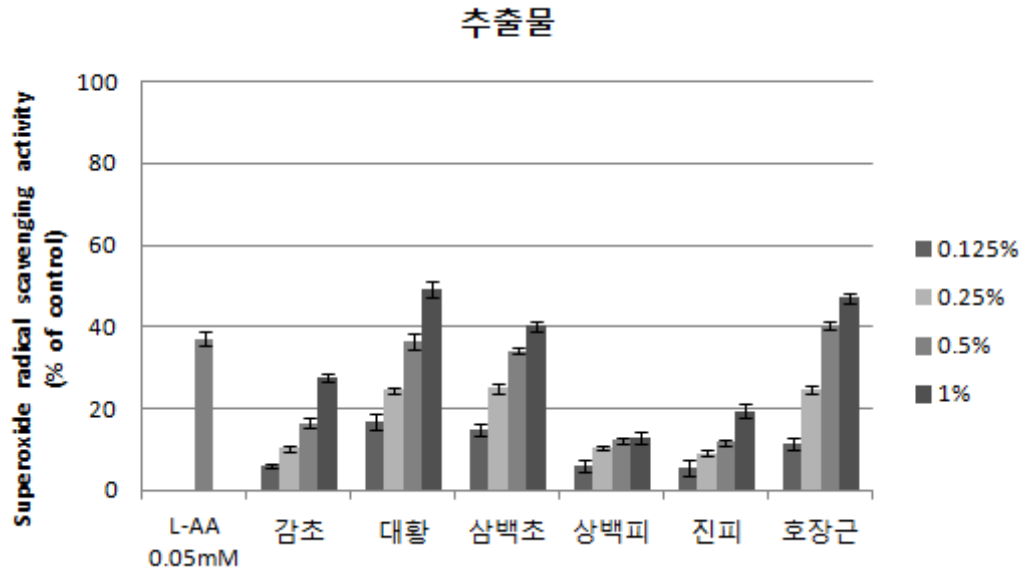


그림 23. 추출물 6가지의 항산화 활성 결과 (NBT assay)

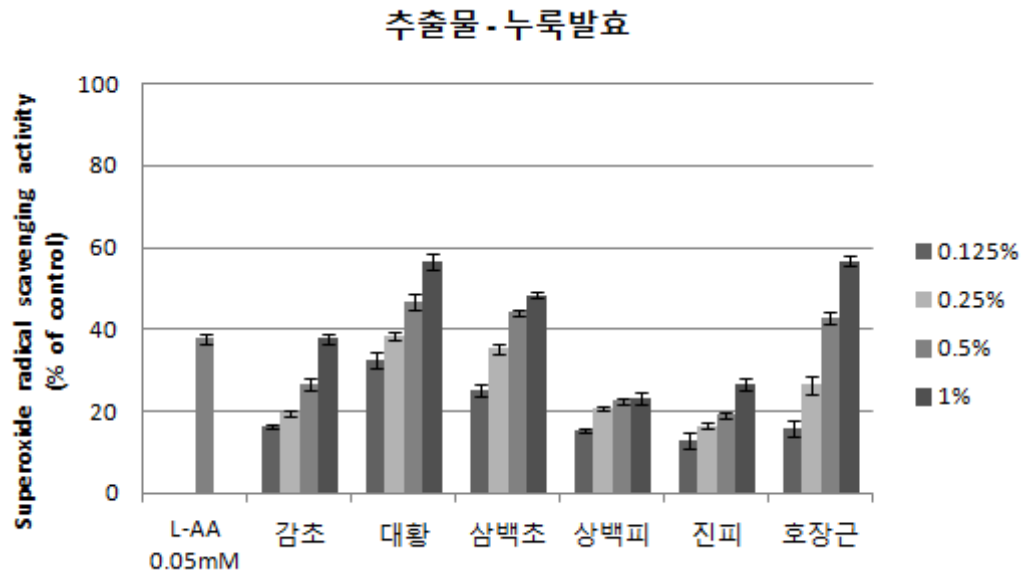


그림 24. 추출물-누룩발효물 6가지의 항산화 활성 결과 (NBT assay)



### 추출물-누룩발효-균주발효

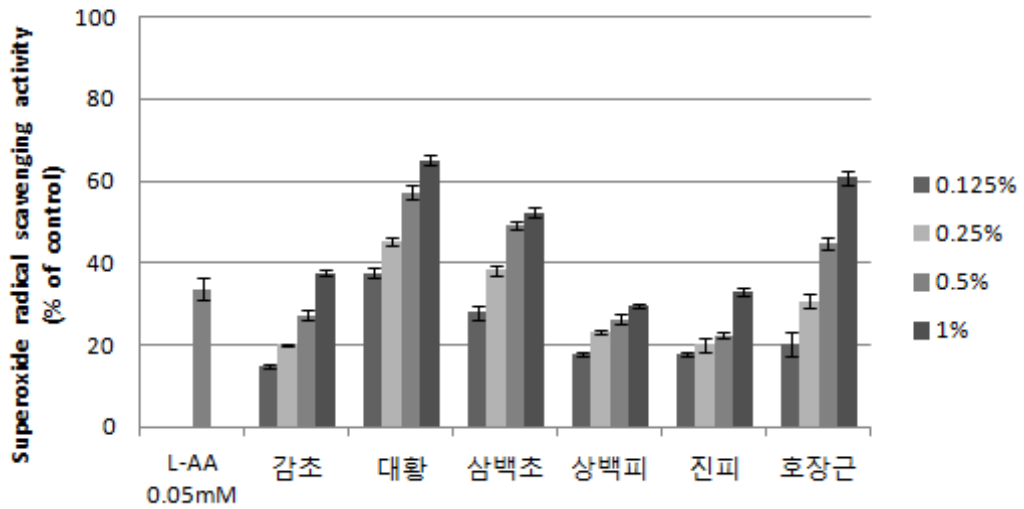


그림 25. 추출물-누룩발효-균주발효물 6가지의 항산화 활성 결과 (NBT assay)

실험 결과, 6가지 샘플은 농도별로 유의한 SOD 저해 활성을 나타내었으며, 대황, 호장근, 삼백초 샘플에서 가장 높은 저해 활성을 나타내었다. 또한, 발효 과정이 진행됨에 따라 저해 활성이 더 높아지는 것을 확인할 수 있었다.

### 3) Cyclooxygenase-2 저해 활성 평가(COX-2 assay)

Cyclooxygenase-2(COX-2)는 피부 염증 반응에 매개체로써 비만세포가 면역글로불린 E(IgE)에 의해 탈과립이 유도된 후 arachidonic acid를 변형하여 염증을 유발하는 prostaglandins를 생성한다. 아토피 질환 등의 염증 반응에 관여하는 COX-2 효소에 대한 활성을 in vitro에서 직접 측정한다.

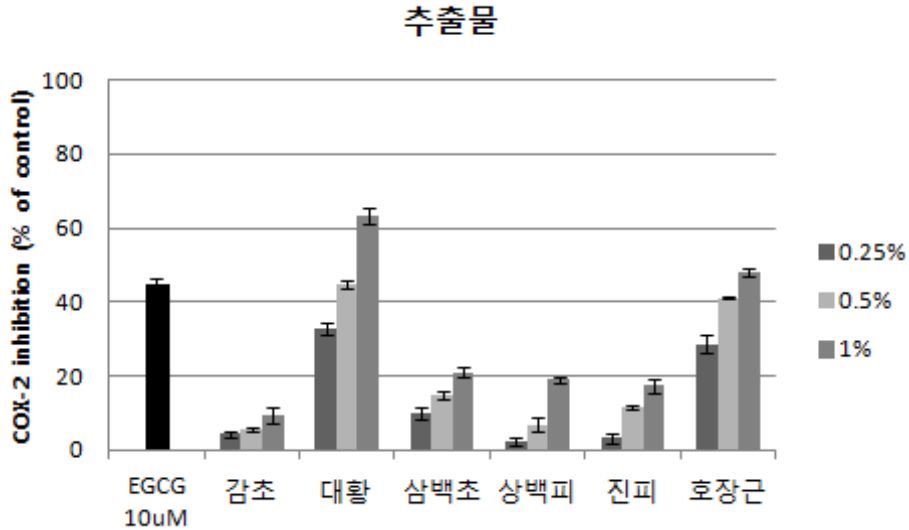


그림 26. 추출물 6가지의 항염 효과 결과 (COX-2 assay)

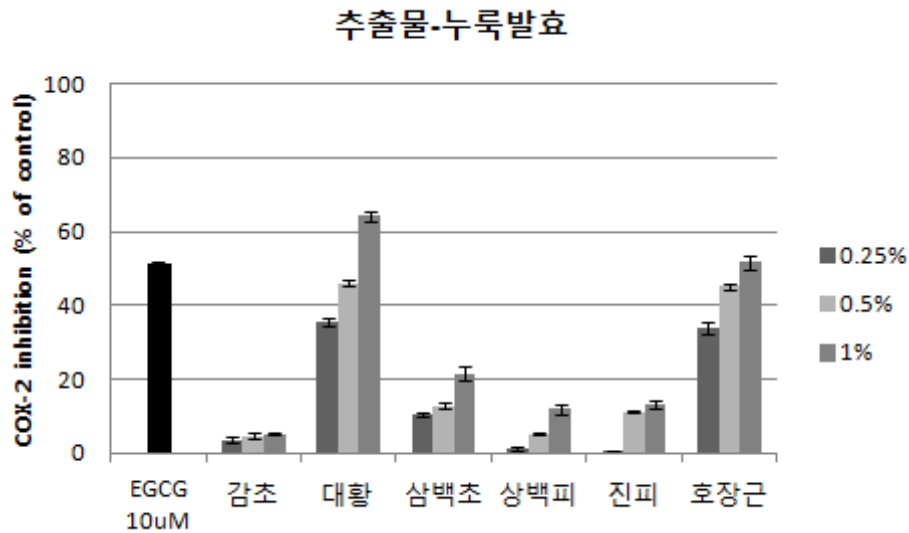


그림 27. 추출물-누룩발효물 6가지의 항염 효과 결과 (COX-2 assay)

### 추출물-누룩발효-균주발효

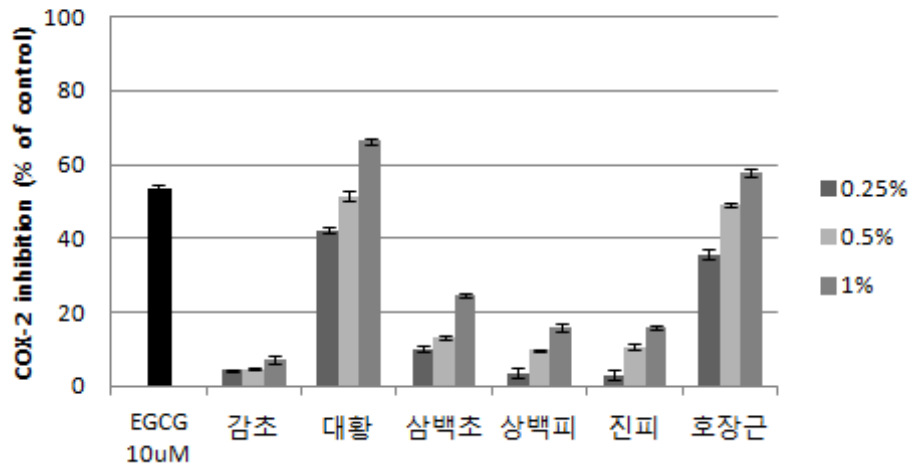


그림 28. 추출물-누룩발효-균주발효물 6가지의 항염 효과 결과 (COX-2 assay)

실험 결과, 6가지 샘플은 농도별로 유의한 COX-2 저해 활성을 나타내었으며, 대황 및 호장근 샘플에서 가장 높은 저해 활성을 나타내었다. 또한, 발효 과정이 진행됨에 따라 저해 활성이 더 높아지는 것을 확인할 수 있었다.

#### 4) 5-Lipoxygenase 저해 활성 평가(5-LOX assay)

lipoxygenase는 arachidonic acid로부터 생체내 염증반응이나 알레르기 반응 등에 관여하는 다양한 화학적인 매개체 역할을 하는 여러 물질들을 생성한다. 따라서 lipoxygenase를 저해하는 물질은 각종 chemical mediators의 생성을 억제하는 결과를 가져오게 되므로 알레르기에 유효할 것이라고 추정할 수 있다. lipoxygenase의 활성정도는 기질과 효소를 이용하여 과산화물 생성정도로 측정하는 실험이다.

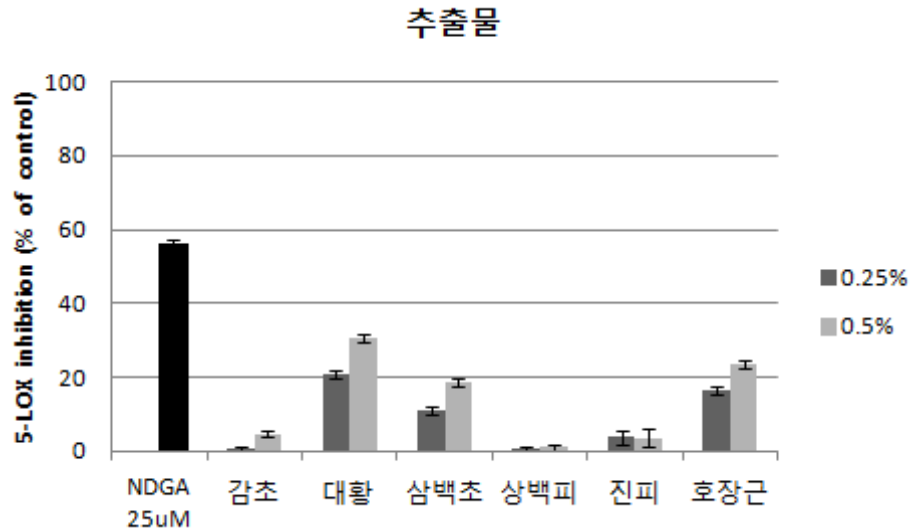


그림 29. 추출물 6가지의 항염 효과 결과 (5-LOX assay)

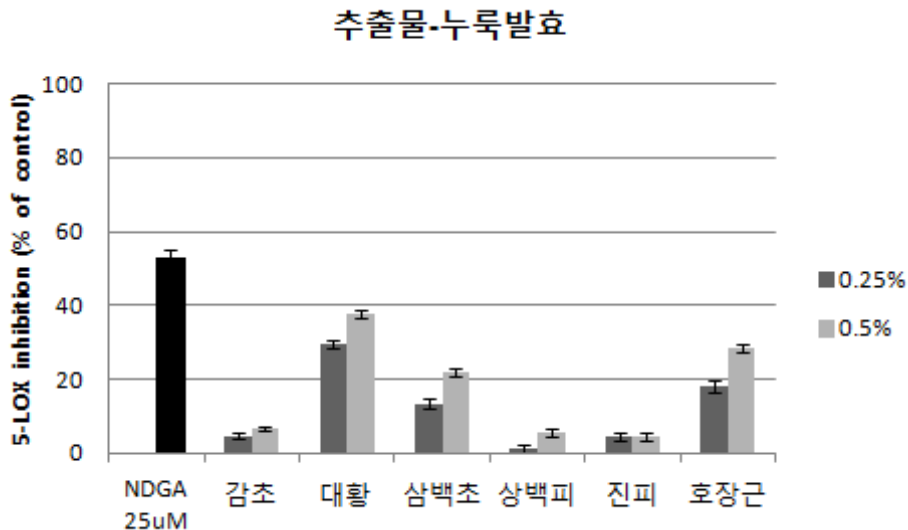


그림 30. 추출물-누룩발효물 6가지의 항염 효과 결과 (5-LOX assay)

### 추출물-누룩발효-균주발효

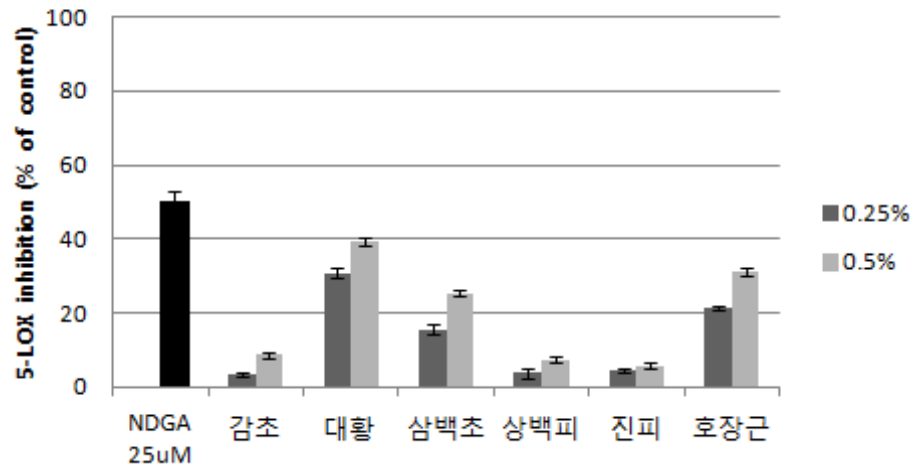


그림 31. 추출물-누룩발효-균주발효물 6가지의 항염 효과 결과 (5-LOX assay)

실험 결과, 6가지 샘플은 농도별로 유의한 5-LOX 저해 활성을 나타내었으며, 대황 및 호장근 샘플에서 가장 높은 저해 활성을 나타내었다. 또한, 발효 과정이 진행됨에 따라 저해 활성이 더 높아지는 것을 확인할 수 있었다.

## 나. 호장근 및 대항 샘플의 항산화 활성 및 염증완화 평가 결과

제주도 특용작물(삼백초, 대항, 감초, 호장근, 뽕나무, 감귤진피)을 이용하여 제주 전통 누룩과 붉은덕다리버섯 균사체 발효 전,후로 비교 평가한 결과, 대항추출물과 호장근추출물의 발효 배양액에서 안전성 및 효능효과가 가장 우수하였으며, 대항추출발효물과 호장근추출발효물에 대하여 다음과 같은 평가를 수행하였다.

### 1) DPPH에 의한 자유라디칼 소거 효과

세포막의 지질과산화의 초기 반응의 억제 정도를 평가 하기 위한 것으로, inhibitor가 안정한 라디칼인 DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical)를 소거하여 탈색되는 정도를 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

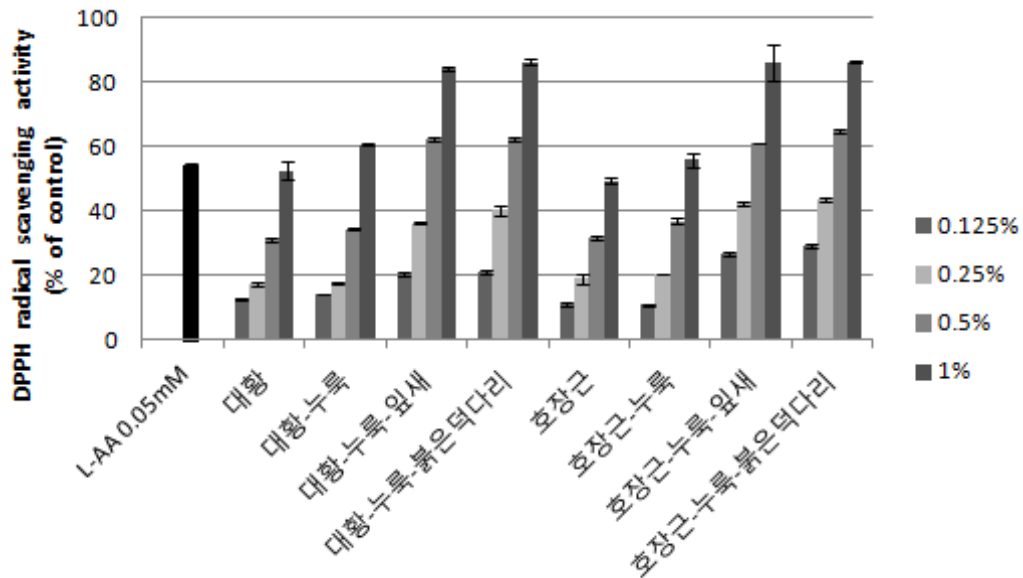


그림 32. 호장근 및 대항 샘플의 항산화 활성 결과 (DPPH assay)

실험 결과, 호장근 및 대항샘플은 농도별로 유의한 DPPH 저해 활성을 나타내었으며, 발효 과정이 진행됨에 따라 저해 활성이 더 높아지는 것을 확인할 수 있었다.

2) Superoxide에 의한 자유라디칼 소거 효과(NBT assay)

xanthine oxidase가 xanthine과 반응하여 uric acid로 전환되고 이때 생성되는  $O_2^-$ 를 소거하는 활성을 평가하는 것으로, inhibitor가 소거하지 못한 활성 산소를 nitroblue tetrazolium 이 반응, diformazan으로 전환되는 정도를 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

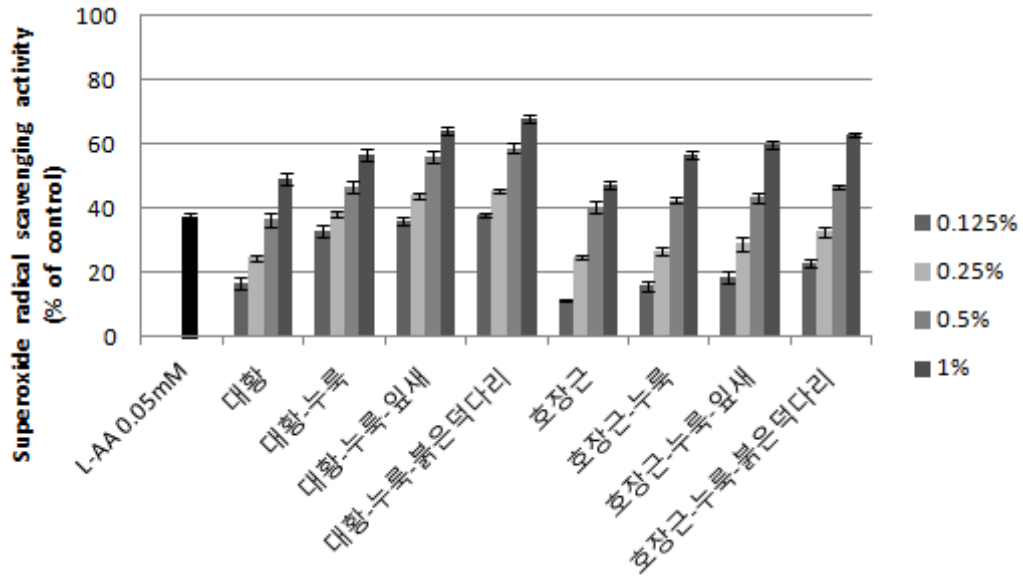


그림 33. 호장근 및 대항 샘플의 항산화 활성 결과 (NBT assay)

실험 결과, 호장근 및 대항 샘플은 농도별로 유의한 SOD 저해 활성을 나타내었으며, 발효 과정이 진행됨에 따라 저해 활성이 더 높아지는 것을 확인할 수 있었다.

### 3) Cyclooxygenase-2 저해 활성 평가(COX-2 assay)

Cyclooxygenase-2(COX-2)는 피부 염증 반응에 매개체로써 비만세포가 면역글로불린 E(IgE)에 의해 탈과립이 유도된 후 arachidonic acid를 변형하여 염증을 유발하는 prostaglandins를 생성한다. 아토피 질환 등의 염증 반응에 관여하는 COX-2 효소에 대한 활성을 in vitro에서 직접 측정한다.

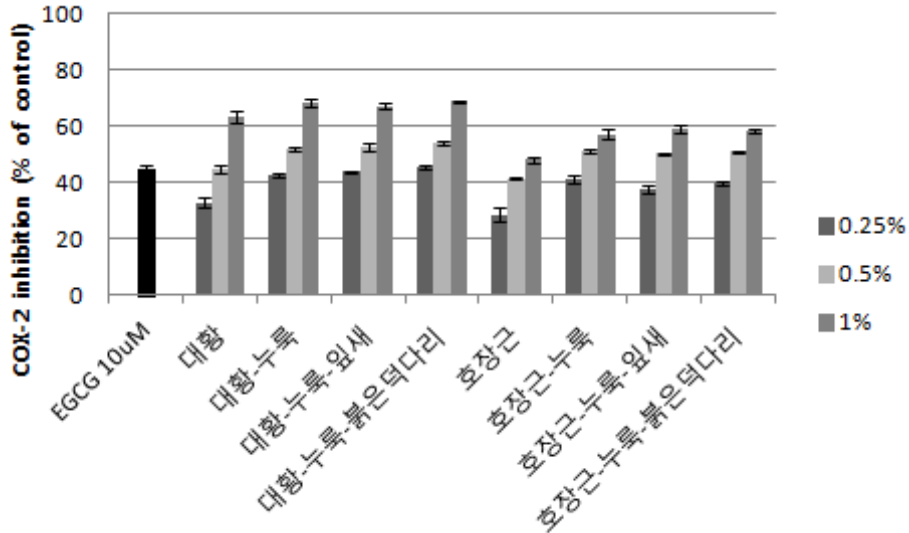


그림 34. 호장근 및 대황 샘플의 항염 효과 결과 (COX-2 assay)

실험 결과, 호장근 및 대황 샘플은 농도별로 유의한 COX-2 저해 활성을 나타내었으며, 발효 과정이 진행됨에 따라 저해 활성이 더 높아지는 것을 확인할 수 있었다.



