

보인과제(), 일반과제(O)

과제번호 107100-3

발간등록번호

11-1541000-000489-01

피부미용 고기능성 허브 확보,
기능성 평가 및 제품화

(Development of skin care products
via the identification of mutant herb
lines and their evaluation for the
improvement in skin health)

고려대학교

농림수산식품자료실



0005090

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “피부미용 고기능성 허브 (레몬밤) 확보, 기능성 평가 및 제품화에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010 년 5 월 31 일

주관연구기관명 : 고려대학교

주관연구책임자 : 이 호 정

세부연구책임자 : 김 경 현

세부연구책임자 : 이 성 준

협동연구기관명 : (주)내추럴 F&P

협동연구책임자 : 김 동 우

연 구 원 : 장 윤 정

연 구 원 : 정 민 우

연 구 원 : 윤 은 주

연 구 원 : 김 세 형

연 구 원 : 박 형 석

연 구 원 : 노 미 란

연 구 원 : 정 연 갑

연 구 원 : 고 인 호

연 구 원 : 김 대 원

연 구 원 : 김 창 회

요 약 문

I. 제 목

피부미용 고기능성 허브(레몬밤) 확보, 기능성 평가 및 제품화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

지구상에는 대략 400,000 종의 식물이 서식하고 있는 것으로 알려져 있으나 그 중 약 10% 만이 연구의 대상이 되고 있는 실정이다. 그럼에도 불구하고 매우 중요한 약리성분의 대부분은 식물에서 추출되어 이용되어 왔으며 어떤 것은 200년 전부터 연구되어 온 것도 있다. 현재 시중의 일반인에 의해 소비되는 약들 중 약 25%가 식물 유래인 것으로 알려져 있다. 약 처방전에 따른 식물유래 이차대사산물의 가치는 미화로 3 백억 달러에 이르는 것으로 추정된다(2002년). 본 연구에서는 이러한 비휘발성 플라보노이드 화합물을 천연 피부 건강기능 촉진 소재로 개발하기 위하여 생명유전공학적 및 생물공학적 방법을 이용하여 다양한 조건에서 다양한 조건에서 허브돌연변이주를 스크리닝하여 확보하고 또한 이들의 허브 캘러스를 다양한 조건에서 배양하고 이로부터 비휘발성 페놀릭 및 플라보노이드계 화합물의 피부 건강기능 촉진 가능성을 검증하여 허브 돌연변이주 및 캘러스 배양 조건 다각화를 통한 피부건강기능성분을 대량생산하여 시제품의 제작 및 시제품의 일반인 평가를 통해 제품화를 하고자 하였다.

식물의 이차대사산물은 주 대사산물 합성 경로에서 파생되어 생겨난 합성 경로를 이용함으로 실제 식물의 생존에 절대적으로 필요한 과정은 아니기에 이차대사산물이라 일컬어지며 대부분의 경우 식물체내 함량이 매우 낮은 것으로 확인된다(식물 건조 중량의 1% 미만). 이들 물질은 그러나 식물이 끊임없이 변화하는 혹독한 환경에서 움직이지 않고도 생존의 기회를 높이는 데 중요한 역할을 함에서 알 수 있듯이 각종의 다양한 물질들이 이에 속한다. 이에서 알 수 있듯이 식물은 여러 가지 생물적, 비 생물적인 스트레스를 받을 때 그 이차대사산물의 합성이 증가하는 것으로 알려져 있으나, 많은 종류의 이차대사산물은 그 식물체 내 역할이 아직 알려져 있지 않은 경우도 있다. 대부분의 많은 이차대사산물들은 독특한 화학구조를 가지고 있고 상당히 큰 물질들도 있어 유기화학적인 방법을 이용하여 합성해내기에는 그 비용 및 기술력에 있어 상당한 애로가 있다(항암제로 쓰이는 유명한 식물 이차대사산물인 Taxol의 경우도 식물체에서 직접 추출하는 형태를 취하고 있음).

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 이러한 비휘발성 페놀릭(phenolic) 화합물을 천연 피부 건강기능 촉진 소재로 개발하기 위하여 생물공정학적 및 생명유전공학적 방법을 이용하여 다양한 조건에서 이들 레몬밤 허브를 다양한 조건에서 배양하고 이로부터 비휘발성 페놀릭 및 플라보노이드계 화합물의 피부 건강기능 촉진 가능성을 검증하여 이에 알맞은 허브 배양 조건을 최적화하고자 하였다. 이의 추출물을 이용하여 피부 건강 기능성을 검증하고 이를 토대로 시제품을 생산하였다. 레몬밤 대사산물의 성분을 조사하기 위하여 우선 다양한 용매를 이용하여 비휘발성 성

본의 분석을 실시하였다. MS 배지에서 기내 배양한 식물을 건조시켜 이의 성분 분석을 실시하였다. 허브로부터 분석물을 효과적으로 추출하기 위하여 용매의 종류, 용매의 양, 추출 조건 등을 다양화시켜 얻어진 비휘발성 추출물을 액체크로마토그래피/질량분석기(Liquid-chromatography/Mass spectrometry)를 이용하여 분석 동정하였다(본 대학 식품과학부 교수님의 협조로 실시) ⇒ LC/MS에서는 Trisector double focusing type (EBE geometry) 과 OA-TOF analyzer를 결합한 고 분해능 질량분석기로서 다양한 ion source (EI/CI, FAB, ESI, APCI)와 MS/MS의 텐덤 기법을 이용하여 생체 고분자물질의 정확한 분자량 확인과 구조 분석을 수행하였다. 이를 기초로 현재는 유도된 레몬밤 켈러스에 MeJA등을 처리한 다음 이들 분석물의 조성이 어떤 것인가를 조사하고자 하였다. 그 결과 정상 조건에서 키운 레몬밤에서 추출한 물질의 성분과 구조를 보여주고 있다. 이는 레몬 밤에 아무 처리를 하지 않았을 경우의 것을 보여 주며 우리는 이 후에 수크로오스 처리 시에 새로이 증가하는 안토시아닌의 존재도 입증하였다. 개발된 추출 및 분석 방법을 토대로 대사산물의 생산성 및 그 성분 프로파일이 다르게 나타나는 다양한 품종 중에 선발된 고기능성 허브 변이주 중 휘발성 성분에 대해 특이적 및 대량 생산성을 가지는 변이주를 스크리닝하기 위해 신속하고 최소량의 시료로 비휘발성 성분의 분석이 가능한 방법을 개발하였다. GC/MS에서 full scan을 통해 전체 성분의 개략적 프로파일을 얻고 SIM mode에서 생체 고분자물질의 정확한 분자량 확인과 구조 분석을 수행하여 동정을 하고 정량적 분석도 시행하였다. 이렇게 동정된 레몬밤의 목적성분은 표준물질을 구입하여 표준곡선을 작성하고 비휘발성 추출물을 HPLC를 이용하여 정량 분석을 실시함으로써 정량이 가능하였다. 이를 이용하여 피부미용기능성을 조사하였으면 시제품의 안정성 등을 조사하였다.

IV. 연구개발결과

본 연구에서는 비휘발성 플라보노이드 화합물을 천연 피부 건강기능 촉진 소재로 개발하기 위하여 방사선 처리로 생산된 허브 돌연변이주를 본 연구실에서 확립한 조건에서 스크리닝하여 확보하고 이로부터 비휘발성 페놀릭 및 플라보노이드계 화합물의 항산화능을 조사함으로써 피부 미용 기능성 성분을 가진 허브 돌연변이주를 확보하고자 하였다. 이는 식물의 이차대사산물은 주 대사산물 합성 경로에서 파생되어 생겨난 합성 경로를 이용함으로써 실제 식물의 생존에 절대적으로 필요한 과정은 아니기에 이차대사산물이라 일컬어지며 대부분의 경우 식물체내 함량이 매우 낮은 것으로 확인되기 때문이다(식물 건조 중량의 1% 미만). 본 연구에서는 허브식물에서 더 많은 양의 이차대사산물을 효과적으로 합성을 증대시키는 방법을 여러 모로 연구한 결과 배양 조건의 다각화를 통하여 이 목적을 달성하였다. 또한 레몬밤 돌연변이주를 얻어 그 효과를 더 증진시킬 수 있었다.

Wild type의 레몬밤 추출물(LBE)은 74.3ug/ml, 돌연변이 레몬밤 추출물(mLBE)는 82.8ug/ml의 total flavonoid를 함유하고 있었다. Total flavonoid에 있어서 mLBE가 LBE에 비해서 11%정도 증가된 것을 확인할 수 있었다. 이는 방사선 조사된 돌연변이 레몬밤 추출물에서 total flavonoids가 증가되었음을 나타낸다. 돌연변이 레몬밤 에탄올 추출물이 항산화 물질로 알려진 flavonoids를 다량 함유하고 있으므로 항산화력이 있다고 판단되어 DPPH radical 소거능을 측정하였다. 환원력이 클수록 강력한 항산화 역할을 한다고 볼 수 있는데, DPPH는 질소원자가 불안정한 상태에서 쉽게 항산화물질과 반응하여 수소원자를 받아들여 안정된다. 따라서 항산화 물질과 반응하여 수소 원자를 받아들임으로서 자체의

정색성을 잃게 되는 성질을 이용하여 항산화 능력의 정도를 측정하였다. DPPH 를 이용한 유리 라디칼 소거 반응으로 돌연변이 레몬밤 추출물의 항산화작용을 측정한 결과, 측정된 추출물의 농도 모두에서 항산화작용을 보였다(Fig 2). 또한 동일 농도에서 효능을 비교할 때, 100ug/ml 이상의 농도에서 control 로 사용한 wild type의 레몬밤 추출물보다 라디칼 소거작용이 다소 증가하는 것으로 나타났다. 또한 전체적인 항산화 효과가 positive control로 사용한 vitamine E에 비하여 레몬밤 추출물에서 약 10%가량 억제효과가 큰 것으로 보였다.

V. 연구 성과 및 성과활용 계획

국내에서 재배 가능한 허브로부터 허브 셀러스를 유도하고 수출 가능한 고급화된 피부건강기능 제품으로 개발하여 농민소득 증대에 기여. 허브 돌연변이주로부터 생산되는 물질의 생리활성연구를 통한 기능성 소재로의 우수성 검증 및 홍보와 고급화된 가공기술을 세계의 여러 나라에 대한 기술수출을 통한 외화획득이 가능하다고 사료된다. 또한 종래의 전통적 허브와는 차별되는 새로운 의미의 상품에 대한 수요창출과 동시에 건강 지향형 소비자의 다양한 욕구를 충족시키는 제품을 생산. 피부건강 및 미용 기능성 허브 제품이라는 상품의 브랜드로서의 가치를 높일 수 있는 효과도 기대된다.

최근 화장품의 연구 분야는 20 여 년 전 미국화장품화학자회에서 Albert Kligma이 Neologism을 최초로 도입하면서 기능성 화장품에 대한 관심이 지속적으로 증가되고 있으며, 의약적 활성을 가진 정상 또는 정상에 가까운 사람들에게 적용할 수 있는 화장품으로 인식되고 있는 관계로 미용의 측면에서도 허브 등의 천연재료가 그 중요성을 더해가고 있으며 그 예로 급속한 노령화 및 사회 전반으로 확산되고 있는 웰빙 바람은 독일 화장품시장에도 변화를 불러 오고 화학성분보다는 천연재료에 관심이 높아지고, 미용에 치료 및 예방효과를 원하는 소비자들의 니즈와 맞물려 기능성 천연화장품이 인기를 끌고 있다. 한 예로, 영국의 국제시장조사 전문기관인 유로모니터(Euromonitor)에 따르면 독일의 화장품시장은 미국, 일본, 프랑스 다음으로 세계에서 4번째로 큰 시장이며, '03년 시장규모는 112억 유로를 기록함. 2002년 대비 성장률은 2.2%이며, 1997년 대비 22.8% 성장해왔고 이중 천연화장품시장은 현재 전체 화장품시장의 매출에 4%인 4억5천만유로로 틈새시장에 불과하지만, 점증적인 성장세를 보이고 있기 때문에 본 연구 결과로 생산된 제품으로 인해 새로운 미백의 기능성을 가진 원료의 개발 및 이를 통한 기능성 입증은 통해 참여기업인 (주)네추럴에프앤피에서 생산함으로써 레몬밤의 생산을 통한 농민의 수익이 증대될 수 있을 것으로 생각되며, (주)네추럴에프앤피의 매출액 증대에도 큰 영향을 미칠 수 있을 것으로 생각된다.

SUMMARY

Medicinal plants are widely used in traditional medicine, and there is great interest in understanding their expanded potential as antimicrobial and antiviral agents as because plant secondary metabolites have shown beneficial effects for a broad spectrum of health conditions. Lemon balm, *Melissa officinalis*, is a member of the mint family native to Europe. The efficacy of this herb is very well known for reducing stress and anxiety, promoting sleep, improving a ppetite, and easing pain and discomfort associated with digestion. Strong anthocyanin induction is triggered by sucrose, but not by other sugars or osmotic stress, in a variety of plant species. However, the mechanism of the induction of anthocyanin accumulation in lemon balm leaves in response to sucrose as well as phytohormones remains unclear. Here, we demonstrate that lemon balm plants show an enhanced level of anthocyanin in response to sucrose. First, our studies reveal that sucrose significantly enhances the level of flavonoids in lemon balm plants, and sucrose induction appears to be mediated by the phyto-hormones, ABA and ACC. Second, we identified delphinidin as the anthocyanins primarily enriched in the leaves grown in high-sucrose medium. Third, our results show that reactive oxygen species (ROS) are positively correlated with sucrose-mediated anthocyanin accumulation.

The extraction of lemon balm (*Melissa officinalis*) with aqueous methanol solution was optimized. The optimal extraction conditions were found to be the methanol concentration of 80.0% (v/v), the extraction temperature of 55°C and the extraction time 60 min with the resulting maximal RA yield of 44.7 mg RA/g dry materials. The effect of sugar on plants was studied using *Melissa officinalis* (lemon balm) and sucrose at different concentrations such as 50, 100, 150, 200, 250 and 300 mM. The effect of sucrose on the metabolite profiles of the plant was analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and principal component analysis (PCA). A total of 64 metabolites from various chemical classes such as alcohols, amines, amino acids, fatty acids, inorganic acids, organic acids, phosphates and sugars and 8 metabolites of anthocyanins were identified by GC/MS and LC/MS, respectively. The treated sample groups composed of biological replicates were clearly separated by the PCA of their metabolite profiles, which indicates the change of level in each metabolite depending on the sucrose concentration. In the course of searching for new materials to use as whitening agents, we screened lemon balm essential oils. Lemon balm essential oils inhibited the melanin production of B16 melanoma cells without significant cytotoxicity. Taken together, our results demonstrate that flavonoids in lemon balm can be significantly overproduced and be utilized in the preparation of cosmetic ingredients.

CONTENTS

Chapter 1	Research background and objectives -----	8
Chapter 2	Current status of research and development -----	11
Chapter 3	Results of research and development -----	13
Chapter 4	Contributions to the related research areas -----	141
Chapter 5	Research and development outcomes -----	142
Chapter 6	New collections of research information -----	144
Chapter 7	References -----	145

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	8
제 2 장	국내외 기술개발 현황	11
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과	13
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	141
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	142
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	144
제 7 장	참고문헌	145

제 1 장 연구개발과제의 개요

◆ 연구 개발의 목적: 본 연구에서는 이러한 비휘발성 플라보노이드 화합물을 천연 피부 건강기능 촉진 소재로 개발하기 위하여 생명유전공학적 및 생물공학적 방법을 이용하여 다양한 조건에서 다양한 조건에서 허브돌연변이주를 스크리닝하여 확보하고 또한 이들의 허브 캘러스를 다양한 조건에서 배양하고 이로부터 비휘발성 페놀릭 및 플라보노이드계 화합물의 피부 건강기능 촉진 기능성을 검증하여 허브 돌연변이주 및 캘러스 배양 조건 다각화를 통한 피부건강기능성분을 대량생산하여 시제품의 제작 및 시제품의 일반인 평가를 통해 제품화를 하고자 함.

- ◆ 식물은 우리가 일상생활에서 필요로 하는 영양소를 섭취할 수 있는 중요한 자원임. 이러한 영양소 및 기타 풍부한 미네랄은 식물에 존재하는 이차대사산물의 다양한 합성 경로를 통하여 이루어지는데 이와 관련된 합성 효소들은 또한 천연 자원 식물에서 많이 발견되는 항생제 및 다른 의약소재의 합성에도 긴밀하게 관련되어 있는 것으로 알려져 있음. 미국의 경우는 이러한 인류의 건강 및 생활에 유용한 이차대사산물을 함유한 식물 자원을 찾기 위해 여러 가지 방법이 강구되고 있는 실정임. 최근에는 기존의 유용 식물을 이용하여 그의 대사과정 경로를 조절하여 기존의 유용 이차대사산물의 합성을 증가시키거나, 혹은 새로운 물질을 합성해내는 방향으로도 그 연구가 활발하게 진행되고 있는 실정임 (Denkert et al., 2008).
- ◆ 지구상에는 대략 400,000 종의 식물이 서식하고 있는 것으로 알려져 있으나 그 중 약 10%만이 연구의 대상이 되고 있는 실정임. 그럼에도 불구하고 매우 중요한 약리성분의 대부분은 식물에서 추출되어 이용되어 왔으며 어떤 것은 200년 전부터 연구되어 온 것도 있음. 현재 시중의 일반인에 의해 소비되는 약들 중 약 25%가 식물 유래인 것으로 알려져 있음. 약 처방전에 따른 식물유래 이차대사산물의 가치는 미화로 3 백억 달러에 이르는 것으로 추정됨 (2002년).
- ◆ 식물의 이차대사산물은 주 대사산물 합성 경로에서 파생되어 생겨난 합성 경로를 이용함으로써 실제 식물의 생존에 절대적으로 필요한 과정은 아니기에 이차대사산물이라 일컬어지며 대부분의 경우 식물체내 함량이 매우 낮은 것으로 확인됨 (식물 건조 중량의 1% 미만). 이들 물질은 그러나 식물이 끊임없이 변화하는 혹독한 환경에서 움직이지 않고도 생존의 기회를 높이는 데 중요한 역할을 함에서 알 수 있듯이 각종의 다양한 물질들이 이에 속함. 이에서 알 수 있듯이 식물은 여러 가지 생물적, 비 생물적인 스트레스를 받을 때 그 이차대사산물의 합성이 증가하는 것으로 알려져 있고 (Chen et al., 2007; Devoto et al., 2005) 혹은 항산화능을 가지는 것으로 알려져 있다 (Gratao et al., 2008; Gollop et al., 2002). 그러나 많은 종류의 이차대사산물은 그 식물체 내 역할이 아직 알려져 있지 않은 경우도 있음.
- ◆ 대부분의 많은 이차대사산물들은 독특한 화학구조를 가지고 있고 상당히 큰 물질들도 있어

유기화학적인 방법을 이용하여 합성해내기에는 그 비용 및 기술력에 있어 상당한 애로가 있음 (항암제로 쓰이는 유명한 식물 이차대사산물인 Taxol의 경우도 식물체에서 직접 추출하는 형태를 취하고 있음) (Denkert et al., 2008; de Sousa et al., 2004). 현재까지 알려진 바로는 약 100,000 종의 이차대사산물이 식물에서 분리되었으나 단지 그의 50% 정도만이 구조가 밝혀진 상태임. 화학적 구조의 다양성으로 인해 뚜렷이 이차대사산물들을 구획하기는 어려우나 그 합성의 모본 구조에 따라 분리하면 대략 다음의 다섯 가지로 나눌 수 있음; polyketides, isoprenoids (e.g., terpenoids), alkaloids, phenylpropanoids, flavonoids.

◆ 외국에서는 허브차가 제조되고 있으나 국내에서는 수입되고 있으며 농가 차원에서 유용성분이 개량된 새로운 차의 개발을 통한 소득증대가 요구되며 더 나아가서는 허브의 피부 건강 기능성 물질의 정확한 분리정제 및 연구는 그 효용성을 일반인으로 하여금 새로이 인식하게 함으로써 폭넓고 다양한 수요 증가를 유도할 수 있음.

◆ 특히, 레몬밤의 수용성 추출물은 항산화(Azuma et al., 2008; Faudale et al., 2008) 는 물론, 항치매, 신경안정, 항균, 항바이러스 등의 생물학적 효과 (Geuenich et al., 2008)가 있는 것으로 알려지고 있어서 새로운 약리기능을 가진 소재로서도 주목을 받고 있으며, 또한 레몬밤은 시트랄(citral)과 같은 휘발성 화합물의 기체질량분석기(GC-MS)에 의한 프로파일(profile)은 레몬 과피와 유사하여 레몬향을 나타내지만 비휘발성 화합물은 레몬 과피와 크게 다른 구성을 보여주고 있어 이러한 점을 이용하면 레몬 껍질을 착즙하여 얻은 레몬오일을 이용하여 생산되고 있는 기존의 레몬향 제품과 달리 레몬향과 같은 우수한 기호성과 비휘발성 성분에 의한 우수한 피부건강기능성도 겸비할 수 있으므로 미용관련 기능성 시험을 통해 화장품과 비누, 샴푸 등 목욕제품에 사용할 수 있는 기능성 소재로 개발이 가능함.

◆ 본 연구에서는 이러한 비휘발성 페놀릭(phenolic) 화합물을 천연 피부 건강기능 촉진 소재로 개발하기 위하여 생물공정학적 및 생명유전공학적 방법을 이용하여 다양한 조건에서 이들 허브 셀러스를 다양한 조건에서 배양하고 이로부터 비휘발성 페놀릭 및 플라보노이드계 화합물의 피부 건강기능 촉진 기능성을 검증하여 이에 알맞은 허브 셀러스 배양 조건을 최적화하고자 함. 생명유전공학적인 측면에서의 식물이차대사산물의 합성 및 생산은 식물이라는 특성 때문에 미비한 단계이나 식물의 유전자 활용과 효모라는 매개체를 사용함으로써 한 단계 진보할 수 있는 분야로 인식되고 있으며 전 세계적으로 다양하고도 독창적인 기술들이 개발되고 있는 실정임. 식물의 이차대사산물의 다양성은 인간에 의해 만들어진 chemical library 보다도 훨씬 더 많은 다양성을 가지고 있으며 이는 앞으로도 새로운 식물의 이차대사산물이 발견되어질 가능성이 커, 최근의 "omics" 관련 기술과 접목될 때 새로운 기술력이 창출될 수 있음을 시사함. 즉, "omics" 기술을 아직까지 연구되어 있지 않은 새로운 식물체에 연루시켜 연구할 경우 새로운 이차대사산물의 창출까지도 생각할 수 있는 분야임.

◆ 최근 화장품의 연구 분야는 20 여 년 전 미국화장품화학자회에서 Albert Kligma이 Neologism을 최초로 도입하면서 기능성 화장품에 대한 관심이 지속적으로 증가되고 있으며, 의약적 활성을 가진 정상 또는 정상에 가까운 사람들에게 적용할 수 있는 화장품으로 인식되고 있음.

◆ 미용의 측면에서도 허브 등의 천연재료가 그 중요성을 더해가고 있으며 그 예로 급속한 노령화 및 사회 전반으로 확산되고 있는 웰빙 바람은 독일 화장품시장에도 변화를 불러 오고 화학성분보다는 천연재료에 관심이 높아지고, 미용에 치료 및 예방효과를 원하는 소비자들의 니즈와 맞물려 기능성 천연화장품이 인기를 끌고 있음. 한 예로, 영국의 국제 시장조사 전문 기관인 유로모니터(Euromonitor)에 따르면 독일의 화장품시장은 미국, 일본, 프랑스 다음으로 세계에서 4번째로 큰 시장이며, '03년 시장규모는 112억 유로를 기록함. 2002년 대비 성장률은 2.2%이며, 1997년 대비 22.8% 성장함.

◆ 이 중 천연화장품시장은 현재 전체 화장품시장의 매출에 4%인 4억5천만유로로 틈새시장에 불과하지만, 점증적인 성장세를 보이고 있음. 독일 의약품, 건강식품, 대체식품 및 바디케어 협회(BDIH)에서는 이와 같은 긍정적인 추세가 지속되어, 머지않아 천연화장품 시장의 비중이 5%선을 넘을 것으로 추정하고 있음.

◆ 국내 화장품의 총 시장규모는 총 5조 6 천억 원 정도로 추정되고 있으며(2004.01, 화장품 신문) 현재는 7 억 원에 가까울 것으로 추정되고 있으며, 이 중에서 9% 정도가 기능성 화장품 시장으로 알려져 있으며, 미백, 주름, 자외선의 순서로 큰 시장성을 형성하고 있음.

◆ 시장규모가 가장 큰 미백 기능성을 가진 고시 원료는 닥나무 추출물(2.0%), 알부틴 (2.0%), 유용성 감초 추출물(0.05%), 3-thoxy ascorbic acid(2.0%) 등이 알려져 있으며, 4가지 물질이 미백 기능성 화장품 전체시장을 차지하고 있음.

◆ 따라서 새로운 미백의 기능성을 가진 원료의 개발 및 이를 통한 기능성 입증을 통해 참여 기업인 (주)네추럴에프앤피에서 생산함으로써 레몬밤의 생산을 통한 농민의 수익이 증대될 수 있을 것으로 생각되며, (주)네추럴에프앤피의 매출액 증대에도 큰 영향을 미칠 수 있을 것으로 생각됨.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
<p>핀란드 VTT 연구소</p>	<p>기능유전체학(functional genomics), 프로테오믹스, 메타볼로믹스 등의 신기술을 이용하여 식물의 이차대사산물 합성과 관련된 유전자를 클로닝한 다음 이들을 식물 시스템(담배 등)에 클로닝해 넣어 이차대사산물의 합성을 촉진시키거나 새로운 이차대사산물의 합성을 유도하는 기술을 개발 중 임.</p>	<p>현재 기술개발 단계임.</p>
<p>영국 University of Buffalo</p>	<p>유전자 정보은행 탐색을 통한 식물 이차대사산물 합성 관련 유전자를 그 합성경로에 맞추어 효모 vector에 클로닝함. 실제 이러한 접근방법이 외국에서는 활발하게 진행되고 있으며 최근에는 이 방법을 통하여 플라보노이드의 함량을 약 30% 증가시켰다고 보고하였음. 효모의 경우는 배양이 간단하며 플라보노이드 합성에 필요한 전구체를 효모 배양액에 첨가하면 바로 효모가 흡수하여 우리가 클로닝해 넣은 합성효소의 기능에 따라 다음 단계의 이차대사산물로 만들어 낼 수 있음.</p>	<p>현재 기술개발 단계임.</p>
<p>태평양</p>	<p>태평양은 97년 경희대 한의대와 공동연구를 통해 6년간 인삼과 옥, 죽, 작약, 연자육, 백합, 자황 등 5가지 한약재를 달여 설화수를 출시한 바 있으며, 미백이 뛰어난 대나무 추출물을 함유한 제품, 한란을 원료로 한 향수, 티트리 추출물인 멜라레우카알터니폴리아라는 천연성분 원료로 만들어 피부, 상처 부위를 깨끗하게 가꾸주는 제품을 개발하였음.</p>	<p>현재 제품 개발 단계임.</p>
<p>LG생활건강</p>	<p>속수자라는 식물에서 추출하여 분리한 피토클리어 EL-1이라는 미백 성분을 개발하였으며, 최근에는 당귀, 녹용, 산수유, 사향초, 오가피, 천문동 등의 보습과 항염, 항균 효과가 뛰어난 원료들을 사용하여 제품을 출시했다.</p>	<p>현재 제품 개발 단계임.</p>
<p>나드리 화장품</p>	<p>9가지 필수아미노산을 비롯하여, 마그네슘, 칼슘 등 각종 영양분이 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있는 대나무 추출수를 이용하여 상품을 개발하였는데, 이 제품은 수분 공급을 위해 대나무 추출물과 유산균 발효액, 나노솜 성분을 사용했다. 또한 항암효과로 널리 알려진</p>	<p>현재 제품 개발 단계임.</p>

	<p>상황버섯을 이용하여, 피부면역 및 노화예방, 미백기능이 있는 제품과 주름개선 기능성 화장품을 개발하였음.</p>	
<p>CJ 엔프라니</p>	<p>최근 주목에서 추출한 원료로 고농축한 항산화물질을 독자적으로 개발하였으며, 이밖에도 여러 기업체에서 솔잎추출물, 표고버섯추출물, 녹차추출물 등을 원료로 사용하여 제품을 개발하였으며, 해양심층수, 콜라겐, 캐비어(caviar) 등 해양 추출물, 온천수 등을 통한 제품 개발이 활발하게 진행되고 있음.</p>	<p>현재 제품 개발 단계임.</p>

제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

구분	세부과제별	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	1 세부 (이호정)	<ul style="list-style-type: none"> 기능성 레몬밤 캘러스 유도 및 생육, 배양 조건 다양화를 통한 피부 건강기능성 이차대사산물 생산 최적화 	<ul style="list-style-type: none"> 허브 이차대사산물 함량 및 성분 변화 창출을 위한 허브 종자 돌연변이를 유도함. 원자력선 (감마선) 및 화학제 (EMS)를 허브 종자에 처리하여 대량의 허브 돌연변이주를 생산함. 다양한 허브로부터 캘러스를 유도하고 그 배양조건을 다각화하여 피부건강기능 증진 이차대사산물의 생산성 최적화 조건 정립.
	2 세부 (김경현)	<ul style="list-style-type: none"> 레몬밤 잎으로부터 비휘발성 이차대사산물 추출 및 분석방법 확립 	<ul style="list-style-type: none"> 허브 분석을 위한 추출방법 최적화(용매의 종류, 용매의 양, 추출 조건) HPLC를 이용한 허브의 비휘발성 성분 분석방법 개발
	3 세부 (이성준)	<ul style="list-style-type: none"> 레몬밤 에센셜오일의 피부미백효과 검증 	<ul style="list-style-type: none"> 레몬밤 에센셜오일 추출조건의 최적화 세포독성실험: MTT assay 레몬밤 에센셜오일의 피부미백 효과검증 <ul style="list-style-type: none"> -mushroom tyrosinase, B16 melanocyte tyrosinase activity 측정 -melanine 함량측정 -tyrosinase 유전자발현측정
	협동 (김동우)	<ul style="list-style-type: none"> 레몬밤 이차대사산물의 원료 인증을 위한 독성검사 실시 	<ul style="list-style-type: none"> 허브이차대사산물의 제품화를 위한 대량 생산 평가기준을 확립함. 허브이차대사산물을 대상으로 hairless mouse, 토끼 등을 대상으로 피부자극성이 나타나는지에 대한 검증을 실시함.
2차년도	1 세부 (이호정)	<ul style="list-style-type: none"> 기능성 레몬밤 돌연변이주 확보 	<ul style="list-style-type: none"> 1 단계에서 선정된 돌연변이주 타겟 라인 별로 새로운 이차대사 산물이 생성되었는지를 신속하게 스크리닝하기 위해 anthocyanine 등의 양을 스펙트로포토미터를 사용하여 조사함.
	2세부 (김경현)	<ul style="list-style-type: none"> 돌연변이 레몬밤 캘러스로부터 비휘발성 이차대사산물 추출 및 LC/MS 이용 대사체 분석 및 다변량 분석 	<ul style="list-style-type: none"> HPLC 및 LC/MS를 이용한 허브 변이주의 비휘발성 성분 추출 및 분석방법 개발 허브 변이주의 대사체 분석을 통한 비휘발성 이차대사산물 고생산능 변이주의 스크리닝
	3 세부 (이성준)	<ul style="list-style-type: none"> 돌연변이 레몬밤 에센셜오일의 피부미백 개선효과 검증 	<ul style="list-style-type: none"> 레몬밤 돌연변이체의 에센셜오일 추출 세포독성실험: MTT assay 돌연변이 레몬밤 에센셜오일의 피부미백 효과검증

			<p>-mushroom tyrosinase, B16 melanocyte tyrosinase activity 측정</p> <p>-melanine 함량측정</p> <p>-tyrosinase 유전자발현측정</p>
	협동 (김동우)	<ul style="list-style-type: none"> 레몬밤 이차대사산물의 원료 인증실시 및 시제품 개발, 안정성 평가 연구 	<ul style="list-style-type: none"> 1차년도 연구를 바탕으로 해서 원료의 기능성 인증을 위한 각종 서류를 접수함 원료 농도의 다양화 및 제품의 산도 변화를 통해 각종 시제품을 생산하여 가혹성 테스트 등을 통해 제품의 안정성을 평가함
3차년도	1 세부 (이호정)	<ul style="list-style-type: none"> 레몬밤 캘러스 및 기능성 돌연변이주 대량 생산을 위한 배양조건의 최적화 및 이들 초 	<ul style="list-style-type: none"> 허브 캘러스는 실제로 그 생산에 시간이 오래 걸리므로 이의 효과적 증식 및 배양을 위한 조건을 다각화하여 제품화에 필요한 대량생산의 경제적 방법을 모색함. 기능성 돌연변이주의 재생산 또한 중요함으로 이의 배양조건 및 증식 조건 확립. 허브 돌연변이주의 기능성 구명을 위한 분자적 특성 조사
	2 세부 (김경현)	<ul style="list-style-type: none"> 돌연변이 레몬밤 캘러스로부터 휘발성 이차대사산물 추출 및 GC/MS 이용 대사체 분석 및 다변량 분석 	<ul style="list-style-type: none"> GC 및 GC/MS를 이용한 허브 변이주의 휘발성 성분 추출 및 분석방법 개발 허브 변이주의 대사체 분석을 통한 휘발성 이차대사산물 고생산능 변이주의 스크리닝
	3 세부 (이성준)	<ul style="list-style-type: none"> 돌연변이 레몬밤 에센셜오일의 주름살 감소기능 연구 	<ul style="list-style-type: none"> 세포주를 이용한 허브 에센셜오일의 주름살 개선효과 검증 피부세포내의 collagen/elastin 합성량 측정 matrix metalloproteinases(MMP) 합성량 측정 항산화능 측정: 피부 주름살 감소효능과의 상관관계 조사
	협동 (김동우)	<ul style="list-style-type: none"> 시제품을 대상으로 한 소비자 테스트 및 원료의 기능성 인증 	<ul style="list-style-type: none"> 소비자를 대상으로 플라시보군, 실험군을 나누어 각각 30명씩을 대상으로 해서 시제품에 대한 소비자 선호도 테스트를 통해 소비자의 선호도가 가장 높은 제품을 개발하며, 원료의 기능성 입증을 실시

제 1 절: 제1세부 과제 연구내용 및 결과

1. 제1세부과제 연구 내용

가. 기능성 허브 캘러스 유도 및 생육, 배양 조건 다양화를 통한 피부 건강기능성 이차대사산물 생산 최적화

- 허브의 재 분화에 관한 연구는 아직 학계에 보고된 바 없으나 (고전적 육종 방법도 다른 작물에 비하여 집중적으로 이루어지지 않았음) 최근에는 보고되는 논문에 따르면 embryogenic callus 등은 성공적으로 유도될 수 있는 것으로 학계에 보고됨. 본 연구진은 이미 허브의 일종인 레몬밤으로부터 조직 배양을 통한 캘러스 유도 성공 단계에 와 있음. 또한 본인은 앞서 cassava로 알려진 열대작물의 조직배양 및 재 분화 과정을 다루어서 성공한 경험이 있으므로 다른 종의 허브에서도 캘러스를 성공적으로 유도할 수 있음.
- 허브 이차대사산물 함량 및 성분 변화 창출을 위한 허브 종자 돌연변이를 유도함. 원자력선 (감마선) 및 화학제 (EMS)를 레몬밤 종자에 처리하여 대량의 허브 돌연변이주를 생산함. 이들로부터 새로운 이차대사산물 및 혹은 기존의 플라보노이드/폴리페놀 화합물의 성분 분석을 효과적으로 수행하여 타겟 라인을 선정함.

나. 기능성 허브 돌연변이주 확보를 위한 다양한 에세이

- 1 단계에서 선정된 돌연변이주 타겟 라인은 다른 세부과제 책임자와의 긴밀한 협조 아래 새로운 이차대사산물이 생성되었는지를 HPLC를 이용하여 조사함. 또한, 기존의 플라보노이드 및 폴리페놀의 함량이 증대된 변이주가 있는지도 검색함.

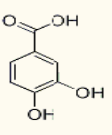
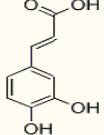
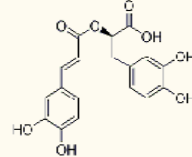
다. 레몬밤 이차대사산물 합성 관련 유전자 확보 및 발현 증대 연구

- 허브 이차대사산물 합성 효소의 유사 유전사를 레몬밤으로부터 클로닝하고 모델식물 시스템에 도입하여 타겟 이차대사산물의 합성량이 증가하였는지를 검정함.
- 유용 이차대사산물 합성 관련 유전자의 발현을 적극적으로 조절할 수 있다면 그 유용 물질의 생산량 증가에 획기적인 결과를 얻을 수 있을 것으로 간주됨. 또한, 더 나아가 이들 이차대사산물 생합성 유전자의 조절 인자가 확보되면 이들의 기능 도메인을 각종 방법으로 다른 조절인자의 그것과 치환시켜 봄으로써 가장 효과적으로 이들 유전자를 발현 혹은 억제시키는 단백질을 만들 수 있을 것임.
- 허브 이차대사산물 합성 효소들이 어떤 조건에서 가장 잘 발현하는지를 분자수준에서 연구하여 기능성 캘러스 배양 조건을 확립함. 확보된 돌연변이주도 똑 같은 연구를 진행하여 우수한 변이주 확보에 기여함.

2. 제1세부과제 연구 결과

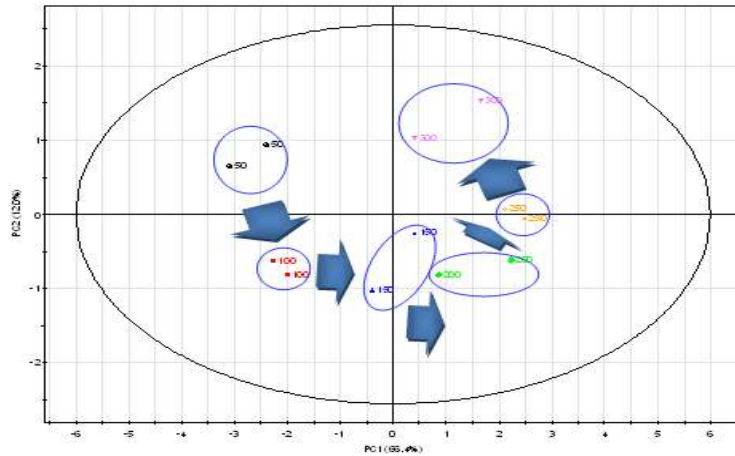
(1) 레몬밤 대사산물의 성분을 조사하기 위하여 우선 다양한 용매를 이용하여 비휘발성 성분의

분석을 실시하였다. MS 배지에서 기내 배양한 식물을 건조시켜 이의 성분 분석을 실시하였다. 허브로부터 분석물을 효과적으로 추출하기 위하여 용매의 종류, 용매의 양, 추출 조건 등을 다양화시켜 얻어진 비휘발성 추출물을 액체크로마토그래피 / 질량분석기 (Liquid-chromatography/Mass spectrometry)를 이용하여 분석 동정하였다 (본 대학 식품과학부 교수님의 협조로 실시) ⇒ LC/MS에서는 Trisector double focusing type (EBE geometry) 과 OA-TOF analyzer를 결합한 고 분해능 질량분석기로서 다양한 ion source (EI/CI, FAB, ESI, APCI)와 MS/MS의 텐덤 기법을 이용하여 생체 고분자물질의 정확한 분자량 확인과 구조 분석을 수행하였다. 이를 기초로 현재는 유도된 레몬밤 켈러스에 MeJA등을 처리한 다음 이들 분석물의 조성이 어떤 것인지 조사하고자 하였다. 아래 그림의 결과는 정상 조건에서 키운 레몬밤에서 추출한 물질의 성분과 구조를 보여주고 있다. 이는 레몬 밤에 아무 처리를 하지 않았을 경우의 것을 보여 주며 우리는 이 후에 수크로오스 처리 시에 새로이 증가하는 안토시아닌의 존재도 입증하였다. 이는 현재 여러 가지 다양한 조건 속에서 그 성분의 정확한 규명을 위해 고려대 김경현 교수님 팀과 공동으로 연구를 진행 중에 있는 단계이다.

	Protocatechuic acid	Caffeic acid	Rosmarinic acid
Synonym	3,4-Dihydroxybenzoic acid	3,4-Dihydroxycinnamic acid	(R)-O-(3,4-Dihydroxy-cinnamoyl)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)lactic acid
Molecular Formula	(HO) ₂ C ₆ H ₃ CO ₂ H	(HO) ₂ C ₆ H ₃ CH=CHCO ₂ H	C ₁₈ H ₁₆ O ₈
Formula Weight	154.12	180.16	360.31
Structure			

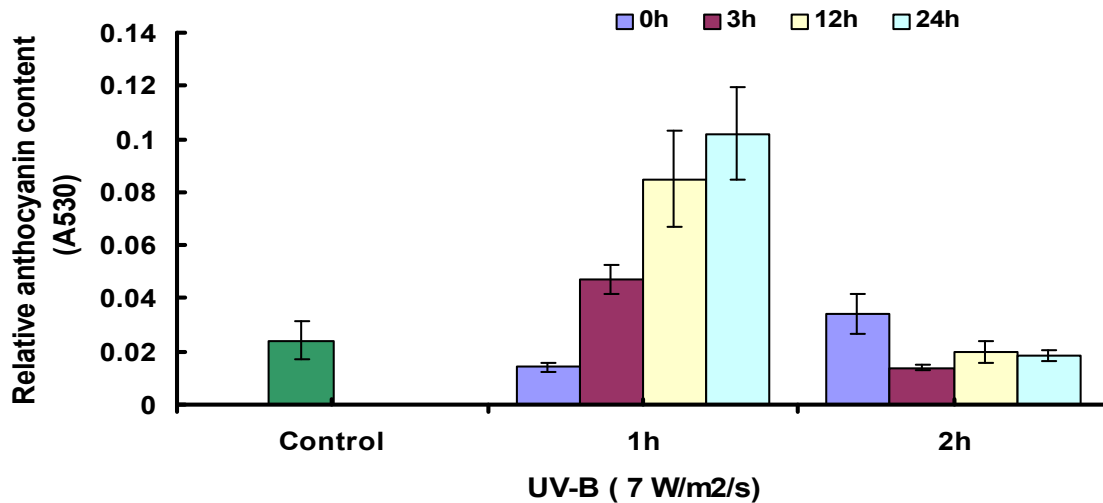
<Figure 1-1. 레몬밤 추출물 중 수크로스 처리 시 분리되는 안토시아닌>

(2) 이를 위하여 다양한 농도의 수크로스를 처리한 처리 한 상태에서 레몬밤을 회수하여 PCA analysis를 수행한 결과 다음과 같은 결과를 현재 분석 중에 있다 (Sumner et al., 2003; Styczynski et al., 2007; Ma et al., 2007)). 농도별 프로파일의 정확한 분획은 이들 처리에 따른 안토시아닌 및 플라보노이드가 뚜렷하게 구별되어 합성됨을 의미하는 결과라고 보여진다. 이 결과 역시 고려대 김경현 교수님 팀의 협조로 확보하게 되었다. 아래 그림은 수크로스 처리 시에 증가하는 안토시아닌의 종류 중 어떤 것이 많이 증가하는 지를 알아보기 위하여 HPLC의 결과 얻은 PCA 분석 결과를 보여주는 그림이다. 다양한 종류의 안토시아닌이 검출되었는데 그 중 standard 물질이 존재하는 것들을 구입하여 분석을 실시한 결과 delphinidine-3-arabinoside를 확인하였다. 이 물질은 특히 세포의 항산화능 증가에 기능이 있는 것으로 밝혀진바 있는 물질이라 우리가 증가시키고자 기획한 의도와 일치하는 결과로 보여진다. 고려대 김경현 교수님의 협조로 확보된 결과이다(24).



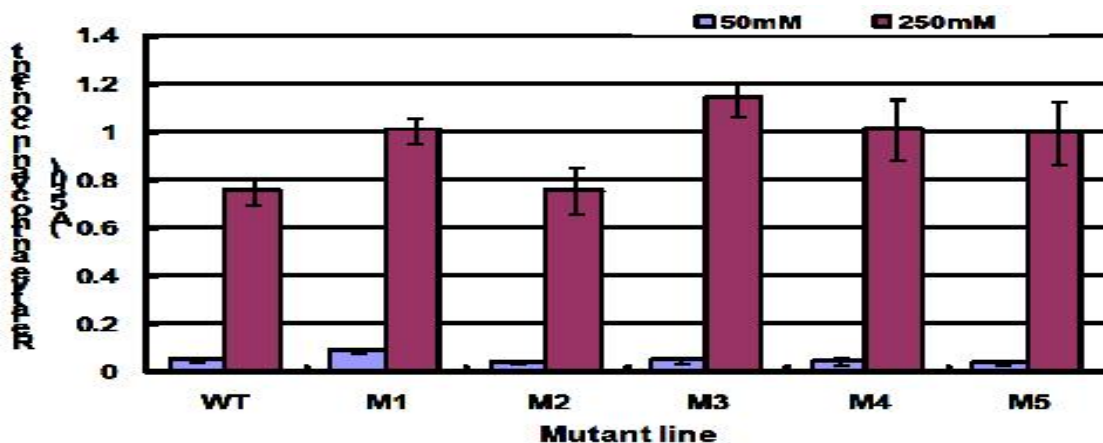
<Figure 1-2. PCA 분석을 통한 플라보노이드 분자량 조사>

(3) 우리는 그 다음으로 레몬 밤에서 플라보노이드의 일종인 안토시아닌을 타겟으로 하여 어떤 조건에서 가장 안토시아닌이 많이 합성되는 지를 확인하기 위하여 아래와 같은 다양한 연구를 수행하였다 (2, 3, 4, 5, 8). 우선 그 첫째로 플라보노이드는 식물이 외부환경에서 살아갈 때 끊임없이 노출되는 자외선(UV)으로부터 자신을 보호하기 위하여 만들어진다는 것에 착안하여 자외선을 조사한 뒤에 안토시아닌을 아래와 같이 측정하여 보았다. 우선 0.3 W 의 UVB 조사량으로 레몬밤을 처리한 결과 (평균 배지에서 20일 키운 식물의 배양기 뚜껑을 열고 아래의 시간 별로 밀폐된 챔버 내에서 처리하였음) 아래의 그림과 같은 결과를 얻었다. 시간은 0.5, 1, 1.5, 2 시간을 조사한 결과 안토시아닌이 점진적으로 증가하는 양상을 보였다. 그러나 그 양은 자외선 조사 후에 회복기를 둘 때에 증가세를 확실하게 인식할 수 있었다. 이는 자외선 조사 후에 안토시아닌의 합성이라는 결과에 이르기까지 상당한 시간을 필요로 함을 입증하는 결과라 하겠다. 우리는 아래의 실험에서 UVB를 1 시간 처리하고 회복기를 2 시간 내지 24 시간 들때 가장 안토시아닌이 많이 축적된다는 결론을 도출하였다. 이번에는 UVB의 강도를 높여서 조사한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다. 우리는 이번에는 7 W 로 강력하게 UV를 1, 2 시간을 처리한 다음에 역시 3, 12, 24 시간의 회복기를 두었다. 위 그림의 절대량을 각각 비교해보면 7 W일 경우에 훨씬 많은 양의 안토시아닌이 합성됨을 쉽게 확인할 수 있다. 이는 1 시간 처리의 경우에만 명확했으며 2 시간 이상을 처리했을 경우에는 식물에 손상이 워낙 커서 안토시아닌의 양이 되레 크게 감소하는 결과를 얻었다. 아래 그림은 위 결과를 얻은 샘플의 직접적인 컬러를 보여주기 위해 나타내었다. 1 번은 아무 처리 없는 경우, 2, 3, 4, 5는 UV를 1 시간 쬐이고 각각 3, 12, 24 시간의 회복기를 둔 경우이며 6, 7, 8, 9는 UV를 2 시간 쬐이고 각각 3, 12, 24 시간의 회복기를 둔 경우의 샘플을 사진으로 찍어보았다. d 경우 안토시아닌을 추출하는 과정을 거쳤기에 샘플의 색깔이 뚜렷하게 확인됨을 알 수 있었다. 즉, 5 번의 경우에서 가장 많은 안토시아닌이 얻어졌다. 그러나 우리는 UV의 조사가 식물 세포의 치사를 유도할 수 있고 이는 플라보노이드 합성에 부정적인 영향을 끼칠 수도 있다는 생각을 하게 되었다. 이를 확인하기 위하여 레몬밤에 UV를 조사한 다음에 아래 그림과 같이 ROS (reactive oxygen species)의 양을 염색법을 통하여 조사하여 보았다. 그 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 즉, 아무 처리도 하지 않을 경우 1, 2 번과 같이 비교적 ROS의 양이 적은 반면 UV를 1 시간 (7w/m2s) 쬐인 경우에는 3, 4, 5, 6 번의 경우처럼 ROS가 짙게 방출됨을 확인하였다.



<Figure 1-3. UV 조사 시 레몬밤에서의 안토시아닌 함량 변화>

(4) 레몬밤 종자에 감마선을 조사하여 얻은 샘플로 우리는 돌연변이를 스크린하는 데 많은 시간을 할애하였다. 그 방법은 아래와 같이 우선 이들 종자를 MS에서 발아시킨 다음에 그 잎에서 안토시아닌을 추출하였다. 다음과 같은 multiplate를 이용하여 대량을 한 번에 스크리닝할 수 있는 시스템을 확보하였고 그 결과 현재 하나의 라인을 확보하기에 이르렀다. 실제로 별반 차이가 없는 라인들도 씨를 파종하여 다음 해에는 M2라인으로 recessive line을 얻을 수 있을 것으로 사료된다. 이 외에도 몇 개의 라인이 더 존재하나 너무 범위가 넓어지는 이유로 현재는 하나의 라인에 집중하여 연구를 진행하였다. 그러나 추후 이들 라인 또 한 연구를 진행할 계획에 있다. 이 돌연변이 또한 위에서 실시한 다양한 실험들을 적용하여 본 결과 wild type 보다 약 20-30 % 정도로 안토시아닌 및 플라보노이드가 높은 것으로 나타났다. 이는 wild type에 수크로스를 처리할 경우 안토시아닌 및 플라보노이드가 4-5배 증가하는 것에 비교할 수는 없지만 그래도 어느 정도 증가하는 것으로 나타났다.



