

최 종
연구보고서

해양한국발전프로그램(KSGP) 연구개발사업

서해 갯벌 흙에 함유된 피부유용물질의 규명 및
피부 개선제 개발에 관한 연구

Characterization of Mud (Sandbar) as a Functional Cosmetics

인하대학교

해양수산부

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문)서해 갯벌 흙에 함유된 피부유용물질의 규명 및 피부 개선제 개발 (영문)Characterization of Mud (Sandbar) as a Functional Cosmetics				
주 관 연구 기관	인하대학교		총괄연구 책임자	(소속)인하대학교 생명화학공학과 (전공분야 : 생명공학)	
참 여 기 업	(주)엠지인투바이오			(성명) 김은기	
총연구개발비 (52,435천원)	계	52,435,000원	총연구 기간	2006.12.27 ~ 2007.12.26 (1년)	
	정부 출연금	42,435,000원	총참여 연구원수	총 인 원	4명
	기업 부담금	10,000,000원		내부인원	4명
	연구기관 부담금			외부인원	
국제 공동 연구	공동연구 과제명				
	공동연구 기간		상대국연구기관명 (상대국연구책임자)		
위탁연구	연구기 관명		연구책임자		
<p>○ 연구개발 목표 및 내용</p> <ul style="list-style-type: none"> - 증가하는 기능성 화장품시장의 원료에 있어 천연물을 이용하는 것중 약용식물을 이용하는 분야가 많은 비중을 차지 하는 가운데 자연의 보고로 알려져 있는 해양 분야의 물질을 이용한 기능성 피부미백제 원료의 개발도 시급한 상황으로 여겨짐. - 갯벌 흙을 이용한 피부관련상품의 효능이 일반인에게 많이 알려지고 있으나 피부작용기작에 대한 연구는 전무한 상태임. - 갯벌 내에는 유기물형태의 humic acid 등이 존재할 것으로 판단되어 이들 구성물들이 피부에 미칠 수 있는 영향을 과학적 실험을 통해 규명하고 갯벌 흙 내의 물질을 추출하여 피부 세포에 어떠한 영향을 주는지를 분석하고자함. - 본 연구는 갯벌 흙내에 존재하는 피부 유용물질을 피부세포에 적용하여 연구함으로써 과학적으로 분석하고 나아가 기능성 피부개선제 원료의 개발과 다양성에 기여하고자 함. <p>○ 연구결과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 갯벌의 채취: 충청남도 보령시에서 채취 - 갯벌 내에 함유한 Humic acid를 분리, 보습력 규명 - 갯벌을 H2O를 사용하여 crude extract한 물질로 melanocyte dendrite를 조절하고, 염증 반응의 매개체로 알려진 PGE2를 억제함을 확인. - 갯벌을 H2O를 사용하여 crude extract한 물질이 피부세포에 독성이 없음을 규명. <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> - 갯벌내의 피부생리활성물질의 영향의 연구결과를 학술논문 투고에 활용. - 갯벌 흙 내의 성분을 이용한 기능성 화장품 개발에 대한 기술제공. - 기존에 판매되고 있는 머드팩이 가지는 과학적인 효과가 인정된 제품이 상용화될 경우 수출 증대로 인한 경제파급효과가 기대됨. 					
색인어	한글				
	영어				

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “서해 갯벌 흙에 함유된 피부유용물질의 규명 및 피부 개선제 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 12월 26일

주관연구기관명 : 인하대학교
주관연구책임자 : 김 은 기
연 구 교 수 : 신 정 현
연 구 원 : 이 향 복
연 구 원 : 호양구엔
연 구 원 : 신 재 동
연 구 원 : 최 치 호

요 약 문

I. 제 목

서해 갯벌 흙에 함유된 피부유용물질의 규명 및 피부 개선제 개발
(Characterization of Mud (Sandbar) as a Functional Cosmetics)

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 증가하는 기능성 화장품시장의 원료에 있어 천연물을 이용하는 것중 약용식물을 이용하는 분야가 많은 비중을 차지 하는 가운데 자연의 보고로 알려져 있는 해양 분야의 물질을 이용한 기능성 피부미백제 원료의 개발도 시급한 상황으로 여겨짐.
- 갯벌 흙을 이용한 피부관련상품의 효능이 일반인에게 많이 알려지고 있으나 피부작용기작에 대한 연구는 전무한 상태임.
- 갯벌 내에는 유기물형태의 humic acid 등이 존재할 것으로 판단되어 이들 구성물질이 피부에 미칠 수 있는 영향을 과학적 실험을 통해 규명하고 갯벌 흙 내의 물질을 추출하여 피부 세포에 어떠한 영향을 주는지를 분석하고자함.
- 본 연구는 갯벌 흙내에 존재하는 피부 유용물질을 피부세포에 적용하여 연구함으로써 과학적으로 분석하고 나아가 기능성 피부개선제 원료의 개발과 다양성에 기여하고자 함.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

구분	연구개발내용	연구범위
1차 년도	<ul style="list-style-type: none"> 갯벌 흙 유래의 생리 활성물질 추출 	<ul style="list-style-type: none"> 갯벌 흙내의 Humic substance 성분의 분리, 농축. solvent extraction을 통한 생리활성물질의 추출. (H₂O, MeOH)
	<ul style="list-style-type: none"> 피부 pigmentation 메카니즘 연구 	<ul style="list-style-type: none"> melanocyte 직접적인 영향에 의한 멜라닌 합성저해 확인. melanocyte의 외부 signal영향에 의한 melanin transfer의 저해인지 확인.
	<ul style="list-style-type: none"> pigmentation이외의 피부기작에 미치는 영향 연구 	<ul style="list-style-type: none"> 갯벌 성분내의 유효물질이 가지는 보습력 규명. 갯벌 성분내의 유효물질이 가지는 염증완화 능력에 대한 연구.
	<ul style="list-style-type: none"> 생리활성물질의 안전성 연구 	<ul style="list-style-type: none"> 멜라닌 세포주 (B16F10, HaCaT cell line)를 통한 MTT assay수행.
	<ul style="list-style-type: none"> 화장품원료제시 	<ul style="list-style-type: none"> 기업 기술 이전을 통한 새로운 기능성 피부 개선제의 개발.

IV. 연구개발 결과

- 갯벌 흙을 이용하여 함유되어있는 유기물질의 형태인 humic acid를 1 g 당 0.5 mg을분리하였고 H₂O를 이용한 용매추출법으로 1 g 당 0.6mg의 crude extract를 얻음.
- 분리한 humic acid가 가지는 water retention capacity를 측정한 결과 기존의 보습력을 가졌다고 알려져 이미 화장품으로 시판되고 있는 황토보다 단위 mass당 13.5% 뛰어난 water retention capacity를 가졌음을 확인.
- 피부세포를 이용하여 추출해낸 water extract에 대하여 pigmentation에 어떠한 영향을 주는지 mechanism을 조사한 결과 melanogenesis에 직접적인 영향을 미치지 않는으나, melanocyte의 dendrite를 activation하는 PGE₂를 positive control인 indomethacin 1 μ M은 UVB만을 쬐어준 대조군에 비하여 66.1%만큼 줄어들음을 보인데 비하여 H₂O를 이용한 갯벌 흙의 crude extract물질은 100 ppm에서 20.9%의 저해율을 200 ppm에서 55%의 저해율을 보임으로써 농도의존적인 저해율을 보임. 억제함을 밝혀냄. 또한 H₂O를 이용한 갯벌 흙의 crude extract물질 중 함유된 무기물과 유기물의 영향을 알아보기 위해 실험을 수행한 결과 무기물에 의하여 PGE₂가 억제됨을 밝혀냄.
- 이는 melanogenesis후외부 signal에 의하여 melanin transfer에 영향을 주어 간접적으로 pigment를 조절하는 것으로 여겨짐. 또한 염증 매개체의 역할을 하는 PGE₂를 억제함으로써 갯벌 흙을 이용한 추출물이 단순히 미백작용만을 하는 것이 아닌 염증완화작용을 함께 하는 것으로 밝혀 짐.

V. 연구개발 결과의 활용계획

수입에 의존하고 있는 기존의 국내 화장품원료시장은 원료의 개발과 과학적인 검증을 필요로 하고있음. 본 연구를 통하여 세계의 5대 갯벌로 알려진 서해안의 갯벌을 이용, 새로운 기능성 미백 화장품의 원료를 개발하고 과학적인 검증을 함으로써 부가적인 화장품 제품들이 생산될 것이고 소비자들의 제품에 대한 신뢰도가 증가할 것임. 그에 따라 새로운 원료에 대한 관심이 증가하여 해양 분야의 기능성 화장품 원료분야의 개발이 증가. 또한 머드 원료의 국내 수요가 증가하고 수출증대로 인한 경제적 파급효과가 예상. 원료의 생산지에서 개최되는 머드 축제를 통한 문화, 관광분야의 경제적 수입도 창출될 것으로 예상되어짐.

SUMMARY

(영문 요약문)

I . Subject

Characterization of Mud (Sandbar) as a Functional Cosmetics

II .Purpose and Need of Research

- The rapid growth of cosmetic material, much of material is from the natural medicine plants. So, we beak fresh ground and find a new target in the sea .
- Mud is widely known as an effective agent for skin care and already used in the cosmetic industry. However, the biologically active materials in mud have not yet been fully determined and mechanism of mud action on skin cell is unclear.
- This study is isolated the Humic substances and crude water extract from the mud and its effects on skin.
- This Work has to be performed to separate and identify the biologically active materials in mud for scientific evidence.