#### 4) 5-Lipoxygenase 저해 활성 평가(5-LOX assay)

lipoxygenase는 arachidonic acid로부터 생체 내 염증반응이나 알레르기 반응 등에 관여하는 다양한 화학적인 매개체 역할을 하는 여러 물질들을 생성한다. 따라서 lipoxygenase를 저해하는 물질은 각종 chemical mediators의 생성을 억제하는 결과를 가져오게 되므로 알레르기에 유효할 것이라고 추정할 수 있다. lipoxygenase의 활성정도는 기질과 효소를 이용하여 과산화물 생성정도로 측정하는 실험이다.

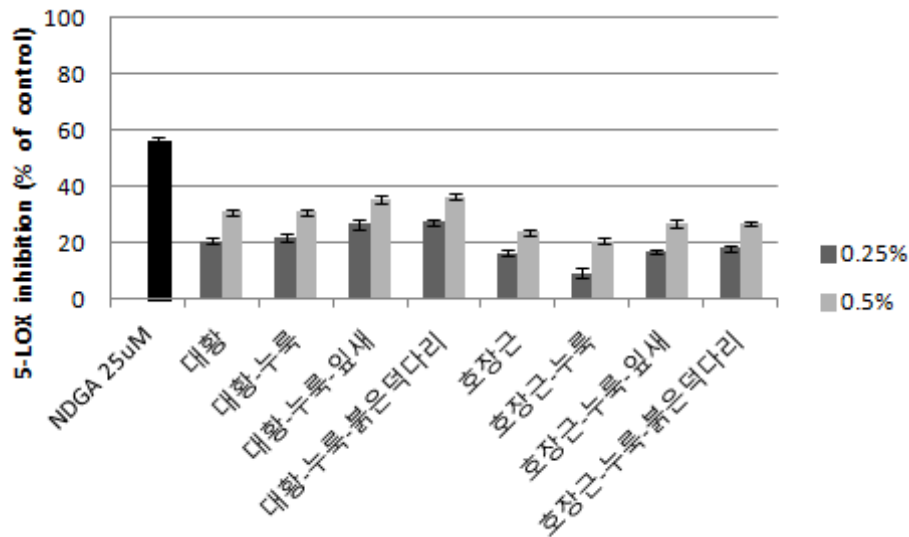


그림 35. 호장근 및 대황 샘플의 항염 효과 결과 (5-LOX assay)

실험 결과, 호장근 및 대황 샘플은 농도별로 유의한 5-LOX 저해 활성을 나타내었으며, 발효 과정이 진행됨에 따라 저해 활성이 더 높아지는 것을 확인할 수 있었다.

#### 5) TRP-1 저해 평가(RT-PCR)

멜라닌은 표피의 기저층사이나 기저층의 아래 모낭 등에서 주로 관찰되는 멜라닌 세포로부터 합성되며, 세포질 돌기를 통해 각질형성세포로 운반되어 표피멜라닌 단위를 형성한다. 멜라닌세포내의 멜라닌소체 (melanosome)에서 생성된 멜라닌색소는 멜라닌소체의 수상돌기를 통하여 부근에 인접되어 있는 각질세포(keratinocyte)로 이동하게 되고, 각질세포가 외피로 부상하면서 피부색으로 나타나게 된다. 멜라닌소체는 정상적인 멜라닌을 합성하는데 필요한 특이적인 효소들을 함유하고 있다. 이 효소들 중 가장 잘 알려진 것으로 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1)과 tyrosinase related protein-2 (TRP-2) 등이 있다. 이 중 tyrosinase 는 멜라닌 합성의 속도 결정단계인 초기반응에 작용하는 효소로서, tyrosin 3,4-dihydroxyphenyl alanine (DOPA)로 전환하는 tyrosine hydroxylase 활성과 DOPA를 DOPA quinone 으로 산화하는 DOPA oxidase 활성을 모두 가지고 있다. 반면 TRP-1은 1986년에 Shibahara에 의해 tyrosinase로서 보고된 효소이다. 그러나 이 단백질이 멜라닌 합성에 관여되 DHICA를 indole-5,

&quinone-2-Carboxylic acid에 산화하고, 최종적으로 중합 반응을 진행시키는 eumelanin 합성 DHICA oxidase로써 밝혀진 것은 1994년 이다. TRP-1은 DHICA oxidase로서의 활동의 이외에 melanosome안 효소군의 안정화에 기여하고 있는 것도 보고되어 있다.

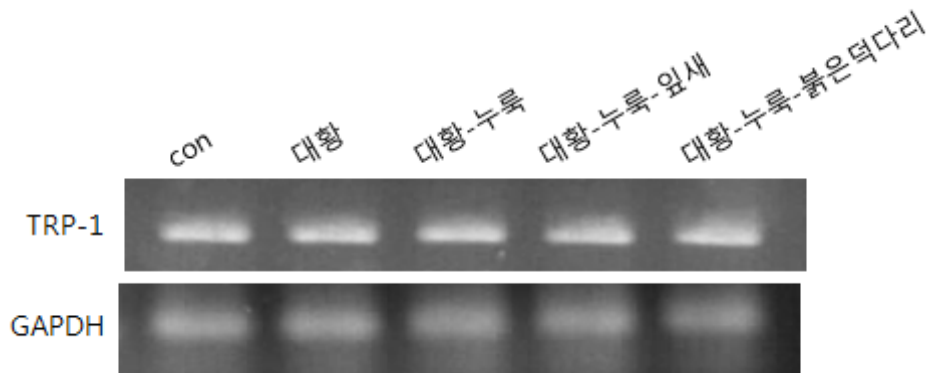


그림 36. 대황 샘플의 항염 효과 결과

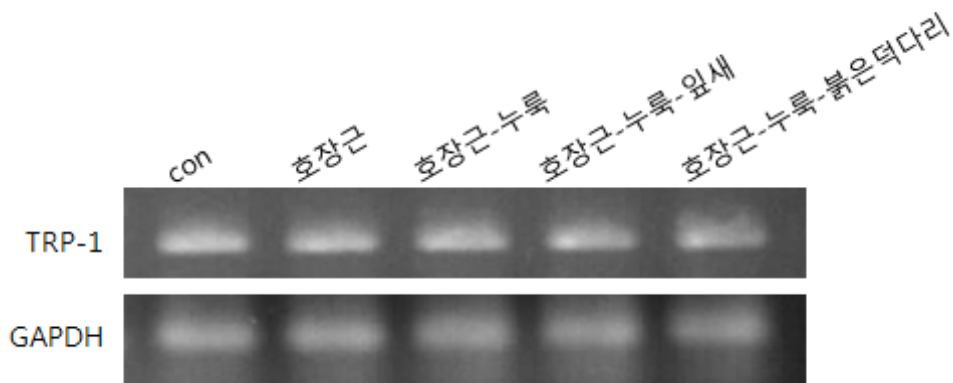


그림 37. 호장근 샘플의 항염 효과 결과

실험 결과, 호장근 및 대황 샘플은 TRP-1 저해 효과를 나타내지 않았다.

## 다. 호장근 및 대황 샘플의 유효성분에 대한 항산화 활성 및 염증완화 평가 결과

대황추출물의 유효성분인 Emodin과 호장근추출물의 Polydatin, 호장근추출발효배양물의 Resveratrol에 대하여 다음과 같은 평가를 수행하였다.

### 1) DPPH에 의한 자유라디칼 소거 효과

세포막의 지질과산화의 초기 반응의 억제 정도를 평가 하기 위한 것으로, inhibitor가 안정한 라디칼인 DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical)를 소거하여 탈색되는 정도를 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

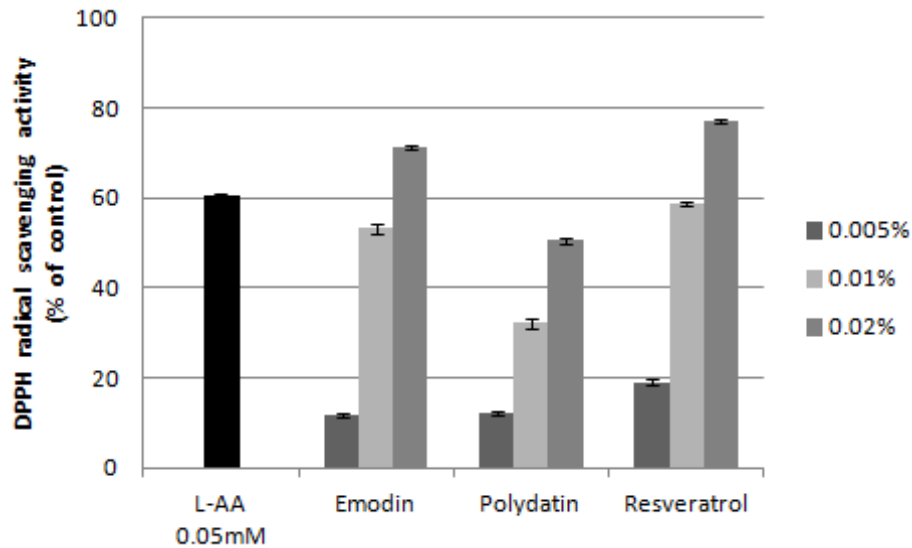


그림 38. 호장근 및 대황 샘플 유효성분의 항산화 활성 결과 (DPPH assay)

실험 결과, Emodin(대황추출물의 유효성분), Polydatin(호장근추출물의 유효성분), Resveratrol(호장근추출발효배양물의 유효성분) 모두 농도별로 유의한 DPPH 저해 활성을 나타내었으며, 호장근추출물을 발효하여 얻어낸 Resveratrol이 발효 전의 Polydatin에 비해 더 높은 저해 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

## 2) Cyclooxygenase-2 저해 활성 평가(COX-2 assay)

Cyclooxygenase-2(COX-2)는 피부 염증 반응에 매개체로써 비만세포가 면역글로불린 E(IgE)에 의해 탈과립이 유도된 후 arachidonic acid를 변형하여 염증을 유발하는 prostaglandins를 생성한다. 아토피 질환 등의 염증 반응에 관여하는 COX-2 효소에 대한 활성을 in vitro에서 직접 측정한다.

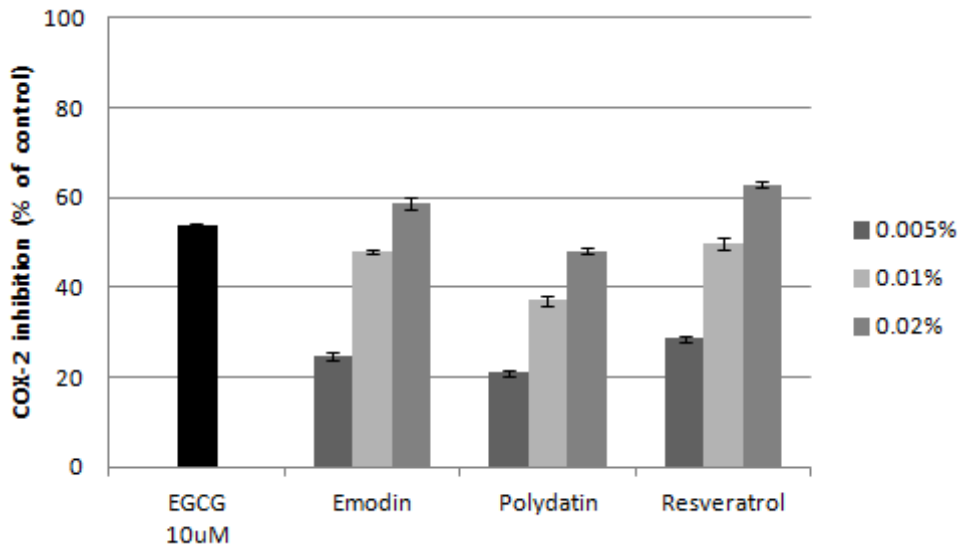


그림 39. 호장근 및 대황 샘플 유효성분의 항염 효과 결과 (COX-2 assay)

실험 결과, Emodin(대황추출물의 유효성분), Polydatin(호장근추출물의 유효성분), Resveratrol(호장근추출발효배양물의 유효성분) 모두 농도별로 유의한 COX-2 저해 활성을 나타내었으며, 호장근추출물을 발효하여 얻어낸 Resveratrol이 발효 전의 Polydatin에 비해 더 높은 저해 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

## 라. 호장근 샘플의 세포 내 효능 평가 결과

### 1) 세포 배양

신생아의 포피조직에서 분리한 human dermal fibroblast (HDF)는 Modern Tissue Technology (MTT, Korea)로부터 구입하였다. 구입한 HDF를 DMEM/F12 (3:1) 배지에 10% FBS (fetal bovine serum), 1% penicillin-streptomycin 을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에 배양하고 trypsinization으로 계대 배양한 뒤 4-8 세대 세포를 실험에 이용하였다.

### 2) 세포 생존률 측정

MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 정량은 Mosmann의 방법을 변형하여 실시하였다. HDF를 1 X 10<sup>4</sup> cells/well 로 농도로 96-well plate의 well에 시료를 투여하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양하였다. 각 well의 배지들을 제거하고 MTT solution (5 mg/ml in PBS)을 첨가하였다. 37°C에서 2시간 반응시킨 후 MTT solution 을 제거 하고 각 well에 100 μl의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 15-20분간 plate shaker로 흔들어 준 후 570 nm에서 microplate reader (Model ELX 800, BIO-TEK Instruments Inc, USA)로 흡광도를 측정하였다.

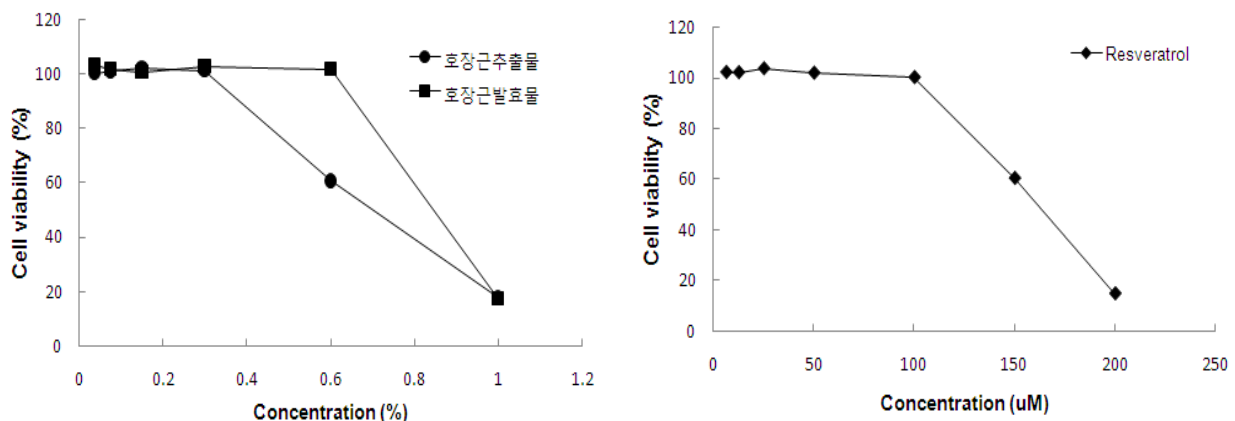


그림 40. 섬유아세포의 호장근추출물 및 호장근추출발효물, resveratrol의 세포독성 실험 결과

### 3) UVA 조사 및 시료의 처리

HDF을 1.5 X 10<sup>5</sup> cells/ml의 농도로 35 mm dish에 배양, 약 80%의 confluency에 도달할 때까지 배양한다. UV조사 전에 배양배지를 제거한 후 PBS로 세척하여 배지내 serum을 제거한 후 PBS 상태에서 6.3 J/cm<sup>2</sup> UVA (UVA F15T8BLB, Sankyo Denki, Japan)를 조사하였다. UVA 조사 후 배양배지는 FBS를 첨가하지 않은 DMEM/F12 (3:1) 배지에 호장근추출물, 호장근배양물, resveratrol을 투여하여 24시간 배양하였다.

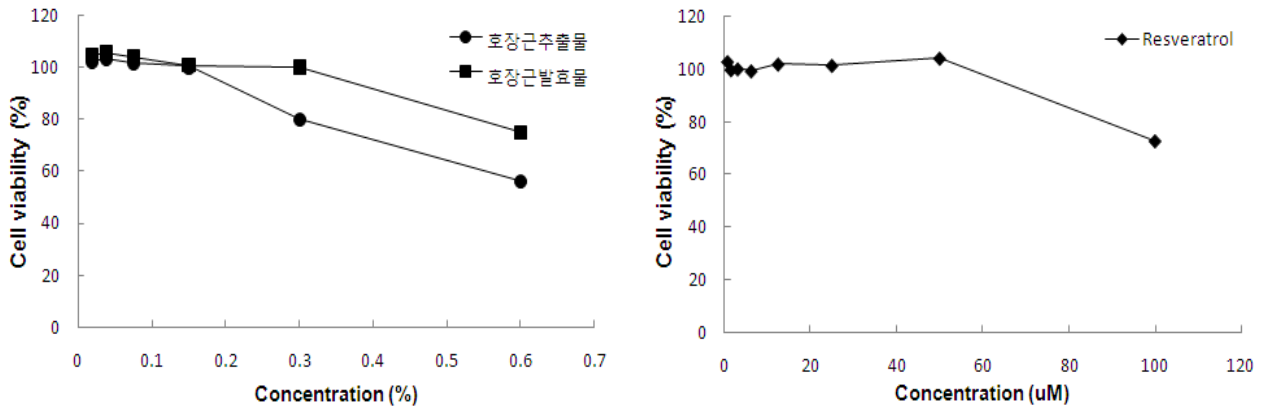


그림 41. UVA 조사 후 섬유아세포의 호장근추출물 및 호장근추출발효물, resveratrol의 세포독성 실험 결과

#### 4) Collagen 합성량 측정(ELISA법)

HDF에 시료를 처리하여 24시간 배양한다. 배지 중에 유리된 프로콜라겐의 양을 프로콜라겐 타입-1C-펩타이드 EIA 키트(procollagen type-1 C-peptide EIA kit, MK101, Takara, Japan)를 사용하여 측정하고, 양성대조군으로 L-ascorbic acid를 사용하였다.

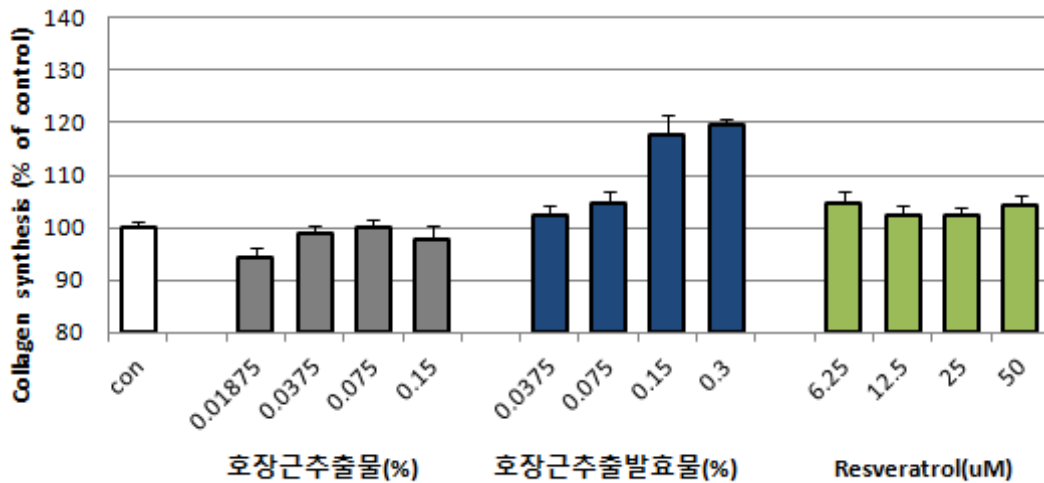


그림 42. 섬유아세포에서 호장근추출물 및 호장근추출발효물, resveratrol의 콜라겐 합성량 실험결과

실험 결과, 호장근추출물에 비해 호장근추출발효물에서 다소 우수한 Collagen 합성 촉진 효과를 확인할 수 있었으며, 유효물질인 resveratrol은 미흡한 효과가 나타났다.

#### 5) MMP-1 발현저해 측정(ELISA법)

HDF에 UVA를 조사 후 시료를 처리하여 24시간 배양한 배지를 96 well plate에 분주하여 4°C에서 overnight하여 coating하였다. PBS-T (phosphate buffered saline + 0.05% Tween 20)로

3회 세척하고 3% BSA (bovine serum albumin)/PBS로 37℃, 2시간 동안 blocking한 후 monoclonal anti-MMP-1 (mouse)을 1:1000으로 blocking solution (3% BSA)에 희석하여 150  $\mu$ l씩 분주하고 37℃, 2시간 반응시켰다. Anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate를 1:1000으로 blocking solution에 희석하여 150  $\mu$ l씩 분주하고 37℃, 90분간 반응시킨 후 PBS-T로 세척한 다음 diethanolamine buffer에 1 mg/ml pNPP (p-nitrophenyl phosphate)를 포함한 기질용액 150  $\mu$ l를 넣어 실온에서 30분간 반응시켰다. 3 N NaOH 50  $\mu$ l를 첨가하여 반응을 완전히 중지시킨 후 microplate reader을 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

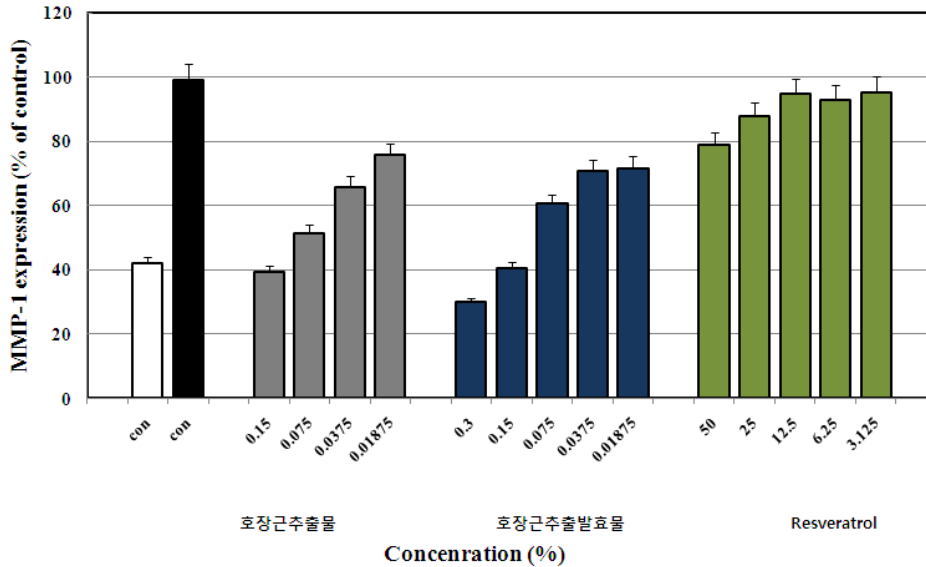


그림 43. UVA 조사 후 섬유아세포의 호장근추출물 및 호장근추출발효물, resveratrol의 MMP-1 저해 활성 실험결과

실험 결과, 호장근추출물에 비해 호장근추출발효물에서 다소 우수한 MMP-1 단백질 발현저해효과를 확인할 수 있었으며, 유효물질인 resveratrol은 미흡한 효과가 나타났다.

#### 6) RNA 분리 및 RT-PCR

Total RNA추출은 RNeasy mini kit (Qiagen, Maryland, Germany)을 이용하였다. cDNA합성은 1  $\mu$ g의 total RNA를 oligo (dT)15 primer, dNTP (0.5 uM), 1 unit RNase inhibitor 그리고 4 unit Omniscript reverse transcriptase (Qiagen, Hilden, Germany)로 37℃에서 60분, 93℃에서 5분 heating 시킴으로서 반응을 중지시켰다. Polymerase Chain Reaction (PCR)은 cDNA로부터 MMP-1, GAPDH를 증폭하기 위하여 1  $\mu$ l cDNA, 0.5 uM의 5'과 3'primer, 10 X buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 200 uM dNTP, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 unit Taq polymerase (Qiagen, Hilden, Germany)를 섞고 distilled water로 전체를 25  $\mu$ l로 맞추는 다음 PCR을 실시하였다. PCR에 의하여 생성된 산물을 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 MMP-1과 GAPDH 유전자의 발현을 확인하였다.