<Figure 1-4. 돌연변이에 수크로스 처리 시의 안토시아닌 함량 변화>

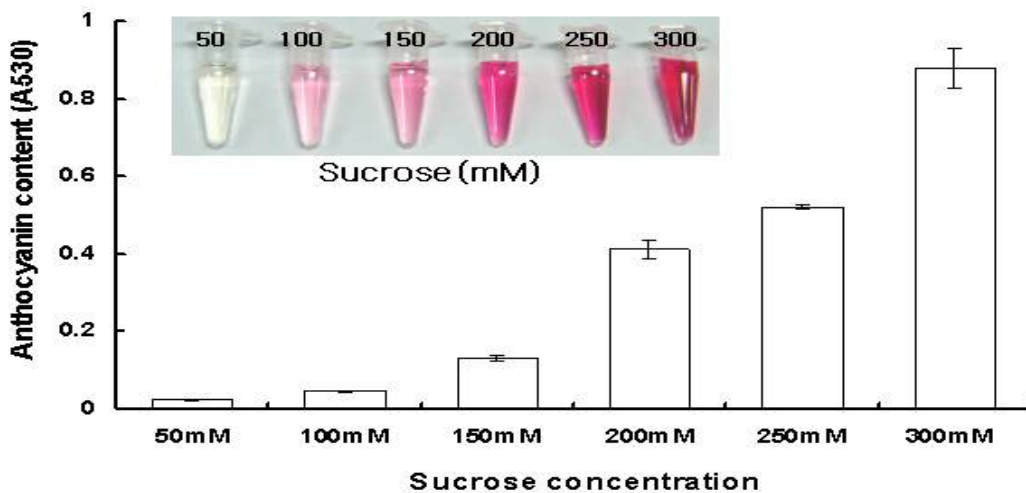
(5) 우리는 모든 실험에서 거의 돌연변이가 20-30프로 정도로 효과적인 결과들을 보였기에 다음과 같이 토양에서는 어떤 결과를 보여주는 지를 조사한 결과 다음과 같이 잎에서 훨씬 더

붉은 빛을 띄는 것으로 나타남을 확인하였다. 그러나 클로로필의 함량에는 별반 차이가 없는 것으로 나타났다.



<Figure 1-5. 돌연변이의 잎 색도>

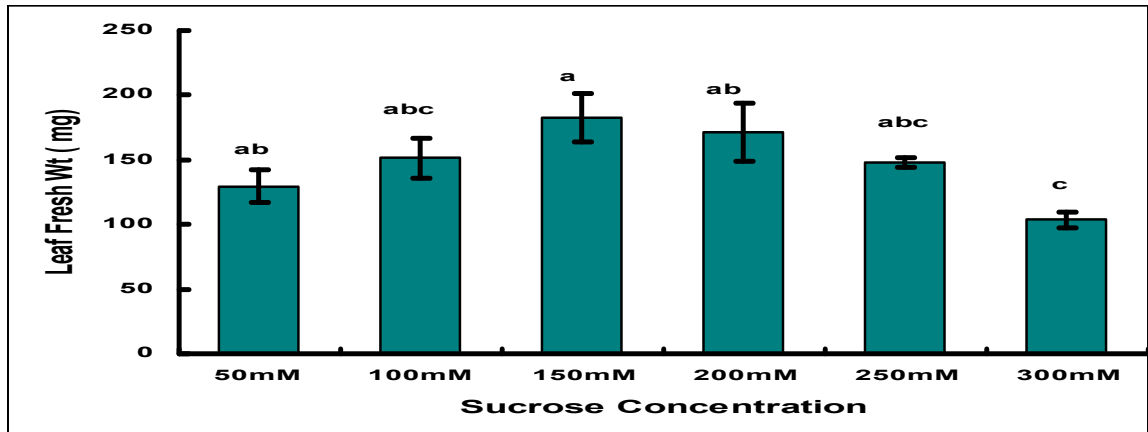
(6) 이상의 결과를 두고 우리는 다음으로 플라보노이드의 함량을 증가시킬 수 있는 다른 조건을 검색하기에 이르렀다. 우리는 그 다음으로 UV와 수크로스를 동시에 처리 할 경우 어떤 결과를 얻게 될 것인지가 궁금하여 다음과 같은 실험을 수행하였다(22, 23). 즉, 다양한 농도의 설탕과 함께 UV를 처리하여 얻은 다음의 결과에서 보듯이 수크로스 단독 처리 시보다 UV와 동시 처리 시에 보다 더 많은 양의 안토시아닌이 합성되는 것을 확인하였으나 그 증가세는 그다지 크지 않은 것으로 판명되었다. 따라서, 우리는 더 이상 UV는 처리 하지 않고 수크로스에 대한 실험을 더 진행하기로 결론을 내리게 되었다. 그 결과는 아래에 보이는 바와 같이 안토시아닌의 샘플 색깔로도 구별이 가능하지 않음에서 충분하게 결론을 내릴 수 있다고 보여진다. 이를 위하여 수크로스를 처리하기로 하고 그 농도를 50, 100, 150, 200, 250, 300 mM의 수크로스 배지에서 레몬밤을 3일 간 배양한 다음에 안토시아닌을 추출하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 수크로스 300 mM 처리 시에 얻은 안토시아닌의 양을 UV 조사 시의 그것과 비교하였을 경우 거의 5-6 배 증가한 축적량을 확인할 수 있었다. 또한 조직의 사멸 정도 또한 그리 문제가 되지 않음을 다음에 나오는 결과에서 순차적으로 확인할 수 있었다.



<Figure 1-6. 수크로스 처리 시 레몬밤에서의 안토시아닌 함량 변화>

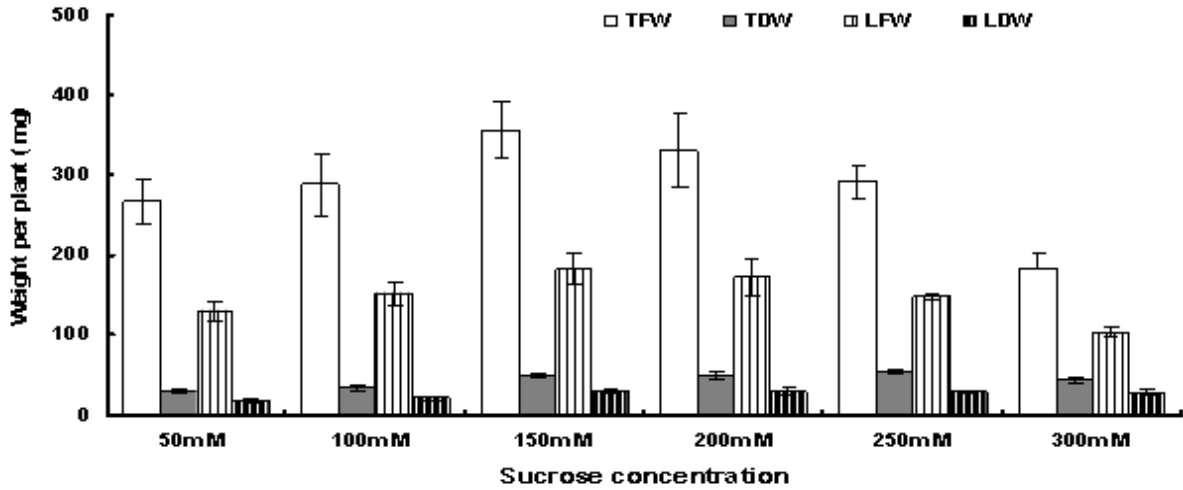
(7) 이번에는 수크로스 배지에서 애초부터 explant 상태로 레몬밤을 키워 보았다. 아래에 보이는 데로 수크로스를 50, 100, 150, 200 mM로 만든 배지에서 키운 결과 20 일 경 후에도 여전히 잘 자라고 있는 것이 확인되었다. 우리가 이 실험을 진행한 이유는 수크로스는 고농도로 처

리 시에 osmotic stress를 유발할 수 있기 때문이었다. 그러나 아래 그림에서 보는 바와 같이 200 mM의 농도에서도 거뜬하게 20일 정도는 잘 자라는 것으로 확인되었다. 위 내용을 정량화 하기 위하여 우리는 다음으로 상기 조건 등에서 레몬밤을 키운 다음 그 무게를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 아래에 보이는 바와 같이 200 mM의 경우에는 leaf fresh weight이 약간 증가하는 반면에 그 이상의 수크로스 농도에서는 무게가 감소하는 것으로 확인되었다. 이는 수크로스가 200 mM 이상이 될 경우에는 어느 정도의 osmotic stress를 유발하는 것으로 짐작해볼 수 있는 결론으로 생각된다.

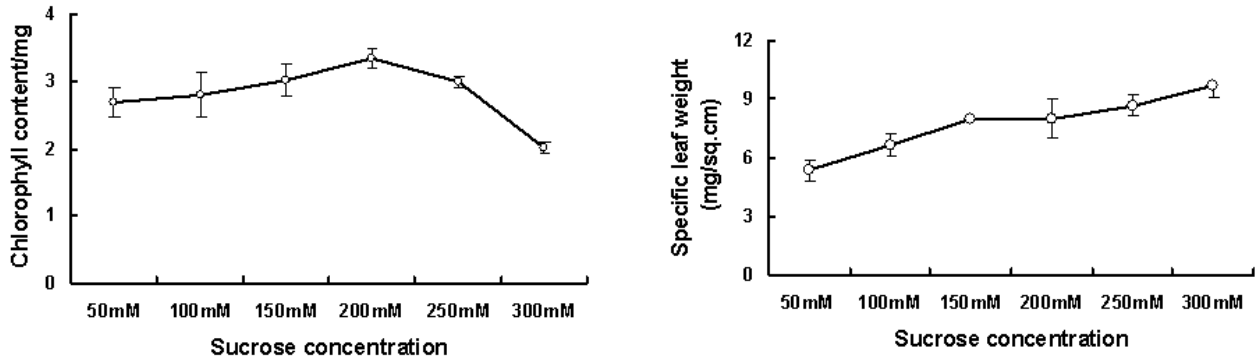


<Figure 1-7. 수크로스 처리 시 레몬밤 잎 무게 변화>

(8) 그러나 위의 결과들에서는 300 mM의 수크로스 처리 시에 상당한 양의 안토시아닌이 축적되는 것으로 미루어 우리는 안토시아닌 획득에 가장 경제적인 조건을 계산해 보기로 하였다. 아래 표에 그 계산 결과를 적시하였다. 수크로스의 농도는 50, 100, 150, 200, 250 및 300 mM로 하였고 레몬밤은 이들 각 배지에서 20일 간 키운 것으로 하여 정량화된 값을 사용하였다. 아래 표의 결과에서 보이는 것은 200 mM 수크로스에서 레몬 밤을 키울 경우에 가장 효과적으로 많은 양의 안토시아닌을 얻을 수 있음을 보여준다. 결과를 더 정확하게 정량화하기 위하여 우리는 다음과 같이 다양한 조건에서 키운 레몬밤의 무게를 조사하였다. LFW (leaf fresh weight), LDW (leaf dry weight), SFW (shoot fresh weight), SDW (shoot dry weight), RFW (root fresh weight), RDW (root dry weight)을 각각의 조건에서 조사하여 다음의 결과를 얻었다. 또한, 클로로필의 함량을 조사함으로써 수크로스 처리 시 생장에 중요한 상해가 미치는 지를 조사한 결과 고농도로 가지 않는 경우에는 별 문제가 없는 것으로 확인되었다.

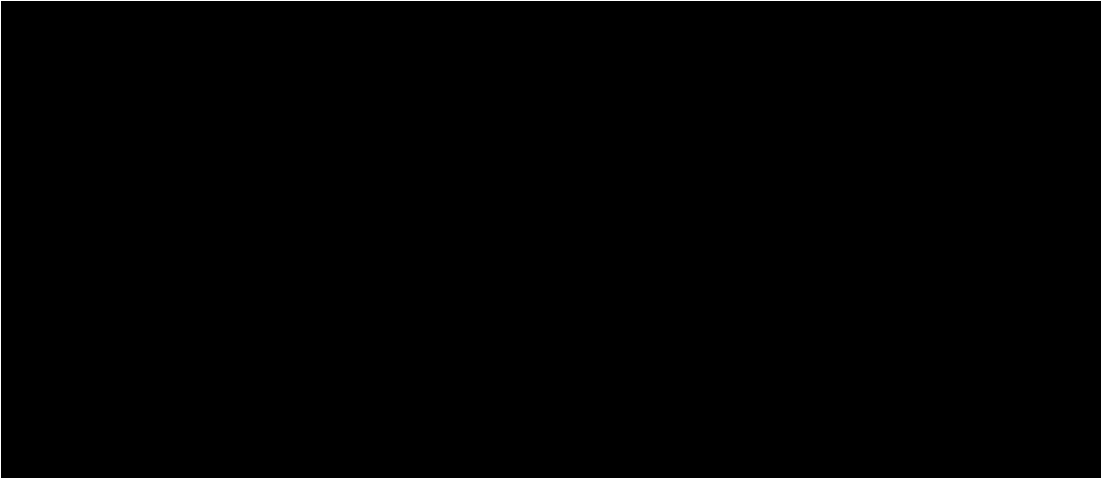


<Figure 1-8-1. 수크로스 처리 시 레몬밤의 전체 무게 변화>



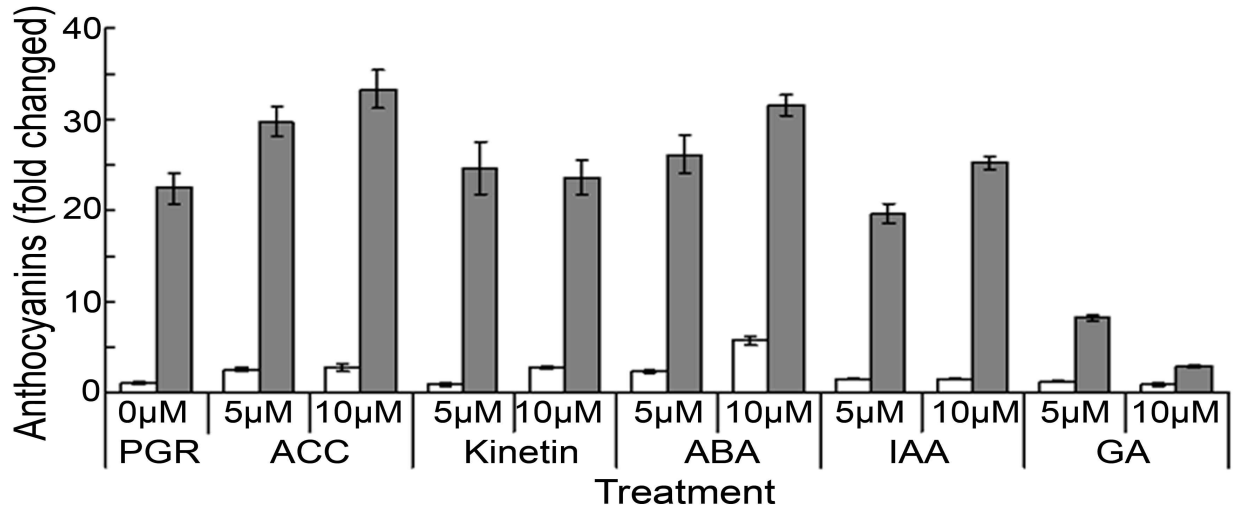
<Figure 1-8-2. 수크로스 처리 시 레몬밤의 엽록체 함량 변화와 단위 면적당 무게>

(9) 안토시아닌 외에도 플라보노이드가 총체적으로 수크로스에 의하여 증가하는 지를 보기 위하여 우리는 수크로스를 농도별로 처리한 레몬밤 샘플에서 얻은 조직을 이용하여 total flavonoid의 양을 측정된 결과 안토시아닌의 결과와 유사한 아래의 결과를 얻게 되었다. 이로써 수크로스의 처리는 레몬밤에서 안토시아닌 뿐만 아니라 total flavonoid의 양까지도 현저하게 증가시킬 수 있다는 결론을 얻게 되었다.



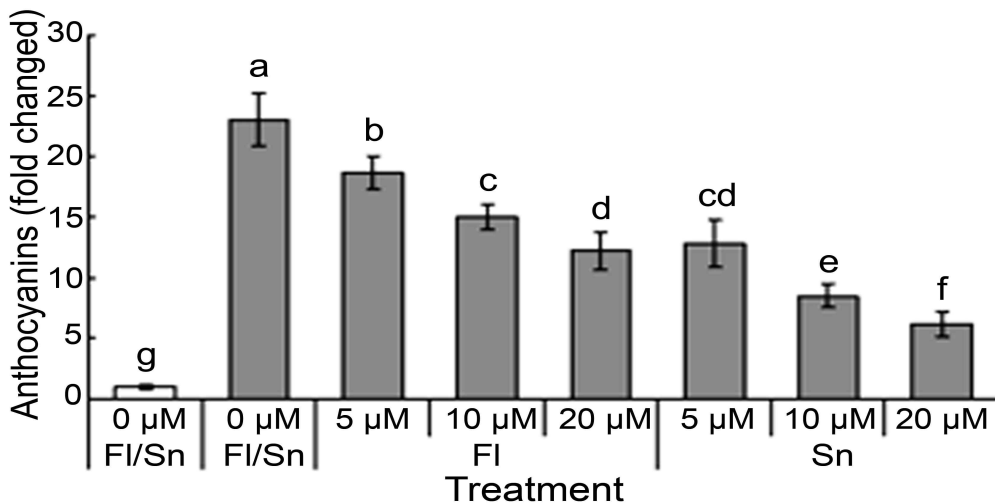
<Figure 1-9. 수크로스 처리 시 레몬밤의 플라보노이드 함량>

(10) 플라보노이드는 또한 식물의 호르몬에 의해서도 그 합성이 조절된다는 보고들이 많이 있다 (Khan, 1980; Leon et al., 2003). 다음으로 우리는 이를 알아보기 위하여 다양한 식물 호르몬을 처리하고 안토시아닌의 축적량이 어떻게 변하는 지를 알아보았다. 아래에 보이는 그림에서처럼 우리는 제일 먼저 에틸렌의 전구체로 알려져 있는 ACC를 0, 5, 10 μM 로 처리하고 이와 함께 수크로스도 처리하여 보았다. 아래의 결과에서 보듯이 우리는 ACC 자체로는 안토시아닌의 축적량에 그다지 큰 영향이 없으나 수크로스를 300mM로 하여 함께 처리할 경우에 더 많은 양의 안토시아닌이 합성됨을 확인하였다. 에틸렌 자체가 식물의 senescence와 관련되기에 우리는 ACC의 처리로 말미암아 식물의 생장이 저해되는 지를 보기 위하여 동일한 조건에서 키운 레몬밤에서 클로로필의 함량에 어떤 변화가 있는 지를 조사하였다(34). 그러나 눈에 띄게 큰 변화는 관찰되지 않았다. 다음으로 우리는 안토시아닌 축적에 미치는 kinetin의 효과를 알아보기 위하여 아래에 보이는 바와 같이 kinetin을 0, 5, 10 μM 로 처리하고 이와 함께 수크로스도 처리하여 보았다(35, 36). 아래의 결과에서 보듯이 우리는 역시 kinetin 자체로는 안토시아닌의 축적량에 그다지 큰 영향이 없으나 수크로스를 300mM로 하여 함께 처리할 경우에 더 많은 양의 안토시아닌이 합성됨을 확인하였다. kinetin 자체가 식물의 생장을 저해시키는 지를 보기 위하여 동일한 조건에서 키운 레몬밤에서 클로로필의 함량에 어떤 변화가 있는 지를 조사하였다. 그러나 눈에 띄게 큰 변화는 관찰되지 않았다. 특이하게 10 μM kinetin의 경우 클로로필 합성을 촉진시키는 것으로 나타났다. 다음으로 우리는 안토시아닌 축적에 미치는 ABA의 효과를 알아보기 위하여 아래에 보이는 바와 같이 kinetin을 0, 5, 10 μM 로 처리하고 이와 함께 수크로스도 처리하여 보았다(Neta-Sharir et al., 2000). 아래의 결과에서 보듯이 우리는 ABA는 단독 처리 시에 약간의 안토시아닌 축적 효과를 보였으며, 수크로스를 300mM로 하여 함께 처리할 경우에 더 많은 양의 안토시아닌이 합성됨을 확인하였다. 역시 클로로필 함량에는 그다지 큰 영향을 보이지 않았다. 이상에서 호르몬의 결과와 다른 종류의 호르몬 결과를 종합하여 그림을 그린 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 즉, 레몬밤 샘플에 호르몬을 단독으로 처리할 경우는 그리 큰 효과가 없지만 수크로스과 함께 처리할 경우에는 플라보노이드 축적에 보다 더 효율적인 효과를 내는 것으로 나타났다. 그 중에서도 ACC와 ABA를 10 μM 로 처리할 경우에 우수한 효과가 있는 것으로 보인다 (Neta-Sharir et al., 2000). 아래 그림에서는 흰색 바는 콘트롤이며 갈색바는 수크로스를 함께 처리한 것이다.



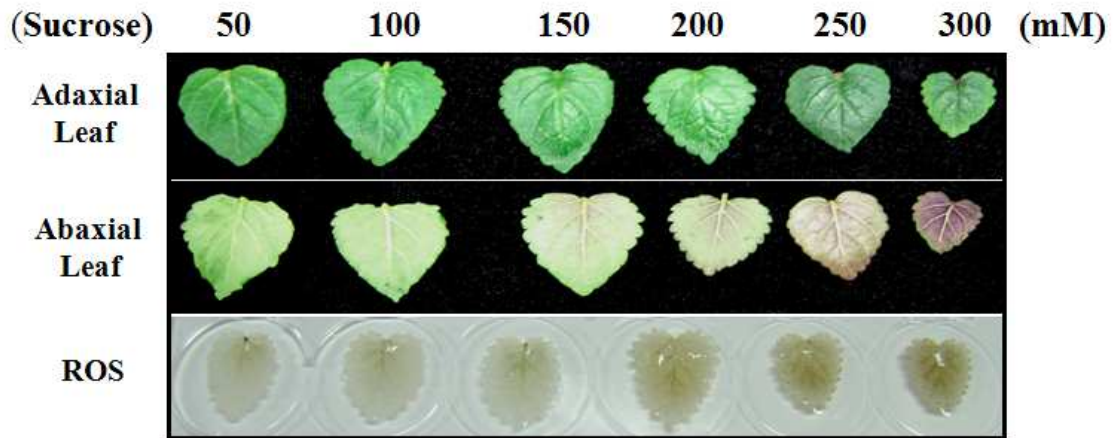
<Figure 1-10. 수크로스와 식물 호르몬 동시 처리 시의 레몬밤에서의 안토시아닌 함량 변화>

(11) 그렇다면 이들 호르몬의 합성을 억제하면 플라보노이드 축적에 어떤 결과가 나타나는 지를 보기 위하여 다음과 같이 수크로스와 함께 이들 ABA 호르몬 합성 억제제인 플루리돈 (FL)과 ACC 합성 억제제인 silver nitrate를 함께 처리한 결과 그 농도에 따라 플라보노이드의 축적량이 줄어드는 것으로 나타났다 (Nagira et al., 2004). 이는 수크로스의 효과가 이들 호르몬에 부분적으로 의존함을 의미한다.



<Figure 1-11. 수크로스와 플루리돈(FI) 혹은 silver nitrate (Sn)을 함께 처리한 후 안토시아닌 함량 변화>

(12) 수크로스 처리가 ROS(reactive oxygen species)를 식물세포에 얼마나 방출시키는 지를 보기 위하여 수크로스를 처리한 후 ROS를 염색한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다. 이는 어느 정도 ROS의 방출량과 안토시아닌의 합성량에 상관관계가 있음을 보여주는 결과라고 하겠다 (Mittler, 2002).



<Figure 1-12. 수크로스 처리 시 레몬밤에서의 안토시아닌 함량 변화를 보여주는 잎의 색도>

(13) 다음으로 우리는 레몬밤에 수크로스를 처리한 후에 생기는 플라보노이드들이 실제로 ROS를 어느 정도 없애는 능력이 있는 지를 보기 위하여 이들 샘플로 ROS scavenging assay를 실시하였다. 수크로스를 처리한 결과 ROS를 없애는 효과가 현저하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 효과는 물론 300mM의 수크로스를 처리하였을 경우에 가장 높은 것으로 나타났다 (Patro et al., 2005). (Van Acker et al., 2000)

Sucrose concentration						
	50mM	100mM	150mM	200mM	250mM	300mM
Scavenging Activity (%)	27.29±0.68	29.93±0.63	55.67±0.36	72.05±0.26	72.94±0.16	73.91±0.18
IC₅₀ Value	583.27±63.08	449.7±43.52	229.87±11.98	60.50 ± 1.57	53.52 ± 2.24	52.93±1.66

<Table 1. 수크로스 처리 시 레몬밤의 ROS scavenging activity>

(14) 현재 레몬밤은 기내 배양을 통하여 영양변식으로 증식시키고 있다. 4 주에 한 번 정도 제일 위 두 잎 바로 아래 부분을 절취하여 새로운 배지에 옮겨주면 1-2 주내로 줄기 부분에서 뿌리가 건강하게 생성되어 나옴이 확인되었다. 이 식물체로부터 다양한 조합의 옥신 계열 및 사이토키닌 계열의 호르몬을 이용하여 레몬밤 허브 캘러스의 고체 배지에서의 배양 조건을 확립하였다. 즉, 1mg/L 농도의 2,4-D와 0.5mg/L BAP 이 있는 배지에서 (암조건) 한 달간 배양하면 우윳 빛깔의 딱딱한 캘러스가 생성되어 나옴이 관찰되었다. 한 달 간격으로 새로운 배지에 옮겨야 하며 조금 시간을 늦출 경우 캘러스가 새까맣게 죽는 것이 관찰되었다. 4 주 간격으로 정확하게 새 배지에 옮겨주는 것이 중요하다고 할 수 있다. 이렇게 얻은 캘러스를 이용하여 우리는 다음과 같이 UV 단독 혹은 수크로스, UV 동시 처리를 한 후 안토시아닌의 양을 측정하였으나 그 차이가 크지 않음을 확인하였다. 이는 플라보노이드와 같은 이차대사산물은 식물이

완전히 분화를 한 뒤에 그 합성 유전자들이 발현하는 데서 기인하는 것으로 보인다, 따라서 우리가 사용한 재료는 캘러스로서 이 세포상태에는 아직 분화가 일어나지 않은 상태라 이차대산물은 많이 합성하지 않으며 이는 긍정적인 자극들을 처리해도 별 차이가 없는 것으로 결론지을 수 있다고 보여진다.



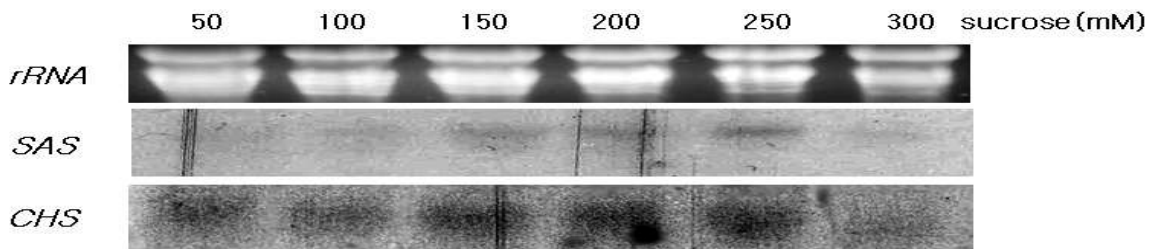
<Figure 1-14. 레몬밤 조직 배양과 캘러스 형성>

(15) 우리는 또한 최근에 수크로스를 처리한 샘플로 EST 분석을 실시하고 있다. 아래에 보이는 그림에서처럼 현재 약 1000개의 EST를 확보하였으며 full length가 확보된 것도 많이 존재한다. 우리는 이 중에서 우선적으로 보이는 transcription factor를 클로닝하는 중에 있으며 현재 그의 characterization이 진행 중에 있다. 이들 결과는 추후 연구 성과 등록 시에 반영될 것이다 (Rolland et al., 2002; Rook et al., 2003; Smeekens, 2000; Solfanelli et al., 2006; Teng et al., 2005).

1	e_value	ry	len	get_access	target_description	r_percent
2	1.10E-17	1764	176204	AC119151.1	Homo sapiens chromosome 5 clone CTD-2582L22, complete sequence	3.17
3	4.30E-17	1764	58001	AC092978.10	Homo sapiens 3 BAC RP11-340E6 (Roswell Park Cancer Institute Human BAC Library) complete sequence	2.69
4	1.70E-16	1764	227835	AC141426.3	Mus musculus BAC clone RP23-28014 from chromosome 12, complete sequence	3.29
5	1.70E-16	1764	227595	AC111275.4	Rattus norvegicus 4 BAC CH230-49L22 (Children's Hospital Oakland Research Institute) complete sequence	3.29
6	6.70E-16	1764	246021	AL663037.13	Mouse DNA sequence from clone RP23-103K12 on chromosome 4 Contains the 5' end of the Fhd1 gene for forkhead-associated (FHA) phosphatase	3.00
7	3.45E-01	1104	16791	AM452978.2	Vitis vinifera contig VV78X02991311, whole genome shotgun sequence	2.08
8	1.36E+00	1104	151730	AC137619.3	Oryza sativa Japonica Group chromosome 5 clone OSJNBa0095J22, complete sequence	1.99
9	1.36E+00	1104	181363	BX323030.5	Zebrafish DNA sequence from clone DKEYP-77D7 in linkage group 1, complete sequence	1.99
10	1.36E+00	1104	80472	AC007945.3	Genomic sequence for Arabidopsis thaliana BAC F28C11 from chromosome I, complete sequence	1.99
11	1.36E+00	1104	177660	BX276188.11	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-245A19, complete sequence	1.99
12	1.60E-09	1186	1807	EF147323.1	Populus trichocarpa clone WS0122_K01 unknown mRNA	4.81
13	1.52E-03	1186	1615	BX823639.1	Arabidopsis thaliana Full-length cDNA Complete sequence from clone GSLTLS5ZF05 of Adult vegetative tissue of strain col-0 of Arabidopsis thaliana	3.29
14	1.52E-03	1186	1696	BX822581.1	Arabidopsis thaliana Full-length cDNA Complete sequence from clone GSLTFB4ZH06 of Flowers and buds of strain col-0 of Arabidopsis thaliana	3.29
15	1.52E-03	1186	71327	AP001300.1	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 3, BAC clone:F5N5	3.29
16	1.52E-03	1186	1891	BT003335.1	Arabidopsis thaliana unknown protein (A13g22970) mRNA, complete cds	3.29
17	1.20E-80	916	1372	AY094446.1	Arabidopsis thaliana AT5g36790/fsh8_20 mRNA, complete cds	63.76
18	1.20E-80	916	1089	AY122899.1	Arabidopsis thaliana AT5g36790/fsh8_20 mRNA, complete cds	63.76
19	1.20E-80	916	1443	NM_123027.3	Arabidopsis thaliana ATPGLP1/PGLP1 (2-PHOSPHOGLYCOLATE PHOSPHATASE 1); phosphoglycolate phosphatase (ATPGLP1/PGLP1) mRNA	63.76
20	1.20E-80	916	1345	NM_001125844	Arabidopsis thaliana ATPGLP1/PGLP1 (2-PHOSPHOGLYCOLATE PHOSPHATASE 1)(ATPGLP1/PGLP1) mRNA, complete cds	63.76
21	1.20E-80	916	1544	NM_001125845	Arabidopsis thaliana ATPGLP1/PGLP1 (2-PHOSPHOGLYCOLATE PHOSPHATASE 1)(ATPGLP1/PGLP1) mRNA, complete cds	63.76
22	1.20E-09	879	115904	AC144807.23	Medicago truncatula clone mth2-9f13, complete sequence	11.95
23	1.80E-05	879	1821	X90558.1	Soleracea mRNA for D1 protein C-terminal processing protease	7.05
24	1.80E-05	879	1864	D50595.1	Spinacia oleracea mRNA for C-terminal protease precursor, complete cds	7.05
25	2.73E-01	879	184026	AC022176.6	Homo sapiens chromosome 1, clone RP11-149C3, complete sequence	2.62
26	2.73E-01	879	181250	AC090403.8	Homo sapiens chromosome 18, clone RP11-739N10, complete sequence	2.62
27	1.00E-06	897	2364	AF190655.1	Nicotiana tabacum poly(A)-binding protein (PABP) mRNA, complete cds	8.03
28	1.00E-06	897	32259	AM447494.2	Vitis vinifera contig VV78X02498311, whole genome shotgun sequence	4.46
29	5.00E-06	897	68912	AM458214.2	Vitis vinifera contig VV78X07358719, whole genome shotgun sequence	5.24
30	2.89E-04	897	2392	XM_001780477	Physcomitrella patens subsp. patens predicted protein (PHYPADRAFT_108547) mRNA, complete cds	5.35
31	1.14E-03	897	106896	AC074375.7	Homo sapiens BAC clone RP11-729M8 from 2, complete sequence	3.01
32	8.10E-11	917	18818	AM434695.1	Vitis vinifera, whole genome shotgun sequence, contig VV78X1192467, clone ENTAV 115	6.43
33	1.17E-03	917	72698	AB007645.1	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, TAC clone:K8K14	5.13
34	1.17E-03	917	1175	AF360127.1	Arabidopsis thaliana unknown protein (A15g67370) mRNA, complete cds	5.13
35	1.17E-03	917	1015	AY051028.1	Arabidopsis thaliana unknown protein (A15g67370) mRNA, complete cds	5.13
36	1.17E-03	917	1175	NM_126137.3	Arabidopsis thaliana unknown protein (AT5G67370) mRNA, complete cds	5.13
37	1.60E-67	878	1549	X75088.1	Nicotiana tabacum mRNA for phosphate translocator	46.81
38	1.80E-42	878	993	X92656.1	Lesculentum mRNA for triose phosphate translocator	25.51
39	7.20E-42	878	1496	X68077.1	P. sativum mRNA for phosphate translocator	46.81
40	4.40E-40	878	1501	BT013330.1	Lycopersicon esculentum clone 135053F, mRNA sequence	25.51
41	1.80E-39	878	1490	X54639.1	P. sativum mRNA for chloroplast import receptor p36	46.81
42	1.70E-07	507	194418	BX001055.11	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-87M5 in linkage group 9 Contains the pth2 gene for parathyroid hormone receptor 2, the 3' end of	8.88
43	1.00E-05	507	206964	BX664610.10	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-11N6 in linkage group 22 Contains the 5' end of the gene for a novel protein similar to vertebrate	5.92
44	1.00E-05	507	163978	BX110984.15	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-05M17 in linkage group 1, complete sequence	5.92

<Figure 1-15. 수크로스 처리 후 얻은 레몬밤의 EST>

(16) 이러한 유전정보를 바탕으로 우리는 수크로스 처리 시에 어떤 유전자들이 증가하는 지를 보기 위하여 EST 등과 모델 식물에서 유추한 정보를 이용하여 수 많은 노던을 실시한 결과 아래와 같은 일련의 결과를 얻었다. S-adenosyl methionine, galactinol synthase, 그리고 프라보노이드 합성에 직접적인 기능을 하는 chalcone synthase가 수크로스 처리 시에 그 발현이 증가하는 것으로 나타났다. S-adenosyl methionine, galactinol synthase는 레몬밤에서는 처음으로 보고되는 유전정보로서 중요한 의의를 가진다고 하겠다.



<Figure 1-16. 수크로스 처리에 따른 레몬밤 chalcone synthase의 발현 양상>

제 2 절: 제2세부 과제 연구내용 및 결과

1. 레몬밤 잎 및 껍질로부터 비휘발성 이차대사산물 추출 및 분석방법 확립

가. 재료 및 방법

(1) 레몬밤 재료

수확된 레몬밤의 잎을 액체 질소에서 quenching 시켜서 초저온 냉동고에서 -80°C 로 동결 저장하면서 분석용 시료로 사용하였다.

(2) LC/MS/MS 분석방법

허브에 함유된 폴리페놀 성분의 정성 및 정량에 사용한 liquid chromatography tandem mass spectrometer(LC/MS/MS)는 Quattro Micro (Micromass UK Ltd, Manchester, UK)를 사용하였으며, 이때 이온화 방법은 electrospray negative ionization(ESI-)를 사용하였고, HPLC는 Sykam S2100 Solvent Delivery System(Sykam, Germany)을 사용하였다. 허브 추출물 시료를 0.45 μm hydrophilic membrane filter(Sartorius, Germany)를 통과시킨 후 LC(Sykam, Germany)/ MS/MS(Micromass UK Ltd, Manchester, UK)로 분석하였다. 시료에서 protocatechuic acid, caffeic acid 그리고 rosmarinic acid를 Aqua C₁₈ HPLC column(2.0mm \times 250mm \times 5 μm , Phenomonex, Torrance, CA, U.S.A.)으로 분리하였다. 이때 이동상은 50% methanol과 0.1% acetic acid를 함유한 수용액을 사용하였다. 이동상의 유속은 0.2 ml/min이고 주입한 시료의 양은 20 μl 이었다. Etrospray 조건은 다음과 같다. capillary voltage, 3.9 kV; cone voltage, 20 V; collision energy, 12 V; source temperature, 120 $^{\circ}\text{C}$ desolvation temperature, 240 $^{\circ}\text{C}$ desolvation gas flow rate, 650 L/h with nitrogen; Argon gas pressure, 6.77×10^{-4} mbar used as collision gas. Protocatechuic acid, caffeic acid 그리고 rosmarinic acid을 얻고 각각에 대해 daughter ion scan을 하여 multiple reaction monitoring(MRM) 조건을 설정하고 이를 이용하여 정성분석을 실시하였다. 이때 Protocatechuic acid의 parents ion은 153.0 m/z, caffeic acid의 product ion은 179.2 m/z 그리고, rosmarinic acid의 product ion은 359.3 m/z을 사용하였다. 표준품을 통하여 HPLC에서 retention time 3가지 물질을 정성분석하고 이어 정량분석 하였으며, 다시 LC-tandem mass spectrometer를 이용하여 정성 분석하였다. LC/MS/MS의 작동조건은 protocatechuic acid, caffeic acid, rosmarinic acid는 각각 Table 2.1, 2.2, 2.3과 같았다.

Table 2.1 Operating conditions of LC/ESI/MS/MS for protocatechuic acid

Parameters	Conditions
Tandem mass spectrometer	Quattro micro, Manchester, U.K.
Capillary (kV)	3.2
Cone (V)	12
Extractor(V)	2
RF Lens (V)	0.2
Source Temperature (°C)	120
Desolvation Temperature (°C)	200
Desolvation gas flow (L/hr)	650
Collision energy	12 V
Collision gas	Ar
Gas Cell pressure (mbar)	8×10^{-4}
Transition Mass (m/z)	153.0 > 109.0
Ionization mode	ESI-
Function type	MRM (Multiple Reaction Monitoring)

Table 2.2 Operating conditions of LC/ESI/MS/MS for caffeic acid

Parameters	Conditions
Tandem mass spectrometer	Quattro micro, Manchester, U.K.
Capillary (kV)	3.2
Cone (V)	12
Extractor(V)	2
RF Lens (V)	0.2
Source Temperature (°C)	120
Desolvation Temperature (°C)	200
Desolvation gas flow (L/hr)	650
Collision energy	12 V
Collision gas	Ar
Gas Cell pressure (mbar)	8×10^{-4}
Transition Mass (m/z)	179.2 > 135.2
Ionization mode	ESI-
Function type	MRM (Multiple Reaction Monitoring)

Table 2.3 Operating conditions of LC/ESI/MS/MS for rosmarinic acid

Parameters	Conditions
Tandem mass spectrometer	Quattro micro, Manchester, U.K.
Capillary (kV)	3.2
Cone (V)	12
Extractor(V)	2
RF Lens (V)	0.2
Source Temperature (°C)	120
Desolvation Temperature (°C)	200
Desolvation gas flow (L/hr)	650
Collision energy	17 V
Collision gas	Ar
Gas Cell pressure (mbar)	8×10^{-4}
Transition Mass (m/z)	359.3 > 161.1
Ionization mode	ESI-
Function type	MRM (Multiple Reaction Monitoring)

(3) HPLC 이용 폴리페놀산의 정량분석방법

본 실험에 사용된 HPLC 시스템은 Agilent 1100(Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)으로서 quaternary pump, micro degasser, variable wavelength detector, refraction index detector, HPLC Chemstation software, column compartment, manual injector로 구성되어 있다. 각각의 injection 샘플 ($20\mu\text{l}$)은 Hypersil ODS column(Hypersil ODS, $5\mu\text{m}$, $4.6 \times 100\text{mm}$, Thermo Electron Corporation, Bellefonte, PA)에 주입하여 분석되었다. Mobile Phase 2 중(A, B)을 사용하여 gradient 조건으로 용출을 실시하였고, 이동상 A의 경우 100% Methanol, B의 경우 0.5% Acetic acid in water를 사용하였다. Gradient 조건은 다음과 같다. 0-10분, Isocratic 95% B; 10-40분, 95-25%B. 이동상의 Flow rate는 1.0 ml/min , Column compartment의 온도는 20°C , 280 nm 에서 분석하였다. Calibration curve 작성을 위한 caffeic acid(99.8%), rosmarinic acid(98.5%)은 (이상 Sigma, USA) 시료를 메탄올 용액 (water: methanol = 50:50, v/v)에 용해시켜 표준물질로 사용하였다. 이를 통해 HPLC에서 분석된 각 시료들의 peak 면적을 농도로 환산하여 최종적으로 정량하였다.

(4) HPLC 이용 anthocyanin의 정량분석방법

Sample을 extraction solvent (Methanol : Acetate : Water = 9:1:10)로 추출한 후 HPLC (Agilent 1100)으로 분석한다. Column은 Hypersil ODS column (Hypersil ODS, $5\mu\text{m}$, $4.6 \times 100\text{mm}$, Thermo Electron Corporation, Bellefonte, USA)을 이용하고 oven 온도는 25°C 로 유지시킨다. 이동상은 아래 Table 2.4와 같다. Injection volume은 $50\mu\text{l}$ 이고, wavelength는 320nm - 520nm 를 이용하여 분석한다.

Table 2.4 Solvent gradient system used in HPLC analysis

Time	CH ₃ CN-H ₂ O-TFA (10:90:0.1)	CH ₃ CN-H ₂ O-TFA: (90:10:0.1)
0	100	0
40	60	40
40.1	0	100
45	0	100
45.1	100	0
52	100	0

(5) 허브로부터 폴리페놀산의 추출조건 최적화

추출 온도와 시간의 일정한 조건을 위해 진탕 항온 수조(shaking water bath)를 사용하였고, LC/MS/MS 를 사용하여 분석한 유효함재성분인 rosmarinic acid를 타겟으로 하여 액체크로마토그래피를 이용하여 정량 분석을 실시하였다. 분쇄한 레몬밤 1g에 20ml의 용매를 넣고 진탕 항온 수조에서 100rpm으로 열수 추출을 한다. 그 후 poresize 5um의 여과지를 이용하여 용매를 거르고 초고속 원심분리기에서 13000rpm으로 10분간 원심분리하고 상등액을 pore size 0.45um의 sywinge filter로 여과한 후 LC vial로 옮긴다. 그 후 20ul를 HPLC injector에 주입하고 분석한다.

나. 결과 및 고찰

(1) LC/MS/MS을 이용한 레몬밤(lemon balm)의 비휘발성 성분의 동정

우선 Figure 2.1에 제시된 바와 같이 레몬밤의 메탄올 수용액 추출물에서는 3가지의 주요한 페놀산(phenolic acid) 성분의 피크를 확인할 수 있었다. 각 성분이 들어 있는 분획을 HPLC를 이용하여 분리하여 각 피크에 해당하는 화합물을 LC/MS/MS로 분석 한 결과, Figure 2.2에서 보는 바와 같이 분자량 154의 procatechuic acid를 동정하였고, Figure 2.3에서 보는 바와 같이 분자량 180 의 caffeic acid, Figure 2.4에서 보는 바와 같이 분자량 360 의 rosmarinic acid를 동정하였다.

이렇게 동정된 각 화합물들은 Figure 2.1에서 보는 것처럼 각 동정된 각 화합물들의 표준물질의 크로마토그램과 비교하였을 때 retention time이 모두 일치하여 LC/MS/MS에서 결정된 구조가 옳음을 확인할 수 있었다. 그리고 Figure 2.1의 크로마토그램에 나타난 각 성분의 피크의 면적을 통하여 레몬밤에 procatechuic acid가 가장 적게 존재하고, caffeic acid가 그 다음으로 존재되며, rosmarinic acid가 가장 많이 존재하는 것을 알 수 있었다(레몬밤에 존재하는 양 : procatechuic acid < caffeic acid < rosmarinic acid). 각 성분의 구조식 및 일반 화합물명은 Table 2.5에 제시하였다.