III. Research Contents and Scopes

Contents	Research Contents	Research Areas
First year	• Confirmed of bioactive material from mud.	• Isolation of HA from the mud. • Solvent extraction from the mud.
	• Confirmed of pigmentation mechanism.	• Confirmed of direct Effects the melanogenesis. • Confirmed of indirect Effects the melanogenesis.
	• Confirmed of other mechanism on skin.	• Test of water retention capacity. • Test of anti-inflammation.
	• Research of safety.	• Using of skin cell line. (B16F10, HaCaT) • Confirmed of MTT assay
	• Application of cosmetic material	• Transfer the technology of extract method from mud • Application of cosmetic products

IV. Research Results

- Isolation of humic acid and crude water extract from the mud
- Mud contained a humic acid that has more water retention capacity than yellow ocher of Korea.
- Extract material effects on the regulation of melanocyte dendrite
- Mud extract effects on the relaxation of inflammation

V. Plan of the research result and application

Cosmetic material parts are depending on the importation. So, many companies need development of material and scientific evidence. So, this study is using the mud in western sea of Korea and found biologically active materials in mud and researching mechanism of mud action on skin cell. After this researching, mud is using in various cosmetic products. And mud material will be increasing the exportation on the cosmetic material part. Also, mud festival, mud sightseeing and mud culture are created the economical import.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1.	Indroduction -----	11
Clause 1.	Background and Purpose ----- of Research	11
Clause 2.	The Need of Research -----	12
Chapter 2.	Thechnical State at Horne ----- and Abroad	14
Clause 1.	Thechnical State at Industry ----	14
Clause 2.	Thechnical State at Experiment ---	16
Chapter 3.	Research Contents and Results ---	18
Clause 1.	Research Contents -----	18
Clause 2.	Research Results -----	22
Chapter 4.	Expected Effects -----	40
Clause 1.	Final Objectives -----	40
Clause 2.	Purpose and Results -----	41
Clause 3.	Objective Achievements -----	43
Chapter 5.	Plan of the research ----- result and application	45
Clause 1.	Academic -----	45
Clause 2.	Economical -----	45
Chapter 6.	Reference -----	47

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 -----	11
제 1 절	연구개발의 목적 -----	11
제 2 절	연구개발의 필요성 -----	12
제 2 장	국내외 기술개발 현황 및 과학기술정보 -----	14
제 1 절	산업 수요면의 기술개발 현황 -----	14
제 2 절	연구 수행면의 기술개발 현황 -----	16
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 -----	18
제 1 절	연구개발수행 내용 -----	18
제 2 절	연구개발수행 결과 -----	22
제 4 장	연구개발 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	40
제 1 절	최종 목표 -----	40
제 2 절	연차별 연구 개발 목표 및 연구개발내용 --	41
제 3 절	계획대비 완성도 -----	43
제 5 장	연구개발결과의 활용계획 -----	45
제 1 절	학문적 활용 -----	45
제 2 절	경제적 활용 -----	45
제 6 장	참고문헌 -----	47
별 첨	자체평가의견서	

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

- 건강하고 여유로운 삶이 요구되고 있는 가운데 아름다워지고자 하는 소망과 함께 기능성 화장품에 대한 관심이 더욱 높아지고 있고, 그에 따라서 기능성화장품은 단순히 미용의 개념에서 진화하여 고기능, 다기능의 개념을 함유한 미백, 주름 개선, 자외선 차단 등 기능성화장품의 신소재 원료 개발이 강하게 요구되고 있음.
- 이를 반영하여 각 화장품회사는 새로운 화장품 원료를 개발하고 있는 와중에 천연물을 이용한 원료개발이 중요한 분야로 자리잡고 있음.
- 천연물을 이용한 원료개발중 약용식물을 이용하는 분야가 많은 비중을 차지 하는 가운데 자연의 보고로 알려져 있는 해양분야의 물질을 이용한 기능성 피부미백제 원료의 개발도 시급한 상황으로 여겨짐.
- 갯벌 흙을 이용한 머드팩 등의 피부관련 상품의 효능이 일반인에게도 알려 지고 많은 관련 상품이 시판되어 개발되고 있음. 현재 이러한 갯벌 흙의 피 부작용 기작에 대한 연구는 전무한 상황임.
- 갯벌 내에는 유기물형태의 humic acid 등이 존재할 것으로 판단되나 이들 구성물들이 피부에 어떤 영향을 미치는지에 대한 연구 또한 전무한 상황임.
- 갯벌 흙내에 존재하는 물질들을 용매를 이용한 crude extract를 통해 추출하여 피부 생리활성물질이라 예상되어지는 물질을 분리한 후 피부세포를 이용 하여 미백작용에 어떠한 영향을 주는지를 분석하여 갯벌 머드팩이 가지는 효능을 과학적으로 검증하고자 함.
- 본 연구는 갯벌 흙내에 존재하는 피부 유용물질을 피부세포에 적용하여 연구함으로써 과학적으로 분석하고 나아가 기능성 피부개선제 원료의 개발과 다양성에 기

여하고자 함.

제 2 절 연구개발의 필요성

- 화장품 산업은 인간의 미와 신체에 관련되는 욕구를 충족시켜주는 이미지 산업으로서 고부가가치가 창출되며 기초과학과 응용기술이 종합적으로 적용 되는 두뇌 집약적인 산업임과 동시에 물류비용이 비교적 적게 들고 환경친화 적인 분야로 선진 외국에는 국가적인 성장산업으로 육성 하고 있음.
- 화장품산업은 문화산업이자 미래지향적인 산업으로 산업규모면에 있어서 국내의 경우, 4조원에 이르며 이는 정밀화학 산업분야 중에서 7조원에 이르는 의약품 산업을 제외하고는 가장 큰 규모로 21세기 핵심선도 기술 산업으로 성장할 수 있는 무한한 잠재력을 내포하고 있음.
- 세계시장 또한 1,000억 달러를 초과하는 거대시장을 형성하고 있음.
- 미래의 화장품 개발은 안정성을 강조한 일반 화장품에 비해 효능, 효과가 부각된 기능성 화장품의 중요성이 강조 됨에 따라 앞으로 기능성 화장품 범위의 확대는 향후 화장품 삼업발전을 위한 현안 과제가 되고 있음.
- 이와 같은 경향에 의하여 화장품의 개념이 피부 손질, 노화 방지와 세포부활, 미백 및 자외선 차단 등 기존의 개념에서 항 여드름, 항 아토피, 항 염증 등 현행 의약 외품과 약용화장품의 성격의 제품으로 확대될 것으로 예상되어짐.
- 이로 인하여 화장품의 연구개발, 제조기술의 발전이 빠르게 진행되고 있으며 기능성화장품 분야를 선점하기 위하여 다양한 방법들의 기술이 개발되고 있음.
- 기능성 화장품 분야의 대표적인 부분인 미백 제품은 기능성 화장품의 시장 확대와 발전을 선도하는 중추적인 역할을 수행하고 있으며 점점 그 범위를 확대해 나가고

있는 추세임.

- 앞으로의 기능성화장품이 확대됨에 따라 미백 제품은 기능성 화장품의 30%이상을 차지할 것이라 예상하며 기능성화장품 개발에 있어서 중추적인 역할을 할 것이라 예측.
- 이에 따라 제형보다는 내용물의 차별화를 시도하고 있는 추세가 뚜렷하게 이루어지고 있는 가운데 효과가 뛰어난 미백원료의 개발을 서두르고 있는 추세임
- 한편, 웰빙 시대에 맞춰 소비자가 지향하는 원료의 경향이 천연물에서 유래한 원료로 초점이 맞춰지고 있는 가운데 해양 유래의 화장품 원료는 식물 유래에 비하여 적은 분야를 차지하고 있어 본 연구에서 갯벌 흙 내의 유용물질 확인하여 화장품 원료로 상용화 가능한지를 과학적으로 증명하자 함.
- 화장품의 기작은 과학적으로 증명되어야 소비자에게 신뢰감을 줌. 즉 기능성 제품은 그 효과 및 기작이 과학적 검증을 통해 입증되고 이에 근거 허가가 되므로 갯벌 흙을 이용한 화장품 제품의 과학적 근거는 필수.
- 현재, 머드제품의 주 기능으로 피지의 흡착 및 제거기능과 미네랄류의 용출에 의한 전반적인 피부개선 등의 경험적 효과만으로 많이 사용되고 있고 구체 적인 과학적 증거가 전무함.
- 화장품 선택 시 천연물을 선호하는 소비기호가 증가함에 따라 머드성분의 과학적 증명 및 균일성은 제품의 상용화에 필수적인 요소로 부각되고 있음.
- 머드제품의 피부노화 방지 및 피부수축 촉진, 윤택작용 등의 피부활성의 과학적인 검증을 위해서는 갯벌 흙내에 포함된 피부생리활성물질의 분리 과학적 검증이 필수적인 요인이 됨.
- 본 연구는 갯벌 흙내에 존재하는 물질들을 분리하여 이들이 피부세포에 어떤 영향을 주는지를 피부 세포를 이용, 연구함으로써 갯벌 머드팩이 가지는 효능을 과학적으로 분석하여 기능성 피부원료 분야의 다양성에 기여하고자 함.

제 2 장 국내외 기술개발 현황 및 과학기술정보

제 1 절 국내의 기술개발 현황

- 국내 화장품산업의 시장규모는 '96년에 약 3조원, 2000년에는 4조원, 2005년에는 8조원, 2010년에는 17조원의 규모로 추정되며 우리나라 전체산업에서 차지하는 비중도 증가하는 추세임.

단위 : 천억원

구분	1996	2000	2005	2010	/연평균 증가율(%)	
					'96-2005	2005-2010
화장품산업	27	39	76	170	20.2	24.7

- 기능성화장품(Cosmeceutical)은 세계적으로 통용될 수 있는 의약품과 화장품의 양 그룹사이에 존재하여 유효성 및 안전성이 향상된 제품으로 일반화장품과 비교하여 안전성 이외의 효능 및 효과가 강조된 제품으로 제품 비중이 매년 8%이상 급소한 증가를 보임.

(자료출처: Cosmeceutical Trends & Technologies, 2'Nd Ed, 1997, Technology Catalysts International Corporation)

도 분류	년				
	2000	2003	2006	2009	2012
향노화	60	85	280	300	450
미백	50	85	250	260	400
자외선	50	70	100	200	350

- 국내 화장품 산업은 신규업체의 증가 및 화장품수입의 완전 자유화, 외국의 투자 및 소매업의 개방에 따라 시장개방이 가속화되고 CGMP제도의 시행에 의한 우수한 화장품 제조, 공급이 예상되고 있음.
- 기능성 화장품의 제품 생산 뿐 아니라 보다 자연 친화적이고 안정성을 함유한 화장품 원료의 개발 또한 기능성 화장품 분야에 있어서 중요한 부분으로 대두되고 있음.
- 기능성 화장품 중 미백 화장품 소재개발 연구는 멜라닌 생합성 저해, 자외선 흡수 및 차단, 각질 용해, 피부세포의 활성 부활 등에 초점을 맞추어 연구가 진행 되고 있음.
- 그 중에서도 특히 melanin생합성 조절 효소로 알려져 있는 tyrosinase 생합성 저해 물질 개발에 많은 연구가 집중 되었고 arbutin 등이 개발되어왔음.
- 미백 분야에서의 소재개발의 발전사를 보면 60-70년대에 비타민 C가 주를 이루고 88년도에는 kojic acid, 89년도에는 arbutin등이 개발되기 시작하였고, 화학합성물에서 천연물의 소재로 경향이 이동하는 중임.
- 기존의 기능성 미백화장품 천연물 이용 원료는 미생물 유래의 유래와 약용식물 유래로 크게 나눌 수 있음.
- 미생물 유래의 미백 화장품 원료는 대표적이던 kojic acid가 갑상선 암에 대한 발암성의 문제가 제기 되면서 사용이 중지되었고, 현재는 arbutin등의 유도체가 많이 활용 되고 있으나 활성이 약한 문제점이 나타나고 있음.
- 약용식물 유래의 미백 화장품 소재는 flavonoid계열의 화합물과 ellagic acid등이 있으며 이들은 tyrosinase 저해 활성과 항산화 활성등 종합적으로 미백활성을 나타내는 것으로 알려져 있음.
- 위와 같이 기능성 미백 화장품 천연물 이용 원료는 현재 미생물 유래의 물질과 약용식물유래의 물질로 크게 두 분야로 나뉘고 있으나 앞으로 성장할 시장에 비해 원

료의 다양성이 적어 새로운 원료개발이 시급한 현황으로 여겨짐.

