

고부가가치식품기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호
11-1543000-003512-01

초음파 활용 실크펩타이드 제조기술 개발

2020.12.31.

주관연구기관/농업회사법인 에스에스바이오팜(주)

협동연구기관/한국식품연구원

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “초음파 활용 실크렙타이드 제조기술 개발” (개발기간 : 2018.04.30.
~ 2020.12.31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020.12.31

주관연구기관명 : (농)에스에스바이오팜(주) (대표자) 김옥희 (인)
협동연구기관명 : 한국식품연구원 (대표자) 박동준 (인)



주관연구책임자 : 이 강 우

협동연구책임자 : 송 경 모

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	118060-03	해 당 단 계 연 구 기 간	2018.04.30. -2020.12.31	단 계 구 분	1/1
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	초음파 활용 실크펩타이드 제조기술 개발			
연구책임자	이강우	해당단계 참여연구원 수	총: 16명 내부: 16명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부:266,000천원 민간:66,500천원 계:332,500천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 18명 내부: 18명 외부: 명	총 연구개발비	정부:745,000천원 민간:186,250천원 계:931,250천원
연구기관명 및 소속부서명	에스에스바이오팜			참여기업명	한국식품연구원
※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음					
연구개발성과의 보안등급 및 사유					

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고 서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호		10-21520 77, 10-21614 54									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월 일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약

- 초음파를 활용한 실크 펩타이드 제조 공정 확립
 - 가용화율 70% 이상 달성
 - 기존 공정 대비 염농도 96% 저감 (50%→0.4%)
 - 10kDa 및 5kDa 이하 펩타이드의 비율 87.8%, 61.7%
 - 세리신 정련 과정 및 탈염 과정 생략으로 공정 간소화
- 실크펩타이드의 생리활성 확인
 - 파파인 분해 실크펩타이드의 피부세포에서 염증성 인자인 COX2, iNOS 등의 발현양 감소 확인
 - 브로멜라인 분해 실크펩타이드의 인간혈관세포에서의 NO 생성능 증가를 통한 혈관 이완 효과 확인
- 건강기능식품 2종, 일반식품 1종 제품 개발
- 논문발표 3건, 특허등록 2건, 총 10명 고용 창출
- 활용계획: 개발한 저분자 실크 펩타이드를 활용한 스포츠 식품, 제과류를 포함한 식음료 제품 개발
- 기대성과: 공정 중 케미컬 사용량 저감, 공정 단계 간소화, 공정 시간 단축 등으로 생산 원가 절감 및 생산 수율 증진을 통한 가격 경쟁력이 확보된 제품 생산 기대

보고서 면수

160

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>기능성 실크 펩타이드의 생산 최적화를 위한 초음파 활용 공정 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 초음파 활용 실크 펩타이드 제조 공정 개발 ○ 용매 염농도 저감, 공정 시간 단축 및 공정 간소화 ○ 실크 펩타이드의 분자량 조절을 통한 생리활성 강화
<p>연구개발성과</p>	<p>1. 실크펩타이드의 분자량 조절 기술</p> <ul style="list-style-type: none"> - 실크단백질에 4종의 단백질 분해효소(papain, pancreatin, bromelain, fungal protease)를 처리하여 SDS-PAGE 분석한 결과 4종 효소 모두 단백질을 분해하였으나 파파인 처리 샘플이 5 kDa 이하에서 전반적으로 좁은 범위의 분자량 분포를 보이는 반면, 다른 3종 효소는 수십 kDa에서 수백 Da의 넓은 범위의 분자량 분포를 보임. - 50% CaCl₂를 사용한 기존방법 대비 누에고치에 0.1 M NaOH를 100 배량 가하여 4시간 초음파 처리(20 kHz, 600 W, 25°C) 후 pH 7로 중화한 용액에 파파인을 처리했을 때 반응 30분만에 대부분이 5kDa 이하로 분해되었고, 24시간 후에는 1.4kDa 부근에서 가장 높은 피크가 검출되었으며, 최종적으로 크로마토그램 상에서 5kDa 이하의 분자량을 가지는 펩타이드의 면적비가 79%로 확인. →기존 방법 대비 염농도 96% 이상 감소 →전체 공정시간 25% 이상 단축(4일→3일) - 파파인에 의해 분해된 펩타이드는 JB6 P+에서 COX-2의 발현 및 대사산물인 PGE2 억제를 통해 피부염증 완화에 효과가 있으며 이와 관련된 인자가 ERK인 것을 확인. - 브로멜라인에 의해 분해된 펩타이드는 인간혈관세포 HUVEC에서 NO 생산량이 가장 높게 관측되었으며 혈관 이완능에 효과가 있음을 확인. <p>2. 초음파 활용 실크펩타이드 생산 기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 누에고치의 가용화를 위하여 100배량(w/v)의 0.1 M 의 수산화나트륨 용액을 가하여 25°C, 4시간, 600W, pulse on/off 20s/20s 조건에서 초음파를 병행 처리한 결과 기존의 공정에 비해 세리신 정련 과정 생략 등으로 가용화처리 단계를 간소화할 수 있으며 낮은 농도의 염을 사용하면서도 높은 수율의 가용화 단백질을 얻을 수 있음을 확인. - 실크 펩타이드 제조를 위한 효소 분해 공정에서 초음파를 병행 처리하여 반응 촉진 효과를 확인하고자 하였으나, 모든 초음파 출력 조건에서 효소의 활성이 감소하였고 효소 단독 처리구에 비해 초음파 병행 처리구에서 10kDa 이상 고분자 분획이 많이 남아 있는 결과를 보아 효소 처리 공정에 있어 초음파를 병행 단독으로 처리하는 것이 저분자 실크 펩타이드 제조에 유리할 것으로 판단. - 대량생산 공정 최적화에 앞서 small pilot-scale의 순환형 초음파 장치를 활용하여 최적 공정을 확립하였으며 장치의 특성상 누에고치를 분쇄하여

이용하였고, 0.1 M NaOH 용액을 가하여 1시간 상온에서 초음파 처리 (20kHz, 출력 800W 이상)를 2회 반복 시 70% 이상 가용화 됨을 확인.

- 대량생산용 초음파 장치를 활용하여 실크 단백질의 가용화를 확인한 결과, 0.1 M NaOH 용액을 사용하여 상온에서 3시간 처리 후 가용화율은 43.9%로 확인되었으며, 파파인 효소 5%(w/w), 24시간 처리 후 분자량 10kDa 및 5kDa 이하 펩타이드의 비율이 크로마토그램 면적비로 87.8%, 61.7%로 검출됨.

3. 초음파 활용 실크펩타이드 대량공정 표준화[부록3-1]

- 기능성 실크 펩타이드의 생산 최적화를 위한 초음파 활용 공정 표준화

4. 사업화 성과

① 건강기능식품 2개, 일반식품 1개 제품개발[부록2-1, 2-2]



② 매출

시제품개발의 지연으로 인해 2021년 사업화 진행예정.

5. 논문발표 3건[부록4-1,4-2,4-3]

① Food science and biotechnology / Extraction conditions for Rosa gallica petal extracts with anti-skin aging activities / 2019.02

② Ultrasonics Sonochemistry / Silk peptide production from whole silkworm cocoon using ultrasound and enzymatic treatment and its suppression of solar ultraviolet-induced skin inflammation / 2020.03

③ Algal research / Production of Undaria pinnatifida sporophyll extract using pilot-scale ultrasound-assisted extraction: Extract characteristics and antioxidant and anti-inflammatory activities / 2020.04

6. 특허출원 2건[부록6]

① 피부염증 개선 활성이 우수한 누에고치 유래 파파인 효소 분해물 및 이의 용도 / 10-2019-0064606

② 혈관 이완능 및 항염 활성이 우수한 누에고치 유래 브로멜라인 효소 분해물 및 이의 용도 / 10-2019-0064628

7. 특허등록 2건[부록7]

	<p>① 피부염증 개선 활성이 우수한 누에고치 유래 과파인 효소 분해물 및 이의 용도 / 10-2152077</p> <p>② 혈관 이완능 및 항염 활성이 우수한 누에고치 유래 브로멜라인 효소 분해물 및 이의 용도 / 10-2161454</p> <p>8. 품목신고용 시험검사성적서 및 영양성분 성적서 4건(제품개발)[부록1]</p> <ul style="list-style-type: none"> - 식품 허가, 인증신청 및 신고 검사용 시험검사성적서(한국분석기술연구원) : (SS)에스에스혈행솔루션 - 식품 허가, 인증신청 및 신고검사용 시험검사성적서(한국기능식품연구원) : (SS)에스에스스킨솔루션 - 영양성분 시험검사성적서(한국분석기술연구원) : (SS)에스에스혈행솔루션, (SS)에스에스스킨솔루션 <p>9. 고용과급효과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 기술개발 진행단계에서 총 10명 고용 창출(연구개발 외) <p>10. 기술실시[부록8]</p> <ul style="list-style-type: none"> - 성과활용명 : 초음파 활용 실크펩타이드 제조기술 개발/직접실시/노하우 <p>11. 기타성과[부록9]</p> <ul style="list-style-type: none"> - 충청남도기업인대상 창업대상 수상 - 무역의 날 수출탑 표창장 및 백만불 수출의 탑 수상 - 한국산학연합회장상 수상 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>○ 활용계획: 개발한 저분자 실크 펩타이드를 활용한 스포츠 식품, 제과류를 포함한 식음료 제품 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> -식음료품 분야: 식품첨가물의 대체재 역할, 원료비용 절감, 베이커리 제과 분야에 활용 가능 -조제약 분야: 단백질은 인체가 면역력을 높이는데 영향을 미치는 필수 아미노산과 연관되어 있기 때문에 제약 및 의료 산업에서도 관심이 증가하는 추세이므로 활용 기대 <p>○ 기대성과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 공정 중 케미컬 사용량 저감, 공정 단계 간소화, 공정 시간 단축 등으로 생산 원가는 절감하고 생산 수율은 증진시킴으로써 가격 경쟁력이 확보된 제품 생산 기대 - 펩타이드의 분자량 조절을 통해 특정 기능성 강화 제품 생산 - 기존 업체들이 시장을 선점한 상황에서 신규 기능성 제시 혹은 기능성 강화 소재 생산으로 경쟁력 확보 기대 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	실크 펩타이드	초음파	저분자	공정개선	기능성 소재
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	silk peptide	ultrasonication	low molecular weight	process development	functional materials

<본문목차>

< 목 차 >

1장 연구개발과제의 개요	11
1절 연구개발 목적	11
2절 연구개발의 필요성	12
3절 연구개발 범위	17
2장 연구수행 내용 및 결과	19
1절 연구개발의 추진전략·방법 및 추진체계	19
1. 연구개발 추진전략	19
2. 제품화전략	20
3. 사업화 확대 전략	21
4. 시장진입을 위한 단계적 지원전략	21
2절 연구개발 추진 체계	23
3절 추진일정	24
4절 연구기관 현황	25
5절 연구개발 성과 및 결과	30
1. 연구개발성과	30
2. 기술개발세부실적	32
3. 기술적 성과	59
4. 경제적 성과	70
3장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	72
1절 목표 및 달성도	72
1. 정량적 목표 및 달성도	72
2. 연차별 연구개발 세부 목표 및 결과	73
3. 목표 미달성 사유 및 차후대책	76
4장 연구결과의 활용 계획 등	77
1절 연구개발 결과의 활용방안 및 기대성과	77
1. 연구개발 결과의 활용방안	77
2. 기대성과 및 파급효과	77
붙임1. 참고문헌	78
붙임2. 부록	79

- <별첨> 연구개발보고서 초록
 주관연구기관의 자체평가의견서
 연구결과활용계획서

1장. 연구개발과제의 개요

1절. 연구개발 목적

1. 최종목표

- 기능성 실크 펩타이드의 생산 최적화를 위한 초음파 활용 공정 개발
 - 분자량 5 kDa 이하의 저분자 실크 펩타이드 생산
 - 최종 수율 70% 이상
 - 기존 공정 대비 염농도 50% 이상 감소 및 전체 공정 시간 30% 이상 단축



< > 초음파 활용 실크 펩타이드의 생산 공정 예상 모식도

2. 세부목표

- 초음파 활용 실크 펩타이드 제조 공정 개발
- 용매 염농도 저감, 공정 시간 단축 및 공정 간소화
- 실크 펩타이드의 분자량 조절을 통한 생리활성 강화

2절. 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 개요

- 연구개발 개요: 초음파 기술을 활용한 저분자 실크 펩타이드 생산 공정 개발
- 핵심기술
 - 펩타이드 분자량 조절 기술: 고기능성의 저분자 실크 펩타이드를 생산하기 위한 가용화 및 단백질 가수분해 효소 처리 기술
 - 초음파 활용 실크 펩타이드 생산 기술: 초음파 추출 기술을 활용함으로써 기존의 복잡한 공정을 개선 및 간소화

2. 연구개발 대상의 국내·외 현황

- 기술현황
 - 실크 펩타이드는 항산화, 면역 증강, 인지 능력 개선, 항당뇨 등 다양한 생리활성을 가진 것으로 알려져 있으며, 실크 단백질의 효소 가수분해물에서 분리한 티로신-글리신 펩타이드가 인지능력 향상에 효과가 있는 것이 국내 연구진에 의해 밝혀짐¹⁾.
 - 실크 단백질로부터 실크 펩타이드 혹은 아미노산을 제조하기 위한 방법으로 효소 분해 혹은 산 가수분해 공정이 이용되고 있음.
 - 산가수분해에 의한 제조 공정은 고농도의 염용액 처리(50% 염화칼슘 등) 및 가열에 의한 가용화 단계, 산 가수분해 단계, 알칼리에 의한 중화 단계, 활성탄 등을 이용한 탈색 단계, 여과 단계, 탈염 단계, 농축 및 건조 단계 등으로 구성됨²⁾.
 - 효소분해에 의한 제조 공정은 가용화 단계, 탈염 단계, pH 조절 단계, 효소분해 단계, 여과 단계, 농축 및 건조 단계 등으로 구성됨.
 - 산가수분해의 경우, 분자량 제어가 어려울 뿐 아니라 고염, 고농도의 산, 염기 등 위험성이 높은 화학물질을 사용하며 이들의 처리를 위한 비용이 추가로 필요하다는 단점이 있음. 기존의 효소분해법 역시 가용화 단계에서 고농도의 염을 처리하므로 이후 효소처리 전 반드시 탈염 과정을 거쳐야 하는 번거로움이 있음. 따라서 가용화 단계에서 염농도를 낮출 수 있다면 그 자체로 비용 절감 효과를 기대할 수 있을 뿐 아니라, 이후 탈염 과정을 생략하고 효소 처리가 가능해지므로 원가 절감, 공정 시간 단축 등의 효과를 기대할 수 있음.
 - 본 과제의 참여 연구기관인 한국식품연구원은 초음파 추출의 원천기술을 확보하고 있으며, 다양한 식품 소재에 적용한 결과 유기 용매 저감화, 추출 시간 단축, 생리활성 증진 등의 결과가 확인되었음³⁾⁴⁾⁵⁾.

1) A silk peptide fraction restores cognitive function in AF64A-induced Alzheimer disease model rats by increasing expression of choline acetyltransferase gene. 2017. Toxicology and Applied Pharmacology, 314: 48-54.

2) 펩타이드 제조 방법. 등록특허 10-0881210

3) High yield ultrasonication extraction method for Undaria pinnatifida sporophyll and its anti-inflammatory properties associated with AP-1 pathway suppression. LWT - Food Science and Technology 64 (2015) 1315-1322.

- 특히, 어피 콜라겐 및 돼지 심근 단백질의 경우, 초음파 추출에 의해 기존 방법에 비해 염농도는 90% 저감하였으며, 추출 시간도 10분의 1 이상 단축하였음. 어피 콜라겐의 추출 기술은 2016년 기술 이전하여 사업화에 성공하였음.
- 이들 결과로 미루어 보아 초음파 기술은 실크 펩타이드 제조 공정에 적용가능성이 매우 높을 것으로 기대되나 초음파 기술을 활용한 실크 펩타이드의 제조에 관한 연구 및 사례는 보고된 바 없음.

○ 시장현황

시 장	요 약	시장 규모	비 고
식품 군 건강기능식품 특수용도식품	*삶의 질, 건강에 대한 관심고조 *성인병-당뇨, 고혈압, 간질환등 *콜레스테롤 억제관심	*2009년도 640억원규모 시장형성 *2,700억원 규모시장	*지속성장
첨가물 군 식품첨가물 화장품 군	*실크 아미노산에 효능 검증, 관심 *실크 화장품의 기능의 관심	*2009년 400억원규모시장형성 *2009년 300억원규모시장형성	*고속성장
의약품 군	*신기술 의약품 선호도 증가 *당뇨, 간질환, 고혈압환자 증가	*2009년도 700억원시장규모형성	
의약품	*천연 의약품 시장의 성장	*2009년 400억원시장규모형성	총5,000억원 시장

- 실크는 다양하게 알려져 있는 효능에 비해 임상 실험 결과들이 미비하여 대중화 및 사업화가 낮게 평가되어 국내의 투자 및 개발이 저조함.

○ 경쟁기관현황

업 체 명	시장 점유율	고용현황	비 고
신도바이오실크	15%	25여명-제조 100여명-판매	제조가공 (원료수입)
실크리아	8%	20여명-제조 300여명-판매	유통판매업 (원료수입)
아미노젠	8%	20여명-제조 200여명-판매	제조가공 (원료수입)
고려한백	9%	20여명-제조 400여명-판매	유통판매 (원료수입)
월드라이센스	30%	30여명-제조 1000여명-판매	제조,유통판매 (원료수입)

4) Effects of salts on ultrasonic extraction of protein from porcine myocardium. Food and Bioproducts Processing 108 (2018) 12-17.

5) Effects of ultrasonic treatment on collagen extraction from skins of the sea bass Lateolabrax japonicus. Fish Sci. 78 (2012) 485-490

- 아래의 내용은 실크아미노산 함유 제품을 제조 및 판매하는 업체로 한정하여 보아도 업계의 상황이 대동소이한 형태를 보이고 있음. 즉, 실크펩타이드 등의 실크아미노산은 다양하게 알려져 있는 효능에 비해 임상 실험 결과가 미비하여 대중화 및 사업화가 낮게 평가되고 있어 국내외에서의 연구개발 및 투자가 저조한 것이 현실임.

구분	경쟁환경
기술분류	건강기능, 고령친화식품 원료
주요 품목 및 기술	영양소, 페놀류, 지방산 및 지질류, 당 및 탄수화물류, 발효미생물류, 아미노산 및 단백질류, 콩 식이보조식품, 고시 및 개별인정원료
해외기업	GMP LABORATORIES OF AMERICA, UNITED INDUSTRY GROUP, PHARMAVITE, NATURALIMMIX HEALTH, SHAANXI JIAHE PHYTOCHEM, CHINA TUHSU DONGFANG IMP AND EXP
국내기업	렉스진바이오텍, 프로바이오닌, 디에이치팜, 서흥캡셀, 한국씨엔에스팜, 네추럴에프애니, 코스맥스바이오, 콜마비엔에이치, 한풍네이처팜, 뉴트리바이오텍, 에프엔바이오

○ 지식재산권현황

- 실크펩타이드 관련 지식재산권 현황

지식재산권명	지식재산권출원인	출원국/출원번호
실크 펩타이드를 제조하는 방법	권혁윤	KR/10-2000-0027054
누에고치를 이용한 기능성 실크아미노산, 펩타이드 소재의 제조방법 중 효소분해법에 의한 제조방법	(주)아미노젠	KR/10-2001-0040561
결정화에 의한 고순도 실크펩타이드의 제조방법	윤대현	KR/10-2003-0023148
누에고치 등을 이용한 기능성 실크아미노산, 펩티드 소재의 제조방법 중 효소 분해법에 의한 제조방법	(주)청해식품연구소	KR/10-1998-0031947
신경 세포 보호 활성을 갖는	(주)바이오그랜드	KR/2003-0009137

실크 펩타이드의 제조방법		
효소분해에 의한 실크분말 펩타이드의 제조방법	농촌진흥청	KR/1998-0008600

○ 기타현황

- 실크단백질 효소가수분해물을 이용한 향당노 기능성식품 소재 및 제품 개발

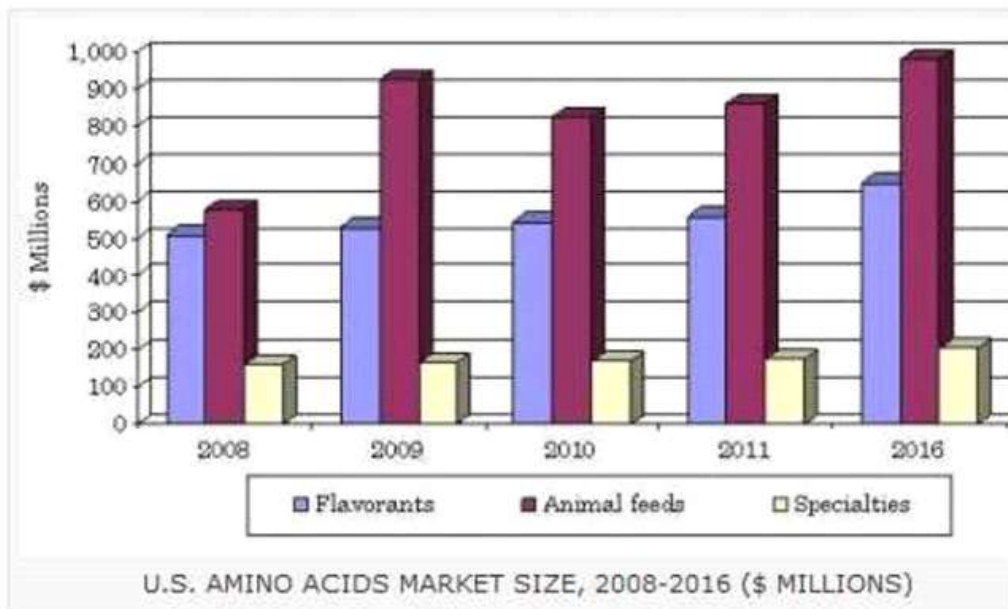
나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

- 한국을 제외하면 일본, 중국 등 아시아권에서 가장 연구가 활발히 진행되고 있음. 연구 내용은 국내와 마찬가지로 실크 펩타이드 혹은 아미노산의 다양한 생리활성에 관한 연구가 대부분이며 최근에는 특정 기능성을 보이는 펩타이드의 염기서열을 밝힌 논문들이 발표되고 있는 추세임.

○ 시장현황

- Global Industry Analysis Inc.(GIA)의 보고서에 따르면 아미노산에 대한 세계 시장은 2015년까지 116억 달러에 도달할 것으로 예상하였으며 동물사료, 건강식품, 식이 보충 제품, 향후 시장이 성장할 것으로 예상됨.



<그림> 미국 아미노산 시장 변화 추이(2008~2016)⁶⁾

- 아미노산 시장은 2008~2009년 세계 경제의 불황으로 수요가 감소하였으며, 특히 동물 사료, 건강식품, 감미료, 화장품과 같은 다양한 아미노산 최종 사용 시장의 침체가 큰

6) U.S marker for amino acid to exceed \$1.4 billion by 2016, Global Industry Analysts Ins. (GIA)

영향을 미침. 하지만 2009년 이후 세계 경제 회복 및 최종용도 시장에서 새로운 수요가 발생함에 따라 시장이 개선될 것으로 예상됨.

- 아시아 태평양은 세계 아미노산 시장 중 가장 큰 지역이다. 지난 몇 년간 monosodium glutamate (MSG)의 광범위한 사용은 아시아-태평양 아미노산 시장이 성장한 결과임. 특히 중국의 아미노산 수요 증가가 세계 시장에 큰 영향을 미치고 있으며, 라틴 아메리카는 분석 기간 동안 4.7%의 빠른 성장률을 보여주고 있음.
- 2017년 글로벌시장인사이트(Global Market Insights, Inc.)의 연구결과에 따르면 중국 및 일본에서 계란 단백질 원료 시장규모의 확대가 아시아 태평양 지역의 단백질 원료 시장 규모 성장을 견인하는 요인으로 작용한다고 조사한 바 있음.

○ 지식재산권현황

- 키프리스 검색 결과 최근 10년 이내 공개된 관련 특허는 검색되지 않았음.

○ 기타현황

- 2013년 9월, 카자흐스탄에서 실크로드 경제벨트의 개념을 제시한 이후, 중국의 아시아 내 주도권 장악 노력이 계속됨.
- 실크로드 경제벨트의 주요 개념은 ‘일대일로(一帶一路)’로, 이를 통해 아시아 전역을 잇는 교통 네트워크 구축, 인구 30억 명을 포괄하는 새로운 시장 생성 기대함. 이와 동시에 ‘호연호통(互联互通)’을 강조해 아시아 국가 내에서의 교류 강조함.



<그림> 중국의 ‘일대일로’ 예상도

7) ‘신 실크로드 경제권’ 추진 동향과 전망

3절. 연구개발 범위

<1차년도>

○ 연구개발 목표

- 주관연구기관(에스에스바이오팜) : 실크 펩타이드의 분자량 조절 기술 개발
- 협동연구기관(한국식품연구원) : 초음파 활용 실크 펩타이드 생산 기술 개발

○ 개발 내용 및 범위

- 주관연구기관(에스에스바이오팜) :
 - 저분자 실크 펩타이드 (5 kDa 이하) 제조
 - 저분자 실크 펩타이드 제조 가능한 단일 혹은 복합 효소의 선정
 - 분자량에 따른 생리활성의 차이 확인
 - 고기능성 실크 펩타이드 제조를 위한 반응 조건 최적화
- 협동연구기관(한국식품연구원) :
 - 실크 단백질의 전처리 조건 개선
 - 초음파 공정 도입을 통한 실크 단백질의 가용화 공정 개선
 - 초음파 공정 도입 단계 (가열 단계 후 혹은 동시 처리), 초음파 처리 조건 등 공정 최적화
 - 기존 방법 대비 염농도 50% 이상 감소 및 시간 단축

<2차년도>

○ 연구개발 목표

- 주관연구기관(에스에스바이오팜) : 실크 펩타이드의 분자량 조절 기술 개발
- 협동연구기관(한국식품연구원) : 초음파 활용 실크 펩타이드 생산 기술 개발

○ 개발 내용 및 범위

- 주관연구기관(에스에스바이오팜) :
 - 저분자 펩타이드의 고기능성 분획물 확보
 - 펩타이드의 분리 및 탈염 공정 조건 확립 (투석, 여과, 컬럼크로마토그래피 등)
- 협동연구기관(한국식품연구원) :
 - 초음파 처리에 의한 효소 반응 촉진 조건 탐색

- 초음파 공정을 도입한 가용화 및 효소 처리 공정 최적화
- 조건별 펩타이드의 항염증 효능 검증

<3차년도>

○ 연구개발 목표

- 주관연구기관(에스에스바이오팜) : 실크 펩타이드를 활용한 시제품 개발
- 협동연구기관(한국식품연구원) : 초음파 활용 실크 펩타이드 생산 기술 개발

○ 개발 내용 및 범위

- 주관연구기관(에스에스바이오팜) :
 - 저분자 실크 펩타이드를 활용한 시제품 2종 이상 개발
- 협동연구기관(한국식품연구원) :
 - 실크 펩타이드 생산 공정 scale up (파일럿 규모)
 - 파일럿 생산 실크 펩타이드의 항염증 효능 검증

2장. 연구수행 내용 및 결과

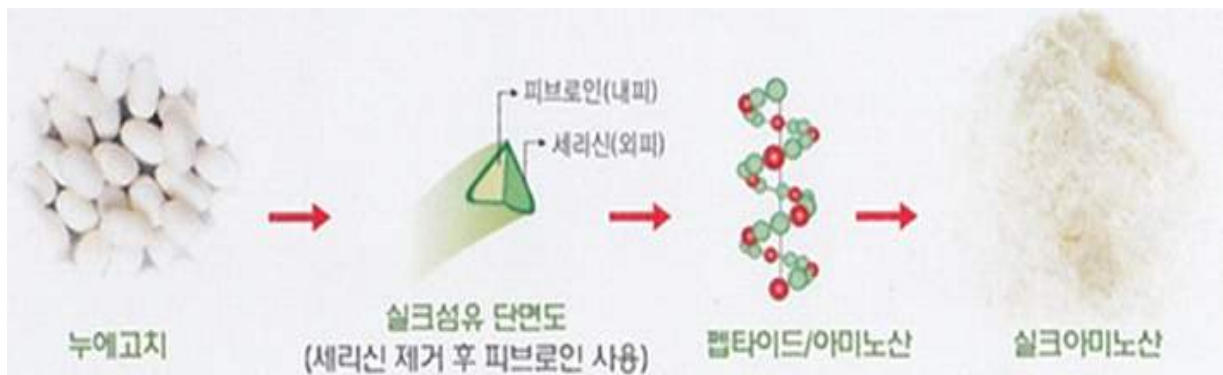
1절. 연구개발의 추진전략·방법 및 추진체계

1. 연구개발 추진전략

- 주관연구 기관인 에스에스바이오팜은 원료인 실크단백질을 확보하여 협동연구기관인 한국식품연구원에 제공함.
- 에스에스바이오팜은 가용화된 실크단백질에 분해효소를 처리하여 다양한 분자량 범위의 펩타이드를 제조하고 이들의 기능성을 협동연구기관인 한국식품연구원에서 검증하여 기능성이 높은 분자량 범위를 특정함. 특정된 범위의 분자량을 가지는 실크펩타이드의 제조를 위한 최적 효소 반응 조건을 확립함.
- 한국식품연구원은 기 보유한 초음파 기술 및 pilot scale 장치를 활용한 실크 펩타이드의 제조 공정을 개발함. 기존 공정 대비 염농도를 줄이고 가용화 시간을 단축하면서도 추출 단백질 수율을 높일 수 있는 조건을 확립함. 1차년도에 실험실 규모 실험을 통해 선정한 용매인 NaOH를 이용한 가용화 조건을 기본으로 하여, 염농도, 초음파 처리 조건 등을 확립함.
- 한국식품연구원은 에스에스바이오팜에서 확립한 효소 처리 조건에 초음파 공정을 결합한 공정을 개발하고, 최종적으로 가용화 단계와 효소처리 단계를 연계시킨 초음파 활용 실크펩타이드 제조 기술을 개발함.
- 저분자 펩타이드의 손실을 최소화할 수 있는 여과 및 탈염 공정을 확립하고자 함. 효소 및 미반응 단백질과 펩타이드를 분리하고, 펩타이드의 손실을 최소화할 수 있는 여과 및 탈염 방법을 결정하고자 함.
- pilot 규모에서 최적 공정 layout 및 처리 조건을 확립하고 이 조건에서 생산된 펩타이드의 효능, 물리적 특성, 분자량 분포 등의 특성을 분석하여 제시함.
- 한국식품연구원에서 공정 단계별 기능성 검증을 통해 생산 과정 중 생리활성의 유지 여부를 판단함.
- 에스에스바이오팜이 기 보유한 대량생산 규모의 초음파 장치를 활용한 생산 조건을 확립하고 제품 제형을 개발하며, 이들의 기능성을 한국식품연구원에서 평가함.