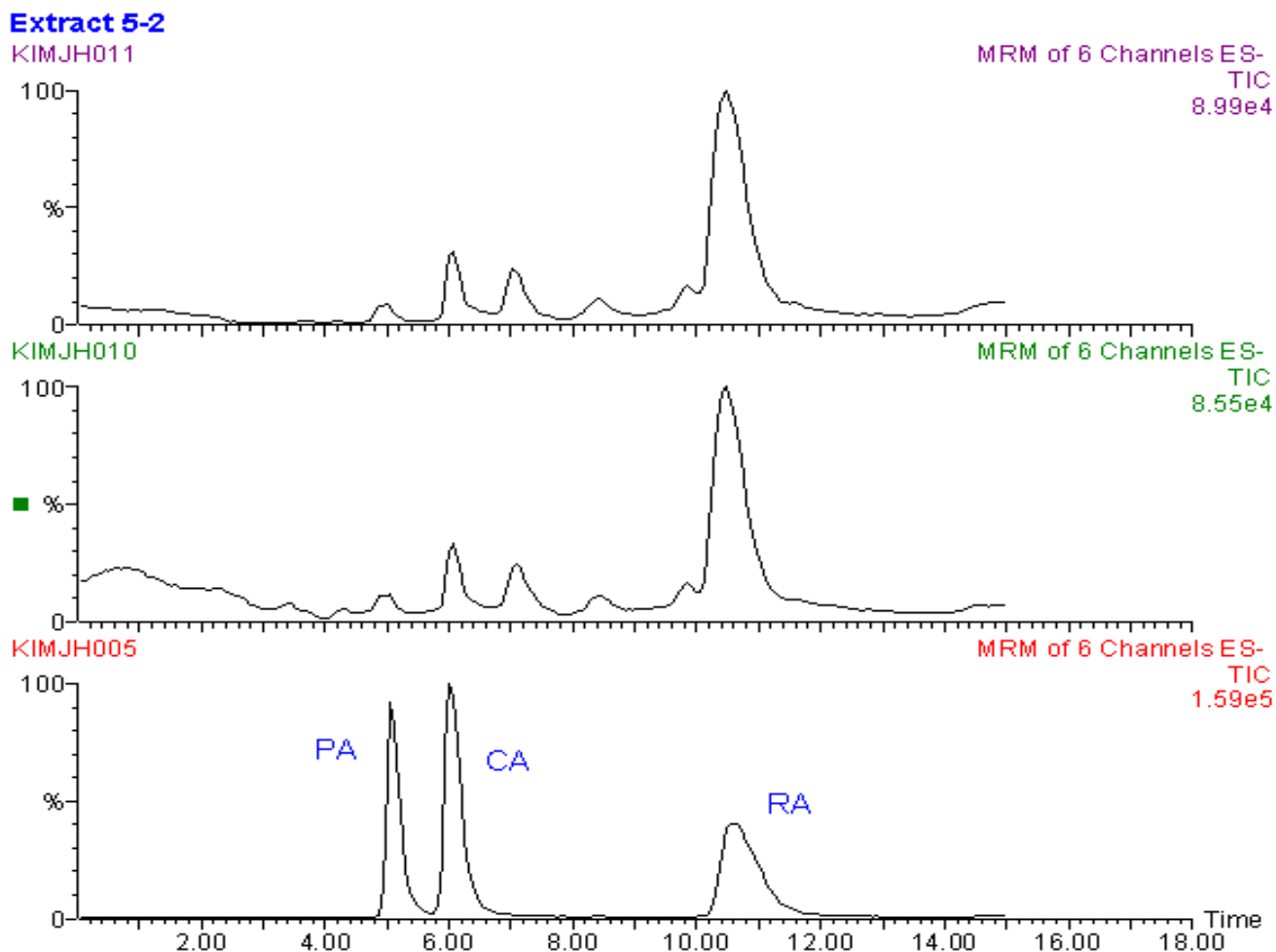


Figure 2.1 Chromatograms of aqueous methanol extracts of lemon balm(top and middle) and standards (PA, procatechuic acid; CA, caffeci acid; RA, rosmarinic acid)

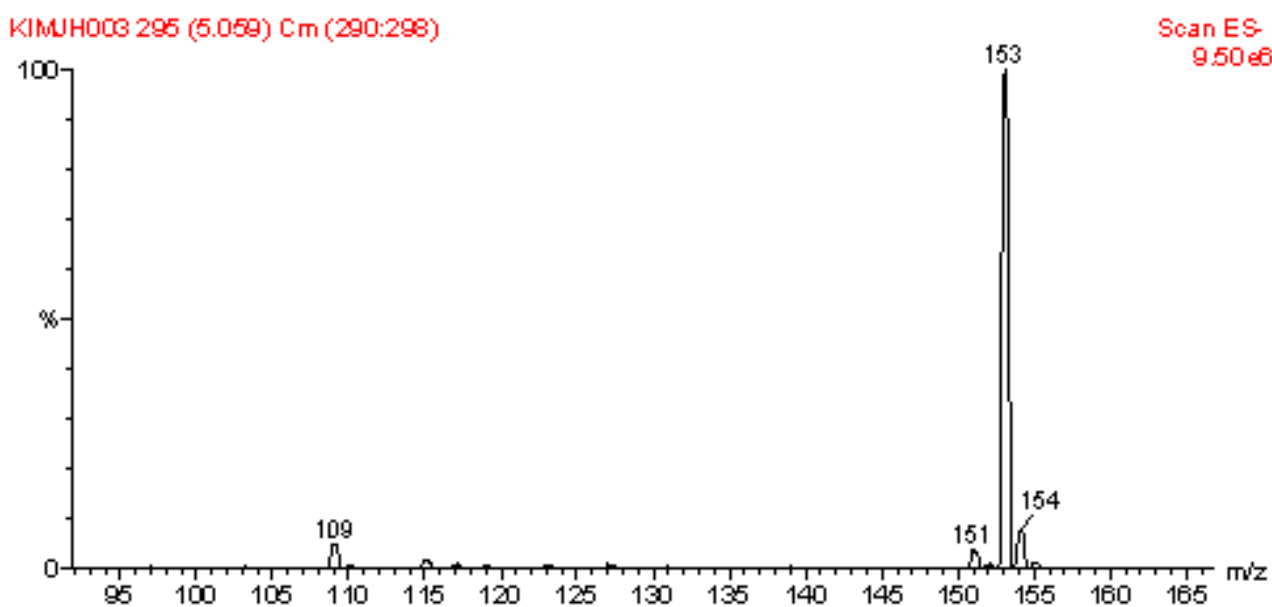


Figure 2.2 Mass spectrum of procatechuic acid in aqueous methanol extract lemon balm

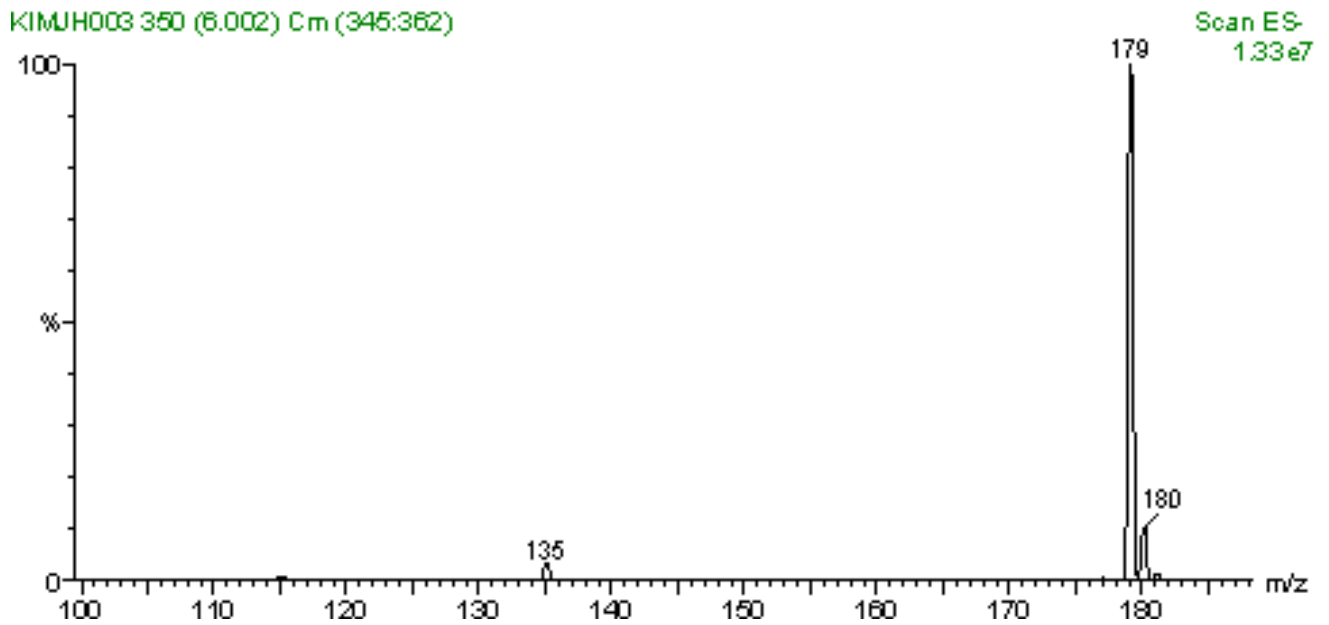


Figure 2.3 Mass spectrum of caffeic acid in aqueous methanol extract lemon balm

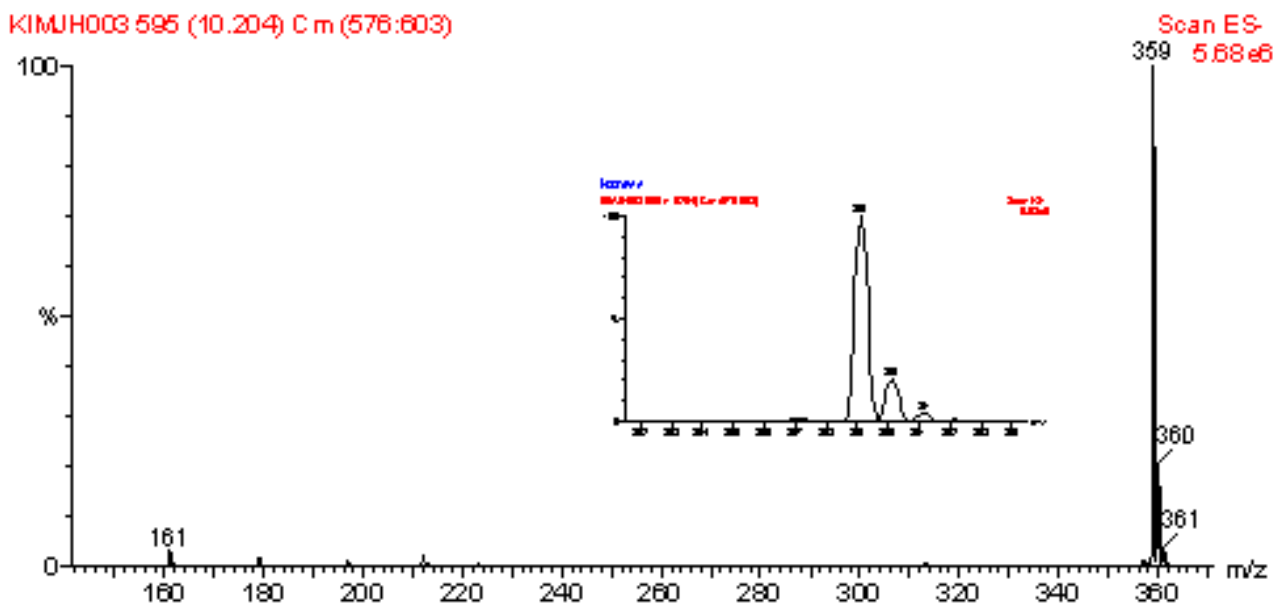
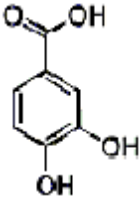
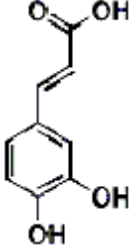
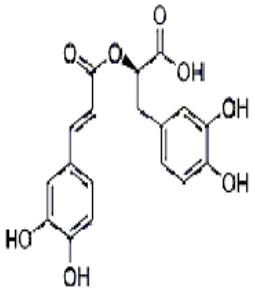


Figure 2.4 Mass spectrum of rosmarinic acid in aqueous methanol extract of lemon balm

Table 2.5 Structure and formula weight of polyphenolic acids found in aqueous extract of lemon balm

	Protocatechuic acid	Caffeic acid	Rosmarinic acid
Synonym	3,4-Dihydroxybenzoic acid	3,4-Dihydroxycinnamic acid	(R)-O-(3,4-Dihydroxy-cinnamoyl)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)lactic acid
Molecular Formula	$(HO)_2C_6H_3CO_2H$	$(HO)_2C_6H_3CH=CHCO_2H$	$C_{18}H_{16}O_8$
Formula Weight	154.12	180.16	360.31
Structure			

(2) 레몬밤으로부터 폴리페놀산의 추출 조건(용매의 종류, 양, 추출 온도, 추출 시간 등)의 최적화

최적 추출 조건을 찾기 위하여 용매의 종류, 용매의 농도, 추출 온도, 추출 시간을 달리하여 실험하였다.

(가) 최적 추출 용매 선택

레몬밤에 존재하는 폴리페놀 성분의 최적 추출 조건을 찾기 위하여 우선 추출 용매에 따른 폴리페놀 산의 추출량 변화를 비교하였다. 각 추출 용매에 따른 비교를 위해 Water, MeOH 60%, EtOH 60%, Isopropanol 60%, Acetone 60%의 용액으로 비교 실험하였으며, 동일한 조건에서 추출 용매에 따른 영향만을 고려하기 위해 25℃에서 건조 시료 1.0 g을 용액 20 ml에 넣어 30분간 추출하였다.

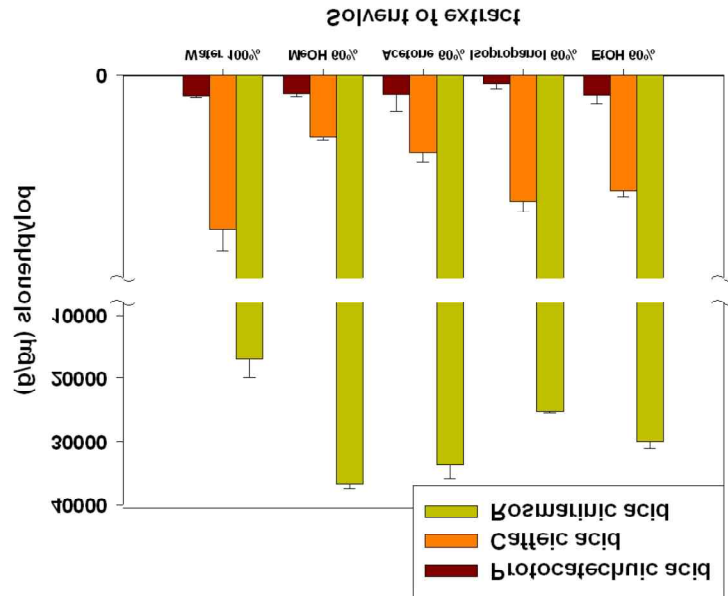


Figure 2.5 Effects of extraction solvents on the recovery yields of protocatechuic acid (PA), caffeic acid (CA) and rosmarinic acid (RA), extracting conditions: 25°C; 30 min ; 1g/20ml.

Figure 2.5은 추출 용매에 따른 각 성분의 추출량을 비교한 그래프이다. 그래프를 보면 메탄올이 다른 용매 보다 더 효과적임을 알 수 있다. Caffeic acid의 경우 Water에서 많이 추출 되었으나, 주 타겟 물질이 Rosmarinic acid이기 때문에 rosmarinic acid가 가장 많이 추출된 메탄올이 효과적 추출 용매라고 말할 수 있다. 이는 메탄올의 극성이 다른 용매보다 높기 때문에 이는 극성 차이로 인한 용매 간 추출량의 차이라고 생각된다.

(나) 최적 추출 용매 농도의 선택

레몬밤에 존재하는 protocatechuic acid, caffeic acid과 rosmarinic acid는 치환될 수 있는 수산기를 가진 방향족 고리 구조를 가지고 있다(Table 2.1을 참고). 서로 비슷한 구조를 가지고 있지만(rosmarinic acid는 caffeic acid로 분리 될 수 있다.) 각각의 극성에 따른 최적 추출 조건을 고려해 주기 위하여 메탄올의 농도를 달리하여 최적 추출 실험을 Figure 2.9와 같이 수행하였다. 메탄올은 20%, 40%, 60%, 80%로 각각의 용액 20 ml에 건조 시료 1 g씩을 넣어 25°C에서 30 분간 추출하였다.

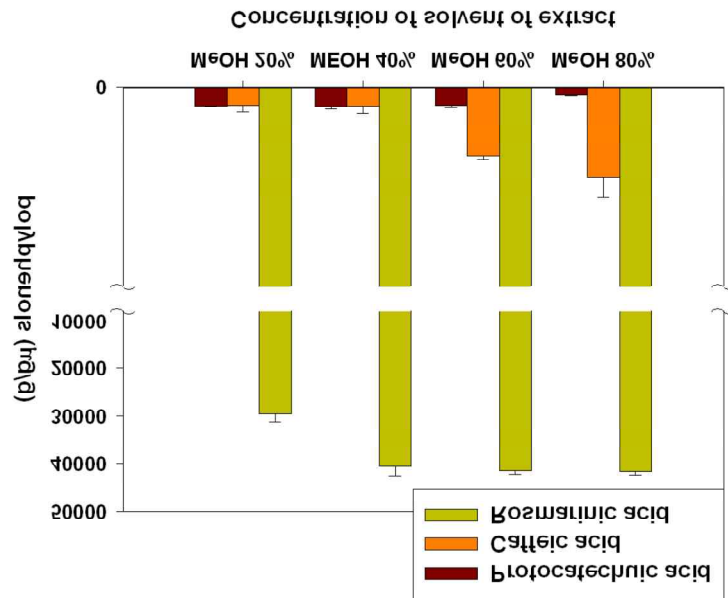


Figure 2.6 Effects of the concentration of extraction solvents on the recovery yields of protocatechuic acid (PA), caffeic acid (CA) and rosmarinic acid from lemon balm (extraction conditions: 25°C; 30 min; 1 g/20 ml).

Figure 2.6에서 보는 것처럼 caffeic acid와 rosmarinic acid 각각의 성분이 모두 메탄올 80%에서 추출이 가장 잘 되는 것을 볼 수 있다. Protocatechuic acid는 MeOH 40%에서 가장 많이 추출 되었으나, 큰 변화가 없음을 알 수 있다. 특히, protocatechuic acid, caffeic acid보다 rosmarinic acid에서 메탄올의 농도에 영향을 더 많이 받는 것을 볼 수 있는 데, 레몬밤에 존재하는 rosmarinic acid가 protocatechuic acid와 caffeic acid의 극성보다 더 낮기 때문에 메탄올의 농도가 높을수록 추출에 더 많은 영향을 받는 것으로 생각된다. 각 성분의 추출 용매의 메탄올 농도가 100%에 가까울수록 용매와 column 간의 친화력이 강해져서 peak에 loading 현상이 나타나 정확한 분석에 영향을 주었다. 위 실험을 통해 레몬밤의 유효 polyphenolic acids의 최적 추출 용매의 농도는 MeOH 80% 용액이 가장 추출에 적합한 것으로 결정되었다.

(다) 최적 추출 온도의 선택

최적 추출 용매의 결정에 이어 최적 추출 온도를 고려해 비교 실험하였다. 각각의 추출 온도는 25°C, 35°C, 45°C, 55°C 로 하였다. 최적 추출 온도 또한 온도에 의한 영향만을 비교하기 위하여 80%의 메탄올 용액으로 건조 시료 1.0 g을 용액 20 ml에 넣어 30 분간 추출하였다. Figure 2.7에서 보는 것과 같이 caffeic acid와 rosmarinic acid는 55°C에서 가장 많이 추출됨을 볼 수 있다. 물질의 용해도는 온도의 변화에 따라 달라지는데 고체의 용해도는 온도가 상승함에 따라 증가하기 때문이다. polyphenolic acids 역시 온도에 따라 용해도가 증가되어 온도가 높을수록 많이 추출 되었다. 최적 추출 온도 비교 실험을 통해 레몬밤의 유효 잠재 성분의 최적 추출 온도를 55°C로 결정하였다.

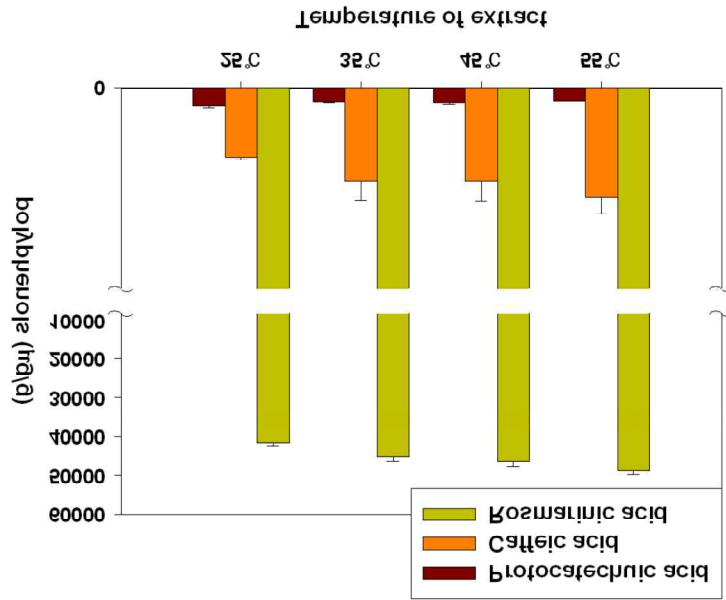


Figure 2.7 Effects of extraction temperatures on the recovery yields of protocatechuic acid (PA), caffeic acid (CA) and rosmarinic acid (extracting conditions: Methanol 80%; 30 min.; 1 g/20 ml).

(라) 최적 추출 시간의 선택

마지막으로 동일한 조건에서 추출 시간에 따른 효과만을 고려하기 위해 55°C, 80% 메탄올 용액으로 건조 시료 1.0 g을 용액 20 ml에 넣어 추출하였다. Figure 2.8에서 보는 것과 같이 LC/MS를 이용하여 동정한 protocatechuic acid, caffeic acid와 rosmarinic acid의 각각의 추출 시간에 따른 추출량을 분석해본 결과 추출 후 시간이 경과함에 따라 60분 이후부터는 많은 가용성 성분들이 추출 평형에 도달함을 추정할 수 있다. 따라서 레몬밤의 추출시간은 60분으로 잡았다. 다른 factor와 달리 시간에 따른 추출량의 변화는 크게 없음을 볼 수 있다.

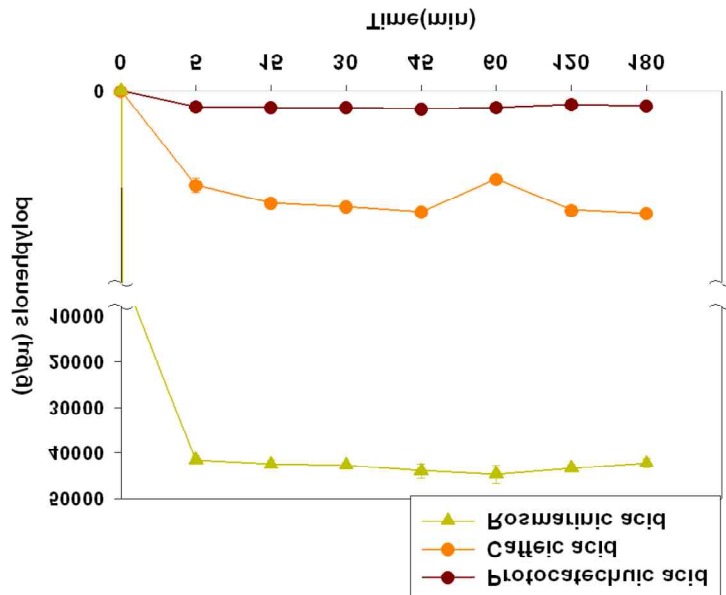


Figure 2.8 Effects of extraction time on the recovery yields of protocatechuic acid (PA), caffeic acid (CA) and rosmarinic acid (RA) (extracting conditions: MeOH 80%; 55°C; 30min. ; 1 g/20 ml).

위의 실험 결과를 바탕으로 레몬밤의 유용 polyphenolic acids (protocatechuic acid, caffeic acid, rosmarinic acid) 성분의 최적 추출 조건은 메탄올 80% 용액으로 55°C에서 60 분간 추출 하는 것이 가장 최적 조건임을 확인할 수 있었다(Table 2.6).

Table 2.6 Optimum extraction conditions for the aqueous methanol extraction of polyphenolic acids from lemon balm

Item	Condition
Solvent	80% MeOH (v/v)
Temperature	55°C
Time	60 minutes
Yield	Protocatechuic acid : $83.83 \pm 16.11 \mu\text{g/g}$ dry weight
	Caffeic acid : $457.93 \pm 23.96 \mu\text{g/g}$ dry weight
	Rosmarinic acid : $44692.96 \pm 1901.68 \mu\text{g/g}$ dry weight

2. 돌연변이 허브 캘러스로부터 비휘발성 이차대사산물 추출 및 LC/MS 이용 대사체 분석 및 다변량 분석

가. 재료 및 방법

(1) 레몬밤 재료

레몬밤을 각각 50 mM, 100mM, 150 mM, 200mM, 250mM, 300 mM의 sucrose 농도에 처리하여, 수확된 레몬밤의 잎을 액체 질소에서 quenching 시켜서 초저온 냉동고에서 -80°C로 동결 저장하면서 분석용 시료로 사용하였다.

(2) 대사체 추출 방법

각각 다른 sucrose 농도로 처리된 레몬밤 50mg을 잘 갈아서 2 ml Eppendorf tube에 넣는다. metabolite의 변화를 막기 위해 0.5 ml의 methanol을 처리하고 잘 섞어준 후 50 ul 의 증류수를 넣고 잘 섞어준다. 그 후 4 °C에서 15분간 잘 섞어준 후 초고속 원심분리기에서 14,000g으로 5분간 원심분리하고 상등액을 pore size 0.45um의 syringe filter로 여과한 후 LC vial로 옮긴다.

(3) LC/MS/MS 분석방법

허브에 함유된 폴리페놀 성분의 정성 및 정량에 사용한 liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometer (UPLC/Q-TOF MS)를 사용하였다. UPLC는 Waters ACQUITY UPLC™ system을 사용하였고, Chromatography는 Waters ACQUITY BEH C₁₈ column (100 x 21. mm, 1.7 μm)에서 수행되어졌다. 이때 이동상은 0.1% formic acid in water 와 0.1% formic acid in acetonitrile을 사용하였다. 이동상의 유속은 0.3 ml/min이고 주입한 시료의 양은 5 ul이었다. Column의 온도는 35°C였으며, autosampler 온도는 15°C였다. Mass spectrometry는 Q-TOF Micro mass detector (Waters, Manchester, UK)를 이용하였다. Etspray 조건은 다음과 같다. capillary voltage, 2.8 kV; sample cone voltage, 35 V; extraction cone voltage, 1.0 V; desolvation temperature, 250°C; source temperature, 100°C; desolvation gas flow rate, 500 L/h. ESI의 mass spectra는 100-1500 m/z에서 얻었다.

(4) 통계분석

얻어진 모든 data는 Waters MassLynx (Ver 4.1)을 사용하여 분석하였다. Noise elimination level은 6.0 으로 설정하였으며, mass와 retention time windows는 0.05 Da, 0.20 min으로 각각 설정하였다. SIMCA-P program (Ver. 11.5, Umetrics, Umea, Sweden)를 이용하여 다변량통계 분석 중 주성분 분석을 실시하여 data 분석을 하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) LC/MS analysis of lemon balm treated with sucrose

Sucrose는 Arabidopsis, Torenia 등 다양한 식물에서 flavonoid 함량의 수준을 높일 수 있다는 많은 연구 결과들이 있다. 다양한 농도의 sucrose를 처리했을 때, 레몬밤의 이차대사산물이 어떻게 변화하는지 보기 위하여 LC/MS 분석을 수행하였다. 다음과 같은 anthocyanin 계통의 metabolite를 확인·동정하였다. malvidin-3-glucoside (MW 493), petunidin-6-acetyl-3-glucoside (MW 521), kaempferol-3-glucoside-7-rhamnoside (MW 594), quercetin-3-glucoside-7-rhamnoside (MW 610), kaempferol-3-rhamnosyl-glucoside-7-rhamnoside (MW 740), cyanidin-3-diglucoside-5-xyloside (MW 743), cyanidin-3-diglucoside-5-glucoside (MW 773), and cyanidin-3-[(caffeoyl)(p-coumaroyl) diglucoside]-5-glucoside (MW 1081).

(2) 통계적 분석을 기반으로 한 이차대사산물의 변화

이차대사산물의 변화를 살펴보기 위해 다변량 통계 분석 방법 중의 하나인 주성분분석 (PCA) 분석을 실시하였다(Sumner *et al.*, Hall *et al.*). PCA 분석 결과 PC1, PC2 score plot을 결합하였을 때, sucrose의 농도에 따라서 확실히 구분되는 것을 확인하였다. sucrose의 농도가 증가할수록 시계방향으로 대사체 pattern이 변하는 것을 확인하였다. 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM sucrose의 농도로 처리한 것은 또한 PC2에 의해서 명백히 구분되는 것을 확인하였으며, 50 mM과 300 mM은 PC3에서 확연히 차이가 나는 것을 알 수 있었다. (Figure 2.9)

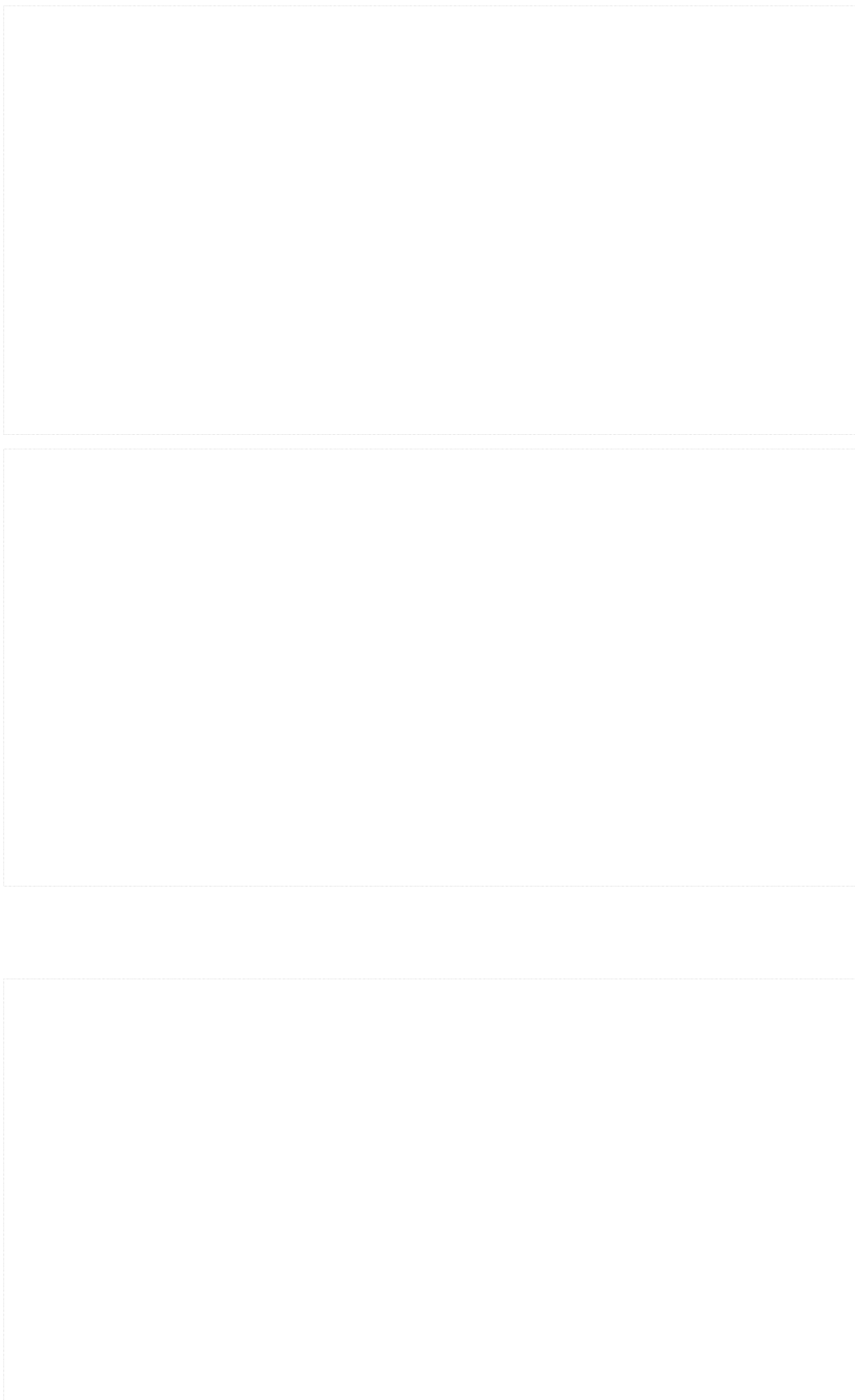


Figure 2.9. Score plot of PCA of pareto scaled metabolite data from *Melissa officinalis* control and plant samples treated with sucrose for different concentration of (a) PC1

(42.0%) and PC2 (22.5%), (b) PC2 and PC3 (12.5%), (c) PC1 and PC3. The ellipse represents the Hotelling T2 with a 95% confidence in the score plot. 50mM (black box): lemon balm treated with 50 mM of sucrose, 100mM (red dot): lemon balm treated with 100 mM of sucrose, 150 mM (blue diamond): lemon balm treated with 150 mM, 200 mM (green star): lemon balm treated with 200 mM of sucrose, 250 mM (orange triangle): lemon balm treated with 250 mM of sucrose, and 300 mM (violet box): lemon balm treated with 300 mM of sucrose.

Score plot에 영향을 미치는 metabolite들의 loading 값을 Figure 2.10. 에 나타내었다. PC1의 positive 하게 영향을 미치는 metabolite는 quercetin-3-glucoside-7-rhamnoside , cyanidine-3-[(caffeoyl)(p-coumaroyl) diglucoside]-5-glucoside과 같으며, negative하게 영향을 미치는 metabolite는 kaempferol-3-glucoside-7-rhamnoside이다. cyanidin-3-diglucoside-5-glucoside는 PC2에 positive 하게 영향을 미치며, quercetin-3-glucoside-7-rhamnoside 은 negative하게 영향을 미친다. PC3에 positive하게 영향을 미치는 metabolite는 petunidin-6-acetyl-3-glucoside 반면, negative 하게 영향을 미치는 metabolite는 cyanidin-3-(caffeoyl)(p-coumaroyl) diglucoside-5-glucoside 이다. Loading plot 과 score plot을 통해, 300 mM sucrose를 처리한 군에서 다른 처리군에 비해 Kaempferol 3-rhamnosyl-glucoside-7-rhamnoside 와 quercetin 3-glucoside-7-rhamnoside 가 더 많았음을 확인할 수 있었으며, 150 mM sucrose로 처리한 군에서는 kaempferol-3-glucoside-7-rhamnoside, cyanidin-3-diglucoside-5-xyloside, cyanidin-3-diglucoside-5-glucoside를 다른 처리군 보다 더 많이 함유하고 있었음을 알 수 있었다.

3. 돌연변이 허브 캘러스로부터 휘발성 이차대사산물 추출 및 GC/MS 이용 대사체 분석 및 다변량 분석

가. 재료 및 방법

(1) 레몬밤 재료

레몬밤을 각각 50 mM, 150 mM, 300 mM의 sucrose 농도에 처리하여, 수확된 레몬밤의 잎을 액체 질소에서 quenching 시켜서 초저온 냉동고에서 -80°C로 동결 저장하면서 분석용 시료로 사용하였다.

(2) 대사체 추출

각각 다른 sucrose 농도로 처리된 레몬밤 50mg을 잘 갈아서 2 ml Eppendorf tube에 넣는다. -20°C 의 metabolite extraction (methanol: chloroform: water = 2.5:1:1) 1 ml을 넣고 내부표준물질로 2 mg/ml의 Sorbitol-¹³C₆ 10ul 을 첨가한다. 30분간 잘 섞어준 후 초고속 원심분리기에서 14,000g으로

5분간 원심분리하고 상등액을 진공 농축기 (NB-503CIR, N-BIOTEK, Bucheon, Korea)에서 완전히 잘 말린다. 말린 샘플을 -80°C 에서 GC/MS 분석하기 전까지 보관한다. 추출된 대사체는 pyridine에 20 mg/ml로 용해시킨 methoxyamine hydrochloride를 50 μl 분주하여 30°C 에서 90 분 동안 반응시킨 후, 80 μl 의 MSTFA (*N*-methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamide)를 첨가해 37°C 에서 30 분간 반응 시켜 유도체화 시킨다.

(3) GC/MS 분석방법

분석에 사용된 GC는 Agilent 7890 GC를, MS는 Agilent 5975 C MSD system (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA)을 이용한다. GC/MS 분석 조건은 아래 Table 2.7과 같다.

Table 2.7 GC/MS analysis conditions

Column	DB-5MS (30 m, 0.25 mm I.D., 0.25 μm film thickness)
Injection temperature	80°C (2 min) \rightarrow ramping ($15^{\circ}\text{C}/\text{min}$) \rightarrow 300°C (10 min)
Acquisition rate	10 spectra/sec
Ionization mode	Electron impact at 70 eV
Ion source temperature	230°C

(4) 통계적 분석을 기반으로 한 대사체 프로파일링

50~600 m/z 범위의 스펙트럼을 Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System Version 3.2 (AMDIS; National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA)를 이용하여 피크 검출과 deconvolution을 수행하였다. 프로세싱된 데이터는 SpectConnect를 이용하여 library에 있는 compound의 질량 스펙트럼과 retention index를 비교함으로써 대사체를 확인 및 동정하였으며, 각각의 대사체의 intensity는 샘플의 내부표준물질의 intensity로 표준화 하였다(Styczynski *et al.*). 또한 표준화한 결과는 SIMCA-P program (Ver. 11.5, Umetrics, Umea, Sweden)을 이용하여 다변량 통계 분석 중 하나인 주성분 분석 (Principal components analysis)과 스튜던트 t -검정법을 통해 각각 비교군에서 차이가 나는 대사 물질을 분석하였다 (Lee & Fiehn, Fiehn *et al.*, Denkert *et al.*)

나. 결과 및 고찰

(1) 대사체 분석과 동정

50 mM, 150 mM, 300 mM sucrose 농도로 각기 처리한 레몬밤을 GC/MS로 분석하였다. 각 샘플을 5반복하여 총 15번의 실험을 수행하였다. GC/MS에 의해서 100 개 이상의 peak이 검출되었으며, 얻어진 GC/MS data를 AMDIS와 Spectconnect를 이용하여 deconvolution과 array 시킨 후 64개의 대사체를 확인, 동정하였다. 확인한 대사체들은 sucrose metabolism, amino acid metabolism, glycolysis, citric acid cycle, shikimate pathway, pentose phosphate

pathway, aspartate metabolism, phenylpropanoids pathsy 등 다양한 metabolism과 metabolic pathway의 중간 대사물질들이다. 이것을 화학 구조에 따라 구분하여 아래 Table2.8에 나타내었다.

Table 2.8 Detected and identified metabolites of *Melissa officinalis* byGC/MS and the Golm metabolome database

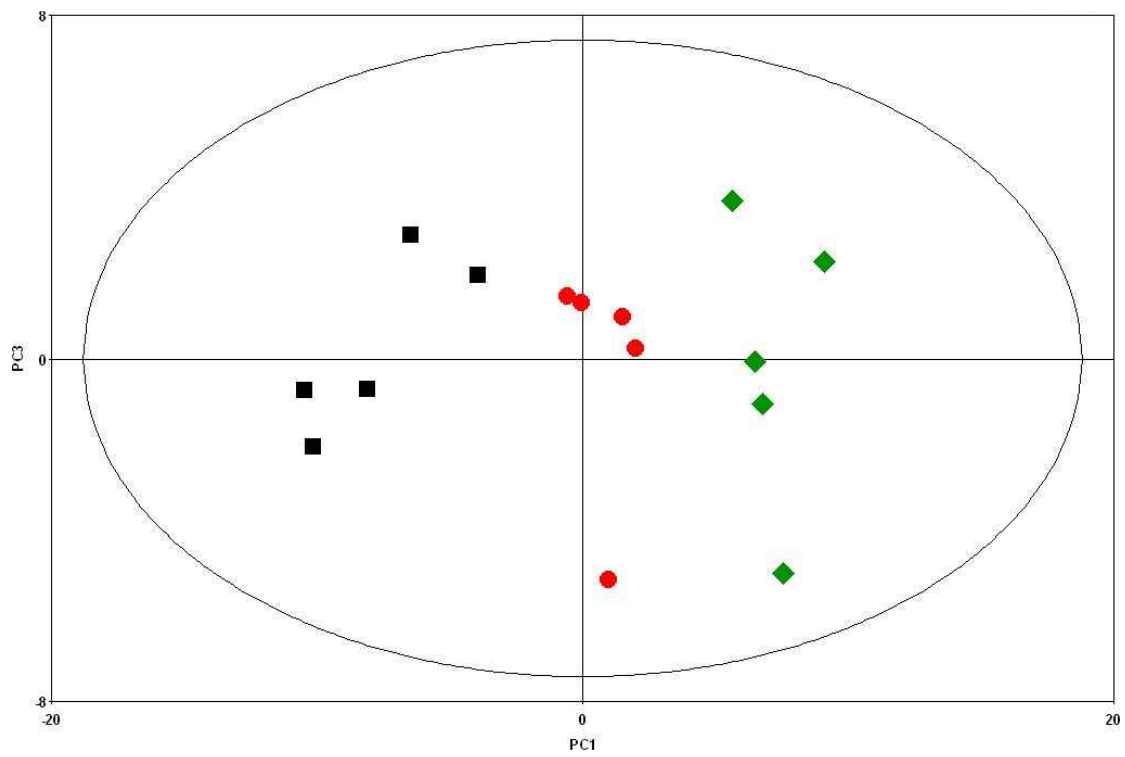
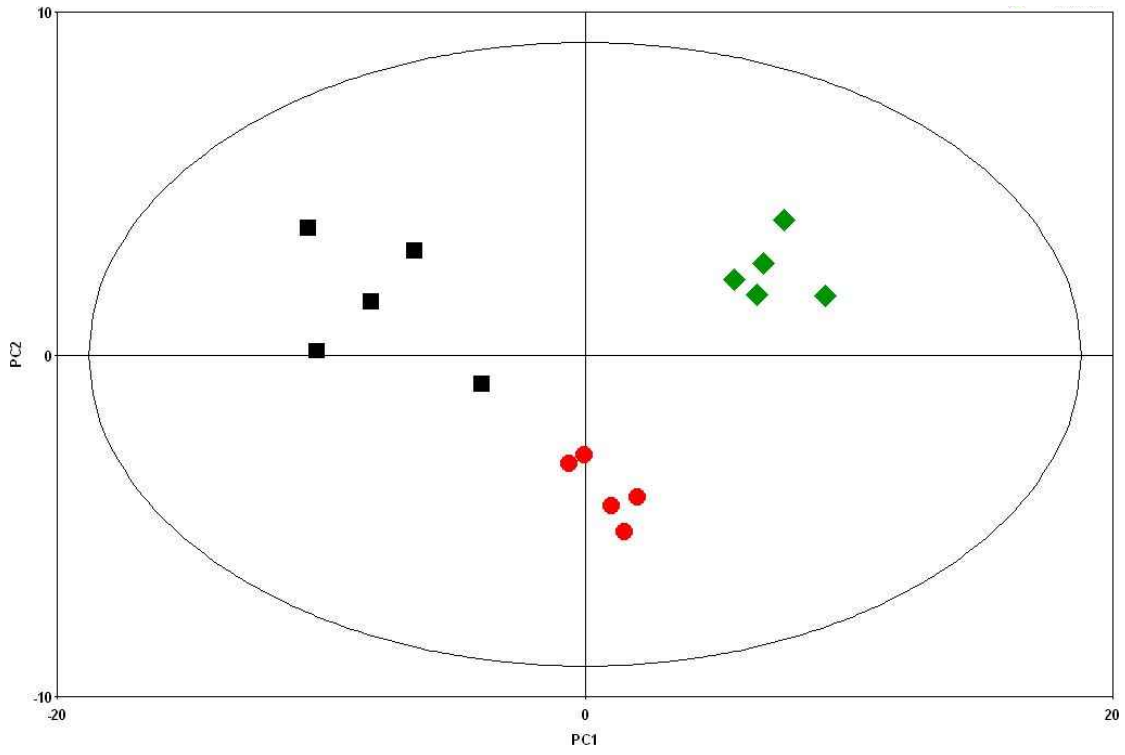
Identified	metabolite
Alcohols	Glycerol
	Erythritol
Amines	Nicotianamine
	Putrescine
Amino acids	4-Aminobutyric acid
	Alanine_T ^a (β-alanine+L-alanine)
	Glutamine_T ^a (glutamine1+glutamine2+glutamine3+L-glutamine1+L-glutamine2)
	Glycine_T ^a (glycine+suberylglycine)
	L-Arginine
	L-Asparagine (L-asparagine 1 + L-asparagine 2)
	L-Aspartic acid
	L-Glutamic acid
	L-Leucine
	L-Lysine
	L-Phenylalanine
	L-Serine
	L-Threonine
	L-Tyrosine
	L-Valine
	Proline_T ^a (proline+L-proline)
	Pyroglutamic acid
Fatty acids	Hexadecanoic acid
	Octadecanoic acid
Inorganic acid(s)	Phosphoric acid
Organic acids	D(-)-Quinic acid
	Erythronic acid
	Fumaric acid
	Glyceric acid
	Lactic acid
	Malic acid
	Oxalic acid
Shikimic acid	

	Succinic acid
	trans-Caffeic acid
Phosphates	L-Glycerol-3-phosphate
	Fructose-6-phosphate_T ^a (fructose-6-phosphate1+fructose-6-phosphate2)
	Glucose-6-phosphate
	Glyceric acid-3-phosphate
Sugars	2-Keto-L-gluconic acid
	Glucose_T ^a (glucose1+glucose2)
	Gluconic acid
	myo-Inositol
	2-O-Glycerol-beta-D-galactopyranoside
	Sucrose_T ^a (sucrose1+sucrose2)
	Trehalose
	Galactinol
	Raffinose
	Fructose_T ^a (fructose1+fructose2)
	Maltose
Others	1-butyl-5-isopropyl-1H-Indole-2,3-dione
	Allantoin
	Urea

^aT indicates the total intensity of identified metabolite with more than one peak, of which peaks were summed to one total value.

(2) 통계적 분석을 기반으로 한 대사체 프로파일링

각각의 처리군에서의 대사체 프로파일링의 차이를 알아보기 위하여 다변량 통계 분석 방법 중의 하나인 PCA 분석을 실시하였다. Figure 2.11을 보면, PC1에 의해 각 처리군이 확연히 구분되는 것을 확인하였다. 처리한 sucrose의 농도가 증가할수록 PC1의 score 값이 증가함을 확인하였다. 50 mM로 처리하였을 때, -6.45, 100 mM로 처리하였을 때, 0.58, 150 mM로 처리하였을 때 5.87의 값을 각각 나타내었다. PC2에 의해서도 잘 구분되는 것을 확인하였으나, PC3에 의해서는 잘 분리되지 않음을 확인하였다.



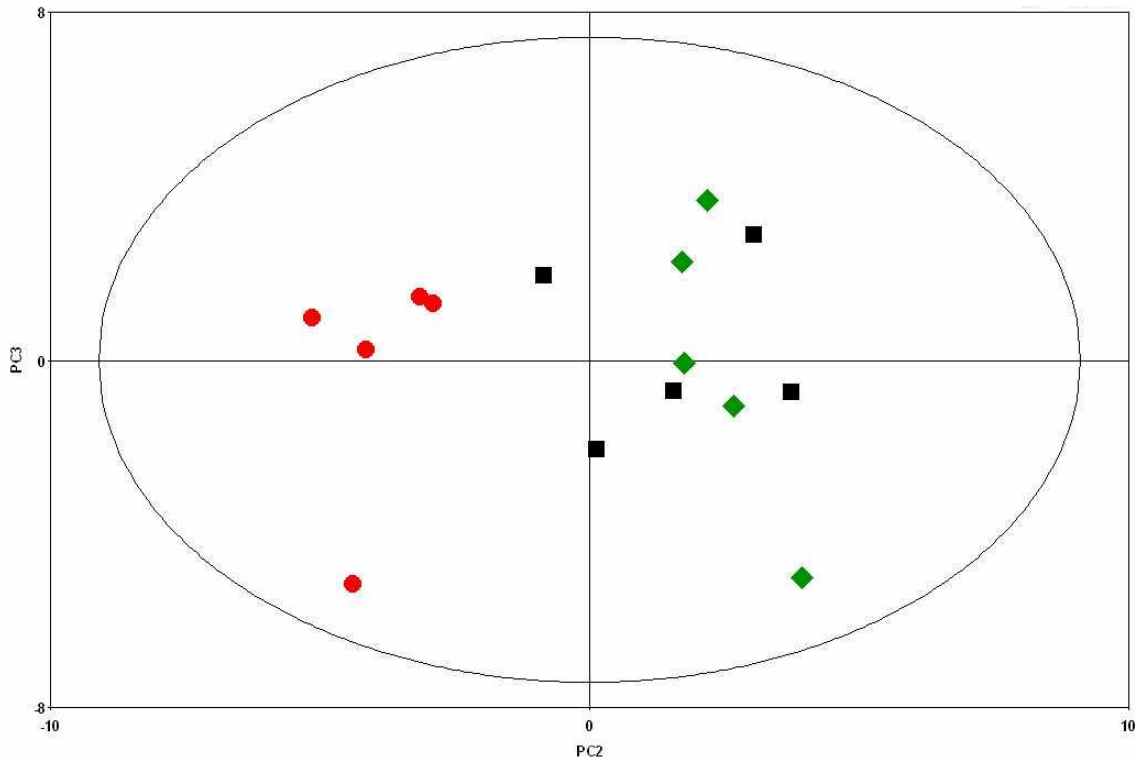
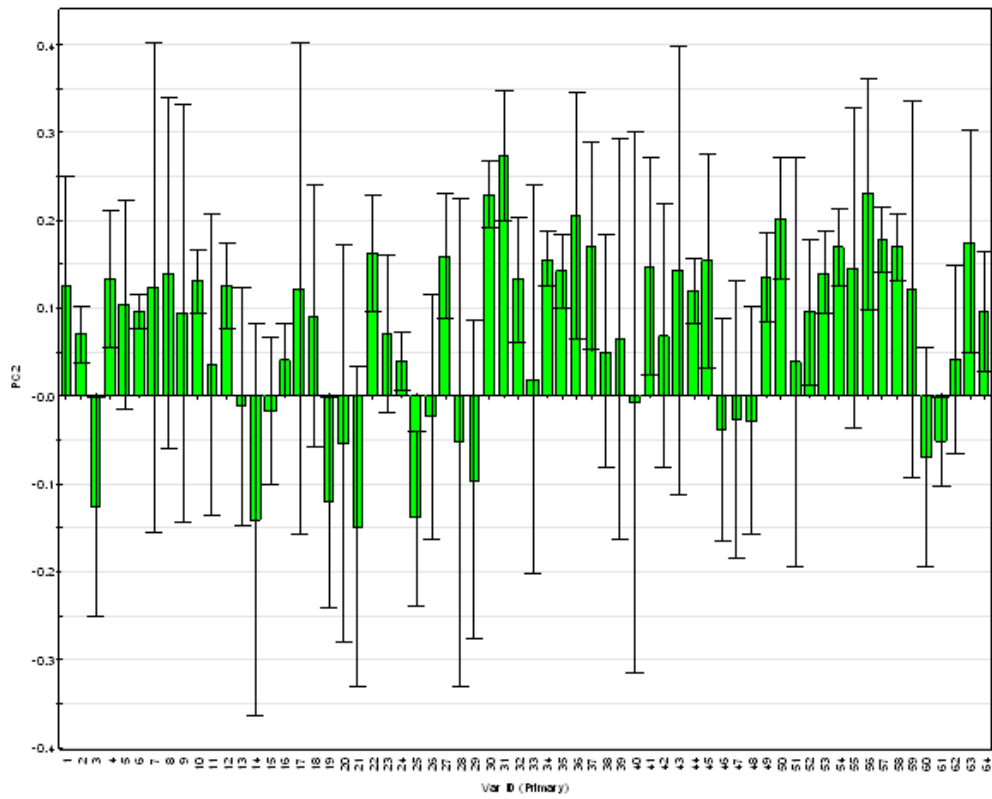
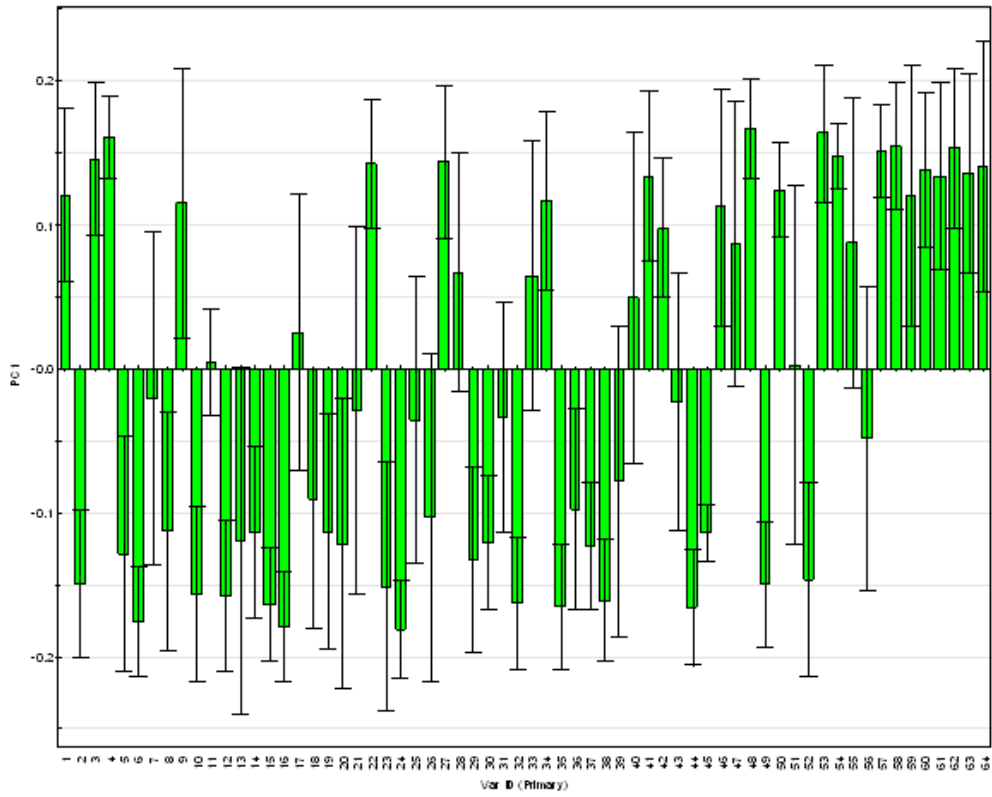


Figure 2.11. PCA score plot of metabolite profiles in response to different concentrations of sucrose. (a) PC1 (43.3%) vs. PC2 (17.1%). (b) PC1 vs. PC3 (10.0%). (c) PC2 vs. PC3. The ellipse represents the Hotelling T2 with a 95% confidence in the score plot: 50 mM (black), lemon balm treated with 50 mM of sucrose; 150 mM (red): lemon balm treated with 150 mM of sucrose; 300 mM (green), lemon balm treated with 300 mM of sucrose.