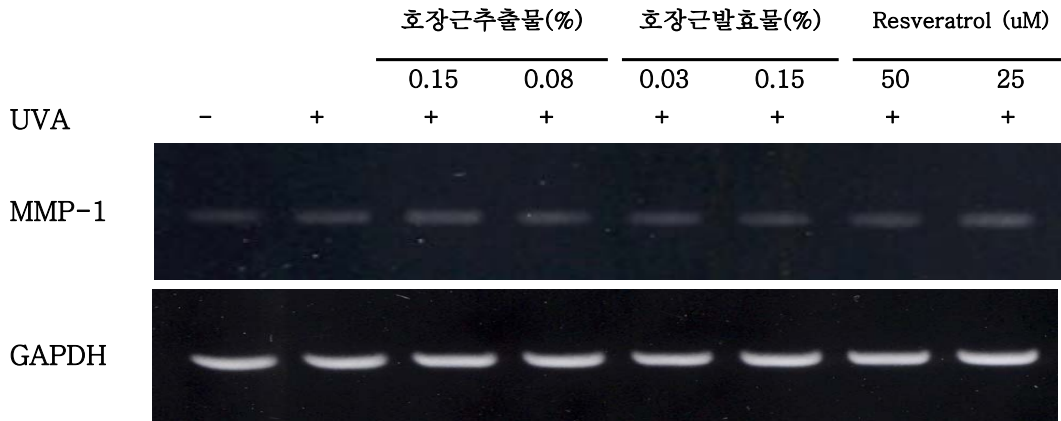


그림 44. UVA 조사 후 섬유아세포의 호장근추출물 및 호장근추출발효물, resveratrol의 MMP-1 mRNA 저해 활성 결과

실험 결과 자외선을 처리한 대조군에 호장근추출물, 호장근발효배양물에서 미약한 정도의 유전자 발현 저해효과를 확인할 수 있었다.

#### 7) $\beta$ -galactosidase 염색을 이용한 노화 지표의 확인

노화의 진행에 호장근추출발효물이 미치는 영향을 확인하기 위해 노화로 인해 증가되며 이를 통해 노화의 지표 단백질로 이용되고 있는  $\beta$ -galactosidase (Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase, SA- $\beta$ -Gal) 활성을 다음과 같이 senescent cell staining kit(sigma, USA)를 사용하여 염색/ 평가하였다.

35mm culture dishes에 섬유아세포를  $1 \times 10^5$  cells를 seeding 한 후 24시간 뒤 UVA 10 J/cm<sup>2</sup> 조사 후 호장근추출발효물을 농도 별로 넣은 배지로 72시간동안 키웠다. 72시간 뒤에 PBS로 wash 한 후, 0.2% glutaraldehyde와 2% formaldehyde로 7분간 고정시킨 후 40mM citric acid/phosphate (pH6.0), 5mM K<sub>3</sub> FeCN<sub>6</sub>, 5mM K<sub>4</sub> FeCN<sub>6</sub>, 150mM NaCl 과 2mM MgCl<sub>2</sub>에 1mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-galactopyranoside 이 되도록 녹인 용액을 CO<sub>2</sub>가 없는 37°C에서 24 시간 둔 후, 파란색으로 염색된 세포들을 광학 현미경으로 관찰하여 세포수를 카운터 한 후 사진 촬영을 하였다.



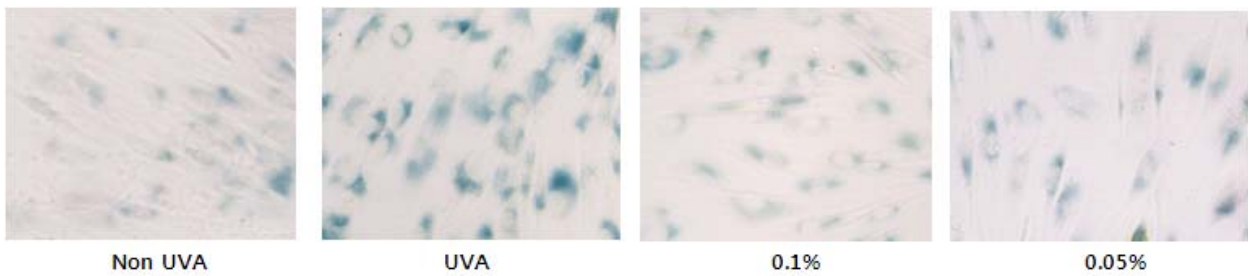
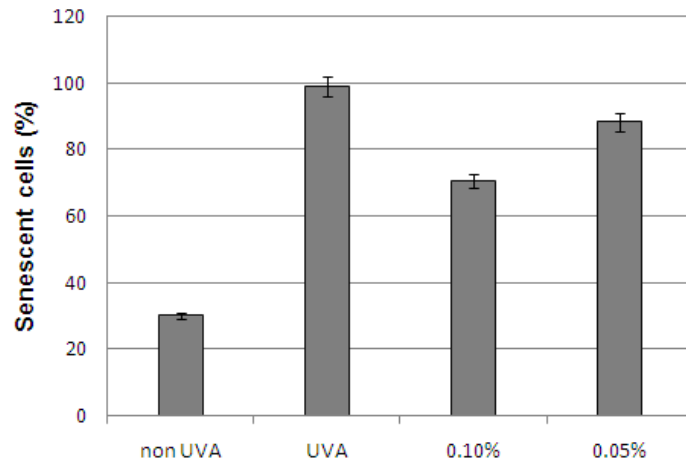


그림 45. 호장근추출발효물의 자외선에 의해 증가된 SA-β-Gal 활성평가 결과

호장근추출발효물을 농도별로 처리한 결과 자외선 조사 시 증가되는 SA-β-Gal 활성이 농도의존적으로 감소되고 있는 것으로 나타났다.

8) 대항 발효/호장근 발효 추출물의 c.elegans 시험법에 의한 효능 확인  
노화(Ageing process)와 stress 저항성의 연구 동향

○ Pro-ageing factors와 anti-ageing factors

대표적 anti-ageing factors로는 Caloric restriction(CR), FoxO, HSF-1, Sirtuins, Chemical substances (e.g. resveratrol) 등이 알려져 있으며, 노화 유발인자로는 Insuling/IGF-1 signalling, TGF-b signalling, Mitochondrial respiration등이 보고되어 있다.

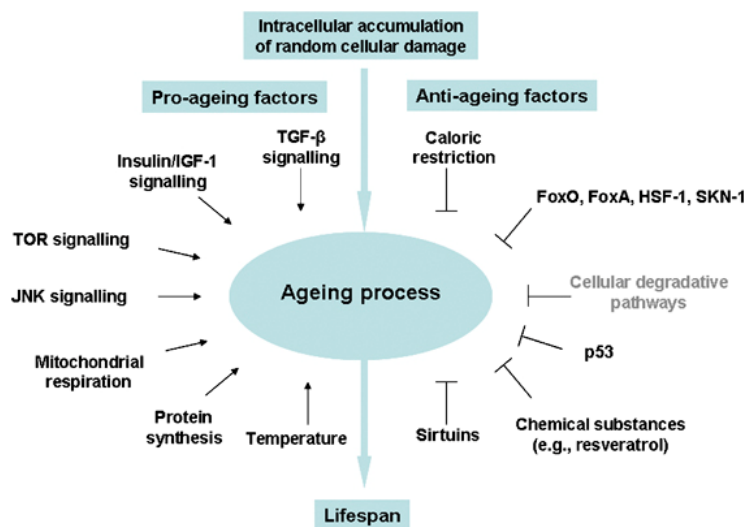


그림 46.노화 유발인자와 노화 억제인자

○ daf-16 (FoxO transcription factor)의 스트레스 저항과 노화조절

Insulin/IGF-1 (IIS) 대사과정 중 인슐린이나 인슐린유사물질, 성장조절인자 등이 IGF-1 receptor인 daf-2 dimer에 결합하면, 스트레스 저항성과 노화 조절의 중요한 인자인 daf-16 (FoxO transcription factor)의 인산화를 유도하게 되고 nuclear translocation이 어렵게 된다. 이 결과로 전사활성이 억제되며 스트레스저항성 감소, 산화적손상 등에 의해 노화가 촉진된다 (*Nature Reviews Neuroscience* 9, 759-767(2008)). 따라서 Insulin/IGF-1 signalling에 의한 daf-16의 negative regulation을 조절 하기위하여 IGF-1 antagonist 소재 발굴이 필요하며 이는 노화 제어의 주요한 목표가 될 수 있다.

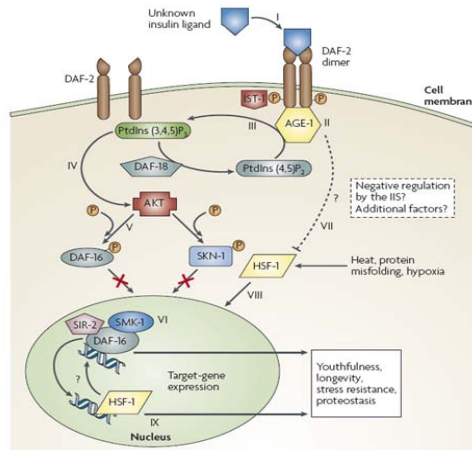


그림 47. *C. elegans*의 노화 조절 기전

○ HSF-1과 *daf-16*의 amyloid beta peptide 방출과 노화 조절

- HSF-1 은 amyloid beta peptide에 의해 생성된 toxic oligomer를 rapid disaggregation 시키고, longevity의 transcription factor로서 역할이 보고되고 있다. *Daf-16* 은 toxic oligomer의 active aggregation을 유도하여 낮은 독성의 high-molecular-mass를 만들고 이들은 slow disaggregation통해 분해된다. 따라서 HSF-1과 *daf-16*의 regulator 발굴을 통하여 proteostasis를 제어하고 스트레스저항성 증대와 노화조절 가능할 것으로 사료된다.

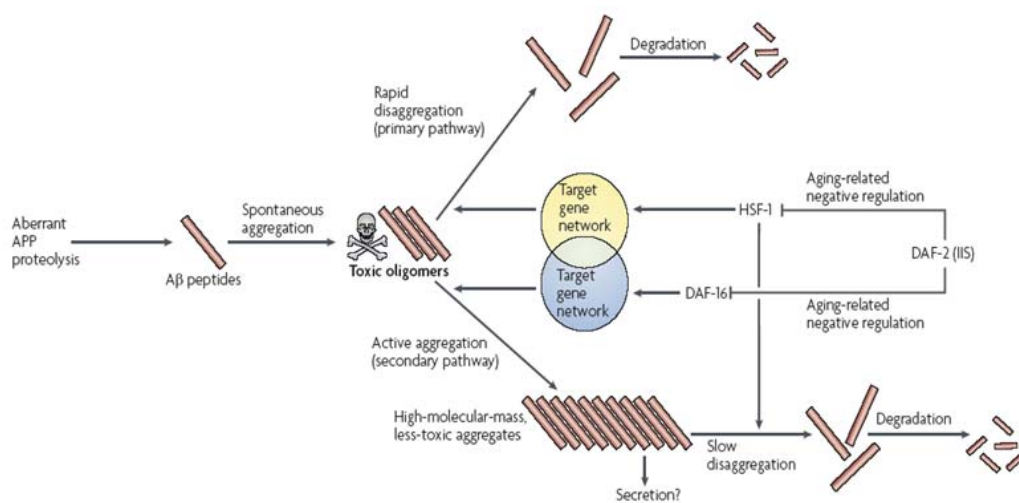


그림 48. *daf-16*의 protein misfolding 조절 기전

### 1.1. 배지 조성

*C. elegans* 배양 배지로는 nematode growth medium(NGM)을 사용하였으며, 조성은 Table 1과 같다. Agar(Sigma), Tryptone (Sigma, ) NaCl (Sigma, 규격, USA), Tris-Base(Sigma, T1503, USA) 및 Tris-HCl(Sigma, T3253)을 3차 증류수에 녹이고 0.5mL 콜레스테롤을 넣어 500mL 하였다. 이를 멸균한 후 Petridish (회사, 60x15mm, 국가)에 5mL씩 분주하여 굳혀서 사용하였다. 고체 배지에서 자란 *C. elegans*를 씻어주는 용도로 사용되는 M9 buffer는 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3gr, NaHPO<sub>4</sub> 6gr, NaCl 5gr, 1M MgSO<sub>4</sub> 1ml을 넣고 증류수로 1L까지 채워서 고압 멸균하여 사용하였다. S 배지는 NaCl 3gr, 1M pH 6.0 potassium phosphate 30ml, potassium citrate 5ml, trace metal solution 5ml, 1M CaCl<sub>2</sub> 3ml, 1M MgSO<sub>4</sub> 3ml을 넣어주고 고압 멸균하여 cholesterol (5mg/ml로 ethanol에 녹인 것) 1ml, streptomycin (50ug/ml) 1ml을 넣어 사용하였다.

Table 1 NGM 배지 조성

Materials	amount
agar	8.5g
Tryptone	1.5g
NaCl	1.0g
Tris-Base	0.12g
Tris-HCl	0.275g
D.D.W	500mL
cholesterol	0.5mL (5mg/mL in ethanol)

### 1.2. *C. elegans*의 유지

야생형으로 Bristol N2와 기전탐색을 위한 *daf-16*, *mev-1*은 조선대학교 조정훈 교수님으로부터 분양받아 사용하였다. Brenner(1974)의 방법에 따라 고체배지에 OP50 균주를 배양하여 lawn을 만들고 그 위에 *C. elegans*를 3-4일 간격으로 옮겨주며 배양하였다. *C. elegans*의 장기보관은 1mL의 OP50이 포함된 2-3개의 10 cm dish에

20 마리의 young adult worm을 옮겨 20℃에서 4일 동안 배양하였다. OP50이 없는 상태로 L1-L2 stage worm이 풍성하게 한후 M9 buffer로 harvest 하여 freezing solution(50mL 1M KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 240mL glycerol, 710mL ddH<sub>2</sub>O, autoclave, add 30uL 1M MgSO<sub>4</sub> per 100mL of solution)을 첨가하였다. 이를 -80℃에 보관하면서 실험 시에 cryovial을 꺼내 실온에서 완전히 녹이고 *E. coli* OP50이 깔아져 있는 NGM 배지에 부어 움직임을 확인하고 2-3일후에 10-15마리를 새로운 plate로 옮겨서 one generation 번식을 실시하였다.

## 2. Thermal stress 저항성 실험

Synchronized L1 stage의 예쁜 꼬마선충 100 마리 정도를 NGM agar plate 옮겨서 72시간 동안 배양하여 L4 stage Lavae가 되도록 하였다. 10마리의 adult worm을 약물이 처리된 6cm plate와 약물이 처리되지 않은 plate에 각각 옮겨 3시간정도 egg laying을 하고 plate에서 adult worm을 제거하였다. Reproductive 기간 동안에 매일 약물이 처리된 새로운 배지로 옮겨주고 6일째 되는 날 35℃ 인큐베이터에서 8시간동안 Thermal stress를 주었다. 그리고 죽은 꼬마선충의 수를 세어 대조군과 비교하였다. 그 결과 CS-131106 추출물 200ug/mL 처리군이 대조군에 비해 5.3% 정도 생존율이 높아 열 스트레스저항성에 유의적(t=4.000) 활성이 관찰되었다.

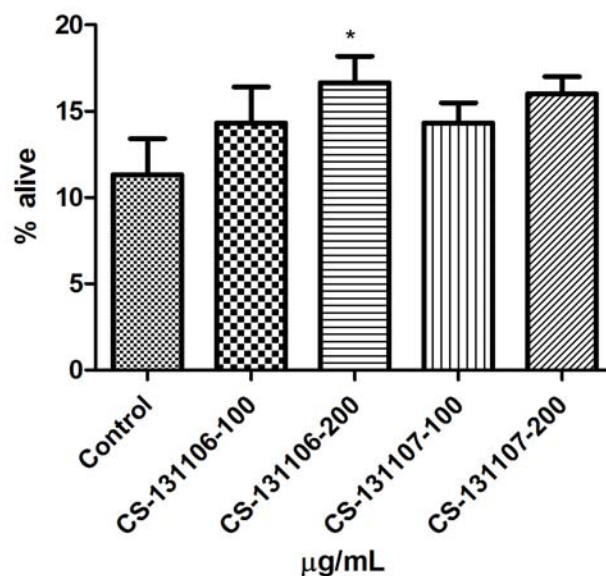


Fig. 1. Effect of CS-131106 on thermal stress in *C. elegans*



그림 lifespan assay of *C. elegans*

### 3. Oxidative stress 저항성 실험

*C. elegans* 는 노화에 따라 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 관련 ROS level이 증가되는 경향이 있음이 알려져 있다. 약물투여군의 산화적스트레스 저항성과 노화억제와의 관련성을 밝히기 위해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에서의 생존력 실험을 실시하였다. Synchronized L1 stage의 예쁜 꼬마선충 100마리 정도를 NGM agar plate 옮겨서 65시간 동안 배양하여 L4 stage Larvae가 되도록 하였다. Synchronized L4 stage의 선충을 10-15마리 씩 10 mM paraquat (NN-dimethyl440-bipyridinium dichloride, Sigma, Germany)와 약물 100-, 200ug/mL이 처리된 배지로 옮겨 배양하였다. Reproductive 기간 동안에 매일 10 mM paraquat (NN-dimethyl440-bipyridinium dichloride, Sigma, Germany)와 약물이 처리된 새로운 배지로 옮겨주고 72시간 후에 죽은 꼬마선충의 수를 세어 대조군과 비교하였다. 그 결과 CS-131106의 200ug/mL 처리군이 대조군에 비해 12.3% 생존율이 높아 산화적 스트레스저항성에 유의적(t=4.148) 활성이 관찰되었다.

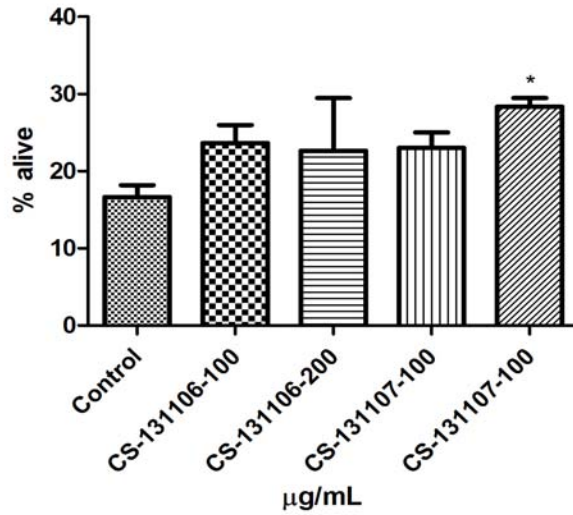


Fig. 2. Effect of fermentative zjf on oxidative stress in *C. elegans*

## II. 실 적(위탁과제)

### 1. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2012)	(위탁) 식물성바이오플라본의 세포내 활성 검증	전통발효법과 생물전환반응을 이용한 선도물질 생산 및 활성검정	100	전통발효법과 생물전환반응을 이용한 선도물질 생산 및 항노화, 항산화 및 항염 효과 검증
		장수유전자 활성화 검색 및 활성검증	100	장수유전자 활성화 검색 및 활성검증 (피부세포활성, 장수유전자)
2차 년도 (2013)	(위탁) 식물성바이오플라본의 세포내 활성 검증	선도물질 분석기준결정	100	천연한약제유래 신기능화장품소재 선별 선별된 신소재의 분석법확립
		피부세포 항노화 작용기전 연구 (세포활성과 장수유전자와의 상호작용연구)	100	식물성 바이오플라본 세포내 작용기전 연구
		동물모델을 이용한 in vivo 비임상 실험	90	동물모델을 이용한 선도물질의 활성평가 피부보습 및 인체 유효성 검증

### 2. 연구범위 및 연구수행 방법

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
전통발효법과 생물전환반응을 이용한 선도물질생산 및 활성검정 (1차년도)	전통발효법을 통해 약용버섯액체배양과 생물전환반응을 통해 화장품소재 선도물질 생산 및 활성검증	약용버섯액체배양을 통해 천연한약재를 기질로 이용하여 화장품소재로 이용이 가능한 선도물질(리퀴리티제닌)생산, 분리하여 활성을 검증함
장수유전자 활성자 검색 및 활성검증 (1차년도)	항노화활성과 관련하여 장수유전자 활성자(activator)를 선별하고, 활성을 검증함	장수유전자(SIRT1)을 활성화시키는 활성자(activator)를 천연한약재로부터 선별하여 활성을 검증함
선도물질 분석기준결정 (2차년도)	전통발효법을 통해 약용버섯액체배양과 생물전환반응을 통해 화장품소재 선도물질 생산 및 항노화, 항산화 및 항염 효과 활성검증	약용버섯액체배양을 통해 천연한약재를 기질로 이용하여 화장품소재로 이용이 가능한 선도물질(리퀴리티제닌) 생산 및 분리하여 생리활성을 검증함
피부세포 항노화 작용기전 연구 (세포활성과 장수유전자와의 상호작용연구) (2차년도)	장수유전자(SIRT1)을 활성화시키는 활성자(activator)를 천연한약재로부터 선별하여 활성을 검증함	선별된 장수유전자 활성자(activator)를 직접 각질형성세포주에 처리하여, 세포독성 및 SIRT1 발현 정도를 검증함



### 3. 세부연구수행 결과(자유기술)

-생리활성이 우수하고 인체적용이 가능한 화학적 안정성이 검증된 식물성 플라보노이드 신소재를 개발하기 위하여 전통발효법과 생물전환반응기술을 이용하여 약용버섯액체배양을 통해 화장품신소재로 사용이 가능한 선도물질을 탐색함. 구체적으로는 리퀴리틴으로부터 생물전환반응을 통해 비배당체형태인 리퀴리티제닌을 약 67%가까운 전환율로 생산이 가능하였고, TLC방법을 이용하여 부분정제를 수행하였음. 또한, 정제한 리퀴리티제닌을 이용하여 장수유전자 활성을 검증한 결과 대조군에 비하여 유전자활성을 증가시키는 결과를 확인하였음. 이 연구결과를 SCI 논문인 Molecules에 투고하였음.

-약 124개 천연한약재 라이브리리로부터 장수유전자 활성을 증가시킬수 있는 10개의 선도물질을 선별하였음. 또한, 최적농도를 검증하기위하여 농도별 장수유전자활성을 검증한 결과 대부분 약 200 mg/mL농도에서 최상의 장수유전자활성이 증가됨을 확인하였음.

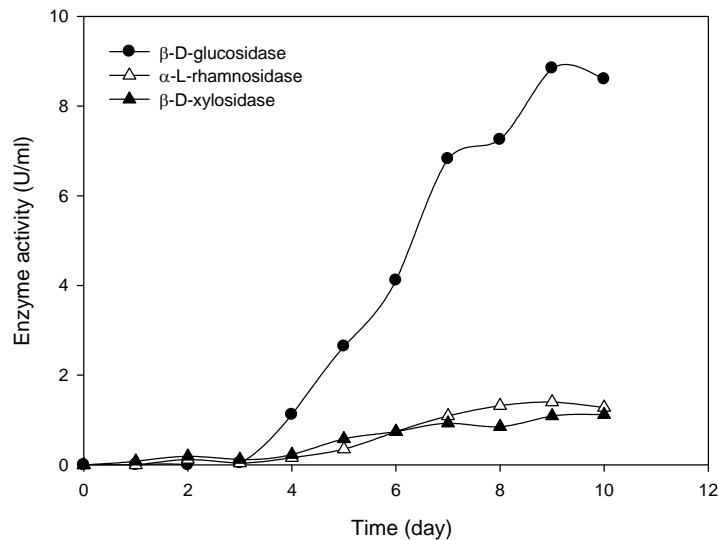
-선별된 10개의 선도물질을 이용하여 화장품소재 개발을 위해, 항산화 효과를 비롯하여 항염 효과, 세포독성 및 SIRT1 발현 정도를 연구하였음. 그 결과 선별된 10개의 선도물질은 비교적 높은 항산화활성을 갖고 있었음을 확인하였음. 항염효과와 SIRT1 발현 정도에서는 유의한 차이는 없었으나, 대조군에 비해 활성이 증가됨을 확인하였음.

-결론적으로 본 연구과제 위탁과제의 1차년도 최종목표는 제주산 특용작물에 다량 함유되어 있는 식물성 배당체를 제주 전통발효기법과 주관기관에서 보유하고 있는 특허균주인 붉은덕다리버섯 균사체 배양기술을 접목하여 생리활성 및 생체흡수능이 우수한 비배당체의 생물전환 소재를 개발하는 것이다.

#### □ 1차년도 세부연구결과:

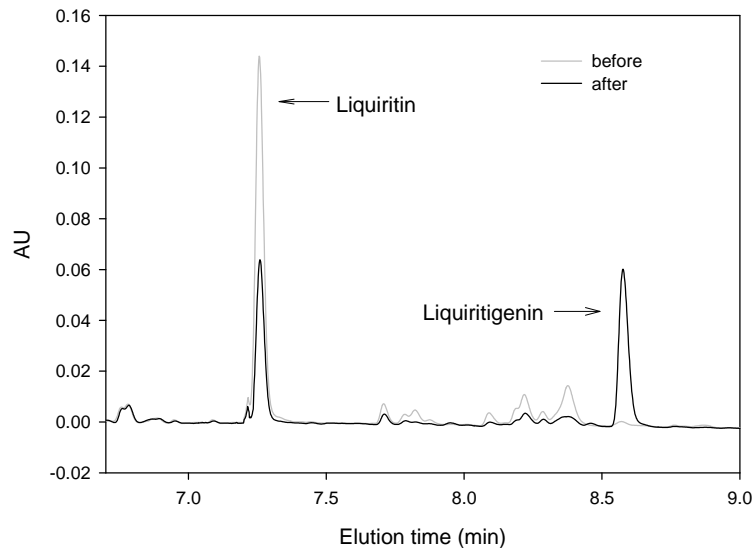
##### 1. 감초추출물을 이용한 붉은덕다리버섯 균사체 액체배양 방법을 통한 생물전환방법 연구 및 비배당체의 장수유전자 활성에 관한 연구

붉은덕다리버섯을 균사체 액체배양의 방법을 이용하여 삼각플라스크 내에서 기내 배양하여 배당체를 비배당체로 생물 전환하는 반응에 필요한 배당체 가수분해효소(glycosidases)들의 활성을 분석하였다.