2. 제품화 전략

- 초음파 활용 실크펩타이드 제조기술은 원료 소재 내 유용성분의 분리 및 반응을 효소와 초음파로 수행하므로 고효율 및 고품질 제품을 생산할 수 있어 산업적 영향을 극대화할 수 있음.
- 본 연구개발에서는 현재 사용하고 있는 산가수분해 공정을 대체하는 신개념 가공기술로 제품의 안전성을 확보하고 균질성을 안정화 시킨 실크펩타이드 생산이 가능할 것으로 보임. 또한 공정을 단순화하여 제조비용 절감과 공정시간이 단축되어 가격경쟁력을 갖춘 고품질 제품 개발이 가능함.
- 상용화 제품을 위한 대량 생산 시스템 구축하여 기기임대료 비용을 절감하고 자체생산으로 에스에스바이오팜의 기술력 확보를 목표로 함.
- 실크펩타이드는 누에고치를 가수분해하여 식품으로 섭취 가능하도록 만들어진 천연단백질로 수용성이며, 체내 흡수율이 높음.



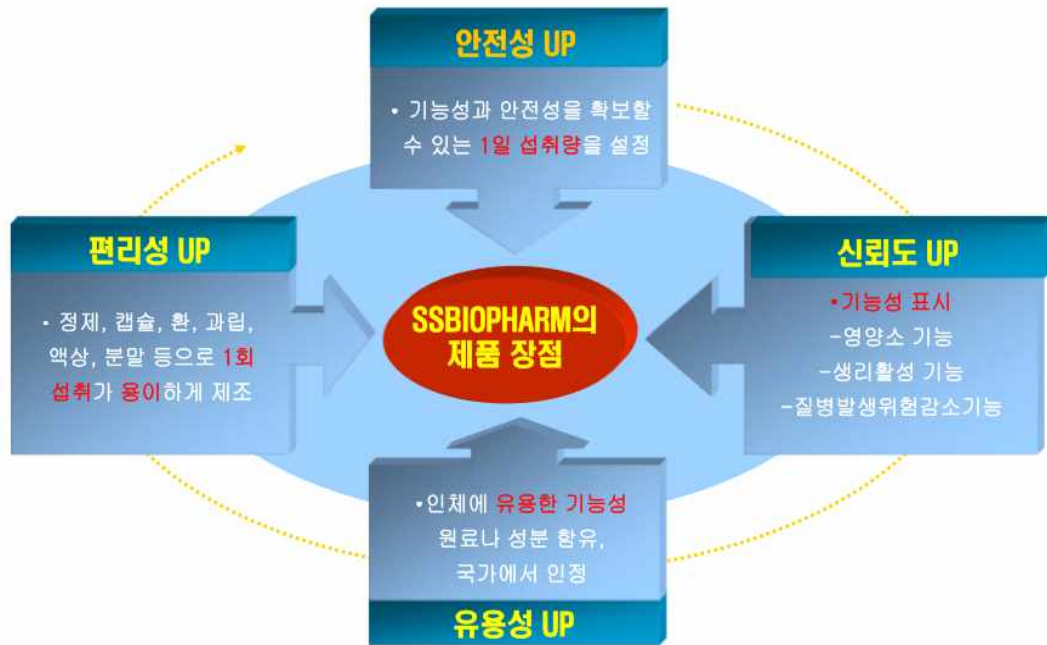
<그림> 실크아미노산 도식화

- 식음료품 분야(식품첨가물 대체제, 스포츠 식품 등) 또는 조제약 분야(제약 및 의료산업)에서 판매할 수 있는 기능성식품 제형 및 연구산물을 활용한 시제품 개발 가능성 검토



<그림> 기능성식품 제형 예시(과립/액상/정제)

- 본 연구에서 실크펩타이드 제조공정 확립 후 이를 안전성, 유용성, 편리성, 신뢰도가 높은 제품을 개발하기 위한 계획 수립



<그림> 에스에스바이오팜 제품 기술력

3. 산업화 확대 전략

- Channels : 오프라인 - 약국, 대형할인마트
온라인 - 중국법인 자체 쇼핑몰, Drugstore, Sephora, Avon, Alibaba, Amazon
- Revenue Streams : 중국, 베트남, 말레이시아 등 현지 법인을 통한 안정적인 수입구조 창출, 본사 직접 마케팅 및 수출을 통한 글로벌 Biz 모델 확립, 유통 단계의 간소화에 의한 영업이익 극대화, 판매 채널과의 win-win 전략에 의한 통런 경영으로 인한 매출 증대, 지역특화소재가 함유된 로컬브랜드의 원산지 효과 창출(기업뿐만 아니라 지역과 국가의 경제발전 도모).
- Cost Structure : 소재 및 제품 제조 공정 개선을 통한 원,부자재 로스율 감소로 인한 공급단가 절감, 클레임 없는 고품질의 양산으로 위험관리 비용 절감.

4. 시장진입을 위한 단계적 지원전략

- 사전조사 : 타깃시장 상황과 소비자니즈, 유통, 식품법, 관세법, 수출 절차 등의 구체적인 선행조사를 동반한 제품기획으로 소비자의 스윗스팟을 관통하는 상품 개발 및 시장진입 준비

철저.

- 본 사업에서 개발한 공정에 대한 안전성 및 제조 공정의 비용절감, 품질 및 경쟁력 확보 등의 개발 공정에 대한 우수성을 마케팅 방안으로 활용 가능함.



<그림> 시장진입을 위한 사업화 추진전략

- 시장진입시기 :

- 완제품의 소비자 및 바이어 제품 안전성 평가 완료
- 중국 현지 법인과 자사의 협력을 통한 온·오프라인, 모바일 동시 프로모션
- 제품개발 완료 시점인 1차년도, 2차년도 순차적 제품 구성 및 시장 진입.
- 국제특허 PCT출원으로 국내뿐만 아니라 국제적인 지적재산권 권리행사.
- FDA인증을 통한 현지 유통 확보
- ICID 등록을 통한 독보적인 value 생성

- 현지화 전략 :

- 중국현지 법인과 전문 Agent를 통한 다양한 사전 시장조사
- (제품 유형, 용량, 성분, 사용감등) 및 품평 진행
- 기획 단계부터 제품, 디자인, 문구에 대한 의견 수렴
- 전시회, 수출 상담회, 수출 로드쇼 등을 통한 제품 소개 및 홍보

2절. 연구개발 추진체계

연구개발과제		총 참여 연구원
과제명	초음파 활용 저분자 실크 펩타이드 생산 기술 개발	주관연구책임자 이○우 외 총 18명

기관별 참여 현황		
구 분	연구기관수	참여연구원수
대 기 업		
중견기업		
중소기업	1	11
대 학		
국공립(연)		
출 연 (연)	1	7
기 타		

에스에스바이오팜
저분자 실크펩타이드 제조 기술 개발
이○우 외 10 명
담당기술개발내용
단백질 분해효소의 처리 조건 확립 시제품 개발

한국식품연구원
초음파 활용 실크 펩타이드 제조 공정 개선
송○모 외 6명
담당기술개발내용
초음파 적용 공정 개발 실크 펩타이드 제조 공정 scale up

3절. 추진일정

1																
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	계획수립 및 자료조사				■	■	■								5,000	(에스에스 바이오팜)
2	전처리 공정 개선				■	■	■								20,000	(한국식품 연구원)
3	단백질 분해효소에 의한 분자량 조절						■	■	■	■	■	■	■	■	70,000	(에스에스 바이오팜)
4	초음파 기술 적용 가용화 공정 개선						■	■	■	■	■	■	■	■	70,000	(한국식품 연구원)
5	실크렙타이드 의 기능성 평가							■	■	■	■	■	■	■	60,000	(한국식품 연구원)
2차년도																
1	분자량별 펩타이드 분획 기술 개발	■	■	■	■										40,000	(에스에스 바이오팜)
2	기능성 검증		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	80,000	(한국식품 연구원)
3	초음파-효소반 응 결합 공정 조건 탐색		■	■	■	■	■	■							60,000	(한국식품 연구원)
4	탈염 및 정제 기술 개발					■	■	■	■	■					60,000	(에스에스 바이오팜)
5	초음파 공정 최적화								■	■	■	■	■	■	60,000	(한국식품 연구원)
3차년도																
1	공정 scale up 및 생산 조건 확립	■	■	■	■	■	■								100,000	(한국식품 연구원)
2	실크렙타이드 대량생산						■	■	■	■					50,000	(한국식품 연구원), (에스에스 바이오팜)
3	시제품 개발				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	70,000	(에스에스 바이오팜)
4	펩타이드 및 시제품 기능성 검증							■	■	■	■	■	■	■	80,000	(한국식품 연구원)

4절. 연구기관 현황

1. 연구개발 참여연구원 현황

	소속기관명	전공 및 학위	연구담당 분야	신규채용 여부*	국가연구개발사업 참여율 (%) [B]	국가연구개발사업 참여과제수 (건)
	성명	학위 (전공)	과제참여 기간	본과제 참여율 (%) [A]	전체 참여율 [A+B,%]	
주관 1	에스에스바이오 팜	박사 (화학과)	책임/시제품 개발 20.01.01.~20. 12.31	기존	65	3
	이○우			30	95	
2	에스에스바이오 팜	학사(경영학)	총괄관리 20.01.01.~20. 12.31	기존	24	2
	김○희			32	56	
3	에스에스바이오 팜	학사(영어영 문학)	상품관리 품질보증 20.01.01.~20. 12.31	기존	0	1
	이○호			46	46	
4	에스에스바이오 팜	학사 (경영학)	사업관리 품질보증 20.01.01.~20. 12.31	기존	10	2
	송○석			22	32	
5	에스에스바이오 팜	학사(환경자 원학)	과제관리 및 생산 20.01.01.~20. 02.29	기존	0	1
	송○안			30	30	
6	에스에스바이오 팜	학사(식품생명 공학)	시제품 개발 20.01.01.~20. 08.20	신규	0	1
	윤○라			100	100	

7	에스에스바이오 팜	학사 (식품과학과)	시제품 개발	기존	43	3
	최○정		20.01.01.~20. 12.31	20	63	
8	에스에스바이오 팜	학사 (식품영양학과)	시제품 개발	신규	0	1
	김○섭		20.01.01.~20. 11.20	100	100	
9	에스에스바이오 팜	학사(식품생명 공학)	시제품 개발	신규	0	1
	윤○정		20.08.24.~20. 12.31	100	100	
협동 1	한국식품연구원	박사 (식품공학)	과제총괄	기존	60	3
	송○모		20.01.01.~20. 12.31	12.2	72.2	
2	한국식품연구원	박사 (해양생물)	기능성 검증	기존	100	3
	강○철		20.01.01.~20. 12.31	5	105	
3	한국식품연구원	박사 (식품수산화)	공정 개선	기존	90	3
	이○혁		20.01.01.~20. 12.31	10	100	
4	한국식품연구원	박사 (식품공학)	공정 개선	기존	50	3
	김○근		20.01.01.~20. 12.31	15	65	
5	한국식품연구원	박사 (기능성 식품학)	공정 개선	기존	20	3
	엄○진		20.01.01.~20. 12.31	50.7	70.7	
6	한국식품연구원	석사 (생명공학)	기능성 검증	기존	20	1
	김○슬		20.01.01.~20. 12.31	20	40	
7	한국식품연구원	석사 (생물미생물 학)	기능성 검증	기존	20	1
	이○아		20.08.01.~20. 12.31	21.4	41.4	

2. 기관(기업) 정보현황

구분	에스에스바이오팜(주)
① 사업자등록번호	314-86-58007
② 법인등록번호	160111-0367262
③ 대표자 성명(국적/성별)	김○희(대한민국/여성)
④ 최대주주(국적)	김○희(대한민국)
⑤ 기업(기관) 유형 (중소기업, 중견기업 대기업) (대학, 출연연, 국공립연, 기타 등)	중소기업
⑥ 설립 연월일	2014.03.08
⑦ 주 생산품목	옥타지, 삼성야황삼 등의 건강기능식품

3. 연구개발비

가. 연도별 연구개발비 총괄표

(단위 : 천원)

비목	세목		1차 연도	2차 연도	3차 연도	4차 연도	5차 연도	합계
			2018	2019	2020	YYYY	YYYY	
직접비	인건비	내부 인건비	미지급					
			지급	현금	81,008	104,792	127,800	
		현물	48,150	59,625	59,850		167,625	
		외부 인건비	미지급					
			지급	현금				
		현물						
	학생인건비							481,225
	인건비 소계		129,158	164,417	187,650			481,225
	연구시설 장비비	현금						0
		현물						0
	연구활동비		36,141	16,501	17,300			69,942
	연구재료비		49,271	86,807	72,106			208,184
	연구수당		22,657	28,752	28,386			79,795
	위탁연구개발비							0
직접비 소계		237,227	296,477	305,442			839,146	
간접비		30,273	36,773	27,058			94,104	
연구개발비 총액		267,500	331,250	332,500			931,250	

나. 연구기관별 연구개발비 총괄표(에스에스바이오팜(주))

(단위 : 천원)

비목	세목	1차 연도	2차 연도	3차 연도	4차 연도	5차 연도	합계
		2018	2019	2020	YYYY	YYYY	

직 접 비	인건비	참여 연구 원	내부 인건비	미지급							
				지 급	현금	15,328	22,992	48,000			86,320
			현물		48,150	59,625	59,850			167,625	
		외부 인건비	미지급								
			지 급	현금							
				현물							
	연구 지원인력인건비										
	학생인건비										
	인건비 소계					63,478	82,617	107,850		253,945	
	연구시설·장비비		현 금	일반							
				통합관리							
	현물										
	연구활동비					23,641	7,001	7,800		38,442	
	연구재료비					39,460	67,240	43,324		150,024	
	연구수당					9,521	12,392	12,426			
위탁연구개발비											
직접비 소계					136,100	169,250	171,400		476,750		
간접비					3,000	3,000	3,000		9,000		
연구개발비 총액					139,100	172,250	174,400		485,750		

다. 연구기관별 연구개발비 총괄표 (한국식품연구원)

(: 천원)

비목	세목			1차 연도	2차 연도	3차 연도	4차 연도	5차 연도	합계	
				2018	2019	2020	YYYY	YYYY		
직 접 비	인건비	참여 연구 원	내부 인건비	미지급						
				지 급	현금	50,510	63,800	79,789		
			현물							
		외부 인건비	미지급							
			지 급	현금						
				현물						
	연구 지원인력인건비									
	학생인건비									
	인건비 소계					50,510	63,800	79,789		194,099
	연구시설·장비비		현 금	일반						
				통합관리						
	현물									
	연구활동비					5,700	5,740	943		12,383
	연구재료비					34,815	44,927	57,852		137,594
	연구수당					10,102	12,760	15,958		38,820
위탁연구개발비										
직접비 소계					101,127	127,227	154,542		382,896	
간접비					27,273	33,773	24,058		85,104	
연구개발비 총액					128,400	161,000	178,600		468,000	

라. 민간부담 연구개발비 중 참여기업별 부담 금액(참여기업이 있는 경우만 기재)

(: 천원)

구분	기업명	기업 유형	민간 부담액		
			현금	현물	계
1차년도	농업회사법인 에스에스바이오팜(주)	중소기업	5,350	48,150	53,500
2차년도	농업회사법인 에스에스바이오팜(주)	중소기업	6,625	59,625	66,250
3차년도	농업회사법인 에스에스바이오팜(주)	중소기업	6,650	59,850	66,500
계			18,625	167,625	186,250

5절. 연구개발 성과 및 결과

1. 연구개발성과(해당 시 작성)

가. 국내의 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	Extraction conditions for Rosa gallica petal extracts with anti-skin aging activities	Food science and biotechnology	Eun Ju Shin	28(5)	Korea	Springer	SCIE	2019.02	
2	Silk peptide production from whole silkworm cocoon using ultrasound and enzymatic treatment and its suppression of solar ultraviolet-induced skin inflammation	Ultrasonics Sonochemistry	Su Jin Eom	61 (2020) 104803	England	ELSEVIER	SCIE	2020.3	
3	Production of Undaria pinnatifida sporophyll extract using pilot-scale ultrasound-assisted extraction: Extract characteristics and antioxidant and anti-inflammatory activities	Algal research	Su Jin Eom	51 (2020) 102039	Netherlands	ELSEVIER	SCIE	2020.4	

나. 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명

다. 생명자원(생물자원)/화합물

No	생명자원(생물자원)/화합물명	등록/기탁번호	등록/기탁기관	발생년도

라. 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	피부염증 개선 활성이 우수한 누에고치 유래 파파인 효소 분해물 및 이의 용도	대한민국	한국식품연구원	2019.05.31	10-2019-0064606				100
2	혈관 이완능 및 항염 활성이 우수한 누에고치 유래 브로멜라인 효소 분해물 및 이의 용도	대한민국	한국식품연구원	2019.05.31	10-2019-0064628				100
3	피부염증 개선 활성이 우수한 누에고치 유래 파파인 효소 분해물 및 이의 용도	대한민국	한국식품연구원			한국식품연구원	2020.08.31	10-2152077	100
4	혈관 이완능 및 항염 활성이 우수한 누에고치 유래 브로멜라인 효소 분해물 및 이의 용도	대한민국	한국식품연구원			한국식품연구원	2020.10.06	10-2161454	100

마. 저작권(소프트웨어, 서적 등)

No	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록번호	저작권자명	기여율

바. 전문 연구 인력 양성

No	분류	기준 년도	현 황													
			학위별				성별		지역별							
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타			

사. 산업기술 인력양성

No	프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원

아. 기술거래(이전) 등

No	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)	누적 징수현황

자. 사업화 투자실적

No	추가 R&D 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자자금 성격
					1) 내부자금 2) 신용대출 3) 담보대출 4) 투자유치 5) 기타

차. 사업화 현황

No	사업화 방식	사업화 형태	지역	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생년도	기술 수명
							국내	국외		
1	기술실시	기술보유자의 직접사업화_기존업체-상품화	국내	(SS)에스에스 혈행솔루션 시제품	혈관 이완능 및 항염 활성이 우수한 누에고치 유래 브로멜라인 효소 분해물 및 이의 용도로 등록된 특허 내용과 관련하여 혈관건강과 관련된 제품 상품과 계획	에스에스바이오오팜	-	-	-	2021.01.01 ~2028.12.31
2	기술실시	기술보유자의 직접사업화_기존업체-상품화	국내	(SS)에스에스 혈행솔루션 시제품	피부염증 개선 활성이 우수한 누에고치 유래 파파인 효소 분해물 및 이의 용도로 등록된 특허내용과 관련하여 피부건강과 관련된 건강기능식품 상품화	에스에스바이오오팜	-	-	-	2021.01.01 ~2028.12.31
3	기술실시	기술보유자의 직접사업화_기존업체-상품화	국내	실크젤리	간단하게 섭취하기 좋은 젤리제형으로 만든 실크펩타이드를 함유하는 일반 식품	에스에스바이오오팜	-	-	-	2021.01.01 ~2028.12.31

(단위 : 명, 년)

카. 표준화

No	수행기관명	표준화 주제	표준화 기구	표준화 단계	관련번호	(채택)일	국가

타. 기술요약정보

연도	기술명	요약내용	기술완성도	등록번호

파. 보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록번호

하. 기타

No.	일자	수상명칭	수여기관	공적내용
1	2019.10.24	충청남도기업인대상 창업대상	충청남도지사	제26회 충청남도기업인대상 창업대상 수상(충남도지사 양승조)
2	2019.12.05	무역의날표창+백만불수출의탑	산업통상자원부장관	무역의 날 수출탑 표창장 및 백만불 수출의 탑 수상(산업통상자원부, 대통령)
3	2020.12.04	한국산학연합회장상	대전·세종지방중소벤처기업청	2020 충청권 산학연 우수 성과 연합발표회에서 한국산학연합회장상 수상

2. 기술 개발 세부 실적

가. 실크펩타이드의 가용화 기술 개발

(1) 염화칼슘 용액에 의한 실크 단백질의 가용화

정련한 실크 단백질 피크로인 90g와 50% CaCl₂ 용액 1L를 섞어 100℃에서 12시간 가열하여 가용화한 것을 대조군으로 하고 다양한 온도, 시간 및 용매 농도 조건에서 가용화를 진행하였다. 또한, 일부 샘플은 가열 처리 이후 25℃에서 6시간 동안 600W, 20 kHz, pulse on/off 20s/20s 조건에서 초음파 처리하였다(VC-750; Sonics & Materials, Inc., USA). 가용화 정도는 상층액의 단백질 농도를 측정하여 평가하였으며 실험 조건 및 결과는 아래 표에 제시하였다.

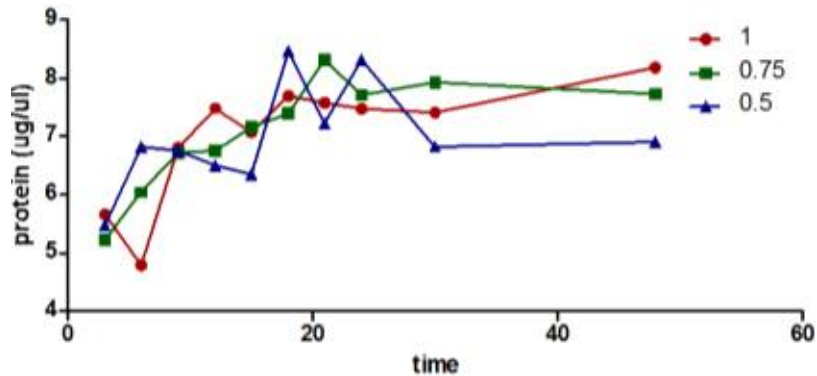
표 1. 실크 피브로인의 가용화 조건

번호	용매	온도	시간	초음파 처리 여부	단백질 수율(%)
1	50% CaCl ₂	100℃	12	×	20.3
2	50% CaCl ₂	90℃	8	×	10.4
3	50% CaCl ₂	150℃	8	×	12.7
4	50% CaCl ₂	150℃	8	○	12.7
5	물	150℃	8	×	0.2
6	물	150℃	8	○	0.3

고농도의 염을 사용하고 고온, 장시간 가열하였음에도 가용화된 단백질 수율은 20% 이하로 낮게 나타났으며, 위 조건에서는 초음파 처리도 거의 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다. 또한 150℃에서 8시간 처리한 샘플보다 100℃에서 12시간 처리한 샘플의 수율이 높은 것으로 보아 용매와 가열 시간이 중요할 것으로 생각된다.

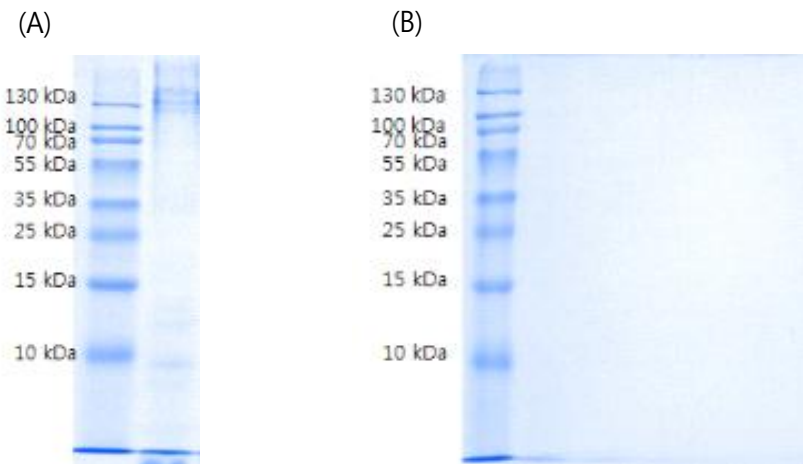
(2) 수산화나트륨 용액에 의한 실크 단백질의 가용화

기존의 방법에 비해 염농도를 낮추고 세리신을 제거하는 정련 과정을 생략하기 위하여 누에 고치에 수산화나트륨 용액을 처리해 가용화 여부를 확인하였다. 누에고치에 100배량(w/v)의 0.5~1.0 M의 수산화나트륨 용액을 가하여 상온에서 교반하며 시간에 따른 용액중 단백질 농도의 변화를 측정하였다. 모든 용매 농도에서 시간의 경과에 따라 용액중 단백질 농도가 상승하였으며, 48 시간째에는 모든 농도 조건에서 누에고치의 형태가 남아있지 않을 정도로 완전히 용해되었으며 수율은 69.1~81.8%로 염화칼슘을 사용했을 때에 비해 높게 나타났다.




<그림> 수산화나트륨 처리 농도 및 시간별 실크단백질의 변화

가용화 전후의 실크단백질을 SDS-PAGE로 분석하였다. 가용화 전 실크 단백질은 8 M urea, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 0.05% (w/v) bromophenol blue/xylene cyanol, 2% (w/v) beta-mercaptoethanol 용액으로 녹여 사용하였다. 가용화 전 샘플의 전기영동 결과 130 kDa 이상의 고분자 단백질과 10 kDa 전후의 저분자 단백질이 검출되었다. 반면, 가용화 후의 샘플에서는 밴드가 검출되지 않았으며 이는 고농도의 알칼리 조건에서 단백질이 분해되어 펩타이드화 되었기 때문으로 추측된다.



<그림> NaOH에 의한 가용화 전(A), 후(B) 실크단백질의 SDS-PAGE

따라서, 알칼리의 농도를 낮추고 처리 시간을 짧게 하여 단백질의 분해가 일어나지 않은 조건에서 초음파 기술을 활용하여 가용화 공정을 개선하기 위한 실험을 수행하였다. 누에고치에 100배량(w/v)의 0.1, 0.25, 0.5 M (0.4~2%)의 수산화나트륨 용액을 가하여 상온에서 교반하며 시간에 따른 변화를 확인하였다.

처리시간	0.5 M	0.25 M	0.1 M
3			
6			
9			
12			
24			
48			

<그림> NaOH 농도 및 처리시간에 따른 누에고치의 변화

NaOH 농도가 높을수록 빨리 누에고치의 형태를 잃고 가용화되는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 0.1 M NaOH 처리군에서도 3시간 처리 이후에는 누에고치의 단단한 조직이 약화되어 용액 중으로 풀리기 시작한 것을 확인하였으며, 고농도의 알칼리에서 단백질이 분해되는 현상을 방지하고자 0.1 M NaOH를 가용화 용매로 선정하였다.

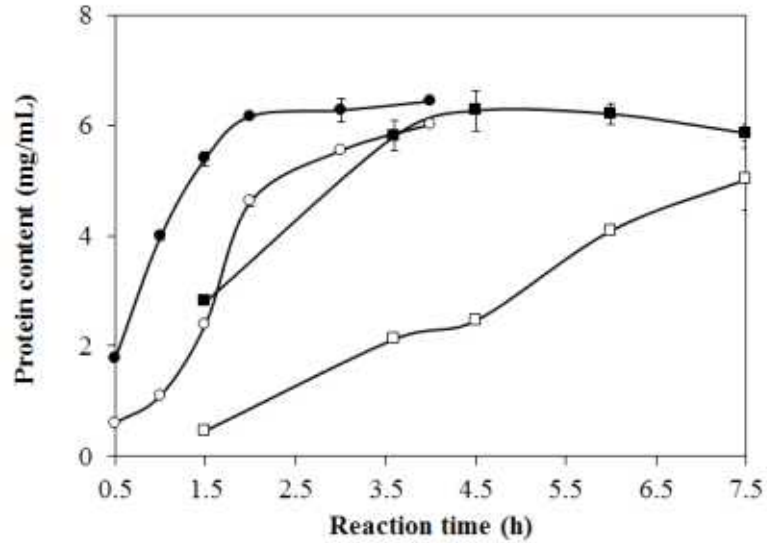
누에고치에 100배량(w/v)의 0.1 M 의 수산화나트륨 용액을 가하여 상온에서 24시간 교반한 후 25°C 에서 24시간 동안 600W, pulse on/off 20s/20s 조건에서 초음파 처리하며 용액 중의 단백질 농도 변화를 측정하였다. 그 결과 수산화나트륨 용액 처리 시간이 경과함에 따라 단백질의 농도 역시 증가하는 경향을 보였으며, 이후 초음파 처리에 의해 더욱 증가함을 확인하였다. 결론적으로, 수산화나트륨 용액을 가용화 용매로 사용하고 초음파를 병행 처리함으로써 기존의 공정에 비해 최대 96% 낮은 농도의 염을 사용하면서도 높은 수율의 가용화 단백질을 얻을 수 있었다.

표 2. NaOH 및 초음파 처리에 의한 시간별 단백질의 가용화율 변화

	처리 시간	가용 단백질 (%)
0.1 M NaOH 처리	2	28.7
	4	39.2
	6	45.0
	20	41.5
	24	42.2
초음파 처리	2	43.5
	4	43.8
	6	45.8
	20	48.6
	24	52.2

(3) 초음파를 활용한 가용화 조건 최적화

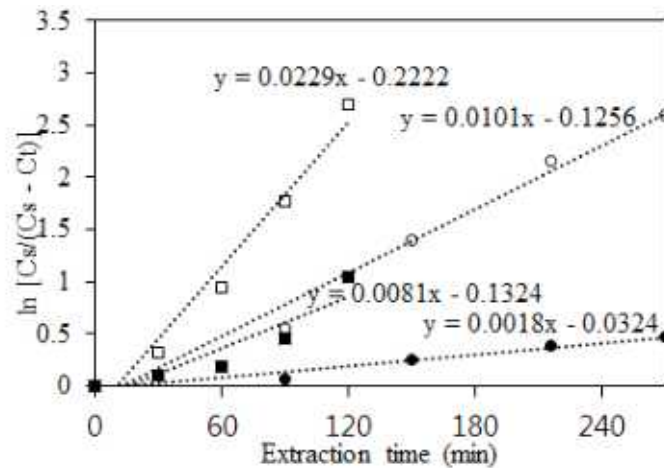
누에고치에 100배량(w/v)의 수산화나트륨 용액을 농도별로 가하여 8시간 동안 25°C, 600W, pulse on/off 20s/20s 조건에서 초음파를 동시에 처리하며 용액 중의 단백질 농도 변화를 측정하였다. 초음파를 처리하지 않았을 경우 최대 단백질 농도에 도달하는 시간은 0.1 M 조건에서 7.5시간, 0.25 M 조건에서 4시간이었으며, 초음파를 처리하였을 경우 최대 단백질 농도에 이르는 시간은 0.1 M 사용 시 4시간, 0.25 M 사용 시에는 약 2시간이었다.