Score plot에 영향을 미치는 metabolite들의 loading 값을 Figure 2.12 에 나타내었다. PC1의 positive 하게 영향을 미치는 metabolite는 30개 였으며, 그 중 glucose-6-phosphate, fructose, sucrose, glucose가 강하게 영향을 미쳤으며, L-threonine, L-glutamic acid, beta-alanine을 포함한 34개의 대사체는 negative하게 영향을 미치는 것을 확인하였다. Octadecanoic acid, hexadecanoic acid, gluconic acid를 포함하는 34개의 대사체는 PC2에 positive 하게, L-phenylalanine, L-tyrosine, L-asparagine을 포함한 대사체들은 negative하게 영향을 미친다. PC3에 31개의 대사체는 positive하게 영향을 미치는 반면 33개의 대사체는 negative하게 영향을 미침을 확인 할 수 있었다.



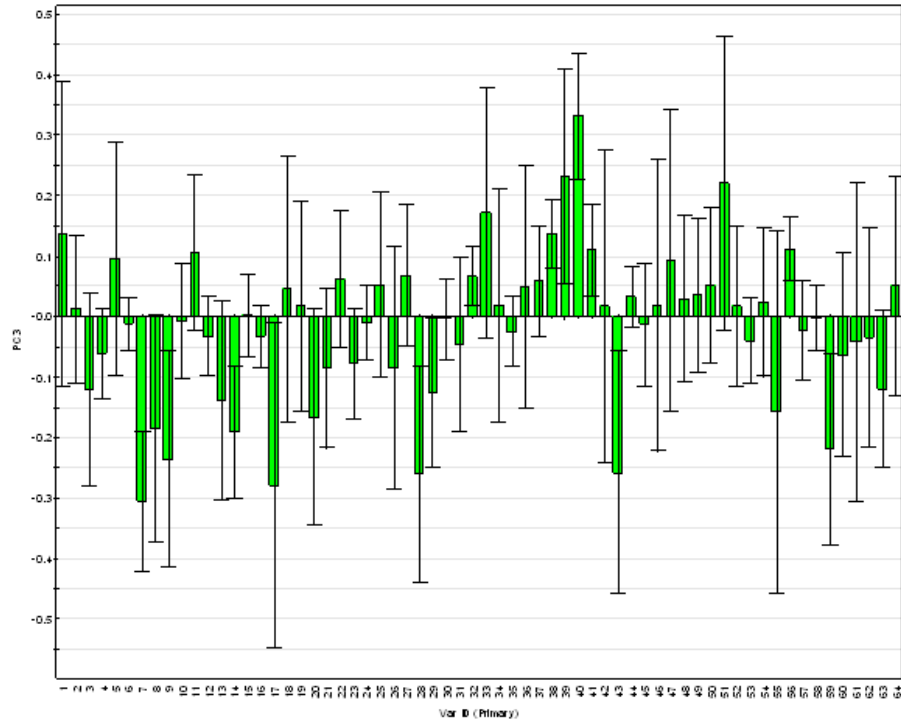


Figure 2.12 Loading plots of metabolites that contributed to the score plots. (a) PC1. (b) PC2. (c) PC3. Each number (i.e. variable ID) represents various metabolites: 1, erythritol; 2, glycerol; 3, nicotianamine; 4, putrescine; 5, 4-aminobutyric acid; 6, β -alanine; 7, glutamine 1; 8, glutamine 2; 9, glutamine 3; 10, glycine; 11, L-alanine; 12, L-arginine; 13, L-asparagine 1; 14, L-asparagine 2; 15, L-aspartic acid; 16, L-glutamic acid; 17, L-glutamine 1; 18, L-glutamine 2; 19, L-leucine; 20, L-lysine; 21, L-phenylalanine; 22, L-proline; 23, L-serine; 24, L-threonine; 25, L-tyrosine; 26, L-valine; 27, proline; 28, pyroglutamic acid; 29, suberyl glycine; 30, hexadecanoic acid; 31, octadecanoic acid; 32, phosphoric acid; 33, d(-)-quinic acid; 34, erythronic acid; 35, fumaric acid; 36, glyceric acid; 37, lactic acid; 38, malic acid; 39, oxalic acid; 40, shikimic acid; 41, succinic acid; 42, trans-caffeic acid; 43, 1-butyl-5-isopropyl-1H-indole-2,3-dione; 44, allantoin; 45, urea; 46, fructose-6-phosphate 1; 47, fructose-6-phosphate 2; 48, glucose-6-phosphate; 49, glyceric acid-3-phosphate; 50, L-glycerol-3-phosphate; 51, 2-keto-L-gluconic acid; 52, 2-O-glycerol-beta-D-galactopyranoside; 53, fructose 1; 54, fructose 2; 55, galactinol; 56, gluconic acid; 57, glucose 1; 58, glucose 2; 59, maltose; 60, myo-inositol; 61, raffinose; 62, sucrose 1; 63, sucrose 2; 64, trehalose.

(3) 화학구조에 따른 대사체 수준의 변화

전체 64개의 대사체는 alcohol, amine, amino acid, fatty acid, inorganic acid, organic acid, phosphates, sugar,로 분류되어질 수 있다. 위의 결과를 바탕으로, sucrose의 농도에 따fms 대사체 프로파일을 비교하기 위해 50 mM과 300 mM로 처리한 레몬밤을 스튜던트 t-검정을 이

용하여 유의 수준 1% 하에서 대사체 프로파일 변화에 큰 영향을 미치는 대사 물질을 분석하였다. Erythritol, nicotianamine, putrescine, L-proline, proline를 포함하는 16개의 대사체는 300 mM에서 많은 반면 15개의 대사체는 50 mM에서 더 많이 증가한 것을 확인하였다. (Figure 2.13)

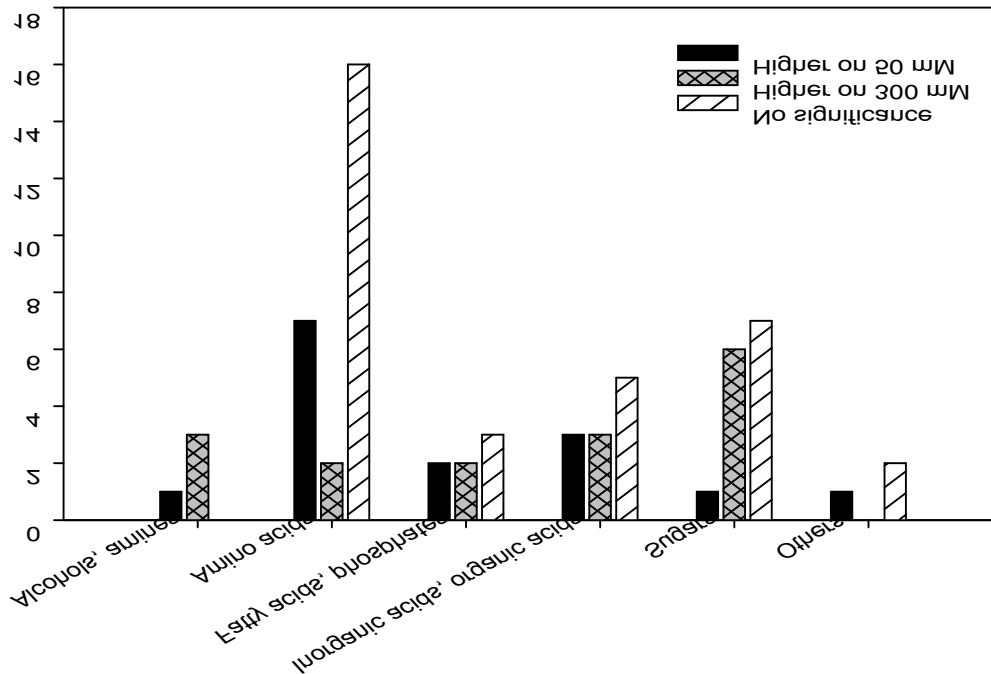
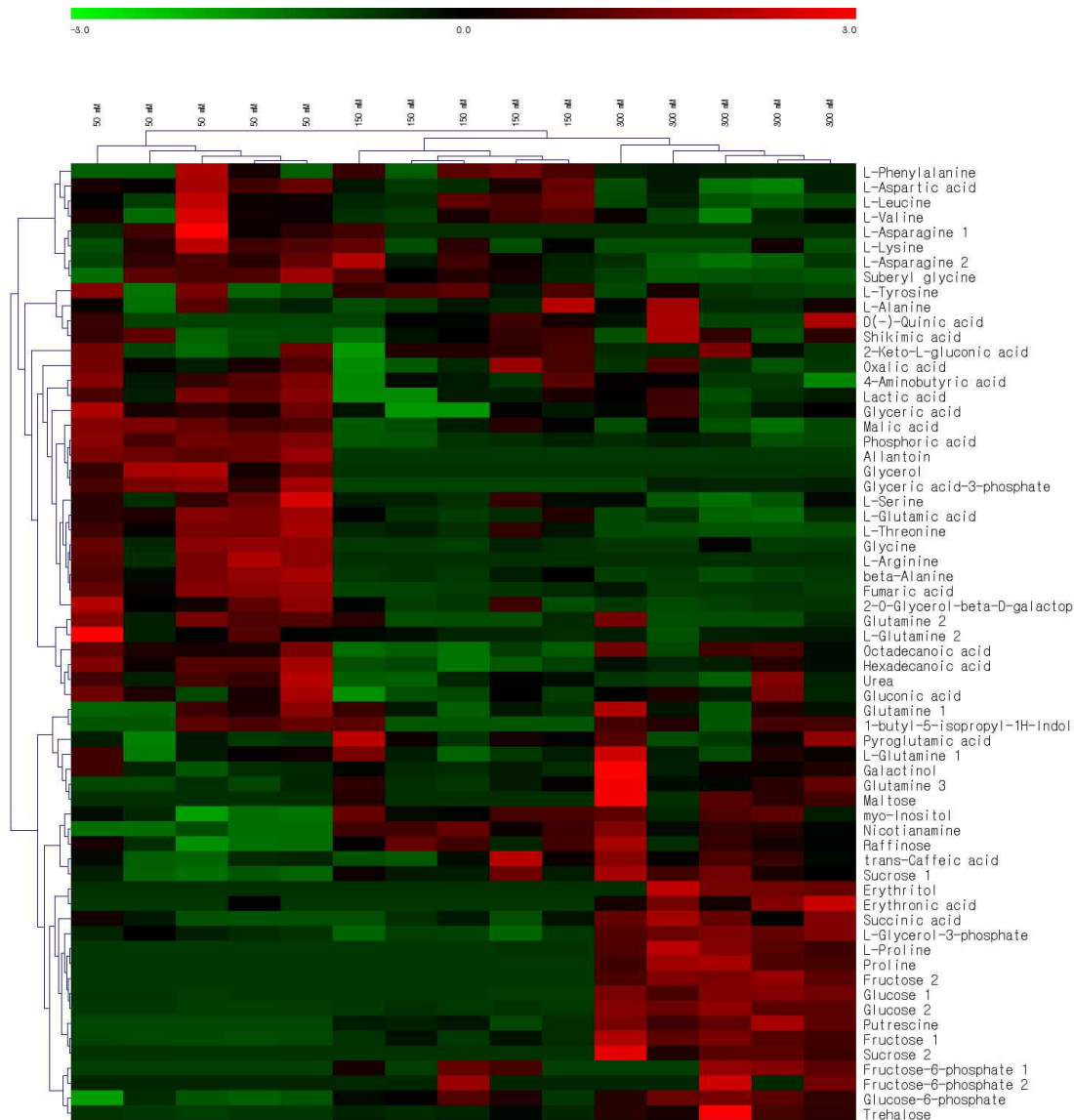


Figure 2.13. Number of significantly increased metabolites in peak intensity of lemon balm treated with 50 and 300 mM of sucrose.

(4) Sucrose 농도 효과에 따른 Hierarchical clustering

다양한 sucrose의 농도로 처리한 레몬밤의 대사체 프로파일을 확인하기 위해 모든 샘플의 대사체 프로파일은 Euclidean distances와 average linkage의 hierarchical clustering에 의해서 시각화, 조직화 되어질 수 있다. 50 mM, 150 mM, 300 mM sucrose 농도로 처리한 각각의 오반복 샘플의 대사체 pattern은 비슷함을 확인 할 수 있었다. 하지만 처리 군 별 대사체 pattern은 각각 다름을 확인하여다. 150 mM로 처리한 레몬밤은 50 mM로 처리한 레몬밤보다 300 mM로 처리한 레몬밤과 더 비슷하였음을 확인하였다. L-proline, glucose, fructose, glucose-6-phosphate 등과 같은 대사체 들이 300 mM에서 처리한 레몬밤에서 증가한 것을 확인 할 수 있었으며, 아미노산 그룹은 50 mM에서 더 많이 함유하는 것을 확인하였다. (Figure 2.14)



Figure

2.14. Hierarchical clustering of 64 metabolites from *M. officinalis* samples treated with different concentrations of sucrose. Similarity assessment for clustering based on the Euclidean distance coefficient and the average linkage method. Columns and rows represent different concentrations of sucrose and individual metabolites, respectively: 50 mM, lemon balm treated with 50 mM of sucrose; 150 mM, lemon balm treated with 150 mM of sucrose; 300 mM, lemon balm treated with 300 mM of sucrose.

위의 결과들을 종합해 볼 때, sucrose 농도의 효과는 Figure 2.15와 같이 citrate cycle, aspartate metabolism, proline-linked pentosephosphate, biosynthesis of phenylpropanoids와 관련하여 설명되어 질 수 있다.

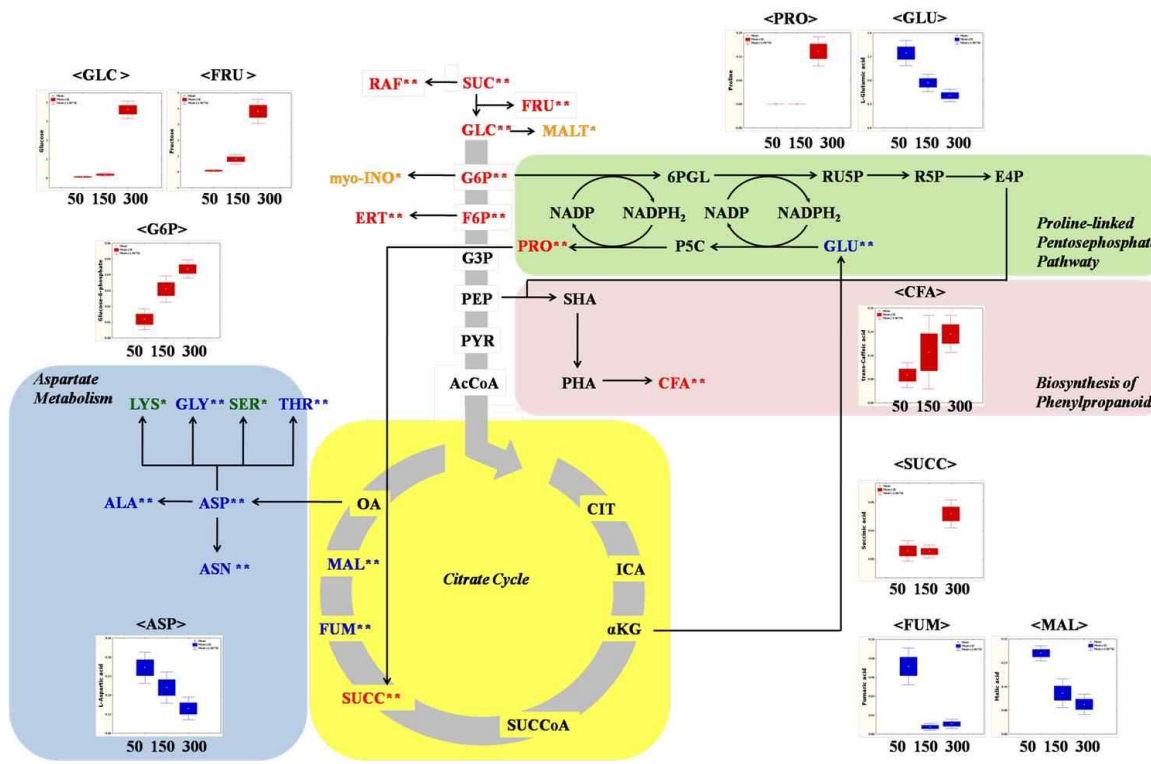


Figure 2.15. Schematic diagram of the proposed metabolic pathway of *M.officinalis*: glycolysis, TCA cycle, proline-linked pentose phosphates pathway, aspartate metabolism pathway and biosynthesis of phenylpropanoids pathway. The changes in metabolite abundances in response to different concentration of sucrose are shown in the box and whisker plots using one-way break down analysis of variance (50: treated with 50mM, 150: treated with 150mM, 300: treated with 300mM).The top and bottom of the boxes are the 25 and 75 percentiles, respectively. The whiskers indicate the maximum and minimum values, and outlier points are shown with small squares. Red (**) and orange (*) indicate the metabolites increased at 1% and 5% significance levels, respectively, when treated with 300 mM sucrose; and blue (**) and green (*) indicate the metabolites increased at 1% and 5% significance levels, when treated with 50 mM sucrose. α KG, α-ketoglutaric acid; 6PGL, 6-phosphogluconolactone; AcCoA, acetyl-CoA; ALA, alanine; ASN, asparagine; ASP, aspartic acid; CFA, caffeic acid; CIT, citric acid; E4P, erythrose- 4-phosphate; ERT, erythritol; F6P, fructose-6-phosphate; FRU, fructose; FUM, fumaric acid; G3P, glyceraldehyde-3-phosphate; G6P, glucose-6-phosphate; GLC, glucose; GLU, glutamic acid; GLY, glycine; ICA, isocitric acid; LYS, lysine; MAL, malic acid; myo-INO, myo-inositol; MALT, maltose; OA, oxalic acid; P5C, pyrroline-5-carboxylate; PEP, phosphoenolpyruvate; PHA, phenylalanine; PRO, proline; PYR, pyruvate; R5P, ribose-5-phosphate; RAF, raffinose; RU5P, ribulose-5-phosphate; SER, serine; SHA, shikimic acid; SUCCoA, succinyl-CoA ; SUC, sucrose; SUCC, succinic acid; THR, threonine

제 3 절: 제3세부 과제 연구내용 및 결과

1. 멜라닌 합성의 주요 경로에 대한 이해

- ◆ 인간의 피부 색깔은 환경, 인종, 성별 등의 여러 가지 요인이 있지만 일반적으로 사람의 피부색은 노란색을 나타내는 카로틴, 붉은색의 헤모글로빈, 갈색의 멜라닌에 의해 결정 된다. 멜라닌 색소는 사람의 피부색을 결정하는 가장 큰 인자이며 자외선을 흡수 또는 산란시켜 자외선으로부터 피부가 손상되는 것을 방지하는데 큰 역할을 한다. 그러나 환경오염에 따라 피부의 자외선 노출이 증가됨에 따라 피부의 기저층에 존재하는 멜라닌의 과다 증식과 피부 노화에 의한 피부색의 변화 즉 색소침착이 증가되고 있다.
- ◆ 이러한 피부색의 이상을 초래하는 질환은 기미(melasma), 주근깨(freckle), 검버섯(seborrheic keratosis)등이며 이는 주로 멜라닌 색소 침착으로 인한 질환이다. 색소침착은 미용적인 문제, 피부노화, 피부암과 같은 건강상의 문제를 야기하게 된다. 최근 피부미백대한 관심이 높아짐에 따라 보다 안정적이고 효과적인 미백 소재를 발견하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다.
- ◆ 사람의 피부에서 멜라닌 색소는 그 조직내에 포함되어 있는 2개의 melanin색소의 비율로 결정되어 있으며 melanin색소에는 흑색의 eumelanin과 적갈색의 pheomelanin이 있다. Melanin 합성 반응은 Raper and Mason에 의해 그 기본적인 경로가 밝혀져 있다.
- ◆ Melanin의 melanocyte에서의 합성경로에 관해서 보면 melanin은 tyrosine이 tyrosinase 효소에 의해 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)로 hydroxylation 되는 과정을 시작으로 dopaquinone, dopachrome의 과정을 거쳐 melanin으로 합성된다. Dopachrome은 자연히 decarboxylation되어 DHI가 되며 빠르게 산화되어 indole-5,6-quinone이 된다. 그 이후 과정을 통하여 인간의 피부의 색조는 melanocyte에서 합성되는 흑색의 eumelanin과 옅은 갈색의 pheomelanin 색소의 비율로 결정된다.
- ◆ Tyrosinase : tyrosinase은 tyrosine을 수산화해 DOPA로 변환하는 tyrosine hydroxylase활성, DOPA를 DOPAquinone으로 산화하는 DOPA oxidase활성을 가지고있는 melanin 합성 반응에 있어 가장 중요한 역할을 하고 있고 또한, 최근에서는 DHI (5, 6-dihydroxyindole)을 indole-5, &quinone에 산화하는 DHIoxidase활성을 소유하는 것이 보고되어 있다. Tyrosinase에는 T1, T2, T3의 3개의 isozyme이 존재하고, Tyrosinase는 그 일차구조 내에 sialic acid, man-nose 및 galactose의 당을 가지며, melanosome안에서의 melanin합성에 있어서는 가장 성숙한 T3 isozyme이 크게 관여한다.
- ◆ TRP-2 (tyrosinase-related protein 2:DOPA chrome tautomerase): Tyrosinase관여 합성반응에서 생성된 DOPA chrome을 TPR-2가 5,6-dihydroxyindole-2-Car-boxylic acid로 변환, indole 골격을 형성 시킨다. 흑색의 eumelanin은 DHICA 및 DHICA가 TRP-2 비존재 하에서 자동산화에 의해 생성되는 DHI (5, &dihydroxyindole)에 의해 구성된다. Pheomelanin은 tyrosinase에 의해 melanin합성이 개시된 후, glutathione이나 cysteine과 같은 SH 화합물이 관여하는 것으로 알려져 있으나 정확한 mechanism에 대해서는 불분명하고 많은 연구가 기대된다.

- TRP-1 (tyrosinase-related protein 1 :DHICA oxidase): TRP-1은 1986년에 Shibahara에 의해 tyrosinase로서 보고된 효소이다. 그러나 이 단백질이 멜라닌 합성에 관여되 DHICA를 indole-5, &quinone-2-Carboxylic acid에 산화하고, TRP-1은 DHICA oxidase로서의 활동의 이외에 melanosome안 효소군의 안정화에 기여하고 있는 것도 보고되어 있다.

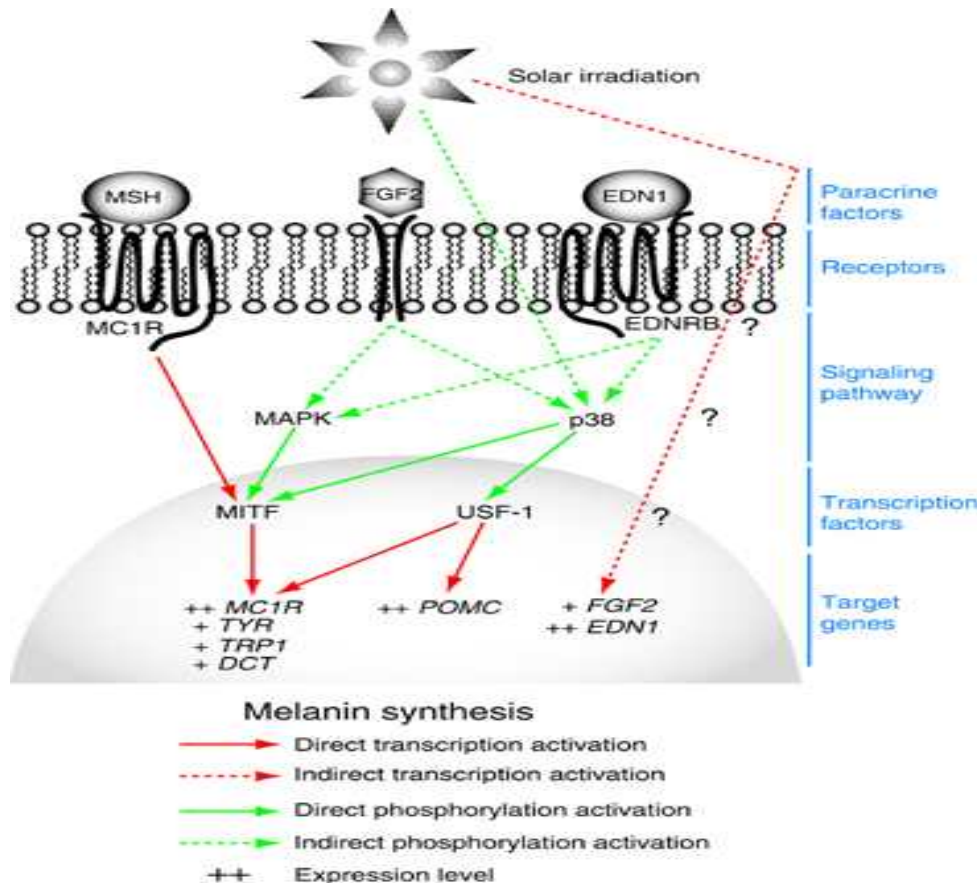


Figure 1-1. Melanin synthesis related MITF gene.

- 멜라노사이트 분화와 피부색소조절의 주요인자인Microphthalmia-associated transcription factor (MITF)유전자는 피부색소 조절에 관여하는 단백질의 발현을 조절하는 주요 전사 인자로 색소조절과 함께 멜라닌 형성세포인 멜라노사이트의 발달과 생존에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. Fig 1에서 보는바와 같이 MITF gene은 tyrosinas, TRP-1, TRP-2(DCT) 와 같은 melanogenesis의 주효소들의 발현에 영향을 주는 것으로 나타났다.

2. 멜라닌 합성 관여 요소들에 대한 실험적 평가

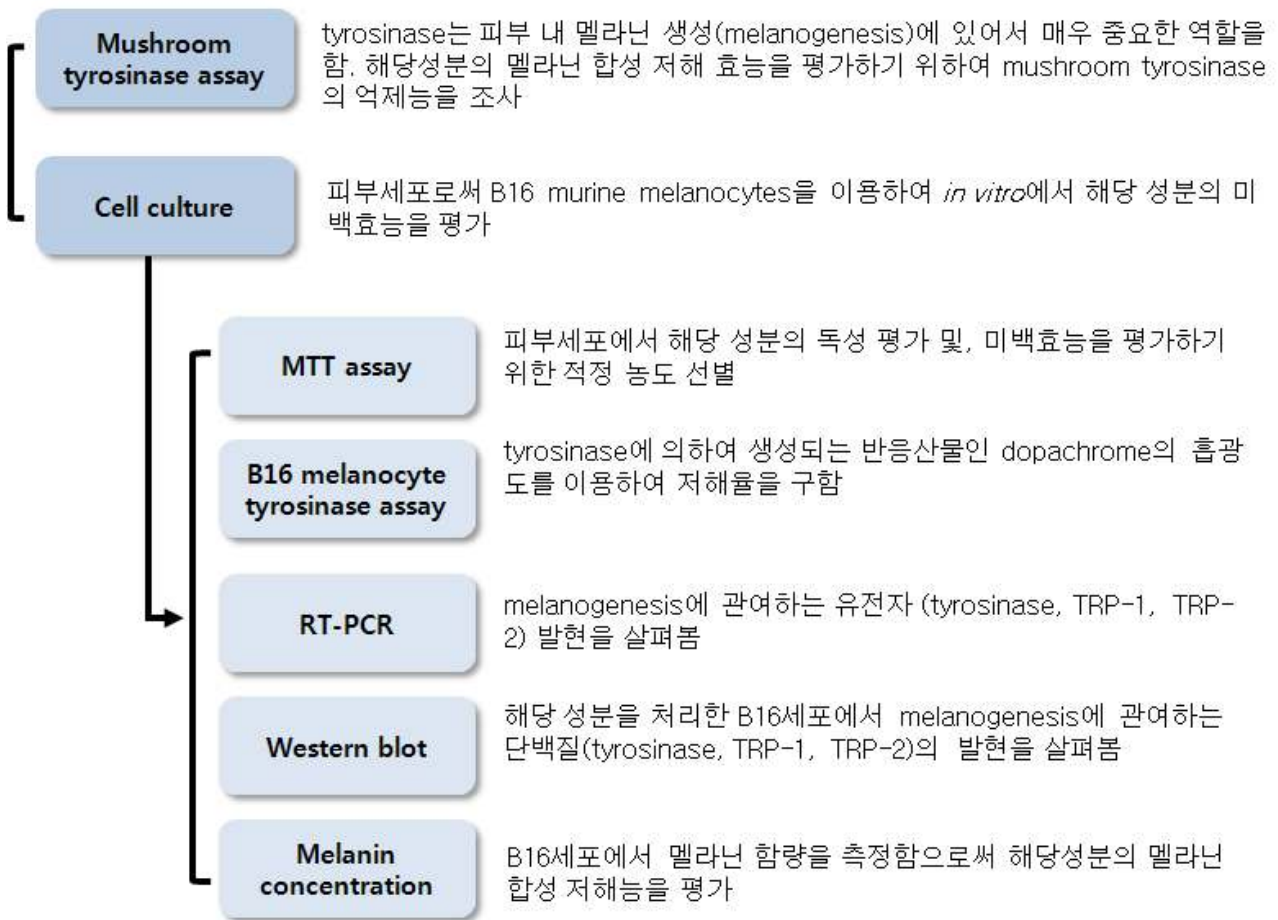


Figure 1-2. experimental designs for assessment of anti-melanogenesis.

- ◆ 미백효능평가 실험은 *in vitro*를 기본으로 실행되었으며, 주로 이용된 세포주는 B16 murine melanocyte로써 멜라닌 합성이 발생하는 피부세포의 일종임.
- ◆ 미백에 직접적으로 영향을 미치는 멜라닌의 함량을 측정하고, 또한 멜라닌 합성에 관여하는 효소인 tyrosinase의 활성을 측정하여 레몬밤이 피부 미백에 미치는 효능을 평가하고자 하였으며, 또한 western blot이나 PCR 방법을 사용하여 멜라닌 합성에 관여하는 유전자 및 단백질의 발현을 측정함으로써 레몬밤에 피부 미백에 미치는 작용기작에 대한 연구를 수행하고자 계획하였음.

3. 연구 내용 및 방법

- ◆ 용매추출
 - 건조시킨 wild type의 레몬밤을 blender로 분쇄하고 시료를 80% 에탄올에 넣어서 24시간동안 환류시킨다. 상층액을 0.45um의 membrane 2장(watman)을 겹쳐서 filtering 시킨다. 1차로 얻어낸 상층액은 냉장보관하며 위의 방법으로 2번 반복하여 최종 3번에 걸쳐 상층액을 얻어낸다. 얻어낸 추출물 용액

은 evaporator로 78°C 이상에서 용매를 증발시키고 flask에 남은 물질은 스페출러로 잘 긁어내어 동결 건조 시킨 후 실험에 사용하였다.

- ◆ Total flavonoid 함량

→ 총 플라보노이드 함량은 추출물 0.1 ml에 80% 에탄올 0.9 ml를 가하여 이 혼합액 0.5 ml에 10% aluminum nitrate 0.1 ml, 1 M potassium acetate 0.1 ml 및 80% 에탄올 4.3 ml를 각각 가하였다. 위 반응액을 상온에서 40분 방치한 후 415 nm에서 흡광도 값을 측정하였으며 표준물질로 quercetin을 사용하여 함량을 계산하였다.

- ◆ DPPH Radical scavenging activity

→ 1.5×10^{-4} M의 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)용액을 만들고 100%에탄올에 농도별로 녹여놓은 레몬밤 에센셜 오일을 혼합한 후 37°C water bath에 30분간 방치하여 둔다. DPPH와 시료 혼합액을 UV-분광광도계를 이용하여 517nm에서 흡광도를 측정하여 시료의 라디칼 소거 활성을 평가한다.

- ◆ SOD 유사활성

→ 일정 농도의 레몬밤 추출물 0.2 ml에 pH 8.5로 조정된 tris-HCl buffer 3 ml와 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml를 가하여 25°C에서 10분간 방치한 후 1 N HCl 1 ml로 반응을 정지시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도를 비교하여 백분율(%)로 나타내었다.

- ◆ 금속이온 제거능 측정

→ 금속이온 제거능은 각 추출물 1 mL에 2 mM ferrous chloride와 5 mM ferrozine을 각각 100 μ L씩 가하여 흡광도 값의 조정을 위해 methanol을 일정량 혼합하였다. 10분간 상온에서 방치한 후 562 nm에서 반응액의 흡광도를 측정하여 시료 첨가구와 비첨가구의 흡광도 차를 백분율로 표시하여 금속이온 제거능으로 나타내었다.

- ◆ Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 측정

→ TBARS는 1% linoleic acid 와 1% tween 20으로 emulsion을 만들고 emulsion 0.8ml와 시료 0.2ml를 섞은 후 35°C water bath에서 12시간 반응 시켰다. 반응후 반응액 1mL에 15% trichloroacetic acid/20mM TBA시약 2 mL를 가한 다음 15분간 boiling하여 반응시켰다. 이 반응액을 실온에서 10분간 냉각시킨 후 15분간 3000rpm으로 원심분리하였다. 원심분리 후 상정액을 532nm에서 흡광도를 측정하여 TBA값을 산출하였다.

- ◆ Mushroom tyrosinase inhibition assay method

→ Tyrosinase는 피부 melanin 생성에 있어서 매우 중요한 역할을 하고 있으며, melanosome내에서 tyrosine을 산화 시켜 DOPA를 만드는 tyrosine hydroxylase로 DOPA를 산화시켜 DOPACHROME을 만드는 DOPA oxidase로 작용하여 최종적으로 melanin 중합체를 합성한다. mushroom tyrosinase 로 물질 자체가 어느 정도 tyrosinase을 작용을 억제하는지 보기 위해 DOPA 50ul의 0.03% tyrosine solution과 75ul의 0.1M phosphate buffer(pH6.8)에 레몬밤 에센셜 오일을 넣고 96well에서 25ul의 mushroom tyrosinase(400u/ml 0.1M phosphate buffer)을 섞어 37°C에서 20분 incubation시킨 후 475nm에서 그 흡광도를 측정하였다.

- ◆ Cell culture

→ B16 murine melanocytes(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea) Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM)에 10%의 fetal bovine serum(FBS), 100U/ml 페니실린과 0.1mg/ml의 스트렙토마이신을 처리하여 37°C, 95%air/ 5% CO₂에서 배양하였다. melanogenesis 실험은 6-well plate에서 수행하였다.

- ◆ MTT assay

→ MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]가 formazan로 환원되는 것으로 세포의 사멸정도를 판단할 수 있는 것으로, 72시간 동안 8가지 농도의 레몬밤 에센셜 오일을 처리한 B16 세포에 MTT를 처리한 배양 배지에 첨가한다. 각 well에 넣어 37°C에서 3시간동안 incubation시키고 formazan crystal을 dimethyl sulfoxide를 첨가하여 녹이고 96well plate에 옮겨 570nm에서 그 흡광도를 측정하였다.

- ◆ Melanin content

→ 멜라닌 함량을 결정하기 위해 세포를 PBS로 씻어준후 20mmol/L Tris-0.1% Triton X-100(pH7.5)를 용해 시켜준다. 세포를 녹인 용액을 12000x g, 4°C에서 5분간 원심분리 시켜 pellet을 얻는다. 얻어진 pellet을 1N NaOH, 60°C에서 1시간동안 녹여준다. 그 흡광도는 400nm에서 관측하고 melanin의 함량을 측정할 수 있다. 그 기준이 되는 물질은 합성한 melanin을 사용하였다. 세포내 멜라닌의 양은 sample의 단백질 함량에 따라 달라질 수 있다. 단백질의 농도는 Bio-Rad protein kit로 측정하였다.

- ◆ Tyrosinase assay

→ Tyrosinase 활성의 분석은 DOPA oxidase 활성의 평가를 하여 측정하였다. 차가운 PBS로 레몬밤 에센셜 오일을 3일간 처리한 세포를 두 번 씻어주고 20mmol/L Tris-0.1% Triton X-100(pH7.5)로 용해 시켜준다. 도파의 산화로 도파크롬으로 바뀌면서 일어나는 색변화를 475nm로 측정하여 tyrosinase의 활성을 알아 낼 수 있다. 각 반응 mixture는 140ul의 0.1% L-DOPA 0.1 mol/L sodium phosphate (pH 6.0) 과 70ul의 enzyme을 37°C에서 incubation시킨다. 변화되는 흡광도는 2시간까지 일정한 간격으로 측정하고 그 흡광도 값은 linear하게 증가하게 되고 그 값이 변한다는 것은 L-DOPA의 auto-oxidation이 제대로 일어나고 있다는 뜻으로 해석될 수 있다. 그리고 control cell의 percentage를 기준으로 하여 레몬밤에센셜 오일을 처리한 세포의 효소의 활성도를 표현한다.

- ◆ Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)

→ 세포내 total RNA를 얻기 위해 TRIzol reagent를 사용하여 추출하였다. melanocyte에서 얻은 mRNA의 2ug으로부터 cDNA를 합성하기 위해 oligo dT and Superscript II를 사용하여 reverse transcription을 하였다. 반응은 최종 20ul로 되게 하여 90분 동안 42°C heat block에 넣은 후, 바로 70°C에서 15분간 incubation시킨다. 결과로 얻은 cDNA는 PCR증폭을 시키는데, 최종 부피가 20ul가 되도록 하여 cDNA, 10X PCR buffer, 2.5 mM dNTPs, 10 mM forward and reverse primers, DNA polymerase, 와 증류수를 섞어준다. tyrosinase, TRP-1, TRP-2에 따라 RT-PCR의 조건을 달리하여 cDNA의 증폭을 시킨다. tyrosinase의 upstream은

5'-GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT-3'; downstream 5'-TGG TGC TTC ATG GGC AAA ATC-3'; TRP-1 upstream 5'-GCT GCA GGA GCC TTC TTT CTC-3'; downstream 5'-AAG ACG CTG CAC TGC TGG TCT-3'; TRP-2 upstream 5'-GGA TGA CCG TGA GCA ATG GCC-3'; downstream 5'-CGG TTG TGA CCA ATG GGT GCC-3'; MITF upstream 5'-GTA TGA ACA CGC ACT CTC TCG A-3'; downstream 5'-CTT CTG CGC TCA TAC TGC TC-3' 로 이루어진 primer를 사용하였다. control로 사용하는 b-actin은 upstream 5'-TGC TGT CCC TGT ATG CCTCT-3'; downstream 5'-AGG TCT TTA CGG ATG TCA ACG-3'로 구성된 primer를 사용하였다. PCR product(10ul)를 전기영동하여 정량적으로 RT-PCR products를 측정하였다.

◆ Western blot assays

→ 72시간동안 시료를 처리한 B16f1 세포를 찬 PBS로 씻은 후 protease inhibitor cocktail(Sigma, st. Louis, MO USA)을 넣은 RIPA buffer (10 mM Tris - HCl, pH 7.5, 1% NP-40, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA)을 넣고 용해시켰다. lysate는 12,000g, 4°C에서 5분간 원심분리시키고 단백질의 농도는 Bio-Rad protein kit(Bio-Rad, Hercules, CA USA) 로 측정하였다. 추출한 단백질과 sample buffer를 넣어 100°C에서 5분간 끓인후 열음에 식히고 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide 겔에서 전기영동하여 단백질을 크기별로 분리한 후 nitrocellulose membrane에 blotting 시켰다. Blocking buffer(phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4, 0.1% Tween 20 and 5% skimmed milk)에서 1시간동안 상온에서 incubation 시킨 후 1차 antiodies를 다음과 같이 희석하여 사용하였다: anti-tyrosinase, 1:500; anti-TRP-1, 1:500; anti-TRP-2, 1:500; anti-MITF, 1:500; anti-a-tubulin, 1:500. 희석시 fresh한 5% skim milk blocking에 희석을 시켰으며 상온에서 1시간 동안 이뤄졌다. 0.1% Tween-20을 PBS에 넣어 여러번 세척한 후 1:2000으로 희석시킨 anti-goat IgG antibody(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 으로 1시간동안 상온에서 incubation하였다. ECL 시약을 사용하여 단백질 발현을 보았고 a-tubuline을 membrane에 반응시켜 일정한 양의 단백질을 사용하였는지 확인하였다.

4. 연구 결과

가. 1차년도

● 연구 결과

- ◆ 레몬밤 에센셜 오일의 멜라닌 합성 저해 능력을 평가하기 위해 에센셜 오일 자체의 미백 효능을 mushroom tyrosinase 실험으로 실시하였다. in vitro 실험으로 후에 세포에 레몬밤 에센셜 오일을 처리하고 수행한 tyrosinase activity과는 다른 실험이다.
- ◆ 그림 2에서 보듯이 레몬밤 에센셜 오일은 0.8-4의 낮은 농도에서 tyrosinase의 합성 저해능이 나타나지 않았지만, 20, 50ug/ml 이상에서 농도 유의적으로 tyrosinase 활성이 감소하는 것을 볼 수 있다. 이것은 레몬밤 에센셜 오일 자체로는 tyrosinase의 활성을 억제 시킨다는 것을 의미한다.

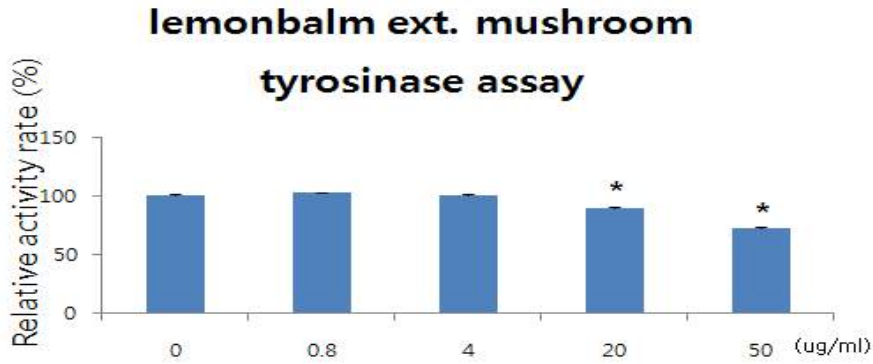
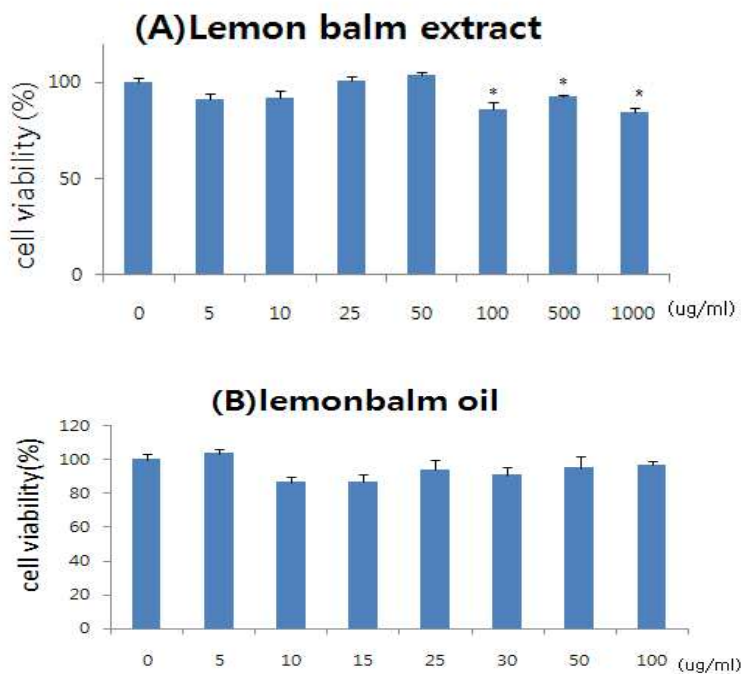


Figure 3.2 Inhibitory effect of lemonbalm essential oil and albutin on the activity of mushroom tyrosinase.

- ♦ 실험에 positive control로 사용한 알부틴은 미백효능이 좋은 물질로 잘 알려져 있으며 화장품에서 화이트닝의 효과를 보이는 것으로 알려져 있다. 알부틴 역시 40ug/ml에서부터 농도 의존적으로 2000ug/ml 까지 유의적으로 tyrosinase activity가 감소하는 경향을 나타냈다. 이는 알부틴이 tyrosinase의 활성을 억제 시키는 작용을 하여 멜라닌 합성을 저해하고 화이트닝 효과를 보인다는 것을 의미 하는 그래프라 할 수 있다.
- ♦ 이 결과를 볼 때, 농도 의존적으로 레몬밤 에센셜 오일이 tyrosinase activity에 영향을 주어 미백 효과가 있을 수 있음을 추론해 볼 수 있다. 이를 기본으로 하여 B16 murine melanocyte에 24well에 8가지 다른 농도로 레몬밤 에센셜 오일을 처리하여 독성실험을 수행하여 레몬밤 농도에 따른 세포의 생존률을 측정해 보았다.



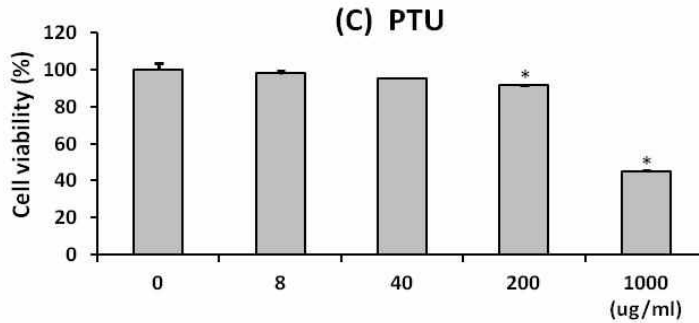


Figure 3.3 Effect of lemonbalm essential oil, standard oil and PTU concentration on the growth inhibition of B16 murine melanocytes determined by MTT assay after 72-h incubation. Values represent the mean \pm S.E.M. *, $p < 0.05$ vs. control.

- ◆ B16 murine cell에서 레몬밤 에센셜 오일이 세포독성에 미치는 영향을 알아보았는데 이는 세포 독성에 영향을 주지 않는 농도를 실험에 선택하기 위해 이루어 졌다.
- ◆ 세포 생존율을 알아본 결과 레몬밤 에센셜 오일이 0-50ug/ml까지는 크게 독성이 없는 것으로 보였으나 100ug/ml, 1000ug/ml에서 control에 비하여 약 20%정도 유의적으로 사멸하는 경향을 보였다. control에 비하여 대부분의 농도에서 약 10%감소하는 경향도 보였다. 세포의 사멸률이 고농도에서도 크지 않는 것으로 볼 때, 레몬밤 에센셜 오일의 경우 세포가 생존하는데 영향을 미치지 않는 것으로 보여 다양한 농도로 실험을 진행 할 수 있다.
- ◆ 그리고 그림3의 B를 보면 standard물질로 사용한 시판 lemonbalm oil의 경우에는 비교적 낮은 농도인 10, 15 ug/ml에서 20%정도 세포가 사멸하는 경향을 보였고, 25-100ug/ml에서는 10%정도 사멸하는 양상을 보였다. 이 역시 농도 의존적으로 세포가 사멸하지 않는 것으로 보아 생존률에는 크게 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.
- ◆ 또한 그림3의 C를 보면 positive control로 사용한 PTU (phenylthiourea)는 tyrosinase의 효소 활성을 강하게 억제하는 물질로 알려져 있는데 8-200ug/ml까지는 세포 독성이 없었지만, 같은 농도의 레몬밤 에센셜 오일이나 시판되고 있는 레몬밤 오일에 비해 1000ug/ml에서는 control에 비교하여 볼때 40%정도 세포가 죽는 양상을 나타냈다. 이는 고농도의 PTU에서는 세포가 사멸한다는 것을 의미하고 독성이 있음을 나타내는 그림이라 할 수 있겠다.
- ◆ 이를 기준으로 레몬밤 에센셜 오일에서는 독성을 나타내지 않는 범위인, 200, 800ug/ml의 농도를 사용하고 standard물질로 사용하는 시판용 레몬밤 오일은 25, 50 ug/ml 그리고 PTU의 경우에는 10-25 사이의 농도로 처리하여 실험에 사용하였다.
- ◆ 다음의 그래프는 레몬밤 에센셜 오일을 B16 세포에 처리하여 멜라닌 함유량을 나타내는 것으로, 여기에서는 positive control로 미백에 효과가 있다고 알려진 PTU를 사용하였다.

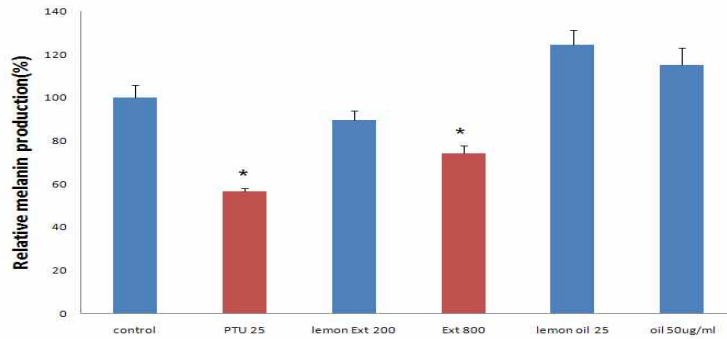


Figure 3.4 lemonbalm essential oil and standard oil lowered the melanin content in the cell. The melanin contents were determined in the control and test substance-treated B16 cells at 72 hours after the treatment. Values represent the mean \pm S.E.M. *, $p < 0.05$ vs. control.