- 천연물 소재의 기능성 미백 화장품원료의 공급을 다양화하고자 본 연구에서는 해양으로 초점을 맞추어 세계 5대 갯벌로 알려진 서해안 연안의 갯벌을 이용한 기능성 미백 화장품의 원료를 증명하고자 함.
- 충남 보령에서만 머드관련제품은 2005년말 까지 106억원의 매출을 보였으며, 서해안 갯벌과 관련된 머드 축제 및 박람회 등으로 인하여 외국 바이어들의 큰 호응을 얻고 있는 실정으로 머드 팩이 가지는 과학적인 효과가 인정된 제품이 상용화될 경우 수출 증대 효과 및 관련 문화상품의 경제 파급효과가 기대됨.

제 2 절 연구 수행면의 기술개발 현황

- 고기능성제품들이 수입되어 이러한 제품을 선호하는 경향이 높아짐에 따라 최근 화장품연구개발은 다기능, 고기능을 추구하면서 새로운 천연원료의 사용과 하이테크놀로지의 응용 등 새로운 영역의 연구개발이 가속화 되고 있음.
- 소재의 개발이 더욱 활발하여 고기능성제품개발을 위한 우수한 기능성 원인의 탐색과 개발 및 이들의 화장품에 적용하기위한 효능, 효과의 과학적 검증, 피부안전성 확보에 대한 연구가 매우진전을 보임.
- 우리나라 화장품 기술수준을 신제품개발능력, 제품제조기술, 디자인 포장기술 등으로 구분하여 선진국과 비교해보면 선진국에 비해 대체적으로 약간 미흡한 것으로 분석되고 있음.
- 국내 화장품 산업은 정밀화학 제품 중 의약산업 다음으로 큰시장을 형성하며 국가산업을 지탱하고 있고 그 중에서도 특히 기능성 화장품 시장은 매년 8% 이상의 높은 증가율을 보이며 성장하고 있음에도 불구하고 화장품 원료의 90% 이상을 해외수입에 의존하고 있고 그 수입 증가율이 점점 가속화 되고있음.

- 기능성화장품 제형에 대한 연구 및 사업화는 활발히 이루어지고 있으나 기능성 생리활성을 주는 원료는 대부분 외국 업체에 의존하여 그에 대한 평가 역시 외국에 의존하고 있는 경우가 대부분으로 기술의 종속도가 심한 편
- 이는 국제적으로 경제력을 가질수 있는 신소재를 확보하지 못한다 그 원인이 있음.
- 본 과제의 연구로 인해 국내 시장 뿐 아니라 세계시장에서 국제 경쟁력을 가진 기능성 미백 화장품 분야의 원료를 개발하고, 그로 인해 수출증대의 효과도 기대됨.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발수행 내용

1. 머드 채취

가. 장소

충청남도 보령시에 위치한 방파제 갯벌에서 채취하였음. 이 지역은 현재 보령시에서 제품화하고 있는 갯벌 흙(mud)제품의 원료 채취 구역으로 사람의 출입이 제한되고 있어 갯벌 흙 보존이 잘 되어있는 지역임.

나. 깊이

지상에서 150cm 내려간 지점에서 채취. 이는 지상에서 가까운 곳의 흙은 갯벌 흙 중 피부유용물질이 적게 들어있고 황갈색의 색을 띄며 상용화 되어있는 제품의 원료채취가 150cm지점에서 이루어짐을 착안하여 회백색의 머드를 채취하였음.

2. 갯벌 흙 내의 피부유용물질의 분리

가. Humic acid의 분리 및 분석

Mud 시료는 건조 후 분쇄과정을 거쳐 humic acid 분리 과정에 사용하였음. 이 과정은 humic acid, fulvic acid 그리고 humin가 용액의 pH에 의해 다르게 가지는 용해성에 의해 진행되어짐. 우선 머드 내에 있는 Lipid 성분을 분리하기 위해 mud 시료 20 g을 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}(3:1, \text{v}/\text{v})$ 혼합 용매에 넣어 overnight하고 0.1 N의 HCl을 이용하여 세척하게 된 후 humin 성분과 염기성 용액에 용해되는 humic acid, fulvic acid의 분리를 위해 0.1N의 NaOH를 1L 가하고 N_2 를 가한 상태 overnight반응시킴. 이 과정에서 염기성 용액에 용해되는 humic acid, fulvic acid와 그렇지 않은 humic물질로 나뉘게 되고 상등액과 침전물을 분리한 후 상등액을 0.2 μm filter를 이용하여 filtration 수행하였음. 이 과

정은 상등액에 부유되어있는 mud의 작은 입자들을 걸러내는 과정으로 추가되었음. 분리한 상등액에 6 N HCl을 미량가하여 pH 1지점으로 조정후 overnight하게 되면 낮은 pH에서 용해되지 않는 humic acid가 바닥에 가라앉게 됨. 바닥에 가라앉은 humic acid부분을 centrifuge를 이용하여 분리 후 건조 하여 분말 상태의 humic acid를 얻게됨.

나. H₂O 및 MeOH를 이용한 추출 및 농축

채취한 갯벌 흙을 건조기를 이용해 완전히 건조 시킨 후 파쇄 과정을 거쳐 powder상태의 sample을 준비함. 준비된 sample powder를 1 g/3 ml의 비율로 H₂O와 혼합한 후 overnight하여 extraction과정을 거침. H₂O에 녹아나온 물질을 미세 mud입자와 분리하기 위해 filtration과정을 거친 후 얻어진 상등액을 동결건조를 이용하여 물질을 분리하였음. 위와 동일한 방법에 대하여 MeOH를 이용한 추출 및 농축작업도 수행하였음.

다. H₂O를 이용한 crude extract내의 유기물질제거.

H₂O를 이용한 갯벌 흙 내의 물질을 추출하고 농축한 후 어떤 성분에 의한 영향인지 알아보기 위하여 550℃의 muffle furnace를 sample내의 유기물질을 제거함. 550℃의 muffle furnace에 sample을 넣고 1시간 보관해두면 유기물을 구성하고 있는 원소들은 모두 연소되어 없어지는 원리를 이용하였음. 시료를 담은 후 1시간 보관을 한 후 desiccate에서 1시간 건조 보관함.

3. 세포주 및 세포배양

가. B16F10 (Mouse melanoma cell line)

추출한 물질이 직접적으로 melanin 생성에 영향을 주는지 알아보기 위하여 멜라닌 생성 억제효과 실험을 수행하기 위해 B16F10 (Mouse melanoma cell line)을 이용하였으며 DMEM에 10 % fetal bovine serum(v/v), 1% penicillin-streptomycin(v/v) 배지를 이용. 세포 배양 조건은 5 % CO₂, 37 °C에서 배양함.

나. HaCaT (Human Keratinocyte cell line)

melanosome transfer 에 영향을 주어 간접적인 미백에 효과를 주는 PGE₂를 측정하기 위하여 HaCaT (Human Keratinocyte cell line) 세포를 사용하였고, RPMI1640에 10 % fetal bovine serum(v/v), 1 % penicillin-streptomycin(v/v) 배지를 이용하였음. 세포 배양 조건은 5 % CO₂, 37 °C에서 배양함.

4. 세포내 생리활성

가. 멜라닌 합성저해효과 (Melanin assay)

B16F10 melanoma cell을 8×10^4 의 농도로 6-well plate에 분주하여 24시간 동안 배양. 배양액을 제거 후 H₂O를 이용한 갯벌 흙 crude 추출물을 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm의 농도로 배지에 넣어 5 % CO₂, 37 °C의 조건으로 48시간 배양함. 이후 배양액을 제거, PBS로 2회 세척 후 trypsin-EDTA로 처리하여 세포 pellet을 회수. 회수한 pellet은 1500 rpm에서 5분간 원심분리를 한 후 상등액을 제거함. 남은 pellet에 10 % DMSO가 함유된 NaOH를 200 μ l넣은 후 80 °C 항온조에서 1시간 반응을 시켜 세포내의 멜라닌을 얻음. 이후 200 μ l를 96-well plate에 옮기고 ELISA reader로 405 nm파장에서 흡광도를 측정하여 멜라닌 양을 측정함. 이때 positive control로 미백작용이 있는 물질로 알려진 Arbutin 200 ppm을 이용하였음.

나. PGE₂에 대한 억제 효과 (PGE₂ assay)

HaCaT 세포를 3.0×10^5 cell/ well의 농도로 6-well plate에 분주하여 24시간 배양한 후 PBS로 2회 세척하였음. 세척후 PBS를 넣어준 후 UVB를 30 mJ/ cm²의 농도로 쬐여 준 후 H₂O를 이용한 갯벌 흙 crude 추출물 100 ppm 200 ppm의 농도로 1 %의 FBS의 배지에 넣어 24시간 배양함. 이때 positive control로 PGE₂의 저

해제로 알려진 Indomethacine을 사용하였음. PGE₂의 발현양은 배양한 상등액을 이용하여 competitive binding technique의 원리를 이용하여 goat anti-mouse polyclonal Ab가 코팅되어있는 96-well plate에 세포 배양배지 100 μ l와 PGE₂ conjugate, PGE₂ Ab용액을 각각 50 μ l씩 넣어준 후 2시간동안 shaking하며 실온에서 반응. 반응 후 각 well을 washing buffer를 이용하여 3회 세척 후 substrate solution을 200 μ l씩 넣어준 후 30분간 반응하고 반응 중지를 위하여 2 N sulfuric acid를 50 μ l씩 넣어 줌. ELISA reader를 이용하여 450 nm파장에서 흡광도를 측정함.

5. 세포 독성 평가 (MTT assay)

분석법은 노란색의 수용성 기질인 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)를 진청색의 비수용성인 formazan 물질로 변화시키는 살아있는 세포의 mitochondria dehydrogenase의 능력을 이용한 방법임. 생성된 formazan의 양은 살아있는 세포 수에 비례함.

HaCaT 세포와 B16F10 세포를 96-well plate에 5×10^3 cell/ well의 농도로 분주하고 24시간 배양. 배양액을 제거 후 H₂O를 이용한 갯벌 흙 crude 추출물 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm의 (B16F10은 100 ppm, 200 ppm) 농도로 배지에 넣어 48 시간 배양함. 47시간후 배양액을 제거, MTT시약을 첨가하고 4시간동안 37 $^{\circ}$ C 인큐베이터에서 반응 시킨 후 MTT시약을 제거. 100 μ l DMSO를 첨가한 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm파장에서 흡광도를 측정함.