<그림> 반응시간과 초음파 처리 전후 실크 펩타이드의 단백질 함량 측정.

●; 0.25 M NaOH+초음파, ○; 0.25 M NaOH, ■; 0.1 M NaOH+초음파, □; 0.1 M NaOH

위 결과로부터 초음파 처리 전후의 반응 속도 상수(k)를 계산하였다. 단백질의 최대 포화 농도를 C_s , 시간에 따른 단백질 농도를 C_t 라고 하여 추출 시간을 x축, $\ln[C_s/(C_s-C_t)]$ 값을 y축으로 하여 아래 그림과 같이 일차방정식을 구하였다. 이 방정식의 기울기를 k로 하며 k 값이 클수록 실크 펩타이드 가용화 속도가 높음을 나타낸다. 아래 그림을 통해 염농도가 높을수록, 초음파를 같이 처리할수록 실크 펩타이드의 가용화되는 속도가 빠른 것을 알 수 있었다.



<그림> 추출 시간에 따른 실크 펩타이드의 반응 속도 상수

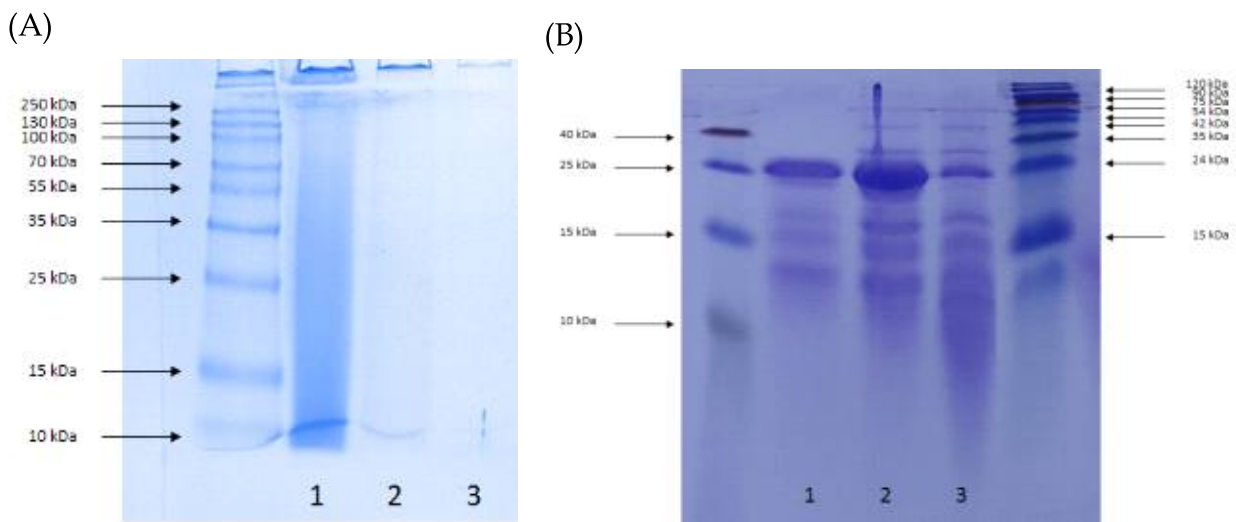
●; 0.1 M NaOH, ○; 0.1 M NaOH+초음파, ■; 0.25 M NaOH, □; 0.25 M NaOH+초음파

나. 실크펩타이드의 분자량 조절 기술 개발

(1) 실크 펩타이드의 제조를 위한 단백질 가수분해 효소의 선별

(가) 파파인에 의한 실크 펩타이드의 제조

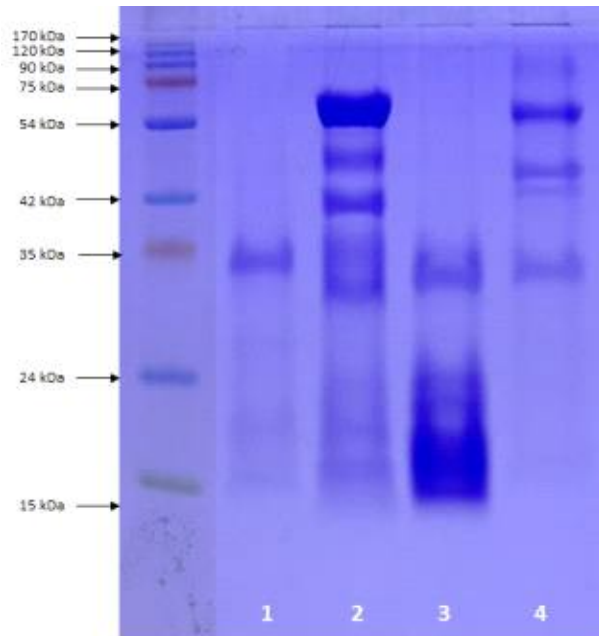
실크 단백질의 효소분해 가능성을 확인하기 위하여, 기존 방법으로 가용화한 실크 단백질에 단백질 가수분해 효소인 파파인을 처리하였다. 구체적인 시험 방법은 다음과 같다. 협동 연구 기관에서 50% 염화칼슘을 이용하여 가용화한 조건 중 수율이 상대적으로 높게 나타난 조건(표 1의 1, 2, 3 조건)으로 가용화한 샘플을 증류수에 투석하여 염을 제거하였다. 염을 제거한 샘플에 0.25% (w/v)의 파파인을 처리하여 55°C 에서 3시간 반응시킨 용액을 SDS-PAGE로 분석하였다. 파파인 처리한 실크 단백질 효소분해물 모두 54 kDa 이하의 밴드만 검출되었으며 특히 15 kDa 이하의 저분자 펩타이드도 다량 함유하고 있는 것으로 확인되었다. 이로써 효소 분해에 의한 저분자 실크 펩타이드의 제조 가능성을 확인하였다.



< > 염화칼슘으로 가용화한 실크단백질(A)의 파파인 가수분해물(B)
가용화조건: 100°C, 12시간 (1); 90°C, 8시간 (2); 150°C, 8시간 (3).

(나) 단백질 가수분해 효소 4종에 의한 실크 펩타이드 제조

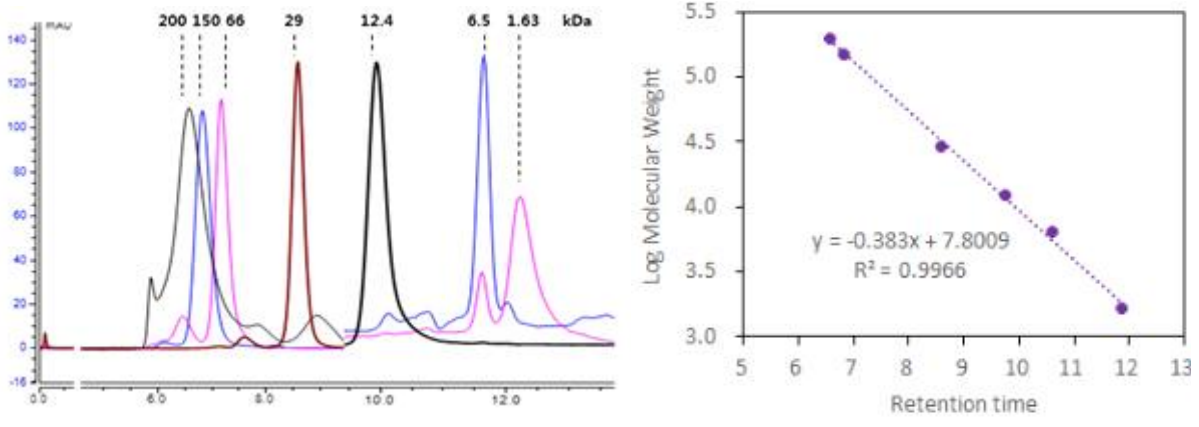
실크 펩타이드 제조를 위한 효소 선별을 위하여 다양한 단백질 가수분해효소를 사용하여 실크 펩타이드를 제조하였다. 수산화나트륨 용액을 사용하여 개선한 조건에서 가용화시킨 실크 단백질에 식품에 사용가능한 효소를 처리하여 분해 패턴을 확인하였다. 누에고치에 0.1 M NaOH를 100배량 (w/v) 가하여 상온에서 3시간 교반시킨 후 HCl을 가하여 pH 7로 중화시켰다. 이 용액에 0.5% (w/v)의 papain, pancreatin, bromelain, fungal protease를 각각 처리하여 3시간 후 전기영동을 통해 펩타이드의 분자량을 확인하였다.



<그림> 단백질 분해 효소 처리한 실크 펩타이드의 SDS-PAGE
1, papain; 2, pancreatin; 3, bromelain; 4, fungal protease.

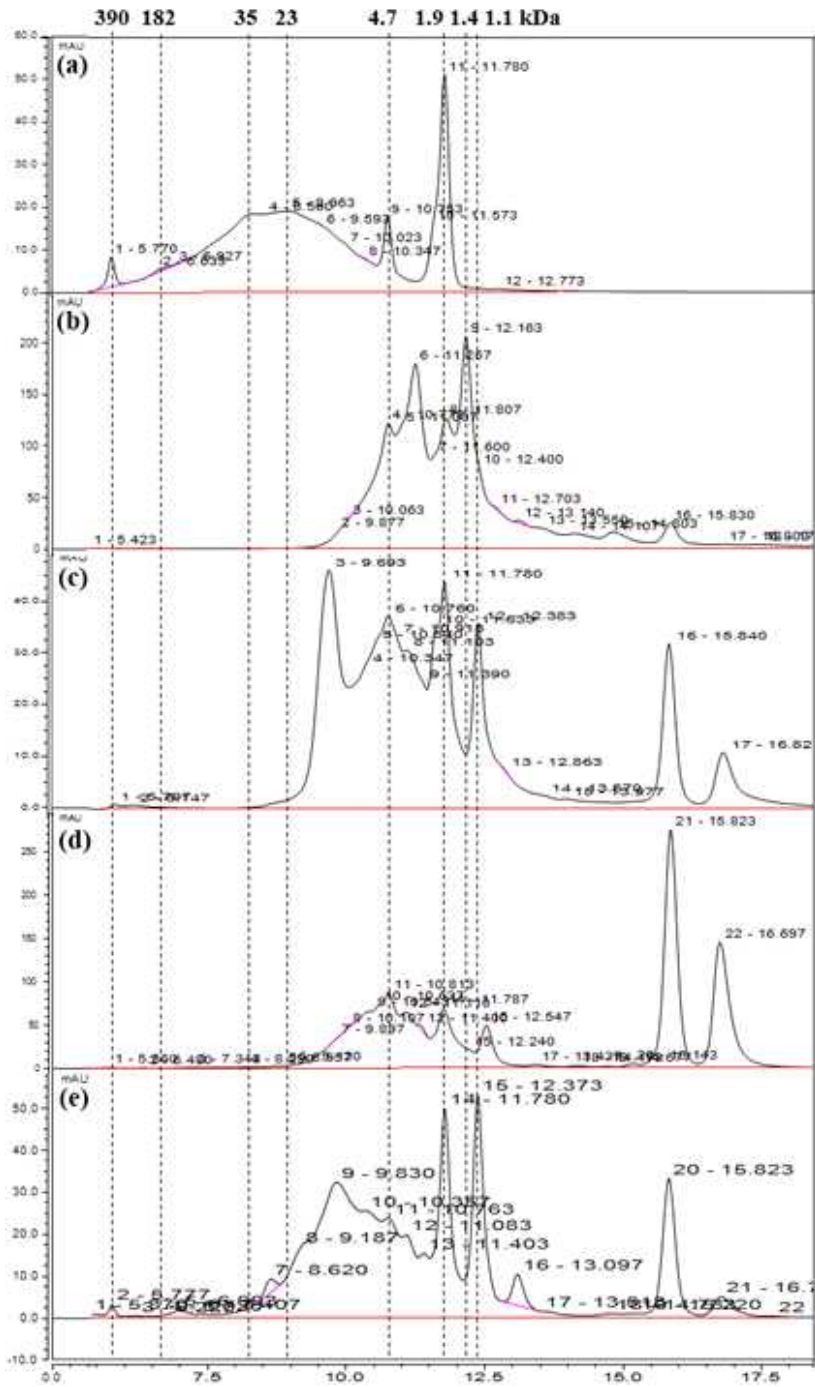
네 종류의 실크 펩타이드 제조물 모두 75 kDa 이상의 고분자 단백질 밴드는 거의 존재하지 않았으며, 실크펩타이드의 제조 가능성은 확인하였다. 그러나, 15 kDa 이하의 저분자 펩타이드 역시 검출되지 않아 효소 처리 시간을 길게 하여 재실험을 수행하였다.

누에고치에 0.1 M NaOH를 100 배량 가하여 4시간 초음파 처리(20 kHz, 600 W, 25°C) 후 pH 7로 중화한 용액에 각 효소를 처리하여 25°C에서 48시간 반응시켰다. 각 샘플의 정확한 분자량 측정을 위하여 GPC(gel permeation chromatography) 분석을 실시하였다. 분석에는 Ultimate 3000 시스템 (Thermo Fisher, Somerset, NJ, USA)을 활용하였으며, Protein KW-802.5(I.D. 8mm × 300mm, 4 μm) 칼럼을 사용하였다. 시료는 0.45 μm PVDF 주사기 필터에 여과하였고, 유속은 1 min/mL, 0.3 M NaCl을 함유한 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)을 이동상으로 하여, UV 검출기로 220 nm에서 측정하였다. 분자량 표준물질로 β-Amylase(200kDa), 알코올 탈수소효소(150kDa), 알부민(66kDa), 카본 무수효소(29kDa), 사이토크롬 c(12.4kDa), 아프로틴(6.5kDa), 시마토스타틴(1.63kDa)을 사용하였다.



〈그림〉 표준물질의 분자량 크로마토그램

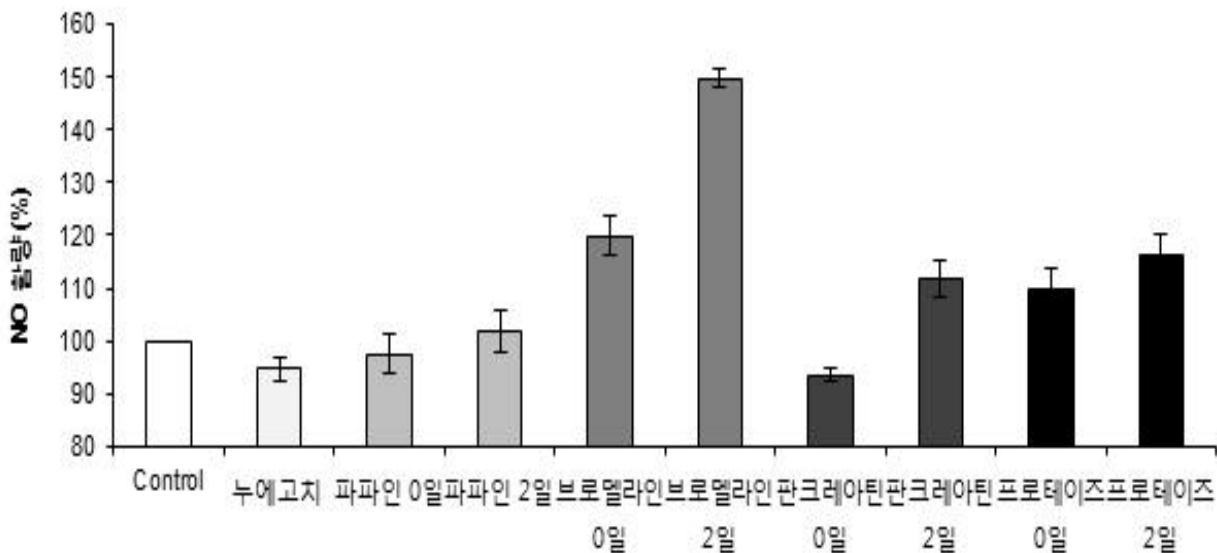
4종 효소 모두 단백질을 분해하였으나, 분자량 분포에서는 차이를 보였다. 파파인 처리 샘플이 5 kDa 이하에서 전반적으로 좁은 범위의 분자량 분포를 보이는 반면, 다른 3종 효소는 수십 kDa에서 수백 Da의 넓은 범위의 분자량 분포를 보였다.



<그림> 효소별 가수분해 실크 펩타이드의 분자량 분포
 (a) 초음파 처리 실크 단백질, (b) a+papain, (c) a+bromelain,
 (d) a+pancreatin, (e) a+fungal protease.

다. 실크 펩타이드의 기능성 검증

위에서 제조한 실크 펩타이드의 혈관 염증과 피부 염증 완화능을 측정하기 위해 HUVEC cell 과 JB6 p+ cell을 이용하였다. Human Umbilical Vein Endothelial Cell (HUVEC)은 5%의 CO2 배양기에서 37°C의 endothelial cell growth 배지에서 배양하였다. 세포는 0.03% EDTA를 포함하는 0.04%의 트립신과 TNS를 사용하여 96 well plate에 $8 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ cell/well로 분주하여 1-2일 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후 5 μ M DAF-FM을 포함한 1 μ L 샘플을 각 웰에 추가하여 1 시간 동안 반응시켰다. 형광분광광도계를 이용하여 생성된 NO의 함량을 495nm (excitation wavelength)와 515nm (emission wavelength)에서 검출하였다 (SpectraMax M2e; Molecular Devices Corporation). 그 결과, 브로멜라인 처리 그룹에서 NO 생성량이 가장 높게 관측되었으며 혈관 염증 완화능이 있음을 확인하였다.

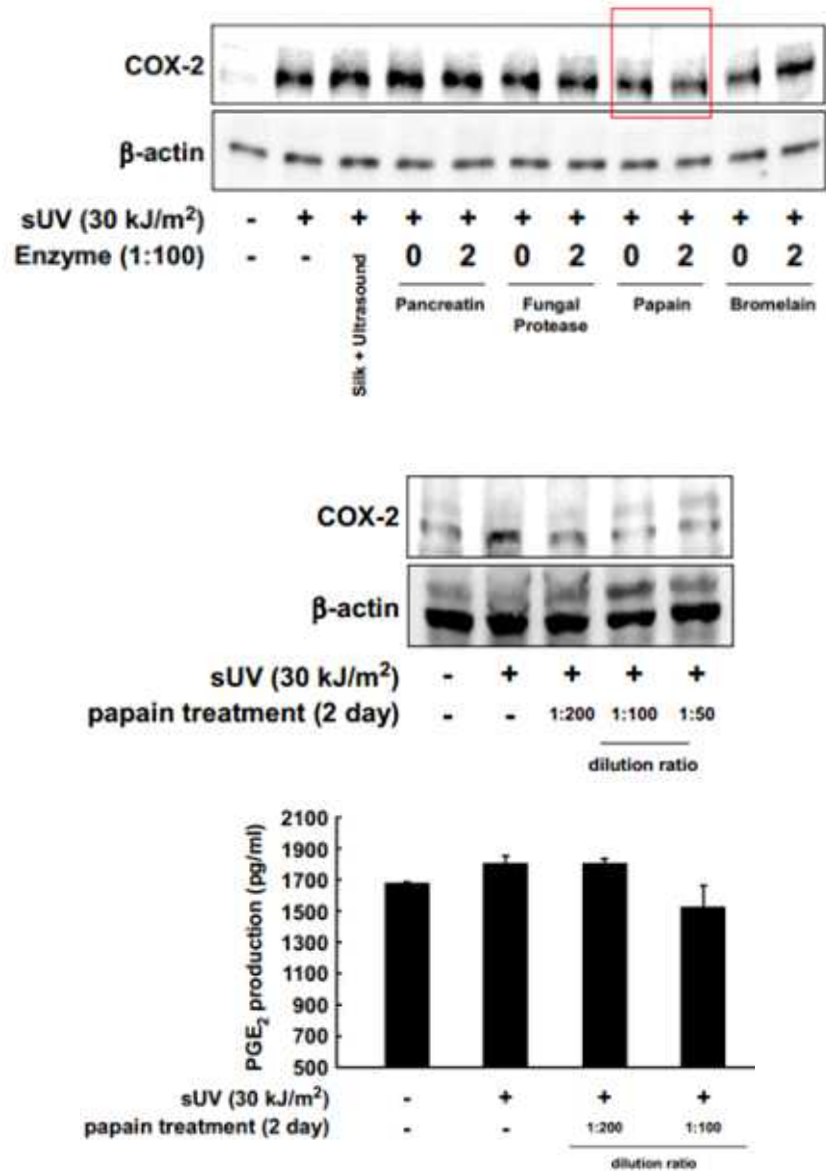


<그림> 실크 펩타이드 효소 가수분해물의 HUVEC 세포에서의 NO 생성능

실크 펩타이드의 피부 염증 개선능은 쥐의 상피세포주 (JB6 P+)를 이용하여 측정하였다. JB6 P+ 세포를 24시간 배양 후 우태아혈청 (FBS)이 들어있지 않은 배지 (DMEM)으로 교환하여 Starvation을 12시간 진행하였다. Starvation 후 각 샘플을 농도에 맞게 배지에 1시간 처리하고 태양광유사 자외선 (solar UV, sUV)을 30 kJ/m² 처리하였다. 태양광유사 자외선 (solar UV, sUV)처리 후 세포배양기 (Incubator)에 넣고 3시간 30분 후 세포내에서 단백질을 추출하고 Western blot 시험법을 이용하여 단백질 내 사이클로옥시게나아제-2 (Cyclooxygenase-2, COX-2)의 발현을 확인하였다. 프로스타글란딘-E2(ProstaGlandin-E2, PGE2)는 태양광유사 자외선 (solar UV, sUV)처리 후 세포배양기 (Incubator)에 넣고 5시간 배양한 후 배지를 수확하여 PGE2 ELISA kit (Cat. # 514010, CAYMAN)로 PGE2양을 측정하였다. Western blot 시험법을 이용하여 단백질 내 염증성신호전달체계 (Inflammatory signaling pathway) 인산화를 확인하였다.

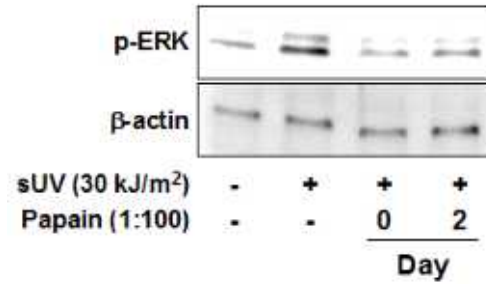
초음파 처리 누에고치 유래 펩타이드와 효소 반응한 가수분해물의 COX-2 발현 측정 결과 파파인 가수분해물에서 COX-2의 발현이 억제되는 것을 알 수 있었다. 파파인 가수분해물을 1:50, 1:100, 1:200으로 농도를 다르게 해서 실험하였을 때, 농도 의존적으로 효과가 있는 것을

확인하였다. 또한 COX-2의 대사산물인 PGE₂의 함량도 파파인 가수분해물의 농도에 따라 감소하는 것으로 보인다.



<그림> 실크 펩타이드 파파인 가수분해물의 COX-2 발현 억제능

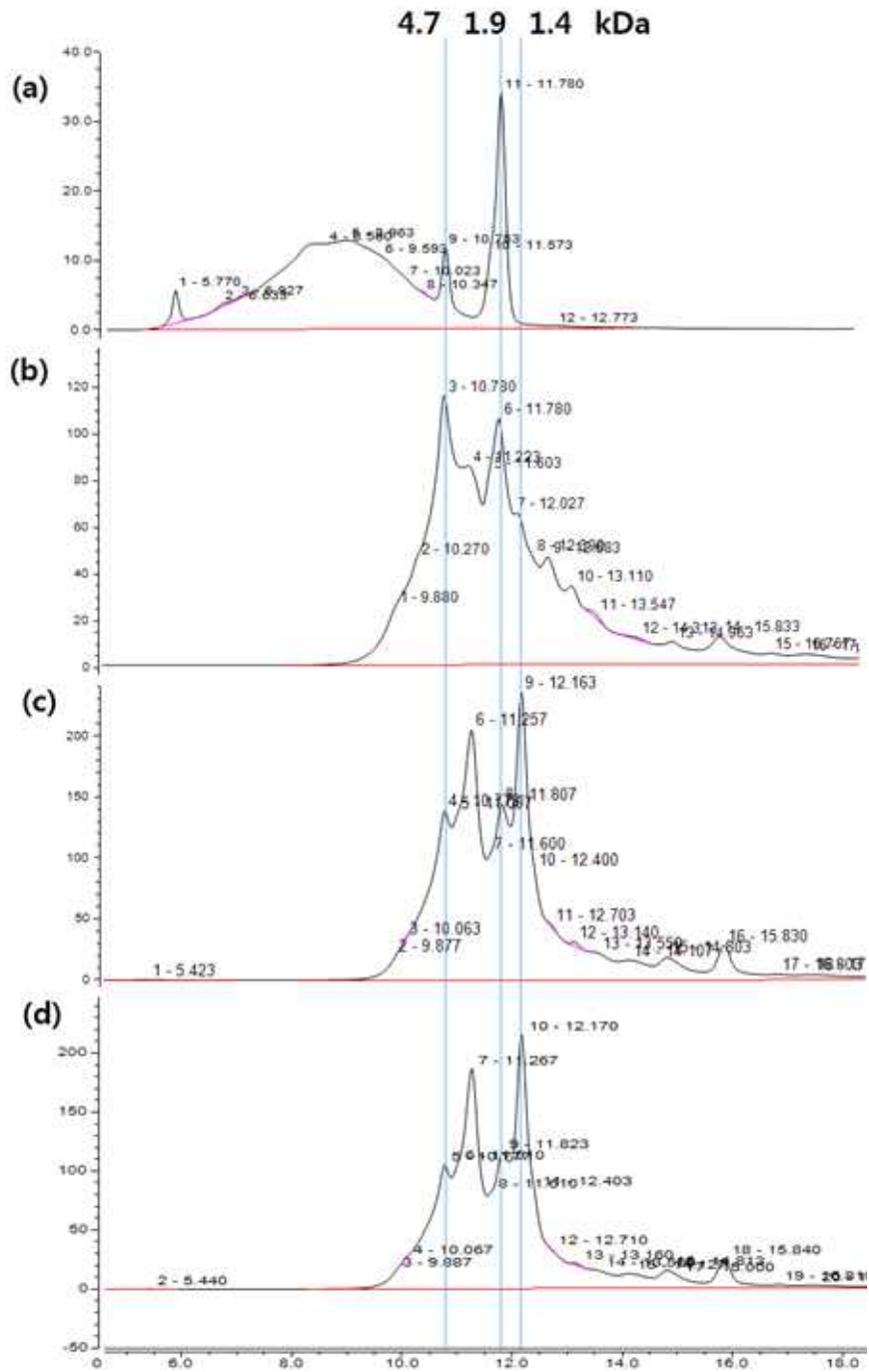
초음파 처리 누에고치 유래 펩타이드의 파파인 가수분해물의 염증성 신호전달체계에 관여하는 인자의 인산화 발현 측정 결과 ERK 인산화를 저해하는 것을 알 수 있었다. 앞서 파파인 가수분해물에서 COX-2 생성이 저해되었는데 이와 관련된 인자가 ERK인 것을 확인하였다.



〈그림〉 실크 펩타이드 파파인 가수분해물의 ERK 인산화 저해능

라. 파파인에 의한 실크 펩타이드 제조 조건 확립

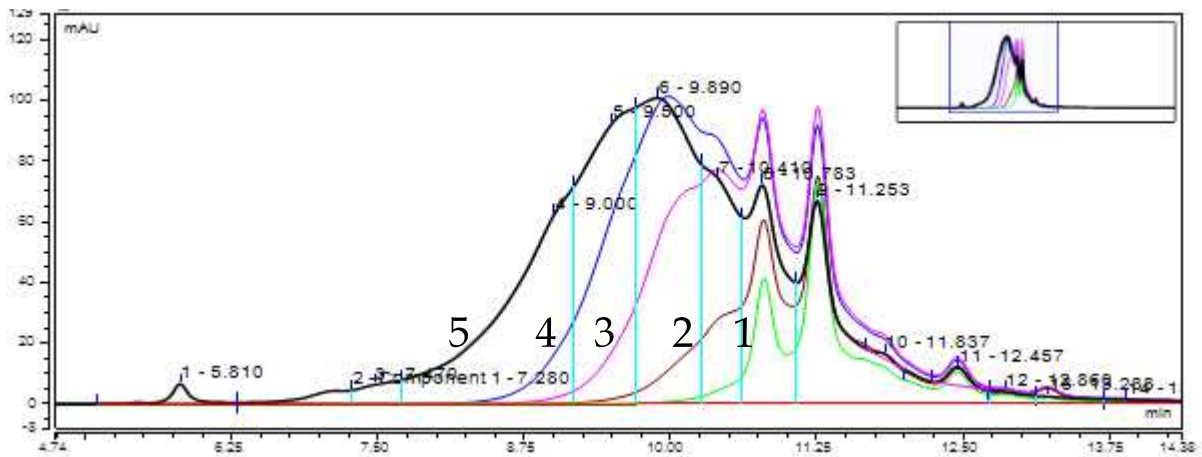
피부 염증 저해 효과가 가장 높았던 파파인을 실크 펩타이드 제조를 위한 효소로 선정하고 최적 조건을 확립하기 위하여 상기 반응 조건에서 반응 시간만 30분, 24시간, 48시간으로 달리 하여 제조한 펩타이드의 분자량을 분석하였다. 반응 30분만에 대부분이 5 kDa 이하로 분해되었으며, 24시간 후에는 1.4 kDa 부근에서 가장 높은 피크가 검출되었고 48시간째에는 큰 변화가 없었다. 최종적으로 크로마토그램 상에서 5 kDa 이하의 분자량을 가지는 펩타이드의 면적비가 79%로 확인되었다.



<그림> 반응 시간별 파파인 처리 실크 펩타이드의 분자량 분포
 (a) 초음파 처리 실크 단백질, (b) a+papain 0.5 h, (c) a+papain 24h, (d) a+papain 48h.

(1) 펩타이드의 분자량별 분획

과파인 분해 실크 펩타이드의 분자량별 분획을 위하여 위 조건에 비해 효소양을 낮게 처리하여 고분자 펩타이드를 포함하는 반응물을 제조하였다. 초음파 처리로 가용화 후 중화한 실크 단백질에 기질 중량 대비 2.5%의 과파인을 처리하여 24 시간 반응하였다. 분자량별 분획은 십자류 여과방식(tangential flow filtration)에 의해 수행하였다. 과파인 분해물을 30, 10, 5, 2 kDa cutoff 여과막에 차례로 통과시켜 2 kDa 이하, 2~5, 5~10, 10~30 kDa, 및 30 kDa 이상의 분자량을 가지는 5개의 분획물을 제조하여 각 분획의 단백질 농도 및 분자량을 분석하였다. 단백질 농도 분석 결과로는 30 kDa 이상 분획이 대부분인 것으로 측정되었으나, GPC 분석 결과 낮은 분자량의 펩타이드도 포함되어 있어 정확한 수치는 측정할 수 없었다.



