

*Zymomonas mobilis*에 의해 생성된 Fructan (Levan)의 특성 및 화장품 원료로의 개발

이재섭¹, 양은경¹, 이정하¹, 김철호², 박수남³, 이종원⁴, 김기호¹

(주)바이오랜드 생명공학연구소¹, (주)리얼바이오텍 기술연구소², 서울산업대학교 정밀화학과³, 동국대 화학공학과⁴

요 약

Fructan(Levan)은 식물체 및 미생물에서 발견되는 탄수화물로 이는 과당(fructose)이 β -2, 6 결합으로 연결되어 있는 polysaccharide 이다. 본 연구에서는 Fructan을 생성하는 미생물(*Zymomonas mobilis*)과 10% sucrose(기질), 1-2% 효모 추출물을 주성분으로 하는 배지를 사용하여 30-37°C, pH 5.0-7.0에서 20-24시간 동안 배양한후 원심분리하여 균체를 제거하고 3배량의 알코올을 가하여 침전, 건조하여 얻은 Fructan의 화장품 원료로서의 가능성을 조사하였다. 보습효과에 있어서는 Hyaluronic acid와 유사하였으며, keratinocyte에 대한 세포증식 효과를 나타내었다. 또한 3-D culture에 의해 구축된 생인공 피부내에 0.05%의 sodium lauryl sulfate (SLS)를 사용하여 피부자극에 의한 초기 염증 반응을 유도한후 0.01mg/ml, 0.05mg/ml의 Fructan을 각각 처리하였을 때, SLS만을 처리한 생인공피부와 비교하여 세포증식효능을 보였고, SLS 자극물질로 유도된 전염증성 조절인자인 interleukin-1 α (IL-1 α)의 분비량을 조사 하였을때 0.01mg/ml, 0.05mg/ml의 Fructan을 처리한 생인공피부의 IL-1 α 양이 Fructan을 처리하지 않은 것보다 상대적으로 감소하였다. 이러한 결과로 Fructan이 생인공 피부내 피부 세포의 증식효과를 나타낼 뿐만 아니라, 또한 피부자극물질에 의한 염증반응에 대해 자극완화효능이 있음을 알 수 있었다. 섬유아세포 및 동물을 이용한 안전성 시험에서도 독성이 없는 안전한 원료로 평가되었다.

I. 서론

자연계에 존재하고 있는 다당류는 구성 탄수화물(structural carbohydrate)과 비구성탄수화물(non-structural carbohydrate)로 나누어진다. 구성탄수화물에는 섬유소(cellulose), 자일로글루칸(xyloglucan), 펙틴(pectin) 등이 속하며 비구성 탄수화물에는 설탕(sucrose), 전분(starch), 프럭탄(fructan)이 있다. 비구성 탄수화물 중에서 가장 잘 알려져 있는 것은 전분으로 이는 포도당(glucose)이 α -1, 4 결합만으로 연결되어 있는 아밀로스(amylose)와 α -1, 6 가지를 갖고 있는 아밀로펙틴(amylopectin) 두 종류가 있다. Fructan은 식물체 및 미생물에서 발견되는 제 3 의 비구성 탄수화물로 이는 과당(fructose)이 β -2, 6 결합으로 연결되어 있고 출처에 따라 β -2, 1 가지를 갖고 있는 다당류이다(1).

자연계에 존재하는 Fructan은 일반적으로 포도당 한 분자와 수십~수만개의 과당이 연결되어 있는 구조를 갖고 있다. 식물체 Fructan은 주로 200개 이내의 과당으로 이루어진 저분자량의 Fructan인 반면 미생물 Fructan은 과당이 십만개 까지도 연결될 수 있는 고분자량의 Fructan이다. Fructan은 결합방식에 따라 크게 이눌린(inulin) 타입과 레반(levan) 타입으로 나누어지고 있다. 이눌린 타입은 과당이 β -2, 1 결합으로 연결되어 있는 Fructan으로 가장 짧은 것으로는 1-ketose 가 이에 해당된다. 레반 타입은 과당이 β -2, 6 결합으로 연결되어 있는 Fructan으로 출처에 따라 서로 다른 정도의 β -2, 1 가지를 갖고 있으며 가장 짧은 것으로는 6-ketose가 이에 해당된다.