6. 보습력 (Water retention capacity test)

밀폐된 공간에 NaOH 포화용액을 넣었을 시에 습도가 75 ~ 76.5 %로 일정하게 유지되는 성질을 이용. 일정 무게의 sample이 가지는 water retention capacity를 시간별로 측정하여 단위 무게 당 가지는 능력을 백분율로 정리하였음. 우선 NaOH 포화용액 500 ml을 제조하여 밀폐된 공간안에 넣어두어 일정 습도를 유지 한후 갯벌 흙 내에서 분리한 humic acid, fulvic acid, humin과 기존에 보습력이 있다고 알려져 화장품으로 생산되어지고 있는 황토를 비교 측정하였음.

제 2 절 연구개발수행 결과

1. 갯벌 흙에서 분리해 낸 humic acid와 H₂O와 MeOH 이용한 crude extract물질.

갯벌에서 분리해낸 humic acid의 수율은 1 g당 0.05 %인 0.5 mg으로 나타났고 H₂O를 이용한 crude extract물질의 수율은 1 g당 0.06 %인 0.6 mg이고, MeOH를 이용한 crude extract물질의 수율은 1 g당 0.12 %인 1.2 mg임을 확인함.

H₂O를 이용한 crude extract물질내의 유기물을 제거하기 위한 실험을 수행한 결과 단위 mass당 22.92 %의 비율로 유기물이 함유되어 있음을 확인함.

2. 갯벌 흙내의 humic acid분리, 보습력 확인

우선 시중에 보습력 기능 함유의 화장품 원료인 황토(yellow ocher of Korea)와 갯벌 흙을 건조 후 파쇄한 sample을 대상으로 water retention capacity를 시간별로 기록, 비교 확인해 보았음. 비교 대상은 가공하지 않은 황토 원료와 324 mesh로 거르는 가공과정을 거쳐 제품화 되어있는 powder상태의 황토를 비교함. 비교 결과는 fig. 1에 나타나 있음.

Table 1. 는 fig. 1 의 그래프 결과를 단위 무게당의 water retention capacity를 계산하여 얻은 것임. 첫 번째 실험 수행 결과 갯벌 흙 sample이 가지는 water retention capacity는 시중에서 보습력을 함유하였다고 알려지고 판매되는 화장품의 원료인 황토와 거의 같은 결과 값을 얻게 되었음.

다음으로 갯벌 흙 내에 어떠한 성분이 보습력을 가졌는지 알아보기 위하여 물질 분리를 수행하였음. 본 연구 초반에 이러한 보습력을 가지는 물질이 갯벌 흙 내에 있는 유기물형태의 humic acid라고 여기어 분리하였음. 그리고 함께 분리되어지는 fulvic acid, humin과 가공된 황토 powder를 비교 실험해 보았음. 황토내에 humic acid가 있을 것으로 예상되어 비교 실험을 하려 하였으나 풍화토로써 분리되지 않아 황토 자체를 가지고 비교 실험을 수행하였음. 결과는 fig.2 과 table. 2에 나타내었음.

분리 후 각각의 물질에 대하여 water retention capacity를 측정된 결과 갯벌 흙내의 물

질 중 humic acid가 가장 좋은 보습능력을 가졌다는 것을 확인함. 또한 다른 형태의 유기물인 fulvic acid 또한 기존에 알려진 화장품 원료인 황토보다 좋은 water retention capacity를 가짐을 알수 있었음. 결론적으로 갯벌 흙 내의 humic acid와 fulvic acid등의 유기물질은 water retention capacity를 가지고 있고 이는 보습 능력을 가졌다고 기존에 알려지고 제품화 되어있는 화장품 원료인 황토와 비교해 보았을 때 단위 무게 당 많게는 13.5 %까지 더 높은 water retention capacity를 지녔음을 확인함.

3. 갯벌 흙 추출물의 멜라닌 생성 억제 효과 검증

H₂O를 이용한 crude extract물질에 대하여 mouse melanoma cell line인 B16F10을 이용하여 melanin inhibition에 대하여 실험을 수행하였음. sample은 50, 100, 200 ppm의 농도로 각각 처리하였고 결과는 fig. 3 에 나타내었음. 또한 MeOH를 이용한 crude extract물질에 대하여 mouse melanoma cell line인 B16F10을 이용하여 melanin inhibition에 대하여 실험을 수행. sample은 50 ppm, 100 ppm의 농도로 각각 처리하였고 결과는 fig. 3 에 나타내었음.

H₂O를 이용한 crude extract물질을 각 농도별로 처리한 결과 미백에 효과가 있어 positive control로 선정한 Arbutin 200 ppm이 24 %의 저해율을 보인데 반해 control인 PBS만을 처리한 것과 거의 유사한 결과로 50, 100, 200 ppm의 농도가 각각 7 %, 8 %, 8 %의 저해율을 보임으로서 melanin생성에 대한 직접적인 저해작용이 없는 것으로 판단됨. MeOH를 이용한 crude extract물질에 대한 결과 또한 Arbutine 200 ppm이 20 %의 저해율을 보인데 비하여 200 ppm, 100 ppm이 각각 5 %와 3 %의 저해율을 보여 직접적인 melanogenesis의 저해를 하지 않음을 확인. 결과는 fig4 에 나타내었음.

다음 결과를 뒷바탕으로 H₂O와 MeOH 이용한 crude extract물질은 melanocyte내의 melanogenesis인자를 억제하여 melanin생성을 제어하는 기능은 없는 것으로 유추됨. 그리하여 시중에서 머드팩이 물을 이용하여 혼합한뒤에 얼굴에 도포함을 착안하여 H₂O crude extract물질에 초점을 두어 melanocyte내부의 melanogenesis영향 인자가 아닌 외부 signal을 조절하여 melanin생성에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 PGE₂ assay를 수행함.

4. 갯벌 흙 추출물이 melanosome 이동에 영향을 주는 PGE2 억제 효과 확인

앞서 수행한 실험에서 H₂O를 이용한 갯벌 흙의 crude extract물질이 직접적으로 melanin inhibition을 하지 않는 것으로 확인되어 외부 자극에 대하여 영향을 미치는지 알아보기 위하여 본 실험을 수행하였음. UV는 melanogenesis가 일어날 수 있게 하는 하나의 영향인자이고, 이로 인하여 PGE₂의 생성이 증가하게 됨. 조사된 논문에 의하면 PGE₂는 melanocyte의 dendrite를 조절하는 것으로 알려짐. 즉 UVB에 의해 keratinocyte에서 방출되는 PGE₂를 줄이는 물질은 melanocyte의 dendrite를 억제시켜 melanin transfer를 감소시킬 수 있음. 그리하여 본 실험은 human keratinocyte에 UVB(312 nm)를 처리하여 방출된 PGE₂의 양과 H₂O를 이용한 갯벌 흙의 crude extract물질이 억제하는 양을 알아보았음.

실험 결과는 fig. 4에 나타내었음. fig. 4의 그래프에서 보는 바와 같이 indomethacin 1 μ M는 UVB만을 쬐어준 대조군에 비하여 66.1 %만큼 PGE₂양이 줄어들음을 보임. 그에 비하여 H₂O를 이용한 갯벌 흙의 crude extract물질은 100 ppm에서 20.9 %의 저해율을 200ppm에서 55 %의 저해율을 보임으로써 농도의존적인 저해율을 보임.

실험 결과를 해석해보면 sample처리군은 positive control로 쓴 indomethacin 1 μ M과 비슷한 정도의 억제효과를 보이고 농도 의존적인 경향을 보이면서 높은 농도에서는 더 많은 저해율을 보임. 이는 H₂O를 이용한 갯벌 흙의 crude extract물질이 melanocyte내의 mechanism에 영향을 미침으로써 melanogenesis를 억제하는 인자는 갖지 않았으나 생성된 melanin transfer에 영향을 미치는 인자를 억제함으로써 depigment에 대하여 영향력이 있음을 보여줌. 따라서 본 실험에서 추출해낸 갯벌 흙 내의 물질은 melanin transfer를 저해하는 작용이 있음으로 결론을 유도할 수 있음.

4. 갯벌 흙 추출물이 UVB에 의한 염증 완화에 미치는 영향 확인

Fig. 4의 data는 추출 물질이 depigment에 못지 않게 염증완화작용을 가진 물질임을 보여줌. fig. 4의 그래프에서 보는 바와 같이 indomethacin 1 μ M는 UVB만을 쬐어준 대조군에 비하여 66.1 %만큼 PGE₂양이 줄어들음을 보임. 그에 비하여 H₂O를 이용한 갯벌 흙의 crude extract물질은 100 ppm에서 20.9 %의 저해율을 200 ppm에서 55 %의 저해율을 보임으로써 농도의존적인 저해율을 보임. PGE₂ (prostaglandinE₂)는 통

중 수용체의 발현을 촉진하여 통증을 뇌로 전달하며 염증 반응의 매개체임. 결과적으로 keratinocyte에서 방출되는 PGE₂양을 줄일 수 있다는 것은 원하는 target인 depigment작용 뿐만 아니라 염증완화 물질이라 말할 수 있음. 이는 현재 기능성 화장품 원료 분야에서 한가지 기능만이 아닌 다기능의 원료를 지향하는 트렌드에 알맞은 물질로써, 추출해낸 갯벌 흙 내의 물질이 가지게 되는 장점을 뒷받침 할 수 있는 자료가 됨. 본 연구에서 수행한 실험에 의해 갯벌 흙을 H₂O를 이용하여 crude extract한 물질은 피부에 있어서 depigment의 작용과 UVB에 의해 일어난 염증완화 작용에 대하여 뛰어난 효과가 있음을 나타내었음.

5. 갯벌 흙 추출물내의 무기물질의 영향.

H₂O를 이용한 갯벌 흙의 crude extract물질로 인하여 melanocyte dendrite 조절인자이고 통증 수용체의 발현을 촉진하여 통증을 뇌로 전달하며 염증 반응의 매개체인 PGE₂가 줄어들음을 확인한 후, sample내의 어떤 인자에 의한 영향인지 확인하기 위하여 sample을 유기물, 무기물이 함께 포함된 crude한 sample과 유기물을 제거하고 무기물만이 포함된 sample로 나누어 처리함. 우선 유기물과 무기물이 모두 포함된 sample과 유기물을 제거하여 무기물만이 포함된 sample을 100 ppm과 200 ppm을 처리한 결과 무기물만 있는 sample이 같은 농도의 유기물, 무기물 함유 sample에 비하여 50 %정도의 PGE₂억제 효과를 보임. 결과는 fig. 6에 나타냄. 하지만 cell viability 결과에서 농도가 높을수록 cell viability가 감소함을 확인한 후 좀 더 낮은 농도를 선택하여 실험을 다시 수행함. 다음 실험 수행시 50 ppm과 25 ppm의 농도로 sample을 처리하였고 결과 농도 의존적인 PGE₂억제 효과를 볼 수 있었음. 결과는 fig.7에 나타냄. 앞서 선택한 농도가 고농도임으로 인해 유기물, 무기물 함유의 sample내 유기물양이 상대적으로 많은 것으로 인하여 PGE₂억제 효과가 더 두드러지게 나타난 것으로 유추됨.