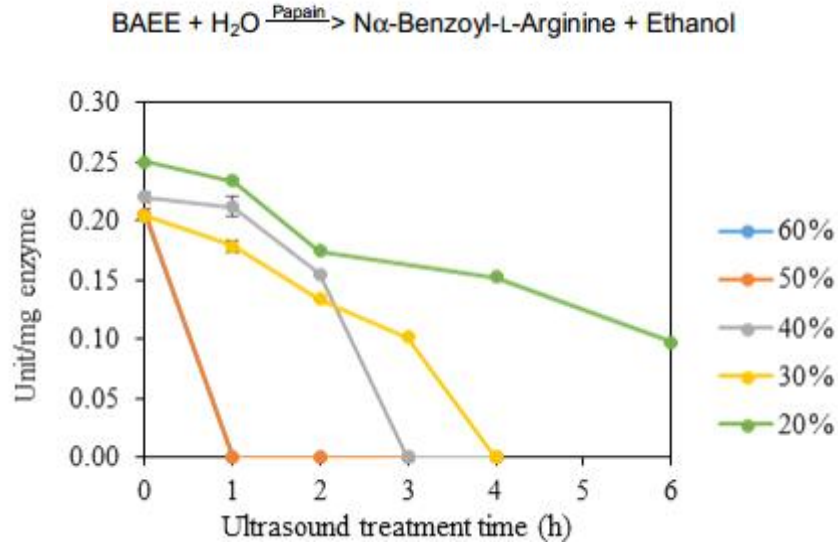
<그림> 분자량별 분획 실크 펩타이드의 분자량 크로마토그램

<표> 분자량별 분획 실크 펩타이드의 수율

No.	kDa	Yield (%)
1	under 2	0.39
2	2~5	0.72
3	5~10	1.61
4	10~30	1.08
5	upper 30	50.59
Total		54.40

마. 초음파 처리에 의한 효소 활성 측정

초음파 처리에 의한 효소 분해 반응 개선 가능성을 확인하기 위하여 초음파 처리 시간에 따른 과파인의 효소 활성도를 측정하였다. BSA 5g에 물 500 mL를 넣고 초음파 출력 20~60% (100% = 750 W) 조건에서 6시간 동안 상온에서 실험을 진행하였다. 효소 활성 측정은 titrimetric rate determination 방법으로 소모되는 수산화나트륨의 양을 구하여 Units/mL로 나타내었다.

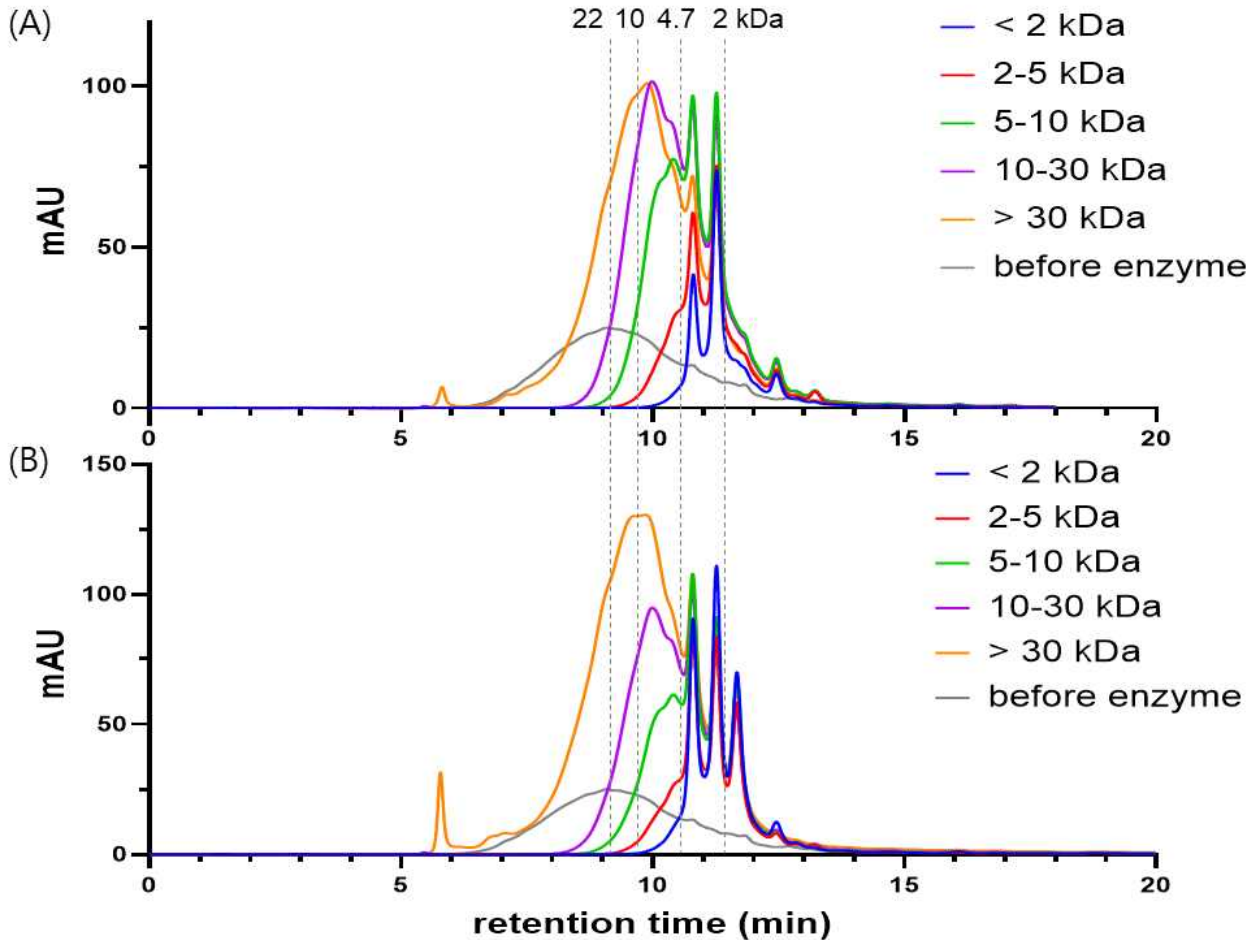


<그림> 초음파 세기와 시간에 따른 효소 활성 변화

측정 결과, 모든 조건에서 시간이 경과함에 따라 효소 활성은 감소하는 것으로 확인되었다. 초음파 출력이 높아질수록 효소 활성은 급격히 감소하였으며, 50% 이상에서는 완전히 불활성화 되었다. 반면, 가장 낮은 20% 출력 조건에서는 활성이 비교적 서서히 감소하였으며, 처리 4시간까지는 미처리군 대비 활성의 50% 이상을 유지하는 것으로 관측되었다.

(1) 초음파 + 효소 병행 처리 실험

앞선 초음파에 의한 효소 활성 확인 실험에서 모든 초음파 처리 조건에서 파파인의 활성이 감소하는 결과를 확인하였다. 그러나, 비가용성 단백질이 포함되어 있는 환경에서 효소 반응시 초음파의 활용 가능성을 확인하기 위하여 가용화 단계 이후 효소 단독 처리 및 초음파와 효소 병행 처리 결과를 비교하였다. 먼저, 누에고치와 0.1 M NaOH를 1:50(w/v) 비율로 섞은 뒤, 4시간 동안 초음파 처리하여 가용화한 용액을 pH 7 부근으로 중화하여 준비하였다. 이 용액에 파파인을 누에고치 대비 2.5% (w/w) 가하여 효소 단독 처리구는 앞선 최적 조건을 적용하여 24시간 반응시켰고, 초음파 병행 처리구는 초음파 20% 출력 조건에서 4시간 반응시켜 준비하였다. 각 조건에서 실크 펩타이드의 수율은 각각 54.4%, 57.7%로 큰 차이는 없었다. 두 샘플의 분자량 차이를 확인하기 위하여 분자량별 분획 후 GPC 분석을 실시하였다. 분자량별 분획은 십자류 여과방식(tangential flow filtration)으로 수행하였으며 molecular weight cut-off가 각각 30,000, 10,000, 5,000, 2,000인 membrane (vivaflo 200, Sartorius, Germany)을 차례로 통과시켜 분획물을 확보하였다.



〈그림〉 실크 펩타이드의 분자량별 분획물의 GPC 분석 크로마토그램

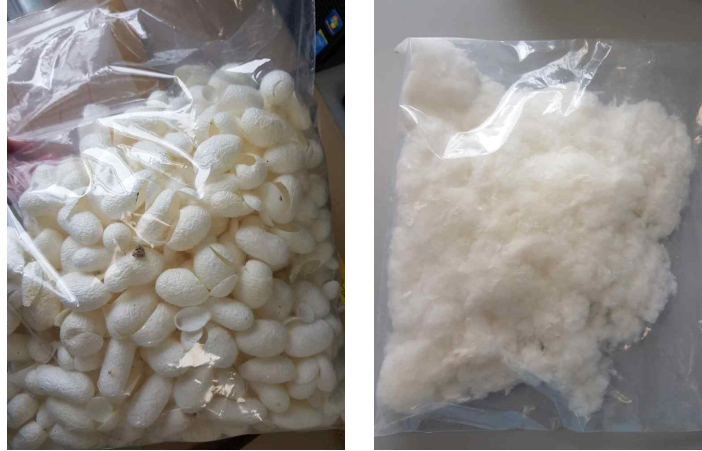
(A) 초음파 가용화 실크 단백질의 파파인 24 시간 반응물; (B) 초음파 가용화 실크 단백질의 파파인 + 초음파 4시간 반응물.

분획물의 분자량 측정 결과, 효소 단독 처리구에 비해 초음파 병행 처리구에서 10 kDa 이상 고분자 분획이 많이 남아있는 것을 확인할 수 있었다. 위 결과를 통해 초음파 병행처리보다는 효소 단독으로 처리하는 것이 저분자 실크 펩타이드 제조에 유리할 것으로 판단하였다.

(2) 실크 펩타이드 생산 공정 scale-up (파일럿 규모)

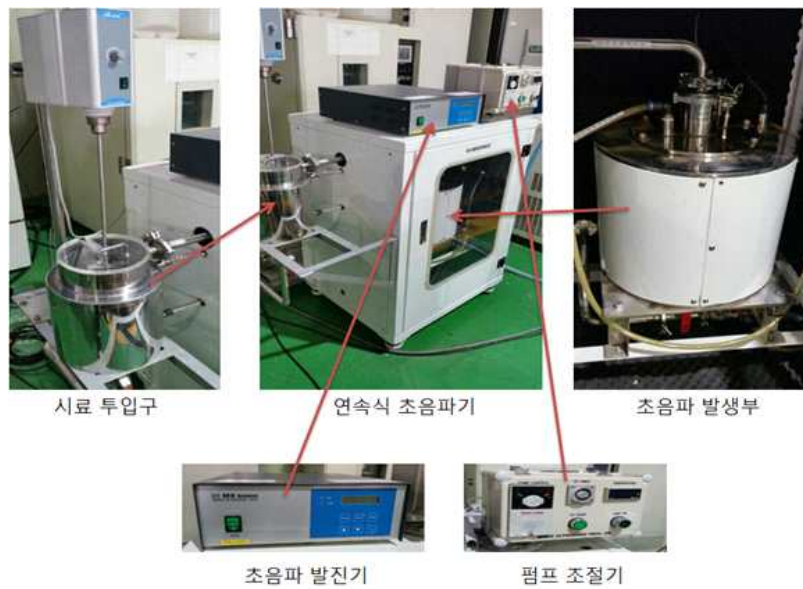
(가) 순환형 초음파 장치를 활용한 실크 단백질 가용화 조건 확립

초음파 장치는 한국식품연구원에서 미래초음파에 의뢰하여 제작한 순환형 초음파 장치를 이용하였다. 실험실 규모 시험에 사용한 혼(horn) 타입 초음파 장치가 시료가 담긴 탱크에 초음파 발생부를 직접 처리하는 형태인 것과 달리, 파일럿 규모 시험에 사용한 순환형 장치는 시료가 시료 탱크와 초음파 발생부를 순환하는 형태로 설계되어 있다. 따라서, 누에고치 형태를 그대로 사용할 수 없어 다목적 분쇄기(pulverisette 19; FRITSCH, Germany)를 이용하여 분쇄한 샘플을 이용하였다.



<그림> 누에고치 분쇄공정 전후

먼저, 분쇄한 샘플의 가용화에도 초음파 처리 공정이 반드시 필요한지 확인하기 위하여 분쇄한 샘플에 50배량의 0.1 M NaOH를 가하여 4시간 동안 초음파 처리한 샘플과 교반만 한 샘플을 준비하였다. 각 샘플의 pH를 중성으로 맞춘 뒤 파파인을 48시간 처리하고 상층액을 동결건조하여 수율을 측정하였다. 그 결과, 가용화 단계에서 초음파 처리한 샘플의 수율은 54.5%인 반면, 초음파 처리하지 않은 샘플의 수율은 7.7%로, 분쇄한 샘플의 가용화에도 초음파 처리가 필요함을 확인하였다.



<그림> 순환형 초음파 장치



<그림> 순환형 초음파 장치를 이용한 실크 단백질의 가용화 과정

분쇄된 샘플을 0.1 M NaOH 용액에 분산시켜 보았을 때 용매 30배량까지도 균질하게 분산이 되는 것을 확인하여 이 비율에서 가용화 작업을 진행하였다. 누에고치 분쇄물과 0.1 M NaOH 를 1:30(w/v) 비율로 혼합하여 900 W, 20 kHz, 25°C 조건에서 초음파 처리하였다. 가용화율은 투입 시료량 대비 상층액 중의 단백질 농도로 측정하였으며, 초음파 처리 1, 2, 3 시간 후 각각 60.0, 58.6, 58.3%로 측정되었다. 이 조건에서는 상층액 중의 단백질 농도가 1시간 만에 포화 상태에 이른 것으로 보이며, 초음파 처리시간을 늘려도 가용화율을 높일 수 없는 것으로 보인다. 불용 잔사물의 추가 가용화 가능성을 확인하기 위하여 상기 조건에서 1시간 처리한 잔사물에 동량의 용매를 가하여 다시 1시간 처리하는 작업을 반복 수행하였다. 그 결과 2차 처리까지 약 73%의 가용화 단백질이 회수되었으며, 이후로는 가용화율이 급격히 낮아짐을 확인하였다.

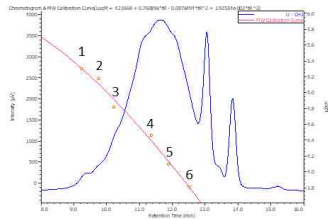
표. 초음파 처리 횟수에 따른 실크 단백질의 가용화율

반복 횟수	1	2(1차 잔사)	3(2차 잔사)	4(3차 잔사)
가용화율 (%)	54.2	19.0	5.4	2.5

(나) 파파인에 의한 실크 펩타이드 제조 조건 확립

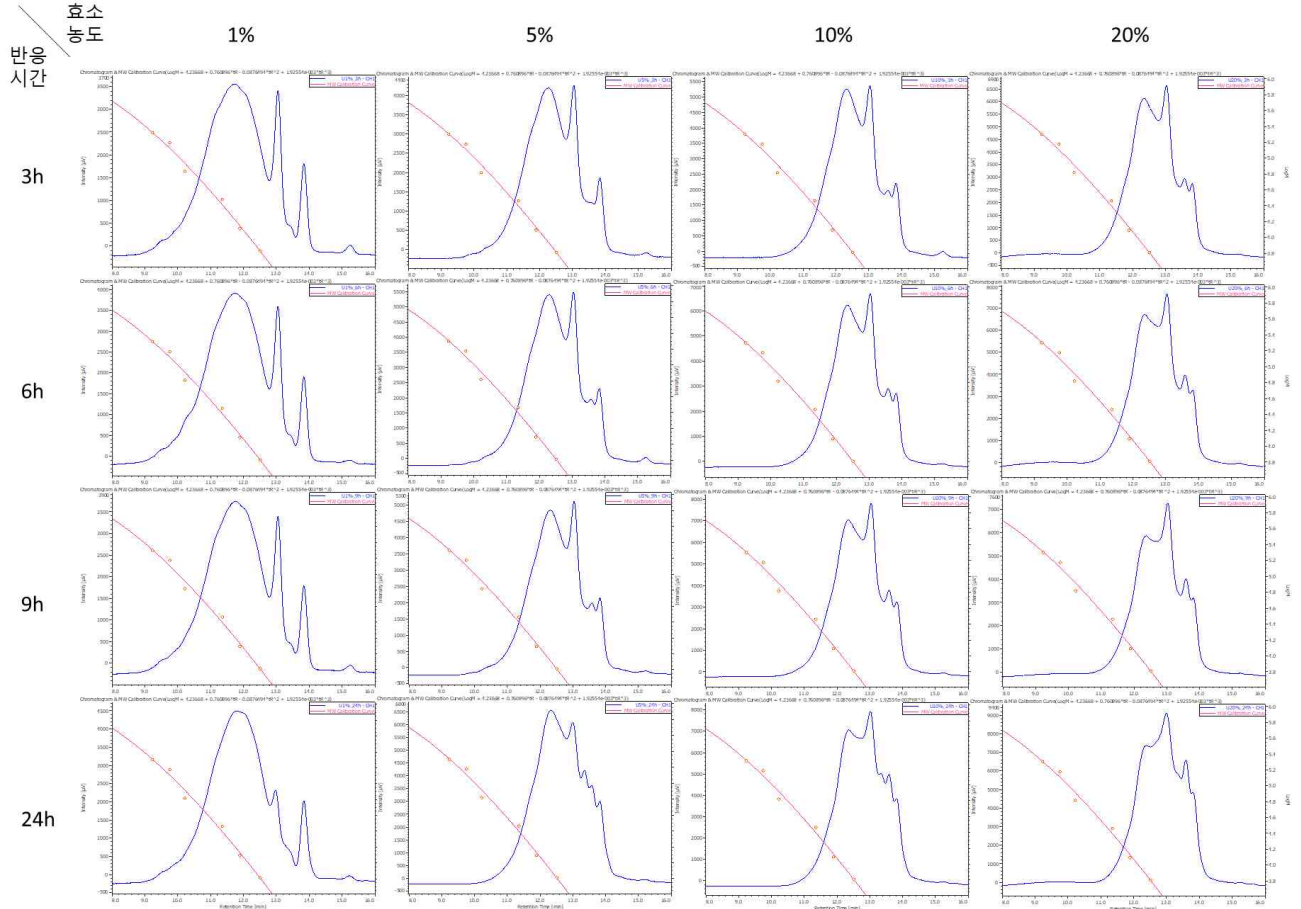
상기 조건에서 1시간 초음파 처리한 실크 단백질 용액을 pH7로 중화한 후 기질 대비 1, 5, 10, 20% (w/w)의 파파인 효소 (Sigma-aldrich)를 처리하여 25°C 에서 교반하며 반응하였다. 반응 3, 6, 9, 24시간 쯤의 샘플의 분자량 변화를 GPC 분석을 통하여 관측하였다. 분석에는 Protein KW-803 (I.D. 8mm × 300mm, 4 μm) 칼럼을 사용하였으며, 0.3 M NaCl을 함유한 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)을 유속 0.9 min/mL로 흘려주며 UV 검출기로 220 nm에서 측정하였다.

초음파 처리 실크



Standard

- 1: Thyroglobulin, bovine, 669,000 MW
- 2: β -Amylase, sweet potato, 200,000 MW
- 3: Alcohol Dehydrogenase, yeast, 150,000 MW
- 4: Carbonic Anhydrase, bovine erythrocytes, 29,000 MW
- 5: Cytochrome c, Horse heart, 12,400 MW
- 6: Aprotinin, Bovine lung, 6,500 MW

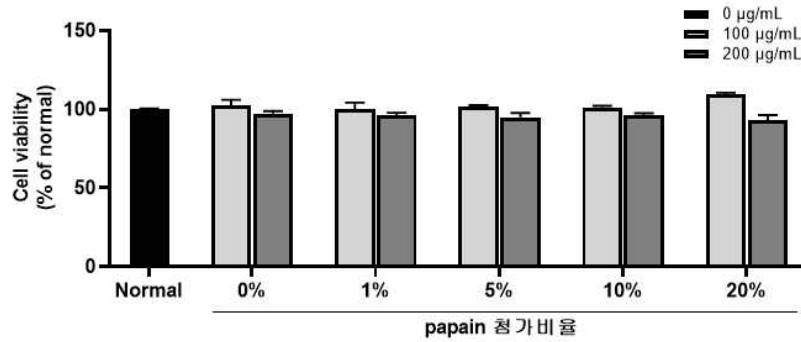


<그림> 파파인 처리 농도별, 반응 시간별 실크 펩타이드의 분자량 분포

파파인 1% 처리군을 제외 모든 샘플에서 반응 3시간 이후부터 분자량이 빠르게 감소하는 경향을 보였으며, 반응 24시간 이후에는 5% 이상 처리한 모든 샘플에서 유사한 분자량 분포를 가지는 것을 확인할 수 있었다. 파파인 처리 조건을 확립하기 위하여 농도별 9시간 반응물의 효능을 확인하였다.

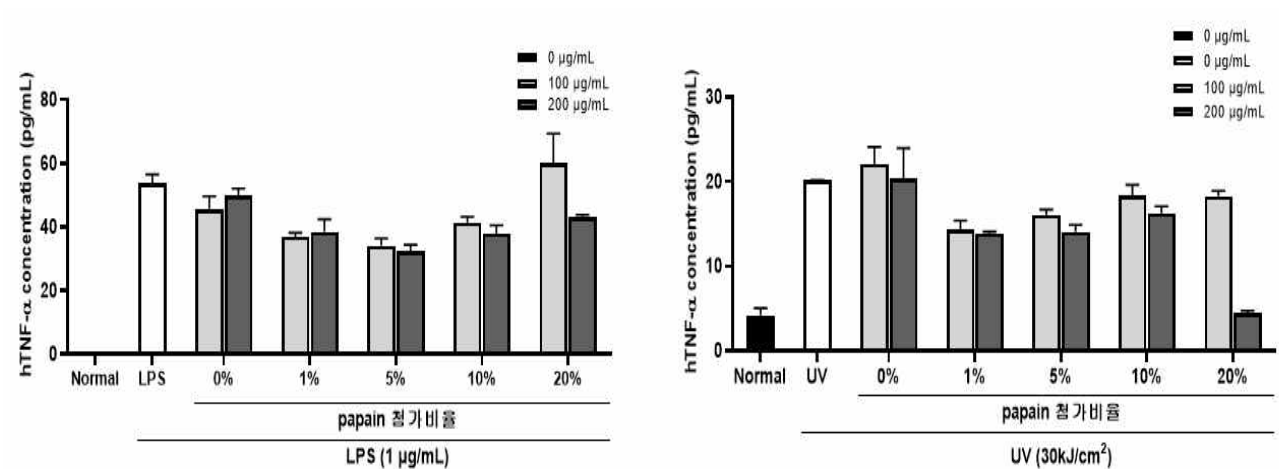
(다) 실크 펩타이드의 기능성 검증

실크 펩타이드의 피부 염증 개선능을 인간 각질형성세포 (HaCaT)를 이용하여 측정하였다.



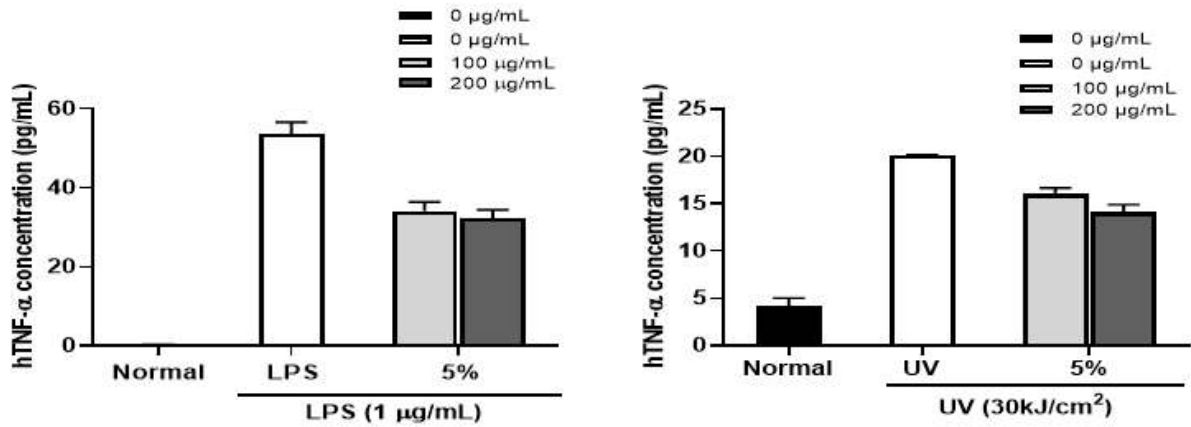
<그림> 실크 펩타이드의 HaCaT 피부세포에서의 독성 평가

파파인 처리 농도별 실크 펩타이드의 HaCaT에 대한 세포 독성을 측정해본 결과, 실크 펩타이드 100-200 µg/ml 에서 피부세포 독성은 나타나지 않았다.



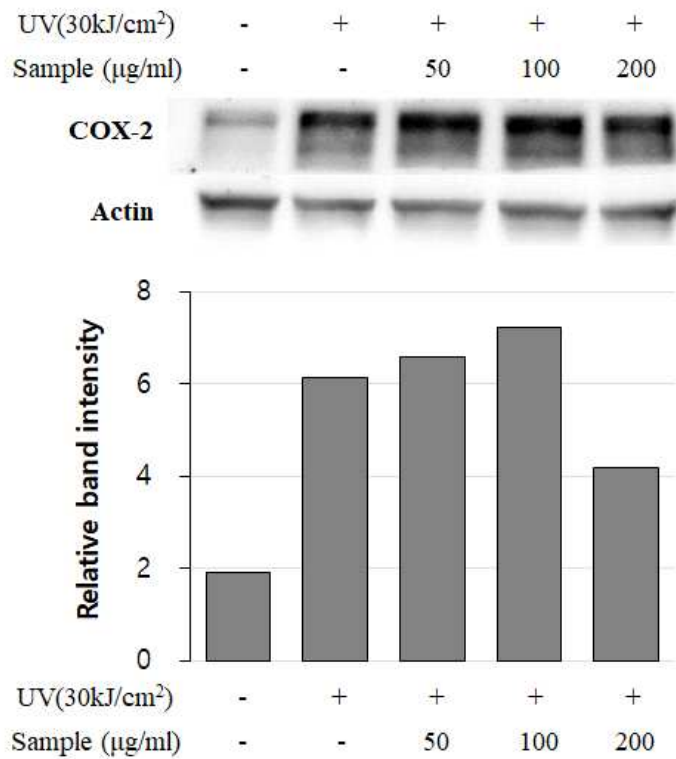
<그림> 실크 펩타이드의 LPS, UV(자외선)으로 유도한 TNF-alpha의 개선 효과

LPS 및 UV로 염증 반응을 유도한 HaCaT 세포에 실크 단백질 가수분해물을 처리하여 피부 세포 보호 효과를 확인한 결과 파파인 5% 처리 샘플에서 사이토카인(TNF-alpha) 감소 효과가 높게 나타났으며 이후 실험은 파파인 5% 가수분해물을 선정하여 진행하였다.



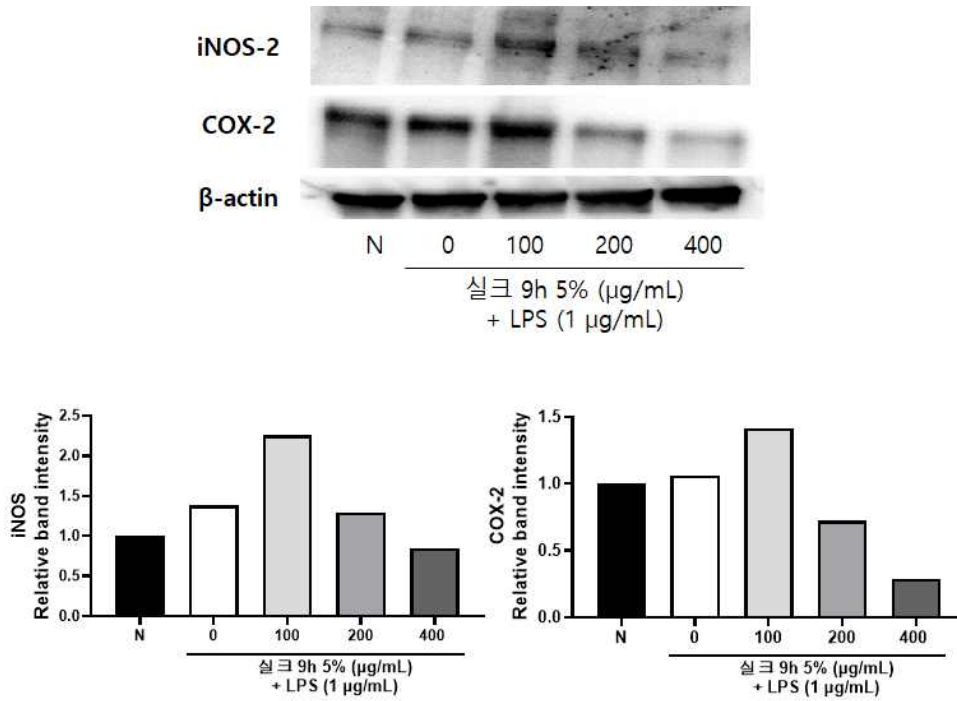
<그림> 실크 5% 파파인 가수분해물의 LPS, UV(자외선)으로 유도한 TNF-alpha의 개선 효과

실크 5% 파파인 가수분해물의 피부 염증 개선효과를 피부세포에서 LPS 및 UV로 유도된 사이토카인(TNF-alpha)의 발현 저해 효과를 통해 확인할 수 있었다.