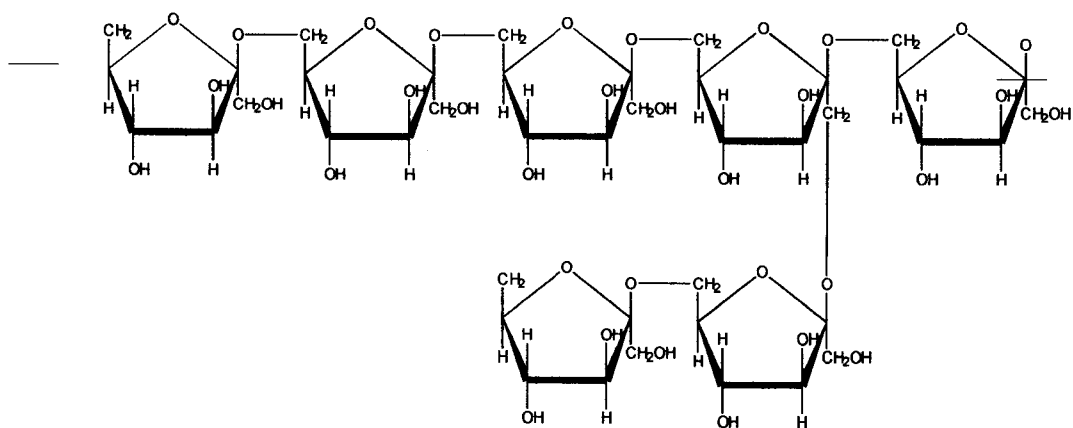


그림 1. Structure of Fructan(Levan)

꽃을 피우는 식물종의 15% 정도는 자연적으로 Fructan을 생성하고 있다. 특히 진화적인 관점에서 볼 때 Fructan은 가장 진화된 패밀리 중에서 발견되는 경향이 있다. 예를 들어

Fructan은 Liliales, Poales, Astrales, Campanulales, Palemoniaceae, Ericales, Dipsacales 및 보리, 밀, 양파, 치커리 등(2, 3)에 포함되어 있다. 현재 지구상에 있는 채소의 1/3은 Fructan을 포함하고 있는 것으로 추정되고 있다. 특히 Fructan을 생성하고 있는 대부분의 종들은 계절적으로 가물은 지역과 추운지역에 분포되어 있다. 이러한 사실로부터 식물체에서 Fructan의 가물에 대한 삼투보호제(osmoprotectant)로서의 기능과 추위에 대한 냉해보호제(cryoprotectant)로서의 기능(4, 5)을 하는 것으로 알려져 있다.

현재까지 *Pseudomonas sp.*, *Xanthomonas sp.*, *Azotobacter chroococum*, *Streptococcus salivarius*, *Basillus subtilis*, *Actinomyces viscosus*, *Rothis dentocariosa*, *Arthrobacter ureafaciens*, *Zymomonas mobilis* 등(6-14)과 같은 다수의 미생물이 Fructan을 생성하는 것으로 알려져 있다. 미생물에서 생성되고 있는 대부분의 Fructan은 레반 타입으로 식물체가 생산하는 Fructan에 비하여 분자량이 큰 다당류이다.

Fructan계 다당류(levan)는 식품, 의약품, 화장품 등에 적용할 수 있는 다음과 같은 다양한 영양학적, 생물학적 및 물리학적 기능들을 가지고 있다.

콜레스테롤(cholesterol) 및 지방(triacylglycerol) 흡수 저해 기능: 레반을 포함한 Fructan은 장내에서 지방의 흡수를 저해하는 hypocholesterolemic effect를 가지고 있다(15).

금속이온 흡수 촉진작용: Fructan은 2가 금속이온의 체내흡수를 촉진하는 기능을 가지고 있어 빈혈, 골다공증의 예방기능과 스포츠 음료에서 이온흡수 촉진기능을 가지고 있다(16).

Fructan 중에서도 특히 레반은 난 소화성 수용성 다당류로 뛰어난 식이섬유기능을 가지고 있어 변비예방 및 다이어트식품 기능을 가지고 있다(17). Fructan은 항암 및 면역증강 기능을 가지고 있다(18). 위와 같은 다양한 기능을 가진 Fructan은 앞으로 식품이나 의약품의 원료뿐만 아니라 화장품 원료로서도 사용이 기대되어지기에 본 연구에서는 *Zymomonas mobilis*에 의해 생성된 Fructan의 특성을 조사하고 화장품 원료로서의 가능성을 검토하여 신규원료로 개발하고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

*Xymomonas mobilis*로부터 Fructan(Levan)의 제조(19, 20)

Fructan(Levan) 생성 미생물인 *Xymomonas mobilis*를 10% sucrose 와 1-2% 효모 추출물을 주성분으로 하는 배지를 사용하여 30-37°C, pH 5.0-7.0에서 20-24시간 동안 배양한 후 원심분리하거나 0.2-0.4마이크론 막을 사용하여 균체를 제거 한 후 얻어진 다당류를 포함하고 있는 용액에 2-3배량의 알코올을 가하여 다당류를 침전 시킨 후 건조하여 Fructan 분말을 얻을 수 있었다.

Fructan의 구조 분석

Fructan의 구조 분석은 Varian Gemini-200 ¹³C-NMR spectroscopy를 사용하였으며 알려진 문헌의 값과 비교하였다.

보습력 측정

데시케이터를 이용한 보습력 측정

각각의 시료 5g을 CaCl₂가 들어있는 데시케이터 중에서 상대온도 65%, 37°C에서 방치하고, 중량변화를 경시적으로 측정하였다.

Corneometer를 이용한 보습력 측정

Corneometer CM 825를 이용하여 피부의 보습력 변화를 측정하였다. 실험자의 팔 안쪽 4cm²의 피부에 10 μ l의 샘플을 도포하여 일정 시간 간격으로 피부의 수분 함량 변화를 측정하였다. 실험은 실내 온도 20°C, 상대 습도 20%에서 이루어졌다.

