



## 저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

碩士學位論文

사과 ‘히로사키’ 캘러스 추출물의  
기능성 화장품소재로서의 특성

(Functional characterization of callus extracts  
of apple ‘Hirosaki’ for cosmetic materials)

濟州大學校 大學院

生命工學科

高承希

2013年 1月

# 사과 ‘히로사키’ 켈러스 추출물의 기능성 화장품소재로서의 특성

指導教授 柳 基 中

高 承 希

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2013 年 1 月

高承希의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 \_\_\_\_\_

委 員 \_\_\_\_\_

委 員 \_\_\_\_\_

濟州大學校 大學院

2013 年 1 月

# 목 차

LIST OF FIGURES .....	3
ABSTRACT .....	5
서 론 .....	7
재료 및 방법 .....	13
1. 식물재료 및 켈러스 유도 .....	13
2. 켈러스 추출물 제조 .....	13
3. 총 폴리페놀 함량 분석 .....	14
4. 피부 효능 평가 .....	14
4-1. 항산화 활성 분석 .....	14
4-2. 주름개선 활성 분석 .....	15
4-3. 발모 활성 분석 .....	15
4-4. 미백 활성 분석 .....	16
4-5. 항염 활성 분석 .....	17
5. 통계처리 .....	19
결과 및 고찰 .....	20
1. 켈러스 유도 및 증식 .....	20
2. 켈러스 추출물 .....	24

3. 켈러스 추출물의 총 폴리페놀 함량 .....	25
4. 켈러스 추출물의 피부 효능 .....	25
4-1. 항산화 활성 .....	25
4-2. 주름개선 활성 .....	28
4-3. 발모 활성 .....	30
4-4. 미백 활성 .....	32
4-5. 항염 활성 .....	35
요 약 .....	41
참고문헌 .....	43

# LIST OF FIGURES

**Figure 1.** Effect of different concentrations of 2,4-D (0.1, 0.5, 1.0, 3.0 mg/L) and BA (0, 0.1, 1.0 mg/L) on callus induction from stem explant of Hirosaki

**Figure 2.** Callus induced from stem cultured on the MS media containing 0.5 mg/L 2,4-D and 1.0 mg/L BA

**Figure 3.** Friable and yellow callus induced from stem on the MS media containing 0.5 mg/L 2,4-D and 1.0 mg/L BA

**Figure 4.** Scheme of the extraction processing to construct extracts of Hirosaki callus

**Figure 5.** DPPH radical scavenging activities of Hirosaki callus extracts

**Figure 6.** Effect of Hirosaki callus extracts on the collagen synthesis in human fibroblast cells

**Figure 7.** Relative growth stimulations of hair follicle dermal papilla cells by Hirosaki callus extracts

**Figure 8.** Effect of Hirosaki callus extracts on melanin content in mouse B16 melanoma cells

**Figure 9.** Effect of Hirosaki callus extracts on melanin content in HeMn

**Figure 10.** Effect of Hirosaki callus extracts on nitrite production induced by LPS in RAW

264.7 cells

**Figure 11.** Effect of Hirosaki callus extracts on COX-2 expression induced by LPS in RAW

264.7 cells

**Figure 12.** Effect of Hirosaki callus extracts on eotaxin-1 production induced by IL-4 in

NIH/3T3 cells

# ABSTRACT

In order to investigate functional characterization of callus extracts of apple ‘Hirosaki’ for cosmetic materials, conditions for callus induction and proliferation were optimized and activities of its extracts regarding to anti-oxidation, wrinkle improvement, hair growth, skin-whitening, and anti-inflammatory effect were tested.

For callus induction, segments cut from newly developed stem were used as explants, and cultured on MS solid media containing different concentration of 2,4-D and BA. As the result, yellow and friable callus was induced in combinations of 0.1-1.0 mg/L 2,4-D and 0.1-1.0 mg/L BA. Among those 0.5 mg/L 2,4-D and 1.0 mg/L BA combination was best for callus proliferation as well as callus induction.

In the activity test of callus extract to skin improvement, anti-oxidative activity measured by DPPH radical scavenging was very low comparing to positive control of Trolox treatment, and skin-whitening activities which were estimated by inhibition of melanin production in mouse B16 melanoma cell and HeMn cell were not significantly changed. However, the callus extract affected to the activities for wrinkle improvement, hair growth and anti-inflammatory effect. The callus extract showed similar activity with TGF- $\beta$  used as positive control at 50 ug/mL concentration in the test of wrinkle improvement effect, and increased 40% of hair growth activity measured by growth stimulation of hair follicle dermal papilla cell. Especially, in case of anti-inflammatory effect, callus extract inhibited about 50% of COX-2 expression which was known as response for intermediating inflammation, and about 70% of eotaxin-1 production which was increased by skin inflammation, although NO production was not inhibited.

Through this study, it was suggested that the callus induced from stem of apple



‘Hirosaki’ had active compounds for wrinkle improvement, hair growth and anti-inflammatory effect, and might possess a potential for developing cosmetic materials.

# 서론

과학이 발전함에 따른 인간의 수명 연장과 삶의 질의 향상으로 인해 건강하고 여유로운 삶을 추구함과 동시에 아름다움과 젊음을 유지하고자 하는 욕구 충족을 위해 화장품에 대한 관심은 날로 증가하고 있다. 이로 인해 기능성 화장품은 미용뿐만 아니라 노화예방, 질병치료 등의 기능도 포함된 다기능성 및 고기능성의 개념을 추구하고 있으며, 그에 따른 신소재 개발이 강하게 요구되고 있다.

최근 화장품 산업의 시장규모는 급격하게 증가하여 정밀화학 산업 분야에서는 의약품 산업 다음으로 거대한 시장을 형성하고 있으며, 질적 삶을 추구하는 현대의 가치개념 변화가 앞으로 기능성 화장품의 수요를 더욱더 증가시킬 것으로 예상하고 있다.

이러한 화장품 산업은 시장변화에 민감하고 기호와 유행에 따라 빠르게 변화하며 화장품의 재료가 곧 제품의 마케팅과 클레임 문제와 연결되어있기 때문에, 소비자에게 안정하고 기능적인 제품을 제공함과 동시에 혁신적이고 유행에도 대응할 수 있는 제품개발을 위한 활성성분의 발굴은 지속적으로 요구되고 있다[1].

주로 의약품, 식품, 농업의 생명과학 분야가 화장품 산업에 영향을 미치게 되면서, 과학 분야는 오래 전부터 화장품에 들어가는 재료에 대한 원천이 되어왔다. 이러한 분야의 지식과 기술의 노하우가 화장품 산업에 이전되면서, 화장품 산업에 사용되는 재료들은 점차 자연으로부터 유래된 천연 물질로 변화하였다[2]. 또한 최근에는 화장품 재료로 유전자변형 식물이나 박테리아

유래의 성분들은 소비자들이 선호하지 않으며, 인간을 포함한 동물 유래의 성분들은 법적으로 사용이 제한되어 대부분의 원료는 식물이나 합성 물질이 사용되고 있다. 따라서 많은 화장품 연구 개발 그룹에서는 소비자 및 법률 요구 사항을 충족시키기 위해 원료의 개발 방법으로 식물 세포배양과 같은 생명공학 기술을 이용하고 있다[1].

식물의 2차 대사산물은 작은 분자량을 갖는 물질로 식물의 생장과 발달에 직접적으로 영향을 주지는 않지만, 식물이 환경에 적응할 수 있도록 도움을 준다[3]. 이러한 2차 대사산물의 생리활성 때문에 식물추출물은 의약품 분야에서 재료로 이용되고 있으며, 농업 분야에서는 천연 살균·살충제로, 식품에서는 조미료·색소로, 화장품 분야에서는 천연 향료나 오일로 다양한 산업분야에서 사용되고 있다[4]. 특히 화장품 분야에서의 식물추출물은 보습, 미백, 태닝, 색조, 자외선 차단, 항산화, 주름 개선, 면역 증강, 세안, 방부제, 점증제 등 다양한 목적으로 이용되고 있다[5].

이렇게 다양한 산업 분야에서 식물의 2차 대사산물을 이용하기 위해서는 많은 양의 식물 재료가 필요로 하지만, 식물 재료의 생산에는 지리적 불안정성과 가뭄, 병해충과 같은 많은 환경적인 요인의 영향뿐만 아니라 파종에서 수확까지의 긴 재배기간, 고수익을 갖는 품종 선택의 어려움, 재배방법이나 계절 변화로 인한 질적 차이 등의 문제로 안정적인 재료 공급에 많은 어려움이 따른다[6]. 특정 대사산물의 경우에는 유기합성이 가능하여 식물 재료 없이 화학적인 방법으로 생산하기도 하지만, 대부분의 유기합성은 과정이 복잡하고 경제적으로도 효율이 낮아 산업적으로 실현하기에 어려움이 많다. 이러한 이유로 인해 대사산물을 대량생산하기 위한 재료 확보에 있어서 경제적이면서 환경의

영향 없이 지속적으로 생산 가능한 시스템 개발에 많은 관심이 집중되어 왔는데, 이런 점에서 식물세포배양은 환경의 영향을 최소화 할 수 있을 뿐만 아니라 경제적으로도 많은 비용을 절감할 수 있는 새로운 재료 확보 시스템으로 주목 받고 있다[4].