6. 갯벌 흙 추출물의 세포독성 확인.

본 실험은 얻어낸 갯벌 내의 추출물이 피부세포에 대하여 얼마만큼의 독성이 있는지 MIT assay를 통하여 cell viability를 측정하였음. 피부 세포는 앞서 수행한 melanin assay와 PGE₂ assay에 사용된 B16F10과 HaCaT cell line에 대하여 실험하였음. 실험

결과는 fig. 8, fig. 9, fig. 10에 나타내었음.

실험 수행결과 기존에 알려진 물질들인 Arbutine과 Indomethacine에 비교하여 cell viability가 줄어들지 않는 경향을 보임. 즉 H₂O와 MeOH 이용한 갯벌 흙 crude extract물질이 피부 세포에 대하여 독성이 거의 없음을 보여주는 결과임. 화장품 원료 산업에 있어서 각 원료가 가지는 기능이 중요하지만 이에 못지 않게 중요하게 여겨지는 인자는 얼마만큼 저 자극성, 저 독성의 물질인가를 나타내는 안정성임. 본 실험에서 추출해낸 갯벌 내의 물질은 기존에 알려진 기능성 물질에 비교 하였을 때 기능 못지 않게 저 독성을 가지는 안정적인 물질로 화장품 원료에 적용하였을 때 큰 효과를 얻을 수 있을 것으로 기대됨.

또한 유기물, 무기물이 함유된 sample과 무기물만 함유된 sample에 대해서도 cell viability를 측정하였음. 실험 결과 유기물, 무기물이 함유된 sample과 무기물만 함유된 sample의 모든 농도에서 control인 PBS와 유사한 cell viability를 보여 sample내에 독성물질이 없음을 보임. 결과는 fig. 11에 나타냄. 무기물 sample에서는 농도가 높아질수록 cell viability가 낮아지는 양상을 보이는 것으로 보아 화장품 원료로 쓰이게 되었을 경우 PGE₂의 양을 줄여주면서 가장 세포독성이 없는 농도를 찾는 것이 중요하다고 여겨짐.

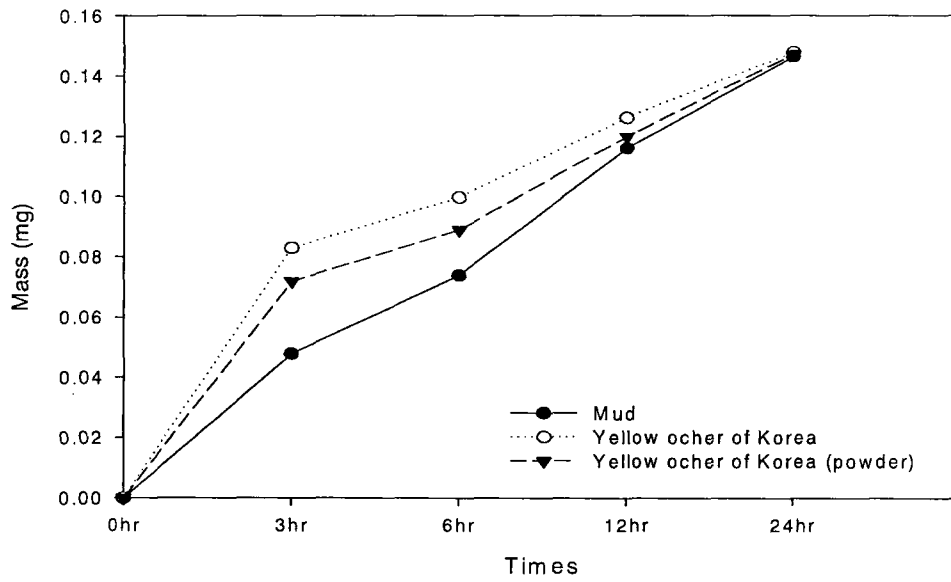


Fig. 1 Time course water uptake of mud components

Table.1 . Percent of water retention capacity

Sample name	water retention capacity (% , mass)
Mud	1.466
yellow ocher of Korea (powder)	1.479
yellow ocher of Korea	1.473

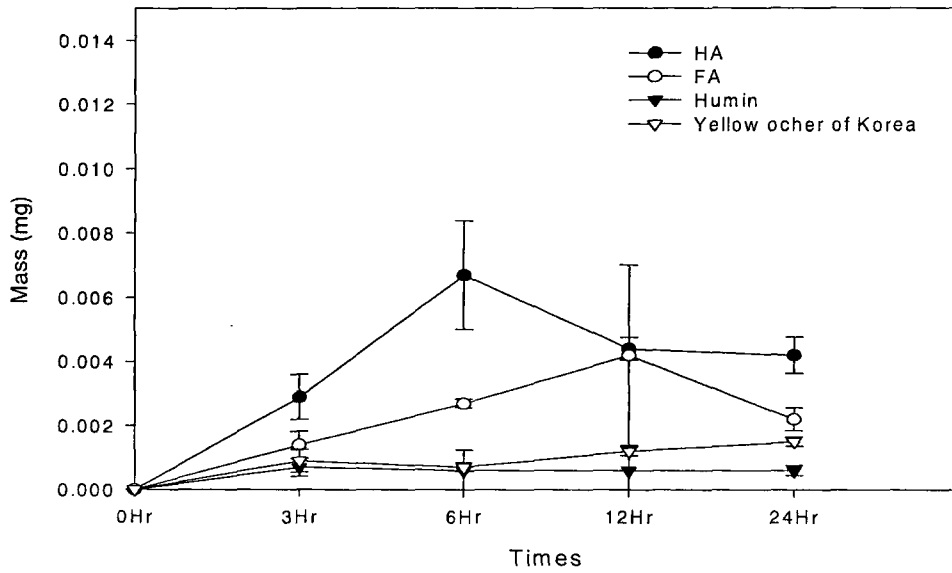


Fig. 2 Time course retention of water retention by mud components

Table. 2 . Water retention by mud component

Sample name	water retention capacity (% , mass)
Humic acid (HA)	21
Fulvic acid (FA)	10.75
Humin	3
yellow ocher of Korea	7.5

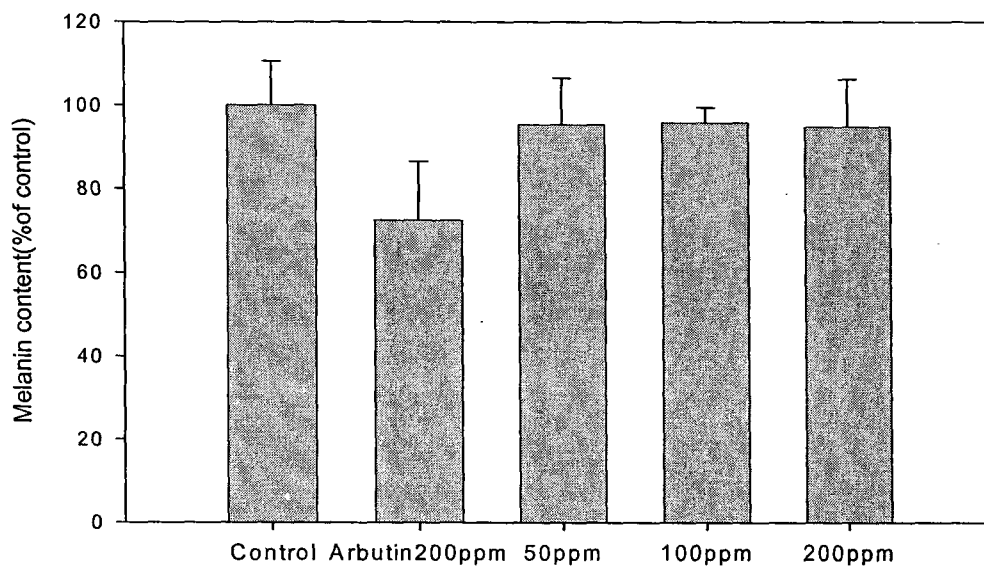


Fig. 3 Inhibitory effects of H₂O crude extract on the melanogenesis of cultured B16F10 melanoma cells.

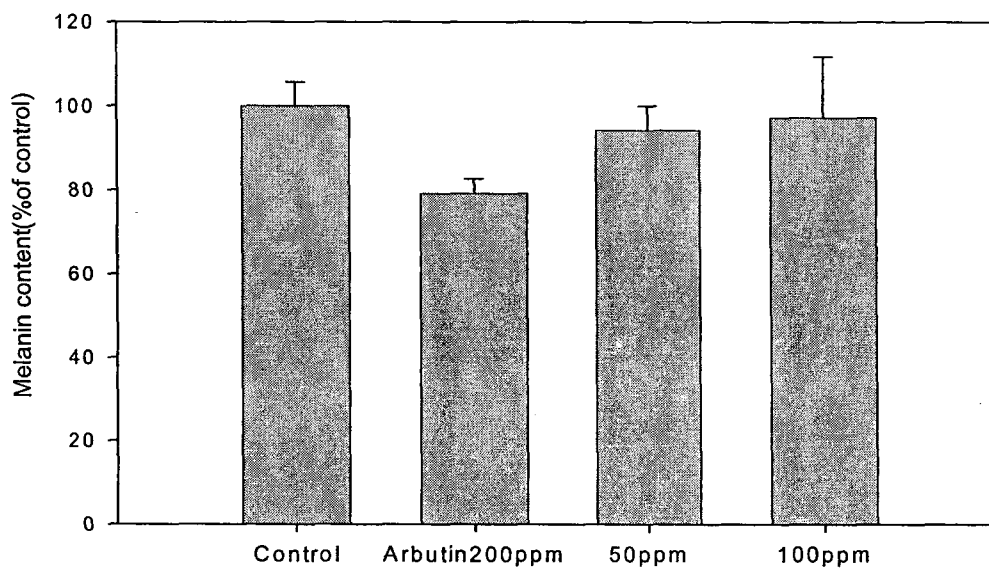


Fig. 4 Inhibitory effects of MeOH crude extract on the melanogenesis of cultured B16F10 melanoma cells.