세포독성 측정

사람 섬유아세포 및 Keratinocyte를 10% FBS(Fetal Bovine Serum, GIBCO BRL)를 함유하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 100 μ l로 증족된 10⁴ cell/well의 밀도를 가진 96 well plate에 놓았다. 그리고 24시간 동안 배양(37°C, 5% CO₂)하였다. 샘플을 첨가한 후, 세포들은 또 24시간 동안 배양 하였다. 세포들의 생존과 증식은 MTT assay에 의해 측정되었다. MTT 용액(100 μ l)은 각 wells에 첨가되었고 4시간 동안 배양 하였다. Overnight 후, 10% SDS를 함유하는 0.01M HCl 100 μ l를 첨가했다. 형성된

Formazan은 ELISA reader를 사용하여 570nm에서 흡광도를 읽음으로 측정하였다.

삼차원 생인공피부를 이용한 조직 세포의 증식 시험(MTT conversion assay)

생인공피부에서의 MTT assay는 monolayer culture system 방법을(21) 기초로 하여 이 실험에 맞게 변형시켜 실시하였다. 배양 배지는 새로운 배지로 교체되고 각 insert 내에 10 μ l의 피부자극물질(SLS : sodium lauryl sulfate)을 투여하고 4시간 뒤 각 농도의 Fructan을 10 μ l 적용한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 24시간 동안 배양한다. PBS를 이용 세척한 후 MTT 용액(0.33mg/ml)을 각 well에 투여한다. 4시간 동안 incubator에 방치한 후 isopropanol로 24시간 동안 실온에서 추출한다. 이용액을 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

삼차원 생인공피부에서의 항염증 효능평가(Interleukin-1 α release assay)

생인공피부에서의 MTT assay는 monolayer culture system 방법을(21) 기초로 하여 이 실험에 맞게 변형시켜 실시하였다. 배양 배지는 새로운 배지로 교체되고 각 insert 내에 10 μ l의 피부자극물질(SLS : sodium lauryl sulfate)을 투여한 후 4시간 뒤 각 농도의 Fructan을 10 μ l 적용한후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 24시간 동안 배양한다. PBS를 이용 세척한 후 MTT 용액(0.33mg/ml)을 각 well에 투여한다. 4시간 동안 incubator에 방치한 후 isopropanol로 24시간 동안 실온에서 추출한다.

Interleukin-1 α assay는 ELISA kit(from Endogen Inc. Boston, MA, USA)를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

에탄올 함량에 따른 Fructan의 안정성 측정

고형분 5% Fructan 수용액에 10-50%까지 에탄올을 첨가하여 상온, 냉장, 40 $^{\circ}$ C에서 45일간 침전이나 성상변화를 관찰하였다.

입자크기 측정

입자의 크기는 ELS-8000(Otsuka Electronics)로 측정하였다.

동물의 안전성 측정

토끼에 대한 안점막자극시험

Fructan이 토끼의 안점막에 접촉 후 국소적으로 나타내는 안자극성을 검토하기 위하여 건강한 수컷 뉴질랜드산 white rabbit의 한 쪽 눈에 시험 물질을 1회 처치하고, 처치하지 않은 한 쪽 눈을 대조군으로 하여 각막, 홍채 및 결막의 손상 정도를 식품의약품안전청 고시 제 96-8호 “의약품등의 독성시험기준(1996.4.16. 제정)”의 제 10조 국소독성시험법에 따라 실시하였다.

토끼에 대한 피부 자극 시험

Fructan의 토끼에 대한 피부자극시험을 수컷 뉴질랜드산 white rabbit를 이용하여 투여 후 72시간까지 식품의약품안전청 고시 제 96-8호 “의약품등의 독성시험기준(1996.4.16. 제정)”에 따라 실시하였다.

토끼에 대한 급성경구독성 시험

Fructan의 토끼에 대한 급성 경구 독성을 조사하기 위하여, 본 제제를 5% 수용액으로 하여 뉴질랜드산 white rabbit에 투여할 수 있는 최대용량인 체중 kg당 5ml를 1회 경구 투여하여 14일간 관찰하였다.

토끼에 대한 급성경피독성

Fructan의 토끼에 대한 급성경피독성을 조사하기 위하여, 본 제제 5% 수용액을 OECD 독성시험 가이드라인(22)의 급성경피독성시험 규정을 참조로 하여 체중 kg당 2ml를 1회 경피투여하여 14일간 관찰하였다.