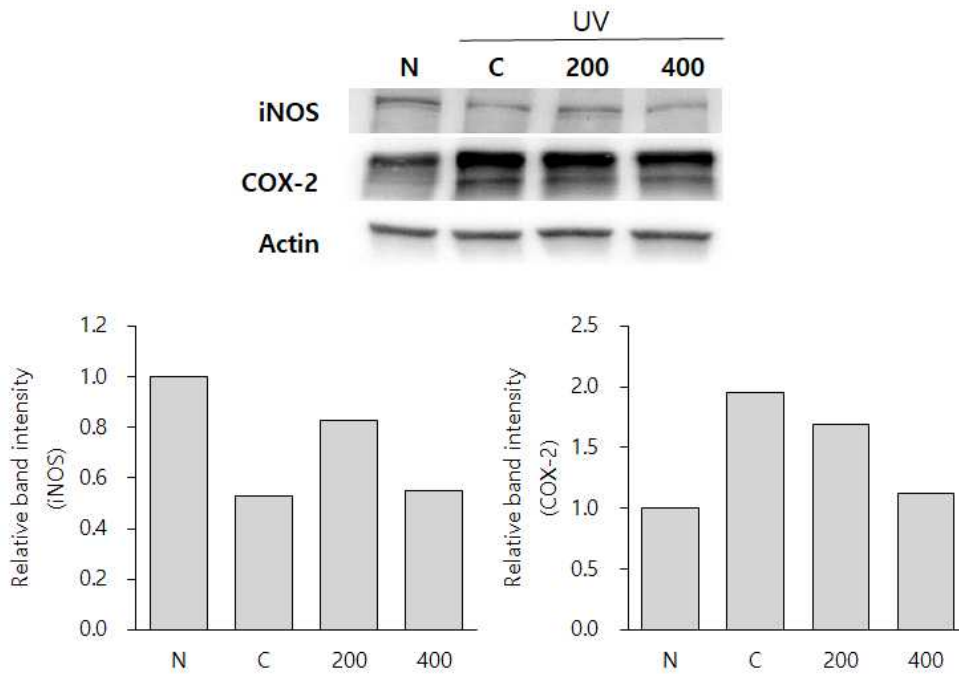


<그림> 실크 5% 파파인 가수분해물의 UV로 유도한 COX-2 개선 효과

실크 단백질의 5% 파파인 가수분해물 200 μg/ml 처리군에서, UV(자외선)에 의해 유도된 피부 염증 인자인 COX-2의 발현량이 감소하는 것으로 관측되었다.

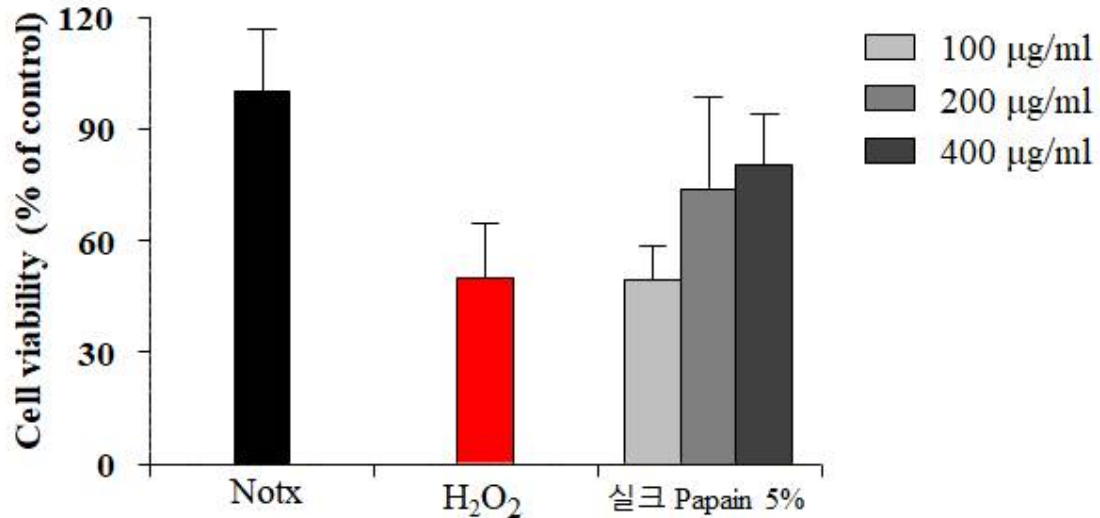


<그림> 실크 5% 파파인 가수분해물의 LPS로 유도한 염증 인자(iNOS,COX-2) 개선 효과



<그림> 실크 5% 파파인 가수분해물의 UV로 유도한 염증 인자(iNOS,COX-2) 개선 효과

피부세포에서 LPS로 및 UV로 유도된 염증 인자인 iNOS와 COX-2의 발현량 감소 효과를 확인하였다. LPS로 유도한 염증 인자의 발현량은 실크 펩타이드 200, 400 μg/ml 처리 농도에서 감소하였으며, UV로 유도한 피부 염증 인자의 발현량은 400 μg/ml 농도에서 감소하였다.



<그림> 실크 5% 파파인 가수분해물의 HaCaT 피부세포에서의 항산화 효과

또한, 실크 펩타이드의 HaCaT 피부세포에 대한 항산화 효과를 확인하기 위하여, 피부세포에 H₂O₂로 산화적 스트레스를 유도한 후 실크 펩타이드를 처리하여 세포 생존율을 측정하였다. 확인 결과, 실크 펩타이드를 처리한 그룹에서 농도 의존적으로 세포 보호 결과가 관측되었다.

바. 실크 펩타이드의 대량생산을 위한 공정 확립

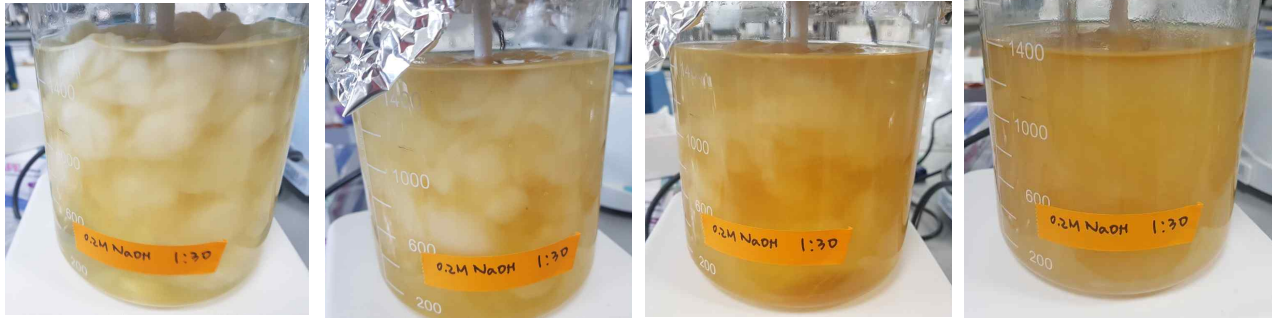
(1) 대량생산용 초음파 장치를 활용한 실크 펩타이드 제조 조건 확립

실크 펩타이드의 대량생산을 위한 가용화 공정에는 한국식품연구원에서 보유하고 있는 최대 1톤까지 처리 가능한 순환형 초음파 장치를 이용하였다.



<그림> 한국식품연구원 보유 대량생산용 순환형 초음파 장치

실크 단백질의 가용화 시험에 앞서 전처리 공정 개선을 통해 대량생산의 효율성을 높이고자 하였다. 누에고치에 0.2 M NaOH 용액을 30배량 가하여 70℃에서 가열하며 교반하였을 때 8시간 후 누에고치 형태가 사라진 것을 확인하였다.



1시간

3시간

4시간

8시간

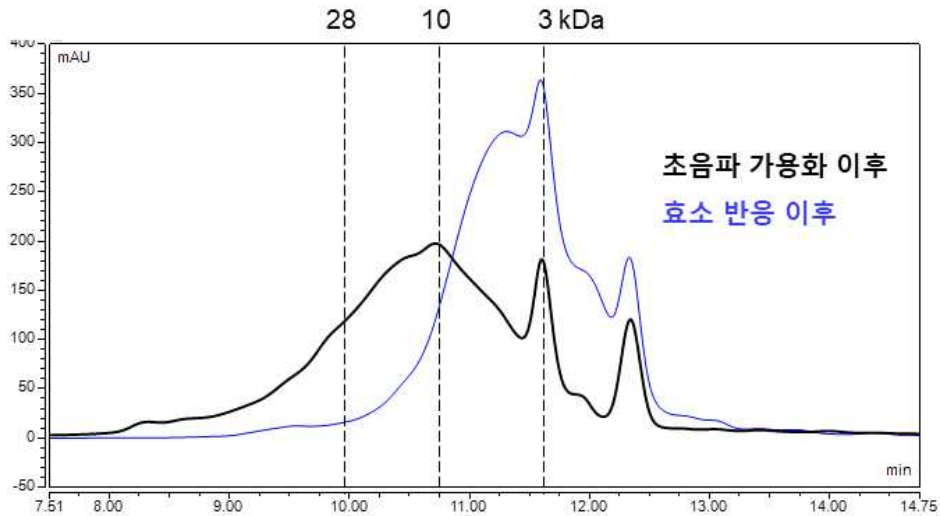
<그림> 가열 시간별 누에고치의 NaOH 용액 중 형태 변화

위의 결과를 토대로 대량생산 1차 시험을 진행하였다. 초음파 추출 장치의 원료탱크에 0.2 M NaOH 400 L를 넣고 초음파 장치에 부착된 스팀 장치와 냉각수로 온도를 70도로 유지하며 누에고치 원료를 투입하였다. 그러나, 용액에 부유하며 서로 감기는 시료의 특성으로 인하여 이처럼 큰 부피에서는 교반 및 분산이 되지 않는 문제점을 발견하였다.

따라서, 기존 파일릿 규모 시험과 마찬가지로 분쇄한 시료를 이용하여 2차 시험을 진행하였다. 원료탱크에 300 L의 0.1 M NaOH와 분쇄한 누에고치 시료 3 kg을 혼합하여 20 kHz, 960 W, 상온 조건에서 3시간 초음파 처리 후 pH 7까지 중화하였다. 여기에 파파인 5%(w/w)를 처리하여 상온에서 24시간 반응하였다. 단계별 수율은 상층액의 단백질 농도를 측정하여 계산하였으며, 가용화 후에는 35.4%, 파파인 처리 후에는 43.9%로 확인되었다.



<그림> 실크 펩타이드의 대량 생산을 위한 공정 시험 개요



〈그림〉 파파인 처리 전후 실크 펩타이드의 분자량 비교

대량생산 공정을 통해 제조한 실크 펩타이드의 분자량을 확인하기 위하여 GPC 분석을 실시하였다. 파파인 처리 이후 분자량이 크게 감소하여 대부분이 10 kDa 이하에서 검출되었으며, 5 kDa 이하의 저분자 펩타이드의 면적비가 61.7%인 것으로 확인되었다.

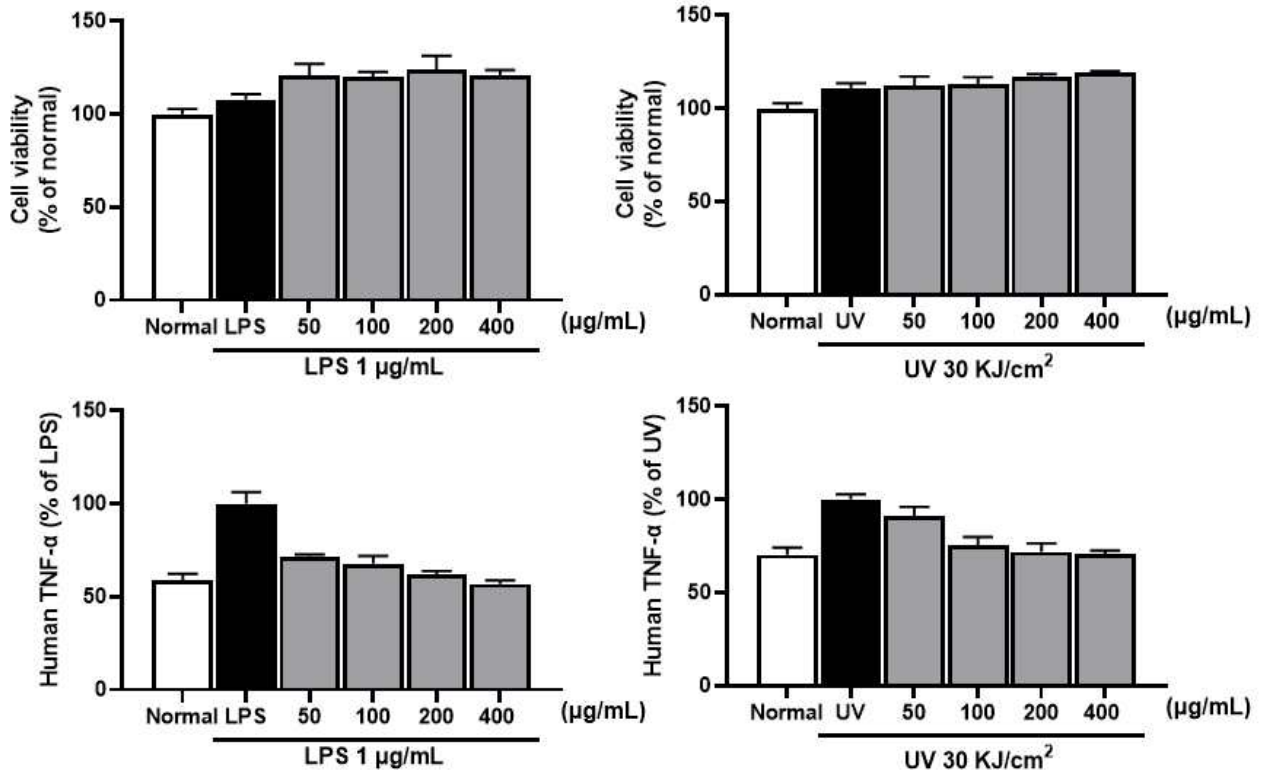
표. 분자량별 실크 펩타이드 함량비(%)*

	초음파 가용화 이후	효소 반응 이후
10 kDa 이하	49.8	87.8
5 kDa 이하	29.5	61.7
3 kDa 이하	17.3	34.8

*전체 피크 면적에 대한 특정 분자량 이하의 피크 면적비로 계산

(2) 실크 펩타이드의 기능성 검증

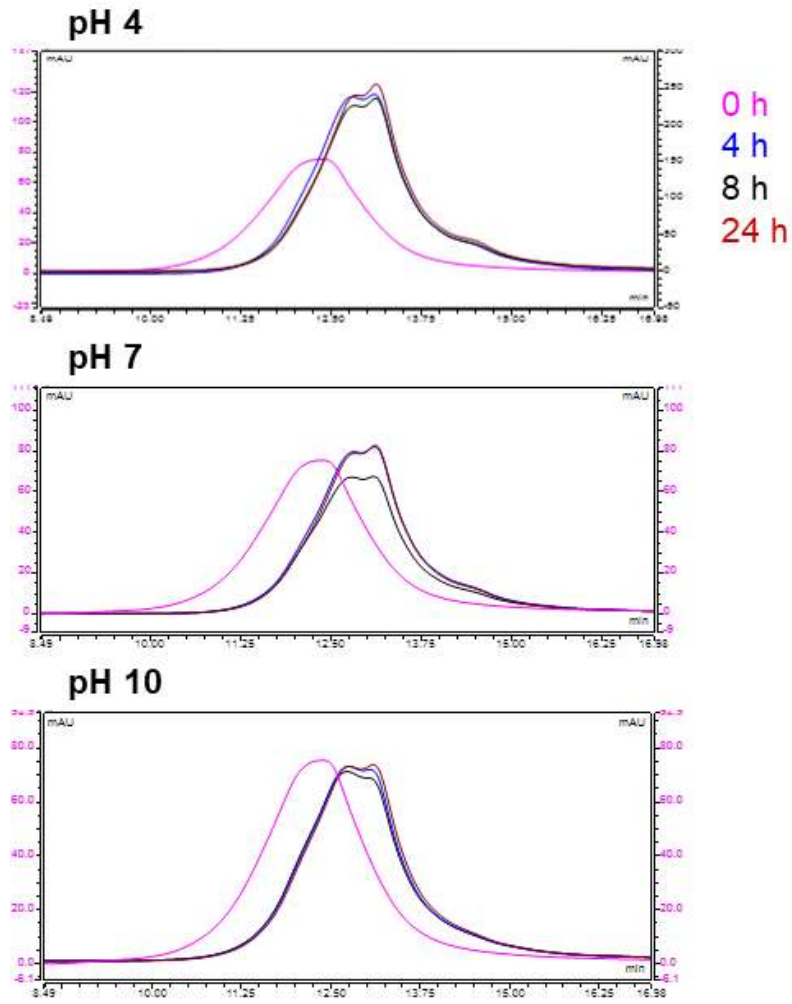
대량생산 공정을 통해 제조한 실크 펩타이드의 피부세포에서의 항염증 반응 확인을 위하여 HaCaT 세포에서 LPS 및 UV로 유도된 염증성 사이토카인인 TNF-alpha의 발현량 감소 효과를 확인하였다. LPS 및 UV에 의해 유도된 TNF-alpha의 발현량은 실크 펩타이드 50-400 $\mu\text{g/ml}$ 처리 농도에서 농도의존적으로 감소하였으며, 이 조건에서 세포 독성은 확인되지 않았다.



<그림> 대량생산 실크 펩타이드의 HaCaT 세포에 대한 독성평가 및 LPS, UV(자외선)으로 유도한 TNF-alpha의 개선 효과

(3) pH에 따른 효소 반응 조건 확인

실크 펩타이드 제조를 위한 효소 반응이 중성 pH 및 중온 조건에서 진행됨에 따라, 대량생산 규모에서는 미생물의 오염 문제가 발생할 수 있다. 이를 방지하기 위하여 미생물의 생육이 어려운 조건인 산성 혹은 알칼리 조건에서 효소 반응 가능성을 확인하였다. 누에고치 분쇄물에 50배량(w/v)의 0.1 M NaOH를 가하여 2시간 초음파 처리 후 pH를 4, 7, 10으로 조절한 용액에 파파인을 처리하여 시간별 분자량 변화를 GPC로 분석하였다. 그 결과, pH에 따른 효소 반응성에는 큰 차이가 없었으며, 이 결과를 통해 가용화 조건과 유사한 알칼리 조건 혹은 산성 조건에서도 효소 반응이 가능할 것으로 예상하였다.



<그림> pH별 효소반응 시간에 따른 실크 펩타이드의 분자량 변화 비교

3. 기술적 성과

가. 실크펩타이드를 함유한 건강기능식품 최종 시제품

(1) 실크젤리, (SS)에스에스스킨솔루션, (SS)에스에스혈행솔루션 총 세 가지의 시제품 제작

- (가) 실크젤리 : 일반식품, 젤리형태로 최종 시제품 제작
- (나) (SS)에스에스스킨솔루션 : 정제형으로 최종 시제품 제작
- (다) (SS)에스에스혈행솔루션 : 정제형으로 최종 시제품 제작

<p>[과정1]</p> 	<p>[과정설명]</p> <p>원료 입고</p>
<p>[과정2]</p> 	<p>[과정설명]</p> <p>입고된 원료 이외에 들어갈 원료를 선별하는 과정</p>



[과정3]



[과정설명]

선별된 원료를 혼합하는 과정 및 젤리 만드는 과정

[과정4]



[과정설명]

혼합된 원료를 타정기에 넣고 타정하는 과정 및 젤리 만드는 과정



[과정5]



[과정설명]

제조한 정제 및
젤리를
포장 하는 과정



나. 시제품 포장 디자인 진행
 (1) 실크젤리



(2)(SS)에스에스스킨솔루션



(3)(SS)에스에스혈행솔루션



다. ‘실크젤리’ 관능평가

: 젤리의 경우 맛, 외관, 질감에 의해 호불호가 많이 결정되는 품목이기에 최종적인 샘플의 맛, 외관, 질감을 결정하기 위해 맛과 점증제의 정도를 달리하여 샘플 세 가지를 만들어 관능검사는 외(색상), 질감(입안느낌), 냄새(향), 맛(신맛), 맛(단맛)에 대해 평가

○ 시제품 샘플의 관능평가는 20.12.11 일자에 실시하였다. 참가자는 모두 10명으로 20대가 4명, 30대가 2명, 40대가 1명, 50대가 3명이며 직업군은 직장인이다.

○ 해당 조사는 실크젤리 샘플 세가지에 대한 조사로 외관(색상), 질감(입안에서의 느낌), 냄새(향), 맛(단맛), 맛(신맛)의 항목검사를 실시했으며, 시식 리스트와 항목별 검사지를 함께 배포하였다.

<시음 방법 리스트>

관능평가 방법 리스트

관능평가에 참여해주셔서 감사의 말씀을 드립니다. 다음 내용은 샘플의 시식에 대하여 좀 더 구체적인 내용과 어떠한 점을 중점으로 두는지 도움을 드리고자 하는 내용입니다. 시식은 각 샘플에 맛과 향, 색채 등을 고려하여 시식해주시고 검사표 작성을 통해 솔직한 의견을 남겨주시면 감사하겠습니다.

★뒷장의 검사표와 함께 진행해주세요!!★

※시식하시기 전에 정확한 검사를 위하여 1개의 시료씩 검사를 진행해주세요※

1. 시식하고자 하시는 제품을 시식 전에 물로 입안을 충분히 씻어주세요.
2. 검사표를 보시고 실크젤리 ①, 실크젤리 ②, 실크젤리 ③의 항목에 시료 작주세요.
3. 시료의 향목이 잘 느껴지지 않는다면 물로 입안을 씻어준 후에 재시식해주세요.
4. 검사가 끝나셨다면 애초사항 및 개선사항, 기타의견이 있다면 적어주세요.

※ 제품의 평가가 완료되었다면 총제적 의견 및 개선사항이 있다면 아래 빈칸에 적어주세요.

기타 의견: _____

<항목 검사지>

관능평가 설문지

실험방법 : 제시된 시료에 대한 관능평가요소의 강도를 1에서 9까지의 범위 내에서 평가하도록 한다. 시료는 반드시 전체의 양을 입안에서 다 넣은 후 확인하는 것을 원칙으로 하고 시료 사이에는 반드시 물로 입안을 헹군다.

실크젤리 ① () 실크젤리 ② () 실크젤리 ③ ()	남() 여()
	① 20대 ② 30대 ③ 40대 ④ 50대
	검사 일시: _____
외관(색상)	① 나쁨 ② ③ 보통 ④ 좋음
질감(입안에서 느낌)	① 나쁨 ② ③ 보통 ④ 좋음
냄새(향)	① 나쁨 ② ③ 보통 ④ 좋음
맛(신맛)	① 나쁨 ② ③ 보통 ④ 좋음
맛(단맛)	① 나쁨 ② ③ 보통 ④ 좋음
종합적인 기호도	① 나쁨 ② ③ 보통 ④ 좋음

○ 관능평가 결과

- 실크젤리 ①의 경우 종합적인 의견은 보통 이하의 점수를 받았다. 특히 맛(신맛)에 대하여 낮은 점수를 받았으며, 외관(색상), 질감(입안느낌)은 보통이상의 점수를, 맛(신맛), 맛(단맛)의 경우에는 보통이하의 점수를 받았다.

- 실크젤리②의 경우 종합적인 의견은 보통의 점수를 받았다. 특히 맛(단맛)의 항목에서는 높은 점수를 받았으며, 특히 30대에서 높은 점수를 받았다. 외관(색상), 질감(입안느낌)의 항목에서는 보통이상의 점수를, 냄새(향), 맛(신맛)의 항목에서 보통수준의 점수를 받았다.

- 실크젤리③의 경우 종합적인 의견의 보통 이상의 점수를 받았다. 특히 맛(단맛)의 경우에는 전체적으로 모든 나이 대에서 높은 점수를 받았으며, 외관(색상), 질감(입안느낌), 냄새(향)의 경우에도 전체적으로 보통 이상 점수를 받았다. 특히 외관(색상), 냄새(향)의 경우 30대에서 높은 점수를 받았으며, 질감(입안느낌)은 20대에서 좋은 점수를 받았다. 맛(신맛)의 경우 다른 항목에 비해 낮은 점수를 받았으며 보통 이하의 점수를 받았다.

- 샘플 세 가지를 관능평가 해 본 결과 전체적으로 좋은 점수를 받았던 실크젤리③으로 샘플 작업을 진행하기로 결정하였다. 전체적으로 보통이상의 점수를 받았던 항목과 달리

보통 이하의 점수를 받았던 맛(신맛)의 경우 요청사항에 따라 변경할 필요가 있다. 또한 보통이상의 점수를 받았던 항목들도 타사와의 경쟁력을 높이기 위해서는 더 개선해야 할 필요가 있다.

라. 논문게제(한국식품연구원)



Silk peptide production from whole silkworm cocoon using ultrasound and enzymatic treatment and its suppression of solar ultraviolet-induced skin inflammation

Su Jin Eom¹, Nam Hyoock Lee¹, Min-Cheol Kang¹, Young Ho Kim¹, Tae-Gyu Lim¹, Kyung-Mo Song^{2*}

ARTICLE INFO

Keywords:
Silk peptide
Ultrasound
Enzymatic
Skin inflammation

ABSTRACT

Silk fibroin, which is derived from sericin through degumming, is mainly used as a biomaterial. However, interest in functional modification and industrial application of sericin has been growing in several areas. We used ultrasonication to simplify the extraction process of the silk peptide under low salt conditions at 30°C, instead of using the conventional conditions of high salt and temperature. The concentrations of the silk peptide were measured to determine the optimized extraction time and sericin, which were 4 h and 0.1 M NaCl, respectively. The molecular weight of the extracted silk peptide was measured using SDS-PAGE and GPC. Silk peptide treated with papain after ultrasound had a molecular weight of less than 5 kDa, and the papain treatment yielded reduced salt at low-ionic-strength (LIS) extraction through inhibition of SDS precipitation. This is the first study investigating simultaneous extraction of fibroin and sericin, which can be used for mass production of food materials.

1. Introduction

As a natural biomaterial, silk has beneficial biocompatibility, degradability, non-toxicity, mechanical, and structural properties [1], and is frequently utilized in fibrous scaffolds, films, sponges, microspheres, nanofibers, and drug delivery through chemical and physical processing methods [2,3]. Silk is widely used not only in the pharmaceutical, biomedical, and cosmetic industries but also in the food industry [4]. In recent decades, studies of regenerated silk with fibroin-containing have been conducted to solve problems with food digestion and packaging [5] and to develop silk as a functional or dietary food with antioxidant properties [6].

Silk protein from Bombyx mori is mainly composed of silk fibroin (approximately 70-80%) and silk sericin (approximately 20-30%) containing, both of which are biological polymers. Until recently, few industrial applications of silk fibroin is mainly used, whereas sericin is usually discarded as a byproduct of silk fabric manufacturing. However, regenerated silk fibroin has been commercialized as a skin-care product and applied in many countries [7]. Nevertheless, reliable evidence suggests that sericin is a bioactive compound that improves blood pressure, gastrointestinal function, and wound healing [8]. Therefore, in this study, we manufactured silk peptide using sericin and

fibroin from silk cocoon to decrease waste in the manufacturing process and increase silk peptide yield and functionality.

Various extraction systems to obtain silk peptide have been developed. Silk degumming is the sericin removal process from fibroin using the difference in their melting properties in hot water [9]. Fibroin regeneration allows production of high-molecular weight proteins [10] with proper morphologies, but the use of salts and organic solvents (CaCl₂, NaCl, Na₂CO₃, LiCl, NaOH, and ethanol, alone or in combination) is essential to produce silk protein. In addition, enzymes such as chymotrypsin, pepsin [9], and papain degrade the amorphous portion of silk [11] to produce silk peptide with low molecular weight. Protein decomposition by enzymes plays an important role in the production of bioactive peptide. Although these enzymes have different numbers of cleavage sites on silk fibroin (chymotrypsin, 515; pepsin 101; papain 61), there are no significant differences in cleavage activity and yield quantity [7] between these enzymes.

An ultrasonic-assisted system is commonly used to obtain bioactive compounds from natural products in the food industry [12]. The catalytic action of the ultrasound treatment continuously degrades and increases the size of bubbles of natural products in liquid state, releasing energy through the burst of an bubble, thus, bioactive compounds are extracted by this destructive process, which depends on the



Production of *Undaria pinnatifida* sporophyll extract using pilot-scale ultrasound-assisted extraction: Extract characteristics and antioxidant and anti-inflammatory activities

Su Jin Eom¹, Young Eun Kim¹, Jung-Eun Kim¹, Joon Park¹, Young Ho Kim¹, Kyung-Mo Song^{2*}, Nam Hyoock Lee^{2*}

ARTICLE INFO

Keywords:
Anti-inflammatory activity
Ultrasound-assisted extraction
Polysaccharide
Undaria pinnatifida sporophyll

ABSTRACT

Ultrasound is increasingly utilized for consistently enhancing the number of studies on extraction technology using lower organic solvents for energy conservation in leaching. Previously, we developed an ultrasound-assisted extraction (UAE) method of *Undaria pinnatifida* sporophyll that reduces extraction time and improves extraction yield. In the present study, we extracted *Undaria pinnatifida* sporophyll, which contained polysaccharide and flavonoids, using ultrasonic cavitation (UC). We used pilot-scale extraction (LSE) and yield of *Undaria pinnatifida* sporophyll extract was improved to 120% compared to that with a conventional method (24.7%) and low-salt extraction (LSE) (20%). After 3 h of UAE, bioactivity was obtained as a 20% yield and low-molecular-weight polysaccharides were decreased. The antioxidant activity of the extract was increased after 3 h of UAE, as assessed by DPPH-scavenging, reducing power, and ferric reducing antioxidant power assays. Pilot-scale extraction (LSE) conditions were optimized to 900 W, 20 kHz, 30 °C, and 3 h; the extract obtained using this method showed inhibitory effects on nitric oxide production and activator protein-1 (AP-1) transactivation.

1. Introduction

Undaria pinnatifida (Harvey) Setchell is known marine algae. *Undaria pinnatifida* has a highly reproductive cycle and competitive price. It is mainly produced in China, Japan, and Republic of Korea, with smaller commercial scale production in French, New Zealand, and Spain. These seaweeds contain dietary fibers, numerous minerals, vitamins, and phytochemicals, and thus have attracted interest as functional health foods [1]. Such functionalities were known to be due to functional materials, including sulfated polysaccharides (e.g., fucoidan), carotenoids (e.g., fucoxanthin), minerals, and peptides [2]. Fucoidan is a representative bioactive material from *Undaria pinnatifida* (a natural polysaccharide containing L-cysteine (anti-cancer), glutathione, vitamin, manganese, and zinc) [3]. Many studies have shown that fucoidan has beneficial biological activities, such as antitumor/anti-metastasis [4], antiangiogenic, anticarcinogenic, anti-inflammatory [5], antioxidant, immunomodulatory, antiviral, antimicrobial [6], and antiviral activity [7]. Fucoxanthin is another representative bioactive material of *Undaria pinnatifida*, and is one of the most abundant carotenoids in nature [8].