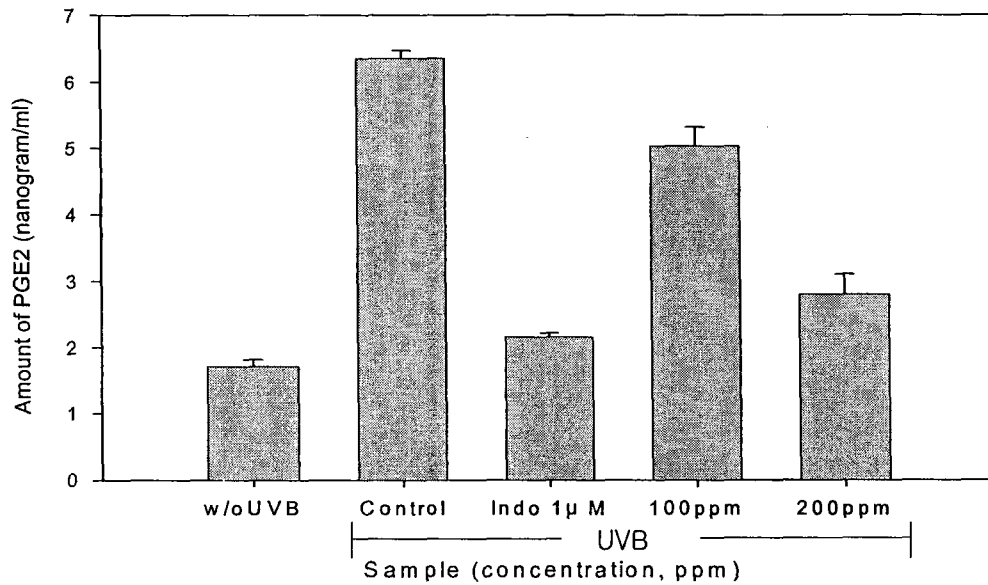


Fig. 5 Inhibitory effects of H₂O crude extract on the PGE₂ of cultured HaCaT cells.

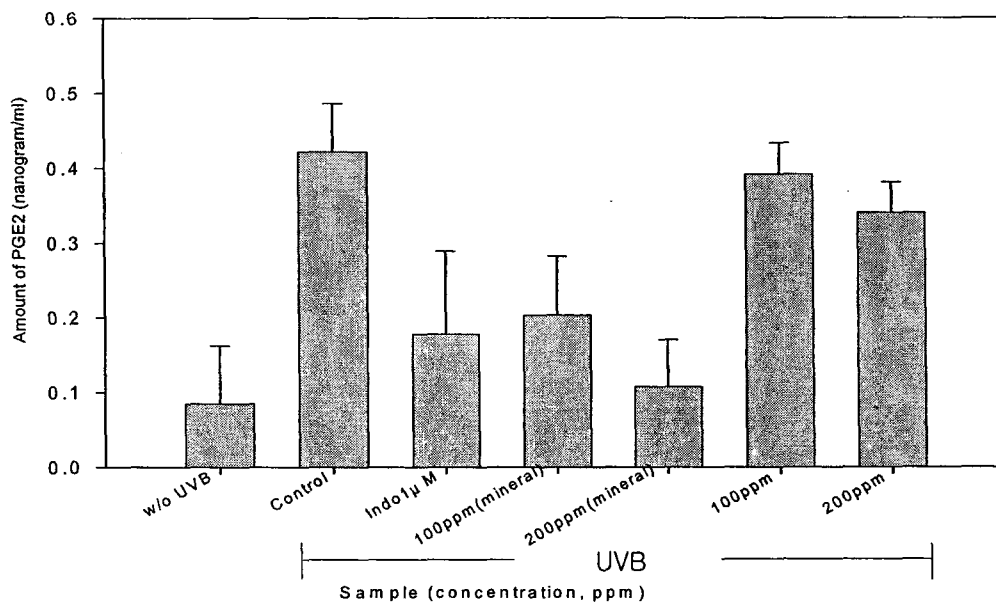


Fig. 6 Inhibitory effects of H₂O crude extract on the PGE₂ of cultured HaCaT cells. (compare with mineral and inclusion of organic material: high concentration)

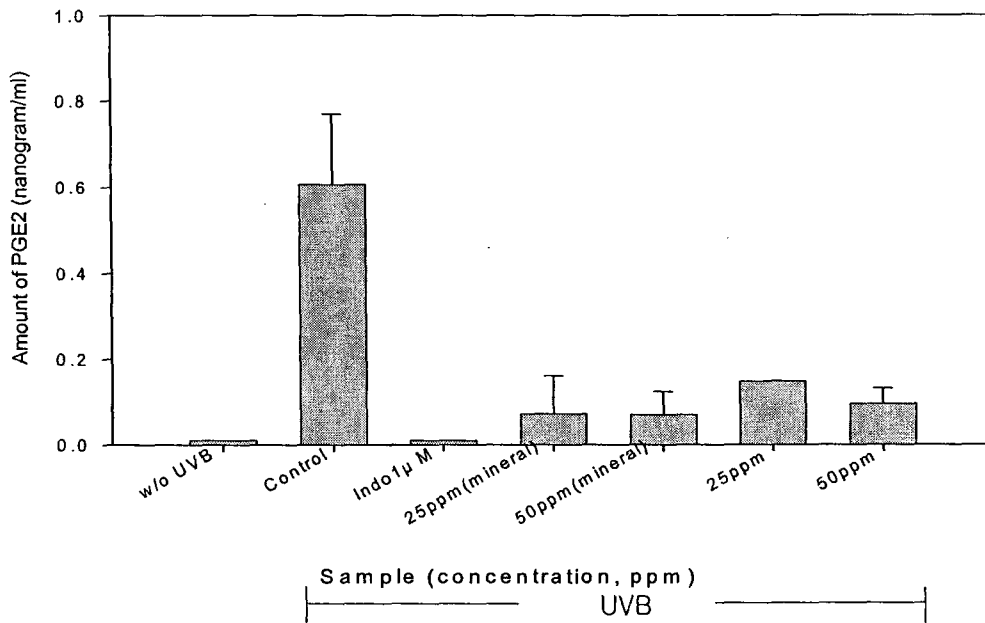


Fig. 7 Inhibitory effects of H₂O crude extract on the PGE₂ of cultured HaCaT cells. (compare with mineral and inclusion of organic material : Low concentration)

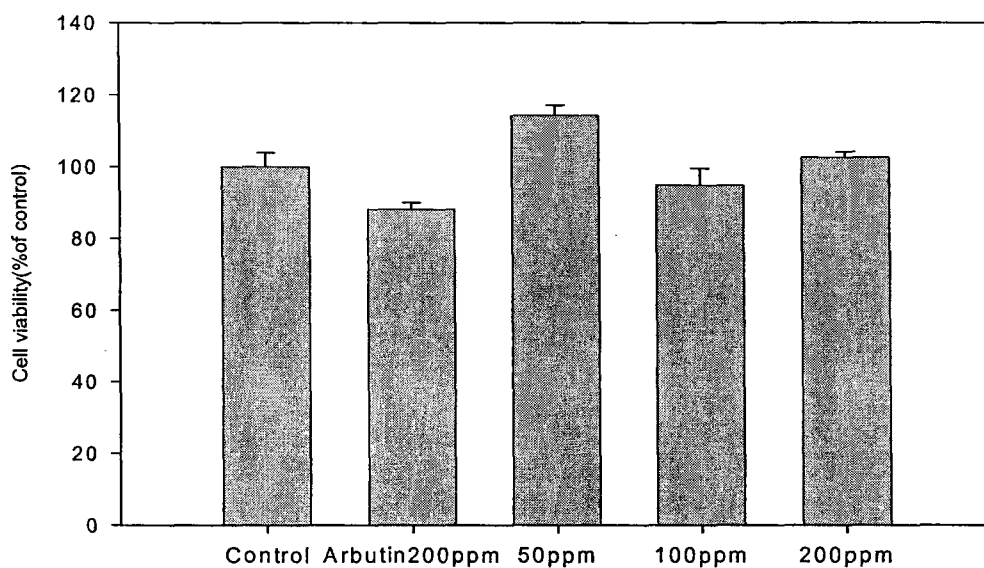


Fig. 8 Cell viabilites of the B16F10 melanoma cells H₂O treated with the crude extract of mud.

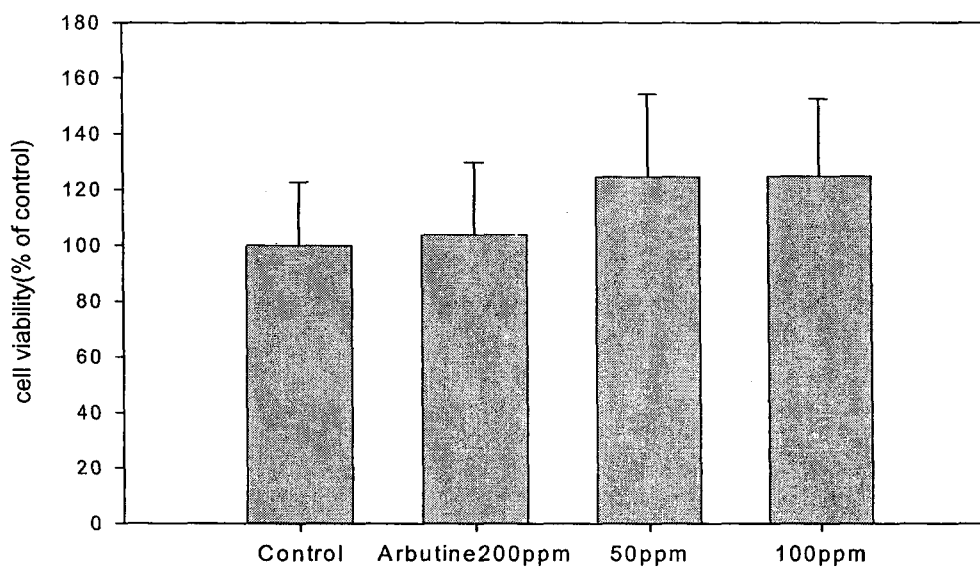


Fig. 9 Cell viabilites of the B16F10 melanoma cells MeOH treated with the crude extract of mud.

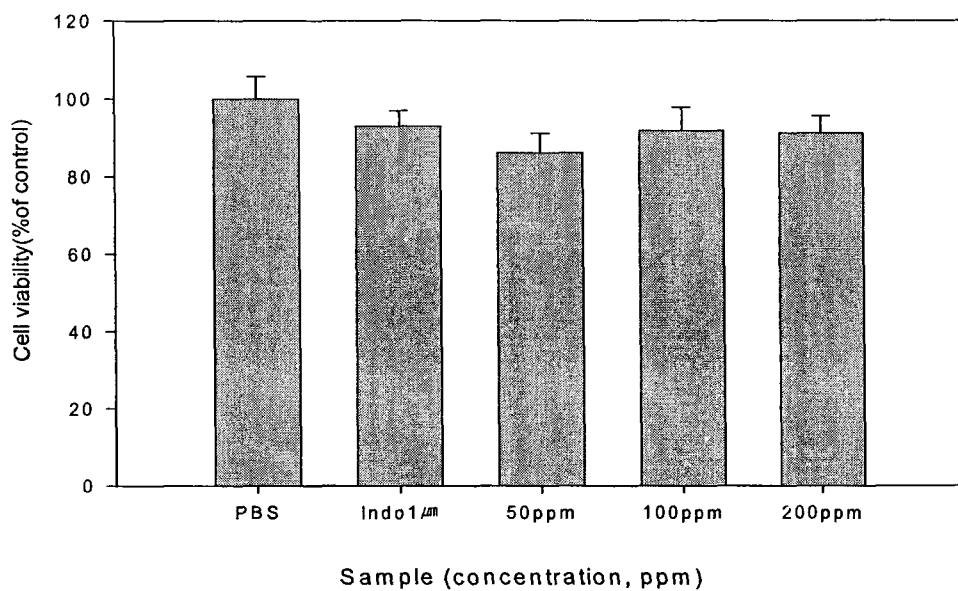


Fig. 10 Cell viabilites of the HaCaT cells treated with H₂O the crude extract of mud.