Guinea pig에 대한 피부감작성시험

Fructan의 생체에 대한 접촉 알러지 유무를 검색하기 위하여 Guinea pig에 있어서 본 제제의 피부 감각에 의한 접촉 알레르기 유무를 Maximization법(23)에 따라 수행하였다. 유도단계에는 제모한 Guinea pig의 경배부(6X4cm)에 시험물질 0.1ml, Freund's complement adjuvant(FCA) 0.1ml, 시험물질과 FCA 유화물 0.1ml를 2부위에 피내주사하였다. 1주후에 같은 부위에 자란 털을 깎고 10% sodium lauryl sulfate(petrolatum)로 약한 자극을 유발한 다음에 동물 당 1ml의 액상의 시험물질을 가로 2cm, 세로 4cm의 watman No. 3 filter paper에 시험물질 1ml를 골고루 도포한 다음 부착시키고 그 위에 비침투성의 플라스틱 테이프로 떨어지지 않게 24시간동안 폐쇄도포하고 압박붕대로 안전하게 감아두었다. 24시간 후에 시험부위에 남아있는 시험물질을 깨끗이 닦아낸 후에 흥반

및 부종이 있는지의 여부를 확인하고 Magnusson과 Kligman의 평가기준(23)에 의하여 관찰하였다.

III. 결과 및 고찰

Fructan의 구조 분석 결과

^{13}C -NMR을 이용하여 측정한 spectrum의 chemical shift값과 pattern은 문헌에 알려진 값과 비교한 결과 C-1(60.2ppm), C-2(104.3ppm), C-3(76.5ppm), C-4(75.4ppm), C-5(80.2ppm), C-6(63.5ppm)로 거의 동일한 결과로 나타났으며, β -2, 6결합에 β -2, 1의 branch가 결합된 구조인 것을 확인하였다(24, 25).

Fructan의 세포독성 측정

그림 2, 3은 MTT assay에 의한 세포독성 및 세포증식 효과에 대한 결과를 보여주고 있다. 사람 섬유아세포 및 keratinocyte를 10% FBS(Fetal Bovine Serum, GIBCO BRL)를 함유하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 100 μl 로 충족된 10^4 cell/well의 밀도를 가진 96 well plate에 놓았다. 그리고 24시간 동안 배양(37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2)하였다. 샘플을 첨가한 후, 세포들은 또 24시간 동안 배양 하였다. 세포들의 생존과 증식은 MTT assay에 의해 측정되었다. MTT 용액(100 μl)을 각 wells에 첨가하여 4시간 동안 배양 하였다. Overnight 후, 10% SDS를 함유하는 0.01M HCl 100 μl 를 첨가했다. 형성된 formazan은 ELISA reader를 사용하여 570nm에서 흡광도를 읽음으로 측정하였다. 섬유아세포에 대한 독성은 없는 것으로 나타났으며 keratinocyte에 대해서는 세포 증식능을 보여 주었다.

Fructan의 보습효과

그림 4는 데시케이터를 사용하여 1% Hyaluronic acid와 5% Fructan solution과의 비교 보습 결과를 나타내고 있다. 그림 5는 Corneometer를 이용한 0.2% Fructan 및 Haluronic acid의 보습 결과이며 Fructan은 Hyaluronic acid와 비교시 거의 유사한 보습결과를 나타내었다.

삼차원 생인공피부를 이용한 조직 세포의 증식 시험(MTT conversion assay)

3-D culture에 의해 구축된 생인공피부내에 0.05%의 Sodium lauryl sulfate (SLS)를 사용하여 피부자극에 의한 초기 염증 반응을 유도한 후 0.01mg/ml, 0.05mg/ml의 Fructan을 처리하였을 때, SLS만을 처리한 인공피부와 비교하여 세포 증식 효능을 보였다(그림 6). 이러한 결과로 Fructan이 생인공피부내 피부 세포의 증식에 효과를 있음을 알았다.

삼차원 생인공피부에서의 항염증 효능평가(interleukin-1 α release assay)

3-D culture에 의해 구축된 생인공피부내에 0.05%의 Sodium lauryl sulfate (SLS)를 사용하여 피부자극에 의한 초기 염증 반응을 유도한 후 0.01mg/ml, 0.05mg/ml의 Fructan을 처리하여 전염증성 조절인자인 interleukin-1 α (IL-1 α)의 분비량을 조사 하였을 때 0.01mg/ml, 0.05mg/ml의 Fructan을 처리한 인공피부의 IL-1 α 양이 Fructan을 처리하지 않은 것보다 상대적으로 감소하였다(그림 7). 이러한 결과로 Fructan이 피부자극물질에 의한 염증반응에 대해 완화 효능이 있음을 알 수 있었다.

Fructan의 에탄올 안정성 결과

고형분 5%의 Fructan 수용액에 에탄올 10-50%(w/w) 까지 첨가하여 혼화성 및 안정성을 측정하였다. 측정 결과 에탄올에 대한 혼화성이 우수 하였고 각 에탄올 농도별 냉장, 상온, 45 $^{\circ}$ C에서 45일동안 성상 변화없이 안정한 결과를 나타내었다(표1).

Fructan의 입자크기 측정

ELS-8000(Otsuka Electronics)를 이용하여 Fructan의 입자 크기를 측정한 결과 224.3nm로 나타났다(그림 8).

동물실험에 의한 Fructan의 독성 실험

토끼에 대한 안점막자극시험 결과

토끼에 대한 안점막자극시험결과 전 동물에서 시험 전 기간을 통해 본 시험물질에 의한 것이라고 인정되는 임상증상, 체중변화의 이상은 관찰되지 않았다.