Fucoxanthin, an allicin compound, is also known for its various properties, such as anticancer, anti-obesity, and antioxidant properties [9]. For use as functional food materials, raw materials must be subjected to an extraction process. The development of alternative, eco-friendly methods has been continuously demanded to minimize the use of organic solvents, which have the risk of toxicity and environment pollution [10]. Ultrasound treatment is an eco-friendly process that not only increases extraction yield but also improves extract stability as the extraction is conducted at a low temperature [11]. Ultrasound treatment on the medium generates bubbles, thereby producing a cavitation phenomenon. When a cavitation bubble collapses near the cell wall, it produces a strong impact on the surface and breaks the cell wall, allowing the solvent to effectively enter the cell, thus facilitating extraction [12,13].

In several recent studies, enzyme, supercritical fluid, ultrasonic, and microwave extraction have been conducted to extract polysaccharides from plants and fungi from algae [14]. In our previous study [15], ultrasonic-assisted extraction of *Undaria pinnatifida* resulted in an increased extraction yield, even under reduced extraction time and solvent

Food & Bioprocess Technology (2019) 12:2020–2027
© The Author(s) 2019

Extraction conditions for *Rosa gallica* petal extracts with anti-skin aging activities

Fan Ju Shin¹, Abram Han¹, Myung-Soo Lee¹, Young-Ran Song¹, Kwang-Min Lee², Tae-Gyu Nam¹, Panjoon Lee², Sung-Yong Lee², Tae-Gyu Lim²

Received: 24 January 2019 / Revised: 25 February 2019 / Accepted: 28 February 2019
© The Author(s) 2019

Abstract The anti-skin inflammatory activities of rose petal extracts have been described in our previous study. Because skin inflammation is closely linked to skin aging, we study investigated the effects of *Rosa gallica* petals on skin aging-related activities such as skin whitening and antioxidant properties. Each sample was prepared via extraction using different ethanol ratios with the objective of evaluating optimal extraction conditions for industrial application. Aqueous 50% (v/v) EtOH extract of *R. gallica* petals significantly suppressed tyrosinase activity, melanin production, and solar UV-induced matrix metalloproteinase-1, a hall mark of wrinkle formation. In addition, the aqueous 50% (v/v) EtOH extract showed the highest antioxidant effect and had higher flavonoid contents, consistent with the reported anti-aging effects. Overall, our findings suggest that *R. gallica* petals extracts exhibit anti-aging effects. Furthermore, 50% EtOH extraction, in particular, was optimal for the highest anti-aging and antioxidant effects as well as to obtain the highest flavonoid content.

Keywords *Rosa gallica* · Skin aging · Flavonoid · Anti-oxidative effect

Introduction

Skin plays a vital role as a protective barrier against harmful factors associated with heredity and genetics, environmental issues, hormonal changes, and metabolic processes (Mullerbacher et al. 2006). Among these, environmental factors, such as exposure to solar ultraviolet (UV) radiation, act as key mediators that contribute to premature aging (Laga and Murphy 2009). Many symptoms of skin-aging, which occurs as a result of photo-aging, include deep wrinkles, abnormal pigmentation and elasticity (Fargnoli et al. 2013; Wlaschek et al. 2001).

Pigmentation is a symptom of aging, which is caused by an abnormal production of melanin, resulting in a variety of skin disorders including freckles, melasma, age spots, and other hyperpigmentation syndromes (Fitzpatrick et al. 2014; Sun et al. 2003). In the melanogenesis pathway, tyrosinase is important as the rate-limiting enzyme that converts L-tyrosine to *p*-DOPA and oxidizes *p*-DOPA to

Published online: 26 March 2019



Springer Nature Link
https://doi.org/10.1007/s11464-019-07000-2
Received: 2 July 2019 / Revised: 6 September 2019 / Accepted: 19 September 2019
Available online: 22 September 2019
1550-4777/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Springer Nature Link
https://doi.org/10.1007/s12292-019-00729-9
Received: 20 April 2019 / Revised: 6 August 2019 / Accepted: 3 August 2019
1151-7530/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

[왼쪽 - Title : Silk peptide production from whole silkworm cocoon using ultrasound and enzymatic treatment and its suppression of solar ultraviolet-induced skin inflammation]

[중간 - Title : Production of *Undaria pinnatifida* sporophyll extract using pilot-scale ultrasound-assisted extraction : Extract characteristics and antioxidant and anti-inflammatory activities]

[오른쪽 - Title : Extraction conditions for *Rosa gallica* petal extracts with anti-skin aging activities]

마. 특허 출원(2건)

- (1) 피부염증 개선 활성이 우수한 누에고치 유래 파파인 효소 분해물 및 이의 용도 / 10-2019-0064606
- (2) 혈관 이완능 및 항염 활성이 우수한 누에고치 유래 브로멜라인 효소분해물 및 이의 용도 / 10-2019-0064628

관인생략
출원번호통지서

출원일지: 2019.05.31
특기사항: 심사청구(유) 공개신청(유) 참조번호(78486)
출원번호: 10-2019-0064628 (접수번호 1-1-2019-0562962-15)
출원인명칭: 한국식품연구원(1-1998-007755-3)
대리인명칭: 특허법인 남연남(9-2012-1000182-6)
발명자명칭: 송경은, 임수진, 이보복, 원태규
발명의명칭: 혈관 이완능 및 항염 활성이 우수한 누에고치 유래 브로멜라인 효소 분해물 및 이의 용도

관인생략
출원번호통지서

출원일지: 2019.05.31
특기사항: 심사청구(유) 공개신청(유) 참조번호(78488)
출원번호: 10-2019-0064606 (접수번호 1-1-2019-056296-49)
출원인명칭: 특허법인남연남(1-1998-007755-3)
대리인명칭: 특허법인 남연남(9-2012-1000182-6)
발명자명칭: 송경은, 임수진, 이보복, 원태규
발명의명칭: 피부염증 개선 활성이 우수한 누에고치 유래 파파인 효소 분해물 및 이의 용도

특 허 청 장

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.

2. 출원된 발명 수순에는 접수일로부터 3개월까지 출원인 납입할 수수료에 대해, 납부자번호로 조회하여 과납액 유무에 관하여 안내하여 드립니다.

3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 특허고객번호 정보변경(결정), 중앙신청서(특허) 온라인(특허)의 홈페이지를 통해 변경하실 수 있습니다.

4. 특허(특정발명) 출원인 명세서 또는 출원된 발명서 발명한 경우, 발명권질 명세서 또는 출원서 제출기간 이전에 출원인명(출원인)을 명세서 또는 출원서 기재된 사항에 맞게 변경하실 수 있습니다.

5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도를 활용하거나 마드리드 제도(선출구)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일로부터 12개월 이내 출원인명(출원인)을 명세서 또는 출원서 기재된 사항에 맞게 변경하실 수 있습니다.

6. 발 출원사실을 위변조 판사하는 경우에는 과징금 과태료에 처하여 하며, 발명 위변조 행위 관련법규를 참고하실 수 있습니다.

7. 출원인명(특수출원)명세서 개발을 발명사(특수출원)가 발명권 질을 갖게 되는 것임. 출원인명(특수출원)명세서 개발을 발명사(특수출원)가 발명권 질을 갖게 되는 것임. 출원인명(특수출원)명세서 개발을 발명사(특수출원)가 발명권 질을 갖게 되는 것임.

8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 출원번호 안내서를 참조하시기 바랍니다.

특 허 청 장

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.

2. 출원된 발명 수순에는 접수일로부터 3개월까지 출원인 납입할 수수료에 대해, 납부자번호로 조회하여 과납액 유무에 관하여 안내하여 드립니다.

3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 특허고객번호 정보변경(결정), 중앙신청서(특허) 온라인(특허)의 홈페이지를 통해 변경하실 수 있습니다.

4. 특허(특정발명) 출원인 명세서 또는 출원된 발명서 발명한 경우, 발명권질 명세서 또는 출원서 기재된 사항에 맞게 변경하실 수 있습니다.

5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특히 선출구)나 마드리드 제도(선출구)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일로부터 12개월 이내 출원인명(출원인)을 명세서 또는 출원서 기재된 사항에 맞게 변경하실 수 있습니다.

6. 발 출원사실을 위변조 판사하는 경우에는 과징금 과태료에 처하여 하며, 발명 위변조 행위 관련법규를 참고하실 수 있습니다.

7. 출원인명(특수출원)명세서 개발을 발명사(특수출원)가 발명권 질을 갖게 되는 것임. 출원인명(특수출원)명세서 개발을 발명사(특수출원)가 발명권 질을 갖게 되는 것임. 출원인명(특수출원)명세서 개발을 발명사(특수출원)가 발명권 질을 갖게 되는 것임.

8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 출원번호 안내서를 참조하시기 바랍니다.

바. 특허등록(2건)

- (1) 피부염증 개선 활성이 우수한 누에고치 유래 파파인 효소 분해물 및 이의 용도 / 10-215 2077
- (2) 혈관 이완능 및 항염 활성이 우수한 누에고치 유래 브로멜라인 효소 분해물 및 이의 용도 / 10-2161454

등록번호: 10-2152077

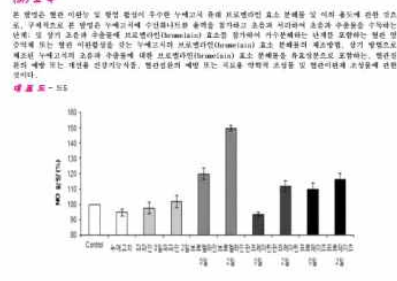
(19) 대한민국특허청(KR) (12) 등록특허공보(B1)	(45) 공고일자: 2020년 10월 08일 (11) 등록번호: 10-2152077 (24) 등록일자: 2020년 09월 24일	(46) 공고일자: 2020년 10월 08일 (11) 등록번호: 10-2161454 (24) 등록일자: 2020년 09월 24일
-------------------------------------	---	---

출원번호: 10-2019-0064606, 10-2019-0064628

등록번호: 10-2161454

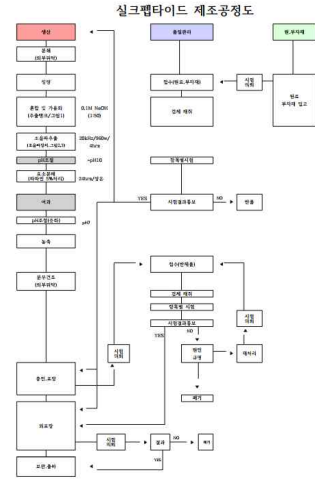
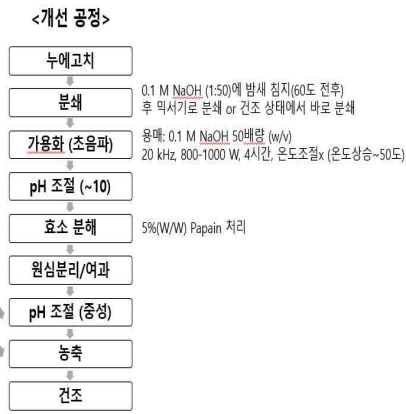
(19) 대한민국특허청(KR) (12) 등록특허공보(B1)	(45) 공고일자: 2020년 10월 08일 (11) 등록번호: 10-2161454 (24) 등록일자: 2020년 09월 24일	(46) 공고일자: 2020년 10월 08일 (11) 등록번호: 10-2152077 (24) 등록일자: 2020년 09월 24일
-------------------------------------	---	---

출원번호: 10-2019-0064606, 10-2019-0064628



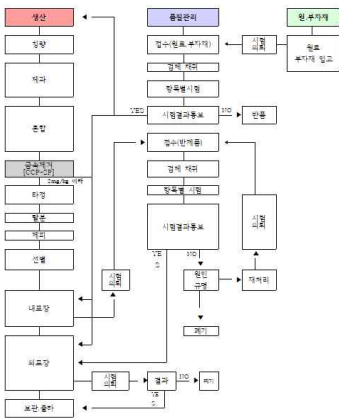
아. 초음파 실크펩타이드 제조공정 확립

● 실크 펩타이드의 제조

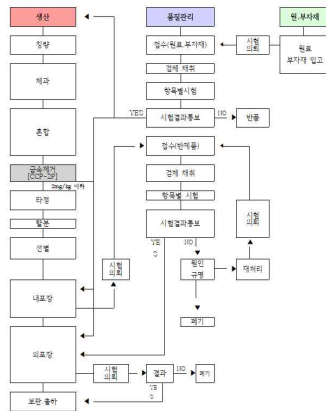


자. 시제품 제조를 위한 제조공정표준화 수립

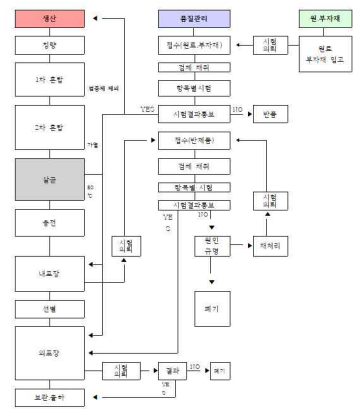
(SS)에스에스킨솔루션 제조공정도



(SS)에스에스알행솔루션 제조공정도



실크젤리 제조공정도



차. 건강기능식품 품목제조신고증 획득

- 제품명 : (SS)에스에스스킨솔루션, (SS)에스에스혈행솔루션

발급번호 : MAMB-ABMR-VARN-KXZ-9ET5

제 20160012278117 호

건강기능식품 품목제조신고증

○ 영업허가(번호) : 20160012278

○ 업 소 명 : 농림축산식품부(에스에스바이오(주))

○ 소 재 지 : 충청남도 천안시 서북구 입장면 흥천당국길 56-3

○ 영업의 종류 : 건강기능식품전문제조업

○ 제 품 명 : (SS)에스에스스킨솔루션 (품목류:히알루론산, 비타민 C)

제조방법·원료나 성분의 명칭과 함량·제품의 형태·기준과 규격 : (위쪽 작성)
 「건강기능식품에 관한 법률」 제7조와 같은 법 시행규칙 제8조에 따라 건강기능식품 품목제조신고증 수리합니다.

2021년 11월 20일

대전지방식품의약품안전청장

발급번호 : 2020-1-549-5392-179F-R03A

제 20160012278113 호

건강기능식품 품목제조신고증

○ 영업허가(번호) : 제 20160012278 호

○ 업 소 명 : 농림축산식품부(에스에스바이오(주))

○ 소 재 지 : 충청남도 천안시 서북구 입장면 흥천당국길 56-3

○ 영업의 종류 : 건강기능식품전문제조업

○ 제 품 명 : (SS)에스에스혈행솔루션 (유형: 은행잎 추출물, 나이아신, 이연, 은토포산, 비타민 B6, 비타민 B2, 비타민 B1)

제조방법·원료나 성분의 명칭과 함량·제품의 형태·기준과 규격 : (위쪽 작성)
 「건강기능식품에 관한 법률」 제7조와 같은 법 시행규칙 제8조에 따라 건강기능식품 품목제조신고증 수리합니다.

2020년 12월 14일

대전지방식품의약품안전청장

카. 일반식품 품목제조신고증 획득

- 제품명 : 실크젤리

발급번호 : MAMB-ABAY-UURU-NTBZ-COKN

식품·식품첨가물 품목제조보고서

보고인	성명 김옥희	생년월일 1981년 11월 05일		
	주소 충청남도 천안시 서북구 입장면 흥천당국길 56-3	전화번호 01093619078		
영업소	명칭(상호) 농림축산식품부(에스에스바이오(주))	영업등록번호 20150449074		
	소재지 충청남도 천안시 서북구 입장면 흥천당국길 56-3			
제품정보	식품의 유형	과다류	품목제조보고번호	2015044907463
	제품명	실크젤리		
	유통기한	제조일로부터 24개월		
	품질유지기한			
	원재료명 또는 성분명 및 배합비율	맛중에 기재		
	용도 용법	맛중에 기재		
	보관방법 및 포장재질	맛중에 기재		
	포장양면 및 포장단위	맛중에 기재		
	성상	젤리형태(가열, 살균제품)		
	품목의 특성			
■ 고열량·지방량·식품 해당 여부 []에 []아니오 []해당 없음 ■ 염, 유아를 섭취대상으로 표시 []에 []아니오 ■ 알레르기는 식품 해당 여부 []에 []아니오 ■ 알코올·열간 제품의 해당 여부 []비알코올 []알코올 []알코올				
기타				

「식품위생법」 제37조 제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조 제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2020년 12월 31일
보고인 김옥희

충청남도 천안시장 귀하

품목보고번호 : 2015044907463

차리부서

처리일자 2020년 12월 31일

나. 사업화성과 및 매출실적

(1) 사업화성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	-
			향후 3년간 매출	3억원
		관련제품	개발후 현재까지	-
			향후 3년간 매출	3억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0% 국외 : 0%
			향후 3년간 매출	국내 : 10% 국외 : 15%
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 0% 국외 : 0%
			향후 3년간 매출	국내 : 10% 국외 : 15%
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		-
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		-

(2) 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		1년		
	소요예산(백만원)		250		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			-	3	5
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	-	10%	15%
		국외	-	10%	15%
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		초음파 활용 실리콘타이드를 함유하는 다양한 제형의 제품 개발 계획			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)		현재	3년후	5년후
	수입대체(내수)		-		
	수 출		-		

다. 고용성과

세부 항목	인원 수	비 고
1년차	3명	
2년차	3명	
3년차	4명	

3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

1절. 목표 및 달성도

1. 정량적 목표 및 달성도

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍 보		기 타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SCI	비 SCI						
단위	건	건	건	건	만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	10	10		10	5	15	20	15	15										
최종목 표	2	2				7	1,800	60	6		1	2							
1차연 도	목 표								1										
	실 적								3										
2차연 도	목 표	1							2			1							
	실 적	2							3		1								
3차연 도	목 표	1				1	200	60	3		1	1							
	실 적		2		1	4.1 72	3		4		2							1	
소 계	목 표	2	2			1	200	60	3		1	1							
	실 적	2	2			3			10		3								
종료 1차연도		1				1	200	60	1										
종료 2차연도		1				1	200	60	1										
종료 3차연도				1	30	1	300	70	1										
종료 4차연도						1	400	70	1										
종료 5차연도						2	500	80	2										
소 계						6	1,600	340	6										
합 계	2	2		1	30	7	1,800	400	12									1	

2. 연차별 연구개발 세부 목표 및 결과

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2018)	실크펩타이드 의 분자량 조절 기술 개발 및 산업화 (주관)	저분자 실크 펩타이드 (5 kDa 이하) 제조	단백질 가수분해 효소 활용 실크단백질 가수분해물 제조	SDS-PAGE 분석결과 10 kDa 이하의 펩타이드 밴드 확인
		저분자 실크 펩타이드 제 조 가능한 단일 혹은 복합 효소의 선정	단일 효소에 의한 실크단백질 가수분해물 제조 및 분석	SDS-PAGE 분석을 통해 효소별 저분자 펩타이드의 생성 차이 확인
		분자량에 따른 항염증활성 의 차이 확인 (협동연구기 관과 연계)	제조한 실크 효소분해물 협동연구기관에 제공	실크펩타이드 분자량별 항염증효능 <i>in vitro</i> 검증 예정
		고기능성 실크 펩타이드 제조를 위한 반응 조건 최 적화	항염증 효능이 높은 분자량 범위의 펩타이드 제조를 위한 반응조건 최적화	분자량별 항염증효능 결과를 바탕으로 고기능성 펩타이드 제조 조건 최적화 예정
	초음파 활용 실크단백질 가용화 및 펩타이드화 기술 (협동)	실크 단백질의 전처리 조 건 개선	실크단백질 가용화 전처리 간소화를 위한 연구 수행	누에고치의 정련(세리신 제거) 과정 생략을 통한 유기용매 사용 및 공정시간 단축
		초음파 공정 도입을 통한 실크 단백질의 가용화 공 정 개선	실크단백질 가용화 단계에 초음파 병행 처리	초음파 처리에 의한 단백질 가용화율 증가 및 가용화 시간 단축
		초음파 공정 도입 단계 (가 열 단계 후 혹은 동시 처 리), 초음파 처리 조건 등 공정 최적화	다양한 공정 단계에서 초음파 처리 시험	- CaCl ₂ 용매 이용 시 가열단계 후 초음파 처리로 가용화율 증가 - NaOH 용매 이용 시 용매와 초음파 동시 처리로 가용화율 증가
		기존 방법 대비 염농도 50% 이상 감소 및 시간 단 축	다양한 종류 및 농도의 염을 이용한 가용화 시험	- 50% CaCl ₂ 를 사용한 기존방법 대비 0.4~2%의 NaOH 사용으로 염농도 96%이상 감소 달성 - 세리신 정련 과정 생략, 효소처리전 탈염 단계 생략 등으로 최종 공정 시간 단축 예상
		분자량별 실크펩타이드의 항염증 효능 <i>in vitro</i> 검증 (주관연구기관 제공 시료)	항염증효능 <i>in vitro</i> 확인을 위한 세포주 확보	raw 264.7 세포, HaCaT 세포, HUVEC 세포를 활용한 항염증 검증 시스템 확보

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
2차 년도 (2019)	실크 펩타이드의 분자량 조절 기술 개발(주관)	저분자 펩타이드의 고기능성 분획물 확보	반응 효소별, 시간별 분 자량과 기능성 평가 결 과 비교를 통한 최적 효 소반응조건 확립	- papain, pancreatin, fungal protease, bromelain 처리 후 비교 분석 결과 파파인 처리 샘플에서 저분자화 및 피부 염증 효능이 가장 높게 나타 남
			실크 펩타이드의 분자 량과 효능의 상관관계 분석	- Tangential flow filtration에 의한 분자량별 분획 방법 확 립 - papain 처리 실크 펩타이드 분자량 분획물의 피부 염증 효능 분석 중
			GPC 분석을 통한 최적 반응물의 분자량 분포 제시	- 효소별 반응물 및 시간별 파 파인 반응물의 GPC 분석을 통한 분자량 분석 결과 제시 - 초음파와 파파인 효소 처리 를 통해 5 kDa 이하의 실크 펩타이드 제조
	펩타이드의 분리 및 탈염 공정 조건 확립	펩타이드의 분리를 위 한 여과 공정 확립 및 중화 반응시 발생한 염 분의 제거를 위한 탈염 공정 조건 확립	- 초음파 처리 및 효소처리 이 후 원심분리에 의한 가용성 부분 확보 - 여과에 의한 분자량별 분획 - 전기 투석기 활용 탈염 공정 시험 예정	
	초음파 활용 실크 펩타이드 생산 기술 개발(협동)	초음파 처리에 의한 효소 반응 촉진 조건 탐색	초음파 병행 효소 처리 최적 조건 탐색을 위한 초음파 조건별 효소 활 성 측정	- 20 kHz 20-60% amplitude 조건에서 초음파 처리 시간 이 증가함에 따라 효소 활성 감소 확인
		초음파 공정을 도입한 가용화 및 효소 처리 공정 최적화	초음파 추출 장치 이용 가용화 조건 및 효소 처리 조건 최적화	- 0.1M NaOH 용매로 4시간 초 음파 처리하여 최적 가용화 조건 확립 - 초음파 처리 후 파파인 효소 처리로 저분자 실크 펩타이 드 생성
		조건별 펩타이드의 항염증 효능 검증	실크 펩타이드의 혈관 및 피부 염증 완화 연 구 수행	- 인간혈관세포 HUVEC에서 NO 생성 측정을 통해 혈관 염증 완화능을 검증 - 쥐 상피세포 JB6 P+에서 COX-2 발현 및 대사산물인 PGE2 억제를 통해 피부 염 증 완화능 검증 및 이와 관 련된 인자가 ERK인 것을 확 인
		생산한 실크 펩타이드의 물리적 특성 확인	조건별 실크 펩타이드 의 단백질 함량 및 분 자량 측정	- 초음파와 파파인 효소 처리 조건별, 분획별 단백질 함량, 분자량 제시

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
3차 년도 (2020)	저분자 실크 펩타이드를 활용한 시제 품 2종 이상 개발 (주관)	실크펩타이드를 함유하는 건강기능식품 2종 개발	혈관 이완능 및 항염 활성 이 우수한 누에고치 유래 브로멜라인 효소 분해물 및 이의 용도로 등록된 특허 내용과 관련하여 혈관건강 과 관련한 건강기능식품 제 품화	- 혈행개선 및 기억력개 선의 기능성을 가진 은행잎 추출물 외 비 타민 미네랄을 함유하 는 7중 기능성(은행잎 추출물, 나이아신, 아 연, 판토텐산, 비타민 B6, 비타민B1, 비타민 B2) 건강기능식품 개발
		실크펩타이드를 함유하는 일반식 품 1종 개발	피부염증 개선 활성이 우수 한 누에고치 유래 파파인 효소 분해물 및 이의 용도 로 등록된 특허내용과 관련 하여 피부건강과 관련한 이 너뷰티 건강기능식품 제품 화	- 피부보습에 도움을 주 는 기능성을 가진 히 알루론산 외 비타민C 를 함유하는 2중 기능 성 건강기능식품 개발
	초음파 활용 실크 펩타이드 생산 기 술 개발(주관 +협동)	실크 펩타이드 생 산공정 scale up (파일럿 규모)	파일럿 및 대량생산 규모의 초음파 장치를 활용한 생산 공정 확립	- 순환형 초음파 장치 활용을 위한 분쇄 등 전처리 공정 확립 - 0.1 M NaOH, 1시간, 상온에서 초음파 처리 (20 kHz, 출력 800 W 이상) 2회 반복시 70% 이상 가용화 확인 - 파파인 처리 농도 확 립 : 5%(w/w), 24시간 처리시 분자량 10 kDa 및 5 kDa 이하 펩타이 드 비율이 87.8%, 61.7%로 검출
	초음파 활용 실크 펩타이드 생산 기 술 개발(협 동)	파일럿 생산 실크 펩타이드의 항염 증 효능 검증	파일럿 및 대량생산 실크 펩타이드의 피부세포에 대 한 항염증 효능 검증	- 인간각질형성세포 HaCaT 세포에서 UV 및 LPS로 유도한 염증 반응의 실크펩타이드 에 의한 완화능 검증 - 염증성 사이토카인인 TNF-a 및 염증인자인 COX-2와 iNOS 발현량 감소 효과 확인

3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

Pilot 생산 공정이 일정보다 늦게 확립되어 연구기간 내에 시제품 개발은 진행하였으나 사업화를 진행할 수 없어 목표하였던 사업화 계획 및 매출을 달성하지 못함. 그러나 현재 초음파 펩타이드를 함유한 시제품 개발 및 품목신고를 완료한 단계임. 앞으로 본 사업에서 개발한 기술에 대한 자료를 활용하여 실크펩타이드의 기능성, 환경친화적 공정에 대한 우수성을 마케팅 방안으로 활용하고, 공정개선을 통한 원가 절감으로 가격경쟁력 및 고품질화 전략을 통해 제품의 신뢰도를 높이면서 당사 제품을 신뢰하는 기존 거래처 및 신규거래처에 신제품을 런칭하고, 바이럴마케팅, PPL마케팅 등을 통하여 제품을 적극적으로 홍보할 계획임.

4장. 연구결과의 활용 계획 등

1절. 연구개발 결과의 활용방안 및 기대성과

1. 연구개발 결과의 활용방안

- 실크 펩타이드의 대량 생산을 위한 초음파 활용 원천 기술 확보
- 대량 생산 시스템 구축을 통한 실크 펩타이드의 산업화
- 기존 공정 개선을 통한 원가 절감 효과로 가격경쟁력 있는 실크 펩타이드 제품 개발
- 개발한 저분자 실크 펩타이드를 활용한 스포츠 식품, 제과류를 포함한 식음료 제품 개발
- 식음료품 분야: 식품첨가물의 대체재 역할, 원료비용 절감, 베이커리 제과 분야에 활용 가능
- 조제약 분야: 단백질은 인체가 면역력을 높이는데 영향을 미치는 필수 아미노산과 연관되어 있기 때문에 제약 및 의료 산업에서도 관심이 증가하는 추세이므로 활용 기대

2. 기대성과 및 파급효과

가. 기대성과

- 공정 중 케미컬 사용량 저감, 공정 단계 간소화, 공정 시간 단축 등으로 생산 원가는 절감하고 생산 수율은 증진시킴으로써 가격 경쟁력이 확보된 제품 생산 기대
- 펩타이드의 분자량 조절을 통해 특정 기능성 강화 제품을 생산 가능
- 기존 업체들이 시장을 선점한 상황에서 신규 기능성 제시 혹은 기능성 강화 소재 생산으로 경쟁력 확보 기대

나. 파급효과

[기술적 측면]

- 생산성 및 기능성 강화 펩타이드 생산 기술 확보로 실크 이외에도 다양한 소재의 펩타이드 생산 공정에 적용 가능할 것으로 기대
- 초음파와 효소반응을 결합한 새로운 공정 기술 개발로 다양한 기능성 식품 소재 추출에 적용하여 공정 간소화 및 생산성 증대를 기대할 수 있으며, 신규 기능성 식품 소재의 개발에도 이용 가능할 것임

[경제적·산업적 측면]

- 초음파 추출 장치는 초기비용이 타 장치에 비해 저렴하며, scale-up 혹은 scale-out이 용이하여 변화에 대한 대응이 유리하므로 산업화에 적합한 장치임
- 또한, 조작이 용이하고 용도 및 목적에 따라 초음파의 세기, 용매, 온도 등 조건을 달리 처리할 수 있어 기타 소재에 대해서도 활용 가능성이 높음

[사회적 측면 등]

- 공정 중 고염용매, 알칼리용매 등 화학물질의 사용을 줄임으로써, 오염 물질의 배출을 줄이고 이들의 처리비용도 저감할 수 있음

붙임1. 참고문헌

1. A silk peptide fraction restores cognitive function in AF64A-induced Alzheimer disease model rats by increasing expression of choline acetyltransferase gene. 2017. Toxicology and Applied Pharmacology, 314: 48-54.
2. 펩타이드 제조 방법. 등록특허 10-0881210
3. High yield ultrasonication extraction method for Undaria pinnatifida sporophyll and its anti-inflammatory properties associated with AP-1 pathway suppression. LWT - Food Science and Technology 64 (2015) 1315-1322.
4. Effects of salts on ultrasonic extraction of protein from porcine myocardium. Food and Bioprocess Processing 108 (2018) 12-17.
5. Effects of ultrasonic treatment on collagen extraction from skins of the sea bass *Lateolabrax japonicus*. Fish Sci. 78 (2012) 485-49
6. U.S marker for amino acid to exceed \$1.4 billion by 2016, Global Industry Analysts Ins. (GIA)
7. 중국의 ‘신 실크로드 경제권’ 추진 동향과 전망

붙임2. 부록

[부록1] 공인인증시험분석 성적서

1. 한국분석기술연구원(식품 허가인증 신청 및 신고 검사; 품목보고용)



문서확인번호 : 2GMI-ISLO-ZNQF-YNV5

시험 · 검사성적서

발행번호		R20201209-0013		접수번호		200120754-001	
검사원요일		2020-12-09		접수연월일		2020-12-01	
제품명		SS혈청솔루션					
(품목)제조번호		품목제조신고번호					
유형 · 재질 · 품목명 은행잎 추출물, 나이아신, 비타민 B1, 비타민 B2, 비타민 B6, 아연, 판토텐산							
제조(수입)일		2020-11-24		유통(품질유지)기한			
뢰뢰자	상명	김옥희		업체명	농업회사법인 에스에스바이오팜 주식회사		
	소재지	(31056)충청남도 천안시 서북구 입장면 흥천당곡길 56-3					
전화번호:		팩스번호:		전자우편:			
제조원	업체명					제조국	
	소재지						
시험 · 검사목적		식품 품목제조, 가공검사					

시험 · 검사 항목 및 결과

시험 · 검사 항목	시험 · 검사 기준	시험 · 검사 결과	판정	단서조항	비고
성상	고유의 색택과 향미를 가지며 이물, 이취가 없어야 함	이물, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 연한 갈색의 타원형정제	적합		
비타민B1(%)	80 이상 180 이하	100 % (1.20 mg / 1400 mg)	적합		표시량 : 1.2 mg / 1400 mg
비타민B2(%)	80 이상 180 이하	99 % (1.38 mg / 1400 mg)	적합		표시량 : 1.4 mg / 1400 mg
나이아신(%)	80 이상 150 이하	101 % (15.2 mgNE / 1400 mg)	적합		표시량 : 15 mgNE / 1400 mg
판토텐산(%)	80 이상 180 이하	130 % (6.5 mg / 1400 mg)	적합		표시량 : 5 mg / 1400 mg
비타민B6(%)	80 이상 150 이하	104 % (1.56 mg / 1400 mg)	적합		표시량 : 1.5 mg / 1400 mg
아연(%)	80 이상 150 이하	108 % (9.15 mg / 1400 mg)	적합		표시량 : 8.5 mg / 1400 mg
플라보놀배당체(%)	80 이상 120 이하	101 % (36.3 mg / 1400 mg)	적합	최종제품	표시량 : 36 mg / 1400 mg
김플릭산(mg/kg)	5.0 이하	불검출	적합		
납(mg/kg)	1.0이하	0.0	적합		
카드뮴(mg/kg)	1.0이하	0.0	적합		
대장균군	음성	음성	적합		

본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며, 발급번호를 통하여 위변조 여부를 확인할 수 있습니다. 또한, 문서하단의 바코드로도 진위확인(스마트폰을 문서확인프로그램)을 하실 수 있습니다.