<그림. 1. 붉은덕다리버섯의 균사체액체 배양기간에 따른 배당체 가수분해효소 (glycosidases)의 활성 비교>

그림 1에서 보여 주는바와 같이 대표적인 배당체 가수분해 효소 중 b-D-glucosidase의 활성이 a-D-rhamnosidase와 b-D-xylosidase의 효소 활성이 비해서 현격하게 높음을 알 수 있다. 배양 9 일째 b-glucosidase, a-rhamnosidase 와 b-xylosidase 의 활성이 각각 8.6, 1.28 과 1.12 U/mL로 나타났고, b-glucosidase의 활성이 a-rhamnosidase 와 b-xylosidase의 활성에 비해서 약 6.7배와 7.6배 높은 것으로 나타났다. 이를 통하여 붉은덕다리버섯을 이용한 생물전환법에서는 b-D-glucosidase가 중요 배당체 가수분해효소로 작용됨을 알 수 있다.



<그림 2. 붉은덕다리버섯의 균사체 액체배양을 이용한 비배당체(liquiritigenin) 생산에서 생물전환된 비배당체와 비전환된 배당체의 비교>

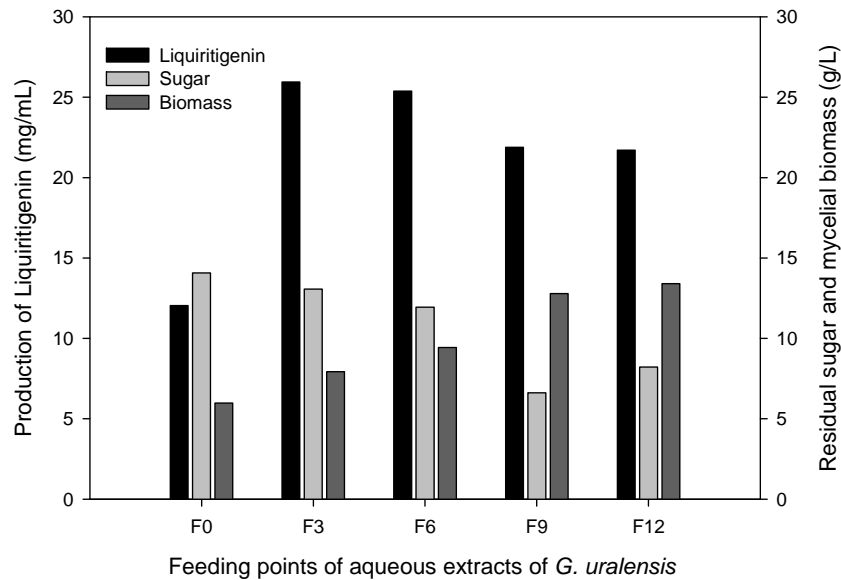
그림 2에서 보여주는 바와 같이 붉은덕다리버섯 균사체 액체배양법을 이용한 생물전환방법에 의해서 감초추출물에 포함된 배당체중 liquiritin 이 비배당체인 liquiritigenin으로 전환됨을 확인 할 수 있다. 10일간의 붉은덕다리버섯의 배양을 통하여 감초추출물내의 67.44%의 배당체인 liquiritin 이 당쇄 부분이 가수분해된 비배당체인 liquiritigenin으로 전환됨을 명확히 보여주고 있다. 그림 2에 나타난 liquiritin과 liquiritigenin의 크로마토그램은 표준물질로서 정선되었다.

<표 1 붉은덕다리버섯 균사체 액체 배양법을 통하여 감초 추출물 내에 함유된 liquiritin으로부터 liquiritigenin의 전환효율 비교>

	Relative conversion ratio (% ± SD)				
	pH 3.0	pH 4.0	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0
Liquiritigenin (%)	67.44 ± 8.22	57.98 ± 1.85	42.75 ± 1.63	39.37 ± 8.12	24.10 ± 3.45

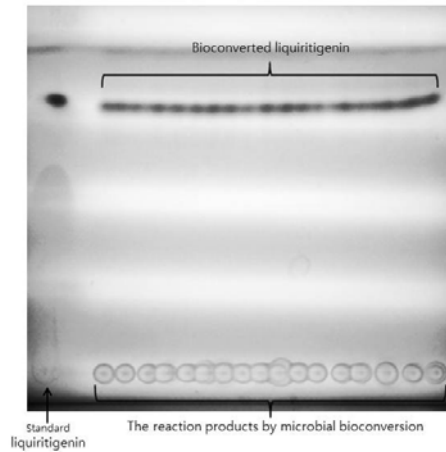
표 1은 최적화된 붉은덕다리버섯 균사체 액체배양에서 초기 pH에 따른 비배당체의 생물전환율에 관한 연구수행결과이다. 기존에 보고된 붉은덕다리버섯의 균사체와 세포외 다당체의

최적조건은 pH3과 4이다. 이를 토대로 pH3에서 pH10까지의 생육가능한 모든 pH영역에서 붉은덕다리버섯에 의한 생물전환효율을 연구한 결과 pH3에서 약 67%의 전환율을 보여주었고, pH8이상에서는 균사체생육에 저해효과가 나타남은 물론 전환효율도 미미하였다(결과생략). 이로써 붉은덕다리버섯을 이용한 감초추출물내의 비배당체 전환방법은 pH3에서 수행할시 최대 전환율을 기대할 수 있음을 보여준다.



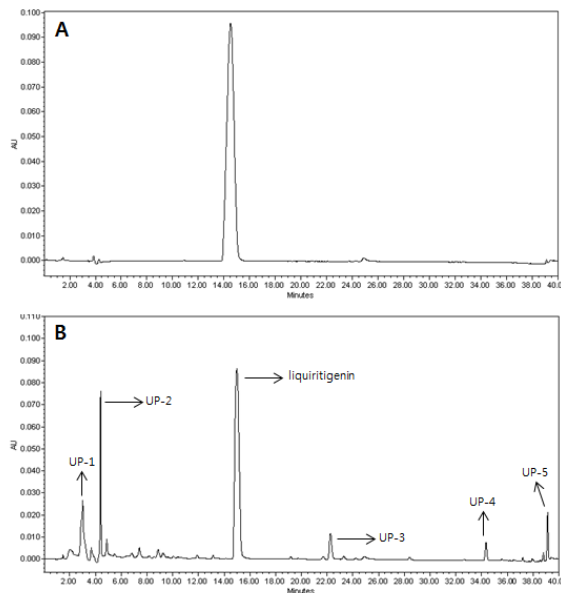
<그림 3. 붉은덕다리버섯의 전체 배양기간 중 감초 추출물의 접종 시기에 따른 비배당체 생산량 비교>

그림 3은 비배당체의 생산량을 최적화하기 위해서 붉은덕다리버섯의 전체 배양기간 중 감초추출물의 최적 첨가시기를 결정하기 위한 연구결과이다. 전체 13일의 배양기간 중 선행된 연구결과에서 보여주듯이 초기(0일), 대수증식기 초반(3일), 대수증식기(6일), 정체기(9일) 그리고 사멸기(12일)에 배당체의 원재료와 추가적인 탄소원으로서 감초추출물을 붉은덕다리버섯의 최적배지 기준 25%의 함량으로 첨가시켰으며, 총 13일의 배양기간이 종료된 후 생물 전환된 비배당체와 잔여 탄소원 그리고 균사체를 분석하였다. 그 결과 대수증식기 초반에 감초추출물을 첨가한 시점이 비배당체의 가장 높은 생산량을 보여주었다.



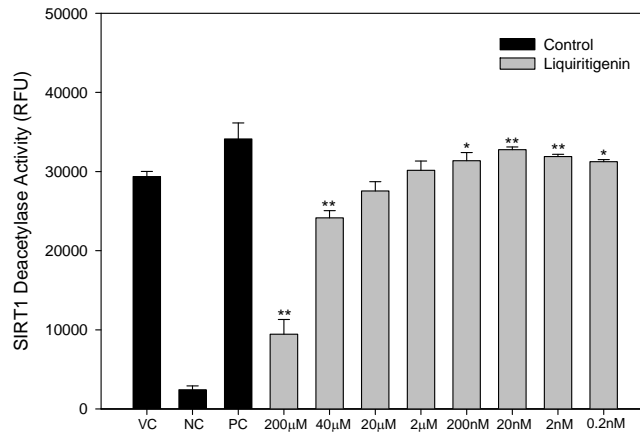
<그림 4. Silica gel thin layer chromatograph (TLC) 방법을 이용하여 생물 전환 된 liquiritigenin의 부분정제>

그림 4는 붉은덕다리버섯의 균사체 액체배양을 이용한 생물전환반응 후 생산된 비배당체를 Silica gel thin layer chromatograph (TLC) 방법을 이용하여 부분 정제한 결과이다. 표준물질과 비교하여서 동일한 Rf값(0.87, 결과생략)을 보여준다. 분리된 비배당체는 TLC plate에서 회수하여 메탄올로 용출하였고, 다시 회수한 후 장수유전자로 잘 알려진 sirtuins 활성을 연구하였다. Sirtuins은 노화를 억제하는 「NAD 의존성 탈아세틸라제」로서 다양한 대사작용과 스트레스반응에 관여하여 노화를 방지한다고 알려져 있다.



<그림 5. silica gel TLC plate상에서 회수된 부분정제 시료의 크로마토그램>  
(A: 표준물질 크로마토그램, B: 부분정제 크로마토그램, UP:알 수 없는 크로마토그램)

그림 5는 silica gel TLC plate에서 회수된 비배당체의 순도를 확인하기 위하여 다시 HPLC를 이용하여 분석한 결과이다. 그림에서와 같이 메인 peak는 생물전환 된 liquiritigenin으로 나타났으며 약 54%의 순도를 나타내었다. 하지만 이 외에도 약 5개의 확인되지 않은 peak가 동일하게 나타났다. 이로써 TLC를 이용한 방법은 부분적으로 정제는 가능하지만 단일물질을 얻기 위한 방법으로는 적당치 않으며, 이를 위해서는 다른 정제방법을 이용하여 진행해야함을 확인함.



<그림. 6. 생물전환된 liquiritigenin의 SIRT1 탈아세틸화효소 활성>

그림 4와 같이 생물전환 된 liquiritigenin은 부분 정제되었고, 이 분획은 최종적으로 10% DMSO상에 녹여져 장수유전자로 알려진 SIRT1 효소활성에 관한 연구가 수행되었다. 회수된 비배당체는 200uM에서 0.2nM 까지 순차적으로 희석되었으며 그 결과는 그림 6에서 보여준다. 대조군과 비교해서 20nM의 농도까지 효소활성이 순차적으로 증가하였으며, 그 이후에는 감소함을 나타내었다. 20nM의 농도에서는 양성대조군으로 알려진 Isoliquiritigenin보다 활성이 더 높게 나타났다.

## 2. 제주산 누룩으로부터 미생물 분리 및 동정

제주산 누룩으로부터 비배당체 생물전환에 필요한 미생물과 beta-glucosidase 활성이 높은 균주를 확보하기 위하여 미생물 분리 동정 작업을 실시하였음. Yeast계열의 미생물 분리를 위해서 YPD (Yeast extract-Peptone-D-glucose) 배지, Lactobacillus 계열의 균주 분리를 위해서 MRS (deMan, Rogosa and Sharpe) 배지, Bacillus 계열의 균주 분리를 위해서 LB (Luria-Bertani media) 배지 그리고 Fungi 계열의 균주 분리를 위해서 MEA(Malt Extract Agar) 배지를 이용하여 균주를 분리하였다.

각각의 고체배지에  $10^{-1}$ 부터  $10^{-6}$ 까지의 배율로 희석한 누룩 현탁액 50ul를 접종하고 37°C에서 배양한 후 각 배지에서 자라는 미생물 군락을 3-4회에 걸쳐서 순양 배양한다. 순양배양이 완료된 각각의 균주는 액체배지에 접종하여 하루 동안 배양한 후 미생물분리 동정기관이 한국미생물보존센터에 분리동정을 의뢰하였다. 의뢰된 분리균주들은 미생물 분석 항목 중 API Kit를 이용하여 분리 동정하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

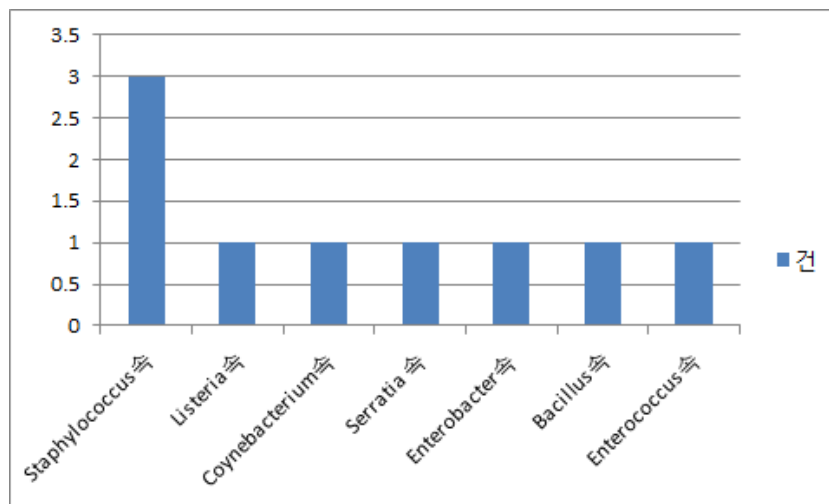
<표 2. 제주산 누룩으로부터 분리 동정된 균주들>

균주번호	동정결과	일치도
1	<i>Staphylococcus cohnii</i>	99.8%
2	<i>Staphylococcus xylous</i>	99.8%
3	<i>Corynebacterium accolens</i>	97.7%
4	<i>Serratia ficarla</i>	97.3%
5	<i>Staphylococcus xylous</i>	99.9%
6	<i>Bacillus licheniformis</i>	99.8%
7	<i>Enterobacter cloacae</i>	99.0%

제주산 누룩으로 분리된 균주를 액체배양한 후 상등액을 취하여서 생물전환반응에 필요한 효소활성을 측정하였다. 측정된 결과 모두 활성측정치 이하로 활성을 나타내기 불가능하였다.

제주산 전통누룩에서 분리동정한 미생물 분포는 다음과 같음.

API kit으로 분리동정한 결과 총 9종의 다양한 미생물균을 확인하였으며, Gram positive bacteria가 5종, Gram negative bacteria가 1종, 그 외 pathogen bacteria가 3종으로 동정됨. 구체적으로는, *Staphylococcus* 속이 3종으로 가장 많이 분리되었으며, *Listeria* 속이 1종, *Coynebacterium* 속이 1종, *Serratia* 속이 1종, *Enterobacter* 속이 1종, *Bacillus* 속이 1종, *Enterococcus* 속이 각각 1종이 동정되었음.



### 3. 지역특산 천연한약재를 대상으로 장수유전자 활성화자 (activator) 선별

국내산 천연한약재를 열수추출한 다음 각각의 농도에서 장수유전자 (SIRT1)효소의 활성을 증가시키는 가능성이 있는 선도물질을 발굴하는 실험을 진행하였음. 구체적으로는 약 124개의 열수추출물을 분획하여 확보한 다음 SIRT1 효소와 반응한 후 대조군(VC, PC)과 비교하여 흡광도가 증가하는 후보물질을 선별하였음. 표 2에 나타난바와 같이 기존에 장수유전자의 활성을 증가시키는 것으로 알려진 아이소리

퀴리틴을 PC대조군으로 비교하여 이 대조군에 비해 흡광도가 높게 나타나는 후보물질 9가지(23, 28, 29, 32, 40, 75, 96, 101, 105)를 선별하였음. 또한, 농도변화에 따라 장수유전자 활성변화를 관찰하기 위하여 EC수치를 측정한 결과 샘플 28, 29, 105의 경우 알려진 아이소리퀴리틴이 첨가됐을 때보다 월등한 활성증가를 나타내었다. 이 결과는 매우 고무적인 결과로서 향후 화장품신소재로의 응용이 가능할 것으로 기대함.

<표 2. 지역 천연한약재를 대상으로 SIRT1 deacetylase activator 검색결과>

SIRT1 deacetylase activity (RFU)								
샘플	Ave	± SD	샘플	Ave	± SD	샘플	Ave	± SD
<b>PC</b>	<b>51967</b>	<b>7469</b>	25	17826	2037	53	4637	403
NC	2261	212	26	42730	5616	54	41977	5663
<b>VC</b>	<b>42470</b>	<b>5541</b>	27	44814	6051	55	40752	5227
			<b>28</b>	<b>55499</b>	<b>7786</b>	56	31326	3851
1	33995	4091	<b>29</b>	<b>52970</b>	<b>7385</b>	57	39756	5310
2	32340	3965	30	44491	6053	58	32330	4225
4	43216	5440	<b>32</b>	<b>48357</b>	<b>6208</b>	59	34364	4616
5	41244	5275	34	42801	5706	60	34209	4634
6	44098	5813	35	33271	4123	61	34909	4507
7	43234	5669	38	29525	3738	62	25908	3060
8	35086	4423	39	41780	5383	63	32365	3973
9	3311	313	<b>40</b>	<b>48276</b>	<b>6867</b>	64	27588	3485
10	28037	3231	41	41367	5697	66	24132	3069
11	46921	5957	43	38773	5185	67	16587	2222
12	35144	4448	44	43732	5679	68	12217	1529
14	1494	148	45	44729	5929	69	26790	3531
15	44788	5901	47	37016	5009	70	44397	6332
16	46611	6459	48	46104	6427	71	18552	2401
17	42249	5868	49	43271	5797	72	32226	4317
18	2738	111	50	42744	6005	73	42104	5741
22	44624	5651	51	44549	6312	74	44215	6087
<b>23</b>	<b>49377</b>	<b>6353</b>	52	36858	4845	<b>75</b>	<b>47485</b>	<b>6302</b>

<표 2. 계속>

샘플	SIRT1 deacetylase activity (RFU)							
	Ave	± SD	샘플	Ave	± SD	샘플	Ave	± SD
76	38452	5337	93	36708	4951	109	35311	4864
77	36456	4863	94	37713	5067	110	27838	3609
78	35056	4798	95	40446	5825	111	18345	2547
79	46254	6411	<b>96</b>	<b>49128</b>	<b>6618</b>	112	38807	4995
80	42227	5766	97	44552	6346	113	32185	4182
81	46954	6756	98	35311	4893	114	26508	3401
82	31258	4110	99	45368	6261	115	16193	1944
83	33470	4192	100	44815	6122	116	20221	2513
84	35941	4844	<b>101</b>	<b>48143</b>	<b>6747</b>	117	16937	2115
85	46263	6459	102	45756	6190	118	19626	2328
86	39613	5635	103	40056	5719	119	7797	840
87	28808	3825	104	36518	4663	120	19185	2071
89	25781	3563	<b>105</b>	<b>52010</b>	<b>7501</b>	121	17487	2024
90	46166	6575	106	39884	5516	122	19776	2478
91	40157	5632	107	38261	5443	123	21061	2732
92	45548	5987	108	32628	4341	124	19876	2287



□ 2차년도 세부연구결과:

1. 지역특산 천연한약재를 대상으로 장수유전자 활성화자 (activator) 선별

국내산 천연한약재를 열수추출한 다음 각각의 농도에서 장수유전자(SIRT1) 효소의 활성을 증가시키는 가능성이 있는 선도물질을 발굴하는 실험을 진행하였다. 구체적으로는 약 124개의 열수추출물을 분획하여 확보한 다음 SIRT1 효소와 반응한 후 대조군(VC, PC)과 비교하여 흡광도가 증가하는 후보물질을 선별하였다. 표 1에 나타난 바와 같이 기존에 장수유전자의 활성을 증가시키는 것으로 알려진 아이소리퀴리틴을 PC대조군으로 비교하여 이 대조군에 비해 흡광도가 높게 나타나는 후보물질 10가지(11, 23, 28, 29, 32, 40, 75, 96, 101, 105)를 선별하였다. 선별된 10가지 후보 물질을 화장품신소재로의 응용하기 위해 항산화효과 및 세포독성 등의 연구 등을 진행하였다.

<표 1. 지역 천연한약재를 대상으로 SIRT1 deacetylase activator 선별>

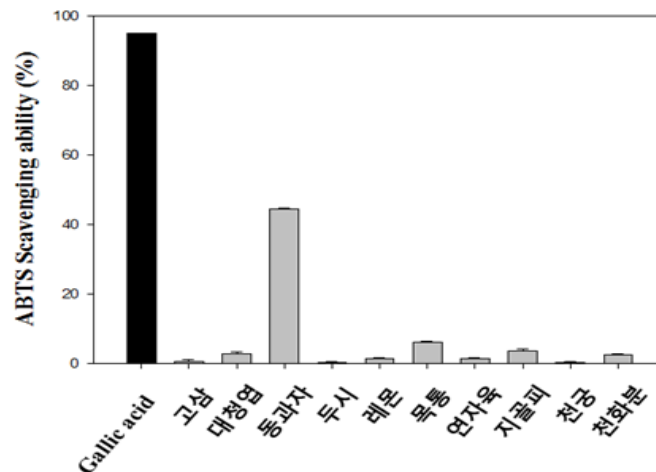
샘플	한글명	학 명	SIRT1 deacetylase activity (RFU)	
			Ave	± SD
PC	-	-	51,967	7,469
NC	-	-	2,261	212
VC	-	-	42,470	5,541
11	고삼	<i>Sophora flavescens</i> AIT.	46,921	5,957
23	대청엽	<i>Isatis tinctoria</i> L.	49,377	6,353
28	동과자	<i>Benincasa hispida</i> (THUNB.) COGN.	55,499	7,786
29	두시	<i>Glycine max</i> Merrill	52,970	7,385
32	레몬	<i>Citrus limon</i>	48,357	6,208
40	목통	<i>Akebia quinata</i> (THUNB.) DECNE.	48,276	6,867
75	연자육	<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertner	47,485	6,302
96	지골피	<i>Lycium chinense</i> MILL.	49,128	6,618
101	천궁	<i>Ligusticum chuanxiong</i> HORT.	48,143	6,747
105	천화분	<i>Trichosanthes kirilowii</i> MAXIM.	52,010	7,501

- RFU: relative fluorescence units,

- Positive control (PC) : Iso-liquiritigenin (50ug/mL), Negative control (NC) : Nicotinamide 3mM,

Vehicle control (VC), - All samples prepared at 200ug/ml concentration with DIW.

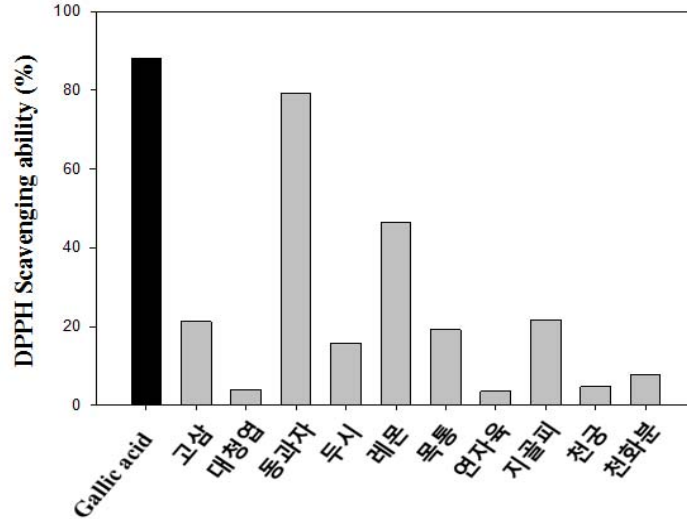
○ ABTS radical cation decolorization 확인



<그림 1. 선별된 한약재의 열수추출물을 이용한 ABTS 라디칼 소거 활성 비교>

선별된 한약재의 열수추출물을 이용한 항산화력을 측정하기 위해 ABTS radical cation decolorization 을 비교 측정한 결과, 그림 1과 같이 동과자가 약 50 %이상의 소거 활성을 가지는 것으로 나타났다.