- ◆ 레몬밤 에센셜 오일과 시판용 오일을 비교하여 B16 murine cell에서 멜라닌 합성 저하는 능력을 실험하였다. 그림 4에서 보듯이, Positive control인 PTU는 멜라닌 합성 효소인 tyrosinase을 강하게 저해하여, 세포 독성이 없는 농도인 25ug/ml정도 처리해도 아무것도 처리하지 않은 control에 비하여 60% 정도의 멜라닌 물질만 합성 된 것을 보였다.
- ◆ 레몬밤 에센셜 오일의 경우에도 200ug/ml에서 멜라닌 합성량이 약 10%정도 감소하였고, 800ug/ml을 처리 했을때는 약 20%정도 유의적으로 감소하는 경향을 나타냈다. 멜라닌 합성량이 감소했다는 것은 레몬밤 에센셜 오일의 영향으로 멜라닌 색소를 생성하는 단백질이나 유전자의 저해가 있었음을 나타낸다고 볼 수 있겠다.
- ◆ 이에 반해 시판 레몬밤 오일의 경우 control에 비해 약간씩 증가하는 모습을 보였는 데, 이는 이 오일의 경우에는 멜라닌 색소를 합성하는데 있어서 저해하는 효과가 없음을 보여주는 것이라 하겠다.
- ◆ 전체적인 멜라닌 생성량의 경우에는 레몬밤 에센셜 오일의 농도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 나타냄을 보였고, 시판되고 있는 오일의 경우에는 미백 효과가 없음을 볼 수 있었다.
- ◆ Tyrosinase 활성은 B16 세포에서의 물질을 72시간 처리한 후에 단백질을 추출하여 세포 안의 tyrosinase 활성 변화를 측정하였다. tyrosinase 활성은 DOPA의 oxidase activity를 측정하여 평가하는데, DOPA의 산화로 인해 DOPA chrome이 되면서 일어나는 색 변화로 그 활성을 평가할 수 있다. 이는 흡광광도계를 이용하여 420nm에서 측정하였다.
- ◆ 그림 4는 멜라닌 합성에 중요한 역할을 하는 tyrosinase의 합성이 레몬밤 에센셜 오일을 처리 했을 때 control에 비하여 두 농도 모두 감소하지 않음을 볼 수 있었다. 세포에서 추출한 단백질의 tyrosinase는 200ug/ml을 처리했을 때 control과 비슷한 값을 나타내다가 800ug/ml의 레몬밤 에센셜 오일을 처리 했을 때는 약 10%정도 증가하는 경향을 보였다. 멜라닌 합성을 감소시키기는 했지만, tyrosinase의 활성에 있어서는 저해 효과가 없는 것으로 보아 멜라닌을 합성시키는 것에 있어서는

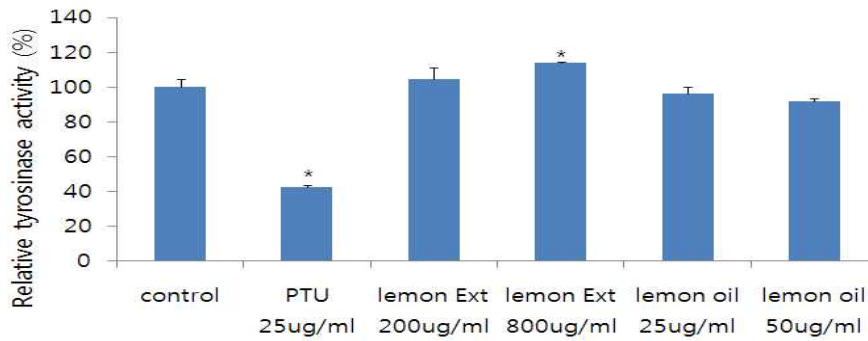


Figure 3.5 The tyrosinase activity in B16 cells incubated with lemonbalm essential oil and oil. B16 cells incubated for 72h with lemonbalm essential oil and oil and the positive control, PTU(25ug/ml) were lysed. Values represent the mean \pm S.E.M. *, $p < 0.05$ vs. control.

tyrosinase를 저해하는 영향은 적은 것으로 보이고 멜라닌 합성단계 중 다른 단백질 합성에 영향을 미쳐 전체적인 함량을 변화 시키는 것으로 보인다.

- ◆ 이에 반해 시판 레몬밤 오일은 control과 비슷하거나 약 10% 정도 감소하는 경향을 나타내었다. 시판 레몬밤 오일은 tyrosinase 활성을 저해 시키는 것으로 나타났는데, 전체적인 멜라닌 함유량은 증가된 것으로 볼 때 tyrosinase의 활성은 저해되었지만 다른 멜라닌 합성 관련 단백질인 TRP-1, TRP-2 등의 활성은 저해 시키지 못해 멜라닌 함유량이 증가된 것으로 보인다.
- ◆ positive control로 사용한 PTU (25ug/ml)가 약 50%이상 tyrosinase의 활성을 억제하는 것에 비하여 레몬밤 오일이 tyrosinase 활성을 저해하는 기능이 크지 않음을 알 수 있었다. PTU의 경우 tyrosinase를 억제시키지만 레몬밤 에센셜 오일의 경우 tyrosinase 이외의 다른 멜라닌 합성 효소들을 억제 하는 것으로 보인다.
- ◆ 유전자 수준에서의 멜라닌 합성 저해능을 평가하기 위해 RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction)을 수행하였다. 멜라닌 합성에 관여하고 있는 효소인 tyrosinase와 Tyrosinase related protein-1(TRP-1), Tyrosinase related protein-2 (DOPA chrome tautomerase, TRP-2)의 유전자 발현을 평가하였다.
- ◆ 그림 6는 레몬밤 에센셜 오일과 시판용 오일을 세포에 24시간 처리했을 때 멜라닌 합성에 관여하는 유전자들의 발현정도 측정하였다. 레몬밤 에센셜 오일의 경우 tyrosinase 유전자와 관련해서는 그 농도가 200ug/ml에서는 유전자 활성이 증가 하는 경향을 보였으나 농도가 높아지면서 800ug/ml일때는 그 유전자 활성이 control에 비해 감소하는 성향을 보였다.
- ◆ 이에 반해 시판되고 있는 lemonbalm oil은 tyrosinase gene의 활성이 증가되는 것으로 나타났다. 이것으로 보아 고농도의 레몬밤 에센셜 오일에서 tyrosinase 유전자 활성이 감소하는 것을 알 수 있었다.

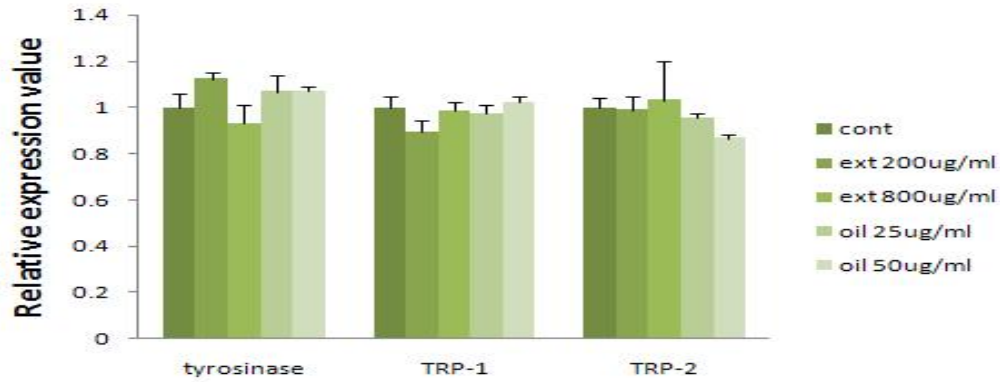
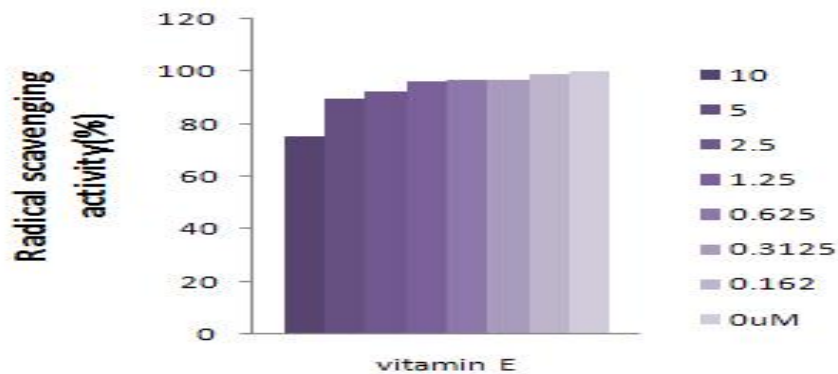


Figure 3.6 Effects of lemonbalm essential oil and standard oil on the expression of tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 mRNA expression. Values represent the mean \pm S.E.M. No significant differences were observed.

- TRP-1의 경우에는 control과 비교해 볼 때, 저농도의 레몬밤 에센셜 오일을 처리 하였을때 그 활성이 감소됨을 알 수 있었다. 800ug/ml의 농도와 시판용 레몬밤 오일의 경우에는 control과 그 활성이 유사하거나 증가됨을 보여주었다.
- TRP-2의 경우에는 레몬밤 에센셜 오일은 control과 유사한 활성을 보였지만, 시판되는 레몬밤 오일의 경우에는 농도가 증가할 수록 그 활성이 점차 감소하는 것을 알 수 있었다. TRP-1, TRP-2에서는 대체적으로 레몬밤 에센셜 오일의 유전자 감소 효과는 없는 것으로 나타났다.



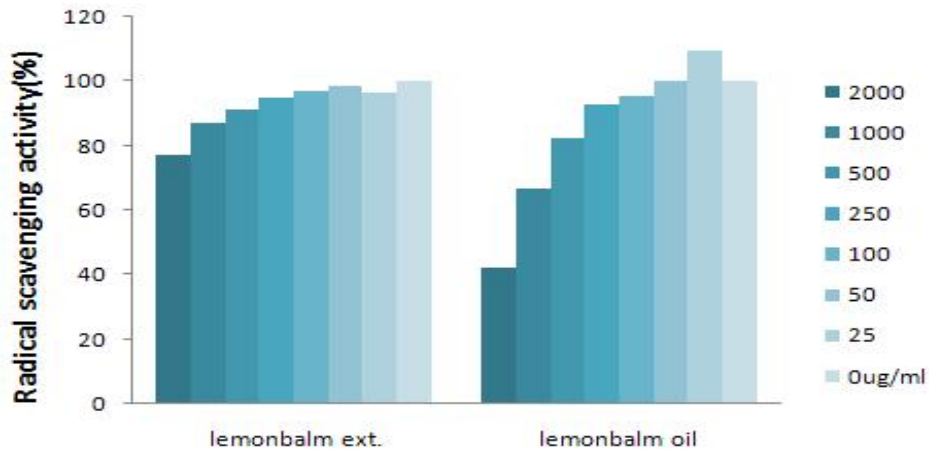


Figure 3.7 DPPH radical scavenging activity.

- ◆ 레몬밤 에센셜 오일의 in vitro에서의 항산화 능력을 평가하기 위해 DPPH [1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl]를 처리하였다. 비타민E의 경우 적은 양만 넣어도 항산화능력이 강한 물질로 매우 낮은 농도로 control로 사용하였다.
- ◆ 그림 7은 DPPH를 이용한 레몬밤에센셜 오일과 시판용 기준 오일의 항산화능력을 평가한 그림으로 대조군으로는 강력한 항산화 효과가 있는 비타민E를 기준으로 비교하였다. 레몬밤 에센셜 오일의 경우 아무것도 넣지 않은 control과 비교했을때 약 25ug/ml에서부터 약하게 라디칼 소거 활성이 보인다. 농도 의존적으로 그 활성이 증가하여 2000ug/ml에서 그 활성이 20% 이상으로 나타났다.
- ◆ 이에 반해 시판 레몬밤 오일은 25과 50ug/ml에서는 소거능을 나타내지 않았으나, 100ug/ml에서부터 농도가 증가함에 따라 급격하게 라디칼 소거능이 활성화 되었음을 볼 수 있었으며, 2000ug/ml에서는 약 50% 이상의 활성을 나타내는 것으로 보아 항산화 능력이 뛰어난 것을 알 수 있었다.
- 내용 요약
- ◆ 위의 내용을 요약하면, mushroom tyrosinase에서 레몬밤 에센셜 오일 농도 의존적으로 tyrosinase를 억제시키는 효과를 가지고 있고 그 항산화능은 비타민E와 시판되는 레몬밤 오일과 비교하여 볼 때 그 능력이 미비한 것으로 나타났다. 또한 세포 사멸 정도를 평가해 보면 1000ug/ml의 고농도에서도 약 20%의 사멸률을 나타내는 것으로 보아 배양 세포계에 독성이 크지 않음을 평가할 수 있다.
- ◆ 레몬밤 추출물을 200ug/ml, 800ug/ml을 처리했을 때 멜라닌 함량을 평가해 보면, 고농도에서 melanin content가 감소함을 볼 수 있었다. 이것으로 볼 때 melanin을 합성하는 경로에서 단백질이나 유전자 수준에서 그 활성이 감소 된 것으로 추론해 볼 수 있다. 하지만 레몬밤 에센셜 오일을 처리한 뒤, 세포에서 추출한 단백질을 가지고 tyrosinase의 활성을 보았을 때는 레몬밤 오일이 tyrosinase의 activity를 저해하는 능력이 없음을 보였다.
- ◆ 레몬밤 에센셜 오일의 멜라닌 합성 관련 gene들의 유전자 감소능력을 평가 하였는데, tyrosinase는 고농도(800ug/ml)에서 TRP-1은 저농도(200ug/ml)에서 유전자가 감소되는 양상을 나타내었다.

TRP-2는 레몬밤 에센셜 오일의 경우 전혀 감소 능력이 없었지만, 시판되는 레몬밤 오일의 경우에는 유전자 활성이 농도 의존적으로 줄어들 수 있었다.

- ◆ 향후 실험에서는 돌연변이체 레몬밤을 에센셜 오일을 추출하여 일반 레몬밤 에센셜 오일과의 차이점을 평가할 예정이다. 레몬밤 에센셜 오일 실험에서와 같은 시판되고 있는 레몬밤 오일을 standard물질로 하여 비교하며, 돌연변이체 레몬밤 에센셜 오일을 통해 얻을 수 있는 미백효과에 대해 측정해 볼 예정이다.
- ◆ 일반적인 레몬밤 에센셜 오일의 결과와 비교하여 레몬밤 돌연변이체의 에센셜 오일에 대한 mushroom tyrosinase 활성 감소 효과 및 배양 세포계에서의 melanin content, tyrosinase 활성을 평가 하고, 항산화 능력과 멜라닌 합성 관련 유전자인 tyrosinase gene과 TRP-1, TRP-2의 활성을 측정하는 실험을 진행할 예정에 있으며, 일반적인 레몬밤 에센셜 오일에서 얻은 data와 비교해 예정이다.

나. 2차년도

- ◆ 건조시킨 돌연변이 레몬밤과 wild type의 레몬밤 추출물을 80%에탄올에 환류 추출하여 동결건조한 후 건조된 고체 추출물을 얻었다. 그 돌연변이 레몬밤 추출물의 수율은 7.57%, wild type의 레몬밤 추출물은 12.5%로 1차년도에 수행한 열수 추출 방법에 비해서 수율이 증가되었다.
- ◆ 대부분의 생명체는 산소를 산화시켜 얻어지는 에너지를 이용하여 생명을 유지하는데, 이런 산소가 필요한 대사과정에서 세포막에 있는 고도의 불포화지방산을 공격하여 세포를 파괴하는 부산물인 활성 산소를 만들어낸다.
- ◆ 이러한 활성산소는 육체 및 정신적 변화와 여러 가지 피부기능의 감퇴로 인하여 색소침착, 피부노화, 주름 등이 유발된다. 피부노화를 지연시키기 위해서는 생체 내 뿐만 아니라 피부에서 과잉의 활성산소 생성을 억제하고 생성된 활성 산소를 효율적으로 제거할 수 있는 시스템이 반드시 필요하다.
- ◆ 활성산소를 제거할 수 있는 물질로 우리 몸이 노화되고 손상되는 것을 막아주는 물질을 항산화제라고 하는데, 인체내에 존재하는 항산화 기능을 하는 효소는 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase등이 있으며, 천연 항산화제로 phenol성 화합물, flavonoid유도체, ascorbic acid, tocopherol(vitamin E) 등이 있다.
- ◆ 활성산소를 제거하여 피부미백효과를 나타내는 flavonoids류의 함량을 확인하기 위해, 80% 에탄올 추출로 얻은 돌연변이 레몬밤 추출물과 wild type의 레몬밤 추출물의 total flavonoid를 측정하여 표 2-1에 나타내었다.

Material	Total flavonoid concentration ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of LBE or mLBE)
LBE	74.3 ± 0.1
mLBE	82.8 ± 0.0

Table 2-1. Total flavonoids

- Wild type의 레몬밤 추출물(LBE)은 $74.3\mu\text{g}/\text{ml}$, 돌연변이 레몬밤 추출물(mLBE)는 $82.8\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 total flavonoid를 함유하고 있었다. Total flavonoid에 있어서 mLBE가 LBE에 비해서 11%정도 증가된 것을 확인할 수 있었다. 이는 방사선 조사된 돌연변이 레몬밤 추출물에서 total flavonoids가 증가되었음을 나타낸다.
- 돌연변이 레몬밤 에탄올 추출물이 항산화 물질로 알려진 flavonoids를 다량 함유하고 있으므로 항산화력이 있다고 판단되어 DPPH radical 소거능을 측정하였다. 환원력이 클수록 강력한 항산화 역할을 한다고 볼 수 있는데, DPPH는 질소원자가 불안정한 상태에서 쉽게 항산화물질과 반응하여 수소원자를 받아들여 안정된 성질을 이용하여 항산화 능력의 정도를 측정하였다.

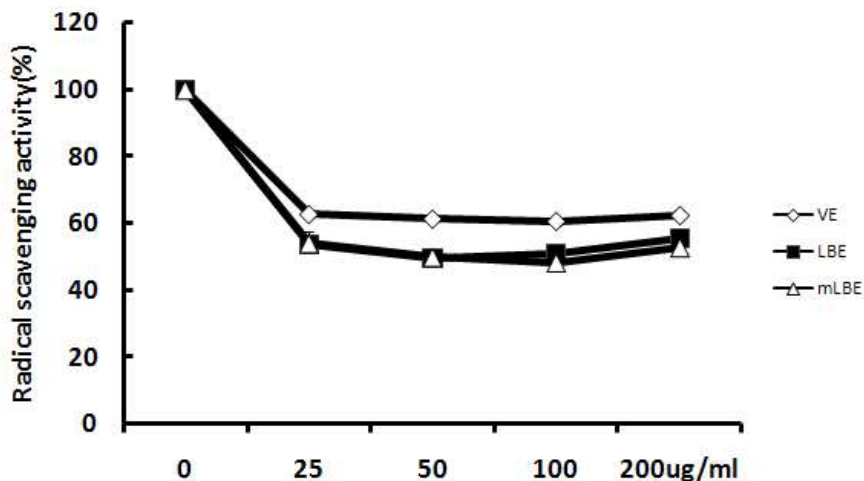


Figure 3-8. Anti-oxidant activities of LBE and mLBE in DPPH radical scavenging activity assay.

- DPPH 를 이용한 유리 라디칼 소거 반응으로 돌연변이 레몬밤 추출물의 항산화작용을 측정한 결과, 측정된 추출물의 농도 모두에서 항산화작용을 보였다(Fig 2-1). 또한 동일 농도에서 효능을 비교할 때, $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서 control로 사용한 wild type의 레몬밤 추출물보다 라디칼 소거작용이 다소 증가하는 것으로 나타났다. 또한 전체적인 항산화 효과가 positive control로 사용한 vitamine E

에 비하여 레몬밤 추출물에서 약 10%가량 억제효과가 큰 것으로 보였다.

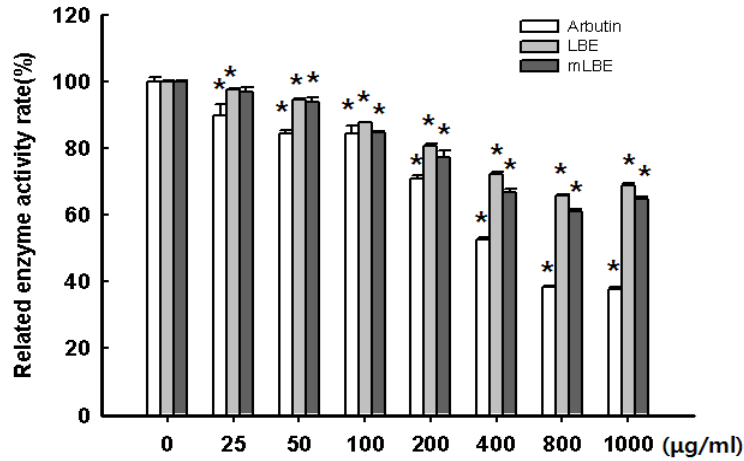


Figure 3-9. Inhibitory effect of mLBE, LBE and the positive control, Arbutin on the activity of mushroom tyrosinase. Activity was determined spectrophotometrically using tyrosinase as the substrate. Values represent the mean \pm S.E.M. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ vs. control.

- 돌연변이 레몬밤의 미백작용을 확인하기 위하여 먼저 melanin 생성에 중요한 작용을 하는 tyrosinase의 직접적인 작용을 관찰하였다. tyrosinase는 L-tyrosine을 L-DOPA로 전환시키고 이어 L-DOPA를 L-DOPA quinone으로 산화시킨다. 이때 cyteine이나 Thiolrl를 갖는 물질이 없을 때 자발적으로 L-DOPA chrome이 형성된다. 이 실험에서는 tyrosinase의 기질을 L-tyrosine과 L-DOPA를 이용하여 mushroom tyrosinase의 활성을 측정하였다. 이는 후에 실험한 세포에 레몬밤 추출물을 처리하고 수행한 tyrosinase activity과는 다른 실험이다.
- Fig 2-2 에서 보듯이 wild type의 레몬밤추출물(LBE)과 mutant type의 레몬밤추출물(mLBE)모두 50ug/ml이하의 낮은 농도에서 tyrosinase의 합성 저해능이 나타나지 않았지만, 100ug/ml 이상에서 농도 유의적으로 tyrosinase 활성이 감소하는 것을 볼 수 있었고 농도가 증가할수록 mLBE가 LBE보다 억제 효능이 커지는 것으로 나타났다. 이것은 레몬밤 추출물 자체로 tyrosinase의 활성을 억제 시킨다는 것을 의미한다.
- 실험에 positive control로 사용한 알부틴은 미백효능이 좋은 물질로 잘 알려져 있으며 화장품 산업에서 기능성물질로 사용되는 것으로 알려져 있다. 알부틴은 tyrosinase에 기질이 결합하는 부위에서 작용하여 기질이 tyrosinase에 결합하는 것을 방해하는 것으로 알려져 있다.
- 알부틴은 25ug/ml에서부터 농도 의존적으로 1000ug/ml 까지 유의적으로 tyrosinase activity가 감소하는 경향을 나타냈다. 이는 알부틴이 tyrosinase의 활성을 억제 시키는 작용을 하여 멜라닌 합성을 저해하고 화이트닝 효과를 보인다는 것을 의미 하는 그래프라 할 수 있다. 이 결과를 볼 때, 농도 의존적으로 레몬밤 추출물이 tyrosinase activity에 영향을 주어 미백 효과가 있을 수 있음을 추론해 볼

수 있다.

- ◆ mushroom tyrosinase에 억제 효능이 있는 농도를 B16 murine melanocyte에 각각의 레몬밤 추출물을 72h 처리하여 독성실험을 수행하였다. 돌연변이 레몬밤 추출물(mLBE)을 장시간 세포에 노출하는 실험에서 세포 독성이 있는지를 확인하기 위하여 MTT를 이용한 세포 생존율을 측정하였다. 이는 미백효과가 있으면서 세포 독성에 영향을 주지 않는 농도를 세포 실험에 선별하기 위해 이루어 졌다.
- ◆ Fig 2-3의 그래프에서 나타난 것과 같이 세포 생존율을 알아본 결과 돌연변이 레몬밤 추출물(mLBE)이 0-200ug/ml까지는 크게 독성이 없는 것으로 보였으나 400ug/ml이상의 농도에서 control에 비하여 30% 정도의 값을 보이는 것으로 관찰되었다.
- ◆ 그리고 Fig2-3에서 보듯이 레몬밤 추출물(LBE)의 경우에는 0-400ug/ml 농도에서 세포에 독성이 적은 것으로 나타났으며 이 범위의 농도로 세포에 처리 시 사멸효과가 크지 않음을 예측할 수 있다.
- ◆ 또한 Fig 2-3의 white bar는 positive control로 사용한 Arbutin으로 tyrosinase의 효소 활성을 강하게 억제하는 물질로 알려져 있는데 실험에 사용한 0-400ug/ml 농도에서는 무처리 군인 control과 비슷한 양상으로 보아 세포독성이 나타나지 않음을 의미한다.
- ◆ 이를 기준으로 돌연변이 레몬밤 추출물(mLBE)에서는 독성을 나타내지 않는 범위인 100, 200ug/ml의 농도를 이용하였으며, standard물질로는 wild type의 레몬밤추출물(LBE) 100, 200ug/ml를 사용하였고 positive control인 Arbutin의 경우에는 125ug/ml의 농도로 처리하여 실험에 사용하였다.

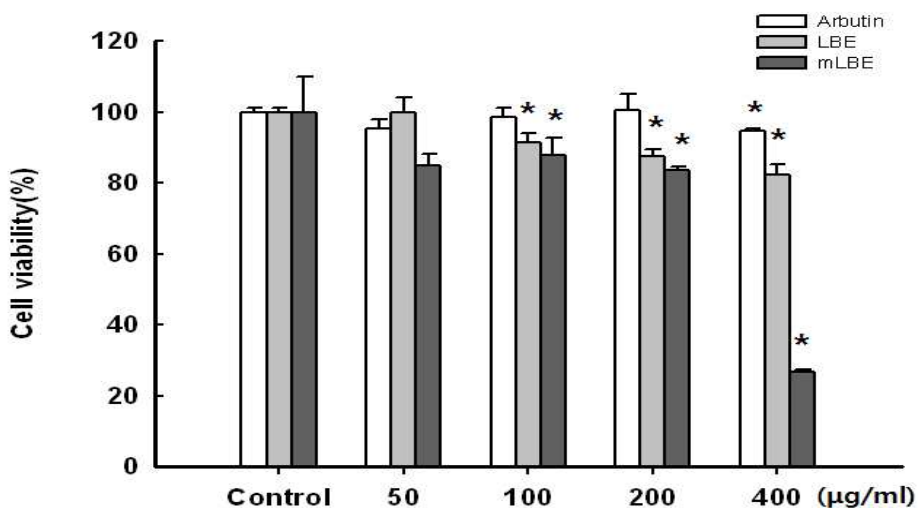


Figure 3-10. Effect of wild and mutant type of lemonbalm extract and Arbutin concentration on the growth inhibition of B16 murine melanocytes determined by MTT assay after 72-h incubation. Values represent the mean \pm S.E.M. *, $p < 0.05$ vs. control.

- ◆ 다음의 그래프(Fig 2-4)는 돌연변이 레몬밤 추출물(mLBE)을 B16 세포에 처리하여 세포내 tyrosinase 활성을 나타내는 것으로, 여기에는 positive control로 미백에 효과가 있다고 알려진 Arbutin를 사용하

였다.

- ◆ Tyrosinase 활성은 B16 세포에서의 물질을 72시간 처리한 후에 단백질을 추출하여 세포 안의 tyrosinase 활성 변화를 측정하였다. tyrosinase 활성은 DOPA의 oxidase activity를 측정하여 평가하는데, DOPA의 산화로 인해 DOPA chrome이 되면서 일어나는 색 변화로 그 활성을 평가할 수 있다. 이는 흡광광도계를 이용하여 420nm에서 측정하였다.
- ◆ Fig 2-4는 멜라닌 합성에 중요한 역할을 하는 tyrosinase의 합성이 각각의 레몬밤 추출물을 처리했을 때 control에 비하여 모두 감소하는 것을 볼 수 있었다. 각 3반복으로 하여 실험을 진행하였고 Fig2-5에서 볼 수 있듯이 control에 비하여 레몬밤 추출물과 Arbutin을 처리한 군에서 멜라닌 합성정도가 감소되었음을 확인 할 수 있었다.
- ◆ 돌연변이 레몬밤 추출물을 세포에서 추출한 단백질인 tyrosinase에 100ug/ml을 처리했을 때 control보다 22% 활성 억제 되었고, 200ug/ml의 돌연변이 레몬밤 추출물을 처리 했을 때는 45%정도 유의적으로 감소하는 경향을 보였다. Fig 2-4에서 보는 바와 같이 돌연변이 레몬밤 추출물을 처리했을때, 세포내 tyrosinase 활성이 억제되어 멜라닌 색소 생성이 감소된 결과를 눈으로 확인할 수 있었다.
- ◆ 대조군으로 사용한 일반 레몬밤 추출물을 처리했을 때는 100ug/ml에서 돌연변이 추출물을 처리했을 때와 같이 약20% 비슷한 감소효과를 보였으나 200ug/ml의 농도에서는 약30%의 감소효과를 보여 돌연변이 레몬밤 추출물을 처리한 것 보다 억제 효과가 적은 것으로 나타났다.
- ◆ Positive control로 사용한 Arbutin (125ug/ml)가 약 64%이상 tyrosinase의 활성을 억제하는 것에 비하여 돌연변이 레몬밤 추출물이 tyrosinase 활성을 저해능이 크지는 않았지만 돌연변이 레몬밤 추출물이 멜라닌 합성에 주요 효소인 tyrosinase의 활성이 저해되는 것을 확인 할 수 있었다.
- ◆ Fig 2-5는 돌연변이 레몬밤 추출물을 B16 세포에 처리하여 멜라닌 함유량을 나타내는 것으로, 여기에서는 positive control로 미백에 효과가 있다고 알려진 Arbutin을 사용하였다.
- ◆ Fig 2-5에서 보듯이, Positive control인 Arbutin은 멜라닌 합성 효소인 tyrosinase을 강하게 저해하여, 세포 독성이 없는 농도인 125ug/ml정도 처리해도 아무것도 처리하지 않은 control에 비하여 50%정도의 멜라닌 물질만 합성 된 것을 보였다.
- ◆ 돌연변이 레몬밤 추출물의 경우에도 100ug/ml에서 멜라닌 합성량이 16%정도 감소하였고, 200ug/ml을 처리 했을때는 51%정도 유의적으로 감소하는 경향을 나타냈다. 멜라닌 합성량이 감소했다는 것은 돌연변이 레몬밤 추출물의 영향으로 멜라닌 색소를 생성하는 단백질이나 유전자의 저해가 있었음을 나타낸다고 볼 수 있겠다.
- ◆ 이에 반해 wild type의 레몬밤 추출물의 경우 돌연변이 레몬밤 추출물과 마찬가지로 감소하는 경향을 나타냈다. 100ug/ml의 레몬밤 추출물을 세포에 처리한 경우에는 12%정도 멜라닌 합성량을 억제시키는 것으로 보였고 200ug/ml의 레몬밤 추출물을 처리했을 때는 44%정도 감소되는 것으로 나타났다.
- ◆ 전체적인 멜라닌 생성량의 경우에는 돌연변이 레몬밤 추출물의 농도가 증가함에 따라 감소하는 경향

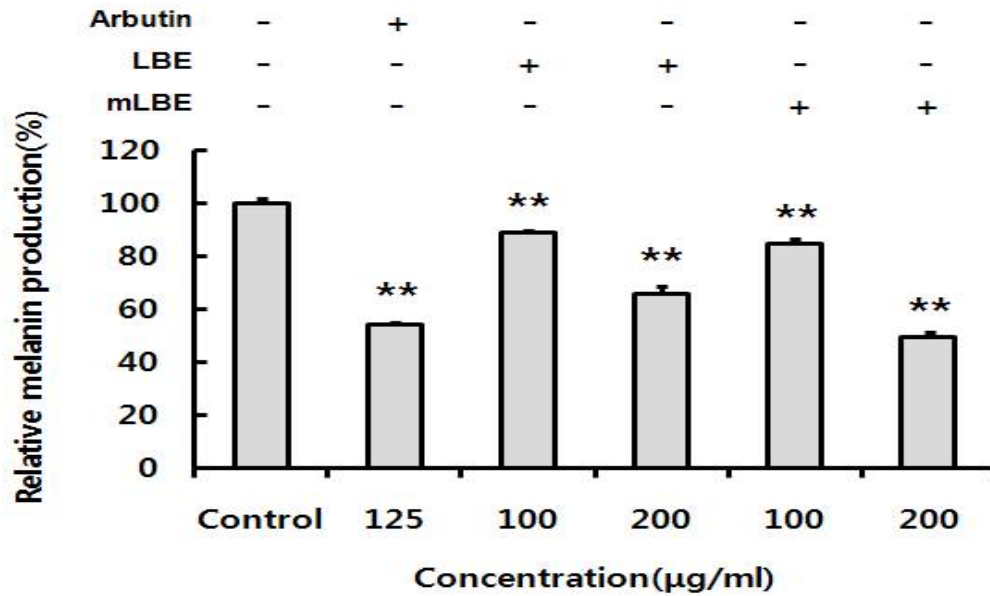


Figure 3-12. Wild and mutant lemonbalm extract and Arbutin lowered the melanin content in the cell. The melanin contents were determined in the control and test substance-treated B16 cells at 72 hours after the treatment. Values represent the mean \pm S.E.M. *, $p < 0.05$ **, $p < 0.01$ vs. control.

을 나타냄을 보였고, wild type의 레몬밤 추출물 경우에도 비슷한 미백 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

- 세포내 tyrosinase 활성과 melanin 함유량의 감소를 확인하여 유전자 수준에서의 멜라닌 합성 저해능이 있을 것이라 판단하여 이를 평가하기 위해 RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction)을 수행하였다. 멜라닌 합성에 관여하고 있는 효소인 tyrosinase와 Tyrosinase related protein-1(TRP-1), Tyrosinase related protein-2 (DOPA chrome tautomerase, TRP-2) 그리고 MITF의 유전자 발현을 평가하였다.
- Fig 2-6A는 wild type의 레몬밤 추출물과 돌연변이 레몬밤 추출물을 세포에 24시간 처리했을 때 멜라닌 합성에 관여하는 유전자들의 발현정도를 측정하였다. tyrosinase은 tyrosine을 수산화해 DOPA로 변환하는 tyrosine hydroxylase활성, DOPA를 DOPAquinone으로 산화하는 DOPA oxidase활성을 가지고있는 melanin 합성 반응에 있어 가장 중요한 역할을 하고 있다
- Wild type의 레몬밤 추출물의 경우 tyrosinase 유전자와 관련해서 실험에 사용한 두 농도 모두에서 약 10%정도 감소하는 경향을 나타내어 tyrosinase 발현을 크게 감소시키지 않음을 확인할 수 있었다. 이에 반해 돌연변이 레몬밤 추출물을 melanocyte에 처리했을 때, tyrosinase gene의 활성이 유의적으로 감소되는 것으로 나타났다. 100ug/ml의 농도에서는 9%정도 감소되었지만 200ug/ml의 농도로 처리했을때 유의적으로 억제효과를 나타내어 43%의 감소효과를 나타내었다. 이것으로 보아 고농도의 돌연변이체 레몬밤 추출물에서 tyrosinase 유전자 활성이 감소하는 것을 알 수 있었다.

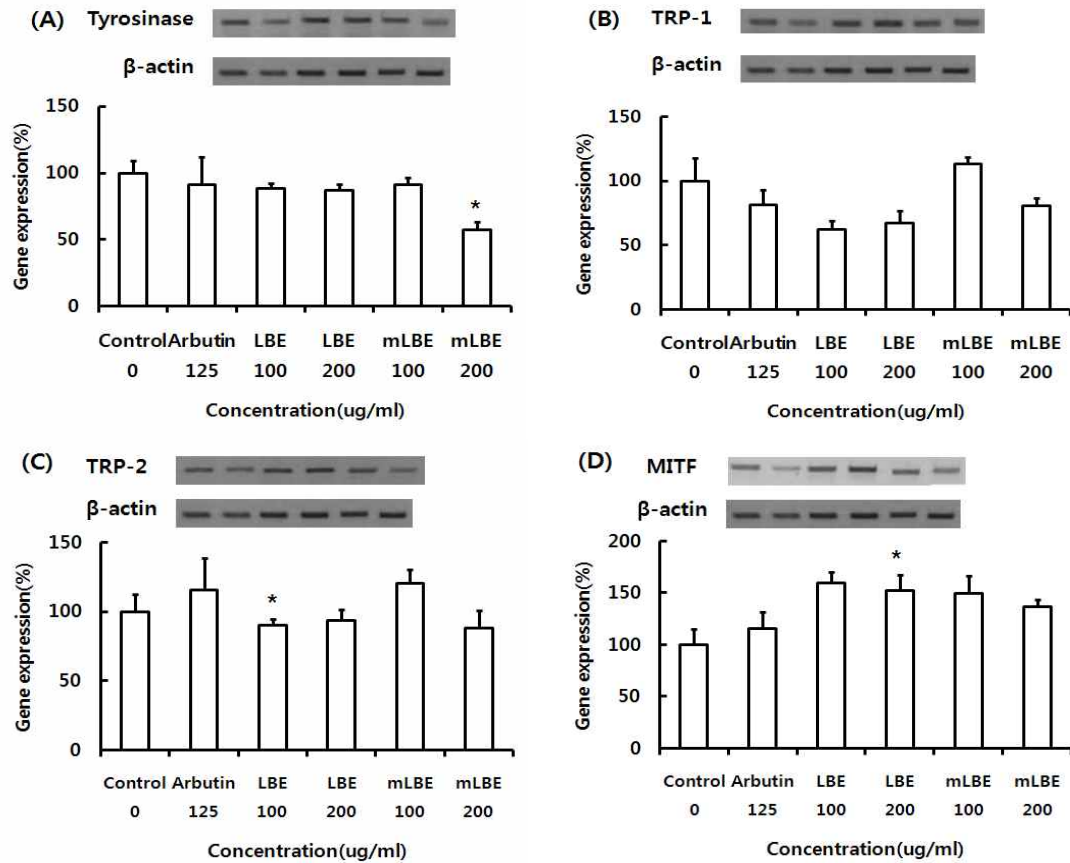


Figure 3-13 Effect of LBE and mLBE on mRNA expression of melanogenesis-related gene. Cells were treated with 100 and 200ug/ml LBE and mLBE for 24 hours. Then cells were harvested and total RNA was extracted. mRNA expression was visualized by RT-PCR. The sizes of amplified gene products were 528bp for β -actin, (A)477bp for tyrosinase, (B)286bp for TRP-1, (C)1044bp for TRP-2 and (D)910 bp for MITF. Values represent the mean \pm S.E.M. *, $p < 0.05$ **, $p < 0.01$ vs. control.

- melanin 합성 효소 중 하나인 TRP-1의 경우(Fig 2-6B), control과 비교하여 wild type의 레몬밤 추출물을 처리 하였을때 두 농도 모두에서 발현정도가 감소됨을 알 수 있었다. 이에 반해 돌연변이 레몬밤 추출물을 처리한 세포에서는 저농도에서는 control과 비슷한 수준으로 유전자 발현 억제효과가 나타나지 않았고 고농도(200ug/ml)에서 20%의 gene expression이 감소되는 것으로 나타났다.
- Fig 2-6 C는 돌연변이 레몬밤 추출물을 세포에 처리 후 tyrosine이 melanin으로 합성되는 과정 중 관여하는 효소인 TRP-2(tyrosinase-related protein 2:DOPA chrome tautomerase)의 변화를 나타낸 그래프로 200ug/ml농도를 처리했을때 약 5%정도 유전자 발현이 control에 비해 감소하는 경향을 나타냈다. Wild type의 레몬밤 100ug/ml에서는 유의적으로 약 10%정도 발현이 줄어들었고 200ug/ml을 처리했을때에도 비슷한 감소를 보였다. TRP-2와 같이 melanin 합성에 주요역할을 하는 tyrosinase와 TRP-1에 비해서는 유전자 억제효과가 크지 않음을 확인 할 수 있었다.
- MITF(Microphthalmia-associated transcription factor)는 피부색소 조절에 관여하는 단백질의 발현을

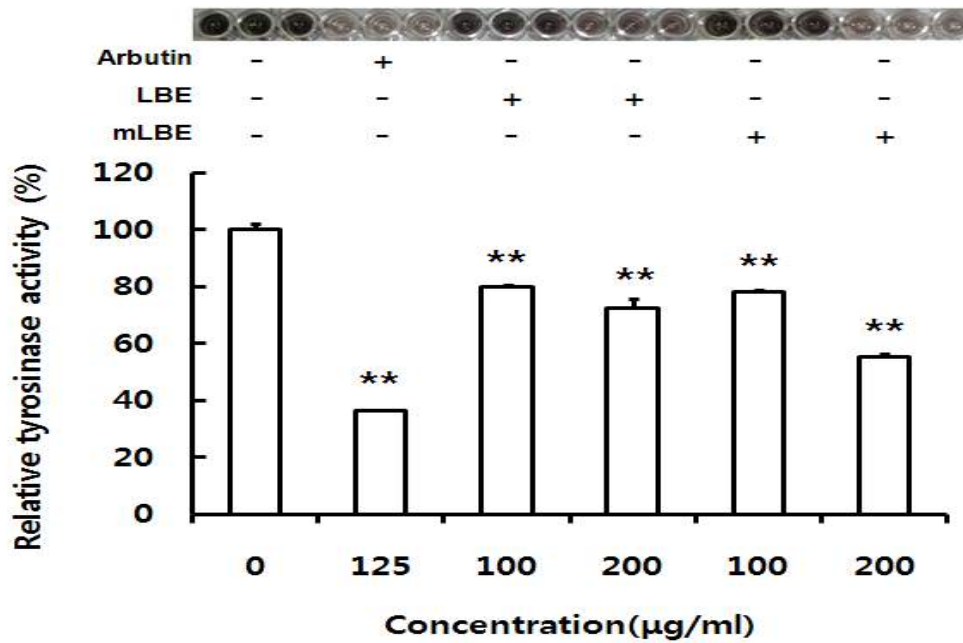


Figure 3-11. The tyrosinase activity in B16 cells incubated with wild and mutant type of lemonbalm extract. B16 cells incubated for 72h with lemonbalm essential oil and oil and the positive control, Arbutin(125ug/ml) were lysed. Values represent the mean \pm S.E.M. *, $p < 0.05$ **, $p < 0.01$ vs. control.

조절하는 주요 전사 인자로 색소조절과 함께 멜라닌 형성세포인 멜라노사이트의 발달과 생존에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. Fig 2-6 D에서는 각각의 레몬밤 추출물을 세포에 처리한 후 MITF의 유전자 변화를 실험하였다. Control군에 비하여 positive control인 arbutin을 비롯하여 레몬밤 추출물을 처리한 군에서 대부분 유전자 발현이 증가되는 것을 볼 수 있었으며 이는 레몬밤이 MITF를 조절하는 pathway가 아닌 다른 경로를 통해 melanin 합성을 억제시키는 것으로 추측해 볼 수 있다.

- Fig 2-6에서 돌연변이 레몬밤 추출물을 melanoma 세포에 처리하므로써 관련 멜라닌 합성 유전자에 미치는 영향을 평가하였는데, tyrosinase와 TRP-1 발현은 강하게 저해하는 것으로 나타났고 TRP-2의 유전자 발현은 10%내외로 억제정도가 크지 않았으며 MITF의 mRNA level은 억제 되지 않는 것으로 나타났다. 멜라닌 생합성 경로 중 MITF의 유전자 발현 억제가 아닌 다른 pathway를 조절하므로써 멜라닌 합성을 억제 시키는 것으로 사료된다.
- 멜라닌 합성은 tyrosinase에 의해 조절되는 일련의 효소적 반응에 의해 조절되며, tyrosine을 기질로 하여 dopa를 생성시키고 다시 dopaquinone으로 산화시키는 연속적인 효소적인 산화가 진행된 후 각 생성물의 중합반응에 의해 이뤄진다고 알려져 있다. 세포내 멜라닌 합성 유전자 감소를 확인하여 단백질 합성에도 연관성이 있는 지를 확인하기 위하여 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF의 항체를 이용한 western blot으로 단백질의 발현량 변화를 실험하였다.

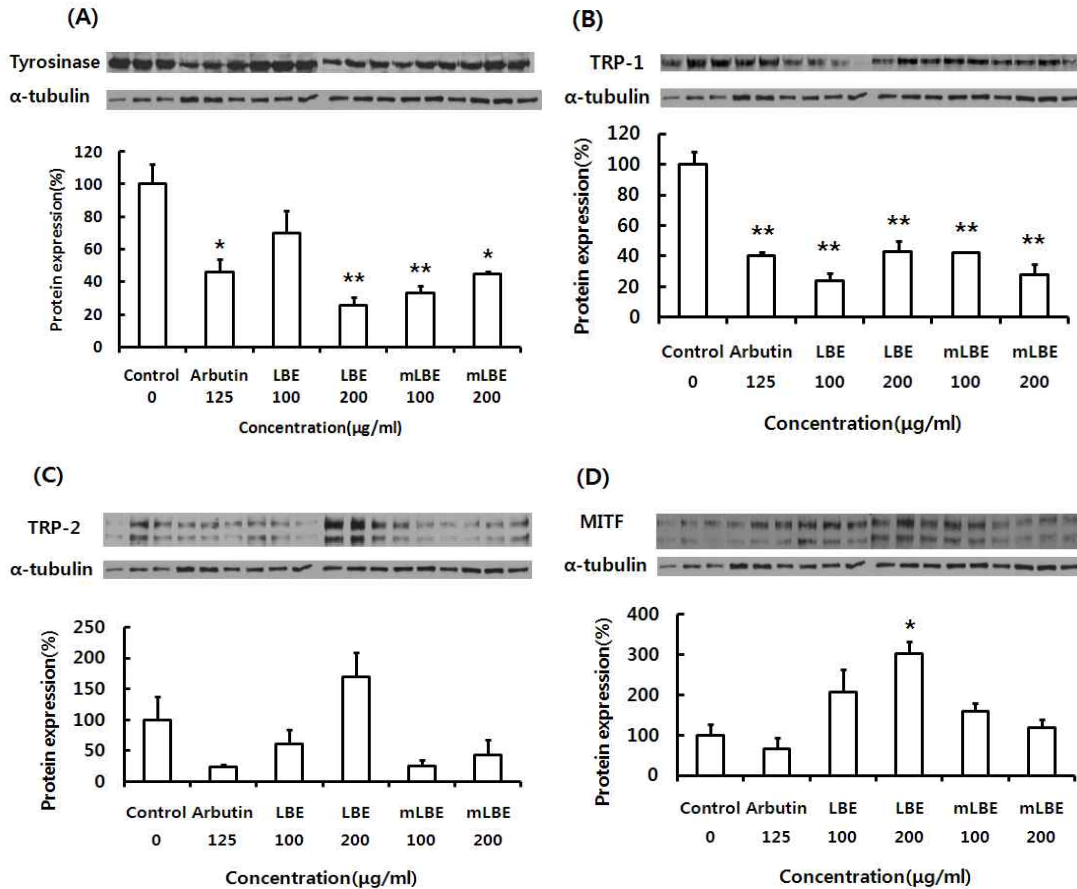


Figure 3-14 Western blot analysis of tyrosinase, TRP-1, TRP-2, and MITF protein level in B16 melanocytes prepared from LBE and mLBE treated. Cells were treated with 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$ of LBE and mLBE for 72 hours. Each concentrations were repeated by 3 times. The sizes of detected-protein were 55KDa for α -tubulin, (A) 75KDa for tyrosinase, (B)80KDa for TRP-1, (C)59KDa for TRP-2, and (D) 55KDa for MITF. Values represent the mean \pm S.E.M. *, $p < 0.05$ **, $p < 0.01$ vs. control.

- Fig 2-7A에서 돌연변이 레몬밤 추출물은 tyrosinase의 단백질 발현을 저해하여 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 67%, 56% 유의적으로 발현 억제효과를 보이는 것으로 나타났으며 wild type의 레몬밤 추출물 역시 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 30%, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 75%정도 유의적으로 활성을 억제하는 것으로 확인되었다. 이는 유전자 수준에서 tyrosinase를 억제한 것과 같은 효과를 나타내는 것으로 돌연변이 레몬밤 추출물이 tyrosinase의 유전자, 단백질 수준에 영향을 미쳐 멜라닌 합성을 저해하는 것으로 볼 수 있다.
- 돌연변이 레몬밤 추출물을 처리한 세포에서 TRP-1의 단백질 합성정도를 평가를 수행하였다. Fig 2-7 B에서 볼 수 있듯이, control 군에 비해서 추출물을 처리한 모든 군에서 단백질 합성이 감소하는 것으로 나타났다. 돌연변이 레몬밤 추출물을 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리했을 때 58%의 저해효과를 나타냈고, 200 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리했을 때는 73%의 억제 효과를 나타내었다. 이는 알부틴을 처리한 군과 비슷하게 TRP-1 단백질 합성을 감소시키는 것으로 관찰되었고, wild type의 레몬밤 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 세포

에서 77% 유의적으로 억제 효과를 보였으나 200ug/ml을 처리했을때는 58% 감소효과를 나타내어 고 농도에서 감소효과가 줄어들음을 확인하였다. 돌연변이 레몬밤 추출물을 처리한 세포에서 나타난 억제 효과는 유전자 수준에서 감소된 효과와 비슷한 경향을 보여 TRP-1단백질 저해효과가 유전자 감소효과에 의한 결과라고 추측해 볼 수 있다.

- Fig 2-7C.은 TRP-2는 dopachrome을 DHICA로 이성화 하는 효소로 잘 알려진 멜라닌 합성효소 중 하나이다. 돌연변이 레몬밤을 세포에 처리했을때, 100ug/ml의 농도에서는 76%, 200ug/ml에서는 67%의 감소효과를 나타냈다. 이에 반해 wild type의 레몬밤에서는 100ug/ml의 농도에서 40%의 억제 효과를 보였지만 200ug/ml에서는 오히려 단백질 합성이 증가되는 결과를 얻었다. 멜라닌 합성에 관련된 TRP-2 단백질 합성에서 돌연변이 레몬밤 추출물이 강한 억제 효과를 보이는 것으로 확인하였다.
- western blot으로 MITF 단백질 활성을 본 Fig 2-7D에서는 알부틴을 제외하고 레몬밤을 처리한 모든 군에서 MITF 단백질 합성이 증가된 것으로 나타났다. 이는 Fig 2-7D의 유전자 발현에서 레몬밤추출물을 처리했을 때와 비슷한 경향을 나타내는 것으로 보아 멜라닌 합성 경로 중 레몬밤이 억제하는 부분은 MITF 합성 pathway가 아닌 것을 확인 할 수 있었다.