식물세포배양 시스템은 관행재배 (Conventional cultivation)와 달리 다음과 같은 여러 장점이 있다. 첫째, 기후나 토양과 같은 환경적 요인과 대사산물에 영향을 주는 미생물, 곤충과 같은 생물적 요인들의 영향을 최소화 할 수 있어 좀 더 균일하고 일관성 있는 재료를 생산할 수 있다. 둘째, 일반적인 식물 재배와 달리 배양환경을 쉽게 조절함으로써 계절에 상관없이 지속적으로 수확 가능하고 비용 또한 감소시킬 수 있다. 셋째, 물리적 조건의 최적화(배지 구성성분, 생장조절제, pH, 빛 등)나 생산성이 높은 세포주의 선택, 전구체의 추가를 통해 배양조건을 최적화함으로써 기능성 물질의 생산성을 극대화 할 수 있다. 넷째, 형질전환이나 고정화배양 기술을 통해 생산효율을 증대할 수 있다[6, 7]. 이로 인해 최근에는 식물세포배양 시스템을 이용한 paclitaxel (*Taxus* spp.), berberine (*Coptis japonica*), 인삼 사포닌 (*Panax ginseng*) 및 식물 다당류 (*Polianthes tuberosa* 등)와 같은 물질이 상업적으로 생산되고 있다[8].

위에서 언급한 바와 같이 의약품 원료나 활성물질 대량생산 등에는 식물세포 배양 기술이 많이 이용되고 있지만, 아직 화장품 산업에서 식물 세포배양을 이용하여 화장품 소재를 생산하는 것은 극히 일부가 알려져 있다. Shikonin은 Mistui Petrochemical 사에 의해 *Lithospermum erythrorhizon* 세포 배양을 통해 생산되어 립스틱의 안료로 사용되고 있으며[9-11], 안료 Carthamin은 Kibun 사에서 홍화 (*Carthamus tinctorius*)의 세포배양 원료를

사용하여 제품화하였다[12, 13]. 피부의 멜라닌 합성을 억제하는 미백 소재인 Arbutin은 *Carthamus tinctorius*의 세포배양시 hydroquinone을 넣어줌으로써 효율적으로 생산하게 되었고, Mistui Petrochemical 사에 의해 상업적으로 제품화 되어있다[14, 15].

최근에는 이러한 식물 세포 배양을 통해 생산된 대사산물뿐만 아니라, 화장품 소재로서 식물의 탈분화 세포인 캘러스의 이용에도 관심이 높아지고 있다. 국내 연구로는 알로에베라, 개똥쑥 캘러스 추출물의 항염증 활성이 보고되었고, 은행과 홍경천의 캘러스 추출물에서는 항산화 활성이 보고되었으며, 가가이모과일 캘러스 추출물은 항비만 효과가 보고되었다[16-20]. 또한 국내 특허로는 산삼, 토마토, 녹차 등 20여종의 식물 캘러스 추출물이 화장품 조성물로 등록되어 있다[21].

사과는 장미과에 속하는 식물로 carotenoids, flavonoids, isoflavonoids, phenolic acids와 같은 phytochemical이 풍부한 것으로 알려져 있다. 역학적 연구를 통해 사과의 섭취가 폐암, 심혈관 질환, 천식, 당뇨병에 걸릴 위험성을 줄여주는 것과 연관이 있는 것으로 알려져 있으며, *in vitro* 연구를 통해서도 사과의 강력한 항산화 효과로 인해 암 세포 증식과 지질 산화를 억제시키고, 콜레스테롤을 감소시키는 것으로 보고되어 있다. 이러한 사과의 항산화 물질로는 quercetin-3-galactoside, quercetin-3-glucoside, quercetin-3-rhamnoside, catechin, epicatechin, procyanidin, cyanidin-3-galactoside, coumaric acid, chlorogenic acid, gallic acid, phloridzin 등이 알려져 있다[22].

화장품소재로서의 사과에 관한 국내연구로는 과육, 과피, 꽃잎, 미성숙과 추출물의 효능이 보고되어 있다[23-25]. 사과의 과육과 과피 추출물에서 높은

항산화 활성과 미백 효능이 나타났으며, 특히 과피의 경우 주름개선 효과를 보여 과육보다는 과피가 효능이 더 높은 것으로 보고되었다[23]. 꽃잎 추출물에서도 항산화 활성, 미백 주름개선 효과와 여드름균으로 알려진 *P. caenes*에 대한 항균 활성이 보고되었다[24]. 이러한 효능은 사과 추출물에 함유되어 있는 다량의 페놀성 화합물로부터 기인한 것으로 판단되고 있다.

또한 사과 세포배양재료를 이용하여 기능성 화장품도 개발된 바 있는데, 이는 ‘Uttwiler Spätlauber’ 라는 스위스 사과 품종의 켈러스 추출물을 이용한 것으로 Human stem cell의 증식 및 보호 효과, 모낭세포의 노화 억제, 임상에서의 눈가의 주름개선 효과가 있는 것으로 알려져 있고, PhytoCellTec™ 사에 의해 상업적으로 판매되고 있다[26].

이처럼 사과의 켈러스 추출물에 대한 기능성 화장품으로서의 효능이 일부 알려져 있기는 하지만, 실제로 식물 켈러스 배양은 배양 조건, 배양방식, 켈러스 유도에 사용된 식물 조직 등에 따라 유효성분의 함량과 활성이 다른 것으로 보고되고 있다. 은행 (*Ginkgo biloba* L.)의 경우 켈러스 배양 시 항산화 활성은 암조건에 비해 광조건에서 4배 높게 나타났으며, 고체배양보다는 현탁배양에서 4배 높은 것으로 보고되었다[18]. 또한 바질 (*Ocimum sanctum* L.)의 켈러스와 켈러스유래 식물 조직의 성분을 분석해본 결과, 총 폴리페놀 함량은 잎과 줄기에서가 각각에서 유래된 켈러스보다 높았으며 켈러스 추출물에서는 식물 조직에 존재하는 eugenol, sinapic acid 등이 검출되지 않았고, DPPH radical 소거능에서도 차이를 나타내었다[27].

이러한 연구결과로 보아 다른 품종, 다른 조직으로부터 유래된 사과의 켈러스 추출물 또한 이미 알려진 ‘Uttwiler Spätlauber’ 의 켈러스 추출물과는

다른 활성을 나타낼 가능성이 높은 것으로 판단하였다.

따라서 본 연구에서는 국내에서 재배되고 있는 히로스키 (Hirosaki) 품종의 켈러스 추출물에 대한 기능성화장품 소재로서의 새로운 효능을 탐색하는데 목표를 두고, 히로스키 품종의 켈러스 유도과 생장률이 높은 배양조건을 확립하여 이로부터 얻어진 켈러스의 추출물에 대한 DPPH assay를 통한 항산화 효과와 콜라겐 생합성능 측정을 통한 주름개선 효과, 모유두 세포의 MTT assay 통한 발모 효과, 멜라닌 세포 (mouse B16 melanoma cell, Human epidermal melanocyte neonatal)의 멜라닌함량 측정을 통한 미백 효과, 염증 유발인자인 NO, COX-2, Eotaxin-1 측정을 통한 항염 효능을 평가하였다.

# 재료 및 방법

## 1. 식물 재료 및 캘러스 유도

사과 캘러스 유도에는 히로사키 (*Malus domestica*) 품종을 이용하였다. 캘러스 유도 조직으로는 당년생 줄기를 이용하였고, 70% 에탄올에 30초간 침지, 중성세제로 10분간 세척, 2% 차아염소산나트륨 (Sodium hypochlorite)으로 15분간 살균한 후 멸균수로 3회 세척하여 캘러스 유도에 사용하였다. 표면 살균된 줄기는 두께 2-3 mm의 크기로 잘라서 0.1, 0.5, 1.0, 3.0 mg/L의 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)와 0, 0.1, 1.0 mg/L의 6-benzylaminopurine (BA)가 각각 혼합처리 된 MS 기본고체배지 위에 치상하였다[28]. MS 기본고체배지는 기본배지 조성액에 3% sucrose, 0.8% agar를 첨가하였고 1 N KOH로 pH 5.8로 보정 후 121°C에서 15분간 고압멸균한 후 petri-dish에 분주하여 사용하였다. 살균된 줄기 절편은 각 배양조건에 9개씩 치상하여 3회 반복 실험하였고, 24 ± 1°C에서 암배양하여 3주 후 유도된 캘러스의 형성율을 조사하였다. 또한 유도된 캘러스는 2,4-D와 BA가 적정농도로 혼합처리된 MS 기본고체배지에서 3주 간격으로 계대배양하여 증식하였다.

## 2. 캘러스 추출물 제조

배양한 캘러스를 수확하여 40°C Dry oven에서 48시간 건조시켰다. 건조된 캘러스에 70% 에탄올을 시료대비 1:10 (w/v)의 비율로 첨가하여 1시간 동안 초음파 추출을 3회 반복하였다. 이 추출물을 여과지(Whatman No.1)로 여과한



후, 회전감압농축기로 40℃에서 농축한 후 남은 추출액을 동결건조하였다. 동결건조한 시료는 냉장보관하여 다음 분석에 사용하였다.

### 3. 총 폴리페놀 함량 분석

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu reagent법을 응용하여 측정하였다[29]. 켈리스 추출물 50 mg에 증류수 10 mL을 첨가하여 0.45  $\mu$ m membrane filter로 여과하여 기질로 사용하였다. 기질용액 50  $\mu$ L에 0.2 N Folin-Ciocalteu reagent 80  $\mu$ L와 7.5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 70  $\mu$ L을 첨가하여 상온에서 2시간 반응시켰다. 흡광도는 ELISA plate Reader (Powerwave X, Bio-tek INC, VT)를 사용하여 760 nm에서 측정하였고, gallic acid를 이용하여 작성된 검량선으로 총 폴리페놀 함량을 계산하였다.