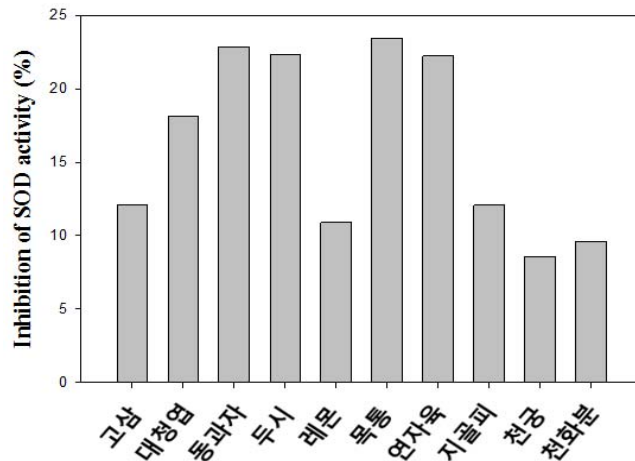
○ 전자공여능 확인



<그림 2. 선별된 한약재의 열수추출물을 이용한 DPPH 라디칼 소거 활성 비교>

전자 공여능 측정에 사용된 DPPH ( $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl)는 안정한 자유 라디칼로서 그것의 비공유전자로 인해 517 nm 부근에서 최대 흡광도를 나타내며 전자 또는 수소를 받으면 517 nm 부근에서 흡광도가 감소하며 각 추출물에서 이러한 라디칼을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 크면 높은 항산화 활성 및 활성 산소를 비롯한 다른 라디칼에 대한 소거 활성을 기대할 수 있으며 인체 내에서 활성 라디칼에 의한 노화를 억제하는 척도로도 이용할 수 있다. DPPH 라디칼 소거 활성 측정한 결과, 그림 2와 같이 동과자 열수추출물이 약 80%의 높은 DPPH 소거 활성을 가지는 것으로 나타났다.

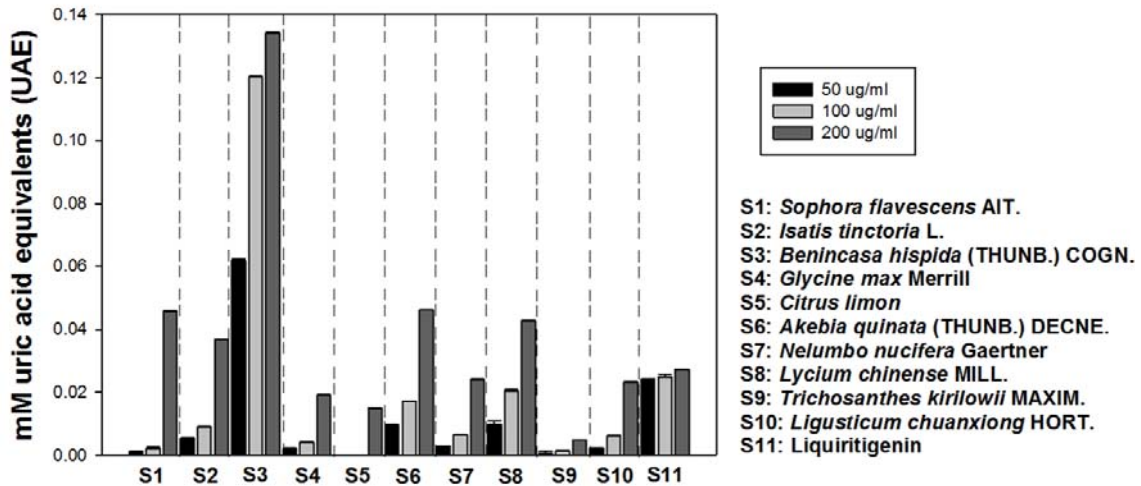
○ Superoxide dismutase (SOD) 저해 활성 검증



<그림 3. 선별된 한약재의 열수추출물을 이용한 SOD 저해 활성 비교>

Superoxide dismutase(SOD)는 항산화 효소로서 세포에 해로운 환원 산소종을 과산화수소로 전환시키는 반응을 촉매하는 효소이며, SOD에 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 peroxidase나 catalase 에 의하여 무해한 물분자와 산소분자로 전환되어 산소상해로부터 생체를 보호하는 기능으로 알려져 있다. 따라서 산화방지는 물론 노화억제와도 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있는 SOD 저해 활성 측정된 결과, 그림 3에서와 같이 동과자, 두시, 목통, 연자육 열수추출물의 SOD 저해 활성이 상대적으로 높은 것을 확인하였다.

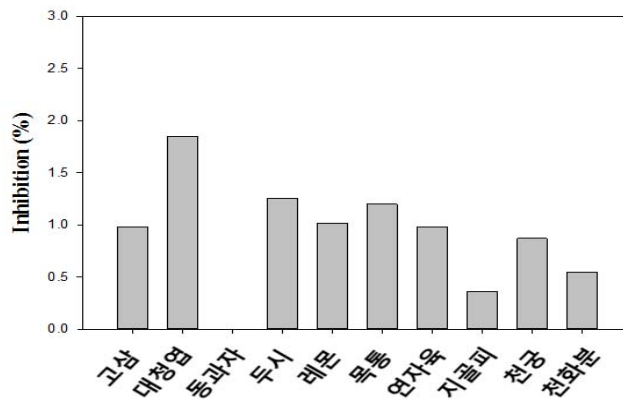
○ Total antioxidant capacity (TAC) 측정



<그림 4. 선별된 한약재의 열수추출물을 이용한 Total Antioxidant Capacity 비교.>

열수추출물의 TAC 활성은 uric acid를 표준시약으로 사용하여 mM uric acid equivalent로 나타내었다. 열수추출물의 농도가 증가함에 따라 TAC 활성이 증가하는 것으로 보이며, 특히 ABTS 라디칼 소거 능력과 전자공여능이 높았던 동과자의 경우 200ug/ml 농도에서 0.13mM uric acid와 동등한 항산화능으로 가장 높은 것으로 나타났다. 이 결과는 매우 고무적인 결과로서 향후 화장품신소재로의 응용이 가능할 것으로 기대된다.

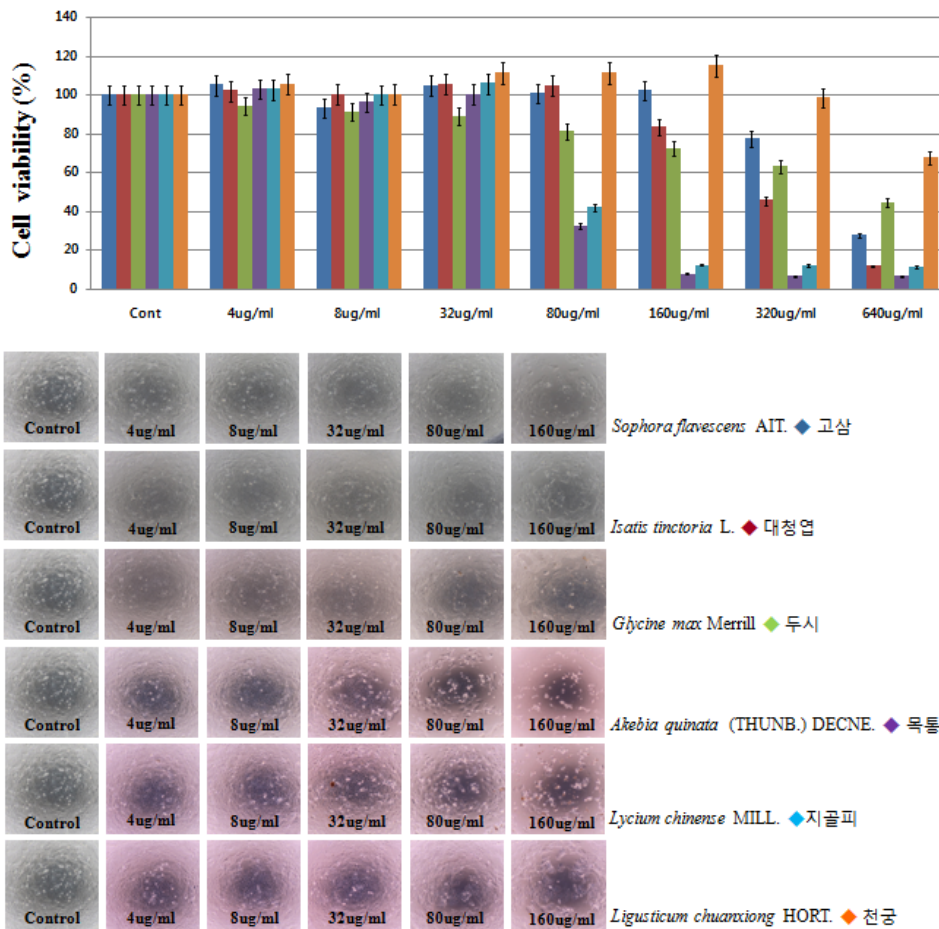
○ Lipoxygenase 효소 저해 활성 비교



<그림 5. 선별된 한약재의 열수추출물을 이용한 Lipoxygenase 효소 저해 활성 비교>

Lipoxygenase는 리놀산, 리놀렌산, 아라키돈산과 같이 분자 내에 1,4-cis,cis-pentadiene(1,4-pentadiene) 구조를 갖는 불포화 지방산에 분자상 산소를 첨가하여 1,3-cis, trans-diene 5-hydroperoxide를 생성하는 산화효소로 아라키돈산으로부터 각종 염증 및 알러지성 질환에 관여하는 로이코트리엔(leucotriene)생합성의 첫 번째 반응에 관여하는 효소이므로 Lipoxygenase 저해 활성을 측정하여 항염효과를 평가할 수 있다. 열수추출물의 항염효과를 알아보기 위해 Lipoxygenase 저해 활성 측정한 결과, 그림 5와 같이 상대적으로 대청엽의 열수추출물이 높은 비교적 Lipoxygenase 저해 활성을 보이지만, 다른 한약재 열수추출물과 유의한 차이는 보이지 않았다.

□ 세포 독성 연구

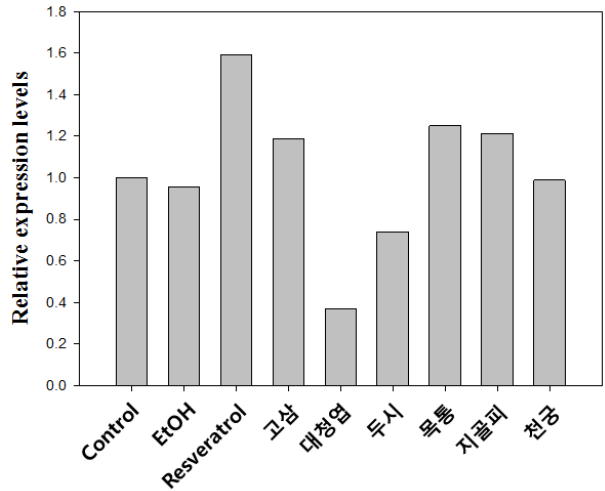


<그림 6. 열수추출물의 농도에 따른 세포의 생존능력 분석>

열수추출물이 세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 각질형성세포주 (Human keratinocyte HaCat cell line)를 96-well plate에 seeding한 후, 고삼, 대청엽 등의 6가지 열수추출물을 PBS에 20mg/ml이 되게 녹인 후 흡식멸균한 뒤 농도를 다르게 처리하여 세포의 생존능력을 확인하였다. 그림 6과 같이, 열수추출물을 4 - 640ug/ml을 처리하였을 때 세포 생존능력을 분석한 결과, 모든 추출물의 농도가 32ug/ml까지는 세포가 죽지 않고 살아 있는 것을 확인하였다. 80ug/ml 이상의 고농도에서 목통과 지골피 추출물의 경우 50% 이상 생존력이 감소하였으며, 그 외에 고삼, 대청엽, 두시, 천궁 추출물의 경우 320ug/ml까지 농도를 높여주었을 때 20-30% 정도 생존력이 감소하였다. 반면에, 천궁의 경우 가장 높은 농도인 640ug/ml인 경우 약 30%의 생존력이 감소하였고

세포의 성장에 많은 영향을 주지 않음을 확인하였다.

□ SIRT1의 유전자 발현



<그림 7. RT-PCR을 이용한 Sirt1의 발현 정도 비교>

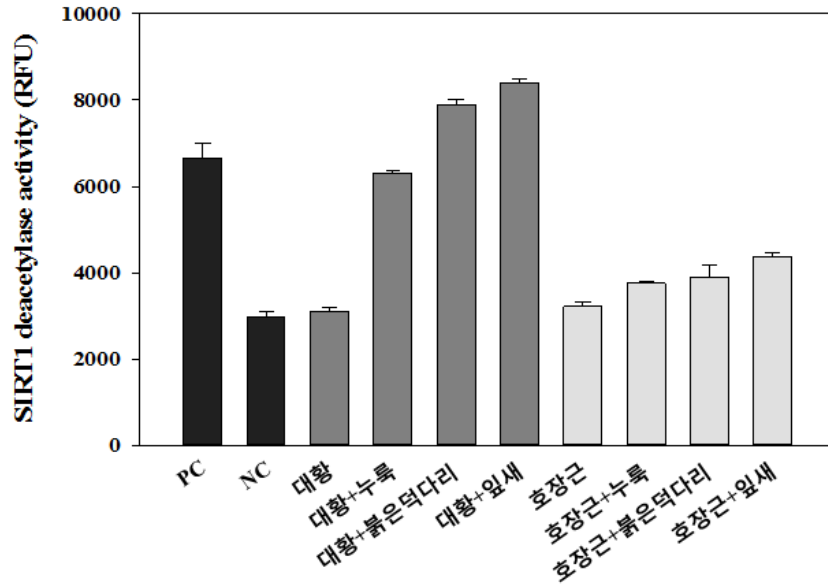
열수추출물을 80ug/ml 농도로 HaCat cell에 처리하여 RT-PCR을 통해 RNA를 분리하고 cDNA를 합성하여 SIRT1의 상대적인 발현 정도를 비교하였다. 고삼, 목통, 지골피, 천궁에서 control 보다 높은 발현을 나타내지만, SIRT를 활성화하는 Resveratrol과 발현 양상을 비교한 결과, 유의성이 나타나지 않았다.

2. 균사체 액체배양 방법을 통한 생물전환 방법 및 장수유전자 활성화에 관한 연구

대황과 호장근 열수추출물을 누룩, 잎새버섯, 붉은덕다리버섯 균사체 액체배양 방법을 통해 얻은 시료를 이용하여 장수유전자 (SIRT1)의 활성을 비교하였음. 시료는 아래 표 2와 같이 준비하였으며, 24시간 발효 후 110mm 와트 지로 감압 여과한 뒤 14,000xg에서 10분간 원심분리하여 상층액을 생리활성 검증에 이용하였다.

<표 2. 대황과 호장근 시료 제조방법>

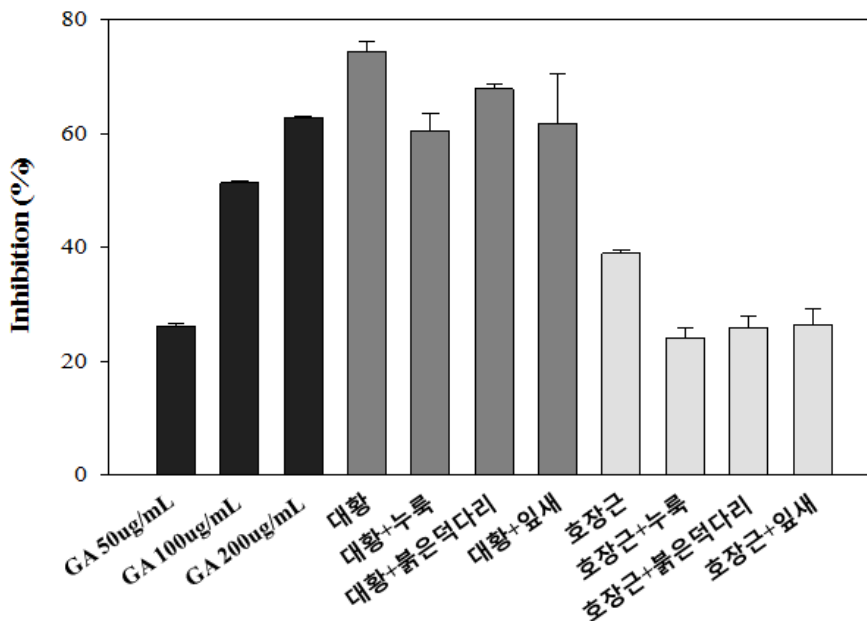
시 료 명	제 조 방 법
대황	대황을 열수 추출한 추출액
대황-누룩	대황 추출액에 누룩을 넣어 24시간 발효
대황-잎새버섯	대황-누룩-추출액에 잎새버섯을 넣어 24시간 발효
대황-붉은덕다리버섯	대황-누룩-추출액에 붉은덕다리버섯을 넣어 24시간 발효
호장근	호장근을 열수 추출한 추출액
호장근-누룩	호장근 추출액에 누룩을 넣어 24시간 발효
호장근-잎새버섯	호장근-누룩-추출액에 잎새버섯을 넣어 24시간 발효
호장근-붉은덕다리버섯	호장근-누룩-추출액에 붉은덕다리버섯을 넣어 24시간 발효



<그림 8. 대황 호장근 시료를 이용한 SIRT1 탈아세틸화효소 활성 비교>

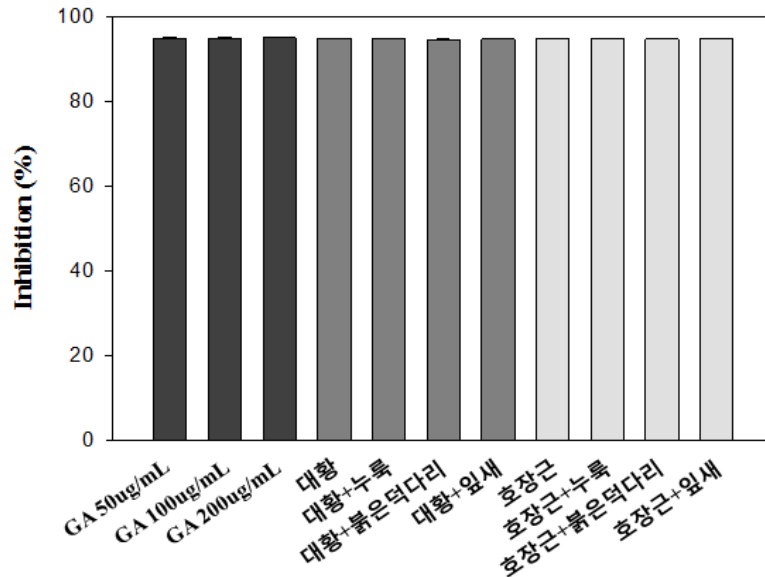
(RFU: relative fluorescence units, Positive control (PC) : Iso-liquiritigenin (50ug/mL), Negative control (NC) : Nicotinamide 3mM)

그림 8과 같이 장수 유전자 SIRT1 탈아세틸화효소 활성을 비교한 결과, 대황 추출액의 경우 호장근 추출액보다 상대적으로 높은 수치를 보였다. 또한 대황 추출액에 누룩, 붉은덕다리버섯, 잎새버섯을 넣어 24 시간 발효할 경우 Positive control보다 높은 SIRT1 탈아세틸화효소 활성을 나타내었다.



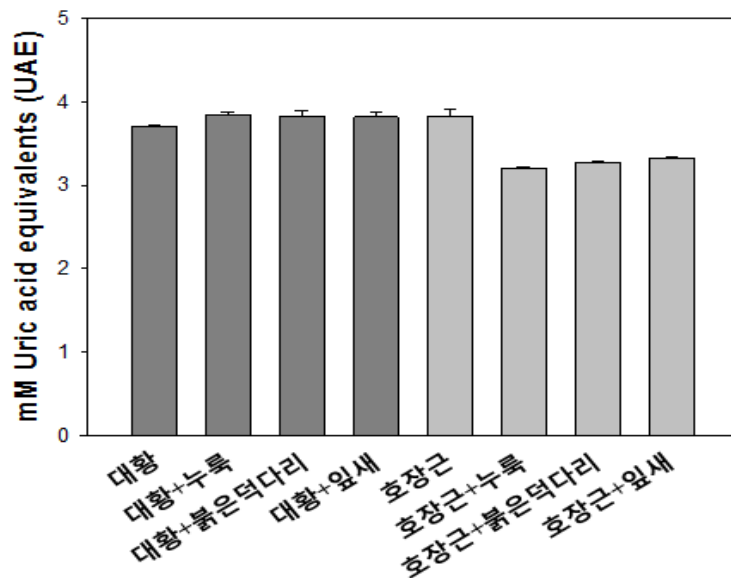
<그림 9. 대황 호장근 시료를 이용한 DPPH 라디칼 소거 활성 비교>

그림 9에서 보여주는 바와 같이 DPPH 소거 활성을 측정한 결과, 대황 추출액의 경우 control인 Galic acid (200ug/ml)보다 높은 활성을 보였으나, 대황 추출액에 누룩, 붉은덕다리버섯, 잎새버섯을 넣어 24 시간 발효할 경우 DPPH 소거 활성이 오히려 감소하는 것으로 나타났다. 호장근 추출액의 경우, 대황 추출액에 비해 전반적으로 낮은 활성을 나타내었다.



<그림 10. 대황 호장근 시료를 이용한 ABTS 라디칼 소거 활성 비교>

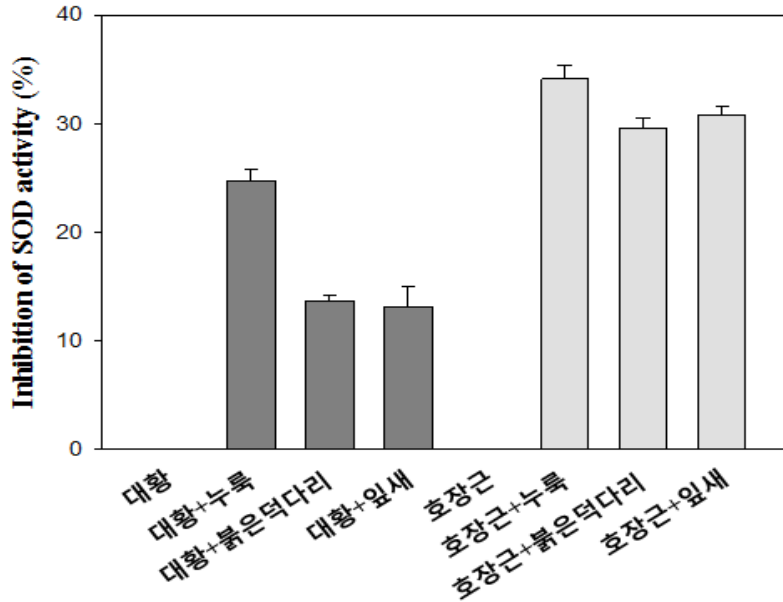
ABTS 소거 활성 측정한 결과, 대황 추출액과 호장근 추출액 모두 약 94% 이상의 ABTS 소거 활성을 가지는 것으로 나타났다. (그림 10)



<그림 11. 대황 호장근 시료를 이용한 Total Antioxidant Capacity 비교>

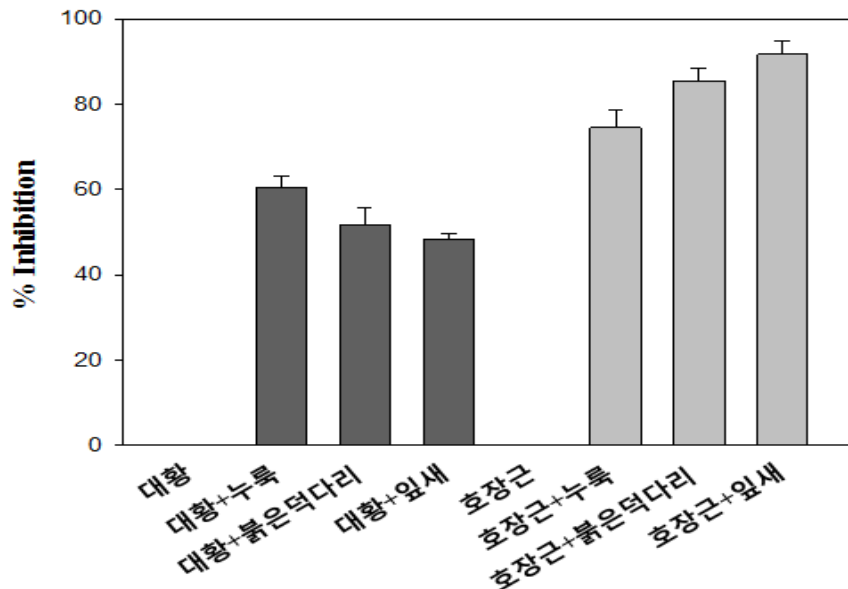
Total Antioxidant Capacity를 측정한 결과, 대황 추출액의 경우 호장근 추출액 sample 보다 비교적

높은 활성을 보였다 (그림 11). 대황 추출물의 경우, 누룩, 잎새버섯, 붉은덕다리버섯을 넣어 발효할 경우 활성이 높아지는 경향을 보였으나, 호장근 추출액의 경우는 누룩, 잎새버섯, 붉은덕다리버섯을 넣어 발효할 경우 오히려 활성이 감소하는 것으로 나타났다.



<그림 12. 대황 호장근 시료를 이용한 SOD 저해 활성 비교>

SOD 저해 활성을 측정된 결과, 대황 추출액의 경우 호장근추출액보다 상대적으로 낮은 수치를 보였다. 또한 그림 12에서와 같이 대황 또는 호장근추출액에 누룩, 잎새버섯, 붉은덕다리버섯을 넣어 24시간 발효할 경우 SOD 저해 활성이 감소되는 것으로 나타났다.