검체 투여 후 1, 2, 3, 4 및 7일에 각각 홍채, 결막에 대한 안구병변의 등급을 점수한바, 검체 투여에 의해 유발된 어떠한 안구병변도 관찰되지 않았다.

토끼에 대한 피부자극시험 결과

전 동물에서 시험 전 기간을 통해 본 시험물질에 의한 것이라고 인정되는 임상증상, 체중 변화 및 부검소견의 이상은 관찰되지 않았다. 시험물질 도포 부위의 홍반과 가피형성 및 부종 등의 자극성은 인정되지 않았으며, Draize의 P.I.I.(Primary irritation index)의 산출에 의한(26, 27) 피부 1차 자극율은 “0”으로 평가되었다. 이상의 결과로 보아 뉴질랜드산 white rabbit에 있어서 Fructan은 “비자극 물질”로 사료 된다.

토끼에 대한 급성경구독성 시험 결과

본 시험에 있어서 시험 전 기간을 통해 사망 예는 전혀 관찰되지 않아 LD₅₀의 산출은 불가능하였고, 일반적 임상증상에서 아무런 이상이 발견되지 않았으며, 체중변화등 어떤 유의할 만한 이상은 관찰되지 않았다. 따라서 본 Fructan은 토끼에 투여할 수 있는 최고용량인 체중 kg당 5ml의 용량으로 경구투여시, 사망예는 물론 어떠한 유의한 임상증상도 관찰되지 않아 토끼에 있어서 어떠한 급성경구독성 및 부작용을 유발하지 않는 안전한 것으로 사료된다.

토끼에 대한 급성경피독성 결과

Fructan의 토끼에 대한 급성경피독성을 조사 결과 전 기간을 통해 사망 예는 전혀 관찰되지 않아 LD₅₀치의 산출은 불가능하였으며, 일반적 임상증상에서 아무런 이상이 발견되지 않았으며, 체중변화 등 어떤 유의할 만한 이상은 관찰되지 않았다.

Guinea pig에 대한 피부감작성시험 결과

Fructan의 생체에 대한 접촉 알러지 유무를 검사하기 위하여 기니피크에 있어서 본 제제의 피부감작에 의한 접촉 알러지 유무를 Maximization법에 따라 수행한 결과, 본 제제는 접촉 알러지 급수에 있어서 무반응으로 반응빈도에 있어서도 0%로 나타나 grade I로 판정되어 Fructan은 기니피크에 있어서 어떠한 접촉 알러지를 유발하지 않는 것으로 판정되었다.

IV. 결론

다당류에 대한 연구는 매우 오래전부터 이루어져 왔으며 식품, 의약품, 화장품등 여러 산업분야에서 제품화되고 있다. 식물체나 미생물이 생산하는 Fructan의 기초적인 생산 기작 및 유용성 등은 여러면에서 발표되고 있으나 그에 대한 특성 연구가 부족하여 화장품 원료로서의 개발 가능성이 낮은 실정이었다. 이에 본 연구를 통해 보습 및 자극완화제로서 화장품 원료로의 개발 가능성을 검토하고자 하였다. *Xymomonas mobilis*에 의해 생성된 Fructan은 보습 및 피부 자극 완화에 우수한 효과를 나타내었고, 섬유아세포나 동물의 안정성 실험에서도 안전한 원료로 평가되었기에 새로운 화장품 신규 원료로 사용 가능성이 높음을 시사하였다. 향후 Fructan의 다양한 용도개발을 위해서는 물성이나 생리학적 활성에 대해 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

참고 문헌

- 1) Dedonder R Levansucrase from *Bacillus subtilis*. *Methods Enzymol* (1966) 8 : 500-505
- 2) Bonnett GD, Sims IM, Simpson RJ, Cairns AJ *New Phytol* (1997) 136 : 11-17
- 3) Carpita NC, Kanabus J, Housley TL *J Plant Physiol* (1989) 134 : 162-168
- 4) Hendry GAF, Wallace RK The origin, distribution, and evolutionary significance of fructan. In M Suzuki, NJ Chatterton, eds, Science and Technology of fructan. *CRC Press, Boca Raton, FL*, (1993) pp 119-139
- 5) Pilon-Smits EAH, Ebskamp MJM, Paul MJ, Jeuken MJW, Weisbeek PJ, Smeekens SCM *Plant Physiol* (1995) 107 : 125-130
- 6) Pabst, M.J. *Infect. Immun.* (1977) 15, 518-526
- 7) Warner, T.N., and Miller, C. H. *Infect. Immun.* (1978) 19, 711-719
- 8) Tanaka, K., Karigane, T., Fujii, S., Chinzaka, T., and Nagamura, S. *J. Biochem. (Tokoyo)* (1985) 97, 1679-1688.
- 9) Dedonder, R., and Peaud-Lenoel, C. *Bull Soc. Chim. Biol.* (1957) 39, 483.