## 4. 피부 효능 평가

### 4-1. 항산화 활성 분석

히로사키 켈리스 추출물의 항산화 활성은 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거활성을 Fugita의 방법을 응용하여 측정하였다[30]. 시료를 100% DMSO에 녹인 후 10, 50, 100, 500  $\mu$ g/mL 농도 별로 희석한 희석액 20  $\mu$ L에 100  $\mu$ M의 DPPH용액 180  $\mu$ L를 가하여 10초간 진탕한 후 상온에서 30분간 방치한 다음 540 nm에서 ELISA plate Reader를 사용하여

흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로 Trolox를 이용하였고, DPPH radical 소거율은 아래와 같은 계산식으로 산출하여 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{DPPH radical 소거활성(\%)} = \left[ 1 - \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{무 첨가군의 흡광도}} \right] \times 100$$

#### 4-2. 주름개선 활성 분석

히로사키 켈러스 추출물의 주름개선 활성은 인간유래 섬유아세포 (Human fibroblast cells)의 콜라겐 생합성량을 측정하였다. 섬유아세포 (아주대 피부과로부터 분양)를 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양하고 계대 후 4-15세대 세포를 실험에 사용하였다. 세포를 96 well plate에 1 × 10<sup>4</sup> 개/well 씩 분주하여 10% FBS가 첨가된 DMEM에서 24시간 동안 배양한 후, 100% DMSO에 녹인 시료를 FBS가 포함되지 않은 새로운 DMEM에 1, 10, 50 μg/mL 농도 별로 첨가하여 다시 48 시간 동안 배양하였다. 배지 중에 유리된 콜라겐의 양은 배양액을 procollagen Type I C peptide EIA kit (Takara bio, Japan)를 이용하여 측정하였다. 표준검량선은 콜라겐 측정키트에 포함된 표준용액을 희석한 후 450 nm에서 ELISA plate Reader로 흡광도를 측정하여 작성하고, 이를 이용하여 콜라겐 생성량을 산정하였다.

#### 4-3. 발모 활성 분석

히로사키 켈러스 추출물의 발모 활성은 모유두 세포 (Hair follicle dermal papilla cell)의 세포증식을 MTT assay를 통하여 측정하였다. 모유두 세포

(Cell application Inc, USA)는 SupplementMix follicle dermal papilla cell GM이 첨가된 Folicle dermal papilla cell growth medium에서 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양하였고, 계대 후 4-11세대 세포를 실험에 사용하였다. 세포를 12 well plate에 5 × 10<sup>4</sup> 개/well 씩 분주하여 24 시간 동안 배양한 후 serum-free media로 바꾸어주고 100% DMSO에 녹인 시료를 1, 10, 50 μg/mL 농도 별로 처리한 후 72시간 동안 다시 배양하였다. 배양이 끝난 후 전체 배지의 1/10되는 양으로 MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 용액 (1 mg/mL in PBS)을 넣어주고, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 4시간 반응하였다. 배양액을 모두 제거하고 DMSO를 500 μL씩 넣고 세포 내 형성된 formazan을 용해시킨 후, 540 nm에서 ELISA plate Reader로 흡광도를 측정하여 세포 증식을 확인하였다.

#### 4-4. 미백 활성 분석

히로사키 켈러스 추출물의 미백 활성은 Mouse B16 melanoma cell과 Human epidermal melanocyte neonatal (HeMn)을 이용하여 측정하였다.

##### 1) Mouse B16 melanoma cell

B16 melanoma cell (ATCC, USA)을 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 DMEM에서 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양하였고, 6 well plates에 1 × 10<sup>5</sup> 개/well 씩 분주한 후 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 100% DMSO에 녹인 시료를 1, 10, 50 μg/mL 농도 별로 전처리하고 72시간 동안 배양하였다. 배양 후 Phosphate buffered saline (PBS)으로 2회

수세한 후 트립신을 처리하여 회수하였다. 회수된 세포는 12,000 rpm 에서 5분 동안 원심분리하여 상등액을 제거한 후, 멜라닌을 녹이기 위해 1 N NaOH를 150  $\mu$ L 첨가한 후 60°C에서 1시간 동안 반응하였다. 멜라닌 함량은 반응액을 450 nm에서 ELISA plate Reader로 흡광도를 측정하여 산출하였다.

## 2) Human epidermal melanocyte neonatal (HeMn)

HeMn 세포 (Cascade Biologics, USA)를 Human Melanocyte Growth Supplement가 첨가된 M254 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양하였고, 6 well plates에  $2 \times 10^5$  개/well 씩 분주한 후 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 100% DMSO에 녹인 시료를 1, 10, 50  $\mu$ g/mL 농도 별로 전처리하고, 5일 후 PBS으로 2회 수세한 후 트립신을 처리하여 회수하였다. 회수된 세포는 12,000 rpm 에서 5분 동안 원심분리하여 상등액을 제거한 후, 멜라닌을 녹이기 위해 1 N NaOH를 150  $\mu$ L 첨가한 후 60°C에서 1시간 동안 반응하였다. 멜라닌 함량은 반응액을 450 nm에서 ELISA plate Reader로 흡광도를 측정하여 산출하였다.

## 4-5. 항염 활성 분석

히로사키 켈러스 추출물에 대한 항염 활성은 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포의 염증인자인 NO, COX-2에 대한 저해 활성과 마우스 섬유아세포인 NIH/3T3 세포의 아토피관련인자인 eotaxin-1의 저해활성을 측정하였다.

## 1) NO 생성 저해 측정

마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포를 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 DMEM에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양하였고, 12 well plate에 5 × 10<sup>4</sup> 개/well 씩 분주한 후 24시간 배양하였다. 배양 후 FBS가 포함되지 않은 새로운 DMEM로 바꾸어주고, 100% DMSO에 녹인 시료를 1, 10, 100 μg/mL 농도 별로 전처리하여 1시간 동안 전배양시켰다. 전배양 후 lipopolysaccharide (LPS)를 200 ng/mL의 농도로 처리하고, 14시간 동안 배양 후 배양상등액을 회수하여 NO 생성량을 측정하였다. NO 생성량은 아질산 및 아질산이온의 검출·정량에 사용되는 시약인 Griess (1% sulfanilamide, 0.1% NED [N-(1-naphthyl)-ethylenediamide dihydrochloride], 8.5% phosphoric acid)를 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포배양 상등액과 Griess 시약을 1:1 비율로 반응한 후 540 nm 파장에서 흡광도 측정을 통해 NO 생성정도를 산출하였다.

## 2) Cyclooxygenase-2 (COX-2) 저해 측정

마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포를 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 DMEM에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양하였고, 12 well plate에 5 × 10<sup>4</sup> 개/well 씩 분주한 후 24시간 배양하였다. 배양 후 transfection reagent를 이용하여 COX-2 reporter vector를 transfection 시켰다. 24시간 배양 후 FBS가 포함되지 않은 새로운 DMEM로 바꾸어준 후, 100% DMSO에 녹인 시료를 1, 10, 100 μg/mL 농도 별로 전처리하여 1시간 동안 전배양시켰다. 전배양 후 LPS를 200 ng/mL의 농도로 각각의 시험군에

처리하여 14시간 동안 배양하였다. 배양 후 세포를 수확하여 얻어진 pellet을 50-100  $\mu$ L의 reporter lysis buffer를 이용하여 얼음 안에서 1시간 용해하였다. 1시간 후 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 얻어진 상층액을 luciferase substrate solution과 1:1 (v/v)로 첨가한 다음 luminometer를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 3) Eotaxin-1 측정

마우스 섬유아세포인 NIH/3T3 세포를 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 DMEM에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양하였고, 12 well plate에  $1 \times 10^5$  개/well씩 분주한 후 24시간 배양하였다. 배양 후 FBS가 포함되지 않은 새로운 DMEM로 바꾸어주고, 100% DMSO에 녹인 시료를 1, 10, 100  $\mu$ g/mL 농도 별로 전처리하여 1시간 동안 전배양시켰다. 전배양 후 interleukin-4 (IL-4)를 50 ng/mL 농도로 처리하여 24시간 동안 배양 후 배양상등액을 회수하여 ELISA를 수행하여 eotaxin-1의 분비 정도를 비교 측정하였다.

## 5. 통계처리

측정된 표준치는 평균±표준편차의 형태로 표시하였고, 통계의 유의성은 Duncan test를 이용하여  $p < 0.05$  이하일 경우 유의 하다고 판단하였다.

# 결과 및 고찰

## 1. 캘러스 유도 및 증식

히로사키의 줄기 절편을 2,4-D와 BA가 혼합처리 된 MS고체배지에 치상한 후 암배양 조건에서 3주 짜 배양한 결과는 Figure 1로 나타내었는데, Figure에서 보는 바와 같이 캘러스 유도율은 0.1-1.0 mg/L의 2,4-D와 0.1-1.0 mg/L의 BA 조합처리에서 가장 양호한 것으로 확인되었다. 또한 캘러스 유도에 있어서 성장조절제 2,4-D와 BA의 농도는 매우 중요한 것으로 확인되었는데, 2,4-D의 경우는 0.1-1.0 mg/L 농도범위에서는 큰 차이를 보이지 않았지만 3.0 mg/L에서는 캘러스 유도율이 낮아지는 것으로 보아 고농도의 2,4-D는 캘러스 유도를 저해하는 것으로 사료되었다. 그리고 2,4-D와 BA를 혼합처리 했을 때가 2,4-D를 단독으로 처리했을 때보다 높은 캘러스 유도율을 나타내는 것으로 보아 BA 처리가 히로사키의 캘러스 유도에 중요한 역할을 하는 것으로 판단되었다.