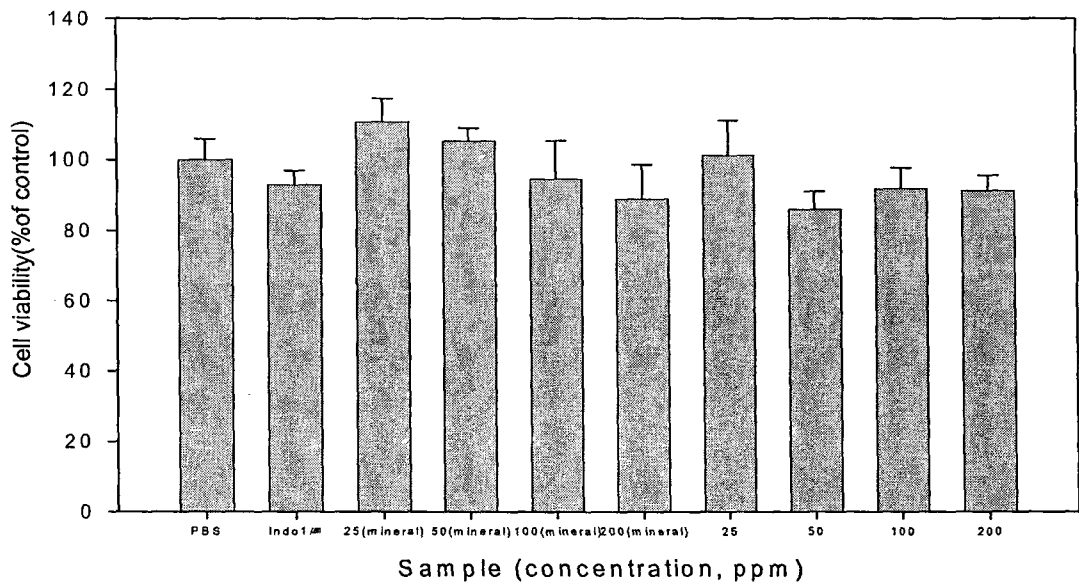


Fig. 11 Cell viabilites of the HaCaT cells treated with H₂O the crude extract of mud. (compare with mineral and inclusion of organic material)

제 4 장 연구개발 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 최종 목표

- 기능을 요구하는 화장품을 추구하는 시대에 그 중 가장 시장성이 큰 미백 기능성 화장품의 주요성분으로 천연물질에 대한 수요자의 기대효과가 크므로 기존에 알려진 미생물과 약용 식물유래의 원료가 아닌 원료의 다양성의 방향성을 제시하고자 함.
- 갯벌 흙이 가지는 피부 생리활성 물질을 분리하고 피부세포를 이용한 연구를 통하여 피부 기작에 미치는 영향과 B16F10과 HaCaT cell line을 이용한 독성실험을 통해 안정성을 과학적으로 밝혀냄.
- 기존에 알려진 미백물질과의 비교를 통한 갯벌 흙이 가지는 효능을 과학적으로 규명.
- 최종적으로 모든 실험을 수행하여 갯벌 흙이 기능성 미백 화장품 분야에 있어서 과학적으로 검증된 새로운 원료로 제시될 수 있음을 규명.

제 2 절 연차별 연구개발목표 및 연구 개발 내용.

년도	연구개발목표	연구개발내용 및 성과
1차년도 (2007년)	<ul style="list-style-type: none"> · 원료의 다양성의 방향 제시 	<ul style="list-style-type: none"> · 원료의 다양성을 제시하고자 세계 5대 갯벌로 알려지고 자연의 최대 정화장이라 알려진 서해안의 갯벌 흙을 선정하였음
	<ul style="list-style-type: none"> · 갯벌 흙이 가지는 피부 생리활성 물질을 분리 	<ul style="list-style-type: none"> · 갯벌 흙 내에 유기물층에의 humic acid를 정제 과정을 통하여 분리.(0.05mg/g) · water를 이용한 갯벌 흙 내의 생리활성물질을 crude extract method를 이용하여 얻어냄.(0.06mg/g) · MeOH를 이용한 갯벌 흙 내의 생리활성물질을 crude extract method를 이용하여 얻어냄.(0.12mg/g)
	<ul style="list-style-type: none"> · 분리물질을 피부 세포를 이용한 연구를 통하여 피부 기작에 미치는 영향 연구 	<ul style="list-style-type: none"> · 갯벌 흙 내에서 humic acid를 분리하여 water uptake test를 수행한 결과 기존에 알려진 보습력 함유 화장품의 원료인 황토보다 좋은 water retention capacity를 보임. · 갯벌 흙을 water를 통해 crude extract한 물질은 melanocyte의 dendrite를 조절하는 물질인 PGE₂의 발생을 감소 시켜 melanin transfer에 저해작용을 할것이라 예상됨. · PGE₂의 염증매개 인자로 이를 억제시킴은 미백과 동시에 염증완화작용이 추출물내에 있을 것이라 결론지을수 있음.

<ul style="list-style-type: none"> · 분리 물질을 B16F10과 HaCaT cell line을 이용한 cell viability측정을 통해 안정성 확인 	<ul style="list-style-type: none"> · 피부 세포인 B16F10과 HaCaT cell line을 이용하여 water extract한 물질에 대해 MTT assay를 통하여 실험을 수행한 결과 cell viability에 대하여 영향을 주지 않음을 확인. · 즉, 갯벌 흙을 이용한 추출물질이 가지는 독성물질은 없는 것으로 판단.
<ul style="list-style-type: none"> · 기존에 알려진 물질들과의 비교를 통한 비교 검증 	<ul style="list-style-type: none"> · 시중에서 보습력함유 물질이라 알려지고 화장품의 원료로도 사용중인 황토 원료를 사용하여 water retention capacity를 비교 측정된 결과 갯벌 흙 내의 humic acid인자가 좋은 water retention capacity를 지님을 검증. · 직접적인 melanogenesis저해가 아닌 외부 signaling의 저해를 알아보기 위하여 기존에 PGE₂를 저해하는 물질인 Indomethacin을 사용하여 비교한 결과 갯벌 흙을 water extract한 물질이 뛰어난 저해 효과를 가짐을 증명.
<ul style="list-style-type: none"> · 갯벌 흙을 기능성 미백 화장품 분야 원료 제시 	<ul style="list-style-type: none"> · 갯벌 흙 내의 생리활성 물질을 분리하여 보습력측정과 PGE₂ assay를 수행한 결과, 갯벌 흙은 미백 뿐만아니라 보습력과 함께 염증 완화작용도 가지고 있는 뛰어난 화장품 원료임이 증명되어, 앞으로 많은 기능성 제품에 원료로써 이용될것으로 예상 됨.

제 3 절 계획 대비 완성도

번호	세부연구개발목표	연구개발내용 및 범위	달성도 (%)
1	·갯벌 흙내에 함유되어있는 유기물질의 형태인 humic acid의 분리	·갯벌 흙을 이용하여 humic acid를 분리 -1g당 0.5mg으로 0.05%인 수치를 얻음.	100%
2	·갯벌 흙내의 생리활성 물질을 용매 추출법을 통해 추출.	·갯벌 흙내의 생리활성 물질 추출, 농축. -water extract는 1g당 0.6mg으로 0.06% -MeOH extract는 1g당 1.2mg으로 0.12%	100%
3	·추출물 피부 pigmentation 메커니즘에 어떠한 영향을 미치는지 연구.	·갯벌 흙 생리활성을 추출 농축하여 피부세포에 적용, pigmentation에 주는 영향을 규명 - 멜라닌 합성저해효과 (Melanin assay) : melanogenesis에 대한 직접적인 영향을 실험한 결과 영향이 없음을 밝힘. - PGE2에 대한 억제 효과 (PGE2 assay) :melanocyte dendrite조절인자를 통한 간접적인 영향 실험을 수행한 결과 대조군에 비하여 66.1%만큼 PGE2양이 줄어들음	100%

번호	세부연구개발목표	연구개발내용 및 범위	달성도 (%)
4	<ul style="list-style-type: none"> 추출물이 pigmentation이외의 화장품원료로써 피부기작에 미치는 영향 연구. 	<ul style="list-style-type: none"> Mud내의 보습인자 규명. <ul style="list-style-type: none"> -HA의 보습력 검증 :비교물질로 황토와 같이 추출된 fulvic acid와 humin 선택. :황토보다 단위 무게 당 13.5%까지 더 높은 water retention capacity를 지녔음 염증완화 작용의 규명. <ul style="list-style-type: none"> -PGE2에 대한 억제 효과 (PGE2 assay) :통증 수용체의 발현을 촉진하여 통증을 뇌로 전달하며 염증 반응의 매개체임인 PGE2에 대한 추출물의 영향에 대한 실험을 수행한 결과 대조군에 비하여 66.1%만큼 PGE2양이 줄어듦 	100%
5	<ul style="list-style-type: none"> 추출물질의 안정성 연구 	<ul style="list-style-type: none"> 피부세포를 이용한 안전성 규명 <ul style="list-style-type: none"> -B16F10 cell line에 대한 cell viability assay 수행. -HaCaT cell line에 대한 cell viability assay 수행. 	100%
6	<ul style="list-style-type: none"> 새로운 화장품원료의 제시 	<ul style="list-style-type: none"> 세포를 이용한 실험 결과를 바탕으로 하여 기업의 기술이전. 	50%

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 학문적 활용

- 머드로부터 유효성분의 분리, 정제 기술 및 test 방법 확보
- 유효성분의 분리에 의한 머드관련 제품 생산 시 제품 품질관리 가능.
- 갯벌 흙내에 존재하는 물질들을 분리하여 이들이 피부세포에 어떠한 영향을 주는지를 과학적으로 분석하여 학술논문 투고에 활용.
- 분리된 유효성분을 이용한 새로운 기능성 제품 창출효과.
- 갯벌의 중요성을 담은 교육용 교재로 재편집하여 해양생리활성물질 교육에 활용.

제 2 절 경제적 활용.

- 갯벌 흙을 이용한 원료 생산과 그에 따른 부가적인 기능성 화장품의 생산.
- 피부세포를 이용한 과학적인 입증을 통한 안정성과 신뢰도의 증가
- 갯벌 흙을 이용한 원료가 천연물을 이용한 개념에 의거한 마케팅과 소비자의 인지도 증가.
- 관련 상품 (갯벌 흙 추출물을 이용한 관련 상품과 채집장소인 충청남도 보령시의 머드관련 문화상품, 축제)등의 경제적 파급효과 예상.
- 과학적 효능이 입증된 기능성 제품의 생산으로 인한 관련 업계의 성장 및 고용창출 효과.