<그림 13. 대황 호장근 시료를 이용한 Lipoxxygenase 효소 저해 활성 비교>



5-Lipoxygenase 효소에 대한 저해활성을 직접 측정함으로써 피부손상의 염증관련 생합성의 저해 효과를 예측할 수 있다. 그 결과 그림 13과 같이, 대황의 경우 60%의 저해활성을 나타내었으며, 누룩, 잎새버섯, 붉은덕다리버섯을 넣어 발효할 경우 활성이 낮아지는 것으로 나타났다. 호장근의 경우, 누룩, 잎새버섯, 붉은덕다리버섯을 넣어 발효할 경우 Lipoxygenase 저해활성이 약 90%로 증가하는 것으로 관찰되었다.

### 3. 제주산 누룩으로부터 신규미생물 동정결과

#### ○동정방법

-한국중균협회부설 한국미생물보존센터에 샘플을 의뢰하여 ABI kit을 이용하여 제주산 누룩속에 포함되어 있는 신규 미생물(구체적으로, beta-glucosidase 생산이 가능한 균주)을 발굴하고 동정하고자 하였다.

-신규 beta-glucosidase를 생산하는 신규미생물이 동정될 경우 오메기술과 생물전환반응에 이용하여 수율과 반응율을 높여 본 연구과제에 응용하고자 하는 목적을 가지고 진행하였다.

-누룩샘플을 멸균수에 희석하여 젖산균, 바실러스, 곰팡이를 선별적으로 배양할 수 있는 agar plate를 제조하여 각 샘플을 도말한 후 incubator에서 배양한 후 single colony를 확보한 후 분석의뢰를 진행하였다. 분리된 균주는 총 9개였으며, 이 9개 균주로부터 single colony를 확보하여 분석을 진행하였다.

-분리균주의 동정은 BBL Crystal Identification kit(Becton, Dickinson and Co., USA)을 이용하여 생리적 특성을 검토하였으며, 16S rDNA 염기서열을 분석하여 결정하였다. 단일 콜로니로부터 이미 보고된 방법으로 DNA를 분리하고, 16S rDNA를 PCR 증폭하여 ABI TaqDye-Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit과 ABI Prism 3100 Genetic Analyzer(Applied Biosystems)를 이용하여 염기서열을 결정하였고, 얻어진 염기서열 결과는 CLUSTAL X, PHYLIP 3.57c, 및 NEIGHBOR program을 사용하여 phylogenetic tree를 완성하였다.

○동정결과

1) Staphylococcus cohnii ssp cohnii API Kit 분석결과

	Strain Name	NO.1
	API Kit	API Staph
분석항목		
1	0 (No substrate acidification)	-
2	D-Glucose (acidification)	+
3	D-Fructose (acidification)	+
4	D-Mannose (acidification)	+
5	Maltose (acidification)	+
6	Lactose (acidification)	-
7	D-Trehalose (acidification)	+
8	D-Mannitol (acidification)	+
9	Xylitol (acidification)	-
10	D-Melibiose (acidification)	-
11	Reduction of Nitrate to Nitrite	-
12	Alkaline Phospatase	+
13	Acetyl-methyl-carbinol production	+
14	Raffinose (acidification)	-
15	Xylose (acidification)	-
16	Sucrose (acidification)	-
17	$\alpha$ -methyl-D-glucoside (acidification)	-
18	N-acetyl-glucosamine (acidification)	-
19	Arginine Dihydrolase	-
20	Urease	-
21	Lysostaphin	-

2) Staphylococcus xylosus API Kit 분석결과

	Strain Name	NO.2
	API Kit	API Staph
분석항목		
1	0 (No substrate acidification)	-
2	D-Glucose (acidification)	+
3	D-Fructose (acidification)	+
4	D-Mannose (acidification)	+
5	Maltose (acidification)	+
6	Lactose (acidification)	-
7	D-Trehalose (acidification)	+
8	D-Mannitol (acidification)	+
9	Xylitol (acidification)	-
10	D-Melibiose (acidification)	-
11	Reduction of Nitrate to Nitrite	+
12	Alkaline Phospatase	+
13	Acetyl-methyl-carbinol production	+
14	Raffinose (acidification)	-
15	Xylose (acidification)	+
16	Sucrose (acidification)	+
17	$\alpha$ -methyl-D-glucoside (acidification)	-
18	N-acetyl-glucosamine (acidification)	+
19	Arginine Dihydrolase	-
20	Urease	+
21	Lysostaphin	-

3) *Corynebacterium accolens* API Kit 분석결과

	Strain Name	NO.3
	API Kit	API Staph
	분석항목	
1	Nitrate reduction	+
2	Pyrazinamidase	+
3	Pyrrolidonyl Arylamidase	-
4	Alkaline Phosphatase	-
5	beta Glucuronidase	-
6	beta Galactosidase	-
7	alpha Glucosidase	-
8	N-Acetyl-β Glucosaminidase	-
9	Esculin (β Glucosidase)	-
10	Urase	-
11	Gelatine (hydrolysis)	-
12	0 (control fermentation)	-
13	Glucose (fermentation)	+
14	Ribose (fermentation)	-
15	Xylose (fermentation)	-
16	Mannitol (fermentation)	+
17	Maltose (fermentation)	-
18	Lactose (fermentation)	-
19	Sucrose (fermentation)	-
20	Glycogen (fermentation)	-
21	Catalase	+

4) *Serratia ficaria* API Kit 분석결과

	Strain Name	NO.4
	API Kit	API 20E
	분석항목	
1	$\beta$ -galactosidase	+
2	Arginine dihydrolase	-
3	Lysine decarboxylase	-
4	Ornithine decarboxylase	-
5	Citrate utilization	+
6	H <sub>2</sub> S production	-
7	Urease	-
8	Tryptophane desaminase	-
9	Indole production	-
10	Acetoin production	+
11	Gelatinase	+
12	Glucose fermentation/oxidation	+
13	Mannitol fermentation/oxidation	+
14	Inositol fermentation/oxidation	+
15	Sorbitol fermentation/oxidation	+
16	Rhamnose fermentation/oxidation	+
17	Sucrose fermentation/oxidation	+
18	Melibiose fermentation/oxidation	+
19	Amygdalin fermentation/oxidation	+
20	Arabinose fermentation/oxidation	+
21	Cytochrome-oxidase	-

5) Staphylococcus xylosus API Kit 분석결과

	Strain Name	NO.5
	API Kit	API Staph
분석항목		
1	0 (No substrate acidification)	-
2	D-Glucose (acidification)	+
3	D-Fructose (acidification)	+
4	D-Mannose (acidification)	+
5	Maltose (acidification)	+
6	Lactose (acidification)	+
7	D-Trehalose (acidification)	+
8	D-Mannitol (acidification)	+
9	Xylitol (acidification)	-
10	D-Melibiose (acidification)	-
11	Reduction of Nitrate to Nitrite	+
12	Alkaline Phospatase	+
13	Acetyl-methyl-carbinol production	+
14	Raffinose (acidification)	-
15	Xylose (acidification)	+
16	Sucrose (acidification)	+
17	$\alpha$ -methyl-D-glucoside (acidification)	-
18	N-acetyl-glucosamine (acidification)	-
19	Arginine Dihydrolase	-
20	Urease	+
21	Lysostaphin	-

6) Bacillus licheniformis API Kit 분석결과

	Strain	NO.6			Strain	NO.6	
		API	CHB			API	CHB
0	Control	-		25	Esculine	+	
1	Glycerol	-		26	Salicine	+	
2	Erythritol	-		27	Cellobiose	+	
3	D-Arabinose	-		28	Maltose	+	
4	L-Arabinose	+		29	Lactose	-	
5	Ribose	+		30	Melibiose	-	
6	D-Xylose	-		31	Saccharose	+	
7	L-Xylose	-		32	Trehalose	+	
8	Adonitol	-		33	Inuline	+	
9	$\beta$ Methyl-xyloside	-		34	Melezitose	-	
10	Galactose	+		35	D-Raffinose	-	
11	D-Glucose	+		36	Amidon	-	
12	D-Fructose	+		37	Glycogene	+	
13	D-Mannose	+		38	Xylitol	-	
14	L-sorbose	-		39	$\beta$ Gentiobiose	-	
15	Rhamnose	-		40	D-Turanose	+	
16	Dulcitol	-		41	D-Lyxose	-	
17	Inositol	+		42	D-Tagatose	+	
18	Mannitol	+		43	D-Fucose	-	
19	Sorbitol	+		44	L-Fucose	-	
20	$\alpha$ Methyl-D-mannoside	-		45	D-Arabitol	-	
21	$\alpha$ Methyl-D-glucoside	+		46	L-Arabitol	-	
22	N Acetyl glucosamine	+		47	Gluconate	-	
23	Amygdaline	+		48	2 ceto-gluconate	-	
24	Arbutine	+		49	5 ceto-gluconate	-	

7) Enterobacter cloacae API Kit 분석결과

	Strain Name	NO.7
	API Kit	API 20E
	분석항목	
1	$\beta$ -galactosidase	+
2	Arginine dihydrolase	+
3	Lysine decarboxylase	+
4	Ornithine decarboxylase	+
5	Citrate utilization	+
6	H <sub>2</sub> S production	-
7	Urease	-
8	Tryptophane desaminase	-
9	Indole production	-
10	Acetoin production	+
11	Gelatinase	-
12	Glucose fermentation/oxidation	+
13	Mannitol fermentation/oxidation	+
14	Inositol fermentation/oxidation	-
15	Sorbitol fermentation/oxidation	+
16	Rhamnose fermentation/oxidation	+
17	Sucrose fermentation/oxidation	+
18	Melibiose fermentation/oxidation	+
19	Amygdalin fermentation/oxidation	+
20	Arabinose fermentation/oxidation	+
21	Cytochrome-oxidase	-



8) *Listeria grayi* API Kit 분석결과

	Strain Name	NO.8
	API Kit	API Coryne
	분석항목	
1	Nitrate reduction	+
2	Pyrazinamidase	-
3	Pyrrolidonyl Arylamidase	-
4	Alkaline Phosphatase	-
5	beta Glucuronidase	-
6	beta Galactosidase	-
7	alpha Glucosidase	-
8	N-Acetyl-β Glucosaminidase	-
9	Esculin (β Glucosidase)	+
10	Urase	-
11	Gelatine (hydrolysis)	-
12	0 (control fermentation)	-
13	Glucose (fermentation)	+
14	Ribose (fermentation)	+
15	Xylose (fermentation)	+
16	Mannitol (fermentation)	+
17	Maltose (fermentation)	+
18	Lactose (fermentation)	+
19	Sucrose (fermentation)	-
20	Glycogen (fermentation)	-
21	Catalase	+

9) Enterococcus faecium API Kit 분석결과

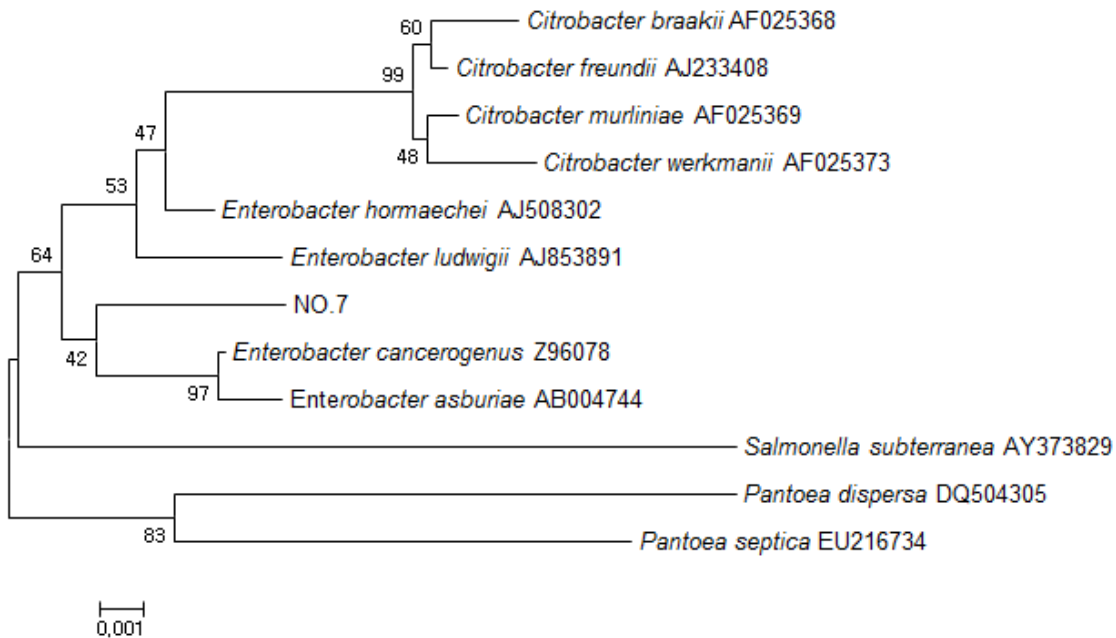
	Strain Name	NO.9
	API Kit	API Strep
분석항목		
1	Acetoin production	+
2	HIPpuric acid hydrolysis	-
3	Esculin hydrolysis( $\beta$ -glucosidase)	-
4	PYRrolidonyl Arylamidase	+
5	$\alpha$ -GALactosidase	+
6	$\beta$ -GIUcuRonidase	-
7	$\beta$ -GALactosidase	+
8	2-naphythyl phosphate	-
9	Leucine AminoPeptidase	+
10	Arginine DiHydrolase	+
11	ribose acidification	+
12	arabinose acidification	+
13	mannitol acidification	+
14	sorbitol acidification	-
15	lactose acidification	+
16	trehalose acidification	+
17	inulin acidification	-
18	raffinose acidification	-
19	starch acidification	-
20	glycogen acidification	-
21	$\beta$ -Hemolysis	-

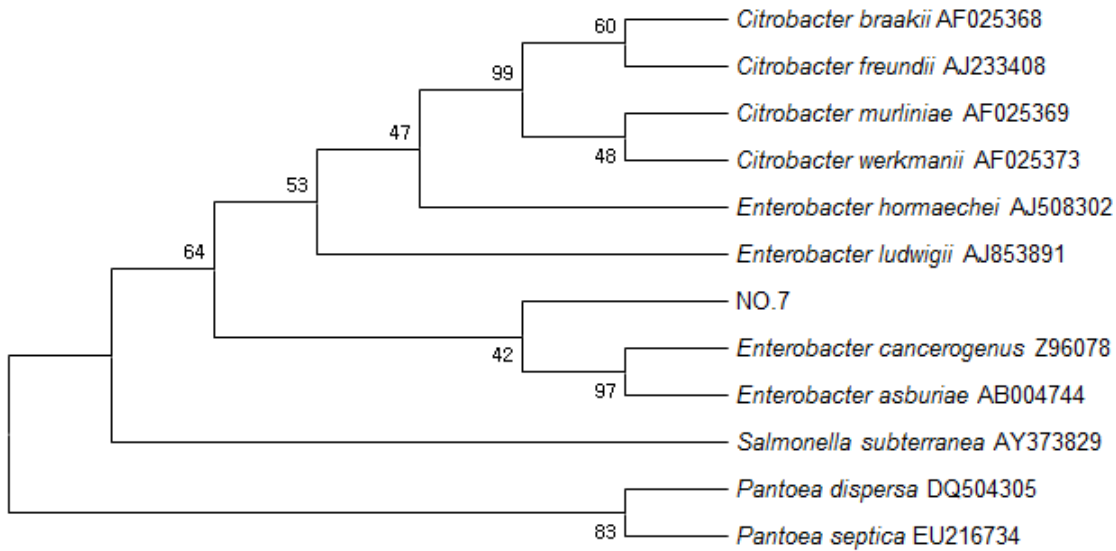
○분석결과

순번	동정결과	% ID
1	<i>Listeria grayi</i>	99.1
2	<i>Staphylococcus cohnii ssp cohnii</i>	99.8
3	<i>Staphylococcus xylosus</i>	99.8
4	<i>Coynebacterium accolens</i>	97.7
5	<i>Serratia ficaria</i>	97.3
6	<i>Staphylococcus xylosus</i>	99.9
7	<i>Enterobacter cloacae</i>	99.8
8	<i>Bacillus licheniformis</i>	99.0
9	<i>Enterococcus faecium</i>	99.0

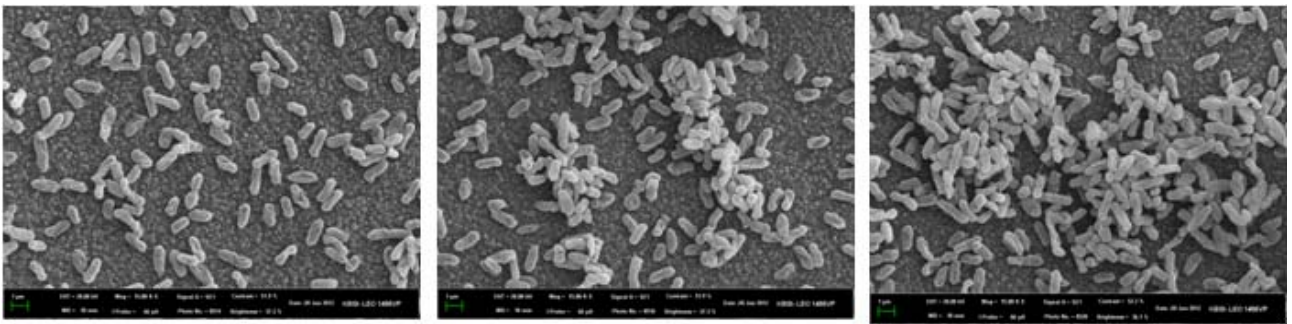
이중 *Enterobacter cloacae* (No.7)의 경우 기존 문헌조사에 의하면 beta-glucosidase 활성이 보고되어 총 9개의 균주중에 *Enterobacter cloacae*에 대해서 좀 더 구체적으로 형태학상의 특징조사를 위해서 phylogenetic tree를 통해 확인하였다.

1) Phylogenetic tree 결과





2) *Enterobacter cloacae*의 전자현미경사진



□ 결론

-생리활성이 우수하고 인체적용이 가능한 화학적 안정성이 검증된 식물성 플라보노이드 신소재를 개발하기 위하여 전통발효법과 생물전환반응기술을 이용하여 약용버섯액체배양을 통해 화장품신소재로 사용이 가능한 선도물질을 탐색함. 구체적으로는 리퀴리틴으로부터 생물전환반응을 통해 비배당체형 태인 리퀴리티제닌을 약 67%가까운 전환율로 생산이 가능하였고, TLC방법을 이용하여 부분정제를 수행하였음. 또한, 정제한 리퀴리티제닌을 이용하여 장수유전자 활성을 검증한 결과 대조군에 비하여 유전자활성을 증가시키는 결과를 확인하였음. 이 연구결과를 SCI 논문인 BMC Biotechnology에 투고 하였음.

-약 124개 천연한약재 라이브리로부터 장수유전자 활성을 증가시킬수 있는 선도물질을 선별하였음. 또한, 최적농도를 검증하기위하여 농도별 장수유전자활성을 검증한 결과 대부분 약 200 mg/mL농도에서 최상의 장수유전자활성이 증가됨을 확인하였음.

-결론적으로 본 연구과제 위탁과제의 1차년도 최종목표는 제주산 특용작물에 다량 함유되어 있는 식물성 배당체를 제주 전통발효기법과 주관기관에서 보유하고 있는 특허균주인 붉은덕다리버섯 균사체 배양기술을 접목하여 생리활성 및 생체흡수능이 우수한 비배당체의 생물전환 소재를 개발하는 것이다.

-제주산 누룩에서 신규미생물발굴을 통해서 생물전환반응에 이용하려는 목적을 가지고 동정 및 분석을 수행하였으나 동정된 *Enterobacter cloacae*는 신규미생물인 것으로 확인되었다.

-하지만, beta-glucosidase 생산을 위해서 배양최적화를 통해 생산여부를 확인하였으나 너무나 미비한 활성을 나타내었다. 또한, 미생물의 세포활성이 불안정한 특징을 가지고 있어 생물전환반응에 직접적으로 이용되기에는 여러 한계점이 있다.

-향후 확보한 총 9개의 신규 미생물로부터 효소활성능을 재확인하거나 배지최적화를 통해 신기능성 화장품소재개발에 이용될 수 있는 생물자원을 확보했다는 측면에서는 매우 의미가 있을 것으로 판단된다.

## 기존연구와의 차별성에 대한 고찰

본 연구과제는 제주의 청정지역에서 자란 특용작물을 이용하여 제주의 농민에게 새로운 부가가치를 창출하기 위한 과제로 예로부터 제주 민간요법으로 내려오는 쉰다리 누룩을 현대 과학적으로 균을 동정하고 쉰다리 발효를 통해 생물 전환시켰다. 쉰다리 누룩발효의 향노화효능 향상과 특허균주(붉은덕다리) 발효를 통해 보습(b-glucan)효능을 극대화시켜 다기능소재 개발이 가능해 졌으며, 124개의 천연물 약제 중 장수유전자의 활성여부를 확인하여 10개의 선도 물질을 개발하였다. 또한 화장품 분야에서 동물 시험법을 못함으로 인해 동물 대체 시험법이 필요한 시점에서 본 과제를 통해 *c.elegance*를 통한 열적, 산화적 스트레스를 통한 생명연장에 관한 시험법을 이용함으로써 새로운 평가법으로의 대안을 제시하였음.

# 용역 연구 결과 보고서

## 화장품 소재의 피부효능

- 피부 보습 효능 평가를 위한 인체 효력 시험

의뢰기관 : (주)코씨드바이오팜  
연구기관 : 광주여자 대학교  
임상시험 실시기관 : 광주여자 대학교 미용과학과  
연구기간 : 2013년 10월 01일 ~ 2013년 12월 31일  
시험기간 : 2013년 12월 01일 ~ 2013년 12월 15일  
시험책임자 : 윤 미 영

2013 년 12월 30일

# 목 차

연구결과 요약 .....	2
피부적용시험 계획서 요약 .....	3
<b>제 1장. 연구 내용 및 방법 .....</b>	<b>5</b>
1. 연구 배경 .....	5
2. 연구목적 .....	6
3. 연구대상자 .....	6
4. 피험자 설명문 및 동의서 .....	7
<b>제 2장. 피부적용 실험 방법 .....</b>	<b>8</b>
1. 피부측정 장비를 통한 기기적 평가 .....	8
1) 피부수분 보유효과 .....	8
2) 경피수분손실량(Transepidermal Water Loss, TEWL) .....	8
2. 통계분석 방법 .....	10
3. 실험 결과 보고서 작성 .....	10
<b>제 3장. 평가 결과 .....</b>	<b>11</b>
1. 기기적 평가 .....	11
1) 피부수분 함유량 변화 .....	11
2) 경피수분 손실량 (TEWL) 변화 .....	15
<b>제 4장. 결론 및 요약 .....</b>	<b>21</b>
<b>별첨 1. 피험자 동의서 .....</b>	<b>22</b>

# 제 출 문

(주)코씨드바이오팜에서 의뢰한 “화장품 소재의 피부효능”의 용역연구를 의뢰 받아, 광주여자대학교에서 임상시험 관리규정에 따라 성실히 연구를 수행하여 그 결과를 다음과 같이 보고합니다.

2013년 12월 30일

연구기관 : 광주여자대학교  
임상시험 실시기관 : 광주여자 대학교 미용과학과  
연구 책임자 : 윤 미 영 (인)



# 연구결과 요약

1. 제 품 명 : 화장품 소재 2종

(호장근 발효물, 대황 발효물)

2. 연구 기간 : 2013년 10월 01일 ~ 2013년 12월 31일

(시험 기간 : 2013년 12월 01일 ~ 2013년 12월 15일)

3. 임상연구 종류 : 수분함유량, TEWL(경피수분손실량), 피부탄력측정

4. 연구결과

피부적용실험을 통해 (주)코씨드바이오팜의 화장품 소재 2종이 100시간이상동안 피부수분보습을 유지하고, 경피수분 손실량을 감소시켜 지속적인 피부보습 유지에 효과가 있음을 확인하였다.