- 10) Fuchs, A. *Nature(London)* (1956) 178, 921.
- 11) Leshner, R. Ph.D. (1976) Thesis, West Virginia Univ., Morgantown.
- 12) Ribeiro, J.C.C., Guimarues, W.V., Borges, A.C., Silv, D.O., and Crug, C.D. *Rev. Microbiol.* (1988) 19, 196-201
- 13) Schlubach, H.H., and Berndt, J. *Ann. Chem.* (1964) 677, 172.
- 14) Tanaka, T., Yamamoto, S., Oi, S., and Yamamoto, T. *J. Biochem.(Tokoyo)* (1981) 90, 521-526.
- 15) Yamamoto, Y., Takahashi, Y., Kawano, M., Iizuka, M., Matsumoto, S., Saeki, S., and Yamaguchi, H., *J. Nutr. Biochem.* (1999) 10 : 13-18
- 16) Ohta, A., Osakabe, N., Yamada, K., Saito, Y., and Hidaka, H. *J. Jap. Soc. Nutr. Food Sci.* (1993) 46, 123-129
- 17) Calazans GMT, Lopes CE, Lima RMOC, Franca FP. *Biotec. Letters* (1997) 19 : 19-21
- 18) Roberfloid, M.B., Gibson, G. R., and Delzenne, N. *Nutr. Rev.* (1993) 51, 137-146
- 19) Song, K. B. & S. K. Rhee. *Biotechnol., Lett.* (1994) 16 : 1305-1310.
- 20) Hafedh Belghith, K. B. Song., C. H. Kim., S. K. Lhee *Biotechnol., Lett.* (1996) 18 : 467-472
- 21) Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* (1983) 65 : 55-63
- 22) OECD 毒性試験, 薬業時報社, 東京, 1991.
- 23) Magnusson, B and Klingman, A. M., J. : *Invest. Dermatol.*, (1969) 52, 268, : The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J. Invest. Derm.* (1969) 52 : 268-276
- 24) Alfred D. French *J. Plant Physiol.* (1989) Vol. 134. 125-136
- 25) Youn W. Han *J. Inderstrial Microbiology*, (1989) 4 : 447-452
- 26) Draize J.H.(1959) : Dermal toxicity. Assoc. Food and Drug officials, U.S. Appraisal of the Safety of chemicals in Food, Drug and Cosmetics. pp46-59, Texas State Dept. of Health, Austin, Texas
- 27) Federal Register (1973) : Method of testing Primary irritant substances. 38(187) : pp1500-1541