Page 1 of 2

시험·검사 항목	시험·검사 기준	시험·검사 결과	판정	단서조항	비고
수은(mg/kg)	1.0이하	0.0	적합		
비소(mg/kg)	1.0이하	0.0	적합		
봉쇄시험	적합	적합	적합		30 분 이내



종합판정 : 적합

시험검사원 :

비고 : SS201124

- ※ 위 판정은 위뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
- ※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 항목 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다.
- ※ 검사결과를 광고하거나 용기·포장 등에 표시할 때에는 시험·검사성적서 전체 내용을 모두 표시하여야 합니다.

「식품·의약품분야 시험·검사 등에 관한 법률」 제11조제2항 및 같은 법 시행규칙 제12조제4항제1호에 따라 위와 같이 시험·검사성적서를 발급합니다.

2020년12월09일

(주)한국분석기술연구원



601839 부산시 동구 대영로 267 해광빌딩(총합동)

T:051)466-1231

F:051)466-3298

2. 한국분석기술연구원(9대 영양소 성분분석)

시 험 성 적 서

발급번호 : 참200016664

접수번호	2012-0083	검 사 목 적	일반참고용
제 품 명	SS말형술무선		
제품유형	-	체 조 일 자	2020.11.24
		유통 기 한	
업 소 명	농업회사법인 에스에스바이오팜 주식회사	의 료 인	강옥화
소 재 지	충청남도 천안시 서북구 입장면 흥천당곡길 56-3		
접수년월일	2020.12.01	검사완료일	2020.12.04

시 험 결 과

시험항목	기준규격	결 과	1일영양성분기준치(%)
열량(kcal/100g)	-	376.4	-
나트륨(mg/100g)	-	246.3	12
탄수화물(g/100g)	-	75.4	23
당류(g/100g)	-	17.8	18
조지방(g/100g)	-	1.2	2
트랜스지방(g/100g)	-	0.0	-
포화지방(g/100g)	-	0.0	0
콜레스테롤(mg/100g)	-	0	0
조단백질(g/100g)	-	18.0	29

* 비교 : SS201124

위 결과는 작성상 세밀한 검토를 필요로 하며, 분량 당 환산치가 변동되오니 포장 전 보내드린 성적서와 영양표시 관련정보 사이트 (<http://www.foodsafetykorea.go.kr>)를 참고하시어 재확인 후 사용하시기 바랍니다.

2020년 12월 04일

(주) 한국분석기술연구원장



- 본 성적서는 제출된 검체에 한하며, 의외목적 이외의 상품 선전, 상업용, 민형사상의 분쟁 등에 사용할 수 없으며 법적효력이 없음
 - 성적서를 받으신 후 꼭 확인하시고 의문점이 있으시면 연락주시지요.
 - 본 성적서는 KOLAS 인정과 관련 없습니다.
- 주소 : 부산시 동구 대영로 287(초량동) 해광빌딩, 전화 : 051-466-1231, 팩스 : 051-466-3298

양식번호(KATRI-P-24-06)

개정번호(1)

개정일자(2019.01.02)

시험 성적서

발급번호 : 참200017195

접수번호	2012-0767	검 사 목 적	일반참고용
제 품 명	SS스킨솔루션		
제품유형	-	제 조 일 자	
		유통 기 한	
업 소 명	농협회사법인 에스에스바이오팜 주식회사	의 리 인	김복화
소 재 지	충청남도 천안시 서북구 임장면 흥천당곡길 56-3		
접수년월일	2020.12.08	검사완료일	2020.12.18

시험 결과

시험항목	기준규격	결 과	1일영양성분기준치(%)
열량(kcal/100g)	-	382.8	-
나트륨(mg/100g)	-	67.3	3
탄수화물(g/100g)	-	81.3	25
당류(g/100g)	-	16.1	16
조지방(g/100g)	-	1.6	3
트랜스지방(g/100g)	-	0.0	-
포화지방(g/100g)	-	0.1	1
콜레스테롤(mg/100g)	-	0	0
조단백질(g/100g)	-	10.8	20

* 비교 : 생산일자:2020.12.03., SS201203

위 결과는 작성상 세밀한 검토를 필요로 하며, 분량 당 환산치가 변동되오니 포장 전 보내드리 성적서와 영양표시 관련정보 사이트 (<http://www.foodsafetykorea.go.kr>)를 참고하시어 재확인 후 사용하시기 바랍니다.

2020년 12월 18일

(주) 한국분석기술연구원장



- 본 성적서는 제출된 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품 선진, 상업용, 민형사상의 분쟁 등에 사용할 수 있으며 법적효력이 없음
 - 성적서를 받으신 후 꼭 확인하시고 의문점이 있으시면 연락주시십시오.
 - 본 성적서는 KOLAS 인정과 관련 없습니다.
- 주소 : 부산시 동구 대영로 267(초량동) 한국분석기술연구원, 전화 : 051-466-1231, 팩스 : 051-466-3298

양식번호(KATRI-P-24-06)

개정번호(1)

개정일자(2019.01.02)

3. 한국기능식품연구원(식품 허가인증 신청 및 신고 검사; 품목보고용)



문서확인번호 : SIOF-3E0B-FQA9-POMK

시험·검사성적서

식품의약품안전처 지정번호 : 식품 제038호

발행번호	R20210115-0113	접수번호	210100133-001	
검사완료일	2021-01-15	접수연월일	2021-01-05	
제품명	(85)에스에스스킨솔루션			
(등록)제조번호		등록제조신고번호		
유형·재질·품목명	하일부분산,비타민 C			
제조(수입)일	2020-12-28	유류(품질유지)기한		
의뢰자	성명	김옥희	업체명	농업회사법인에스에스바이오팜(주)
	소재지	(31066)충청남도 천안시 서북구 일죽면 흥천당로길 56-3 전화번호:		
제조원	업체명		제조국	
	소재지			
시험·검사목적	식품 품목제조,가공검사			
시험·검사 항목 및 결과				
시험·검사 항목	시험·검사 기준	시험·검사 결과	판정	비고
비타민C(%)	표시량의 80% ~ 150%	93% (93 mg/1800mg)	적합	100 mg/1800mg
색상	고유의 색채와 향미를 가지며 이물,이취가 없어야 한다.	고유의 향미가 있고 이물, 이취가 없는 연한 분홍색의 장박질 제품이다.	적합	
하일부분산(%)	표시량의 80% ~ 120%	87% (104 mg/1800mg)	적합	최종제품 120 mg/1800mg
납(mg/kg)	2.0 이하	0.0	적합	
카드뮴(mg/kg)	0.5 이하	0.0	적합	
비소(mg/kg)	1.0 이하	0.0	적합	
수은(mg/kg)	0.5 이하	불검출	적합	
대장균군	음성	음성	적합	
병원시험	적합	적합(재피징제 : 60분 이내 분해)	적합	



* 본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며, 발급번호를 통하여 위변조 여부를 확인할 수 있습니다. 또한, 문서하단의 바코드로도 진위확인(스캐너를 문서확인프로그램)을 하실 수 있습니다.

종합판정 : 허합
시험검사원 :

※ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 항목 및 결과값은 별지로 작성 가능합니다.
※ 검사결과를 광고하거나 용기·포장 등에 표시할 때에는 시험·검사실적서 전체 내용을 모두 표시하여야 합니다.

「식품·의약품분야 시험·검사 등에 관한 법률」 제11조제2항 및 같은 법 시행규칙 제12조제4항제1호에 따라 위와 같이 시험·검사실적서를 발급합니다.

2021년01월15일

(사)한국건강기능식품협회부설 한국기능식품연구원



13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로 700 A동 102층(심평동,코리야비이모과
크) T:031-628-2400 F:031-628-0400-1



※ 본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며, 발급번호를 통하여 위변조 여부를 확인할 수 있습니다.
또한, 문서하단의 바코드로도 권위확인(스캐너용 문서확인프로그램)을 하실 수 있습니다. <http://lms.mfds.go.kr> Page 2 of 2

[부록2-1] 건강기능식품 품목제조신고증

① (SS)에스에스혈행솔루션

발급번호 : 08WE-L54N-534D-V7AW-PR3A

제 20160012278113 호

건강기능식품 품목제조신고증

○ 영업허가(번호) : 제 20160012278 호

○ 업 소 명 : 농업회사법인에스에스바이오팜(주)

○ 소 재 지 : 충청남도 천안시 서북구 입장면 흥천당곡길 56-3

○ 영업의 종류 : 건강기능식품전문제조업


○ 제 품 명 : (SS)에스에스혈행솔루션 (유형: 은행잎 추출물, 나이아신, 아연, 판토텐산, 비타민 B6, 비타민 B2, 비타민 B1)

제조방법·원료나 성분의 명칭과 함량·제품의 형태·기준과 규격 : (뒤쪽 작성)

「건강기능식품에 관한 법률」 제7조와 같은 법 시행규칙 제8조에 따라 건강기능식품품목제조신고를 수리합니다.

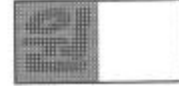
2020년 12월 14일

대전지방식품의약품안전청장



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

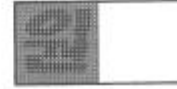
발급번호 : 08WE-L54N-53AQ-V7AW-PR3A



제품명	(SS)에스에스혈형술루션
섭취방법	1일 1회, 1회 2정을 물과 함께 섭취하십시오.
섭취 시 주의사항	임산부, 수유부, 어린이 및 수술전후 환자는 섭취에 주의 의약품(항응고제) 복용 시 섭취에 주의 1) 특이체질, 알레르기 체질의 경우 성분을 확인하시고 섭취하여 주시기 바랍니다. 2) 어린이의 경우 섭취 시 독에 걸릴 우려가 있으니 보호자의 지도하에 섭취하십시오. 3) 제품의 포장을 개봉 또는 섭취 시 포장재에 의해 상처를 입을 수 있으니 주의하시기 바랍니다. 4) 유통기한을 확인하시기 바라며, 섭취량 및 섭취방법을 준수하시기 바랍니다. 5) 질환자의 경우 섭취 전에 의사와 상담하여 주시기 바랍니다.
포장방법	PTP 또는 병포장
포장단위	700mg×10정, 30정, 60정, 90정, 120정, 240정, 360정
포장재질	병포장:폴리에틸렌(PE), 폴리에틸렌테레프탈레이트(PET), 폴리스티렌(PS)/PTP포장:폴리염화비닐(PVC)+알루미늄호일(AL-FOIL)
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 연한 갈색의 타원형 정제
기능성내용	[은행잎추출분말] 기억력 개선-혈행 개선에 도움을 줄 수 있음 [나이아신] ①체내 에너지 생성에 필요 [아연] ①정상적인 면역기능에 필요 ②정상적인 세포분열에 필요 [판토텐산] ①지방, 탄수화물, 단백질 대사와 에너지 생성에 필요 [비타민B6] ①단백질 및 아미노산 이용에 필요 ②혈액의 호모시스테인 수준을 정상으로 유지하는데 필요 [비타민B2] ①체내 에너지 생성에 필요 [비타민B1] ①탄수화물과 에너지 대사에 필요

본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

발급번호 : 0BWE-L54N-534Q-V7AW-PR3A

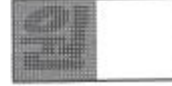


<p>제조방법</p>	<p>①원료 구입 및 선별 : 본 제품의 제조에 사용되는 원료는 건강기능식품공전, 식품공전, 식품첨가물 공전 기준과 규격에 적합한 원료를 구입하여 사용한다. ②원료청량 : 위의 원료를 제조 배합비율에 따라 전자저울로 각각 미생물의 혼입 우려가 없는 원료 청량실에서 원료를 청량한다. ③체과 : 청량한 원료를 체과망에 체과한다. ④혼합 : 청량한 원료를 혼합기에 넣어 혼합한다. ⑤타정 : 청량한 원료를 타정기를 이용하여 1정당 700mg 단위로 일정하게 타정한다. ⑥탈분 : 타정된 정제를 탈분기를 이용하여 탈분한다. ⑦선별 : 불량정제를 선별하고 색상, 정량면차 등 중간공정 검사를 실시한다. ⑧충전, 포장 : 선별된 정제를 포장방법 및 포장단위에 따라 정량 충전 포장한 후 무봉기한 등을 표시한 후 포장에 완료된 제품에 한하여 규격에 의한 최종검사를 한다. ⑨보관, 출하 : 자가품질검사결과 적합품에만하여보관출하한다.</p>
-------------	---



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

발급번호 : ØBWE-L54N-53AQ-V7AW-PR3A



제품의 형태	정
기준과 규격	<p>(1) 색상: 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 연한 갈색의 타원형 정제</p> <p>(2) 플라보놀배당체 : 표시량(36mg/1,400 mg)의 80~120%</p> <p>(3) 비타민B1 : 표시량(1.2mg/1,400mg)의 80~180%</p> <p>(4) 비타민B2 : 표시량(1.4mg/1,400mg)의 80~180%</p> <p>(5) 비타민B6 : 표시량(1.5mg/1,400mg)의 80~150%</p> <p>(6) 나이아신 : 표시량(15mg/1,400mg)의 80~150%</p> <p>(7) 판토텐산 : 표시량(5mg/1,400mg)의 80~180%</p> <p>(8) 아연 : 표시량(8.5mg/1,400mg)의 80~150%</p> <p>(9) 납(mg/kg) : 1.0 이하</p> <p>(10) 카드뮴(mg/kg) : 1.0 이하</p> <p>(11) 수은(mg/kg) : 1.0 이하</p> <p>(12) 비소(mg/kg) : 1.0 이하</p> <p>(13) 김클릭산 : 김클릭산(mg/kg) : 5.0 이하</p> <p>(14) 분해도: 30분 이내</p> <p>(15) 대장균군 : 음성</p>
보존 및 유통기준	고온다습한 곳이나 직사광선을 피하여 서늘한 곳에 보관
유통기간	제조일로부터 24개월
기타	



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

발급번호 : 0BWE-L54N-534Q-V7AW-PR3A



원료나 성분의 명칭과 함량				
기능성 원료(기능성에 표시하고자 하는 원료)				
No.	원재료명 또는 성분명	배합비율(%)	기능(지표)성분함량	원재료 기타 설명
1	미량인추출물(고시형)			
2	니코틴산아미드(고시형)			
3	산화아연			
4	판토텐산칼슘(고시형)			
5	비타민 B6 염산염			
6	비타민B1염산염(고시형)			
7	비타민B2(고시형)			
기타 원료				
No.	원재료명 또는 성분명	배합비율(%)	기능(지표)성분함량	원재료 기타 설명
1	결정셀룰로스			
2	포도당			정제포도당



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

②(SS)에스에스스킨솔루션

발급번호 : MAMB-ABMB-VARN-1KXZ-BEIS



제 20160012278117 호

건강기능식품 품목제조신고증

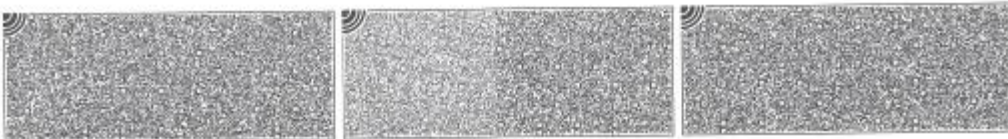
- 영업허가(번호) : 20160012278
- 업 소 명 : 농업회사법인에스에스바이오팜(주)
- 소 재 지 : 충청남도 천안시 서북구 입장면 흥천당곡길 56-3
- 영 업 의 종 류 : 건강기능식품전문제조업
- 제 품 명 : (SS)에스에스스킨솔루션 (품목류:히알루론산, 비타민 C)

제조방법·원료나 성분의 명칭과 함량·제품의 형태·기준과 규격 : (뒤쪽 작성)

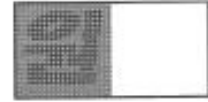
「건강기능식품에 관한 법률」 제7조와 같은 법 시행규칙 제8조에 따라 건강기능식품 품목제조신고를 수리합니다.

2021년 01월 20일

대전지방식품의약품안전청장



발급번호 : ØBWE-L54N-53A0-V7AW-PR3A



기타원료				
No.	원재료명 또는 성분명	배합비율(%)	기능(지표)성분함량	원재료 기타 설명
3	누에고치단백기수분정제분말			실크린타이드
4	치커리뿌리추출물분말			
5	강황뿌리줄기			강황분말
6	난소화성알토덱스트린(고시형)			
7	복차추출물			
8	비타민C(고시형)			
9	세양산사자추출물분말			
10	스테아린산마그네슘			
11	마늘추출물분말			
12	비수리추출물분말			
13	이산화규소			



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.



제조방법 · 원료나 성분의 명칭과 함량 · 제품의 형태 · 기준과 규격

제품명	(SS)에스에스스킨솔루션
섭취방법	1일1회, 1회3정 물과 함께 섭취하십시오.
섭취 시 주의사항	<ol style="list-style-type: none"> 1) 목이체질, 알레르기 체질의 경우 성분을 확인하시고 섭취하여 주시기 바랍니다. 2) 어린이의 경우 섭취 시 목에 걸릴 우려가 있으니 보호자의 지도하여 섭취하십시오. 3) 제품의 포장을 개봉 또는 섭취 시 포장재에 의해 상처를 입을 수 있으니 주의하시기 바랍니다. 4) 유통기한을 확인하시기 바라며, 섭취량 및 섭취방법을 준수하시기 바랍니다. 5) 질환자의 경우 섭취 전에 의사와 상담하여 주시기 바랍니다. 6) 이상사례 발생 시 섭취를 중단하고 전문가와 상담 하십시오.
포장방법	병포장
포장단위	600mg × 10정, 30정, 60정, 90정, 120정, 240정, 360정
포장재질	폴리에틸렌테레프탈레이트(PET), 고밀도 폴리에틸렌(HDPE), 폴리프로필렌(PP), 폴리염화비닐/알루미늄호일, 폴리스틸렌(PS), 폴리에틸렌(PE), 알루미늄(AL)
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 연한 분홍색의 장방형 제피정제
기능성내용	<p>[히알루론산]피부보습에 도움을 줄 수 있음</p> <p>[비타민C]①결합조직 형성과 기능유지에 필요②철의 흡수에 필요③유해산소로부터 세포를 보호하는데 필요</p>
제조방법	<ol style="list-style-type: none"> ①원료 구입 및 선별 : 본 제품의 제조에 사용되는 원료는 건강기능식품공전, 식품공전, 식품첨가물공전 기준과 규격에 적합한 원료를 구입하여 사용한다. ②원료칭량 : 위의 원료를 제조 배합비율에 따라 전자저울로 각각 미생물의 혼입 우려가 없는 원료 칭량실에서 원료를 칭량한다. ③체과 : 칭량한 원료를 체과망에 체과한다. ④혼합 : 칭량한 원료를 혼합기에 넣어 혼합한다.





제조방법 · 원료나 성분의 명칭과 함량 · 제품의 형태 · 기준과 규격

제조방법	<p>타정 : 혼합된 원료를 타정기를 이용하여 1정당 600mg 단위로 일정하게 타정한다.</p> <p>⑥탈분 : 타정된 정제를 탈분기를 이용하여 탈분한다.</p> <p>⑦제피액조제 : 주정알코올에 히드록시프로필메틸셀룰로오스를 용해시켜 제피액을 만든다.</p> <p>⑧제피 : 타정된 정제를 코팅팬에 넣고 코팅액을 골고루 분사, 열풍 건조 하여 제피한다.</p> <p>⑨선별 : 불량정제를 선별하고 성상, 중량편차 등 중간공정 검사를 실시한다.</p> <p>⑩충전, 포장 : 선별된 정제를 포장방법 및 포장단위에 따라 정량 충전 포장한 후 유통기한 등을 표시한다.</p> <p>⑪최종검사 : 포장이 완료된 제품에 한하여 건강기능식품 규격에 의한 최종검사를 한다.</p> <p>⑫보관, 출하 : 자가품질검사 결과 적합품에 한하여 보관, 출하한다.</p>
제품의 형태	정
기준과 규격	<p>(1) 성상: 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 연한 분홍색의 장방형 제피정제</p> <p>(2) 히알루론산 : 표시량(120mg/1,800 mg)의 80~120%</p> <p>(3) 비타민C : 표시량(100mg/1,800mg)의 80~150%</p> <p>(4) 납(mg/kg) : 2.0 이하</p> <p>(5) 카드뮴(mg/kg) : 0.5 이하</p> <p>(6) 수은(mg/kg) : 0.5 이하</p> <p>(7) 비소(mg/kg) : 1.0 이하</p> <p>(8) 대장균군 : 음성</p> <p>(9) 분해도: 60분 이내</p>
보존 및 유통기준	
유통기간	24개월
기타	





기능성원료(기능성을 표시하고자 하는 원료)

No.	원재료명 또는 성분명	비합비율(%)	기능(지표)성분함량	원재료 기타 설명
1	히알루론산		(90%)	
2	비타민C(고시형)		(100%)	

기타원료

No.	원재료명 또는 성분명	비합비율(%)	기능(지표)성분함량	원재료 기타 설명
1	엑스트린			
2	갈락실룰로스			
3	유당분말			
4	누에고치단백 가수분해물분말			실크펩타이드
5	석류농축분말			
6	생선콜라겐펩타이드분말			
7	카복시메틸셀룰로스칼슘			
8	스테인이산화마그네슘			
9	이산화규소			
10	유산균농축분말		생균(1680000)	1.68*10 ⁹ CFU/g
11	↳ 식물성크림			
12	↳ 엑스트린			알토엑스트린
13	↳ Bifidobacterium longum(고시형)			
14	↳ Streptococcus thermophilus			
15	↳ Lactobacillus acidophilus(고시형)			
16	↳ Lactobacillus plantarum			
17	↳ Lactobacillus casei			
18	하드핵시프로필메탈셀룰로스			



발급번호 : MAMB-ABMB-VARN-KOZ-BE15



No.	원재료명 또는 성분명	배합비율(%)	기능(치효)성분함량	원재료 기타 설명
19	알라스인가수분해물			
20	토마토추출물분말			
21	비오린			



[부록2-2] 일반식품 품목제조신고증

발급번호 : MAMB-ABAY-UURU-NTBZ-COKN

식품·식품첨가물 품목제조보고서

보고인	성명 김옥희	생년월일 1961년 01월 05일		
	주소 충청남도 천안시 서북구 입장면 흥천당리길 56-3	전화번호 휴대전화 01093619078		
영업소	영칭(상호) 농업회사법인에스에스바이오팜주식회사	영업등록번호 20150449074		
	소재지 충청남도 천안시 서북구 입장면 흥천당리길 56-3			
제품정보	식품의 유형	캔디류	품목제조보고번호	2015044907463
	제품명	싱크플리		
	유통기한	제조일로부터 24개월		
	품질유지기한			
	원재료명 또는 성분명 및 배합비율	맛장애 기재		
	용도·용법	맛장애 기재		
	보관방법 및 포장재질	맛장애 기재		
	포장방법 및 포장단위	맛장애 기재		
	성상	젤리형태(가열, 살균제품)		
	품목의 특성			
<input type="checkbox"/> 고열량·저영양 식품 해당 여부 []에 []아니오 [0]해당 없음 <input type="checkbox"/> 영, 유아를 섭취대상으로 표시 판매하는 식품 해당 여부 []에 [0]아니오 <input type="checkbox"/> 살균·멸균 제품의 해당 여부 []비살균 [0]살균 []멸균				
기타				

「식품위생법」 제37조 제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조 제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2020년 12월 31일
보고인 김옥희

충청남도 천안시장 귀하

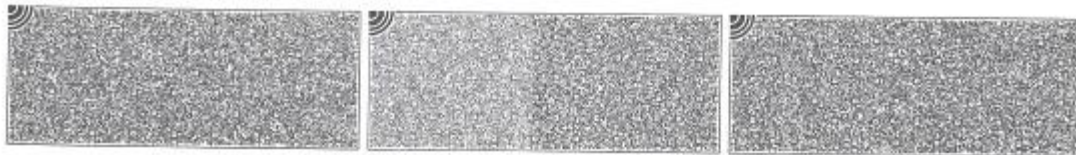
품목보고번호 : 2015044907463

처리부서

처리일자 2020년 12월 31일

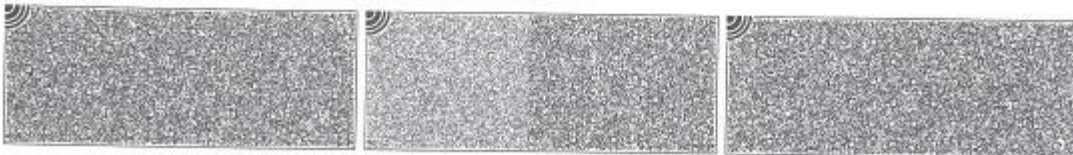
(원재료명 또는 성분명 및 배합비율)

No.	원재료명 또는 성분명	배합비율 (%)	No.	원재료명 또는 성분명	배합비율 (%)
1	석류농축액				
2	누에고치단백 가수분해물분말 [실크펩타이드]				
3	마카농축액분말				
4	생선콜라겐펩타이드분말				
5	비타민C(고시형)				
6	카라기난				
7	석류향				
8	로커스트콩겔				
9	한천				
10	산화아연				
11	히알루론산				
12	L-아르지닌				
13	자몽종자추출물				

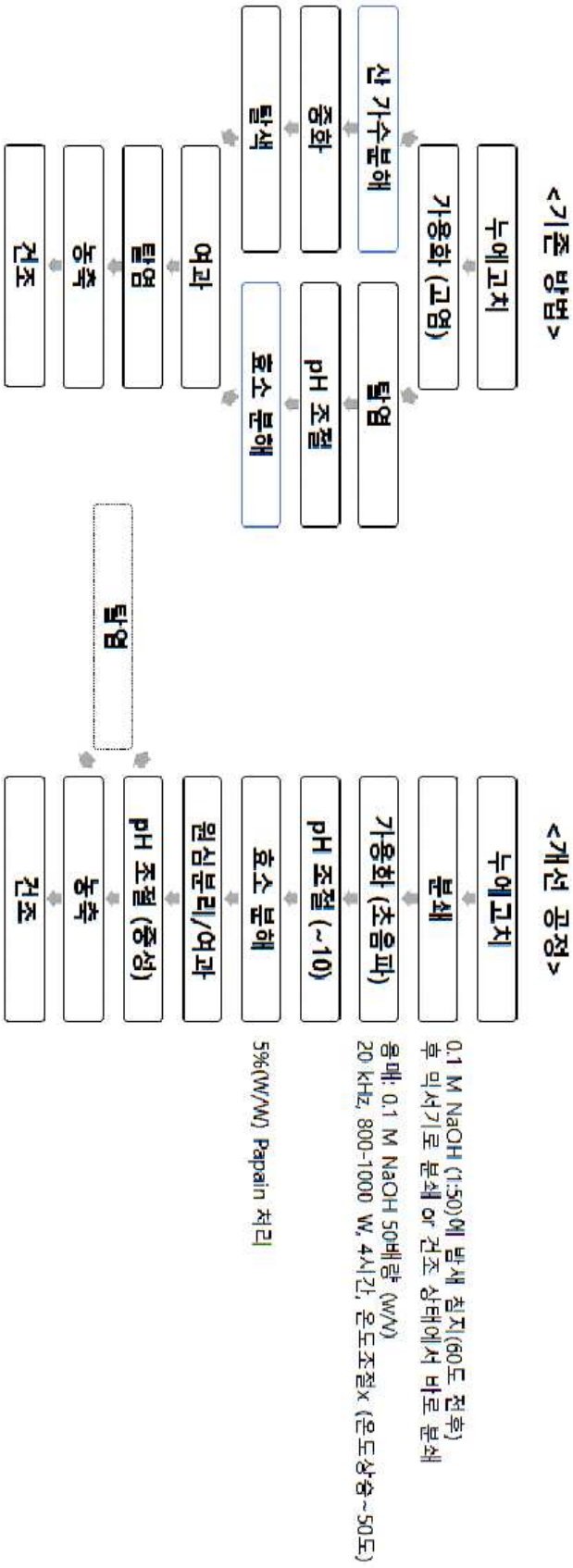


발급번호 : MAMB-ABAY-UURU-NTBZ-COKN

용도용법	1일 1회, 1회 1포(15g)를 섭취하십시오.
보관방법 및 포장재질	1. 직사광선이나 고온 다습한 곳을 피하여 서늘한 곳에 보관, 유통 하십시오. 2. 실온보관 내포장 ? 폴리에틸렌(PE) / 외포장: 종이
포장방법 및 포장재질	밀봉포장