사과의 캘러스 배양은 이미 보고된 Uttwiler Spätlauber 품종의 경우와 같이 주로 열매유래 캘러스를 이용해 왔기 때문에 본 연구에서도 열매로부터 캘러스 유도를 시도해 보았다. 하지만, 열매로부터의 캘러스 유도에는 2달 이상의 기간이 소요되었고, 초기 캘러스의 증식 또한 매우 느리다는 단점이 있었다. 이로 인해 본 연구에서는 줄기유래 캘러스를 사용하였으며, 기존의 캘러스 유도 조직과 다른 캘러스 유도 조직을 사용함으로써 추출물의 활성 차이를 기대해 보았다.

캘러스 유도가 가장 양호한 0.5 mg/L 2,4-D와 1.0 mg/L BA 혼합처리

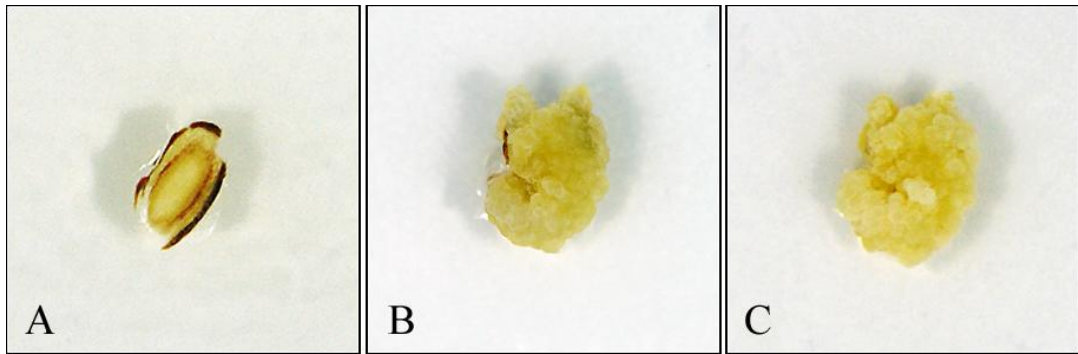
조건의 켈러스 유도 과정은 Figure 2 에 나타내었는데, Figure 에서 보는 바와 같이 켈러스는 배양 3일 후부터 줄기 절편으로부터 유도되었으며 배양 21일 후에는 노란색의 켈러스가 다량 증식되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 켈러스의 증식은 0.5 mg/L의 2,4-D와 1.0 mg/L BA 혼합처리 된 조건에서 가장 우수하였으며, 켈러스는 노란색의 부스러지기 쉬운 형태를 나타내었다 (Figure 3). 켈러스의 형태와 증식은 성장조절제의 농도에 따라 차이를 보였는데, 2,4-D 단독처리 시에는 켈러스가 흰색을 띠며 수분함량이 많은 켈러스가 형성되었고 증식이 거의 일어나지 않는 반면, 2,4-D와 BA를 혼합처리 시에는 노랗고 부스러지기 쉬운 켈러스가 형성되었으며 증식이 빠른 것을 확인할 수 있었다.

따라서 본 연구에서는 0.5 mg/L 2,4-D와 1.0 mg/L BA가 혼합처리 된 배지에서 유도된 켈러스를 같은 조건에서 3주 간격으로 배양한 후, 화장품 소재로서의 활성 분석을 위한 추출물 제조에 이용하였다.



2,4-D \ BA	0.1 mg/L	0.5 mg/L	1.0 mg/L	3.0 mg/L
0 mg/L				
0.1 mg/L				
1.0 mg/L				

**Figure 1. Effect of different concentrations of 2,4-D (0.1, 0.5, 1.0, 3.0 mg/L) and BA (0, 0.1, 1.0 mg/L) on callus induction from stem explant of Hirosaki.**



**Figure 2.** Callus induced from stem cultured on the MS media containing 0.5 mg/L 2,4-D and 1.0 mg/L BA. A: Stem explant. B: After 3 days. C: After 21 days.



**Figure 3.** Friable and yellow callus induced from stem on the MS media containing 0.5 mg/L 2,4-D and 1.0 mg/L BA. Scale bar= 0.2 cm.

## 2. 켈러스 추출물

히로사키 켈러스를 MS고체배지에서 3주간 배양하여 생중량 28.42 g의 켈러스를 수확하였다. 이를 40℃ Dry oven에서 48시간 건조시킨 후 건조중량 3.21 g을 얻었으며, 건조된 시료에 70% 에탄올을 30 mL 첨가하여 1시간 동안 초음파 추출을 3회 반복하였다. 추출물을 여과지로 여과하고 회전감압농축기로 40℃에서 농축시킨 후, 남은 추출액을 동결건조한 결과 약 1.30 g의 고형추출물을 얻을 수 있었다 (Figure 4). 따라서 켈러스 생체중으로부터 고형추출물의 수율은 약 4.6%임을 확인할 수 있었다.

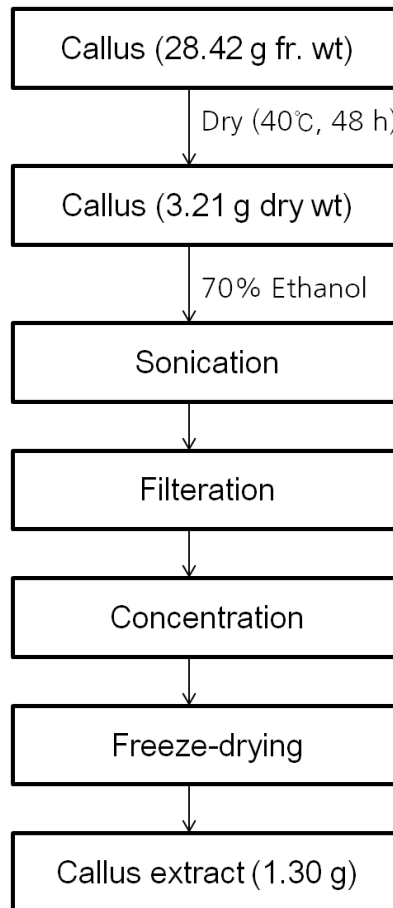


Figure 4. Scheme of the extraction processing to construct extracts of Hirosaki callus.

### 3. 켈러스 추출물의 총 폴리페놀 함량

히로사키 켈러스 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정하여 본 결과, 5.94 mg GAE/g으로 나타나 켈러스 추출물의 폴리페놀 함량은 매우 낮은 것으로 확인되었다.

### 4. 켈러스 추출물의 피부 효능

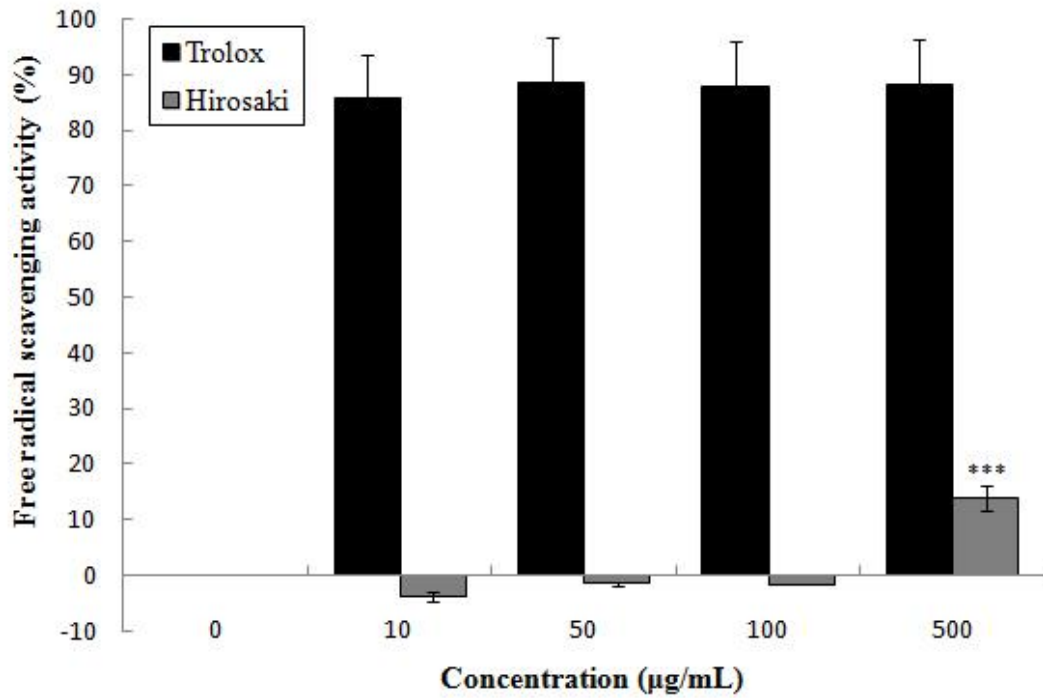
#### 4-1. 항산화 활성

피부는 자외선 노출로 free radical인 활성 산소종 (reactive oxygen species, ROS)이 생성되어, 탄력감소, 주름살 및 기미, 주근깨와 같은 피부 노화를 야기시키는 것으로 알려져 있다. 이들 반응은 대부분 라디칼 반응으로 자동산화반응을 거쳐 진행되는데,  $\alpha$ -tocopherol, L-ascorbic acid와 같은 항산화제에 의해 radical이 소거되면서 반응이 종결된다[31]. 그 중 안정화된 구조의 라디칼인 DPPH 반응은 항산화 활성을 측정하는데 보편적으로 사용되는 방법으로, 히로사키 켈러스 추출물의 항산화 활성도 DPPH radical 소거능을 이용하여 측정하였으며, 그 결과는 Figure 5 에 나타난 것과 같다. 양성 대조군인 Trolox는 10  $\mu$ g/mL의 농도에서 약 85%의 소거능을 보인 반면, 켈러스 추출물은 500  $\mu$ g/mL에서 약 14%의 낮은 소거능을 나타내어 항산화 활성이 매우 낮은 것으로 확인되었다.