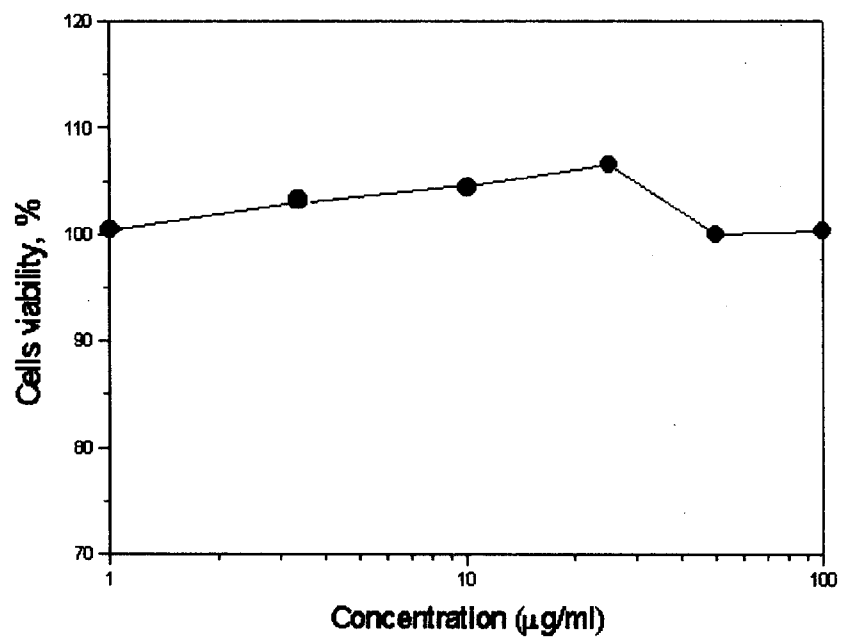


그림 2. 섬유아세포를 이용한 Fructan의 세포독성

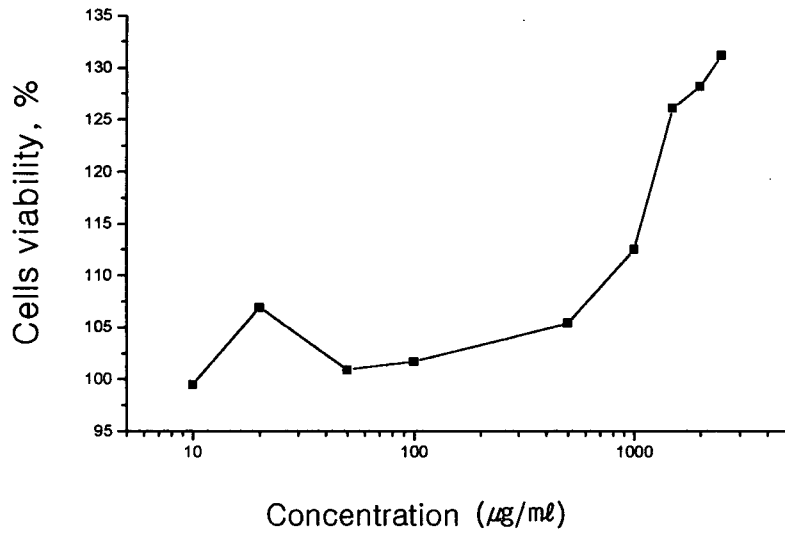


그림 3. Keratinocyte를 이용한 세포증식 효과

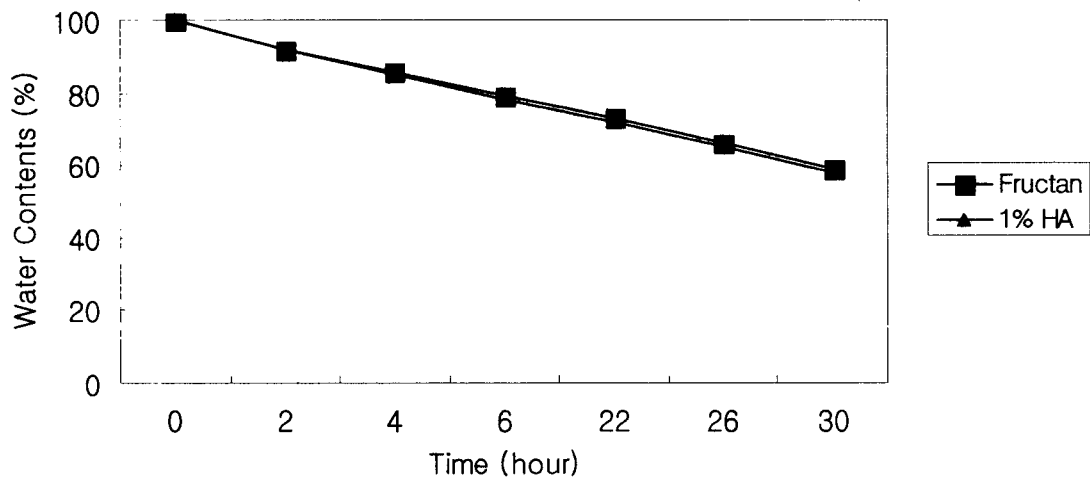


그림 4. Dessicator를 이용한 Fructan의 보습력

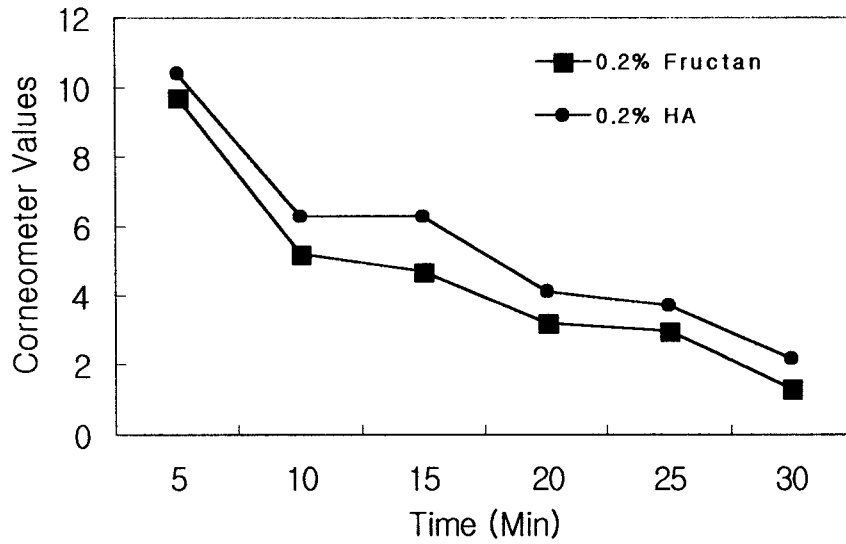


그림 5. Corneometer를 이용한 Fructan의 보습력

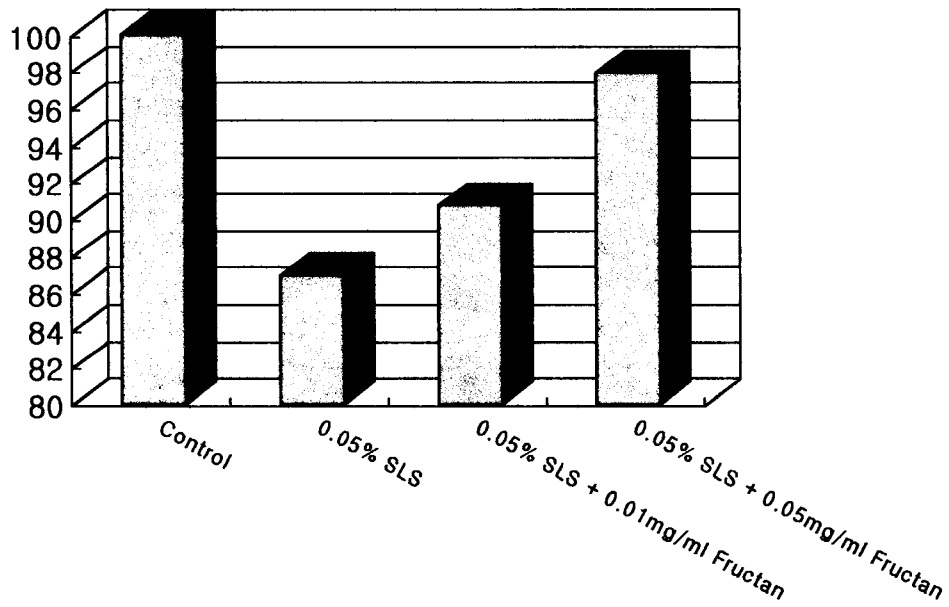


그림 6. 3-D 인공 피부를 이용한 세포 증식 효과

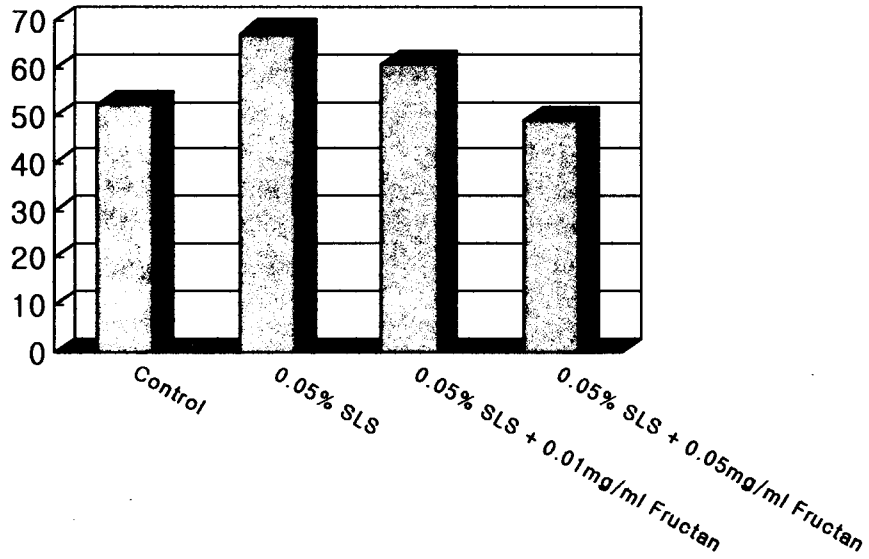