- 수입에 의존하던 화장품 원료의 시장에 새로운 원료를 제시함으로써 원료의 수출과 국내 원료의 이용증가 효과.

제 6 장 참고문헌

1. Park HJ, Kim HJ, Kwon HJ, Lee JY, Cho BK, Lee WJ, Yang Y, Cho DH. (2006). UVB-induced interleukin-18 production is downregulated by tannic acids in human HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol*, 15, 589-595.
2. D. S. chang, S. J. Seo, C. K. Hong. (2002). The effect of aminotic membrane extract on the expression of iNOS mRNA and generation of NO in HaCaT cell by ultraviolet B irradiation. *Photodermatol Photoimmunol Photothmed*, 18, 280-286.
3. S. Mi. Ahn, H. Y. Yoon, B. G. Lee, K. C. Park, J. H. Chung, C. H. Moon ,S. H. Lee.(2002). Fructose-1,6-diphosphate attenuates prostaglandin E2 production and cyclo-oxygenase-2 expression in UVB-irradiated HaCaT keratinocytes. *British Journal of Pharmacology*,137, 497-503.
4. Sachiko Tanaka, Takashi Sato, Noriko Akimoto, Masamichi Yano, Akira Ito.(2004). Prevention of UVB-Induced photoinflammation and photoaging by a polymethoxy flavonoid, nobiletin, in human keratinocytes in vivo and in vitro. *Biochemical Pharmacology*,68,433-439.
5. Ortonne, T.-P.,(2002). Photoprotective properties of skin melanin, *Br. J. Dermatol.*, 146, 7-10.
6. Li Li a,b,, Wanglu Jia a, Ping'an Peng a, Guoying Sheng a, Jiamo Fu

- a, Weilin Huang (2006), Compositional and source characterization of base progressively extracted humic acids using pyrolytic gas chromatography mass spectrometry, *Applied Geochemistry*, 21, 1455-1468.
7. Glynis Scott., Alex Fricke, Anne Fender, Lindy McClelland, Stacey Jacobs.(2007). Prostaglandin E2 regulates melanocyte dendrite formation through activation of PKC ζ . *Experimental cell research*. 313, 3840-3850
 8. Won-Kyun Kim.(1992) Production and Application of Microbial Surfactant. Master. Thesis. University of Inha. Incheon. Korea
 9. Schnitzer, M. (1991) Soil organic matter The next 75 years. *Soil Sci.* 151, 4158.
 10. Geoffrey Davies. (1997) Isolation of humic acid from the terrestrial plant *Brugmansia sanguinea*
 11. Chang-Hoon Lee (2004)Chemical and spectroscopic characterization of peat moss and its different humic fractions.(Humin, Humic acid and fulvic acid),.Korean society of soil and groundwater environment. Vol. 9, No.4, p. 42~51
 12. Petra Boukamp, Rule T. Petrussevska, Dirk Breitzkreutz, Jiirgen Hornung, Alex Markham, and Norbert E. Fusenig (1988)Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell Line *The Journal of Cell Biology*, Volume 106, 761-771
 13. Sung Mok Beak ,Yong Soo Lee , Jung-Ae Kim,(2004)NADPH

oxidase and cyclooxygenase mediate the ultraviolet B-induced generation of reactive oxygen species and activation of nuclear factor- κ B in HaCaT human keratinocytes, *Biochimie* 86,425-429

14. Geoffrey Davies, Amjad Fataftah, Amal Radwan, Robert F. Raffauf, Elham A. Ghabbour, Susan A. Jansene, (1997) Isolation of humic acid from the terrestrial plant *Brugmansia sanguinea*, *The Science of the Total Environment* 201, 79-87
15. Fabrizio Adani, Giuliana Ricca, Fulvia Tambone, Pierluigi Genevini (2006) Isolation of the stable fraction (the core) of the humic acid, *Chemosphere* 65 (2006) 1300-1307
16. Jae-We Cho, Kun Park, Gi Ryang Kweon, Byeong-Churl Jang, Won-Ki Baek, Min-Ho Suh, Chang-Wook Kim, Kyu-Suk Lee and Seong-Il Suh, (2005) Curcumin inhibits the expression of COX-2 in UVB-irradiated human keratinocytes (HaCaT) by inhibiting activation of AP-1: p38 MAP kinase and JNK as potential upstream targets, *EXPERIMENTAL and MOLECULAR MEDICINE*, Vol. 37, No. 3, 186-192,

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제코드			
사업구분					
과제구분	세부	(주관,협동)	과제성격	개발	
총괄과제명	해양한국발전프로그램(KSGP) 연구개발사업				
주관기관	인하대학교		주관연구 책임자	인하대학교 총장	
과제명	서해 갯벌 흙에 함유된 피부유용물질의 규명 및 피부 개선제 개발				
연구기관	인하대학교		연구책임자	김은기	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2006.12.27 ~ 2007.12.26	42,435,000원	10,000,000원	52,435,000원
	2차년도				
	3차년도				
	4차년도				
	5차년도				
	계				
참여기업	(주)엠지인투바이오				
상대국		상대국연 구기관			

2. 평가일 : 2007년 12월 25일

3. 평가자(연구책임자)

소속	직위	성명
인하대학교 생명화학공학부 생물공학과	교수	김은기

4. 평가자(연구책임자) 확인

- 본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본자료가 전문위원회 및 사업조정관 평가시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
----	--

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

· 기존에 상품화되어 있지만 과학적 검증이 되지 않은 원료를 선택하여 피부세포를 이용하여 어떠한 기작이 있는지 알아보고, 그 결과를 토대로 기능성 미백 화장품 분야에 새로운 원료를 제시했다는 점.
· 제시한 머드원료는 기존의 미백 화장품이 tyrosinase의 저해에 target을 잡은 데 비하여 melanocyte외부의 작용기작까지 검토하였고 미백뿐만 아니라 보습력, 염증완화능력까지 보유

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

· 대부분의 기능성 미백화장품의 원료 시장이 약용식물에서 유래된 것에 비하여 본 연구에서 쓰인 갯벌 흙은 서해안에서 채집한 것으로 우리나라의 특이성이 있어 국외의 화장품원료시장에서 각광받을 것이라 예상되며, 이로 인한 경제적 파급효과가 예상된다.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

· 지금까지 소비자의 사용후기로만 전해졌던 mud원료제품의 과학적결과가 뒷받침되면서 상품의 신뢰도가 증가할 것이고 안정성과 다기능이 확인된 새로운 화장품 원료로 제시되어 갯벌 머드를 이용한 더 많은 기능성 화장품이 개발될 것이라 예상된다.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

· 기능성 화장품원료시장의 경향이 다기능인 원료를 원함에 따라 본 연구에서도 피부 세포를 이용한 미백에 대한 실험뿐만 아니라, 보습과 염증완화 또한 검증하여 목표하였던 미백분야의 피부개선제 및 원료에 대하여 보다 확대된 결과를 도출하게 되었음.

5. 공개발표된 연구개발성과

(논문, 산업재산권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

· 국내 학술대회와 국제 학술대회발표를 수행하였음.
· 연구 내용을 바탕으로 전문 학회지 논문 게재 준비 중. (SCI 1편)

II. 연구목표

번호	세부연구목표 (연구계획서상에 기술된 연구목표)	달성내용	달성 도 (%)
1	· 갯벌 흙내에 유기물 질 형태인 humic acid 의 분리	· humic acid를 갯벌 흙 1g당 0.5mg으로 0.05%인 수율로 분리하였음.	100%
2	· 갯벌 흙내의 생리활 성 물질을 용매 추출법 을 통해 추출.	· 갯벌 흙내의 생리활성 물질 추출, 농축. -water extract는 1g당 0.6mg으로 0.06% -MeOH extract는 1g당 1.2mg으로 0.12%	100%
3	· 추출물이 피부 pigmentation 메카니즘 에 어떠한 영향을 미치 는지 연구.	· 갯벌 흙 생리활성을 추출 농축하여 피부세포에 적용, pigmentation에 주는 영향을 규명 - 멜라닌 합성저해효과 (Melanin assay) : melanogenesis에 대한 직접적인 영향을 실험한 결과 영향이 없음을 밝힘. - PGE2에 대한 억제 효과 (PGE2 assay) :melanocyte dendrite조절인자를 통한 간접적인 영향 실험을 수행한 결과 대조군에 비하여 66.1%만큼 PGE2양이 줄어들	100%
4	· 추 출 물 이 pigmentation이외의 화 장품원료로서 피부기작 에 미치는 영향 연구.	· Mud내의 보습인자 규명. -HA의 보습력 검증 :비교물질로 황토와 같이 추출된 fulvic acid와 humin 선 택. :황토보다 단위 무게 당 13.5%까지 더 높은 water retention capacity를 지녔음 · 염증완화 작용의 규명. -PGE2에 대한 억제 효과 (PGE2 assay) :통증 수용체의 발현을 촉진하여 통증을 뇌로 전달하 며 염증 반응의 매개체임인 PGE2에 대한 추출물의 영향에 대한 실험을 수행한 결과 대조군에 비하여 66.1%만큼 PGE2양이 줄어들	100%
5	· 추출물질의 안전성 연구	· 피부세포를 이용한 안전성 규명 -B16F10 cell line에 대한 cell viability assay 수행. -HaCaT cell line에 대한 cell viability assay 수행.	100%
6	· 새로운 화장품원료의 제시.	· 세포를 이용한 실험 결과를 바탕으로 하여 기업 의 기술이전.	50%

Ⅲ. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구는 기능성 화장품 분야의 원료의 다양성을 위하여 해양 자원을 이용하여 새로운 원료를 제시하였음. 또한 기존에 임상만을 통한 정보가 아닌 피부세포를 이용한 과학적 실험과 결과를 통하여 원료가 피부에 주는 영향에 대하여 자세히 알아 낼수 있는 계기가 되었음. 그리하여 갯벌 흙의 추출물이 존의 미백 화장품이 tyrosinase의 저해에 target을 잡은데 비하여 melanocyte외부의 작용기작까지 검토하였고 미백뿐만 아니라 보습력, 염증완화능력까지 보유하고 있다는 것을 확인.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

기존의 화장품 원료가 알려진 약용식물의 유래에 초점을 두는데 비하여 본 연구는 풍부한 해양자원을 이용한 새로운 화장품 원료를 제시하였음.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

우선 머드로부터 유효성분의 분리, 정제 기술 및 test 방법을 확보하였고 유효성분의 분리에 의한 머드관련 제품 생산 시 제품 품질관리 가능. 또한,갯벌 흙내에 존재하는 물질들을 분리하여 이들이 피부세포에 어떠한 영향을 주는지를 과학적으로 분석하여 학술논문 투고에 활용. 기업기술이전을 통한 분리된 유효성분을 이용한 새로운 기능성 제품 창출효과.