바질의 줄기유래 켈러스의 경우 420  $\mu$ g/mL의 농도에서 50%의 DPPH radical 소거능을 나타내었으며, 식물 조직(잎, 줄기)과 켈러스 추출물의

폴리페놀 함량이 DPPH radical 소거능과 서로 상관관계가 있음이 보고된 바 있다[27].

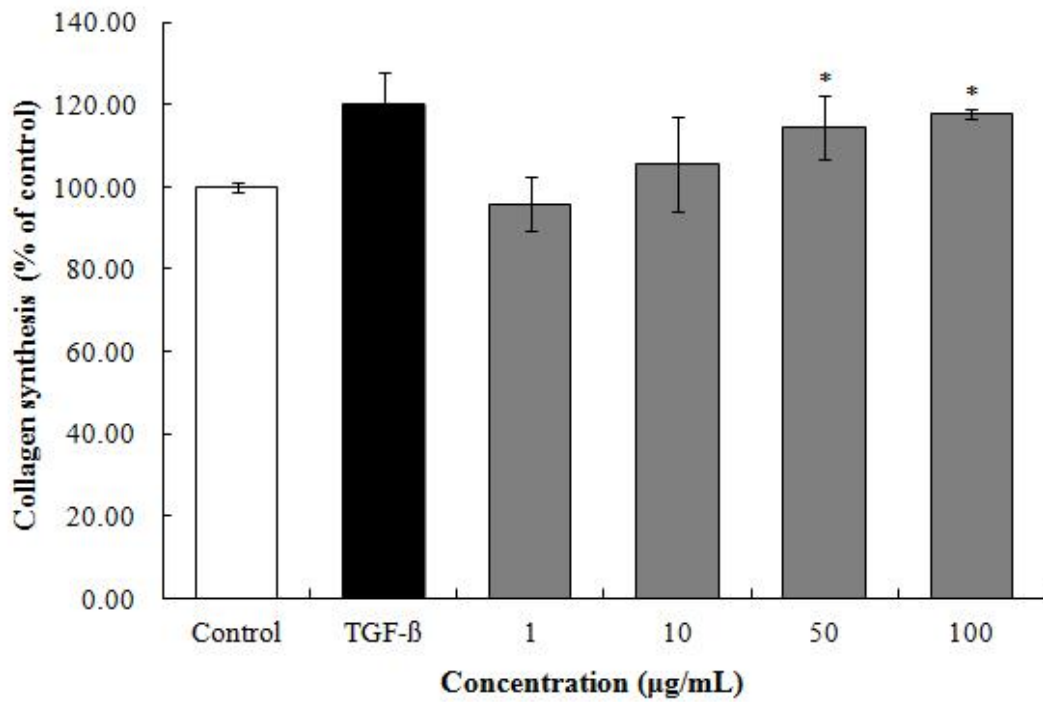
따라서 폴리페놀 화합물이 DPPH radical 소거활성과 같은 항산화 활성에 중요한 인자로 작용한다는 것을 근거로 본다면, 히로사키 켈러스 추출물의 경우는 폴리페놀에 기인한 높은 항산화 활성은 기대하기 어려운 것으로 판단되었다[32].



**Figure 5. DPPH radical scavenging activities of Hirosaki callus extracts. Trolox was used as positive control. Data are expressed as means±S.D.. Significant differences compared with the control values are determined using Duncan’s test (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).**

#### 4-2. 주름개선 활성

외부로부터의 자극에 대해 피부를 보호, 유지하는 콜라겐은 피부의 장력과 강도를 부여하기 때문에, 콜라겐의 감소는 피부노화 및 주름생성과 관계되어 있다[33]. 따라서 히로사키 켈러스 추출물의 주름개선 활성을 사람의 섬유아세포에 대한 콜라겐 생합성능으로 측정하여 콜라겐 합성 촉진 효과를 조사하여 보았다. 그 결과, Figure 6에 나타난 것과 같이 시료를 처리하지 않은 대조군의 콜라겐 생합성량을 100%로 보았을 때 켈러스 추출물은 대조군에 비해 50  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 콜라겐 생합성량이 약 14% 증가하는 것으로 확인되었다. 이것은 양성대조군인 TGF- $\beta$ 를 10 ng/mL 농도로 처리했을 때와 비슷한 수준의 활성이었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 히로사키 켈러스 추출물은 50  $\mu\text{g/mL}$  농도 수준에서 콜라겐 생합성을 촉진하는 주름개선 활성이 있는 것으로 사료되었다.

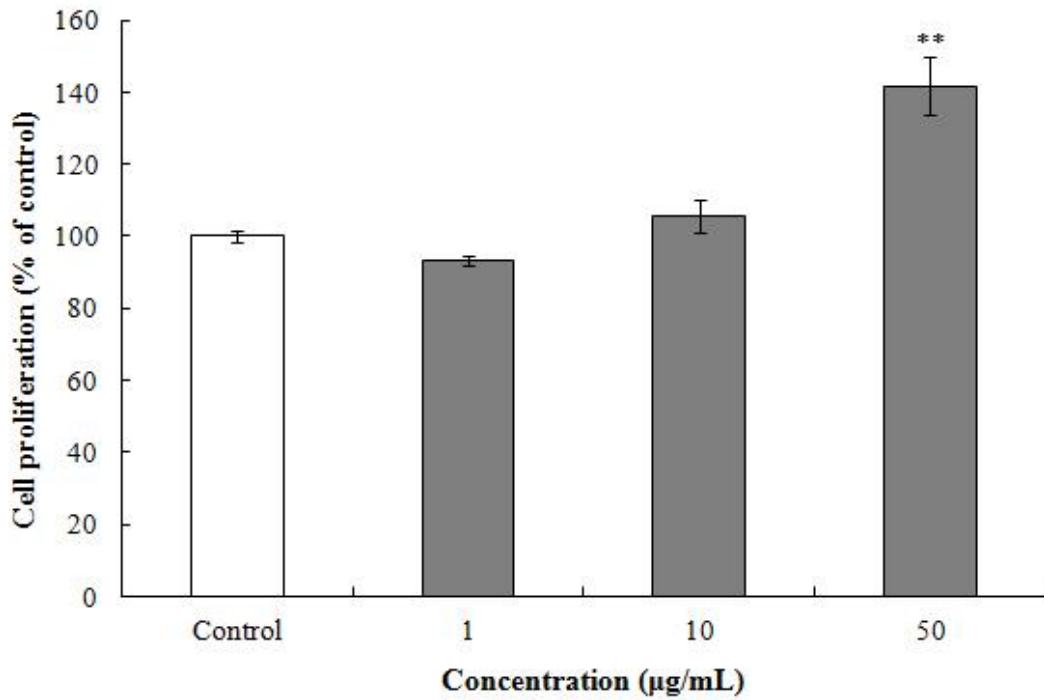


**Figure 6. Effect of Hirosaki callus extracts on the collagen synthesis in human fibroblast cells. TGF-β was used as positive control. Data are expressed as means±S.D.. Significant differences compared with the control values are determined using Duncan's test (\*p<0.05).**



### 4-3. 발모 활성화

모유두 세포 (dermal papilla cells)는 모낭 아래쪽에 위치하여 모발의 발생, 성장과 주기를 조절하는 역할을 담당하며, 모유두 세포의 증식은 발모 활성을 측정하는 하나의 방법으로 이용되고 있다[34]. 따라서 히로사키 켈러스 추출물의 발모 활성화도 모유두 세포의 증식을 조사하여 확인하였으며, 모유두 세포의 증식은 MTT assay를 통하여 확인하였다. Figure 7은 대조군에 대한 켈러스 추출물 처리구의 상대적 증식 활성을 비교하여 나타낸 것인데, 여기에서 보는 바와 같이 모유두 세포의 증식은 켈러스 추출물을 1, 10  $\mu\text{g/mL}$  농도 수준에서 처리하였을 때에는 대조군과 큰 차이를 보이지 않았지만, 50  $\mu\text{g/mL}$  농도에서는 약 40% 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 히로사키 켈러스 추출물이 모유두 세포의 증식을 촉진하는 발모 활성을 가지고 있기 때문인 것으로 판단되었다.