다. 3차년도

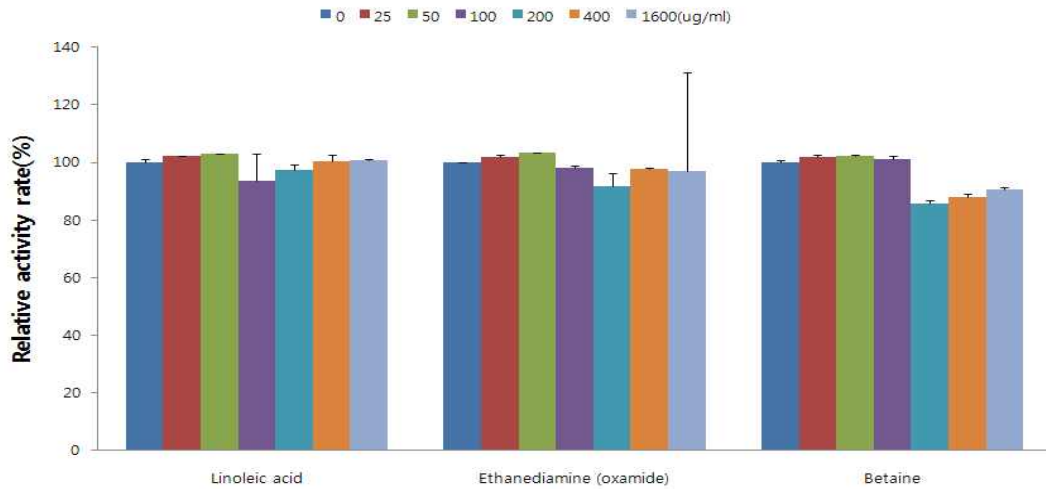
(1) 레몬밤 열수추출성분 내 단일물질 분석 및 미백효능평가

No.	Compound	Peak Area (%)
Alcohols		
1	Cyclopropanemethanol	t
2	Ethanol	23.46
3	Cyclohexanol	6.27
4	Chirald	0.54
Aldehydes		
5	Octadecadienal	7.58
Ketones		
6	Butanedione	1.33
7	Nonanone	0.53
Acids		
8	Threonine	0.52
9	Benzoic acid	3.08
10	Hexanecanoic acid	4.7
11	Octadecadienoic acid	6.51
12	Linoleic acid	13.21
13	Betaine (Trimethylaminoacetic acid)	6.55
Saturated hydrocarbon		
14	Pentane	1.49
Others		
15	Ethanediamine	1.12
16	10H-Phenothiazine-10-propanamine(chlorpromazine)	2.21
17	Dimethylhistamine	6.1
18	Boron	0.76
19	Cyclohexaneethanamine	1.73
20	Butanenitrile	1.3
21	Methanamine	1.77
22	Ethanediamine	8.4
23	Betaine hydrochloride	0.79
Total area of identified peaks (%)		99.96

	함량/100%	lemon balm extracts
1	23.46%	Ethanol
2	13.21%	Linoleic acid
3	8.40%	Ethanediamine(oxamide)
4	7.58%	Octadecadienal
5	6.55%	betaine

< Table 3-1 > The list of single compounds in lemon balm extracts

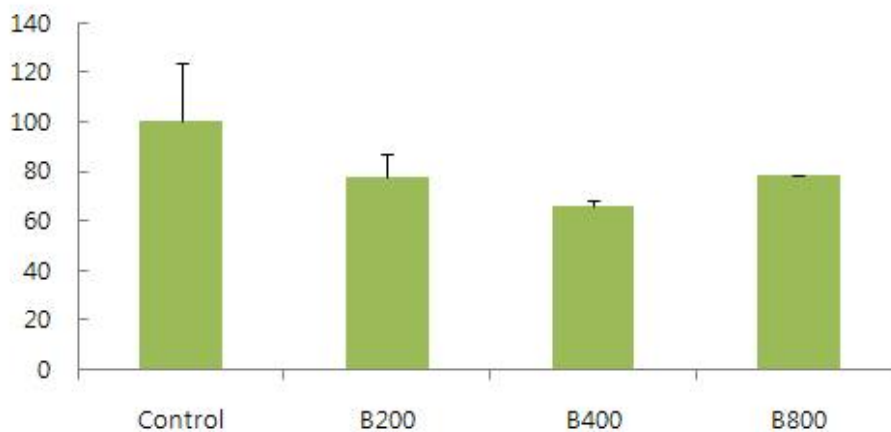
- ◆ 1차년도 레몬밤 추출물로부터 성분분석을 실시하여, 비교적 높은 함량으로 함유되어 있는 물질을 선정, 3차 년도에 각 단일 물질에 대한 피부미백효능평가를 실시하여, 레몬밤의 미백효능에 대한 좀 더 구체적인 근거로 활용하고자 하였다.
- ◆ 표 3-1은 레몬밤 추출물의 성분분석을 실시한 결과로 높은 함량을 차지하고 있는 상위 5개 항목은 아래쪽에 위치하고 있는 표와 같다.
- ◆ Ethanol (23.46%), Linoleic acid (13.21%), Ethanediamine(8.4%), Octadecadienal(7.58%), Betaine (6.55%) 이 레몬밤 열수 추출물에 가장 많이 함유되어있는 단일 물질인 것으로 분석 결과 드러났으며, 이중 미백효능이 있을 것으로 예상되는 물질을 선정하여 미백효능 평가를 진행하였다. 선정된 물질은 다음과 같다.
→ Linoleic acid, Ethanediamine, Betaine.
- ◆ 진행된 미백효능 평가 실험은 MTT assay, mushroom tyrosinase, melanin content 함량 측정 실험으로 구성되어 있다.
- ◆ 선정된 3가지 단일물질로 세포수준에서의 실험을 진행하기에 앞서, 독성을 평가하고 세포에 처리할 적정 농도를 선정하기 위한 MTT assay를 수행하였다.



< Figure 3-15 > Linoleic acid, Ethanediamine, Betaine의 MTT assay

- ◆ MTT assay 실험결과는 그림 3-1에 나타냈으며, 실험분석 결과 Linoleic acid와 Ethanediamine은 1600µg/ml까지 세포독성 결과가 크게 나타나지 않았으며 Betaine은 100µg/ml 이후부터 약간의 세포 독성이 눈에 띄었지만 큰 영향은 끼치지 않는다는 것이 확인되었다.
- ◆ 결론적으로, 레몬밤 함유 단일 물질인 linoleic acid, ethanediamine, betaine은 고농도에서도 유의적인 독성을 보이지 않았으므로, 우리는 비교적 높은 농도(200, 400, 800µg/ml)를 선정하여 이후 tyrosinase activity와 melanin contents 측정 실험을 진행하였다.

Tyrosinase activity

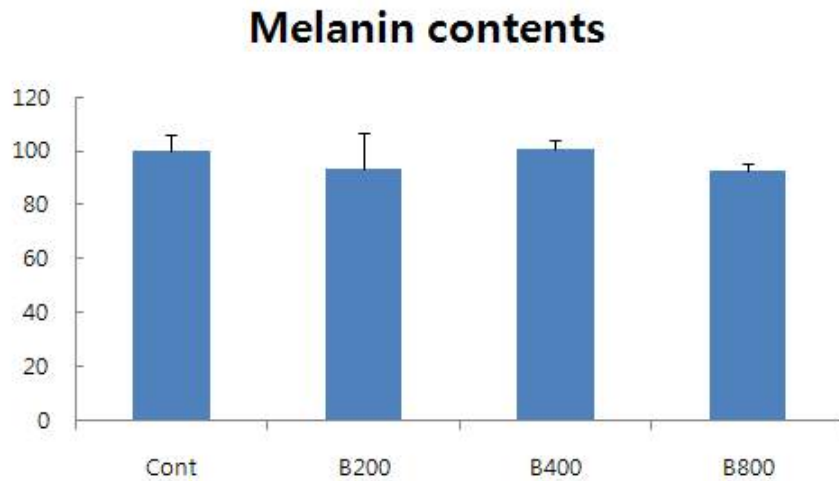


<Figure 3-16 > Betaine 농도처리 따른 Tyrosinase activity

- ◆ 그림 3-2 는 betaine성분이 tyrosinase의 활성화에 미치는 영향에 대해 나타낸 도표이다. X축

은 betaine을 멜라닌 합성 세포에 각각 0, 200, 400, 800 μ g/ml의 농도로 처리하였음을 나타내며, Y축은 tyrosinase에 의하여 생성되는 반응산물인 dopachrome의 흡광도로써 대조군인 0 μ g/ml의 결과를 기준으로 그 활성의 정도를 평가하였다.

- ◆ 실험결과 대조군과 비교하여 betaine의 처리가 멜라닌 합성에 관여하는 효소인 tyrosinase의 활성감소에 영향을 미치는 것으로 판단되었으며, 따라서 반응 생성물인 멜라닌의 함량을 직접 측정함으로써 최종적으로 그 효능을 평가하고자 하였다.



<Figure 3-17 > Betaine 농도 처리에 따른 B16F10 세포에서의 melanin contents

- ◆ 그림 3-3은 멜라닌 합성 세포에 betaine을 각 0, 200, 400, 800 μ g/ml의 농도로 처리하였을 때, 대조군(0 μ g/ml)을 기준으로하여 멜라닌 합성량의 상대적인 값을 비교한 그래프이다.
- ◆ 앞서 그림 3-2에서는 betaine의 농도가 증가함에 따라 tyrosinase의 활성을 억제시킨다는 결과를 얻었다. 하지만 이에 따른 melanin contents는 농도 증가에 따라 일정하게 감소하지 않아 그 미백효과는 미미한 것으로 보인다.

(2) 레몬밤 에센셜오일성분 내 단일물질의 분석 및 미백효능평가

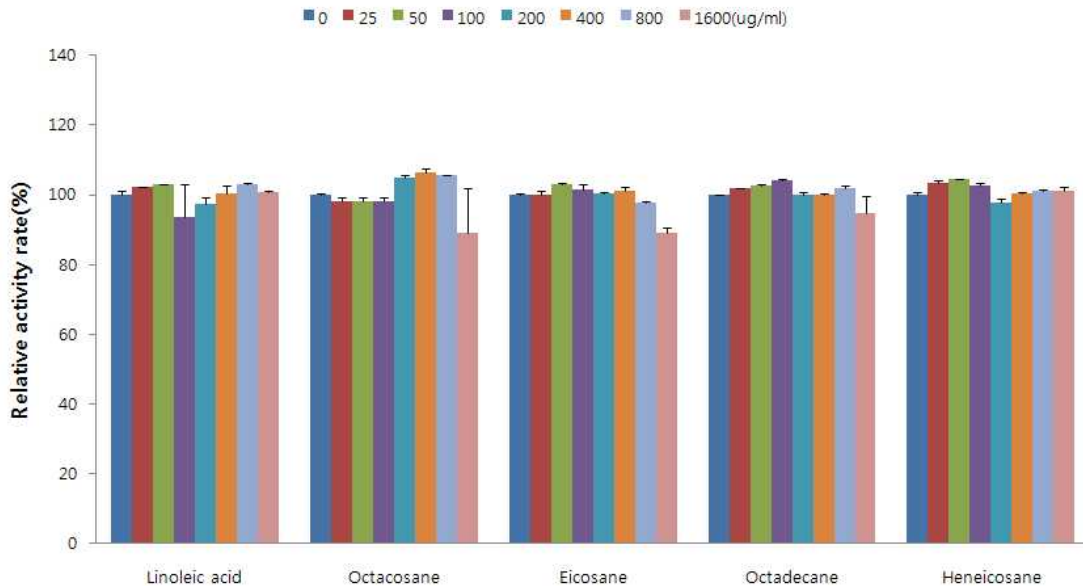
No.	Compound	Peak area (%)
Oxygenated monoterpenes		
1	Citral	0.78
Acids		
2	Palmitic acid	0.81
3	Linoleic acid	25.38
Aldehydes		
4	Octadecadienal	0.56
Alcohols		
5	Linoleyl alcohol	1.86
6	Tetradecynol	4.15
7	Octadecatrien-diol	0.21
Saturated hydrocarbons		
8	Cyclododecyne	1.26
9	Heptadecane	0.97
10	Docosane	3.47
11	Octacosane	17.75
12	Heneicosane	8.02
13	Eicosane	16.02
14	Nonadecane	3.6
15	Octadecane	14.75
Other		
16	Linoleic acid chloride	0.41
Total area of identified peaks (%)		100.00

함량/100% lemon balm essential oils		
1	25.38%	<u>Linoleic acid</u>
2	17.75%	<u>octacosane</u>
3	16.02%	<u>Eicosane</u>
4	14.75%	<u>octadecane</u>
5	8.02%	<u>Heneicosane</u>

< Table 3-2 > 레몬밤 에센셜오일의 single compounds 조성

- ◆ 레몬밤 에센셜오일을 구성하고 있는 단일물질을 분석한 후 상위 5개 물질을 선정하여, 각 물질에 대한 피부미백효능 평가를 진행하고자 하였다.
- ◆ 레몬밤 에센셜오일의 조성은 표 3-2와 같으며, 이중 상위 5개 물질은 아래 작은 표로 정리하였다.

- ◆ 분석 결과 레몬밤 에센셜오일에 함유되어있는 상위 5가지 물질은 linoleic acid(25.38%), octacosane(17.75%), eicosane(16.02%), octadecane(14.75%), heneicosane(8.02%) 였으며, 이들 모두에 대해 피부미백효능 평가를 실시하였다.
- ◆ 선정된 단일물질들에 대한 미백효능평가를 하기에 앞서, 각 성분들의 독성여부를 판단하고, 세포에 처리하기 위한 적정 농도를 선별하기 위해 MTT assay를 실시하였으며 그 결과는 그림 3-4와 같다.

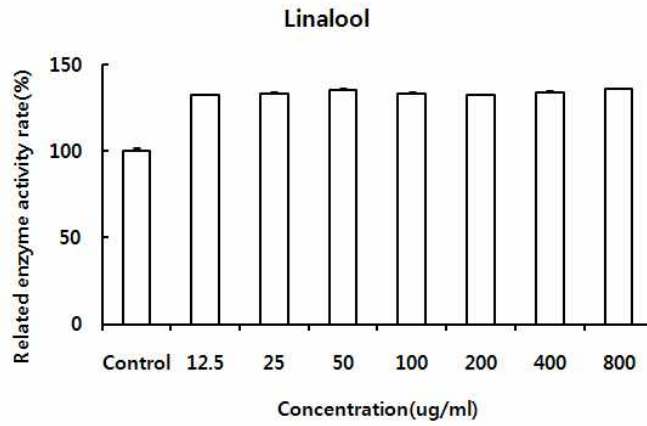


< Figure 3-18> 레몬밤 에센셜 오일 single compounds 의 MTT assay

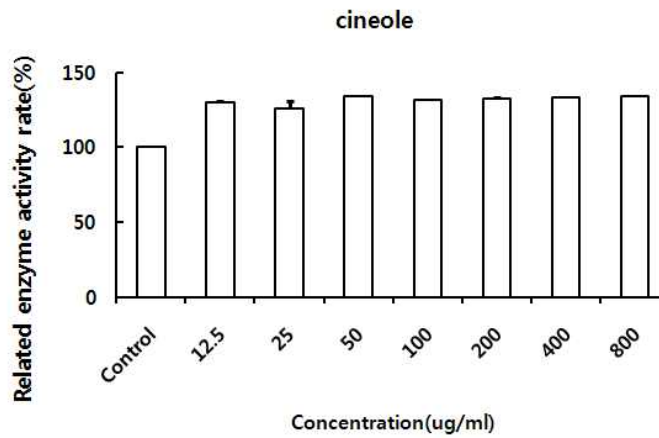
- ◆ 0, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 각 단일 물질의 세포에 처리한 결과, 모든 실험값에서 유의적인 차이는 관찰되지 않았으며, 따라서 독성정도가 미미한 것으로 판단하였다.

(3) 레몬밤 함유 단일물질의 분석 및 미백효능평가

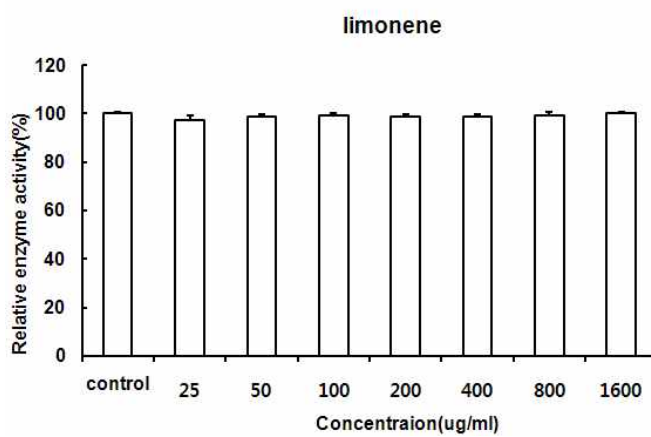
- ◆ 일반적으로 레몬밤 내 함유되어있는 것으로 알려진 단일물질을 선정하여 미백효능을 in vitro로 평가하였다.
- ◆ 선정된 물질은 linalool, cineole, limonene, citral, caryophyllene 으로 총 5가지이며, 이들에 대해 mushroom tyrosinase 활성을 측정된 결과는 다음의 그림 3-5, 6, 7, 9 와 같다.



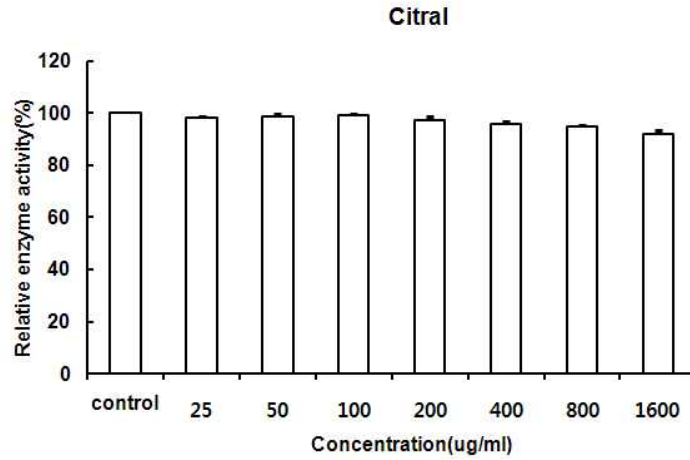
< Figure.3-19> Linalool의 mushroom tyrosinase activity 측정



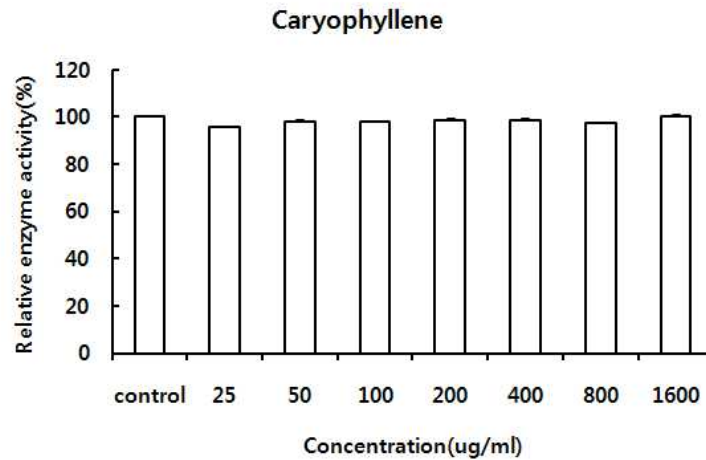
< Figure.3-20> Cineole의 mushroom tyrosinase activity 측정



< Figure.3-21 > Limonene의 mushroom tyrosinase activity 측정

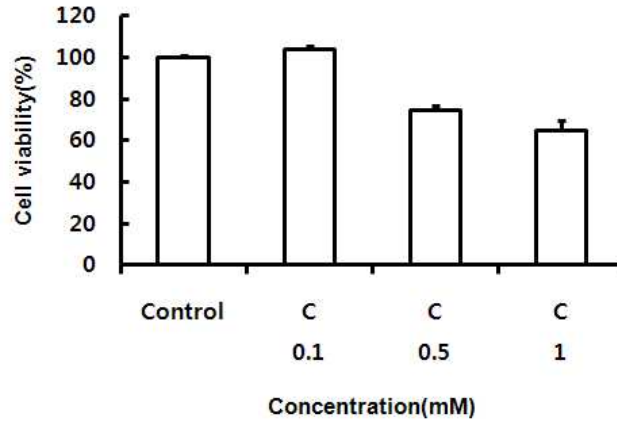


< Figure. 3-22 > Citral의 mushroom tyrosinase activity 측정



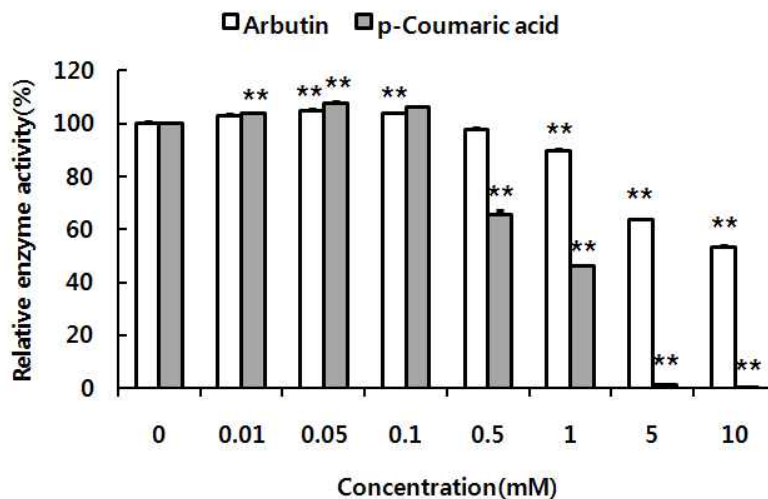
< Figure. 3-23 > Caryophyllene의 mushroom tyrosinase activity 측정

- ◆ mushroom tyrosinase assay 실험 결과, 농도 증가에 따른 tyrosinase 활성 억제 정도가 나타나지 않아 각각의 단일 물질에 대한 효소저해에 따른 미백효능은 미미하다.
- ◆ 이외에도 single compound인 p-Coumaric acid (Hydroxycinnamic acid)의 미백효능을 확인하기 위해 MTT assay, mushroom tyrosinase 활성측정, cell tyrosinase 활성측정 그리고 melanin contents를 측정하였다.



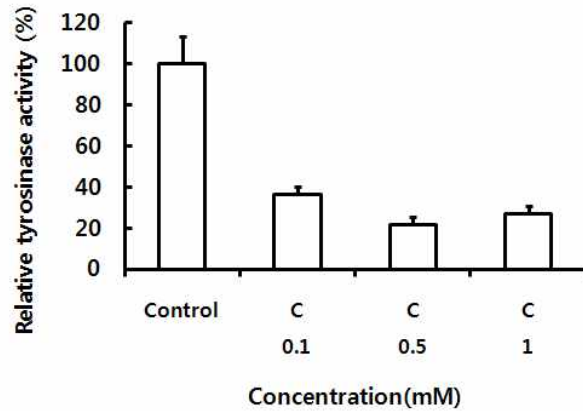
< Figure 3-24. > p-Coumaric acid (Hydroxycinnamic acid)의 MTT assay

- ♦ MTT 실험 결과, 고농도의 p-coumaric acid 처리에서는 세포의 생존률이 감소하는 경향을 보였으나 대조군과 비교하여 유의적인 차이는 관찰되지 않았으므로, 본 실험 농도 내에서 다음 미백효능평가를 위한 실험을 진행하였다.



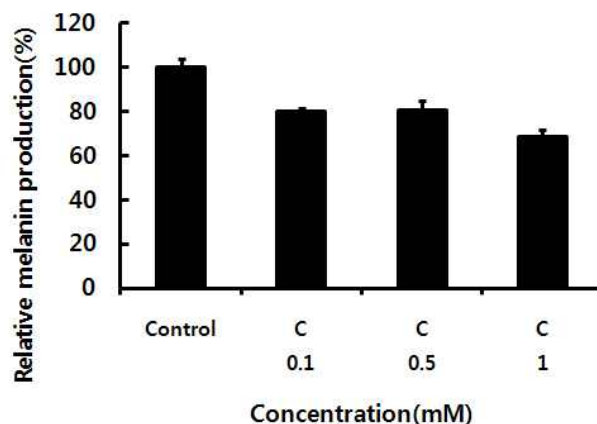
< Figure 3-25 > p-Coumaric acid (Hydroxycinnamic acid)의 mushroom tyrosinase activity 측정

- ♦ 그림 3-11은 mushroom tyrosinase activity를 측정한 것으로, 기존에 미백효능이 있는 것으로 알려진 알부틴을 positive control로 사용하여 비교하였다.
- ♦ 실험결과, 알부틴과 p-coumaric acid의 농도에 따라 효소의 활성이 억제되고 있음을 확인할 수 있었으며, 특히 레몬밤에 함유되어있는 물질인 p-coumaric acid는 기존에 알려진 미백효능 물질인 알부틴에 비해 효소 활성억제 효과가 더 뛰어난 것으로 예상된다.



< Figure 3-26 > p-Coumaric acid (Hydroxycinnamic acid)에 따른 B15F10 cell의 tyrosinase activity 측정

- ◆ 앞선 실험결과 p-coumaric acid가 mushroom tyrosinase의 활성을 억제함을 확인하였기 때문에, 본 단일물질은 멜라닌 합성세포에도 처리하여 그 결과를 다시 관찰하였다. (그림 3-12)
- ◆ 실험 결과, 대조군에 비해 p-coumaric acid를 처리한 그룹에서 tyrosinase의 활성이 감소되는 경향을 보였으며, 특히 낮은 농도에서도 그 효과가 뚜렷이 나타남을 확인하였다. 따라서 본 결과를 바탕으로 단일물질의 미백효능에 대한 최종확인을 위하여 최종반응 산물인 멜라닌의 함량을 *in vitro*로 측정하였다.
- ◆ 세포내 멜라닌 함량 측정 결과는 그림 3-13과 같으며, 측정 결과 p-Coumaric acid를 0.1, 0.5, 1 μ g/ml의 농도로 처리한 그룹의 경우 처리하지 않은 control에서의 멜라닌 합성량에 그 정도가 감소하였으며 농도 증가에 따라 멜라닌 합성 저해 효과가 증가하는 경향을 보여 멜라닌의 함량이 적게 측정되었다. 이로써 p-Coumaric acid는 미백효능을 가진 단일 물질로서 확인할 수 있었다.



< Figure 3-27 > p-Coumaric acid (Hydroxycinnamic acid) 처리에 따른 B16F10 세포의 멜라닌 합성

(4) 레몬밤 내 단일물질에 대한 미백효능평가 결론

- ◆ 3차년도에는 레몬밤에 함유되어 있는 성분을 분석하고, 주요 성분을 선별하여 각 단일물질이 피부미백에 미치는 효능을 개별적으로 스크리닝 하고자 하였다.
- ◆ 본 연구를 위하여 열수 추출한 레몬밤 추출물과 레몬밤 에센셜오일의 성분 분석이 이루어졌으며, 각 분석 결과 높은 함량을 가지고 있는 것으로 보이는 단일물질을 선정하여 실험을 진행하였다. 또한 기존에 알려진 레몬밤 내 단일물질을 조사하여 본 실험에 적용하였다.
- ◆ 실험은 열수 추출물의 분석결과 선정되어진 물질 3종과 에센셜오일함유 성분 5종 그리고 기존에 알려진 레몬밤 내 단일물질 6종으로 진행되었다.
- ◆ 실험결과 모든 단일 물질이 MTT 결과 값에서 독성이 미미한 것으로 판단되었으며 일부 물질들은 멜라닌 합성에 관여하는 효소인 tyrosinase의 활성을 억제하는 경향이 있는 것으로 나타났다. 하지만 최종적으로 멜라닌 합성량까지 감소시킨 물질은 p-coumaric acid 한 가지 이었으며, 이 물질은 현재 미백화장품의 원료로 널리 사용되는 알부틴과 비교한 실험에서도 뛰어난 효능을 보여 레몬밤이 미백효능을 가진 화장품원료로써 사용될 수 있는 가능성을 제시한 것으로 판단된다.

제 4 절: 제4세부 과제 연구내용 및 결과

1. 제4세부 과제 연구내용

가. 1 차년도

: 허브이차대사산물의 제품화를 위한 대량생산 평가기준을 확립하며, 동물을 통한 독성검사를 실시함.

- 3-4 개월령 New Zealand white rabbit 6마리를 본 실험에 사용하며, 체중은 2.5-2.7kg인 동물을 사용한다. 동물 입수 후 1주일간 동물을 순화시킨 다음에 실험에 사용한다. 척추를 중심으로 좌우 각각 2 개 부분을 설정하여, 위쪽에는 찰과상을 유발하고 아래쪽은 찰과상을 유발하지 않는다. 왼쪽은 고려대학교에서 공급받은 시료를 도포하여 사용하고, 오른쪽은 시료를 녹인 용매를 도포하여 피부의 자극성을 확인한다. 물질의 투여 후 24시간, 72시간 후에 피부의 자극성 정도를 표1-2의 평가표와 자극판정 기준에 맞춰서 자극의 정도를 판정한다.

[표. 1] 피부반응 평가표

1. 홍반과 가피형성	
○ 홍반이 전혀 없음	0
○ 아주 가벼운 홍반(육안으로 겨우 식별할 정도)	1
○ 분명한 홍반	2
○ 약간 심한 홍반	3
○ 심한 홍반(홍당무색의 발적)과 가벼운 정도의 가피	4
* 총 가능한 홍반 점수	4
2. 부종형성	
○ 부종이 전혀 없음	0
○ 아주 가벼운 부종(육안으로 겨우 식별할 정도)	1
○ 가벼운 부종(뚜렷하게 부어 올라서 변연부가 분명히 구별될 경우)	2
○ 보통의 부종(약 1mm정도 부어 올랐을 경우)	3
○ 심한 부종(1mm이상 부어오르고 노출부위 밖에서 까지 확장된 상태)	4
* 총 가능한 부종 점수	4

[표. 2] P. I. I.에 의한 자극 편성

정도(P. I. I.)	자극 부분
0.0 ~ 0.5	비자극성(None irritating)
0.6 ~ 2.0	약한 자극성(Mildly irritating)
2.1 ~ 5.0	중등도 자극성(Moderately irritating)
5.1 ~ 8.0	강한 자극성(Severely irritating)

* P. I. I. : 일차자극지수(Primary Irritation Index, Sum of means/4)

나. 2 차년도

: 레몬밤 이차대사산물의 원료 인증실시 및 시제품 개발, 안정성 평가 연구

- 허브 이차대사산물의 원료 인증실시

(가) 용량으로 표시된 제품 : 내용물이 들어있는 용기에 뷰렛으로부터 물을 적가하여 용기를 가득 채웠을 때의 소비량을 정확하게 측정하고 다음 용기의 내용물을 완전히 제거하고 물 또는 기타 적당한 유기용매로 용기의 내부를 깨끗이 씻어 말린 다음 뷰렛으로부터 물을 적가하여 용기를 가득 채워 소비량을 정확히 측정하고 전후의 용량차를 내용량으로 한다. 다만, 150mL 이상의 제품에 대하여는 메스실린더를 써서 측정한다.

(나) 중량으로 표시된 제품 : 내용물이 들어있는 용기의 외면을 깨끗이 닦고 무게를 정밀하게 단 다음 내용물을 완전히 제거하고 물 또는 적당한 유기용매로 용기의 내부를 깨끗이 씻어 말린 다음 용기만의 무게를 정밀히 달아 전후의 무게차를 내용량으로 한다.

(2) pH : 검체 약 2g 또는 2mL를 취하여 100mL 비이커에 넣고 물 30mL를 넣어 수욕상에서 가온하여 지방분을 녹이고 흔들어 섞은 다음 냉장고에서 지방분을 응결시켜 여과한다. 이때 지방층과 물 층이 분리되지 않을 때는 그대로 사용한다. 여액을 가지고 장원기 일반시험법 pH측정법에 따라 시험한다. 다만, 성상에 따라 투명한 액상인 경우에는 그대로 측정한다.

(3) 납 : 디티존법에 따라 정량을 함. 검체 1.0g을 자체도가니에 취하고(검체에 수분이 함유되어 있을 경우에는 수욕상에서 증발 건조한다) 약 500°C에서 2 ~ 3시간 회화한다. 회분에 묽은 염산 및 묽은 질산 각 10mL씩을 넣고 수욕상에서 30분간 가온한 다음 상징액을 유리여과기(G4)로 여과하고 잔류물을 묽은 염산 및 물 적당량으로 씻어 씻은 액을 여액에 합하여 전량을 50mL로 한다.

(4) 비소 : 검체 1.0g을 달아 장원기 일반시험법의 비소시험법 중 제3법에 따라 검액을 만들고 장치 A를 쓰는 방법에 따라 시험한다.

(5) 수은 : 검체 1.0g을 정밀히 달아 그림 1과 같은 수은 분해장치의 플라스크에 넣고 유리구 수개를 넣어 장치에 연결하고 냉각기에 찬물을 통과시키면서 적가 깔대기를 통하여 질산 10mL를 넣는다. 다음에 적가 깔대기의 콕크를 잠그고 반응 콕크를 열어주면서 서서히 가열한다. 아질산가스의 발생이 거의 없어지고 옅은 황색으로 되었을 때 가열을 중지하고 식힌다. 이때 냉각기와 흡수관의 접촉을 열어놓고 흡수관의 희석시킨 황산(1→100)이 장치 안에 역류되지 않도록 한다. 식힌 다음 황산 5mL를 넣고 다시 서서히 가열한다. 이때 반응 콕크를 잠가주면서 가열하여 산의 농도를 농축시키면 분해가 촉진된다. 분해가 잘 되지 않으면 질산 및 황산을 같은 방법으로 반복하여 넣으면서 가열한다. 액이 무색 또는 옅은 황색이 될 때까지 가열하고 식힌다. 이때 냉각기와 흡수관의 접촉을 열어놓고 흡수관의 희석시킨 황산(1→100)이 장치 안에 역류되지 않도록 한다. 식힌 다음 과망간산칼륨가루 소량을 넣고 가열한다. 가열하는 동안 과망간산칼륨의 색이 탈색되지 않을 때까지 소량씩 넣어 가열한다. 다시 식힌 다음 적가 깔대기를 통하여 과산화수소시액을 넣으면서 탈색시키고 10% 노소 용액 10mL를 넣고 적가 깔대기의 콕크를 잠근다. 이때 장치 안이 급히 냉각되므로 흡수관 안의 희석시킨 황산(1→100)이 장치 안으로 역류한다. 역류가 끝난 다음 천천히 가열하면서 아질산가스를 완전히 날려 보내고 식혀서 100mL 용량플라스크에 옮기고 뜨거운 희석시킨 황산(1→100)소량으로 장치의 내부를 잘 씻어 씻은 액을 100mL 메스플라스크에 합하고 식힌 다음 물을 넣어 정확히 100mL로 하여 검액으로 한다. 검액 및 공 시험액을 시험용 유리병에 옮기고 5% 과망간산칼륨용액 수적을 넣어 주면서 탈색이 되면 추가하여 1분간 방치한 다음 1.5% 염산히드록실아민용액으로 탈색시킨다. 따로 수은표준액 10mL를 정확하게 취하여 물을 넣어 100mL로 하여 시험용 유리병에 옮기고 5% 과망간산칼륨용액 수적을 넣어 흔들어 주면서 탈색이 되면 추가하여 1분간 방치한 다음 50% 황산 2mL 및 3.5% 질산 2mL를 넣고 1.5% 염산히드록실아민용액으로 탈색시킨다. 위의 전처리가 끝난 표준액, 검액 및 공 시험액에 1% 염화제일석 0.5N 황산용액 10mL씩을 넣어 곧 그림 2와 같은 원자흡광광도계의 순환펌프에 연결하여 수은증기를 건조관 및 흡수 셀(cell) 안에 순환시켜 파장 253.7nm에서 기록계의 지시가 급속히 상승하여 일정한 값을 나타낼 때의 흡광도를 측정할 때 검액의 흡광도는 표준액의 흡광도보다 적어야 한다.

- 시제품의 개발 및 안정성 평가 확인

본사에서 보유하고 있는 know-how를 통해 마스크팩, 로션, 에센스, 스킨 등에 대한 시제품을 제작하고 안정성을 평가하기 위해 고온, 고습 (40℃ 이상, 85% 이상)에서 6개월간 지속적으로 방치하여 가혹조건을 확립한 후에 변화를 확인함으로써 제품의 유통기한 및 안정성의 평가를 실시함.

다. 3 차년도

: 시제품을 대상으로 한 소비자 테스트 및 원료의 기능성 인증

- 가장 안정성이 뛰어난 시제품을 대상으로 일반인을 통한 기능성 평가 수행
- 피부 내 주름개선 효과를 측정하기 위해 visimeter를 이용하여, 추출물 0.1%를 함유한 크림 제형의 주름개선 효과를 측정하였으며, 전문가의 육안판정을 통해 실험 결과를 보정하였다. 실험은 총 지원자 중 자체 선정기준에 의해 본 실험에 적합하다고 판정된 36세에서 52세까지의 여성 21인을 대상으로 이루어졌음. 시험기간은 총 8주로 피시험자는 시험기간 중 총 4회

(시험 시작 전, 4주 경과, 6주 경과, 8주경과) 피부 상태를 측정하였으며, 시험기간 내 시험결과에 영향을 줄 수 있는 아이크림, 영양크림, 에센스, 기타 노화 방지용 화장품의 사용을 금지하였으며, 팩이나 피부 마사지 등도 금지하도록 한다.

- 첫 방문 시, 제품 사용 4주, 6주, 8주 후에 각각 피시험자를 대상으로 대조제품과 시험제품의 일반적인 평가(사용감), 효능성 평가에 대해 변화 없음 (점수: 0), 경미 (점수 : 1), 양호 (점수 : 2), 현저 (점수 : 3), 화장품 적합성 평가, 안전성 평가, 제품에 대한 호감도 등을 설문 조사하였다. 설문은 방문시마다 작성하도록 한다.

2. 제4세부 과제 연구결과

가. 1차년도

(1) 허브이차대사산물을 이용한 피부 내 반응실험

레몬밤 추출액을 시험동물의 등 부위에 단회 투여하여 3일간의 피내반응을 평가하는 방법으로 용출액은 멸균생리식염주사액(SC)와 면실유 (Cotton Seed Oil)를 사용하였다. 각각은 표1. 의 판정기준에 따라 점수를 타내었다. (Draize et al., 1944, Methods for the study of irritation and toxicity of substance applied topically to the skin and mucous membranes. J Pharmacol Exp Ther 82, 377, 390). 판정기준과 점수표를 비교하여 표2. 과 표3. 와 같은 결과를 얻었으며 SC용출액이 평균점수 차이가 0.00 이었고 CSO 용출액 평균점수 차이는 -0.06으로 피부에 자극이 없는 것으로 확인되었다.

Table 4-1 피부자극성을 판정하기 위한 판정 기준표

홍반 및 가피의 형성	점수
홍반없음	0
경미한 홍반 (미미한 수준)	1
확실한 홍반	2
중증도의 홍반	3
매우심한 홍반과 가피형성	4
부종의 형성	점수
부종없음	0
매우 경미한 부종(미미한 수준)	1
경미한 부종(부종구역이 확실함)	2
중증도의 부종 (1mm정도 부어오름)	3
심한 부종(1mm 이상 부어오르고 부종지역이 확대)	4

$$\text{평균 점수} = \frac{\text{시간대별 피부반응 점수의 합계}}{\text{개체수}}$$

Table 4-2 0.9 % 멸균생리식염수 용출균

시간/반응 동물/SITE		시 험 액 (각 5개소) / 대 조 액 (각 5개소)						
		24시간		48시간		72시간		
		I	II	I	II	I	II	
1# (2.3kg)	1	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	평균합①
	2	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	
	3	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	
	4	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	
	5	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	
Score Ave		0.00 / 0.00	0.00 / 0.00	0.00 / 0.00	0.00 / 0.00	0.00 / 0.00	0.00 / 0.00	0.00 / 0.00
2# (2.3kg)	1	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	평균합②
	2	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	
	3	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	
	4	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	
	5	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	
Score Ave		0.00 / 0.00	0.00 / 0.00	0.00 / 0.00	0.00 / 0.00	0.00 / 0.00	0.00 / 0.00	0.00 / 0.00
			시험군	대조군	차			
평균점수[=평균합(①+ ②) / 12]			0.00	0.00	0.00			

Table 4-3 면실유(Cotton Seed Oil) 용출균

시간/반응 동물/SITE		시 험 액 (각 5개소) / 대 조 액 (각 5개소)						
		24시간		48시간		72시간		
		I	II	I	II	I	II	
3# (2.3kg)	1	1 / 1	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	평균합①
	2	1 / 1	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	
	3	1 / 1	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	
	4	1 / 1	0 / 0	0 / 2	0 / 0	0 / 0	0 / 0	
	5	1 / 1	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	
Score Ave		1.00 / 1.00	0.00 / 0.00	0.00 / 0.20	0.00 / 0.00	0.00 / 0.00	0.00 / 0.00	1.00 / 1.20
4# (2.3kg)	1	2 / 2	2 / 2	2 / 1	2 / 2	2 / 1	2 / 2	평균합②
	2	2 / 2	2 / 2	2 / 1	2 / 2	2 / 2	2 / 2	
	3	2 / 2	0 / 2	2 / 1	0 / 1	2 / 2	0 / 1	
	4	2 / 2	0 / 0	2 / 2	0 / 0	1 / 2	0 / 1	
	5	2 / 2	1 / 1	1 / 2	0 / 0	1 / 1	1 / 1	
Score Ave		2.00 / 2.00	1.00 / 1.40	1.80 / 1.40	0.80 / 1.00	1.60 / 1.60	1.00 / 1.40	8.20 / 8.80

	시험군	대조군	차
평균점수[=평균합(①+ ②) / 12]	0.77	0.83	-0.06

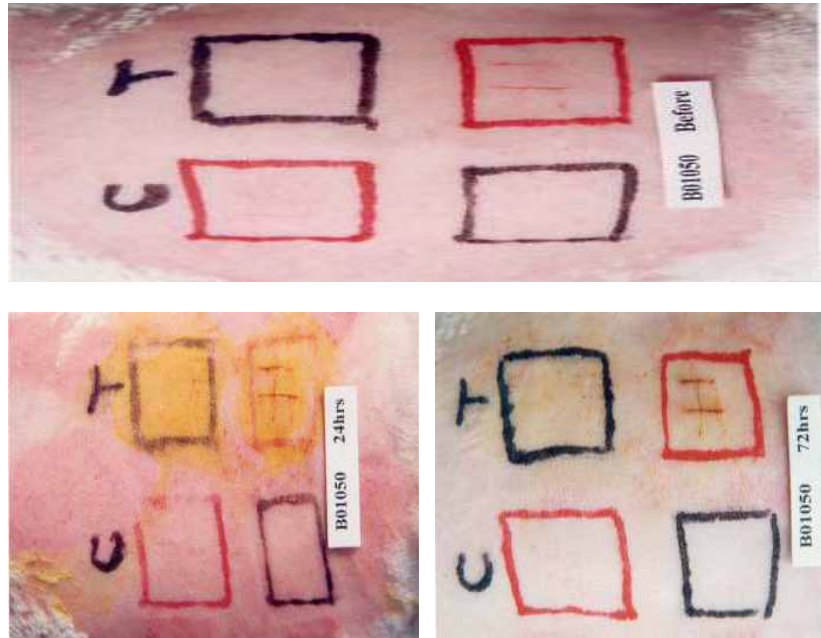


Figure 4-1 Application sites on 24~72hrs after topical application of herb extract

허브이차대사산물에 대한 피부자극시험을 3~4개월령 6마리 수컷 New Zealand White 토끼를 이용하여 투여 후 24시간 및 72시간까지 실시한 바 fig 1. 같은 결과를 얻었다. 일반증상에서 시험물질의 도포에 기인된 것으로 사료되는 변화는 관찰되지 않았다. 24시간째는 약간의 감소가 있었으나 이는 고정에 의한 물리적인 스트레스에 의한 것이며 72시간째는 정상 회복되었다. Draize의 방법에 따라 홍반 및 가피, 부종 관찰결과로부터 산출한 피부일차자극지수 (Primary Irritation Index, P.I.I.)는 “0”이거나 기준 미만이므로, 토끼를 이용한 피부자극 시험결과 플라보노이드는 “비자극 물질”로 판단된다.

(2) 허브이차대사산물을 이용한 감작성 실험

항생물질 등 여러물질에 대해서 예민한 반응을 나타내며, 피부 알레르기 시험의 기초자료가 풍부한 기니픽을 선택하여 실험을 진행하였다. 우선 순화기간을 거친 후 건강한 동물중에서 체중을 기초로 하여 무작위법을 이용하여 군분리 하였다. 군분리시 군평균체중을 계산하여 균등성여부를 확인하였다. 사육상자에는 시험번호, 성별, 시험군, 개체번호, 투여량, 시험책임자 및 시험기간을 기재한 라벨을 부착한다. 개체식별은 이개부 내측에 각 개체마다 유성매직으로 번호를 표시하였으며, 등부위 및 측복부를 시험단계에 따라 4×6 cm 와 2×4 cm의 넓이로 제모하고, 80% 치오글리콜산을 함유한 제모제 (에바크린®, 삼공약품)을 도포하고 미온수로 깨끗이 제거하여 24시간 휴식시켰다. 그 후 아래 표1 같은 예비 실험을 실시하여 본 실험에서 사용할 농도를 설정하였다.

Table 4-4. 시험군 조성을 위한 농도 설정 표

분 류	시험군	동물수	동물번호
예비시험 (시험물질투여군)	피내주사	저농도 (12.5 %)	2 P1 ~ P2
		중농도 (25 %)	2 P3 ~ P4
		고농도 (50 %)	2 P5 ~ P6
	폐색칩포	저농도 (12.5 %)	2 P7 ~ P8
		중농도 (25 %)	2 P9 ~ P10
		고농도 (50 %)	2 P11 ~ P12
본시험	용매대조군	5	M1 ~ M5
	시험물질투여군 (50 %)	10	M6 ~ M15
	양성대조군	5	M16 ~ M20

(3) 시험물질의 조제

(가) 용매대조물질

DMSO 1ml을 멸균 생리식염수로 최종 50ml의 희석액이 되도록 조제하여 사용하였다 (2% DMSO).

9나) 시험물질

피내투여시에는 플라보노이드를 1.5 g 칭량하여 2 % DMSO로 최종 3 ml 50 % 농도의 조제액을 조제하였으며, 폐색칩포에 의한 감각시에는 5 g을 칭량하여 최종 10 ml의 조제액, 그리고 폐색칩포에 의한 야기시에는 1 g을 칭량하여 최종 2 ml의 조제액을 조제하였다 (50 % 플라보노이드 조제액).

(다) 양성대조물질

Dinitrochlorobenzene (DNCB) 0.01 g을 칭량하여 10 % propylene glycol (PG)에 최종 10 ml이 되도록 용해시켜 조제하였다 (0.1 % DNCB).

(4) 시험방법

시험방법은 Magnusson과 kligman의 기니픽의 maximization법에 따라 실시하였다. 시험은 크게 예비시험과 본시험으로 나누며, 각각 감각 (Induction)단계와 야기 (Challenge)단계로 나누어 실시하였다.

(가) 예비시험

시험물질의 피내주사에 의한 감각시 감각항원량과 폐색칩포에 의한 감각 및 야기시의 항원량 결정 단계로 나누어 실시하였다.

피내주사에 의한 감각시 감각항원량

부형물질로 조제한 12.5, 25 및 50 % 플라보노이드를 제모한 기니픽의 등에 주사기 (주사바늘 26

1/2 Gauge)를 사용하여 0.1 ml씩을 피내주사하였다. 각 농도별로 2 마리씩 사용하여 24 시간 후에 주사부위를 관찰하여 2 마리 에서 모두 피부괴사가 나타나지 않은 최고농도를 감각 항원량으로 정하였다.

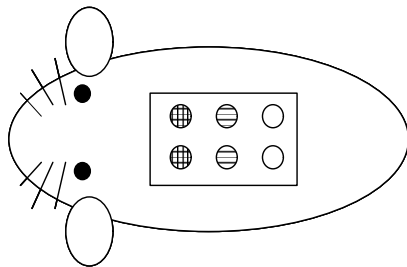
(나) 폐색칩포에 의한 감각 및 야기시의 항원량

부형물질로 용해한 12.5, 25 및 50 % 플라보노이드를 제모한 기니픽의 측복부에 단계별 희석액 0.2 ml을 포함하는 패취 (Whatman # 3 filter paper, 2 × 4 cm)를 부착하여 24 시간 폐색칩포하였다. 각 농도별로 2 마리의 기니픽을 사용하여, 2 마리 모두 홍반이 나타나는 최저농도를 2차 감각항원량으로 하였고, 홍반이 나타나지 않은 최대농도를 야기 항원량으로 하였다.

(다) 본시험

1차감작

피내주사를 하기 위해서 fig.1과 같이 제모된 등부위의 가능한한 투여면적을 2 × 4 cm 부위를 표시하여 주사기(주사바늘 26 1/2 Gauge)를 사용하여 좌우대칭의 3부위 (상부, 중부, 하부)에 예비시험 피내주사시에 피부괴사가 나타나지 않은 50 % 플라보노이드 조제액 또는 양성대조물질 0.1 ml씩을 피내주사하여 1주간 유지하였다.