연구책임자 : 윤 미 영 (인)

## 피부적용시험 계획서 요약

제목	화장품 소재의 피부효능
시험 목적	화장품 소재의 피부수분 함유량, TEWL(경피수분손실량)의 평가를 통하여 고기능성 보습소재의 효능을 입증 함.
의뢰자	(주)코씨드바이오팜
임상시험 실시기관	광주여자대학교
연구 책임자	광주여자 대학교 미용과학과. 교수 윤미영
연구기간	2013년 10월 01일 ~ 2013년 12월 31일
시험디자인	단일기관, 무작위 배정, 비교제품 대조 인체효력시험 피험자가 자의로 인체효력시험 동의서에 서명하고 피험자 선정/제외기준에 적합하다고 평가되면, 등록된 순서에 따라 시험군과 대조군에 1:1로 무작위 배정된다.
피험자 수	총 10명 / 각 군당 10명 (시험군, 대조군)으로 아래의 제외기준에 부합되지 않은 피험자
인체효력시험용 제품	<input type="checkbox"/> 시험제품 : 화장품 소재 2종 (Sam-B: 호장근발효물, Sam-D: 대황발효물)
도포기간 및 사용방법	<input type="checkbox"/> 시험제품 : 피부의 일정 부위에 1회 도포 후, 30분 60분 120분 240분 360분 측정 후, 최초시간의 24시간 간격으로 100시간동안 측정
피험자의 선정기준	(대상피험자들은 다음의 기준에 적합하여야 한다) 1. 부분 또는 전신으로 피부질환이 없는 피험자 2. 본 임상시험에 대한 자세한 설명을 들은 후 자의로 참여를 결정하고 동의서에 서명한 피험자
피험자의 제외기준	(다음 어느 하나라도 해당되는 피험자는 본 연구에 참여할 수 없다) 1. 시험 부위에 건선(psoriasis), 습진(eczema)등과 기타 피부 병변 있는 경우 2. 감염성 피부질환이 있는 경우 3. 아토피성 피부를 가지고 있는 경우 4. 알레르기성 특이 체질이거나 과민증이 있는 경우 5. 최근 2개월 이내에 스킨 스케일링이나 피부 관리를 받은 경우 6. 최근 6개월 이내에 피부박피를 받은 경우 7. 화장품, 의약품, 일상적 일광노출에 자극이나 알러지가 있는 경우 8. 임신중이거나 수유중인 경우 9. 현저한 영양 장애자 및 약물이나 알코올 중독자 10. 인체시험 책임자의 판단으로 인체시험이 어렵다고 판단된 경우

# 피부적용 시험 결과 요약서

임상연구제목	화장품 소재의 평가 연구			
연구기관	광주여자 대학교	연구기간	2013년 10월 01일 ~ 2013년 12월 31일	
시험방법	시험기간	2013년 12월 01일 ~ 2013년 12월 15일	시험인원	10명
	사용방법	보 습 : 1회 국소 도포 경피수분손실량 : 1회 국소 도포	대조제품	없음
	세부시험 방법	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 연구종류 : 단일기관, 무작위 배정, 비교제품, 대조피부적용시험</li> <li>- 연구 시료 : 화장품 소재 2종 (Sam-B: 호장근발효물, Sam-D: 대황발효물)</li> <li>- 평가방법                             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 피부수분 함유량</li> <li>○ 경피수분 손실량(TEWL)</li> </ul> </li> </ul>		
시험결과	<p>피부적용실험을 통해 (주)코씨드바이오팜의 화장품 소재 2종을 피부에 도포하여 100시간 동안 측정한 결과, 상대적으로 대황추출물에서 지속적으로 피부수분 함유량을 유지시키고 경피수분 손실량을 감소시켜 피부보습 지속력에 효과가 있음을 확인하였다.</p>			
첨부자료	피험자 동의서			

# 제 1장. 연구 내용 및 방법

## 1. 연구의 배경

건강한 피부란 피부세포의 활동이 왕성하여 살결이 고운 피부, 촉촉한 피부, 윤기가 넘치는 피부 등으로 표현할 수 있다. 피부의 건강은 개인의 생활 습관에 큰 영향을 받기 때문에 적당한 운동과 영양섭취, 적절한 휴식 등으로 신체의 건강을 유지하는 건강 증진 행위 실천이 필요하다. 그러므로 피부의 건강을 유지하기 위해서는 인체에 해로운 요소들을 최소화하고 피부에 필요한 영양소들을 공급해 정상적인 피부 상태를 유지하는 것이 중요하다

피부의 가장 중요한 기능 중 하나는 피부장벽(skin barrier)기능이다. 피부는 표피, 진피, 피하지방층으로 나뉘며, 그 중 표피는 각화세포의 변형에 따라 피부 안쪽으로 부터 기저층(stratum basale, basal layer), 유극층(stratum spinosum, spinous layer), 과립층(stratum granulosum, granula layer), 투명층(shining layer), 각질층(stratum corneum)으로 나뉘고 외부환경과 직접 접촉되어 있어 물리적, 화학적, 생물학적 요인에 항상 노출되어 있다(김한식 등, 2007). 피부의 각질층은 피부의 최외각에서 외부환경으로부터 인체를 보호하고 수분 증발을 억제하는 장벽기능을 한다. 각질층의 주성분은 케라틴 단백질이 58%, 지질이 11%, 천연보습인자(NMF)가 38%를 차지한다. 각질층의 성분에는 세라마이드, 스쿠알렌, 콜레스테롤, 에스테르, 왁스에스테르, 중성지질, 자유지방산 등이 있으며, 이들은 각질세포 사이를 메워 외부물질로부터의 보호와 수분증발을 억제해주는 피부장벽을 형성하고 있다. 건강한 피부는 이러한 피부 장벽기능으로 인하여 외부의 자극으로부터 보호될 수 있고 일정한 수분을 유지할 수 있다. 표피의 수분함량은 기저층부터 과립층 하부까지 65~79%로 일정하고 과립층과 각질층의 경계 부위에서 40%로, 각질층의 상부로 가면 20~15%까지 감소한다. 이러한 각질층이 건강한 피부상태를 유지하기 위해서는 30%의 수분을 함유하고 있어야 한다. 만약 이러한 요소들의 균형이 깨지거나 결핍되면 건조한 피부가 유발된다,

건조피부의 사전적 의미로는 건성피부 단지 피부에 수분이 부족하거나 없는 상태를 지칭한다. 건조피부는 표피, 진피, 피하지방층을 포함한 피부 전체에 걸친 변화하기보다는 주로 표피의 상층부에 일어나는 변화로 알려져 있으며, 표피 상층부의 표피장벽의 역할을 하는 각질층에서 일어나는 변화가 건조피부의 중요한 원인으로 생각되고 있다.

건조피부 발생의 생화학적 측면에서는 피지, 세포간 지질, 각질 세포 내 천연 보습인자(NMF)의 소실과 그리고 교소체의 분해에 의한 각질 세포의 비 이상상적인 탈락이 중요한 요소이다. 이러한 정상 생화학적 과정에 장애가 발생하면 피부가 건조해진다. 이러한 피부건조는 노화뿐만 아니라 아토피 피부염, 어린선, 건피증, 만성 습진들을 일으키는 것으로 알려져 있다.

최근 화장품 연구에서는 건조한 피부를 개선하기 위한 보습제에 대한 연구가 많이 진행 되어

지고 있다.

과거 보습제는 단순한 피부의 수분 보충으로 이해되어 왔으나, 최근에는 피부의 가장 중요한 기능인 장벽 기능의 회복에 보다 관심이 집중되고 있다. 이상적인 보습제는 이런 기능적인 측면 외에도 미용적으로 우수하고 접촉성 피부염과 여드름의 악화 등과 같은 부작용이 없으며, 기능이 오래 지속되는 제제인데, 현재까지 이런 이상적인 보습제에 가장 근접한 것이 생리적 지질혼합물(physiologic lipid mixture)라고 할 수 있다.

본 연구에서는 (주)코씨드바이오팜으로부터 제공된 원료의 장벽기능 개선을 위한 인체효력 시험과 탄력 효능의 평가를 통하여 보습과 탄력에 대한 상관성을 검증하여 새로운 장벽기능 및 탄력기능 개선을 위한 다기능성 보습제를 개발하고자 수행하였다.

## 2. 연구목적

- 화장품 소재에 대한 피부 보습력을 측정 한다.
- 화장품 소재에 대한 경피수분손실량을 측정 한다.

## 3. 연구대상자

### - 피험자 선정기준

임상시험 관리기준 (good clinical practice, GCP)에 의거 이학적 검사상 피부에 어떠한 자극의 증상을 갖고 있지 않은 사람을 대상으로 실험내용 등에 대하여 충분히 설명하고 다음의 피험자는 선정에서 제외한다.

1. 시험 부위에 건선(psoriasis), 습진(eczema)등과 기타 피부 병변 있는 경우
2. 감염성 피부질환이 있는 경우
3. 아토피성 피부를 가지고 있는 경우
4. 알레르기성 특이 체질이거나 과민증이 있는 경우
5. 최근 2개월 이내에 스킨 스케일링이나 피부 관리를 받은 경우
6. 최근 6개월 이내에 피부박피를 받은 경우
7. 화장품, 의약품, 일상적 일광노출에 자극이나 알러지가 있는 경우
8. 임신중이거나 수유중인 경우
9. 현저한 영양 장애자 및 약물이나 알코올 중독자
10. 인체시험 책임자의 판단으로 인체시험이 어렵다고 판단된 경우

#### - 피험자 선정

20~30세 여성, 20명

[Table 1] Fitzpatrick skin type

Score	0	1	2	3	4
What is the colour of your eyes?	Light blue, Grey, Green	Blue, Grey or Green	Blue	Dark Brown	Brownish Black
What is the natural colour of your hair?	Sandy Red	Blond	Chestnut/Dark Blond	Dark Brown	Black
What is the colour of your skin (non exposed areas)?	Reddish	Very Pale	Pale with Beige tint	Light Brown	Dark Brown
Do you have freckles on unexposed areas?	Many	Several	Few	Incidental	none

#### 4. 피험자 설명문 및 동의서

본 연구에 사용한 피험자 동의 설명서와 동의서 양식은 다음과 같다.

[별첨 ] 피험자 동의서

## 제 2장. 피부적용 실험 방법

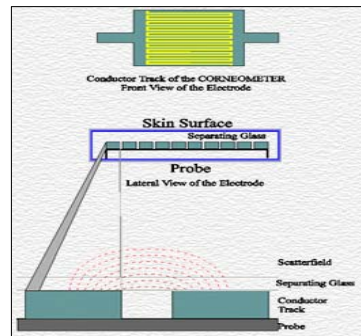
### 1. 피부측정 장비를 통한 기기적 평가

피부상태의 정확한 상태를 측정하기 위하여 항온항습시설이 갖추어진 광주여자대학교 미용연구소에서 피부 진단실에서 기기적 평가를 실시하였다. 항온항습조건은 실내온도 20~25℃, 실내습도 40~60%로 설정하였다.

연구대상자가 피부 진단실에 들어오면 30분간 안정을 취해 피부 표면의 온도와 습도를 측정 공간의 온도와 습도에 적응하게 하였고, 정확한 평가를 위해 수분 섭취를 제한하였다.

#### 1) 피부수분 보유효과

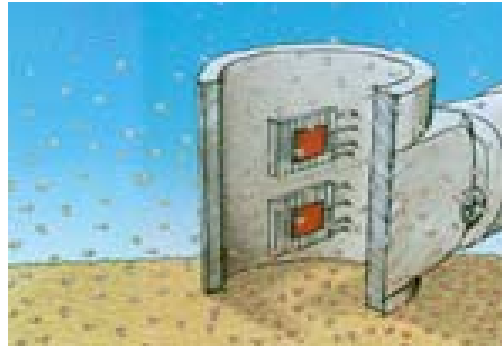
건강하고 탄력 있는 피부를 위해서는 각질층의 충분한 수분 함유가 요구되며, 또한 피부의 수분 증발을 억제하여 피부 내외의 충분한 수분을 보유하여야 한다. In vivo 평가 방법으로 제품 도포 시 수분 보유력을 평가하여야 한다. 수분량 측정기 사용기(Corneometer CM 825, Courage + Khazaka, Germany)를 이용하여 피부표면의 수분 함량을 정전부하용량 계측법(capacitance measurement)으로 측정하는 하는 방법으로, 제품을 도포한 후, 도포 30분 후, 60분, 120분, 240분, 360분, 측정후, 최초 측정시간 하루에 한번씩 4일간 측정하였다(96시간).



#### 2) 경피수분손실량(Transepidermal Water Loss, TEWL)

테이프를 이용하여 팔하박부 안쪽의 피부를 스트래핑 방법으로 피부의 각질을 인위적으로 제거한 후 경피수분손실량 측정기 Tewameter TM 210, Courage + Khazaka, Germany)를 이용하여 피부의 수분증발량을 평가하는 방법이다. 수분증발량의 평가는 시간당 단위면적에서 증발하는  $g/m^2/h$ 으로 표시된다. 피부측정 시간은 제품을 도포한 후, 도포 30분 후, 60분, 120분,

240분, 360분, 측정후, 최초 측정시간 하루에 한번씩 4일간 측정하였다(96시간).



### 3) 피부 탄력 임상시험

- 1) 피험자 : 20~50대 여성 20명
- 2) 측정 항목 및 기기 :
  - (1)피부 탄력 측정 : Cutometer SEM 575 - 눈가부위
  - (2)Facial Stage DM-3 촬영
  - (3)효능 설문 평가 결과
  - (4)안전성 평가 결과

#### 3) 실험 방법

20~50대 여성 20명을 대상으로 시험제품을 아침, 저녁 1일 2회 사용하도록 하였다. 기기측정시 미온수로 세안 후 항온항습실에서 20분 경과 후 측정하였다. 측정은 시험 전, 4주, 8주 경과 후 피부 탄력을 측정하였다. 4주, 8주 경과 후 피험자가 제품의 효능 및 안전성에 대한 설문에 응답하였다.

#### 4) 시험 제품

발효 호장근을 3% 함유 크림

## 2. 통계분석 방법

본 임상연구의 결과 정리 및 데이터 분석을 위하여 Excel program을 이용하였고, 통계 소프트웨어인 SPSS Window. version 18을 사용하여 통계적 분석을 하였으며, 통계의 유의성을 위하여 유의 수준 0.05를 설정하여 분석하였다.

## 3. 실험 결과 보고서 작성

모든 피부적용실험에 대한 결과는 도포와 무도포로 동시에 기준이 되는 원료나 제품과 비교 실험을 동시에 수행하며, 이 결과를 토대로 효능효과를 평가한다.

실험이 종료되면 측정 보고서 작성 후 실험 의뢰자에게 결과를 통보한다.



# 제 3장. 평가 결과

## 1. 기기적 평가

피부측정 장비를 통한 기기적 평가로 항온항습시설(실내온도 20~25℃, 실내습도 40~60%)이 갖추어진 피부진단실에서 피부의 객관적인 상태 변화를 알아보기 위하여 실험 부위에 약물을 도포한 후 시간별로 피부수분 함유량과 경피수분 손실량을 측정을 하였다.

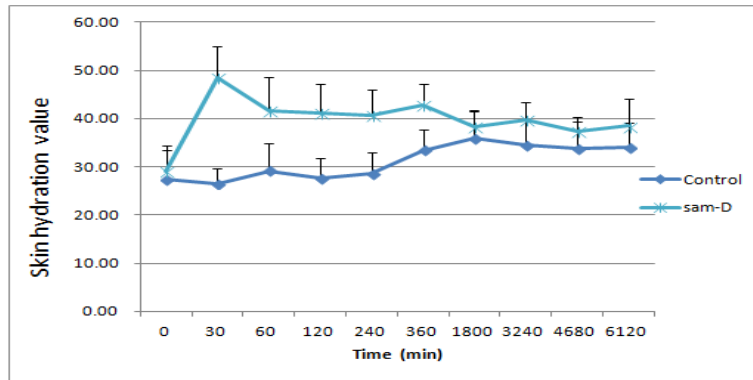
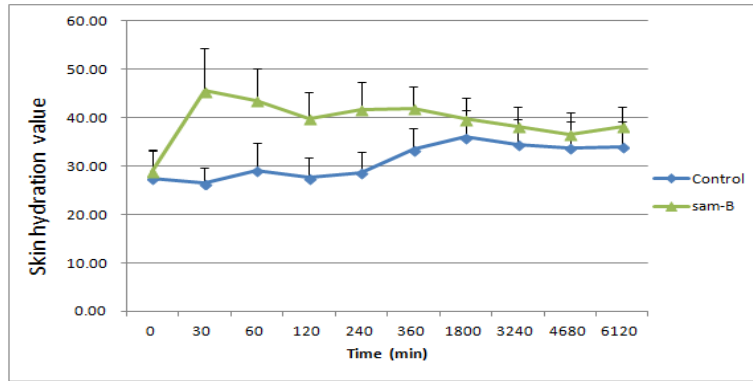
### 1) 피부수분 함유량 변화

건강한 피부를 위해서는 피부가 함유하고 있는 수분의 함량이 매우 중요하다. 특히 피부 병변이 있는 경우에는 피부염증 부위뿐만 아니라 환자의 병변이 없는 부위의 피부에서도 정상치보다 낮은 수분 함유량을 보이는 것으로 알려져 있다.

실험결과 도포한 후 30분이 지난 후에는 가장 수분함유량이 높게 나타내었고, 서서히 감소를 나타내었다. 또한, 상대적으로 다른 실험군에 비하여 sam-D에서 수분함유량이 대조군에 비하여 높게 나타내었다(Table 2, Fig. 1).

Table 2. Change of Skin Hydration

sample group (N=10)	Skin Hydration		
	Mean ± S.D		
/Time(min)	Control	sam-B	sam-D
0	27.43±5.9	28.8± 4.2	29.0± 5.3
30	26.4± 3.3	45.6± 8.8	48.4± 6.5
60	29.1± 5.6	43.6± 6.5	41.5± 7.0
120	27.6± 4.2	39.9± 5.4	41.1± 5.9
240	28.6±4.4	41.7± 5.7	40.7± 5.3
360	33.4± 4.2	41.9± 4.5	42.7± 4.5
1800	36.0± 5.5	39.7± 4.3	38.2± 3.5
3240	34.4± 5.2	38.3± 3.9	39.7± 3.6
4680	33.7± 5.5	36.6± 4.5	37.3± 2.9
6120	34.0±5.2	38.1± 4.0	38.4± 5.6

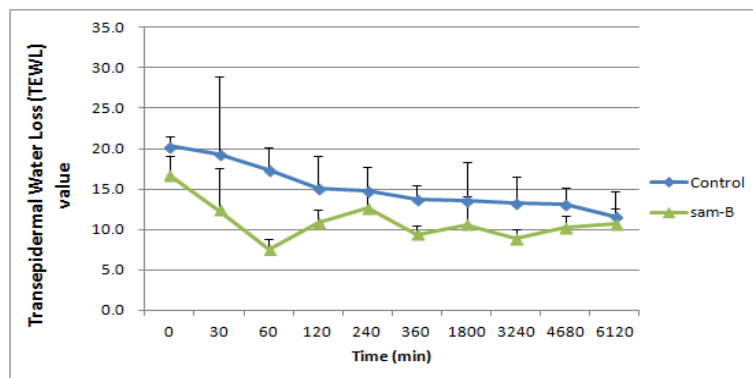


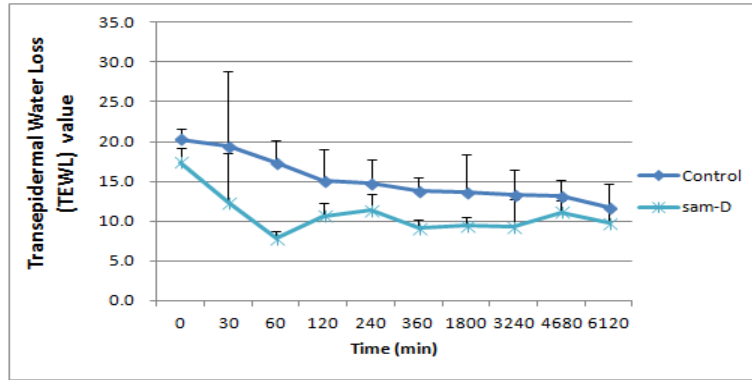
## 2) 경피수분 손실량 (TEWL) 변화

피부장벽의 기능은 수분의 함유량 뿐만 아니라 보유한 수분을 얼마나 잘 지키는지도 매우 중요한 문제로 피부가 함유한 수분을 외부에 빼앗기지 않고 얼마나 많이 함유하고 있는가 하는 개념에서 경피수분 손실량(TEWL)은 피부장벽의 기능을 측정하는 중요한 방법의 하나이다. 경피수분 손실량에서는 테이프를 이용하여 각질을 탈락시켜 인위적으로 수분손실을 극대화시킨 후, 제품을 도포하여 측정하였다. 실험결과 도포한 후 30분이 지난 후에는 가장 경피수분손실이 높게 나타났었고, 서서히 감소하였다. 또한, 상대적으로 다른 실험군에 비하여 sam-D에서 경피수분손실량이 대조군에 비하여 낮게 나타내었다(Table 3, Fig. 2).

Table 4. Change of Transepidermal Water Loss (TEWL)

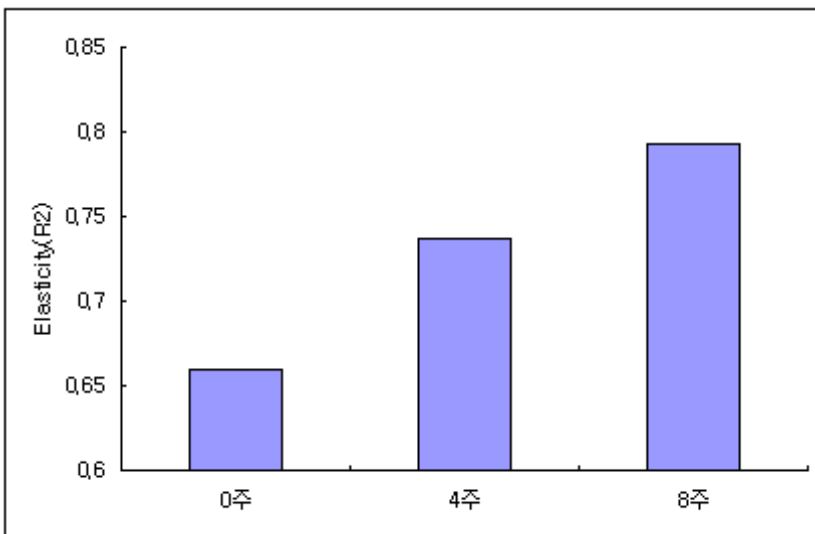
sample group (N=10)	Skin TEWL		
	Mean $\pm$ S.D		
/Time(min)	Control	sam-B	sam-D
0	20.3 $\pm$ 1.2	16.7 $\pm$ 2.4	17.4 $\pm$ 1.8
30	19.4 $\pm$ 9.4	12.3 $\pm$ 5.1	12.32 $\pm$ 6.1
60	17.4 $\pm$ 2.6	7.5 $\pm$ 1.3	7.7 $\pm$ 1.0
120	15.0 $\pm$ 4.0	10.8 $\pm$ 1.6	10.6 $\pm$ 1.6
240	14.8 $\pm$ 2.9	12.6 $\pm$ 2.3	11.3 $\pm$ 2.0
360	13.7 $\pm$ 1.7	9.4 $\pm$ 1.0	9.1 $\pm$ 1.0
1800	13.5 $\pm$ 4.7	10.6 $\pm$ 3.4	9.4 $\pm$ 1.0
3240	13.2 $\pm$ 3.2	8.8 $\pm$ 1.1	9.2 $\pm$ 3.5
4680	13.1 $\pm$ 2.1	10.2 $\pm$ 1.4	11.1 $\pm$ 1.4
6120	11.6 $\pm$ 3.1	10.7 $\pm$ 1.8	9.7 $\pm$ 1.9





### 3) 피부 탄력 증진 효과 (R2)

	평균	표준편차	증가율(%)	p-value
0D	0.6597	0.0717		
4W	0.7369	0.1094	11.8%	0.000
8W	0.7923	0.0808	20.2%	0.000
4W-0W	0.0778	0.0656		
8W-0W	0.1332	0.0657		



시험 크림을 1일 2회 8주간 사용한 후의 탄력을 측정한 결과 제품 사용전과 비교하여 4주, 8주 경과 후 유의한 효과를 확인할 수 있었다 ( $p < 0.05$ ).

## 2. 사용 크림 사용에 따른 설문 평가

### 1) 4주 경과 후 설문 평가 결과

	변화없음(0)	경미(1)	양호(2)	현저(3)	합계
1. 피부탄력개선	25.0	45.0	30.0	0.0	75.0%
응답자 수(명)	5	9	6	0	15/20명
2.피부 주름 개선	35.0	45.0	20.0	0.0	65.0%
응답자 수(명)	7	9	4	0	13/20명
3. 피부 밝아짐	30.0	30.0	40.0	0.0	70.0%
응답자 수(명)	6	6	8	0	14/20명
4. 피부 촉촉함	15.0	45.0	40.0	0.0	85.0%
응답자 수(명)	3	9	8	0	17/20명
5. 피부 매끄러움	20.0	35.0	40.0	5.0	80.0%
응답자 수(명)	4	7	8	1	16/20명

### 2) 8주 경과 후 설문 평가 결과

	변화없음(0)	경미(1)	양호(2)	현저(3)	합계
1. 피부탄력개선	15.0	30.0	50.0	5.0	85.0%
응답자 수(명)	3	6	10	1	17/20명
2. 피부주름개선	30.0	45.0	20.0	5.0	70.0%
응답자 수(명)	6	9	4	1	14/20명
3. 피부 밝아짐	20.0	35.0	40.0	5.0	80.0%
응답자 수(명)	4	7	8	1	16/20명
4. 피부 촉촉함	10.0	25.0	65.0	0.0	90.0%
응답자 수(명)	2	5	13	0	18/20명
5. 피부 매끄러움	10.0	35.0	55.0	0.0	90.0%
응답자 수(명)	2	7	11	0	18/20명

시험 크림을 1일 2회 8주간 사용한 결과 피부탄력 개선 85.0%, 피부 주름개선 70.0%, 피부 밝아짐 80.0%, 피부 촉촉함 90.0%, 피부 매끄러움 90.0%가 있다고 응답하였다.