**Figure 7. Relative growth stimulations of hair follicle dermal papilla cells by Hirosaki callus extracts. Data are expressed as means±S.D.. Significant differences compared with the control values are determined using Duncan's test (\*p<0.05, \*\*p<0.01).**

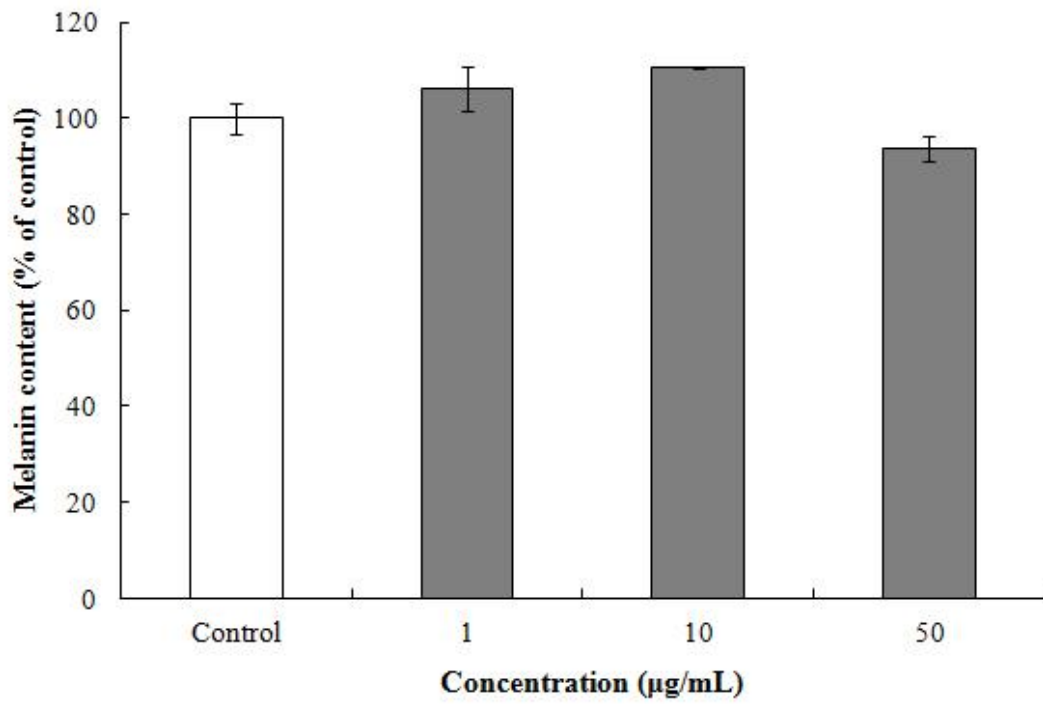
#### 4-4. 미백 활성

멜라닌은 사람의 피부에서 자외선 조사 등 환경에 의한 피부 손상을 막아주는 역할을 하지만, 과잉생성은 기미, 주근깨, 피부 반점을 유발하며 멜라닌 전구물질의 독성으로 인한 세포의 사멸 및 피부암 생성이 촉진되기도 한다[35]. 히로사키 켈러스 추출물의 미백 활성은 이러한 멜라닌 합량을 측정하여 멜라닌 합성의 저해 활성 여부를 조사함으로써 확인하였는데, 멜라닌 합량 변화 분석에는 마우스와 인간의 멜라닌 세포를 각각 이용하였다.

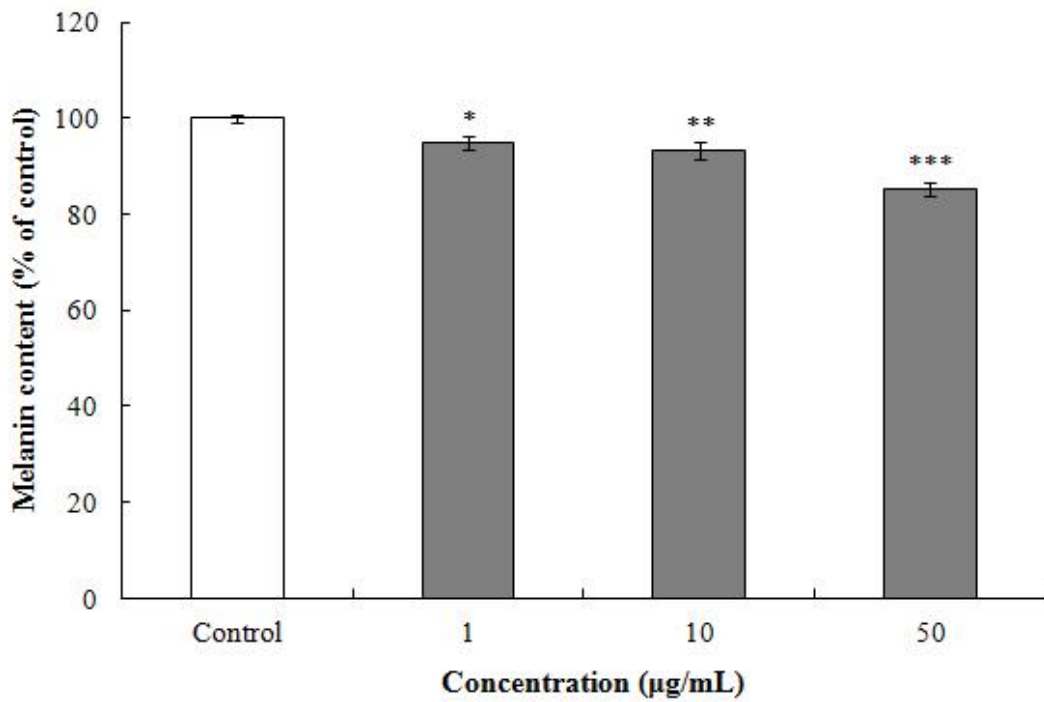
히로사키 켈러스 추출물을 마우스 B16 melanoma cell에 농도 별로 처리하여 멜라닌 합성 저해 정도를 측정한 결과, Figure 8에서 보는 바와 같이 켈러스 추출물을 1, 10  $\mu\text{g/mL}$  농도 수준으로 처리한 세포의 경우 멜라닌 합량은 대조군에 비해 다소 증가하는 경향을 보였으나, 50  $\mu\text{g/mL}$ 에서는 소폭 감소되는 것으로 나타났다. 하지만 통계적으로 유의성은 없는 것으로 확인되었다.

히로사키 켈러스 추출물을 HeMn 세포에 처리하였을 때에는 시료를 처리하지 않은 대조군에 비해 켈러스 추출물을 1, 10, 50  $\mu\text{g/mL}$  농도 수준으로 처리한 경우 멜라닌 합량이 각각 94%, 93%, 85%로 농도의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 9). 하지만 멜라닌 합성 저해 활성은 그리 높지 않은 것으로 확인되었다.

이러한 결과로 볼 때, 히로사키 켈러스 추출물은 마우스 B16 melanoma 세포와 HeMn 세포에서 멜라닌 합성 저해 활성이 있기는 하지만 그 효과는 미비한 것으로 판단되어 멜라닌 합성 저해를 통한 미백 활성을 기대하기는 어려울 것으로 사료되었다.



**Figure 8.** Effect of Hirosaki callus extracts on melanin content in mouse B16 melanoma cells. Data are expressed as means±S.D..



**Figure 9.** Effect of Hirosaki callus extracts on melanin content in HeMn. Data are expressed as means±S.D.. Significant differences compared with the control values are determined using Duncan's test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

#### 4-5. 항염 활성

염증은 유해한 자극에 대한 몸의 생리적 방어 반응으로, 지속적인 염증 반응은 점막 손상을 촉진시켜 결과적으로 통증, 부종, 발적, 발열 등을 일으킴으로써 기능장애를 유발한다[36, 37]. 히로사키 켈러스 추출물의 항염 활성은 염증인자 NO, COX-2 및 eotaxin-1의 저해 활성을 분석하여 조사하였다.

##### 1) NO 생성 저해

LPS에 의해 NO 생성이 활성화된 RAW 264.7 세포에 켈러스 추출물을 1, 10  $\mu\text{g/mL}$  농도 수준으로 처리하였을 때 NO 생성량은 LPS만 처리하였을 때와 큰 차이를 나타내지 않았으며, 100  $\mu\text{g/mL}$  농도 수준으로 처리하였을 때는 다소 감소하여 경향을 보이기는 하였으나, 통계적으로 유의성은 없는 것으로 확인되었다(Figure 10). 따라서 히로사키 켈러스 추출물의 NO 생성에 대한 저해 활성은 거의 없는 것으로 확인되었다.

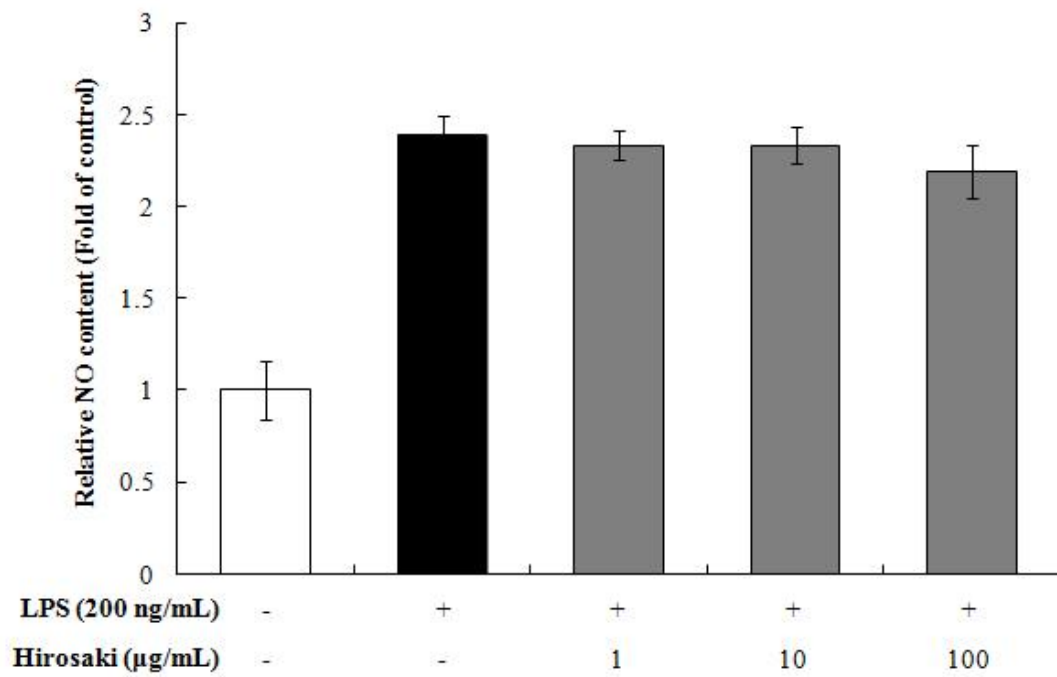


Figure 10. Effect of Hirosaki callus extracts on nitrite production induced by LPS in RAW 264.7 cells. Data are expressed as means±S.D..