- ⊕ : 용매대조물질(또는 양성대조군의 용매)과 동량의 FCA의 유화물
- ⊖ : 시험물질(또는 양성대조물질)
- : 시험물질(또는 양성대조물질)과 동량의 FCA의 유화물

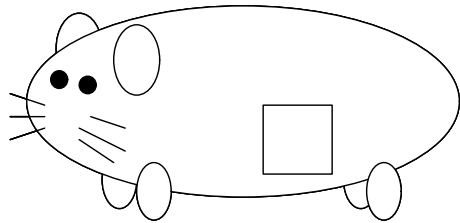
Figure 4-2

2차감작

1차 감작 1주 후 시험물질을 피내주사했던 동일부위를 제모하였다. 피내주사부위에 10 % Sodium Lauryl Sulfate (SLS)를 조제하여 0.5 ml을 도포한 후 유리막대로 맛사지하여 약한 피부자극을 유발하였다. 24 시간 후 부형물질로 용해한 50 % 플라보노이드 조제액 또는 양성대조물질 1 ml을 포함하는 패취(Whatman # 3 filter paper, 2 x 4 cm)를 부착하고, 불침투성의 플라스틱반창고 (4cm 3M bander)로 시료가 흘러나오지 않게 잘 덮고 몸통을 둘러쌀 수 있는 탄력붕대 (6.4 cm폭)로 동물의 행동에 지장이 없도록 48 시간 폐색칩포하였다

(라) 야기(Challenge) 단계

폐색칩포에 의한 2차 감각 2주 후 fig.2 와 같이 좌 · 우 측복부를 2 × 4 cm로 제모한 후, 예비 시험에서 폐색칩포에 의한 야기시험시 홍반이 나타나지 않은 최대농도인 부형물질로 용해한 50 % 플라보노이드 조제액 또는 양성대조물질을 좌측복부에 그리고 우측복부에 부형물질을 각각 0.2 ml씩 포함하는 패취 (Whatman # 3 filter paper, 2 × 2 cm)를 부착하여 24 시간 폐색칩포하였다



□ Patch : Whatman # 3 filter paper, 2 × 2 cm

Figure 4-3

(마) 관찰 및 판정

24 시간 폐색칩포 후에 시험부위에 남아있는 시험물질을 미온수로 깨끗이 닦아내고, 3시간 후 홍 반 및 부종 여부를 확인하고 정도를 Magnusson과 Kligman의 평가기준⁴⁾에 의하여 평가하였다. 또한 느리게 반응이 진행되고 있는지를 알아보기 위하여 국소야기 48 시간 후에 한번 더 평가하였다.

(5) 관찰 및 검사항목

(가) 일반증상 관찰

시험기간 중 매일 1 회 일반증상을 관찰하였다.

체중측정

군분리시, 1차 감각시 투여개시전, 시험기간 중 주 1 회씩 3주, 총 5 회의 체중을 측정하였다.

(나) 피부반응의 판정

1차 피부반응 평가 : 야기 24 시간 후 패취를 제거하여 피부반응 평가기준 Table 1을 기초로 하여 시험물질의 피부감작성 평가 Table 2 를 실시하였다.

2차 피부반응 평가 : 약하고 천천히 발생하는 반응들을 검색하기 위해서 야기 48 시간째에 다시 피부반응 평가기준 Table 1을 기초로 하여 시험물질의 피부감작성 평가 Table 2를 실시하였다.

Table 4-5. 피부반응 평가기준

점 수	판 정 기 준 (grade)
0	무반응 (No reaction)
1	홍반이 적용부위에서 흩어져 나타남 (Scattered mild redness)
2	홍반이 적용부위 전체에 나타남 (Moderate & diffuse redness)
3	전체적으로 강한 홍반 및 부종이 나타남 (Intense redness & swelling)

Table 4-6 피부감작성의 평가기준

감작률 (%)	등급 (grade)	분류 (class)
0 - 8	I	매우 약함 (Weak)
9 - 28	II	약함 (Mild)
29 - 64	III	보통 (Moderate)
65 - 80	IV	강함 (Strong)
81 - 100	V	매우 강함 (Extreme)

$$\text{감작률}(\%) = \frac{\text{양성동물수}}{\text{전체동물수}} \times 100$$

(6) 자료의 통계학적 해석방법

검사 항목 중 체중변화는 시험기간동안의 체중측정결과에 대해 분산의 동질성을 비교하기 위한 Levene's test를 실시하였고, 분산이 동질하여 one-way analysis of variene (ANOVA)를 실시하였다.

(7) 결 과

(가) 사망률 및 임상증상 (Table 1, Appendix 1)

시험 전기간을 통하여 용매대조군 (2 % DMSO), 시험물질투여군 (플라보노이드), 양성대조군 (0.1 % Dinitrochrobenzene, 0.1 % DNCB)에서 사망예 및 특이한 임상증상은 전혀 관찰되지 않았다.

(나) 체중변화 (Table 2, Appendix 2)

시험 전기간을 통하여 용매대조군, 시험물질투여군, 양성대조군에서 시험 전기간을 통하여 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다.

(다) 피부반응의 판정 (Table 3, 4)

시험의 결과를 피부반응 평가기준 (Text-Table 1)을 기초로 하여 피부감작성 평가기준 (Text-Table 2)에 따라 평가하였다.

① 용매대조군 (2% DMSO, Fig-2)

용매대조군은 24 시간 및 48 시간째의 피부반응 점수 (sensitization score)는 0 점이고, 피부감작률 (sensitization rate)은 0 %로 피부감작성 평가등급 (sensitization grade)은 'I'로 판정은 '매우 약함'으로 분류되었다.

② 시험물질투여군 (플라보노이드, Fig 1, 3, 4)

시험물질투여군은 24 및 48 시간째의 피부반응 점수는 0 ~ 3 점이고, 피부감작률은 90 ~ 60 %로 피부감작성 평가등급은 'V'로 판정은 '매우 강함'에서 'III'의 '보통'으로 분류되었다.

③ 양성대조군 (0.1 % Dinitrochlorobenzene, Fig 5, 6)

양성대조군은 모든 기니픽에 있어서 24 시간 및 48 시간째의 피부반응 점수는 각각 2 ~ 3 점으로 나타났고, 피부감작률은 100 %로 피부감작성 평가등급은 'V'로 판정은 '매우 강함'으로 분류되었다.

(8) 고찰 및 결론

플라보노이드의 생체에 대한 접촉 알레르기 유 · 무를 검색하기 위하여 기니픽에 있어서 피부감작에 의한 접촉 알레르기 유 · 무를 Maximization법¹⁾에 따라 수행하였다. 용매대조군 (2 % DMSO), 시험물질투여군 (플라보노이드) 및 양성대조군 (0.1 % Dinitrochlorobenzene, DNCB)의 3 군을 설정하였다.

예비시험으로 피내주사 감작항원량, 폐색접포에 의한 감작 항원량 및 야기 항원량으로 50 % 플라보노이드 조제액을 본시험의 투여농도로 정하였다.

본시험에서 야기후 24 시간째에 시험부위에 남아있는 시험물질을 미온수로 깨끗이 닦아낸 후에 홍반과 가피 및 부종 여부를 확인하고 48 시간째에도 Magnusson과 Kligman의 피부반응 평가기준에 의하여 관찰하였다.

시험결과에 있어서 용매대조군 24 시간 및 48 시간째의 피부반응 점수 (sensitization score)는 0 점이고, 피부감작률 (sensitization rate)은 0 %로 피부감작성 평가등급 (sensitization grade)은 'I'로 판정은 '매우 약함'으로 분류되었다. 그러나 시험물질투여군은 24 시간 및 48 시간째의 피부반응 점수는 각각 0 ~ 3 점으로 나타났고, 피부감작률은 90 ~ 60 %로 피부감작성 평가등급은 'V'에서 'III'로 판정은 '매우 강함'에서 '보통'으로 분류되어 홍반 및 부종을 형성하는 뚜렷한 양성반응을 나타내었다. 그리고 양성대조군은 모든 기니픽에 있어서 24 시간 및 48 시간째의 피부반응 점수는 각각 2 ~ 3 점으로 나타났고, 피부감작률은 100 %로 피부감작성 평가등급은 'V'로 판정은 '매우 강함'으로 분류되었고, 홍반 및 부종을 형성하는 뚜렷한 양성반응을 나타내었다.

이상의 결과로부터 플라보노이드를 50 % 농도로 기니픽에 적용하여 Maximization법에 의한 피부감작성 시험에서 접촉 알레르기를 유발하는 물질로 판단된다.



Fig 4-4. Guinea pig treated intradermally with 2 % DMSO + FCA, herb extract and herb extract + FCA.



Fig 4-5. Reaction state of guinea pig observed at 24 hours after topical application of 2 % DMSO (0.2 ml/animal). Any allergy reaction was not observed.



Fig 4-6. Reaction state of guinea pig observed at 24 hours after topical application of herb extract (0.2 ml/animal). Intensive allergy reaction was observed.

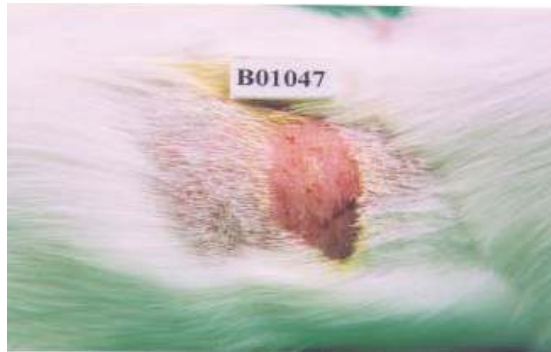


Fig 4-7. Reaction state of guinea pig observed at 48 hours after topical application of herb extract (0.2 ml/animal). Intensive allergy reaction was observed.

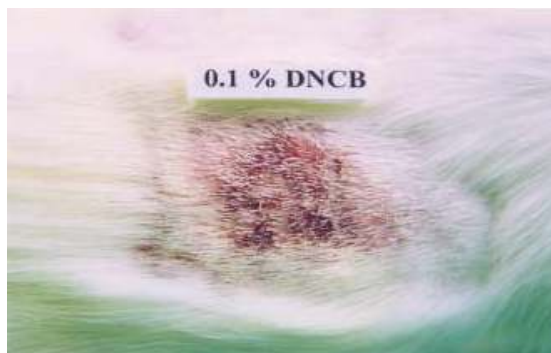


Fig 4-8. Reaction state of guinea pig observed at 24 hours after topical application of 0.1% DNCB (dinitrochlorobenzene in 10% PG) (0.2 ml/animal). Intense redness, schar & edema were observed.

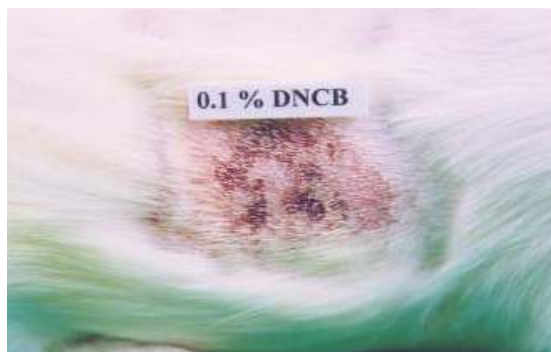


Fig 4-9. Reaction state of guinea pig observed at 48 hours after topical application of 0.1% DNCB (dinitrochlorobenzene in 10% PG) (0.2 ml/animal). Intense redness, schar & edema were observed.

Table 4-7. Mortality and clinical signs (Group Summary)

Group / Test materials	G1 2%DMSO	G2 Herb Extract	G3 0.1%DNCB (in 10%PG)
Sex	M	M	M
Signs	N	N	N
Day	1	5	10
	2	5	10
	3	5	10
	4	5	10
	5	5	10
	6	5	10
	7	5	10
	8	5	10
	9	5	10
	10	5	10
	11	5	10
	12	5	10
	13	5	10
	14	5	10
	15	5	10
	16	5	10
	17	5	10
	18	5	10
	19	5	10
	20	5	10
	21	5	10
	22	5	10
	23	5	10
	24	5	10
Mortality	0/5	0/10	0/5

N : Normal

Table 4-8. Body weight change (Group Summary)

(g)

Group	T e s t materials	Weeeks after treatment				
			0	1	2	3
G1	2%DMSO (vchicle)	MEAN	528.6	557.7	557.9	590.3
		S.D.	37.2	47.6	60.7	62.6
		N	5	5	5	5
G2	Herb Extract	MEAN	519.7	544.7	576.1	606.8
		S.D.	39.8	59.1	62.6	60.5
		N	10	10	10	10
G3	0.1%DNCB (in 10%PG)	MEAN	519.1	563.6	586.2	629.5
		S.D.	40.4	57.7	56.8	60.4
		N	5	5	5	5

DNCB : Dinitrochlorobenzene

PG : Propylene Glycol

Table 4-9. Sensitization score of challenge reaction at 24 hours after topical applicatoin of Herb Extract

Group	Test meterials	Animal Sensitization scoore		Sensitization (%)	Tatal evaluation grade (class)
		No.	(Grade)		
G1	2%DMSO (vehicle)	1	0	0 (0/5)	1 (Weak)
		2	0		
		3	0		
		4	0		
		5	0		
G2	Herb Extract	6	2	100 (9/10)	V (Extreme)
		7	3		
		8	1		
		9	3		
		10	3		
		11	3		
		12	2		
		13	3		
		14	0		
		15	1		

G3	0.1% DNCB (in 10% PG)	16	2	100 (5/5)	V (Extreme)
		17	3		
		18	3		
		19	3		
		20	3		

DNCB : Dinitrochlorobenzene

PG : Propylene Glycol

Table 4-10. Sensitization score of challenge reaction at 48 hours after topical applicatoin of Herb Extract

Group	Test materials	Animal No.	Sensitization score (Grade)	Sensitization (%)	Total evaluation grade (class)
G1	2%DMSO (vehicle)	1	0	0 (0/5)	1 (Weak)
		2	0		
		3	0		
		4	0		
		5	0		
G2	Herb Extract	6	0	60 (6/10)	V (Extreme)
		7	2		
		8	0		
		9	1		
		10	1		
		11	2		
		12	1		
		13	0		
		14	0		
G3	0.1% DNCB (in 10% PG)	16	3	100 (5/5)	V (Extreme)
		17	3		
		18	3		
		19	2		
		20	3		

DNCB : Dinitrochlorobenzene

PG : Propylene Glycol

Appendix 1. Clinical signs (Individual)

Group	G1 2%DMSO					G2 Herb Extract										G3 0.1%DNCB (in 10%PG)					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
Day	0	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	5	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	6	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	8	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	9	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	10	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	11	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	12	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	13	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	14	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	15	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	16	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	17	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	18	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	19	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	20	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	21	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	22	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	23	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	24	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N : Normal

Appendix 2. Change of body weight (Individual)

(g)

Group	T e s t materials	No.	Weeeks after treatment			
			0	1	2	3
G1	2%DMSO (vchicle)	1	569.4	480.9	452.0	494.2
		2	551.3	581.2	589.9	575.2
		3	542.0	585.6	573.4	619.8
		4	500.1	597.8	603.8	599.2
		5	480.0	543.1	570.5	663.0
		MEAN	528.6	557.7	557.9	590.3
		S.D.	37.2	47.6	60.7	62.6
N	5	5	5	5		
G2	Herb Extract	1	559.4	567.7	598.5	632.0
		2	559.4	607.1	664.1	702.7
		3	544.4	601.0	608.7	624.5
		4	554.3	586.6	639.9	679.9
		5	522.5	585.1	617.6	632.6
		6	530.9	491.7	568.1	528.9
		7	517.5	435.1	484.6	529.0
		8	500.3	471.5	484.2	606.4
		9	465.6	561.3	576.5	540.1
		10	443.1	540.3	518.7	592.3
MEAN	519.7	544.7	576.1	606.8		
S.D.	39.8	59.1	62.6	60.5		
N	10	10	10	10		
G3	0.1%DNCB (in 10%PG)	1	554.1	621.4	654.2	552.6
		2	555.0	567.6	619.0	647.7
		3	523.6	521.3	543.1	697.2
		4	505.7	616.9	514.6	581.9
		5	457.3	490.8	600.4	668.0
		MEAN	519.1	563.6	586.2	629.5
		S.D.	40.4	57.7	56.8	60.4
N	5	5	5	5		

DNCB : Dinitrochlorobenzene

PG : Propylene Glycol

2. 2차년도

가. 허브추출물 와일드 및 허브추출물 돌연변이의 New Zealand White계 토끼를 이용한 안점막 자극시험

(1) 실험 내용

본 시험에 사용된 실험동물은 안점막자극 시험에 많이 사용되고 있으며 풍부한 시험기초자료가 있어서, 시험결과의 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있어 토끼를 선택하여 실험을 진행하였다. 순화기간을 거쳐 건강한 것으로 판정한 토끼의 체중을 측정하고 평균체중에 가까운 동물들을 2~3마리씩 선택하였다. 선택한 동물들은 순위화한 체중에 따라 각 군의 평균체중이 최대한 균일하게 분포하도록 무작위법으로 분배하여 '시험군의 구성'표에 지정된 수가 되도록 하였다. 개체의 식별은 순화기간 중에는 좌측 귓바퀴 내부에 적색 유성 펜으로, 시험기간 중에는 우측 귓바퀴 내부에 검은색 유성 펜으로 동물번호를 표시하였다. 사육상자에는 용량별로 다른 색상의 개체식별카드를 부착하였으며, 사육상자대에는 고유번호를 부여하였다. 사육실 입구에는 시험번호, 동물실 사용기간, 시험책임자명 및 시험담당자명, 비상연락처 등을 기재한 동물실사용 기록지를 부착하였다.

본 시험은 동물실험윤리규정의 준수하여 실시하였으며 아래와 같이 시험군을 구성한 후 Draize 방법에 따라 마리당 0.1ml 씩의 시험물질을 좌측안구의 안점막에 적용하였다.

군	성별	동물수 (마리)	동물번호	적용량 (ml/head)	적용부위	적용물질	물질명
G1 (세안군)	Male	2	1~2	0.1	좌안 우안	시험물질 비적용	와일드
G1 (세안군)	Male	3	3~5	0.1	좌안 우안	시험물질 비적용	와일드
G1 (세안군)	Male	2	6~7	0.1	좌안 우안	시험물질 비적용	돌연변이
G1 (세안군)	Male	3	8~10	0.1	좌안 우안	시험물질 비적용	돌연변이

허브추출물 와일드타입(시험물질1)과 허브추출물 와일드타입(시험물질2)와 부형제(멸균생리식염주사액)를 1:1로 희석하여 사용하였다.

시험물질 적용 24시간 전에 미리 안검사를 실시하여 각막의 손상이 없는 동물의 안점막에 좌안의 하안검을 안구로부터 당겨서 결막낭내로 시험물질을 적용하고 상하안검을 약 1초간 서로 맞추었다. 우안은 적용하지 않은 상태로 두어 비적용 대조안으로 하였다. 이와 같이 시험물질을 1회 적용한 후 세안군(G1, G3)은 20~30초 후 미온 멸균생리식염주사액 약 20ml 정도로 양안을 모두 세안하고, 미세안군(G2, G4)은

그대로 두었다.

실험동물의 관찰 및 검사는 매일 1회 일반적인증상을 관찰하고 시험적용일과 관정일에 체중의 변화를 측정하고 시험물질 적용 후 1, 24, 48 및 72 시간 후에 토끼의 눈주위, 안구 및 행동을 관찰하였다. 안구는 각막의 혼탁, 혼탁된 각막의 범위, 홍채의 반응, 결막의 발적, 부종 및 배출물 유무 등의 변화를 육안적으로 안반응을 관찰하였다. 안구병변의 등급에 따라 평가하였다. 관찰결과의 판정은 각 마리의 총점[0 ~110 점 범위, The Individual Index of Ocular Irritation (I.O.I.)]의 합과 이를 마리수로 나눈 평균 값 [Mean Index of Ocular Irritation (M.I.O.I.)]으로 판정하였다.

Score (M.I.O.I)	Tentative ocular irritation rating
0~5	None irritating
5~15	Mild irritating
15~30	Moderately irritating
30~60	Severely irritating
60~110	Extremely irritating

* 안구 병변의 등급

관찰항목	소견	평점
각 막 (혼탁: A)	· 화농이나 혼탁이 없음	0
	· 혼탁이 분산 혹은 밀집 되어있음(정상적인 투명성이 약간 둔화된 것과는 다름). 홍채의 말단이 명확히 관찰 됨	1
	· 반투명한 부분이 쉽게 식별됨, 홍채의 말단이 약간 불명확함	2
	· 진주색깔을 나타냄, 홍채의 말단이 관찰 안됨, 동공의 크기가 가까스로 관측됨	3
	· 각막이 불투명(혼탁 때문에 홍채가 관찰 안됨)	4
각 막 (혼탁된 각막의 범위: B)	· 1/4 이하(그러나 0은 아님)	1
	· 1/4 이상 1/2 미만	2
	· 1/2 이상 3/4 미만	3
	· 3/4 이상 1 까지	4
A × B × 5, 최대치 = 80		
홍채 (C)	· 정상	0
	· 현저한 주름의 형성, 출혈 종창, 각막 주위에 중등도의 출혈(이상과 같은 단독	1

	· 혹은 혼합), 홍채는 빛에 대해 반응함(둔한 반응은 양성)	
	· 홍채는 빛에 대해 반응 없음, 출혈, 현저한 조직파괴(이상과 같은 증상의 일부 혹은 전부)	2
C × 5, 최대치 = 10		
결막 (발적: D)	· 혈관은 정상	0
	· 몇몇의 혈관은 명확한 출혈	1
	· 넓은 선홍색 색조, 각각의 혈관은 식별하기 어렵다.	2
	· 육류의 적색(넓은 선홍색)	3
결막 (부종: E)	· 부풀지 않음(중창)	0
	· 정상보다 약간 중창(순막 포함)	1
	· 안검 부분적 외전을 동반한 분명한 중창	2
	· 눈이 반쯤 감길 정도의 안검의 중창	3
	· 눈이 반 이상 감길 정도의 안검의 중창	4
배출물 (F)	· 배출물 없음	0
	· 약간의 배출물(정상동물의 내부 눈꼬리에서 관찰되는 적은 양 제외)	1
	· 눈썹과 눈꺼풀을 적시는 배출물	2
	· 눈 주위의 상당 부위와 속눈썹과 눈꺼풀을 적시는 배출물	3
(C × E × F) × 2, 최대치 = 20		

(2) 결과

시험기간 중 모든 시험군에서 사망동물이나 일반증상 변화는 관찰되지 않았으며(Table 1), 시험물질 투여와 관련한 체중변화는 관찰되지 않았다(Table 2).

허브추출물 와일드의 세안군에서는 시험물질 적용과 관련한 아무런 이상도 관찰되지 않았으며 비세안군에서는 시험물질 적용 후 1시간째 grade 1의 결막 발적(Conjunctiva redness)이 2 레 관찰되었으며, 적용 24시간 이후부터는 아무런 이상도 관찰되지 않았다.

허브추출물 돌연변이의 세안군에서는 시험물질 적용 후 1시간째 grade 1의 결막 발적(Conjunctiva redness)이 2 레 관찰되었으며, 적용 24시간 이후부터는 아무런 이상도 관찰되지 않았으며 비세안군에서는 시험물질 적용과 관련한 아무런 이상도 관찰되지 않았다(Table 4~15).

허브추출물 와일드의 세안군은 평균 안자극지수는 비자극성인 0 으로 평가되었고 비세안군은 평균 안자극지수는 1 시간째에 1.33 이었으며, 이후 모두 비자극성인 0 으로 평가 되었다(Table 16).

허브추출물 돌연변이의 세안군은 평균 안자극지수는 1시간째에 2.00 이었으며, 이후 모두 비자극성인 0 으로 평가 되었고 비세안군은 평균 안자극지수는 비자극성인 0 으로 평가되었다.(Table 17).

(3) 결론

본 시험은 시험물질 허브추출물 와일드 및 허브추출물 돌연변이의 안점막 자극성을 조사하기 위하여 New Zealand White계 토끼의 왼쪽 안구에 적용한 후 시험물질을 적용하지 않은 오른쪽 안구와 비교 평가하였다.

시험결과 일반증상 및 체중의 이상변화는 관찰되지 않았다.

시험물질 적용 후 안반응 관찰 결과, 증상이 관찰된 허브추출물 와일드 비세안군과 허브추출물 돌연변이 세안군의 평균 안자극 지수가 5.0 이하로 비자극성으로 평가되었다.

이상의 결과에서 본 시험조건에 의한 허브추출물 와일드 및 허브추출물 돌연변이의 안점막자극 시험 결과, 두 시험물질 모두 자극성이 없는 물질로 평가되었다.

Table 4-11. Mortality and clinical signs in male rabbits

MORTALITY AND CLINICAL SIGNS			
GROUP	ANIMAL #	OBSERVATIONS	SEX: MALE TIME OCCURRED
G1 (Eye Washing)	1	Nomal Terminal sacrifice	Day 0 - Day 3 Day 3
	2	Nomal Terminal sacrifice	Day 0 - Day 3 Day 3
G2 (No Eye Washing)	3	Nomal Terminal sacrifice	Day 0 - Day 3 Day 3
	4	Nomal Terminal sacrifice	Day 0 - Day 3 Day 3
	5	Nomal Terminal sacrifice	Day 0 - Day 3 Day 3
G3 (Eye Washing)	6	Nomal Terminal sacrifice	Day 0 - Day 3 Day 3
	7	Nomal Terminal sacrifice	Day 0 - Day 3 Day 3
G4 (No Eye Washing)	8	Nomal Terminal sacrifice	Day 0 - Day 3 Day 3
	9	Nomal Terminal sacrifice	Day 0 - Day 3 Day 3
	10	Nomal Terminal sacrifice	Day 0 - Day 3 Day 3

Table 4-12. Body weight changes in male rabbits

INDIVIDUAL BODY WEIGHTS(Kg)				
G1 (Eye Washing)				SEX : MALE
ANMAL #	DAY 0	DAY 1	DAY 2	DAY 3
1	1.949	1.969	2.009	2.005
2	2.205	2.212	2.242	2.283
MEAN	2.08	2.09	2.13	2.14
S.D	0.18	0.17	0.16	0.20
N	2	2	2	2
G2 (No Eye Washing)				SEX : MALE
ANMAL #	DAY 0	DAY 1	DAY 2	DAY 3
3	2.067	2.092	2.106	2.166
4	2.149	2.211	2.219	2.244
5	2.251	2.261	2.306	2.357
MEAN	2.16	2.19	2.21	2.26
S.D	0.09	0.09	0.10	0.10
N	3	3	3	3

Table 4-13. Body weight changes in male rabbits

INDIVIDUAL BODY WEIGHTS(Kg)				
G3 (Eye Washing)				SEX : MALE
ANMAL #	DAY 0	DAY 1	DAY 2	DAY 3
1	2.020	2.051	2.092	2.137
2	2.258	2.311	2.310	2.376
MEAN	2.14	2.18	2.20	2.26
S.D	0.17	0.18	0.15	0.17
N	2	2	2	2
G4 (No Eye Washing)				SEX : MALE
ANMAL #	DAY 0	DAY 1	DAY 2	DAY 3
3	2.051	2.080	2.079	2.125
4	2.090	2.107	2.100	2.152
5	2.057	2.057	2.117	2.106
MEAN	2.06	2.08	2.10	2.13
S.D	0.02	0.03	0.02	0.02
N	3	3	3	3

Table 4-14. Degree of cornea-opacity in male rabbits

DEGREE OF CORNEA-OPACITY											
SEX : MALE											
Hour	GROUP	G1 (Eye washing)				G2 (No eye washing)					
	Animal No	1		2		3		4		5	
	Site	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
1		0 ^{a)}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a) Grades are follows

Table 4-15. Degree of cornea-opacity in male rabbits

DEGREE OF CORNEA-OPACITY											
SEX : MALE											
Hour	GROUP	G3 (Eye washing)				G4 (No eye washing)					
	Animal No	6		7		8		9		10	
	Site	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
1		0 ^{a)}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a) Grades are follows

Response	Grade
No opacity	0
Scattered or diffuse areas, details of iris clearly visible	1
Easily discernible translucent areas, details of iris slightly obscured	2
Opalescent areas, no details of iris visible, size of pupil barely discernible	3
Opaque, iris invisible	4

Table 4-16. Diffuse areas of cornea-opacity in male rabbits

DEGREE OF CORNEA-OPACITY											
SEX : MALE											
Hour	GROUP	G1 (Eye washing)				G2 (No eye washing)					
	Animal No	1		2		3		4		5	
	Site	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
1		0 ^{a)}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a) Grades are follows

Table 4-17. Diffuse areas of cornea-opacity in male rabbits

DEGREE OF CORNEA-OPACITY											
SEX : MALE											
Hour	GROUP	G3 (Eye washing)				G4 (No eye washing)					
	Animal No	6		7		8		9		10	
	Site	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
1		0 ^{a)}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a) Grades are follows

Response	Grade
One-quarter (or less), not zero	1
Greater than one-quarter, but less than half	2
Greater than half, but less than three-quarters	3
Greater than three-quarters, up to whole area	4

Table 4-18. Changes of iris in male rabbits

CHANGES OF IRIS											
SEX : MALE											
Hour	GROUP	G1 (Eye washing)				G2 (No eye washing)					
	Animal No	1		2		3		4		5	
	Site	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
1		0 ^{a)}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a) Grades are follows

Table 4-19. Changes of iris in male rabbits

CHANGES OF IRIS											
SEX : MALE											
Hour	GROUP	G3 (Eye washing)				G4 (No eye washing)					
	Animal No	6		7		8		9		10	
	Site	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
1		0 ^{a)}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a) Grades are follows

Response	Grade
Normal	0
Folds above normal, congestion swelling, circumcorneal injection (any or all or combination of these), iris still reacting to light (sluggish reaction is positive)	1
No reaction to light, hemorrhage, gross destruction (any or all of these)	2

Table 4-20. Redness of conjunctivae in male rabbits

REDNESS OF CONJUNCTIVAE											
SEX : MALE											
Hour	GROUP	G1 (Eye washing)				G2 (No eye washing)					
	Animal No	1		2		3		4		5	
	Site	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
1		0 ^{a)}	0	0	0	1	0	1	0	0	0
24		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a) Grades are follows

Table 4-21. Changes of iris in male rabbits

REDNESS OF CONJUNCTIVAE											
SEX : MALE											
Hour	GROUP	G3 (Eye washing)				G4 (No eye washing)					
	Animal No	6		7		8		9		10	
	Site	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
1		1 ^{a)}	0	1	0	0	0	0	0	0	0
24		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a) Grades are follows

Response	Grade
Vessels normal	0
Vessels definitely injected above normal	1
More diffuse, deeper crimson red, individual vessels not easily discernible	2
Diffuse beefy red	3

Table 4-22. Edema of conjunctivae in male rabbits

EDEMA OF CONJUNCTIVAE											
SEX : MALE											
Hour	GROUP	G1 (Eye washing)				G2 (No eye washing)					
	Animal No	1		2		3		4		5	
	Site	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
1		0 ^{a)}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a) Grades are follows

Table 4-23. Edema of conjunctivae in male rabbits

EDEMA OF CONJUNCTIVAE											
SEX : MALE											
Hour	GROUP	G3 (Eye washing)				G4 (No eye washing)					
	Animal No	6		7		8		9		10	
	Site	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
1		0 ^{a)}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a) Grades are follows

Response	Grade
No swelling	0
Any swelling above normal (include nictitating membrane)	1
Obvious swelling with partial eversion of lids	2
Swelling with lids about half-closed	3
Swelling with lids about half-closed to completely closed	4

Table 4-24. Secretion in male rabbits

SECRETION											
SEX : MALE											
Hour	GROUP	G1 (Eye washing)				G2 (No eye washing)					
	Animal No	1		2		3		4		5	
	Site	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
1		0 ^{a)}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a) Grades are follows

Table 4-25. Secretion in male rabbits

SECRETION											
SEX : MALE											
Hour	GROUP	G3 (Eye washing)				G4 (No eye washing)					
	Animal No	6		7		8		9		10	
	Site	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
1		0 ^{a)}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a) Grades are follows

Response	Grade
No discharge	0
Any amount different from normal (does not include small amounts observed in inner canthus of normal animals)	1
Discharge with moistening of the lids and hairs just adjacent to lids	2
Discharge with moistening of lids and hairs, and considerable area around the eye	3

Table 4-26. Score of ocular irritation in male rabbits

SCORE OF OCULAR IRRITATION						
Group		G1 (Eye washing)		G2 (No eye washing)		
Animal No.		1	2	3	4	5
Hour						
Cornea	Degree of opacity (A)	1	0	0	0	0
		24	0	0	0	0
		48	0	0	0	0
		72	0	0	0	0
	Diffuse areas of opacity (B)	1	0	0	0	0
		24	0	0	0	0
		48	0	0	0	0
		72	0	0	0	0
iris (C)	1	0	0	0	0	
	24	0	0	0	0	
	48	0	0	0	0	
	72	0	0	0	0	
Conjunctivae	Redness (D)	1	0	0	1	1
		24	0	0	0	0
		48	0	0	0	0
		72	0	0	0	0
	Edema (E)	1	0	0	0	0
		24	0	0	0	0
		48	0	0	0	0
		72	0	0	0	0
	Secretion (F)	1	0	0	0	0
		24	0	0	0	0
		48	0	0	0	0
		72	0	0	0	0
I.I.O.I.	1	0	0	2	2	
	24	0	0	0	0	
	48	0	0	0	0	
	72	0	0	0	0	
M.I.O.I.	1	0.00		1.33		
	48	0.00		0.00		
	24	0.00		0.00		
	72	0.00		0.00		

I.I.O.I. : The individual Index of Ocular Irritation = (A × B × 5) + (C × 5) + 2(D + E + F)

M.I.O.I.: Mean Index of Ocular Irritation = I.I.O.I./animal No.

Table 4-27. Score of ocular irritation in male rabbits

SCORE OF OCULAR IRRITATION							
		Group	G3 (Eye washing)		G4 (No eye washing)		
		Animal No.	1	2	3	4	5
		Hour					
Cornea	Degree of opacity (A)	1	0	0	0	0	0
		24	0	0	0	0	0
		48	0	0	0	0	0
		72	0	0	0	0	0
	Diffuse areas of opacity (B)	1	0	0	0	0	0
		24	0	0	0	0	0
		48	0	0	0	0	0
		72	0	0	0	0	0
iris (C)		1	0	0	0	0	0
		24	0	0	0	0	0
		48	0	0	0	0	0
		72	0	0	0	0	0
Conjunctivae	Redness (D)	1	1	1	0	0	0
		24	0	0	0	0	0
		48	0	0	0	0	0
		72	0	0	0	0	0
	Edema (E)	1	0	0	0	0	0
		24	0	0	0	0	0
		48	0	0	0	0	0
		72	0	0	0	0	0
	Secretion (F)	1	0	0	0	0	0
		24	0	0	0	0	0
		48	0	0	0	0	0
		72	0	0	0	0	0
I.I.O.I.		1	2	2	0	0	0
		24	0	0	0	0	0
		48	0	0	0	0	0
		72	0	0	0	0	0
M.I.O.I.		1	2.00		0.00		
		48	0.00		0.00		
		24	0.00		0.00		
		72	0.00		0.00		

I.I.O.I. : The individual Index of Ocular Irritation = (A × B × 5) + (C × 5) + 2(D + E + F)

M.I.O.I.: Mean Index of Ocular Irritation = I.I.O.I./animal No.

Photo 1. An example of ocular irritation reaction in rabbit at 1hours after application



(a) G1 (Eye washing)



(b) G2 (No eye washing)



(c) G3 (Eye washing)



(d) G4 (No eye washing)

Photo 2. An example of ocular irritation reaction in rabbit at 24hours after application



(a) G1 (Eye washing)



(b) G2 (No eye washing)



(c) G3 (Eye washing)



(d) G4 (No eye washing)

Photo 3. An example of ocular irritation reaction in rabbit at 48hours after application



(a) G1 (Eye washing)



(b) G2 (No eye washing)



(c) G3 (Eye washing)



(d) G4 (No eye washing)

Photo 4. An example of ocular irritation reaction in rabbit at 72hours after application



(a) G1 (Eye washing)



(b) G2 (No eye washing)



(c) G3 (Eye washing)



(d) G4 (No eye washing)

나. 허브추출물 와일드 및 돌연변이의 Hartley계 기니픽을 이용한 피부감작성 시험

(1) 실험 내용

본 시험에 사용된 실험동물은 감수성이 높아 면역독성시험에 많이 사용되는 실험동물종의 하나이며 풍부한 시험기초자료가 있어서, 시험결과의 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있어 기니픽을 선택하여 실험을 진행하였다. 순화기간을 거쳐 건강한 것으로 판정한 기니픽의 체중을 측정하고 평균체중에 가까운 동물들을 16마리씩 선택하였다. 선택한 동물들은 순위화한 체중에 따라 각 군의 평균체중이 최대한 균일하게 분포하도록 무작위법으로 분배하였다. 군분리 후 잔여동물은 예비투여에 활용하였다. 개체의 식별은 포화 피크린산 용액을 이용한 피모 색소표식법과 사육상자별 개체식별카드 표시법으로 실시하였다. 그리고 사용동물실의 입구에는 시험번호, 동물실 사용기간, 시험책임자명 및 시험담당자명, 비상연락처 등을 기재한 동물실사용 기록지를 부착하였다. 본 시험은 동물실험윤리규정의 준수하여 실시하였으며 아래와 같이 시험군을 구성하였다.

Group	Sex	Animal ID	Sensitization		Challenge
			Intradermal 0.1ml (0.1ml/site)	Closed patch 0.2 ml (0.2ml/site)	Closed patch 0.2 ml (0.1ml/site)
G1 (부형제대조군)	M	1~3	Vehicle	Vehicle	Vehicle 100 %
G2 (와일드)	M	4~8	100%	100%	100% 50%
G3 (돌연변이)	M	9~13	100%	100%	100% 50%
G4 (양성대조군)	M	14~16	10%	20%	20% 5%

(가) 시험물질의 조제

허브추출물 와일드 및 돌연변이 추출물을 200%로 간주하고 시험물질을 조제하였다.

- * 1차 감작(피내주사): 시험물질 및 양성대조물질을 각각의 부형제를 이용하여 감작농도로 조제하여 사용하였다. 단, FCA유화물과의 혼합액(1:1) 조제시는 2 배의 농도로 조제한 뒤 FCA유화물과 1:1로 혼합하였다.
- * 감작유도: Sodium lauryl sulfate를 10 % 농도가 되도록 Vaseline을 이용하여 조제하였다.
- * 2차 감작(폐쇄 첩포): 시험물질과 양성대조물질은 각각의 부형제를 이용하여 조제하였다.
- * 야기 처치: 시험물질과 양성대조물질은 각각의 부형제를 이용하여 조제하였다.

(2) 투여

투여경로

- * 1차 감작(피내 주사)

상배부 약 2 x 4 cm 부위를 electric clipper를 사용하여 제모한 다음 감작유도부위를 유성펜으로 표시

하였다. 표시된 감각 유도부위에 G1에는 FCA와 증류수의 혼합액 (1:1), 부형제대조물질, 부형제대조물질과 FCA의 혼합액(1:1)을 각각 0.1ml씩 좌우대칭으로 2개소씩 피내주사하였다. G2의 경우 FCA와 증류수의 혼합액 (1:1), 시험물질, 시험물질과 FCA유화물의 혼합액(1:1)을 각각 0.1ml씩, 좌우대칭으로 2개소씩 피내주사하였다. G3에는 FCA와 증류수의 혼합액 (1:1), 양성대조물질, 양성대조물질과 FCA유화물의 혼합액(1:1)을 각각 0.1ml씩 좌우대칭으로 2개소씩 피내주사하였다.

* 감각 유도

피내주사 6일 후 피부 감각성을 높이기 위해 피내주사 부위에 Sodium lauryl sulfate를 10% 농도가 되도록 Vaseline을 이용하여 조제한 다음 0.5g/head을 24시간 동안 개방 적용하였다.

* 2차 감각(폐쇄 첩포)

감각유도 24시간 후 알코올 솜으로 감각유도부위를 깨끗이 닦아낸 후 시험물질, 양성대조물질 및 부형제를 각각 0.2ml씩 좌우 대칭으로 2 x 4 cm 거즈와 비자극성 테이프를 이용하여 48시간동안 폐쇄첩포하였다.

* 야기 처치

폐쇄첩포 2주 후 좌우측 측복부를 electric clipper로 제모(야기 하루 전)한 다음 좌측과 우측에 각 1개소씩 유발부위를 정하여 시험물질, Vehicle control 및 양성 대조물질을 0.1ml씩 좌우대칭으로 2 x 2 cm 거즈와 비자극성 테이프를 이용하여 24시간 동안 폐쇄첩포하였다.

(3) 관찰 및 검사항목

- * 일반증상관찰: 투여 전기간에 걸쳐 1 일 1 회 투여 직후의 일반증상을 관찰하였다. 일반 증상의 관찰은 사망여부, 증상의 종류, 발현일 및 증상의 정도를 개체 별로 기록하였다.
- * 체중측정: 시험기간 중 주 1 회 체중을 측정하였다.
- * 감각성 반응의 판정: 야기 처치(폐쇄첩포) 24 시간 후 시험물질, 부형제대조물질 및 양성대조물질을 제거한 후 24 시간 및 48 시간 후의 피부반응을 평가하며, 이를 기초로 시험물질의 피부감각성을 평가하였다.

* 피부반응 평가기준

Score	증상
0	무반응
1	홍반이 적용부위에 흩어져 나타남
2	홍반이 적용부위 전체에 나타남
3	전체적으로 강한 홍반 및 부종이 나타남

* 피부감각성 평가기준

감작율(%)*	등급	분류
0~8	I	매우 약함
9~28	II	약함
29~64	III	보통
65~80	IV	강함
81~100	V	매우 강함

*: 감작율(%) = (감작된 동물 수 / 사용된 동물 수) × 100

(4) 결과

- * 일반증상(Table 1 and Appendix 1): 일반증상의 변화는 관찰되지 않았다
- * 체중 변화(Table 2 and Appendix 2): 시험기간 중 체중변화에서 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았다. 다만, 마지막 평가일에 시험물질2 투여군에서 체중이 감소하였다.
- * 피부반응 및 감작성의 평가(Table 3 and Appendix 3): 부형제대조군(G1)과 시험물질1, 2 투여군(G2, G3)의 경우 시험물질 100%를 야기 처치시 아무런 반응도 나타나지 않아 0% 감작률로 '매우약함'(I 등급)으로 평가하였다. 반면 양성대조군(G4)의 경우 5% 에서는 홍반이 적용부위에 흩어져 나타나는 score1과 홍반이 적용부위 전체에 나타나는 score2가 관찰되었고, 20% 농도에서 전체적으로 강한 홍반 및 부종이 나타나는 score3, 홍반이 적용부위 전체에 나타나는 score2 및 홍반이 적용부위 흩어져 나타나는 score1이 관찰되었다. 감작성 평가 기준으로 볼 때 양성대조물질인 Benzocaine은 24시간째에는 100%의 감작율로 '매우강함'(V등급)으로, 48시간째에는 33.3% '보통'(III등급)으로 평가하였다.

(5) 결론

본 시험은 허브추출물 와일드 및 돌연변이의 피부감작성을 평가하기 위하여 Hartley계 기니픽을 이용하여 시험하였다. 시험방법으로는 시험물질 100% 농도로 감작시킨 후, 50% 및 100% 농도로 야기하여 부형제대조군 및 양성대조군과 비교 평가하였다.

시험결과, 시험물질 처치에 따른 일반증상 및 체중변화의 이상은 관찰되지 않았다. 다만, 마지막 평가일에 측정된 시험물질2 투여군(G3) 체중에서 경미한 체중감소는 야기처치시 적용한 폐색칩포로 인한 스트레스 때문에 발생한 것으로 판단하였다.

부형제대조군(G1)과 시험물질 1, 2 투여군(G2, G3)의 경우 시험물질1, 2 모두 50% 및 100%의 야기 처치시 아무런 반응도 나타나지 않아 0% 감작률로 '매우약함'(I 등급)으로 평가하였다.

반면 양성대조군(G4)의 경우 5% 에서는 홍반이 적용부위 전체에 나타나는 score2와 홍반이 적용부위에 흩어져 나타나는 score 1이 관찰되었고, 20% 농도에서 전체적으로 강한 홍반 및 부종이 나타나는 score3, 홍반이 적용부위 전체에 나타나는 score2 및 홍반이 적용부위 흩어져 나타나는 score1이 관찰되었다. 감작성 평가 기준으로 볼 때 양성대조물질인 Benzocaine은 24시간과 48시간째에 각각 100% 감작율로 '매우강함'(V등급), 33.3% '보통'(III등급)으로 평가하였다.

이상의 결과로 보아 본 시험 조건하에서 허브추출물 와일드 및 돌연변이는 임상예정용량의 50%와 100% 농도에서 0% 감작율을 보여 '매우약함'(I 등급)으로 평가하였다.