## 제 4장. 결론 및 요약

1. 실험결과 도포한 후 30분이 지난 후에는 가장 수분함유량이 높게 나타내었고, 서서히 감소를 나타내었다. 또한, 상대적으로 다른 실험군에 비하여 sam-D에서 수분함유량이 대조군에 비하여 높게 나타내었다.
2. 실험결과 도포한 후 30분이 지난 후에는 가장 경피수분손실이 높게 나타내었고, 서서히 감소하였다. 또한, 상대적으로 다른 실험군에 비하여 sam-D에서 경피수분손실량이 대조군에 비하여 낮게 나타내었다.
3. 시험 크림을 1일 2회 8주간 사용한 후의 탄력을 측정한 결과 제품 사용전과 비교하여 4주, 8주 경과 후 유의한 효과를 확인할 수 있었다 ( $p < 0.05$ ). 또한 설문평가 결과 피부탄력 개선 85.0%, 피부 주름개선 70.0%, 피부 밝아짐 80.0%, 피부 촉촉함 90.0%, 피부 매끄러움 90.0%가 있다고 응답하였다.

(주) 코씨드 바이오팜에서 의뢰한 화장품 고기능성 보습소재 2종은 위와 같은 결과로 피부수분 함유량을 증가시키고 경피수분 손실을 감소시켜 피부보습에 효과가 있음을 확인하였다. 또한 피부탄력시험 결과 유의한 효과를 확인할 수 있었으며, 설문 평가 결과에서도 피험자들에게 유의한 효과를 확인할 수 있었다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### I. 실적

#### 1. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2011 ~2012)	제주 유래 신다리 및 오메기술 공법 을 응용한 제주산 특용작물의 화장품 소재 사업화 (주관)	제주산 특용작물 자원 선 별 및 확보	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>제주 자생 특용작물 및 한방생약재 검토</li> <li>- 후보물질: 삼백초, 대황, 호장근, 뽕나무, 감초, 진피 등</li> <li>•in vitro, 항산화 활성 및 염증완화 측정</li> <li>- DPPH/NBT assay, 5-LOX/COX-2 저해 평가</li> </ul>
		식물성 배당체 추출공정 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>•다양한 추출공법에 의한 추출물 획득</li> <li>- 열수추출/유기용매추출(온도, 시간별)</li> <li>- 초고압진공추출(ultra high pressure)</li> <li>•크로마토그래피법을 이용한 식물성 배당체(glycosides) 주성분 및 함량 측정</li> <li>- TLC, HPLC, Total sugar, flavonoid 함량</li> </ul>
		제주 신다리/오메기술 공 법 발효배양 공정 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>•발효균주 액체배양조건 확립</li> <li>- 붉은덕다리버섯, 잎새버섯 균사체</li> <li>•균사체 발효 동력학적 연구(rheology)</li> <li>•전통발효포제(신다리/오메기술) 공법을 접목한 약용버섯 균사체 발효조건 확립</li> </ul>
		Lab scale 수준의 발효 배양조건 확립 (5L, Bioreactor)	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>•발효균주 성장조건 확립</li> <li>- 배지(medium), 온도, pH, 회전력 등</li> <li>•발효기 성장 매개변수 확립</li> <li>- 온도, pH, 산소량, 회전력 등</li> <li>•발효균주 정지배양 조건 확인</li> </ul>
		바이오플라본의 확인시 험법 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>•HPLC 분석조건 확립</li> <li>- 컬럼, 용매조건, 검출조건 등</li> </ul>
	식물성바이오플라 본의 세포내 활성 검증(위탁)	선도물질의 효능효과 검증(항산화 및 MMP 저해능, 항염)	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>•전통발효법과 생물전환반응을 이용한 선도물질생산 및 활성검정</li> </ul>
		장수유전자 단백질 발현 실험(sirtuin1 발현 촉진)	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>•장수유전자 활성화자 검색 및 활성검증</li> </ul>

구분 (연도)	세부과제명	세부연구내용	달성도 (%)	연구범위
2차 년도 (2012 ~2013)	● 바이오플라본 소재의 주성분 동 정 및 규명(주관)	•유효 성분 분리 동정	100	컬럼을 이용한 유효 분획 동정
		•분획, NMR, Mass, IR	100	분획에 대한 기기 분석
	● 바이오플라본 대량생산 공정 확 립 및 제품화 개 발(주관)	•생물전환소재 최적 생 산조건 확립	100	특허버섯균사체 및 쉰다리 누룩 배양조건 확립
		•바이오플라본 대량생산 공정 확립 -Pilot 생산공정	100	쉰다리 발효시스템 확립(20L)
	● 바이오플라본 세포내 작용기전 연구(주관)	•피부 세포의 장수유전 자 활성화 기작 규명	100	각질형성세포에서의 장수유전자 확인 및 검증
		•피부 세포 활성화 검증 시스템개발 -섬유아세포, 케라티노 사이트	100	피부세포활성 평가 (0.5% growth 0%) 증식작용
	● 항노화(피부장 벽강화) 비임상 (임상) 효능 평가 (주관)	•피부 TEWL 개선 인체 효력 시험	100	피검자 20명, p,0.05 신뢰수준
		•피부 보습 및 탄력 인 체 유효성 측정	100	피검자 20명, p,0.05 신뢰수준
	● 선도물질 분석 기준결정(위탁)	•천연한약제유래 신기능 화장품소재선별	100	제주산 천연한약제로부터 장수유전자활성 활성자(activator)검색 및 검증법 확립
		•선별된 신소재의 분석 법확립	100	HPLC, GC 등을 이용하여 신기능화장품 소재의 분석법 확립
	● 동물모델을 이 용한 in vivo 비 임상 실험(위탁)	•식물성 바이오플라본 세포내 작용기전 연구	100	피부세포의 장수유전자(SIRT1) 활성기작규명
	● 피부세포 항노 화 작용기전 연구 (세포활성과 장수 유전자와의 상호 작용연구)(위탁)	•동물모델을 이용한 선 도물질의 활성평가	100	피부세포 활성화 검증법 개발
		•피부보습 및 인체 유효 성 검증	100	꼬마선충을 이용한 선도물질의 활성평가



## 2. 연구개발 목표 및 내용

### 2-1. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

#### (1) 최종목표

<b>최종 목표</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>□ 본 연구의 최종 목표는 제주 전통발효공법(신다리, 오메기술)과 첨단 발효공법(bioreactor)을 접목하여 제주 자생 특용작물 자원의 발효 신소재를 산업화하고 이를 이용한 피부를 보호하고 피부 세포활성과 세포 수면연장에 관여하는 장수유전자(sirtuin)를 활성의 과학적인 검증을 통하여, 안전하고 외부 자극으로부터 피부장벽을 강화하는 발효한방 신소재를 개발함으로써, 농산업의 소득 증대와 지역산업 경쟁력을 강화하는 것임.</li><li>□ 또한 생물전환(bioconversion) 기술을 이용하여 제주산 특용작물(삼백초, 대황, 호장근, 뽕나무) 자원으로부터 생산된 선도물질(resveratrol, fisetin, quercetin 등)은 피부 각질층에 풍부한 수분공급과 피부장벽을 보호하며, 제형화가 쉽고, 물리화학적으로 안정된 항노화 신소재를 제조하여 제품화하고자 함.</li><li>□ 선정된 고기능성 발효한방 신소재를 안정적이며 경제적인 대량 생산체계를 확립하여 피부장벽을 강화하는 고부가가치의 프리미엄 화장품 개발을 위한 소재를 제공하는 것임.</li><li>□ 안정적 전통발효공법의 기술체계 확립, 이로부터 얻어진 피부장벽을 보호하는 유효성분의 고농도 분획 공정, 기준 및 시험방법 확립과 안정적 공급을 위한 체제를 확립하는 것임.</li><li>□ 항산화 활성 및 염증완화 효능이 우수하고 사용성 및 화학적 안정성이 개선된 발효한방 신소재를 이용하여 피부 저자극성 및 세포수준에서의 항산화, 면역증강, 염증억제 등의 의학적 효능을 규명하여 소재의 다양한 기능을 검증하고, 피부 염증완화 개선 작용기전을 규명하여 제품화함으로써 국내 화장품 소재 개발 분야의 선도적 역할을 수행하는 것임.</li><li>□ 또한 개발된 식물성 바이오컨버전 플라보노이드 신소재를 이용하고, 피부 침투에 용이한 다양한 제형화 기술 및 함유된 유효성분의 안정성을 확보해 주는 encapsulation 등의 안정화 기술 그리고 경피 흡수 촉진 기술, 고보습 제형 기술 등을 응용한 화장품 신제형 개발에 제공하고자 함.</li><li>□ 확보된 고기능성 발효한방 신소재 적용 제제에 대한 <i>in vivo</i> 및 임상적 효능 검증을 하고자 함.</li></ul>
--------------	--

## (2) 연차별 주요내용

### ① 1차년도 주요내용

#### ▶ 1차년도 최종목표:

피부 안전성과 피부장벽 보호 효과가 우수한 생물전환 선도물질 발굴을 위해 제주산 특용작물 자원과 전통발효공법에 약용버섯 균사체배양기술이 접목된 최적 생산공정 시스템을 개발하는 것임.

- 제주 자생 특용작물 자원의 탐색 및 발굴
- 천연물 자원으로부터 다량의 식물성 배당체의 고효율 추출공정 최적화 기술개발
- Lab. scale 수준의 생물전환 최적 조건을 개발(윈다리/오메기술 공법 적용)
- 발효 기술로 생산된 식물성 바이오플라본 선도물질(butein, resveratol, fisetin, glycyrrhizin, liquiritin 등)에 대하여 다양한 크로마토그래피법을 이용한 고농도 분획공정을 확립하고, 과학적인 평가법과 KFDA 규격기준에 의거 피부장벽기능을 개선하는 발효한방 신소재를 개발
- 발효 기술 확립, 기능성 분획 및 고농도 분획 공정 개발, 개발된 식물성 바이오플라본 신소재의 규격기준을 확립
- 식물성 바이오플라본 소재 생산을 위한 약용버섯 균사체 최적화 배양 조건 및 유효물질의 생물전환(bioconversion) 기본 조건 탐색
- 생리활성이 우수하고 사용성 및 화학적 안정성이 개선된 식물성 플라보노이드 신소재를 이용하여 피부 안전성 및 세포수준에서의 세포활성, 항산화, 염증억제, 콜라겐 생합성 등의 의학적 효능을 규명
- 피부세포 수명연장에 관여하는 장수유전자(sirtuin, SIRT1) 활성 유도물질 선별 및 검증 시스템 확립
- 개발된 선도물질의 피부장벽을 강화하는 효과 이외에 보습, 탄력 등 다양한 효능효과를 탐색하고 평가

## ② 2차년도 주요내용

### ▶ 2차년도 최종목표:

1차년도에서 제주 전통발효공법(권다리/오메기술)으로부터 발굴된 식물성 바이오플라본 선도물질의 대량 생산 공정 확립과 피부학적 효능규명을 통하여 관련 산업분야에 적용하여 발효한방 신소재를 산업화하는 것임.

- 약용버섯 균사체 배양을 통한 식물성 바이오플라본 신소재의 산업적 대량 생산 및 분리 정제 공정을 개발하고자 함.
- 약물의 피부침투에 용이한 다양한 제형화 기술 및 함유된 유효성분의 안정성을 확보해주는 encapsulation 등의 안정화 기술 그리고 경피 흡수 촉진 기술, 고보습 제형 기술 등을 응용한 화장품 신제형을 개발에 적용하고자 함.
- 식물성 바이오플라본 신소재의 물성을 바탕으로 안정적이며 재현가능하게 생산할 수 있는 대량 생산 공정을 개발하고자 함.
- 발효 공정을 통해 생산된 고농도 분획(선도물질)에 대한 대량생산 체계를 구축하고 ICID에 등재하여 독자적 지위를 확보하고 이를 바탕으로 대한화장품협회 진성분 표시명에 등록 수재함.
- 피부에서 노화 현상 방어 기능을 확인하는 것으로, 화장품 형태로 제형화된 피부장벽 기능이 강화된 선도물질 함유 화장품을 인체를 이용한 기능성 시험을 이용하여 효력을 확인하고자 함.
- 제품화 이후 단계의 관리를 위하여, 유효성분 및 지표성분을 선정하고 이를 분석기기를 이용하여 화장품 내에서 정량적으로 확인하는 기준 및 시험방법을 확립하여 향후, 품질 관리 기준을 마련하고자 함.
- 식물성 바이오플라본 신소재의 세포생물학적인 피부장벽 작용 기전을 규명하고자 함.
- 개발된 시제품의 비임상 효능 평가를 통해 기능성 및 피부안전성을 확인하고자 함.

(3) 연차별 연구개발의 목표 및 내용

구분		목표	주요 연구개발 내용	
1차 년도	주관 기관	▶ 제주산 특용작물 자원 선별 및 확보	<ul style="list-style-type: none"> <li>•제주 자생 특용작물 및 한방생약재 검토</li> <li>-후보물질: 삼백초, 대황, 호장근, 뽕나무, 감초, 진피 등</li> <li>•in vitro, 항산화 활성 및 염증완화 측정</li> <li>-DPPH/NBT assay, 5-LOX/COX-2 저해 평가</li> </ul>	
		▶ 식물성 배당체 추출공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>•다양한 추출공법에 의한 추출물 획득</li> <li>-열수추출/유기용매추출(온도, 시간별)</li> <li>-초고압진공추출(ultra high pressure)</li> <li>•크로마토그래피법을 이용한 식물성 배당체 (glycosides) 주성분 및 함량 측정</li> <li>-TLC, HPLC, Total sugar, flavonoid 함량</li> </ul>	
		▶ 제주 쉰다리/오메기솔 공법 발효배양 공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>•발효균주 액체배양조건 확립</li> <li>-붉은덕다리버섯, 잎새버섯 균사체</li> <li>•균사체 발효 동력학적 연구(rheology)</li> <li>•전통발효포제(쉰다리/오메기솔) 공법을 접목한 약용버섯 균사체 발효조건 확립</li> </ul>	
		▶ Lab scale 수준의 발효배양조건 확립(5L, Bioreactor)	<ul style="list-style-type: none"> <li>•발효균주 성장조건 확립</li> <li>-배지(medium), 온도, pH, 회전력 등</li> <li>•발효기 성장 매개변수 확립</li> <li>-온도, pH, 산소량, 회전력 등</li> <li>•발효균주 정치배양 조건 확인</li> </ul>	
		▶ 바이오플라본의 확인시험법 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>•HPLC 분석조건 확립</li> <li>-컬럼, 용매조건, 검출조건 등</li> </ul>	
	위탁 기관	▶ 항노화(피부장벽강화) 유효성 평가 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>•in vitro, 항산화, MMP-1 저해 활성</li> <li>•항염활성 측정(5-LOX, COX-2 저해)</li> <li>•콜라겐 생합성 측정</li> </ul>	
			<ul style="list-style-type: none"> <li>•장수유전자 단백질 발현 모니터링 기술개발</li> <li>•피부 세포활성 측정</li> <li>•세포수준의 항산화, MMP-1 저해활성 측정</li> <li>•세포내 염증유발인자 저해 시험</li> </ul>	
	2차 년도	주관 기관	▶ 바이오플라본 소재의 주성분 동정 및 규명	<ul style="list-style-type: none"> <li>•유효성분 분리 동정(분획, NMR, Mass, IR)</li> <li>•생물전환소재 최적 생산조건 확립</li> </ul>
			▶ 바이오플라본 대량생산 공정 확립 및 제품화 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>•바이오플라본 대량생산 공정 확립</li> <li>-Pilot 생산공정</li> </ul>
		위탁 기관	▶ 바이오플라본 세포내 작용기전 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>•피부 세포의 장수유전자 활성 기작 규명</li> <li>•피부 세포 활성화 검증시스템개발</li> <li>-섬유아세포, 케라티노사이트</li> </ul>
▶ 항노화(피부장벽강화) 비임상 효능 평가			<ul style="list-style-type: none"> <li>•동물모델의 피부장벽 개선 확인시험</li> <li>•피부 보습 및 탄력 인체 유효성 측정</li> </ul>	

### 3. 평가의 착안점 및 기준

#### 3-1. 개발기술의 평가방법 및 평가항목

평가항목 (주요성능 Spec)	신뢰성 측정 지표	전체항목 에서차지 하는비중 (%)	세계최고 수준 보유국/ 보유기업 성능수준	연구개발 전 국내 성능수준	개발 목표치		평가방법			
					1차년도	2차년도				
주 관 기 관	소재 유효성 확인	유효성분(분 획) 확인	건	10	프랑스/로레알	세계수준의 80%	2	-	HPLC, MASS	
		추출 수율 (유효성분 함 량)	%	15	프랑스/IRB 0.2%이상	세계수준의 80%	0.1	0.2	원료화 공정개발	
	소재 화특성	중금속	ppm	5	프랑스/IRB 20 ppm 이하	세계수준의 100%	40-	20	AAS	
		비소	ppm	5	프랑스/IRB 2	세계수준의 100%	4	2	"	
	소재 기 능성	보습력	AU	5	프랑스/로레알 85	세계수준의 90%	75	80	기능성화장품 임상효능평가법	
		탄력도	U <sub>r</sub> /U <sub>t</sub>	5	프랑스/로레알 0.75	세계수준의 85%	0.75	0.65	"	
		주름개선율	%	5	프랑스/로레알 95%유의성	세계수준의 100%	-	95%	"	
	참 여 기 관	작용기 전 확 인	Sirtuin1 발 현 촉진	%	10	미국/NIH 20	세계수준의 90%	15	19	효소활성측정
			콜라겐 생합 성 촉진	%	5	미국/NIH 50	세계수준의 80%	30	50	콜라겐 생합성 (EIA kit)
		MMP-1 발현 저해	%	5	미국/NIH 30	세계수준의 90%	20	30	RT-PCR, ELISA resder	
TRP-1, TRP-2 억제율		%	5	일본/시세이도 20	15	16	20	RT-PCR		
COX-2 저해		%	5	스위스/펜타팜 60	40	50	60	효소 활성 평가법		
	특허출원	건	5	프랑스/로레알	세계수준의 80%	1	1	특허출원 건수		
	시제품 개발	건	15	프랑스/로레알	세계수준의 100%	1	2	화장품원료기준		



## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 1. 연구성과

#### 가. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

##### (1) 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분		(예시)특허		(예시)신품종				(예시)유전자원 등록	(예시)논문		기타
		출원	등록	품종명칭 등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
						출원	등록				
1차 년도	목표	2	-	-	-	-	-	-	1	-	
	달성	2	-	-	-	-	-	1	-	-	
2차 년도	목표	-	1	-	-	-	-	1	-	-	
	달성	-	1	-	-	-	-	-	-	-	
계	목표	2	1	-	-	-	-	2	-	-	
	달성	2	1	-	-	-	-	2	-	-	

##### (2) 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분		기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	1	3	2	2	3	
	달성	-	-	-	-	-	

#### 나. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2012	Microbial biotransformation of liquiritigenin from the aqueous extracts of Glycyrrhiza uralensis fermented with <i>Laetiporus sulphureus</i> CS0218	정상철	박종필	박성민	BMC Biotechnology (투고완료)		국외저널	SCI(imp act factor 2.35)
2013	<i>Laetiporus sulphureus</i> CS0218 as microbial catalyst for simple bioconversion of liquiritigenin with the aqueous extracts of <i>Glycyrrhiza uralensis</i>	황혜진	박종필	박성민	New Biotechnology (투고완료, 심사중)		국외저널	SCI(imp act factor 2.35)

다. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
					2013	참바늘머섯균사체추출물을 함유하는 피부외용제 조성물	주식회사 코씨드 바이오 팜	한국	10-1305411

라. 기술료 징수 현황  
해당사항 없음

마. 사업화 현황  
해당사항 없음

바. 인력활용/양성 성과  
(1) 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
2	2				2				2

(2) 장·단기 연수지원 성과  
해당사항 없음

(3) 산업기술인력 양성 성과  
해당사항 없음

사. 경제사회 파급효과  
해당사항 없음

2. 활용계획

- 기술적, 경제적 기대효과 : 제주 전통 쉰다리, 오메기술 공법의 단순 체험문화를 벗어나 첨단 발효공법과 과학적 검증을 통한 농업현장의 활용도를 높이고, 1차 산업의 제주산 특용작물의 생산성 향상과 수요처 확보와 동시에 화장품 산업 및 관련 제품은 제주도가 추진하고 있는 건강뷰티 생물산업과의 연계가 가능하므로, 연구 인프라 구축 및 산업화, 마케팅 등의 상호 지원 및 공유가 용이함.

○ 상품화 및 수요처 기대효과 :

- 국내 주요 화장품 업체와의 기술이전 및 수입원료 대체효과와 수출상품 개발



- 국내 화장품 업체(주요거래처; 한불, 사임당, 두리, LG생활건강 등)의 기능성원료(주름개선 효과) 및 효능원료(피부장벽강화, 보습 등)로 공급
- 해외 화장품 업체(주요거래처; 이스트힐/일본, 코스맥스/중국공장 등) 피부진정, 보습, 탄력 증진 등의 소재로 수출 공급
- 국내 생활용품 업체(주요거래처; LG, 아모레퍼시픽, 코스맥스)의 헤어 제품에 공급

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당사항 없음

## 제 7 장 연구시설·장비 현황

해당사항 없음

## 제 8 장 참고문헌

1. Srivastava D, Arya U, SoundaraRajan T, Dwivedi H, Kumar S, et al. (2008) Reserpine can confer stress tolerance and lifespan extension in the nematode *C. elegans*. *Biogerontology* 9: 309-316.
2. Drake J, Link CD, Butterfield DA (2003) Oxidative stress precedes fibrillar deposition of Alzheimer's disease amyloid beta-peptide (1-42) in a transgenic *Caenorhabditis elegans* model. *Neurobiol Aging* 24: 415-420.
3. Peterson DW, George RC, Scaramozzino F, LaPointe NE, Anderson RA, et al. (2009) Cinnamon extract inhibits tau aggregation associated with Alzheimer's disease in vitro. *J Alzheimers Dis* 17: 585-597.
4. Dudonne S, Vitrac X, Coutiere P, Woillez M, Merillon JM (2009) Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *J Agric Food Chem*.
5. Dragland S, Senoo H, Wake K, Holte K, Blomhoff R (2003) Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. *J Nutr* 133: 1286-1290.
6. Hasani-Ranjbar S, Larijani B, Abdollahi M (2009) A systematic review of the potential herbal sources of future drugs effective in oxidant-related diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets* 8: 2-10.
7. Frosch PJ, Kligman AM. The soap chamber test. A new method for assessing the

- irritancy of soaps. *J Am Acad Dermatol.* 1:35-41, 1979
8. Johansen JD. Fragrance contact allergy: a clinical review. *Am J Clin Dermatol.* 4:789-798, 2003
  9. Kligman AM. The identification of contact allergens by human assay. 1. A critique of standard methods. *J Invest Dermatol.* 47:369-374, 1966
  10. Kligman AM. The identification of contact allergens by human assay. 2. Factors influencing the induction and measurement of allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol.* 47:375-392, 1966
  11. Kligman AM. The identification of contact allergens by human assay. 3. the maximization test : A procedure for screening and rating contact sensitizers. *J Invest Dermatol.* 47:393-408, 1966
  12. Kligman AM. Updating the maximization test for identifying contact allergens. *Contact Dermatitis.* 1:231-239, 1975
  13. Choi, S.H., Ahn, J.B., Kozukue, N., Levin, C.E. and Friedman, M., Distribution of free amino acids, flavonoids, total phenolics, and antioxidative activities of Jujube (*Ziziphus jujuba*) fruits and seeds harvested from plants grown in Korea, *J Agric Food Chem.* 59 6594-604.
  14. Huang, X., Kojima-Yuasa, A., Xu, S., Kennedy, D.O., Hasuma, T. and Matsui-Yuasa, I., Combination of *Zizyphus jujuba* and green tea extracts exerts excellent cytotoxic activity in HepG2 cells via reducing the expression of APRIL, *Am J Chin Med.* 37 (2009) 169-79.
  15. Pahuja, M., Mehla, J., Reeta, K.H., Joshi, S. and Gupta, Y.K., Hydroalcoholic extract of *Zizyphus jujuba* ameliorates seizures, oxidative stress, and cognitive impairment in experimental models of epilepsy in rats, *Epilepsy Behav.* 21 356-63.
  16. Sabzghabae, A.M., Khayam, I., Kelishadi, R., Ghannadi, A., Soltani, R., Badri, S. and Shirani, S., Effect of *Zizyphus jujuba* fruits on dyslipidemia in obese adolescents: a triple-masked randomized controlled clinical trial, *Med Arh.* 67 156-9.
  17. Sarris, J., McIntyre, E. and Camfield, D.A., Plant-based medicines for anxiety disorders, Part 1: a review of preclinical studies, *CNS Drugs.* 27 207-19.
  18. Tian, S.P., Yao, H.J., Deng, X., Xu, X.B., Qin, G.Z. and Chan, Z.L., Characterization and Expression of beta-1,3-Glucanase Genes in Jujube Fruit Induced by the Microbial Biocontrol Agent *Cryptococcus laurentii*, *Phytopathology.* 97 (2007) 260-8.
  19. Zhang, Y., Zhou, A. and Xie, X.M., [Determination of triterpenoic acids in fruits of *Ziziphus jujuba* using HPLC-MS with polymeric ODS column], *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 38 848-51.