## 2) Cyclooxygenase-2 (COX-2) 저해

LPS에 의해 COX-2 발현이 활성화된 RAW 264.7 세포에 켈러스 추출물을 처리한 후 COX-2 저해활성을 분석하여 본 결과, Figure 11에 나타난 바와 같이 COX-2 발현은 켈러스 추출물 처리농도에 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 COX-2 발현양이 50% 정도 감소하는 것으로 나타나 높은 저해활성이 있는 것으로 확인되었다.

이는 NO가 COX-2의 활성을 촉진시키는 것으로 알려져 있으나, 켈러스 추출물이 NO 생성에는 저해활성을 거의 보이지 않았고 COX-2 발현에는 저해활성을 나타내었다[38]. 이러한 결과를 토대로 볼 때, 히로사키 켈러스 추출물의 항염 활성은 NO 생성과는 무관하게 염증 원인 물질인 prostaglandin을 합성하는 COX-2의 활성을 저해함으로써 나타낼 가능성이 높을 것으로 확인되었다. 하지만 히로사키 켈러스 추출물의 항염 활성에 대한 명확한 작용기작을 규명하기 위해서는 좀 더 구체적인 연구가 필요할 것으로 사료되었다.



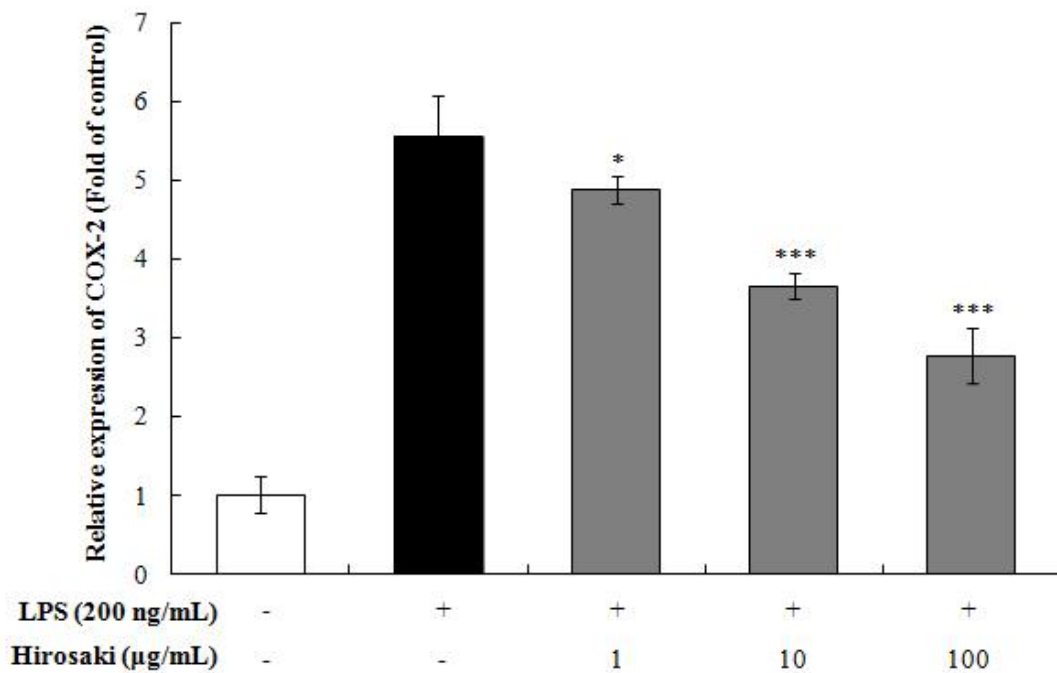
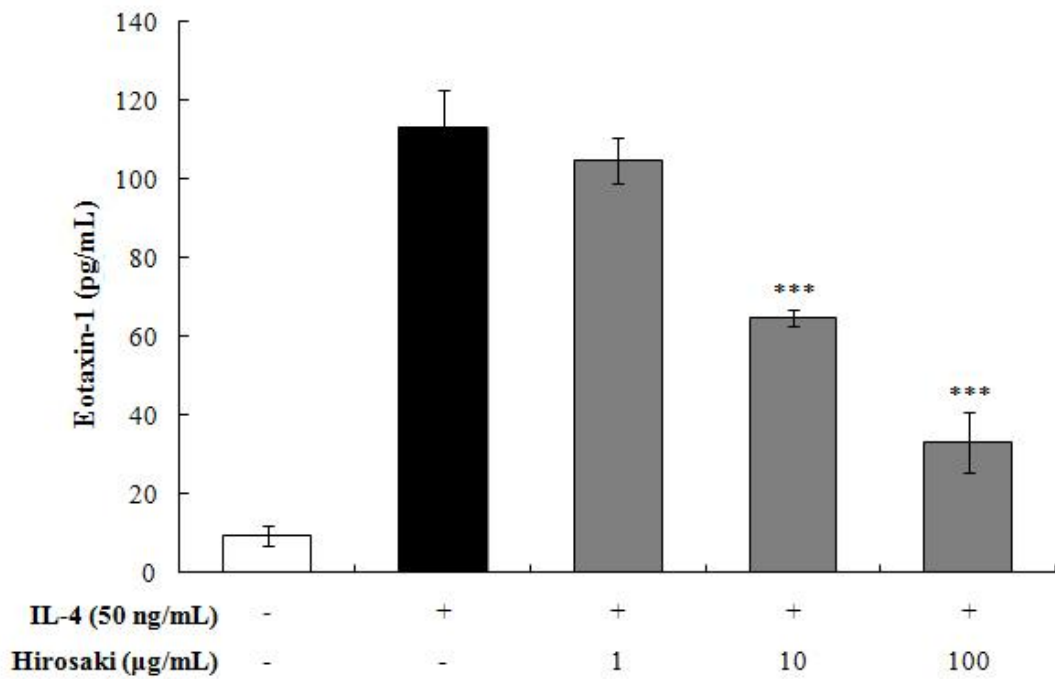


Figure 11. Effect of Hirosaki callus extracts on COX-2 expression induced by LPS in RAW 264.7 cells. Data are expressed as means±S.D.. Significant differences compared with the positive control values (COX-2 expression induced by LPS in RAW 264.7 cells) are determined using Duncan's test (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

### 3) Eotaxin-1 측정

Eotaxin-1 생성 저해 활성은 IL-4에 의해 eotaxin-1 생성이 활성화된 NIH/3T3 세포에 켈러스 추출물을 처리하여 확인하였는데, 그 결과 figure 12에 보여진 것과 같이 eotaxin-1 생성량은 켈러스 추출물 처리 농도에 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 약 70%의 높은 저해 활성을 보이는 것으로 확인되었다.

Eotaxin-1의 경우는 염증뿐만 아니라 아토피 피부염 유발인자로도 알려져 있어 이에 대한 생성 저해 활성은 아토피 피부염 치료제로서의 개발 가능성도 시사한다고 볼 수 있어, 히로사키 켈러스 추출물의 경우는 아토피 피부염 치료제 개발 원료로서의 가치도 높을 것으로 사료되었다.



**Figure 12. Effect of Hirosaki callus extracts on eotaxin-1 production induced by IL-4 in NIH/3T3 cells. Data are expressed as means±S.D.. Significant differences compared with the positive control values (eotaxin-1 production induced by IL-4 in NIH/3T3 cells) are determined using Duncan's test (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).**

## 요 약

본 연구에서는 사과 품종 중 하나인 히로사키 켈러스 추출물의 화장품 소재로서의 특성을 알아보기 위하여 히로사키 사과나무 줄기절편으로부터 켈러스 유도/증식에 대한 적정조건을 확립하고, 이로부터 얻어진 켈러스의 추출물을 이용하여 항산화 (DPPH radical 소거능), 주름개선 (세포내 콜라겐 합성), 발모 (모유두 세포의 증식 효과), 미백 (세포내 멜라닌 생성억제), 항염 (NO, COX-2, Eotaxin-1 생성억제) 등에 대한 기능성 화장품소재로서의 특성에 대한 분석을 수행하였다.

히로사키 줄기절편으로부터의 켈러스 유도는 0.1-1.0 mg/L 2,4-D와 0.1-1.0 mg/L BA가 혼합처리 된 배지에서 양호하였으며, 유도된 켈러스는 노랑고부스러지기 쉬운 형태를 나타내었다. 그 중 0.5 mg/L 2,4-D와 1.0 mg/L BA가 혼합처리 된 MS배지에서 켈러스 증식이 가장 우수하여, 추출물 제조를 위한 켈러스의 유도/증식에는 0.5 mg/L 2,4-D와 1.0 mg/L BA를 혼합처리한 조건을 사용하였다.

히로사키 켈러스 추출물의 피부 효능은 항산화 활성의 경우 양성대조군인 Trolox에 비해 낮은 DPPH radical 소거능을 나타내었으며, 이는 켈러스 추출물 내의 폴리페놀 함량이 낮은 것과 연관이 있을 것으로 사료되었다. 또한 미백 활성 실험에서도 마우스 B16 melanoma cell과 HeMn 세포에 대한 추출물의 멜라닌 합성 저해 효과는 미비한 것으로 평가되었다. 하지만 켈러스 추출물의 주름개선, 발모 및 항염 활성은 높은 것으로 확인되었다. 켈러스 추출물의 인간유래 섬유아세포 내에서의 주름개선 활성에서는 50  $\mu$ g/mL 농도에서

TGF- $\beta$ 가 처리했을 때와 유사한 효과를 나타내었으며, 발모 활성 실험에서는 사람의 모유두 세포 증식이 50  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 약 40% 증가하여 높은 효과를 나타내었다. 특히, 항염 활성 실험에서는 추출물의 NO 생성은 저해효과는 미비하였지만, COX-2 발현저해와 eoxatin-1 생성저해에 높은 활성을 나타내어 켈러스 추출물의 100  $\mu\text{g/mL}$  농도 수준으로 처리한 경우 대조군에 비해 각각 약 50%와 약 70%의 저해활성을 나타내는 것으로 확인되었다.