Table 4-28. Clinical signs in male guinea pigs

CLINICAL SIGNS					
SEX: MALE					
DAY	SIGN OBSERVED	GROUP (Test article)			
		G1 (Vehicle control)	G2 (Test article1)	G2 (Test article2)	G4 (positive control)
0	Appears normal	3/3 ^{a)}	5/5	5/5	3/3
1	Appears normal	3/3	5/5	5/5	3/3
2	Appears normal	3/3	5/5	5/5	3/3
3	Appears normal	3/3	5/5	5/5	3/3
4	Appears normal	3/3	5/5	5/5	3/3
5	Appears normal	3/3	5/5	5/5	3/3
6	Appears normal	3/3	5/5	5/5	3/3
7	Appears normal	3/3	5/5	5/5	3/3
8	Appears normal	3/3	5/5	5/5	3/3
9	Appears normal	3/3	5/5	5/5	3/3
10	Appears normal	3/3	5/5	5/5	3/3
11	Appears normal	3/3	5/5	5/5	3/3
12	Appears normal	3/3	5/5	5/5	3/3
13	Appears normal	3/3	5/5	5/5	3/3
14	Appears normal	3/3	5/5	5/5	3/3
15	Appears normal	3/3	5/5	5/5	3/3
16	Appears normal	3/3	5/5	5/5	3/3
17	Appears normal	3/3	5/5	5/5	3/3
18	Appears normal	3/3	5/5	5/5	3/3
19	Appears normal	3/3	5/5	5/5	3/3
20	Appears normal	3/3	5/5	5/5	3/3
21	Appears normal	3/3	5/5	5/5	3/3
22	Appears normal	3/3	5/5	5/5	3/3
23	Appears normal	3/3	5/5	5/5	3/3
24	Appears normal	3/3	5/5	5/5	3/3

a) No. of animals with the sign/No. of animals examined

Table 4-29. Body weight changes in male guinea pigs

BODY WEIGHT (g)					
SEX : MALE					
GROUP (Test article)					
PERIOD		G1 (Vehicle control)	G2 (Test article1)	G3 (Test article2)	G4 (positive control)
DAY 0	MEAN	329.79	331.46	331.27	333.98
	S.N.	25.54	11.43	13.52	16.32
	N	3	5	5	3
DAY 7	MEAN	379.42	357.67	380.09	364.52
	S.N.	34.81	18.86	27.75	35.19
	N	3	5	5	3
DAY 14	MEAN	425.32	401.42	428.55	432.31
	S.N.	34.17	16.09	21.70	43.38
	N	3	5	5	3
DAY 21	MEAN	471.29	419.03	492.60	506.21
	S.N.	49.87	21.73	29.21	43.13
	N	3	5	5	3
DAY 24	MEAN	476.56	467.04	492.89	517.35
	S.N.	52.84	29.10	30.47	41.92
	N	3	5	5	3

Table 4-30. Evaluation of skin reactions after challenge in male guinea pigs

SEX : MALE								
GROUP	Test article		No. of Animals	Score ^{a)}	Time (hrs)		Sensitization rate (%)	
	Sensitization	Challenge			24	48	24	48
G1	Vehicle control (Saline)	Vehicle (saline)	3	0 1 2 3	3 0 0 0	3 0 0 0	0	0
		Test article 1 (100%)	2	0 1 2 3	3 0 0 0	3 0 0 0	0	0
		Test article 2 (100%)	1	0 1 2 3	3 0 0 0	3 0 0 0	0	0
G2	Test article 1 (100%)	Test article 1 ^{b)} (100%)	5	0 1 2 3	3 0 0 0	3 0 0 0	0	0
		Test article 1 ^{c)} (50%)	5	0 1 2 3	3 0 0 0	3 0 0 0	0	0
G3	Test article 2 (100%)	Test article 2 (100%)	5	0 1 2 3	3 0 0 0	3 0 0 0	0	0
		Test article 2 (50%)	5	0 1 2 3	3 0 0 0	3 0 0 0	0	0
G4	Positive control (10/20%)	Benzocaine (20%)	3	0 1 2 3	0 2 0 1	0 0 1 0	100	100
		Benzocaine (5%)	3	0 1 2 3	0 2 1 0	0 1 0 0	100	100

a) Grades are follows:

0; no visible change, 1; discrete or patchy erythema, 2; moderate and confluent erythema, 3; intense erythema and swelling

b) Left side, c) Right side

Appendix 1. Clinical signs in male guinea pigs

INDIVIDUAL OBSERVATIONS		
GROUP: G1		SEX : MALE
ANIMAL #	OBSERVATIONS	TIME OCCURRED
1	Appears normal	DAY 0 ~ DAY 24
2	Appears normal	DAY 0 ~ DAY 24
3	Appears normal	DAY 0 ~ DAY 24
GROUP: G2		SEX : MALE
ANIMAL #	OBSERVATIONS	TIME OCCURRED
4	Appears normal	DAY 0 ~ DAY 24
5	Appears normal	DAY 0 ~ DAY 24
6	Appears normal	DAY 0 ~ DAY 24
7	Appears normal	DAY 0 ~ DAY 24
8	Appears normal	DAY 0 ~ DAY 24
GROUP: G3		SEX : MALE
ANIMAL #	OBSERVATIONS	TIME OCCURRED
9	Appears normal	DAY 0 ~ DAY 24
10	Appears normal	DAY 0 ~ DAY 24
11	Appears normal	DAY 0 ~ DAY 24
12	Appears normal	DAY 0 ~ DAY 24
13	Appears normal	DAY 0 ~ DAY 24
GROUP: G4		SEX : MALE
ANIMAL #	OBSERVATIONS	TIME OCCURRED
14	Appears normal	DAY 0 ~ DAY 24
15	Appears normal	DAY 0 ~ DAY 24
16	Appears normal	DAY 0 ~ DAY 24

Appendix 2. Body weight changes in male guinea pigs

INDIVIDUAL BODY WEIGHTS (g)

GROUP: G1					SEX : MALE
ANIMAL #	DAY 0	DAY 7	DAY 14	DAY 21	DAY 24
1	308.66	350.04	397.63	429.60	428.35
2	322.55	370.35	414.83	457.71	468.26
3	358.17	417.86	463.50	526.56	533.05
Mean	329.79	379.42	425.32	471.29	476.56
S.D.	25.54	34.81	34.17	49.87	52.84
N	3	3	3	3	3

GROUP: G2					SEX : MALE
ANIMAL #	DAY 0	DAY 7	DAY 14	DAY 21	DAY 24
4	331.39	377.61	419.09	432.51	478.03
5	313.44	340.35	395.00	410.22	457.55
6	330.04	334.93	377.44	384.91	421.86
7	342.98	369.39	404.18	429.74	479.39
8	339.43	366.05	411.37	437.77	498.37
Mean	331.46	357.67	401.42	419.03	467.04
S.D.	11.434	18.86	16.09	21.73	29.10
N	5	5	5	5	5

GROUP: G3					SEX : MALE
ANIMAL #	DAY 0	DAY 7	DAY 14	DAY 21	DAY 24
9	314.96	346.35	425.03	471.19	486.15
10	329.28	385.52	425.79	501.55	511.79
11	350.53	420.27	463.70	539.99	533.88
12	337.48	384.82	424.35	478.15	476.77
13	324.12	363.48	403.86	472.12	455.85
Mean	331.27	380.09	428.55	192.60	492.89
S.D.	13.52	27.75	21.70	29.21	30.47
N	5	5	5	5	5

GROUP: G4					SEX : MALE
ANIMAL #	DAY 0	DAY 7	DAY 14	DAY 21	DAY 24
14	327.97	370.78	432.86	519.72	533.99
15	321.51	326.62	388.65	457.95	469.66
16	352.45	396.16	475.41	540.97	548.39
Mean	333.98	364.52	432.31	506.21	517.35
S.D.	16.32	35.19	43.38	43.13	41.92
N	3	3	3	3	3

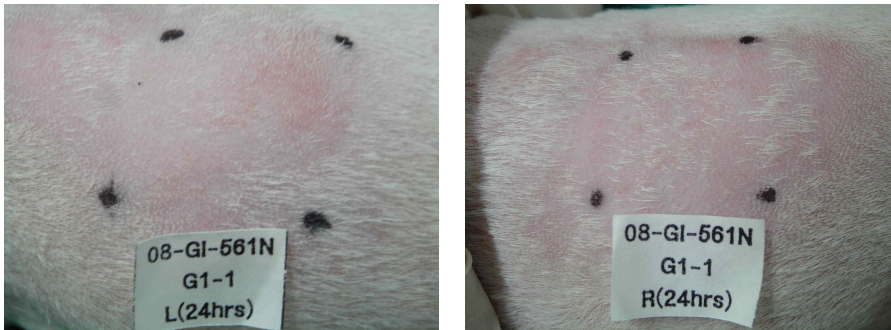
Appendix 3. Evaluation of skin reaction challenge in male guinea pigs

SEX : MALE											
GROUP	Animal No.	Test article		Score				Sensitization rate (%)			
		Sensitization	Challenge	24 hrs		48 hrs		24 hrs		48 hrs	
				L	R	L	R	L	R	L	R
G1	1	Vehicle (saline)	Test article 1 (100%) Vehicle	0 ^{a)}	0	0	0	0	0	0	0
	2			0	0	0	0				
	3	Vehicle (saline)	Test article 2 (100%) Vehicle	0	0	0	0	0	0	0	0
G2	4	Test article 1 (100%)	Test article 1 (100, 50%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	5			0	0	0	0				
	6			0	0	0	0				
	7			0	0	0	0				
	8			0	0	0	0				
G3	9	Test article 2 (100%)	Test article 2 (100, 50%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	10			0	0	0	0				
	11			0	0	0	0				
	12			0	0	0	0				
	13			0	0	0	0				
G4	14	Benzocaine (10, 20%)	Benzocaine (20, 5%)	3	2	2	1	100	100	33.3	33.3
	15			1	1	0	0				
	16			1	1	0	0				

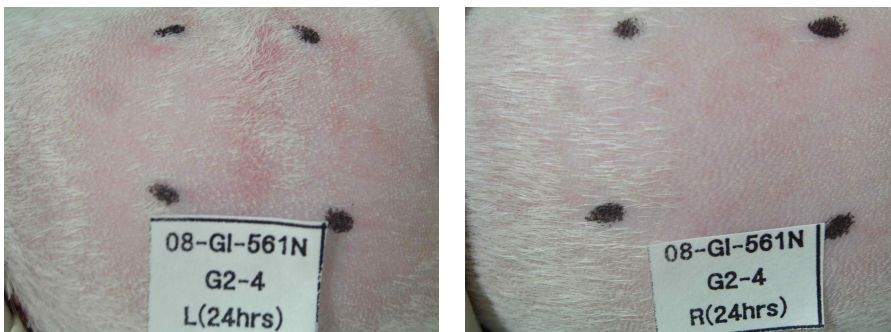
a) Grades are follows:

0; no visible change, 1; discrete or patchy erythema, 2; moderate and confluent erythema, 3; intense erythema and swelling

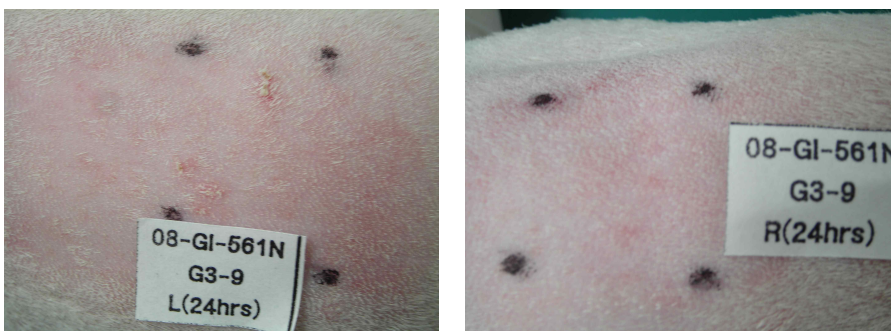
Photo 1. Evaluation of skin reaction challenge in male guinea pigs(24 hrs)



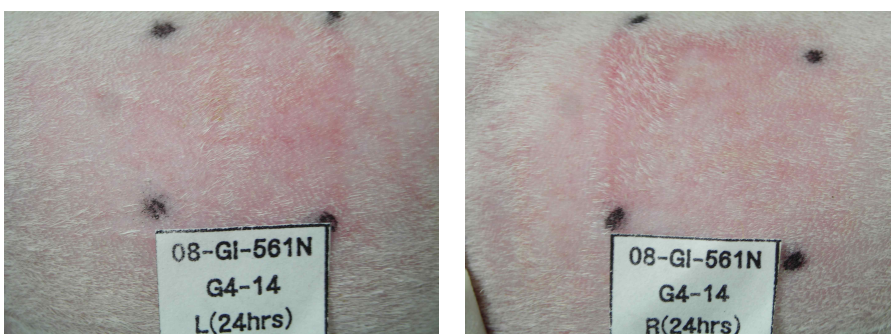
(a) G1



(b) G2

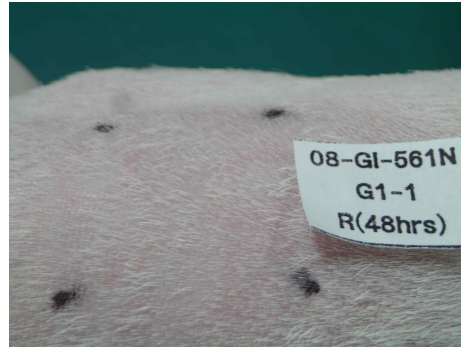
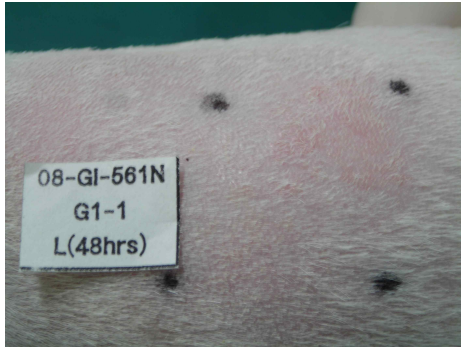


(c) G3



(d) G4

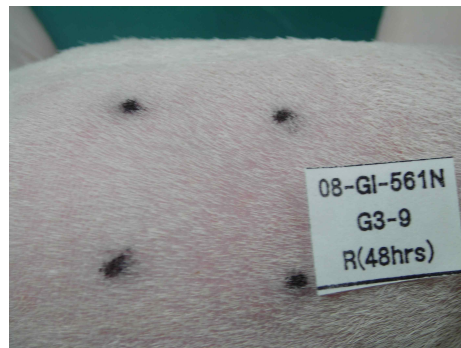
Photo 2. Evaluation of skin reaction challenge in male guinea pigs(48 hrs)



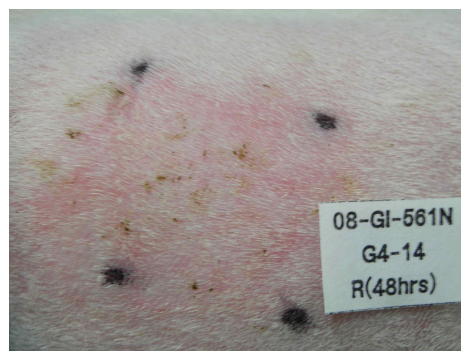
(a) G1



(b) G2



(c) G3



(d) G4

3. 3차년도

가. 첩포 검사(Patch- Test)

(1) 실험 내용

Mutant type 레몬밤 허브 추출물의 피부 자극 정도를 검사하기 위하여 Finn Chambers On Scanpor Tape을 이용하여 상완 내측에 48시간 동안 첩포 하고, 관찰은 제거 48시간 이후에 하였으며 국제 접촉 피부염 연구회(International Contact Dermatitis Research Group : ICDRG)의 판정 기준은 다음 Table 1,2에 나타 내었다.

Table 4-31. A criterion of patch test

Signature	Criteria for judging
-	Negative reaction
±	A slight erythema
+	Erythema, edema
++	Erythema, edema, papule, vesicles
+++	Bull

Table 4-32. A judgment

Grade	Criteria for judging
0-0.9	Non irritant
1.0-1.9	Slight irritant
2.0-2.9	Mild irritant
3.0 above	Severe irritant

(2) 실험 결과

Mutant type 레몬밤 허브 추출물을 각각 1%, 5%, 10% 농도로 하여 피부1차 자극 첩포(Patch Test)시험 결과 아래 Table 3과 같은 결과를 확인 하였다. Mutant type 레몬밤 허브 추출물 1% 와 5%에서는 피부 자극 반응이 전혀 관찰되지 않았으나 10%에서 약간의 자극이 관찰 되었다. 따라서 mutant type 레몬밤 허브출물의 화장료 제형 원료로 이용하기 위한 한계 농도를 5%로 선정하였다.

Table 4-33. The result of patech test

Classification	48 hour	Mean Score(n=10)	Assess.
Control	-	0	Non irritant
Mutant herb type(1% in D.W.)	-	0	Non irritant
Mutant herb type(5% in D.W.)	-	0	Non irritant
Mutant herb type(10% in D.W.)	±	0	Slight irritant

나. 최적 화장료 제형의 제조

화장료의 실질적 제형을 제조하기 위해 일반적으로 사용되는 각각의 원료를 선정하여 사용하였다. Oil base를 O/W 유화제품의 내상으로 사용하면서 피부 유연감 및 퍼짐성을 증진시키고 이에 적합한 유화제를 선정한 후 Aqueous base로 일반적으로 사용되는 정제수를 이용하였다.

계면장력을 낮추기 위해 적합한 Surfactant를 선정하여 Flocculation을 감소시키는 역할로 사용하였다. 또한 흡습성이 우수해 피부 보습력을 증가시키는 Humectants(Glycerine, 1,3-Butylene glycol)와 피부 유연감, 기능성을 부여하는 다양한 Skin-Conditioning Agent-Miscellaneous 성분 및 향기성분(향료)을 사용하였다.

이온화된 활성성분을 중화시키거나 화장료 제형의 pH(5.5±1)를 피부와 같아지도록 조절하여 피부 자극을 최소화시키기 위한 pH Adjust Material과 화장료의 퍼짐성을 향상시키기 위한 점도 증가제(Viscosity Imparting Agent)를 사용하였다.

화장료 제조방법은 아래와 같은 방법에 의해 제조 되었으며 화장료 최적의 점도, 유화, 흡습성 및 향기부여를 위해 피부컨디셔닝제, 계면활성제, pH Adjust 및 향료를 Optimization하고 마지막으로 5% mutant type 레몬밤 추출물을 이용하여 최적의 화장료(최종 pH 5.77)를 제조 하였다. 화장료 배합비 및 조성은 Table 4에 나타내었다.

- ① 멸균된 모든 기구를 위생적으로 한 후, 각각의 원료를 개량한다.
- ② 주믹서에 A 그룹의 원료를 투입한다.
- ③ 투입된 원료는 가온탱크에서 용해시킨다. (온도: 45-50℃, 시간: 30분, 속도: 700-800rpm)
- ④ 보조믹서에 B 그룹의 원료를 투입하고 혼합한다.

- ⑤ 혼합된 B그룹원료가 완전히 용해되는지를 확인한다.(온도: 상온, 시간: 30분, 속도: 300-400rpm)
- ⑥ 주믹서에서 완전 용해된 B 그룹은 A 그룹과 혼합하여 교반한다.
(온도: 45-50℃, 시간: 30분, 속도: 1000-1100rpm)
- ⑦ A+B 그룹이 완전히 용해되면 C상의 원료를 투입하고 용해한다.
(온도: 50-55℃, 시간: 30분, 속도: 1000-1100rpm)
- ⑧ A+B+C 그룹이 완전히 용해되면 D 그룹의 원료를 투입하고 용해한다.
(온도: 50-55℃, 시간: 60분, 속도: 1000-1100rpm).
- ⑨ 내용물 제조 완료 후 Mesh(100-200)을 이용하여 여과한 후 반제품(화장료) 제조를 완료한다.

Table 4-34. 화장료 배합비 및 조성

Phase	원료명	함량(%)	기능
A	정제수	84.530	Aqueous base
A	부틸렌글라이콜	2.000	피부보습제
A	글리세린	2.000	피부보습제
A	베타인	1.500	피부보습제
A	알로에베라잎즙	0.500	피부컨디셔닝제
A	Mutnat Type 레몬밤 추출물	5.000	본과제 추출원료
B	에탄올	1.000	용제
B	피이지-60하이드로제네이티드캐스터오일	0.200	계면활성제-유화제
B	페녹시에탄올	0.200	살균보존제
B	향료(Ciel)	0.020	향료
C	스위스알파인허브	0.100	피부컨디셔닝제
C	캐모마일꽃추출물	0.100	피부컨디셔닝제
C	코엔자임 Q10	0.100	미백기능성원료
C	소듐카보머	0.200	점도증가제
C	천연방부제	0.200	살균보존제
C	디포타슘글리시리제이트	0.100	피부컨디셔닝제
C	하이알루로네이트	0.030	피부컨디셔닝제
C	EGF	0.010	피부컨디셔닝제
C	마치현 추출물	0.010	피부컨디셔닝제
D	소듐시트레이트	0.100	pH Adjust
D	시트릭에씨드	0.100	pH Adjust

다. 화장료 제형의 저장 안전성 실험

(1) 실험 내용

화장료를 대상으로 Table 5와 같은 조건하에서 제형 안정성 실험을 수행하였다. 성상의 변화를 보기 위해서 광택, 점성 및 입자 뭉글거림에 대하여 관찰하였다. 그리고 시험기간 동안 이취 또는 변취에 의한 제품의 취 변화도도 파악하였다.

사용감을 파악하기 위해 시험 기간 중에 화장료를 이용하여 유분감, 흡수력 등의 현상을 체크하였으며, 색의 변화 유·무를 파악하여 Table 6과 같은 시험 결과를 얻었다.

(2) 실험 결과

실온(R/T), 항온(55℃) 및 일광의 조건에서 성상, 사용감, 변취, 변색, 물성 및 산패에 대한 실험 결과 8주간의 실온(R/T) 및 3주간의 일광 조건에서는 성상, 물성, 사용감, 변색, 변취, 산패의 변화가 관찰되지 않았다.

비록 8주간의 항온(55℃) 조건 실험 중 마지막 주에서 성상, 물성, 사용감에서 약간의 변화가 관찰되었지만 항온조건의 오랜시간(8주간) 실험특성 상 흔히 관찰될 수 있는 경우로 간주하고 최종적으로 본 화장료 제형의 저장 안전성을 우수한 것으로 판단하였다.

Table 4-35. 화장료 안정성 실험 방법

실험 조건	시험 기간	체크 주기	체크 사항
실온(R/T)	8주	1주일: 2회/주 1주일 경과 후: 3회/주, 2주일 경과 후: 3회/주, 3주일 경과 후부터: 4회/주	성상, 물성, 사용감, 변색, 변취, 산패
항온(55℃)	8주	1주일: 2회/주 1주일 경과 후: 3회/주, 2주일 경과 후: 3회/주, 3주일 경과 후부터: 4회/주	성상, 물성, 사용감, 변색, 변취, 산패
일광	3주	1회/일	변색, 변취, 산패

Table 4-36. 화장료 안정성 실험 결과

실험조건	체크사항	1주	2주	3주	4주	5주	6주	7주	8주
실온(R/T)	성상, 물성, 사용감	○	○	○	○	○	○	○	○
	변색	○	○	○	○	○	○	○	○
	변취, 산패	○	○	○	○	○	○	○	○
항온(50℃)	성상, 물성, 사용감	○	○	○	○	○	○	○	△
	변색	○	○	○	○	○	○	○	○
	변취, 산패	○	○	○	○	○	○	○	○
일광	변색	○	○	○					
	변취, 산패	○	○	○					

○ : 변화없음(안정성 확보) △ : 약한 변화 × : 변화(안정성 미확보)

라. 마스크 팩 시제품 제작

마스크 팩 소재로 일반 부직포가 아닌 자사 특허보유 중인 바이오 셀룰로오스(Bio-Cellulose) Sheet를 소재로 활용하고 최적화된 화장료(Table 4) 25g를 첨가하여 마스크 팩 시제품을 개발 하였다.

- 마스크 팩 소재로는 일반 부직포가 아닌 자사 특허보유 중인 바이오 셀룰로오스(Bio-Cellulose) Sheet를 활용하였다. (특허 등록 번호 : 10-0405776, 미생물 셀룰로오스를 주성분으로 포함하는 Wet Sheet 제조방법 및 그 용도 개발)

- 바이오 셀룰로오스(Bio-Cellulose) Sheet는 다음과 같은 특징을 가지고 있다.

(1) 바이오셀룰로오스는 다수의 박테리아, 특히 *Acetobacter xylinum* BRC5 균주의 배양에 의해서 생산되는 고분자 물질로서, 정치배양 조건(1% Acetate, 10% Sucrose, 35% 사과주스)에서는 배양액상에 반투명한 막(Pellicle) 형태로 생성된다.

미생물에 의해 생산된 바이오셀룰로오스는 식물로부터 얻어지는 셀룰로오스와 같이 Glucose가 β-1,4로 결합된 Polymer이나, 그의 섬유폭은 식물 Cellulose의 20~50μm보다 약 150배 적은 약 0.04~0.1 μm이고, 3차원 망상구조를 이루고 있어 식물 Cellulose 보다 산업적으로 이용 가치가 크다.

한편 화장품용 마스크 팩은 식물 셀룰로오스를 주성분으로 하는 부직포에 화장수를 함침시켜

제조되거나 부직포에 콜라겐을 도포하여 제조될 수 있다. 마스크 팩 소재 중에 부직포는 보수제로서 성형이 간단하고, 두께조절이 가능한 장점 때문에 가장 일반적으로 이용되는 소재이나 보수성(수분을 보유하는 능력)이 적은 것이 단점이다.

(2) 높은 보수성으로 인하여 미백, 피부진정, 주름제거 또는 여드름치료 등의 화장수를 다량 함유시킬 수 있어 단시간 내에 피부에 수분 및 영양분을 공급 한다.

(3) 치밀한 구조로 되어 있어 피부에의 접촉성이 우수하며, 혼자 사용(착용)하기 용이 할 뿐 아니라 착용감이 부드러운 고급형 시트이다.

(4) 피부에 접촉 시 땀구멍 까지 밀착되므로 피부 표면의 지방이나 이물질 의 제거능이 뛰어나다.

(5) 식품소재로 제조한 것이므로 피부에 안정성이 있다.

(6) 피부에 접착성을 부여하기 위한 어떠한 물질도 첨가 되어 있지 않아 착용 시 끈적한 느낌이 없다.

(7) 겔(Gel)상으로 일정 두께를 가지므로 일정시간 경과 후에도 피부에 상쾌함과 시원함을 유지시켜 준다.

(8) 한국화학시험연구원 안전성 Test 통과하여 피부 안전성을 확보하였다.



Figure 1. 시제품 사진

마. 시제품 화장료 pH 및 미생물 실험

(1) pH 측정

(가) 실험 내용

식품의약품안전청 고시 제 2005 - 68호의 화장품 기준 및 시험 방법에 따라 화장료의 pH를 측정하였다. 화장료 2g를 취하여 100 mL 비커에 넣고 물 30 mL를 넣어 수상에서 가온하여 지방분을 녹이고 흔들어 섞은 다음 냉장고에 지방분을 응결시켜 Whatman No. 2 filter paper로 여과한 용액을 pH 측정기(Corning pH meter 440, U.S.A)를 이용하여 3번 측정 후 평균값을 이용하였다.

Table 4-37. 반제품 pH 값

횟수	pH 값	평균
1	5.59	5.58
2	5.63	
3	5.52	

(나) 실험 결과

피부의 pH는 4.5~6.5 정도(약산성)일 때 가장 좋은 피부라고 하는데, 이는 피부를 보호하고 있는 피지막(천연피부보호막)의 pH이다. 반제품 pH 값은 평균 5.58이었다. 이는 일반적으로 건강한 피부 pH 범위인 5.5 ± 1 범위에 포함되는 범위이다.

(2) 미생물 실험

미생물 실험은 식품공전 제 7. 일반 시험법 8. 미생물 시험법에 따라 실시하였다.

(가) 실험 내용

표준평판균수는 검체중에 존재하는 세균 중 표준 한천배지 내에서 발육할 수 있는 중온균의 수를 말한다. 이 방법은 보통 검체와 표준한천배지를 페트리접시 중에서 혼합 응고시켜 배양 후 발생한 세균의 집락수로 부터 검체중의 생균수를 산출하는 방법이다.

- 배지 : 표준한천배지 (균수측정용) : Standard Methods Agar (Plate Count Agar)

Tryptone : 5.0g

Yeast Extract : 2.5g

Dextrose : 1.0g

Agar : 15.0g

위의 성분에 증류수를 가하여 1,000ml로 만들고 pH를 7.0~7.2로 맞추어 101도에서 15분간 멸균하였다.

(나) 시험방법 : 화장수 5ml를 식염수 5ml에 희석하여 검체로 사용.

검체 1ml씩을 멸균 페트리접시 2매 이상씩에 무균적으로 취하여 43~45도를 유지한 PCA배지 약 15ml를 무균 분주 후, 페트리접시 뚜껑에 부착하지 않도록 주의하면서 배지와 검체를 잘 섞고 냉각응고 시킨다.

냉각 응고시킨 페트리접시는 거꾸로하여 35도에서 48시간을 배양한다. 배양 후 즉시 집락 계산기를 사용하여 생성된 집락수를 계산한다.

(다) 실험결과 : 배양 48시간 후 육안 확인 결과 미생물 군락(colony)이 관찰되지 않았다.



Figure 2. 배양이 완료된 PCA 배지

(라) 대장균 균

(1)정성시험 ① 유당배지법

대장균균이라 함은 Gram음성, 무아포성 간균으로 유당을 분해하여 가스를 발생하는 모든 호기성 또는 통성 혐기성 세균을 말한다.

대장균 균 시험에는 대장균균의 유무를 검사하는 정성시험과 대장균균의 수를 산출하는 정량 시험이 있으나 본 실험에서는 대장균균의 유무를 판별해야 하므로 정성시험을 시행하였다.

- 배지 : 유당배지 (Lactose Broth)

Peptone : 5.0g

Beef Extract : 3.0g

Lactose : 5.0g

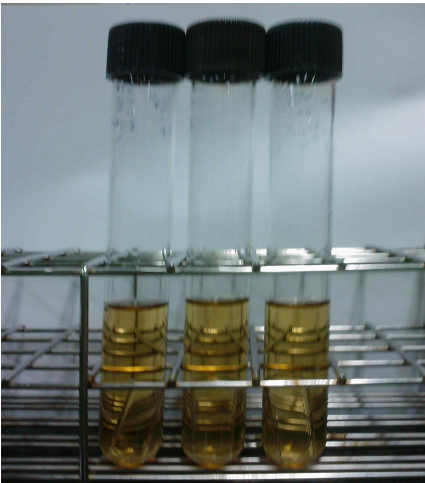
위의 성분을 증류수 500ml (2X 유당배지)에 녹여 ph 6.9±0.2로 조정한 후 121도에서 15분간 멸균하였다.

(마) 시험방법 : 화장수 1 mL를 식염수 9 mL에 희석하여 검체로 사용.

유당 배지를 가한 발효관에 검체를 넣어 35±1도에서 48시간동안 배양하여 가스발생이 있으면 대장균군의 존재가 추정된다.

검액을 10ml씩 접종하여 35±1도에서 24시간 배양하여 발효관 내에 가스가 발생하면 추정시험 양성이고, 만약 가스가 발생하지 않았을 때에는 48시간까지 관찰한다. 이때까지 가스가 발생하지 않았을 때에는 음성이며, 가스발생이 있을 때는 추정양성으로 확정시험을 시행하여야 한다. 본 실험에서는 추정시험 음성판정이 나왔으므로 확정시험은 시행하지 않는다.

- 시험 결과 : 24시간 배양 후 가스 발생이 관찰되지 않았으므로 음성으로 판단 함.



(바) 효모, 곰팡이 ::측정방법은 2)세균수(일반세균수) 측정방법에 준하여 실험

- 배지 : 건조필름 배지(3M™ Petrifilm™), 효모 및 곰팡이용 건조 필름배지

- 시험방법 : 화장수 원액을 검체로 사용

검체 1ml를 건조필름배지에 접종한 후 25도의 인큐베이터에서 5일간 배양한다.

효모균은 핑크에서 녹색의 빛깔을 띠며 작고, 가장자리 부분이 명확히 구분된다. 곰팡이균은 다양한 색상을 나타내며 큰 공간을 차지하고 가장자리 부분이 명확히 구분되지 않는다.

- 실험 결과 : 5일 후 건조필름배지 관찰결과 아무런 색이 나타나지 않았으므로 음성으로 판단 하였다.



마. 시제품의 사용감 및 제품력 테스트: 소비자 선호도 조사

마스크 팩 시제품의 소비자 선호도 및 제품력 테스트를 위해 사용감 및 제품 품평을 자체적인 기준의 설문에 의해 실시하였다.

총 20명의 사내 품평단을 통하여 각 항목 별로 기준을 설정한 후 5점만점 기준으로 사용자의 점수를 환산하여 평가하였다. 판단 기준으로는 Table 7과 같은 방법을 사용하였다.

- 조사 결과

총 20명의 사내 품평단을 통하여 각각의 품평항목에 5점만점 기준으로 점수를 취득한 후 통합한 결과 5점 만점 기준으로 평균 4점을 얻었다.

전체적으로 다른 조사 항목에 비해 보습력, 밀착력, 피부 유연감 및 제품 만족도는 우수(5점) 하다고 답했고 피부가 밝고 화사해 졌는가? 즉 피부 브라이팅 효과의 만족도는 평균 4점의 만족도를 보였다.

그리고 20명의 품평단 중 2명이 제품 사용 후 피부가 약간 붉게 변한 것 같다고 답하였다. 이는 현재 시중에 판매되고 있는 고가 마스크 팩 경우에도 몇몇 관찰되어지고 있으며 개개인의 피부 상태에 따라 느끼는 정도가 매우 다양한 것으로 판단되어 진다.

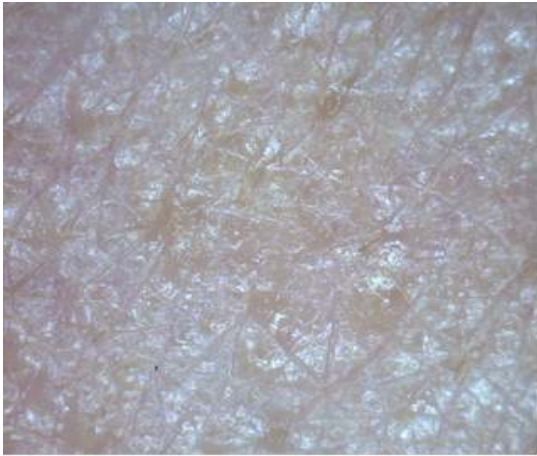
Table 4-38. 마스크 팩 시제품의 제품력 평가 항목

No	평가 항목	평가 세부사항
1	퍼짐성	부드럽게 퍼발리는 정도가 좋은가?
2	밀착력	밀착감의 정도가 좋은가?
3	피부흡수력	느껴지는 피부 흡수력이 좋은가?
4	보습지속력	흡수 후 느껴지는 보습력 정도가 좋은가?
5	끈적임	흡수 후 느껴지는 끈적임의 정도가 좋은가?
6	피부자극도	흡수 후 느껴지는 따가움이나 가려움의 정도가 있는가?
7	피부브라이트닝효과	피부가 밝고 화사해 졌는가?
8	종합평가	전체적인 제품의 만족도

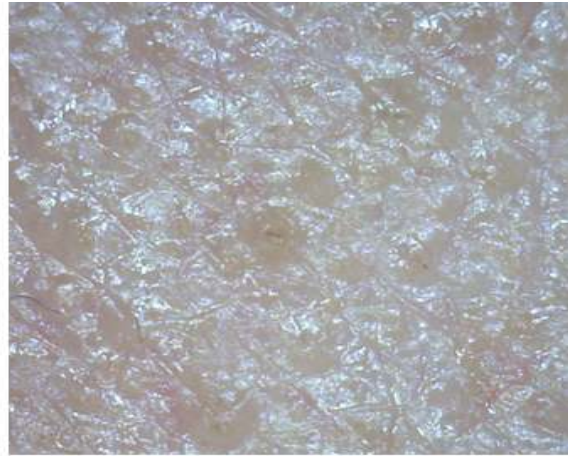
No	평가 항목	평 가				
		매우 나쁘다		보통		매우 좋다
1	부드럽게 퍼발리는 정도가 좋은가?	1	2	3	4	5
2	밀착감의 정도가 좋은가?	1	2	3	4	5
3	느껴지는 피부 흡수력이 좋은가?	1	2	3	4	5
4	흡수 후 느껴지는 보습력 정도가 좋은가?	1	2	3	4	5
5	흡수 후 느껴지는 끈적임의 정도가 좋은가?	1	2	3	4	5
6	흡수 후 느껴지는 따가움이나 가려움의 정도가 있는가?	1	2	3	4	5
7	피부가 밝고 화사해 졌는가?	1	2	3	4	5
8	전체적인 제품의 만족도	1	2	3	4	5

- 제품 선호도 설문지 조사 결과 8가지 평가 항목 중 매우 좋다(5점)는 평가를 내린 사람의

피부 사진(70X)이며 마스크 팩 제품 사용 전 사진과 마스크 팩 제품 30분간 사용 후 사진 결과이다.



Before(70X)



After(70X)

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분	연도	세부연구개발 목표	달성도	평가의 착안점 및 기준
1차 년도	2007	◦ 기능성 레몬밤 켈러스 유도 및 생육, 배양 조건 다양화	100 %	◦ 레몬밤 및 그 켈러스의 기능성 증대 배양 조건 확립
		◦ 레몬밤 잎 및 켈러스로부터 비휘발성 이차대사산물 추출 및 분석방법 확립	100 %	◦ 레몬밤의 비휘발성 이차대사산물 추출 및 분석방법 확립
		◦ 레몬밤 에센셜오일의 피부미백효과 검증	100 %	◦ 레몬밤 에센셜오일의 피부미백효과 검증
		◦ 레몬밤 이차대사산물의 원료 인증을 위한 독성검사 실시	100 %	◦ 레몬밤 이차대사산물의 원료 인증을 위한 독성검사 실시
2차 년도	2008	◦ 기능성 레몬밤 돌연변이주 스크리닝 및 확보	100 %	◦ 기능성 레몬밤 돌연변이주 스크리닝 및 확보
		◦ 돌연변이 레몬밤 및 켈러스로부터 비휘발성 이차대사산물 추출 및 LC/MS 이용 대사체 분석 및 다변량 분석	100 %	◦ 돌연변이 레몬밤 켈러스로부터 비휘발성 이차대사산물 추출 및 LC/MS 이용 대사체 분석 및 다변량 분석
		◦ 돌연변이 레몬밤 에센셜오일의 피부미백 개선효과 검증	100 %	◦ 돌연변이 레몬밤 에센셜오일의 피부미백 개선효과 검증
		◦ 레몬밤 이차대사산물의 원료 인증실시 및 시제품 개발, 안정성 평가 연구	100 %	◦ 레몬밤 이차대사산물의 원료 인증실시 및 시제품 개발, 안정성 평가
3차 년도	2009	◦ 레몬밤 돌연변이주의 기능성의 분자적 특성 구명	100 %	◦ 레몬밤 켈러스 및 돌연변이주의 기능성의 분자적 특성 구명
		◦ 돌연변이 레몬밤으로부터 휘발성 이차대사산물 추출 및 GC/MS 이용 대사체 분석 및 다변량 분석	100 %	◦ 돌연변이 레몬밤 켈러스로부터 휘발성 이차대사산물 추출 및 GC/MS 이용 대사체 분석 및 다변량 분석
		◦ 돌연변이 레몬밤 에센셜오일의 주름살 감소기능 연구	100 %	◦ 돌연변이 레몬밤 에센셜오일의 주름살 감소기능 연구
		◦ 시제품을 대상으로 한 소비자 테스트 및 원료의 기능성 인증	100 %	◦ 시제품을 대상으로 한 소비자 테스트 및 원료의 기능성 인증
최종 평가	2010	◦ 기능성 레몬밤 켈러스 배양조건 확립 및 돌연변이주 확보	100 %	◦ 기능성 레몬밤 켈러스 배양조건 확립 및 돌연변이주 확보
		◦ 레몬밤 및 켈러스, 돌연변이주 이차대사산물 분석	100 %	◦ 레몬밤 및 켈러스, 돌연변이주 이차대사산물 분석
		◦ 레몬밤 및 켈러스, 돌연변이주의 피부미용 기능성 검증	100 %	◦ 레몬밤 및 켈러스, 돌연변이주의 피부미용 기능성 검증
		◦ 레몬밤 피부 미용 시제품 개발	100 %	◦ 레몬밤 피부 미용 시제품 개발

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

- 기존 특허는 화장품, 차 등 제품의 조성물로서의 허브의 기능성 등에 관한 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 생육조건에 따른 허브의 지표물질의 새로운 구조 확인 및 활성 확인 등의 방향으로 연구를 추진하여 특허를 국내 및 국외에 출원할 계획임
- 기존논문은 각종 허브 추출물의 항산화, 항암 활성 측정 및 분야에만 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 메타볼로믹스 접근을 통해서 허브의 생육 조건에 따른 1,2차 대사산물의 변화를 확인하고, 이를 활성과 연결하는 방향으로 연구를 추진하여 논문을 Agriculture and Food Chemistry 학술지 등에 게재할 계획임.
- 전문가들의 국내의 화장품 시장 전망은 물론, 일본, 중국을 포함한 세계적으로 화장품시장은 앞으로 지속적인 고속 성장을 이룰 것이라는 공통적인 전망에 있어, 국내의 성장에는 물론 세계적으로도 화장품 시장성장을 이끄는 Anti-aging 화장품분야의 대기업 사이에서 차별화된 소재와 이미지로 시장에 참여.
- 국내 및 국외시장 분석결과 허브의 기능성을 이용하여 화장품, 식품 등의 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 국내에서는 국외에 비해 아직 허브에 대한 연구와 제품화가 부족한 바, 본 연구과제에서는 허브의 기능성 강화와 최적 생육 조건의 연구를 추진하여 기능성 제품 등을 생산하여 국내 및 국외에 판매할 계획임.
- 화장품 소재로서의 국내재배 허브소재의 기능성 연구 자료 확보 및 유효성을 검증하고 국내 재배 허브소재를 이용한 기능성 화장품 개발 및 관련 사업 부흥에 이바지한다. 국내재배 허브 천연원료를 이용한 제품을 개발하여 피부에 기능성을 부여하므로 소비자의 니즈를 충족시키며 DNA microarray 기법을 이용하여 허브의 피부기능에 대한 생리적 효능을 평가하고 예측할 수 있는 기초자료의 생산이 가능하다고 사료된다.
- Expression genomics와 informatics를 적용한 유전체학의 신개념 식의약품의 효능 평가 및 예측 방법 가능성을 제시할 수 있으며 경제적이고 specific한 시험방법을 통해 신속하고 신뢰성 있는 연구결과의 도출이 가능하다.
- 기능성 화장품의 신원료 개발로 국내 화장품 기술 수준을 향상시키며 국내산 천연소재를 이용한 기능성 화장품 소재 개발로 농민소득증대 및 자생 천연소재의 부가가치 창출이 가능하다. 국내 유전체 기법 산업 육성으로 국가 경쟁력 강화를 위한 전문 연구 인력 양성
- 국내 독자적인 자생 천연소재 추출물 성분의 피부미백 효능 평가를 위한 유전체 기법의 확립과 국제적 경쟁력 확보가 가능하며 기능성 화장품 원료 및 기능성 화장품의 무역수지 불균형이 해소되고 기능성 화장품의 수출로 화장품 산업 발전과 국가 수익 증대에 이바지한다.

농산업의 발전 및 수출가능 기능성 고급 화장품으로 개발, 농가의 소득 증대를 기대함.

- 연구개발과 인력양성: 화장품 시장에 두 가지 방향인 안티에이징 시장과 천연화장품 시장의 동시 공략하고 프리미엄 화장품 연구의 경쟁력을 갖춘 전문 연구 인력 양성이 가능하며 시제품의 소비자 테스트 및 사업화: 사내망을 통한 시제품의 설문조사와 시제품 테스트 시행. 자사 방판 업체 (Evergoodlife), 화장품 전문점, 피부과, 백화점, 마케팅(연예인 홍보), 홈쇼핑(농수산, GS, CJ오쇼핑), 국외수출(자사해외법인: 중국, 대만, 홍콩, 몽골, 베트남) 등 현재 자사제품 판매 경로를 통한 사업화를 가능하게 한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 국외에서 허브 관련된 산업이 오래전부터 발전해 왔었으며 오늘날에도 허브의 기능성을 이용하여 식품, 의약품 등의 용도로 많은 부분을 차지하고 있음.
- 150 여년 동안 키엘 약국은 최상급의 천연 허브를 이용하여 자연주의 화장품 및 치료 연고를 제작해옴. (2010. 01. 13. 스포츠서울닷컴)
- 미국의 영양보조식품 시장의 약 40%는 비타민, 30%는 허브가 차지하고 있음. (2003. 기술동향분석보고서. KIST)
- 일본은 경기침체와 다양한 기능을 하나로 묶은 B.B크림과 같은 멀티기능 제품의 유행으로 화장시장의 규모는 축소되고 있으나, 기능성 화장품 시장은 꾸준한 성장세를 보이고 있다. 2008년 기준으로 일본의 기능성 화장품 시장의 규모는 1조 6천억 엔으로 추정됨. (출처:KIET)
- 최근에는 남성들도 외모에 투자하는 경향이 늘어나는 추세여서 이를 겨냥한 남성화장품 시장의 급속한 성장이 이루어지고 있다. 미국은 2007년을 기준으로 남성전용 스킨케어제품이 4600만 달러 판매된 것으로 알려졌으며 이중 20%가 안티에이징 제품인 것으로 나타났다. (출처 :KOTRA)
- 세계시장규모는 화장품 시장 규모가 2007년 기준 270조원에 달하며 의료기기(196.8조원),백색가전(148.8조원)보다 시장규모가 크다. 소득향상과 소비계층의 증가 등으로 연 6.6%의 고성장유지를 유지해 오고 있으며 세계 100대 기업 중 우리나라는 5곳인데 19위 아모레퍼시픽(1.8조원), 32위 LG 생활건강(0.8조원), 60위 더페이스샵(0.2조원), 84위 코리아나화장품(0.1조원),100위 에이블씨엔씨(0.09조원)가 있다. 한류 붐을 타고 동남아 시장에서 우리나라 화장품의 인지도와 호감도가 급속하게 신장되고 있으므로 그에 따른 보다 고품질의 화장품 개발이 시급하다고 보여진다.

제 7 장 참고문헌

- Azuma, K., A. Ohyama, K. Ippoushi, T. Ichianagi, A. Takeuchi, T. Saito, and H. Fukuoka. 2008. Structures and antioxidant activity of anthocyanins in many accessions of eggplant and its related species. *J. Agric. Food Chem.*56:10154-10159.
- Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier, and C. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 28:25-30.
- C. Denkert, J. Budczies, W. Weichert, G. Wohlgemuth, M. Scholz, T. Kind, S. Niesporek, A. Noske, A. Buckendahl, M. Dietel, and O. Fiehn, (2008) Metabolite profiling of human colon carcinoma - deregulation of TCA cycle and amino acid turnover. *Molecular Cancer* 7, 15.
- Chen, Q.F., D. Liang-Ying, X. Shi, W. Yun-Sheng, L. Xiong-Lun, and W. Guo-Liang. 2007. The *COI1* and *DFR* genes are essential for regulation of jasmonate-induced anthocyanin accumulation in *Arabidopsis*. *J. Integ. Plant Biol.* 49:1370-1377.
- de Sousa, A.C., D.S. Alviano, A.F. Blank, P.B. Alves, C.S. Alviano, and C.R. Gattass. 2004. *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *J. Pharm. Pharmacol.* 56:677-681.
- Devoto, A., C. Ellis, A. Magusin, H.S. Chang, C. Chilcott, T. Zhu, and J.G. Turner. 2005. Expression profiling reveals *COI1* to be a key regulator of genes involved in wound- and methyljasmonate-induced secondary metabolism, defense, and hormone interactions. *Plant Mol. Biol.*58:497-513.
- D.Y. Lee, and O. Fiehn, (2008) High quality metabolomic data for *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Methods* 4, 13.
- Faudale, M., F. Viladomat, J. Bastida, F. Poli, and C. Codina. 2008. Antioxidant activity and phenolic composition of wild, edible, and medicinal fennel from different Mediterranean countries. *J. Agric. Food Chem.* 56:1912-1920.
- Fester, T. and G. Hause. 2005. Accumulation of reactive oxygen species in arbuscular mycorrhizal roots. *Mycorrhiza* 15:373-379.
- Galasinski, W., J. Chlabicz, A. Paszkiewicz-Gadek, C. Marcinkiewicz, and A. Gindzienski. 1996. The substances of plant origin that inhibit protein biosynthesis. *Acta Pol Pharm.*53:311-318.

Geuenich, S., C. Goffinet, S. Venzke, S. Nolkemper, I. Baumann, P. Plinkert, J. Reichling, and O.T. Keppler. 2008. Aqueous extracts from peppermint, sage and lemon balm leaves display potent anti-HIV-1 activity by increasing the virion density. *Retrovirology* 5:27.

Gollop, R., S. Even, V. Colova-Tsolova, and A. Peri. 2002. Expression of the grape dihydroflavonol reductase gene and analysis of its promoter region. *J. Exp. Bot.* 53:1397-1409.

Gratão, P.L., A. Polle, P.J. Lea, and R.A. Azevedo. 2005. Making the life of heavy metal-stress plants a little easier. *Funct. Plant Biol.* 32:481-494.

Gratão, P.L., C.C. Monteiro, L.E.P. Peres, and R.A. Azevedo. 2008. The isolation of antioxidant enzymes from mature tomato (cv. Micro-Tom) plants. *HortScience* 43:1608-1610.

Jain, V.K. and K.N. Guruprasad. 1989. Effect of chlorocholine chloride and gibberellic acid on the anthocyanin synthesis in radish seedlings. *Physiol. Plant.* 75:233-236.

Kennedy, D.O., A.B. Scholey, N.T. Tildesley, E.K. Perry, and K.A. Wesnes. 2004. Attenuation of laboratory-induced stress in humans after acute administration of *Melissa officinalis* (Lemon Balm). *Psychosom Med.* 66:607-613.

Kennedy, D.O., W. Little, C.F. Haskell, and A.B. Scholey. 2006. Anxiolytic effects of a combination of *Melissa officinalis* and *Valeriana officinalis* during laboratory induced stress. *20:96-102.*

Khan, M.I. 1980. Gibberellic acid bioassay based on the inhibition of anthocyanins production in tomato seedlings. *Biol. Plant.* 22:401-403.

Leon, P. and J. Sheen. 2003. Sugar and hormone connections. *Trends Plant Sci.* 8:110-116.

Loreti, E., G. Povero, G. Novi, C. Solfanelli, A. Alpi, and P. Perata. 2008. Gibberellins, jasmonate and abscisic acid modulate the sucrose-induced expression of anthocyanin biosynthetic genes in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 179:1004-1016.

L.W. Sumner, P. Mendes, and R.A. Dixon, (2003) Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry* 62, 817-836.

M.P. Styczynski, J.F. Moxley, L.V. Tong, J.L. Walther, K.L. Jensen, and G.N. (2007) Stephanopoulos, Systematic identification of conserved metabolites in GC/MS data for metabolomics and biomarker discovery. *Analytical Chemistry* 79, 966-973.

- Ma, H.L., M.J. Qin, L.W. Qi, G. Wu, and P. Shu. 2007. Improved quality evaluation of *Radix Salvia miltiorrhiza* through simultaneous quantification of seven major active components by high-performance liquid chromatography and principal component analysis. *Biomedical Chromatography* 21:931-939.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7:405-410.
- Moalem-Beno, D., G. Tamari, Y. Leitner-Dagan, A. Borochoy and D. Weiss. 1997. Sugar-dependent gibberellin-induced Chalcone Synthase gene expression in petunia corollas. *Plant Physiol.* 113: 419-424.
- Muller, S.F. and S. Klement. 2006. A combination of valerian and lemon balm is effective in the treatment of restlessness and dyssomnia in children. *Phytomedicine* 13:383-387.
- Nagira, Y. and Y. Ozeki. 2004. A system in which anthocyanin synthesis is induced in regenerated torenia shoots. *J. Plant Res.* 117:377-383.
- Nagira, Y., K. Ikegami., T. Koshiha, and Y. Ozeki. 2006. Effect of ABA upon anthocyanin synthesis in regenerated torenia shoots. *J. Plant Res.* 119:137-144.
- Neff, M.M. and J. Chory. 1998. Genetic interactions between Phytochrome A, Phytochrome B, and Cryptochrome 1 during Arabidopsis development. *Plant Physiol.* 118:27-35.
- Neta-Sharir, I., O. Shoseyov, and D. Weiss. 2000. Sugars enhance the expression of gibberellin-induced genes in developing petunia flowers. *Physiol. Plant.* 109: 196-202.
- Pasqua, G., B. Monacellia, N. Mulinacci, S. Rinaldi, C. Giaccherini, M. Innocenti, and F. Vinceri. 2005. The effect of growth regulators and sucrose on anthocyanin production in *Camptotheca acuminata* cell cultures. *Plant Physiol. Biochem.* 43:293-298.
- O. Fiehn, G. Wohlgemuth, M. Scholz, T. Kind, D.Y. Lee, Y. Lu, S. Moon, and B. Nikolau, (2008) Quality control for plant metabolomics: reporting MSI-compliant studies. *Plant Journal* 53, 691-704.
- Patro, B.S., A.K. Bauri, S. Mishra, and S. Chattopadhyay. 2005. Antioxidant activity of *Myristica malabarica* extracts and their constituents. *J. Agric. Food Chem.* 53:6912-6918.
- Porra, R.J., W.A. Thompson, and P.A. Kriedmann. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic

absorption spectroscopy. *Biochem Biophys Acta* 975:384–394.

R.D. Hall, I.D. Brouwer, and M.A. (2008) Fitzgerald, Plant metabolomics and its potential application for human nutrition. *Physiologia Plantarum* 132, 162–175.

Rolland, F., B. Moore, and J. Sheen. 2002. Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* 14:S185–S205.

Rook, F. and M.W. Bevan. 2003. Genetic approaches to understanding sugar response pathways. *J. Exp. Bot.* 54:495–501.

Smeeckens, S. 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51:49–81.

Solfanelli, C., A. Poggi, E. Loreti, A. Alpi, and P. Perata. 2006. Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 140: 637–646.

Teng, S., J. Keurentjes, L. Bentsink, M. Koornneef, and S. Smeeckens. 2005. Sucrose-specific induction of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* requires the MYB75/PAP1 gene. *Plant Physiol.* 139:1840–1852.

Tolstikov, V.V., O. Fiehn, and N. Tanaka. 2007. Application of liquid chromatography–mass spectrometry analysis in metabolomics. Ed. W. Weckwerth. *In Metabolomics Methods and Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ, p141–155.

Tonelli, C., E. Cominelli, D. Allegra, and M. Galbiati. 2007. Plant tolerance to drought and salinity: modulation of transcription factors. Proc. 18th International Conference on *Arabidopsis Research*. 176.

van Acker, F.A., O. Schouten, G.R. Haenen, W.J. van der Vijgh, and A. Bast. 2000. Flavonoids can replace alpha-tocopherol as an antioxidant. *FEBS Lett.* 473:145–148.

Weiss, D., A.J.V. Tunen, A.H. Halevy, J.N.M. Mol, and A.G.M. Gerats. 1990. Stamens and gibberellic acid in the regulation of flavonoid gene expression in the corolla of *Petunia hybrida*. *Plant Physiol.* 94:511–515.

White, C.N. and C.J. Rivin. 2000. Gibberellins and seed development in maize. II. Gibberellin synthesis inhibition enhances abscisic acid signaling in cultured embryos. *Plant Physiol.* 122:1089–1097.