그림 7. 3-D 인공 피부를 이용한 피부 자극 완화 효과

시간 에탄올 함량	7일	15일	30일	45일
10%	안정	안정	안정	안정
20%	안정	안정	안정	안정
30%	안정	안정	안정	안정
40%	안정	안정	안정	안정
50%	안정	안정	안정	안정

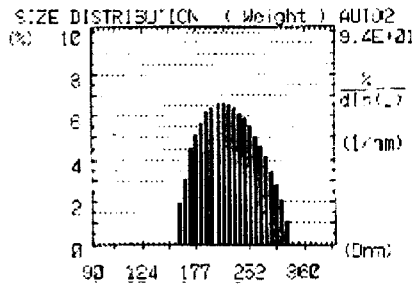
표 1. 에탄올 함량별 Fructan의 안정성

5% Fructan

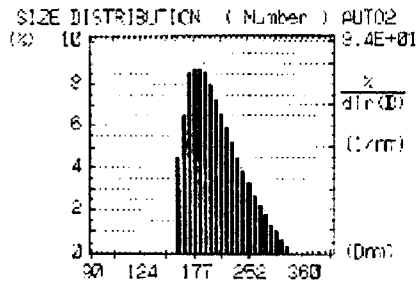
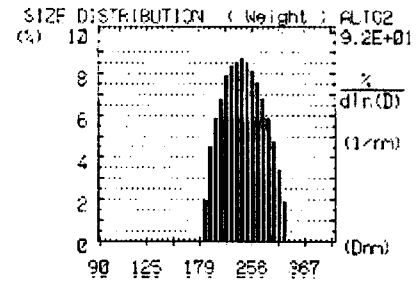
: Diameter 224.3 nm

5% Fructan을 20% EtOH 화한 것

: Diameter 251.8 nm



Weight



Number

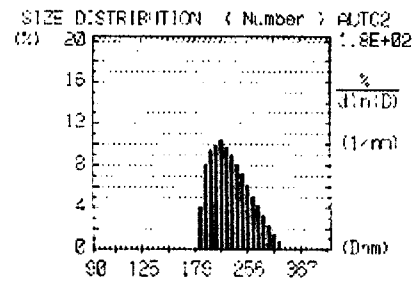


그림 8. Fructan의 입자 크기