이러한 결과로 볼 때, 히로사키 켈러스 추출물은 주름개선, 발모 및 항염에 대한 효과가 높은 것으로 판단되었으며, 그에 따른 기능성 화장품 소재로서의 개발 가치도 높은 것으로 사료되었다.

## 참고문헌

- [1] Schürch C, Blum P, Züllli F (2008) Potential of plant cells in culture for cosmetic application. *Phytochem Rev* 7:599-605
- [2] Kostarelos K, Rheins L (2002) Biotechnology impacting cosmetic science: Altering the way cosmetics are perceived. *Cosmet Toiletries* 34
- [3] Wilson SA, Roberts SC (2012) Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules. *Plant Biotechnol J* 10:249-268
- [4] Kirakosyan A, Cseke L J, Kaufman PB (2009) The use of plant cell biotechnology for the production of phytochemicals. In: Kirakosyan A, Kaufman PB (eds.) *Recent Advances in Plant Biotechnology*. Springer, New York, pp 15-33
- [5] Blum P, Schürch C, Züllli F (2007) Topische Anwendung von dedifferenzierten Pflanzenzellen für den Schutz und die Erneuerung von Hautstammzellen. Patent pending
- [6] Dicosmo F, Misawa M (1995) Plant cell and tissue culture: Alternatives for metabolite production. *Biotechnology Advances* 13(3):425-453

- [7] Mulabagal V, Tsay H-S (2004) Plant cell cultures – An alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *Int J Appl Sci Eng* 2(1):29-48
- [8] Kieran P (2001) Bioreactor design for plant cell suspension cultures. In: Cabral JMS (ed) *Principles of multiphase reactor design*. Harwood Academic Publishers, New Jersey, pp 391-426
- [9] Fujita Y, Takahashi S, Yamada Y (1985) Selection of cell lines with high productivity of shikonin derivatives by protoplast culture of *Lithospermum erythrorhizon* cells. *Agric Biol Chem* 49:1755-1759
- [10] Takahashi S, Fujita Y (1991) In: Komamine A, Misawa M, DiCosmo F (eds.) *Plant Cell Culture in Japan*. CMC Co., Tokyo, pp 72-78
- [11] Misawa M (1994) Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolites. *FAO Agric Serv Bull* 1-87
- [12] Kibun Co., Japan Patent 87-126924 (1987)
- [13] Kusaka K, Wakayama S (1991) In: Komamine A, Misawa M, DiCosmo F (eds.) *Plant Cell Culture in Japan*. CMC Co., Tokyo, pp 127-137
- [14] Akiu S, Suzuki Y, Fujinuma Y, Asahara T, Fukada M (1988) Inhibitory effect of arbutin on melanogenesis: biochemical study in cultured B16 cells and effect on the UV-induced

pigmentation in human skin. Proc Jpn Soc Invest Dermatol 12:138-139

[15] Yokoyama M, Yanagi M (1991) In: Komamine A, Misawa M, DiCosmo F (eds.) Plant Cell Culture in Japan. CMC Co., Tokyo, pp 79-91

[16] Kim M-U (2010) Optimization of suspension cultivation of *Aloe vera* callus and characteristics of cultured products from suspension culture. PhD Thesis, Kangwon National University, Korea

[17] Kim IS (2010) Characteristics of cells derived from *Artemisia annua* L. cambium and anti-inflammatory activity of cell extracts. MS Thesis, Chonbuk National University, Korea

[18] Kim JS, Park H-J, Park H-Y (2011) Antioxidative activity and flavonol glycosides analysis in callus derived from leaf tissue of *Ginkgo biloba* L. Korean J Plant Res 24(4):461-471

[19] Ha JH, Jeong HS, Jeong MH, Kim SS, Jin L, Nam JH, Hwang B, Ma CJ, Lee HY (2009) Comparison of anticancer activities of ultrasonification extracts of callus and roots from *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. Korean J Food Sci Technol 41(5):552-559

[20] Park CM, Joung MS, Choi JW (2009) Tissue-cultured *Gymnema sylvestre* leaf extract enhance anti-adipogenic effects through inhibition of C/EBP- $\alpha$  expression and lipid droplet accumulation. J Soc Cosmet Scientists Korea 35(2):111-116

[21] [www.kipris.or.kr](http://www.kipris.or.kr)



- [22] Boyer J, Liu R (2004) Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutr J* 3:1-15
- [23] Jeong HR, Jo YN, Jeong JH, Jin DE, Song BG, Heo HJ (2011) Whitening and anti-wrinkle effects of apple extracts. *Kor J Food Preserv* 18(4):597-603
- [24] Choi SJ, Cho E-A, Cho EH, Jeong YJ, Ku CS, Ha BJ, Chae HJ (2011) Screening of functional materials from solvent fractions of apple flower leaf extract. *KSBB Journal* 26:165-171
- [25] Choi SY, Kim SS, Lee YM, Lee B-H, Han CK (2010) Phenolic compounds content and tyrosinase inhibitory effect of unripe apple extracts. *J Appl Biol Chem* 53(2):87-90
- [26] Schmid D, Schürch C, Blum P, Belser E, Züllli F (2008) Plant stem cell extract for longevity of skin and hair. *SOFW Journal* 134(5):30-35
- [27] Hakkim FL, Shankar CG, Girija S (2007) Chemical composition and antioxidant property of Holy Basil (*Ocimum sanctum* L.) leaves, stems, and inflorescence and their in vitro callus cultures. *J Agric Food Chem* 55:9109-9117
- [28] Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3):473-497
- [29] Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16(3):144-158

- [30] Fujita Y, Uehara I, Morimoto Y, Nakashima M, Hatano T, Okuda T (1988) Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids. II. Inhibition mechanism of caffeetannins isolated from leaves of *Artemisia* species on lipoxygenase dependent lipid peroxidation. *Yakugaku Zasshi* 108(2):129-135
- [31] Park SN (1997) Skin aging and antioxidants. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 23(1):75-132
- [32] Jeong C-H, Choi S-G, Heo HJ (2008) Analysis of nutritional components and evaluation of functional activities of *Sasa borealis* leaf tea. *Korean J Food Sci Technol* 40(5):586-592
- [33] Park KJ, Park SH, Kim JK (2010) Anti-wrinkle activity of *Acanthopanax senticosus* extract in ultraviolet B (UVB)-induced photoaging. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39(1):42-46
- [34] Won CH, Kwon OS, Kang YJ, Yoo HJ, Lee DH, Chung JH, Kim KH, Park WS, Par NH, Cho K, Kwon SO, Choi J-S (2012) Comparative secretome analysis of human follicular dermal papilla cells and fibroblasts using shotgun proteomics. *BMB Rep* 45(4):253-258
- [35] Choi SY, Kang NJ, Kim HC (2006) Inhibitory effects of root extracts on melanin biosynthesis in *Rodgersia podophylla* A. Gray. *Korean J Medicinal Crop Sci* 14(1):27-30
- [36] Zamora R, Vodovotz Y, Billiar TR (2000) Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol Med* 6(5):347-373

[37] Leem HH, Kim EO, Seo MJ, Choi SW (2011) Anti-inflammatory effects of volatile flavor extract from herbal medicinal prescriptions including *Cnidium officinale* Makino and *Angelica gigas* Nakai. J Soc Cosmet Scientists Korea 37(3):199-210

[38] Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P (1993) Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. Proc Natl Acad Sci USA 90(15): 7240–7244

# 감사의 글

드디어 4년 6개월이 지나서야 졸업하게 되었습니다. 아무 것도 모를 학부 1학년 때 실험실에 들어가게 되어서 많은 경험을 하였고, 많은 분들을 알 수 있었습니다. 그렇게 하기 싫었던 세미나 준비도, 봄마다 취나물 채취하러 다니던 것도, 3개월 동안 지독히도 안되었던 클로닝도, 결과가 궁금해서 새벽부터 실험실에 나왔던 기억도 추억으로 남게 되었습니다.

저를 딸처럼 생각해주시는 류기중 지도교수님과 이동선 교수님, 제가 실험실에 들어갈 수 있게 해주시고 많은 걸 가르쳐주신 부경환 박사님과 이도승 박사님, 박사님이라고 부르고 싶은 전경용 팀장님, 저 때문에 고생을 많이 하고 있는 우진규(a.k.a. 장동건)님, 한참 나이 많은데도 저를 친구처럼 대해준 단방맹과 주초이, 쿠엔, 내 귀여운 후배인 소희와 석훈이, 지현, 송이, 승남에게 고마웠다고 말하고 싶습니다. 그리고 제가 힘들어할 때 위로해주었던 송인자 박사님과 보화, 현아한테도 진심으로 고마움을 느낍니다. 이렇게 졸업할 수 있게 도움을 주신 바이오스펙트럼 사장님과 회사 분들께 감사하며, 논문 쓰는 내내 투정을 받아준 은경이(a.k.a. 솔메)와 표현은 하지 않지만 저 때문에 더 아프고 힘들었을 가족들 사랑합니다.

지난 3년간 정말 많은 분들께 도움을 받았습니다. 너무나도 어렸고 단단하지 못했던 그 때의 저를 아직까지도 걱정해주고 격려해준 분들께 감사의 말을 전합니다.

You only get one shot, do not miss your chance to blow. This opportunity comes once in a lifetime.