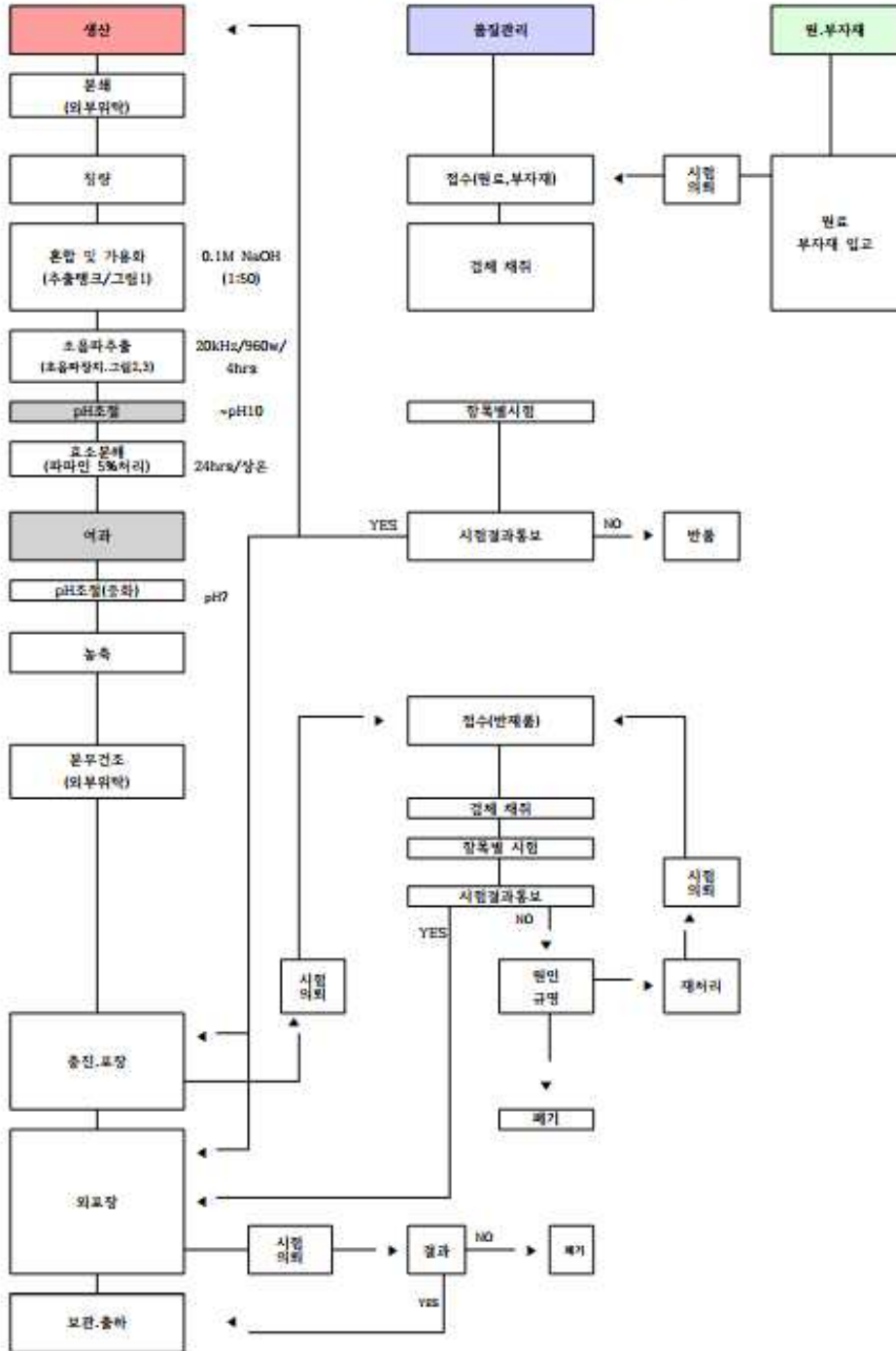


● 실크 펩타이드의 제조

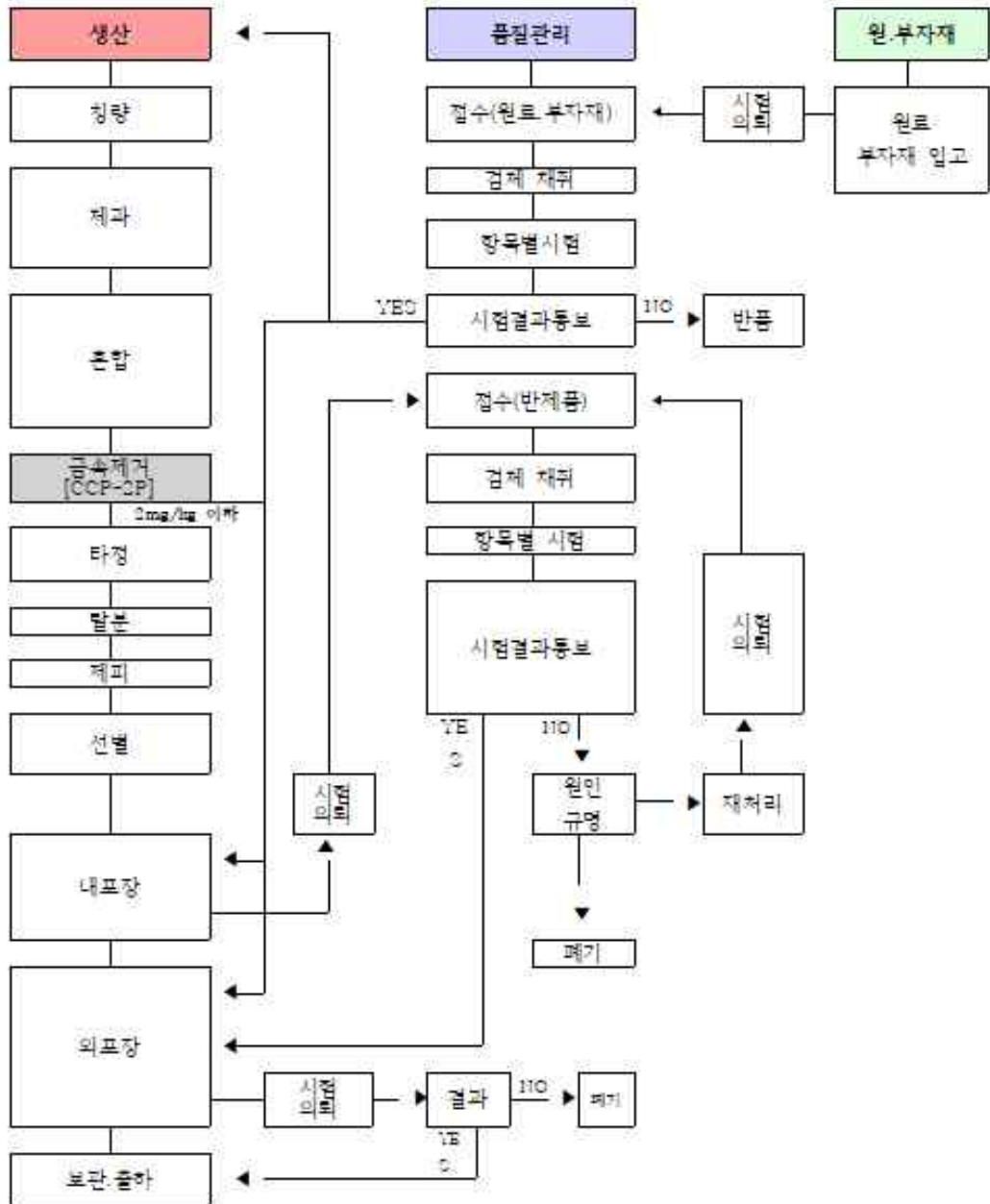


[부록3-2] 실크펩타이드 제조공정도

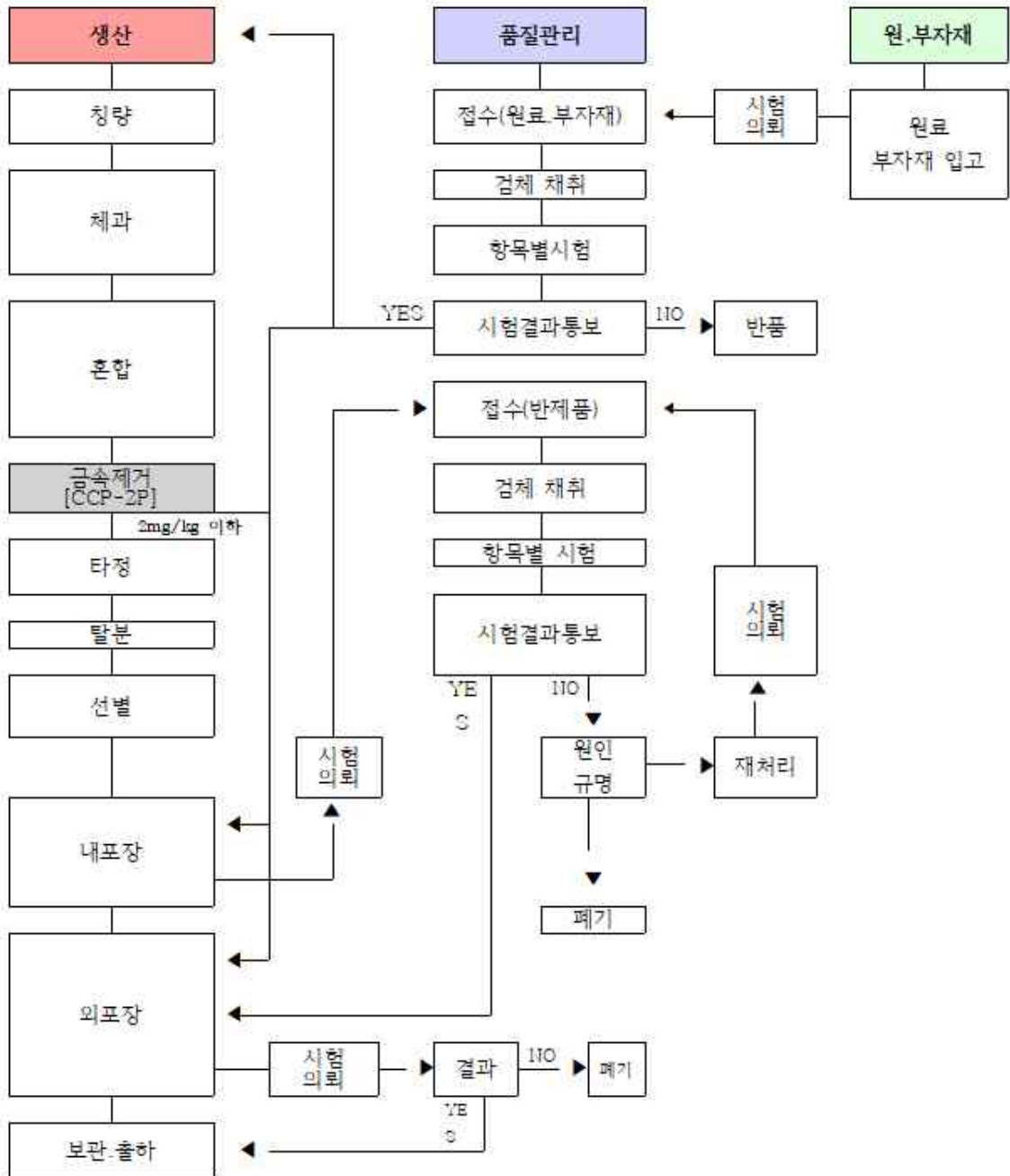
실크펩타이드 제조공정도



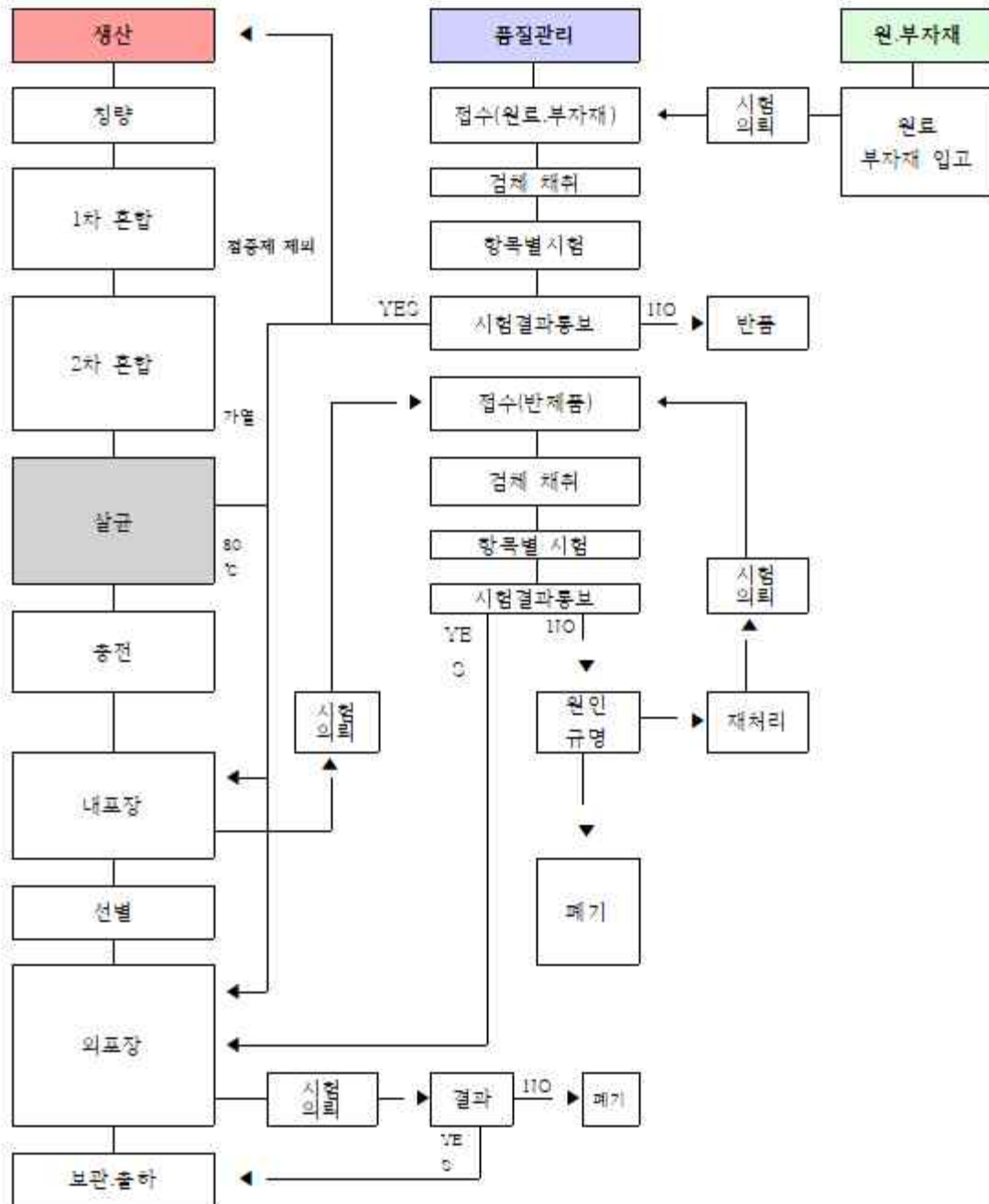
(SS)에스에스스킨솔루션 제조공정도



(SS)에스에스혈행솔루션 제조공정도



실크젤리 제조공정도



[부록4-1] 논문(한국식품연구원)

- Title : Silk peptide production from whole silkworm cocoon using ultrasound and enzymatic treatment and its suppression of solar ultraviolet-induced skin inflammation



Silk peptide production from whole silkworm cocoon using ultrasound and enzymatic treatment and its suppression of solar ultraviolet-induced skin inflammation

Su Jin Eom^a, Nam Hyouck Lee^a, Min-Cheol Kang^a, Young Ho Kim^a, Tae-Gyu Lim^{b,*}, Kyung-Mo Song^{a,*}

ARTICLE INFO

Keywords:
Silk peptide
Ultrasound
Papain
Molecular weight
Skin inflammation

ABSTRACT

Silk fibroin, which is derived from sericin through degumming, is mainly used as a biomaterial. However, interest in functional verification and industrial applications of sericin has been growing for several years. We used ultrasonication to simplify the extraction process of the silk peptide under low salt conditions at 20°C, instead of using the conventional conditions of high salt and temperature. The concentration of the silk peptide was measured to determine the optimized extraction time and solvent, which were 4 h and 0.1 N NaOH, respectively. The molecular weight of the enzyme-treated silk peptide was measured using SDS-PAGE and GPC. Silk peptide treated with papain after ultrasound had a molecular weight of less than 5 kDa, and the papain treated-silk peptide reduced solar ultraviolet-induced COX-2 expression through inhibition of ERK phosphorylation. This is the first study investigating simultaneous extraction of fibroin and sericin, which can be used for mass production of food materials.

1. Introduction

As a natural biomaterial, silk has beneficial biocompatibility, degradability, easy processing, mechanical, and structural properties [1], and is frequently utilized in fibrous scaffolds, films, sponges, microfibers, nanofibers, and drug delivery through chemical and physical processing methods [2,3]. Silk is widely used not only in the pharmaceutical, biomedical, and cosmetic industries but also in the food industry [4]. In recent decades, studies of regenerated silk with silk fibroin-coating have been conducted to solve problems with food expiration and packaging [5] and to develop silk as a functional or dietary food with antioxidant properties [6].

Silk protein from *Bombyx mori* is mainly composed of silk fibroin (approximately 70–80%) and silk sericin (approximately 20–30%) coatings, both of which are biological polymers. Until recently, for industrial application, silk fibroin is mainly used, whereas sericin is usually discarded as a by-product of silk fabric manufacturing. Moreover, regenerated silk fibroin has been commercialized as a clinical product and approved in many countries [7]. Nevertheless, reliable evidence suggests that sericin is a bioactive compound that improves blood pressure, gastrointestinal function, and wound healing [8]. Therefore, in this study, we manufactured silk peptide using sericin and

fibroin from silk cocoon to decrease waste in the manufacturing process and increase silk peptide yield and functionality.

Various extraction systems to obtain silk peptide have been developed. Silk degumming is the sericin removal process from fibroin using the difference in their melting properties in hot water [8]. Fibroin regeneration allows production of high-purity silk protein [9] with proper morphologies, but the use of salts and organic solvents (CaCl₂, NaCl, Na₂CO₃, LiBr, LiSCN, and ethanol, alone or in combination) is essential to produce silk protein. In addition, enzymes such as chymotrypsin, protease XIV, and papain degrade the amorphous portion of silk [10] to produce silk peptide with low molecular weight. Protein decomposition by enzymes plays an important role in the production of bioactive peptide. Although these enzymes have different numbers of cleavage sites on silk fibroin (chymotrypsin, 515; protease XIV, 389; papain, 41), there are no significant differences in cleavage activity and yield quantity [7] between these enzymes.

An ultrasound-assisted system is commonly used to obtain bioactive compounds from natural products in the food industry [11]. The cavitation action of the ultrasound treatment continuously decreases and increases the size of bubbles of natural products in liquid state, releasing energy through the burst of air bubbles; thus, bioactive compounds are extracted by this destructive process, which depends on the

<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104803>

Received 5 July 2019; Received in revised form 2 September 2019; Accepted 19 September 2019

Available online 21 September 2019

1350-4177/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Table 1
Yield (%) of silk cocoon protein in different concentrations of sodium hydroxide and reaction time.

Extraction time (h)	Yield (%)			
	0.10 N NaOH	0.25 N NaOH	0.50 N NaOH	1.0 N NaOH
3	12.83 ± 0.56 ^a	40.59 ± 1.93 ^a	42.23 ± 1.24 ^a	57.20 ± 1.54 ^a
6	31.10 ± 1.16 ^b	45.29 ± 0.91 ^b	46.76 ± 1.25 ^b	74.81 ± 0.41 ^b
9	39.81 ± 0.97 ^a	49.63 ± 2.26 ^a	54.56 ± 1.71 ^a	80.23 ± 1.03 ^a
12	45.14 ± 0.69 ^{ab}	53.07 ± 1.16 ^{ab}	61.59 ± 1.20 ^d	81.48 ± 2.06 ^a
15	46.03 ± 2.45 ^d	52.84 ± 1.26 ^{cd}	62.70 ± 0.47 ^d	81.00 ± 0.82 ^a
18	45.94 ± 2.83 ^d	54.35 ± 0.65 ^d	61.14 ± 0.52 ^d	80.77 ± 1.03 ^a
24	47.00 ± 1.88 ^d	53.99 ± 2.21 ^d	61.99 ± 0.87 ^d	79.54 ± 1.62 ^a

The values are presented as mean ± SD (n = 3). Different letters in the same row indicate significant differences, as determined by Tukey's multiple comparison tests (p < 0.05).

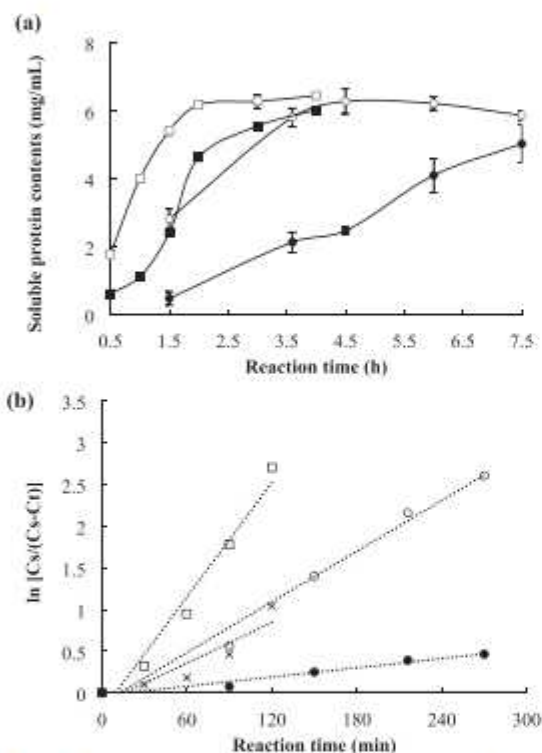


Fig. 1. Soluble protein contents (a) and kinetic constant (b) of silk cocoon treated with ultrasound at 750 W. ●; 0.1 N NaOH, ○; 0.1 N NaOH + Ultrasound, ■; 0.25 N NaOH, □; 0.25 N NaOH + Ultrasound. C_s ; final concentration of soluble protein, C_t ; concentration of soluble protein at reaction time, k ; mass transfer coefficient.

operating conditions [12]. This process is capable of emulsification or homogenization, extraction, and altering viscosity and texture. At present, ultrasound extraction techniques intensify the aspects of solvent reduction, extraction time, and energy [13]. Despite these advancements, mass production of silk with ultrasound-assisted extraction faces difficulties in dissolution and desalting, requiring high solvent concentration and facility cost [14].

Solar ultraviolet (sUV) irradiation is essential to human metabolic reaction, but also exerts adverse effect on the skin. Excessive exposure of the skin to sUV induces DNA damage and decreases the skin barrier function, causing photoaging, chronic inflammatory skin disease, and skin carcinogenesis [15,16]. Studies investigating bioactive food

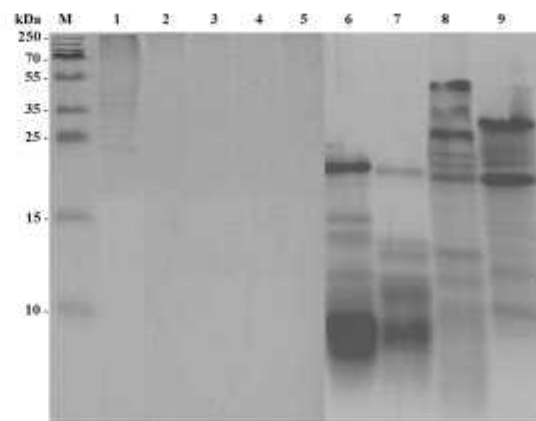


Fig. 2. SDS-PAGE results of silk peptide treated with various enzymes. 1, soluble silk protein extracted by ultrasonication; 2, 0.5% papain; 3, 0.5% bromelain; 4, 0.5% pancreatin; 5, 0.5% fungal protease; 6, 1 + 2; 7, 1 + 3; 8, 1 + 4; 9, 1 + 5.

products to prevent these diseases have been conducted. Blackberry has been reported to protect the skin from UVB through 8-oxodG, CPD, PCNA, and cyclin D1 inhibition [17]. Soybean also inhibits UVB-induced skin inflammation by controlling IL-6 and MAPK signaling [18]. Cyclooxygenase (COX) is an enzyme involved in inflammation regulation that converts arachidonic acid to prostaglandins. It is well-known that COX-2 expression can be induced by various inflammatory stimuli, such as tumor promoters, growth factors, and cytokines [19,20]. In addition, silk fibroin and sericin have been known to suppress the expression of the COX-2 and iNOS genes and production of nitric oxide [21,22].

Considering these findings, the aim of this study were as follows: (i) to select a proper method to process silk peptide from *B. mori* silk cocoon (sericin and fibroin) using an ultrasound system and food-grade enzymatic treatment; (ii) to produce low-molecular-weight silk peptide by optimizing the processing parameters: salt concentration, extraction time, enzyme type, and order of ultrasound and enzymatic treatment; and (iii) to evaluate the inhibitory effect of silk peptide on skin inflammation.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Bombyx mori cocoon was obtained from SSBio Pharm Co. Ltd. (Cheonan, Korea). Pancreatin from porcine pancreas (8000 U/g), protease from *Aspergillus oryzae* (EC 3.4.11.1, 500 U/g), papain from papaya latex (EC 3.4.22.2, 1500–10,000 U/g), bromelain from pineapple stem (EC 3.4.22.32, 8100 U/g), and gel filtration markers kit for protein

Table 2
Molecular weight distribution (%) of silk peptide treated with food additive enzymes.

Enzyme	Molecular weight (kDa)				Total (%)
	$m < 10$	$10 \leq m < 25$	$25 \leq m < 50$	$50 \leq m$	
Papain	57.8	42.2	0.0	0.0	100
Bromelain	53.3	46.7	0.0	0.0	100
Pancreatin	12.9	41.1	22.2	23.8	100
Fungal protease	6.9	60.5	32.6	0.0	100

Molecular weight distribution was calculated by measuring the intensity of protein bands using the ImageJ program.

molecular weights (MWGF200) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Protein molecular weight marker (MBS355493) for sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was purchased from MyBioSource (San Diego, USA). Cell media and buffer were purchased from PromoCell (Promo Cell, Heidelberg, Germany).

2.2. Production of silk peptide using ultrasound and enzyme

Silk cocoon was cleaned from impurities, dried overnight, and dissolved in 0.10, 0.25, 0.50, and 1.0 N NaOH for 1 day. To optimize the extraction conditions, silk protein content was measured using the DCTM Protein kit (Bio-Rd, Hercules, USA) with bovine serum albumin as a standard [23]. Ultrasound conditions were adjusted as follows: power, 750 W; amplitude, 80%; pulse, 20 s/20 s (VCX 750; Sonics & Materials, Newtown, USA), whereas the reaction temperature was set to 25 °C (ADE engineering, USA). Silk protein treated with ultrasound was titrated with 6 N HCl to a final pH of 7.0, and then treated with 0.5% (w/v) enzyme (pancreatin, protease from *A. oryzae*, papain, or bromelain). Enzymatic reactions were carried out at 25 °C for 48 h, after which the enzyme was inactivated by heating at 100 °C for 10 min. The yield of silk protein (1) was calculated using the following equation:

$$\text{Yield of silk protein (\%)} = \left(\frac{\text{soluble protein contents (g)}}{\text{weight of sample (g)}} \right) \times 100 \quad (1)$$

2.3. Kinetic study of silk peptide production

The kinetic constants (2) were calculated using the first order reaction from the quasi-steady extraction model [24,25] with the following equation:

$$\ln \frac{C_s}{C_s - C_t} = k_1 + \alpha \quad (2)$$

where C_s is the final concentration of soluble protein, C_t is the concentration of soluble protein at reaction time, k_1 is the rate constant of soluble protein extraction, and α is the semi empirical intercept. The mass transfer coefficient (k) was determined by the slope of the linear regression from a plot of $\ln C_s/(C_s - C_t)$ versus time for the initial extraction time.

2.4. SDS-PAGE

SDS-PAGE was performed by Laemmli's method [26] using an AE-6500 Dual Mini Slab (Atto Co., Tokyo, Japan) at 80–120 V. Samples were mixed with protein loading dye and then heated at 95 °C for 10 min. After gel electrophoresis, peptide were stained with Coomassie brilliant blue R-250 and de-stained with 9.2% acetic acid and 50% methanol. The range of molecular weight calibration was 10–250 kDa. Molecular weight distribution (%) according to enzymes was calculated using the ImageJ software [27].

2.5. Gel permeation chromatography (GPC)

The molecular weight of silk peptide was determined by GPC using an Ultimate 3000 system (Thermo Fisher, Somerset, USA) equipped with a UV detector. The GPC column was Protein KW-802.5 (LD, 8 mm × 300 mm,

4 μm; Shodex, Tokyo, Japan) [28]. Samples were filtered on 0.45-μm polyvinylidene fluoride (PVDF) syringe filter (Whatman Inc., Clifton, USA), injected to the mobile phase (50 mM sodium phosphate buffer containing 0.3 M NaCl) at 1 min/mL, and then detected at 220 nm. β-Amylase (200 kDa), alcohol dehydrogenase (150 kDa), albumin (66 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), cytochrome c (12.4 kDa), aprotinin (6.5 kDa), and somatostatin (1.63 kDa) were used as standards.

2.6. Cell culture

JB6 P+ cells were kindly provided by Dr. Zigang Dong's laboratory in Hormel Institute. The cells were cultured at 37 °C and humidified atmosphere of 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and 0.1% penicillin-streptomycin-neomycin (PSN).

2.7. Western blotting

JB6 P+ cells were treated with samples at the indicated concentration for 1 h, and then irradiated with sUV. Cellular proteins were harvested with 1 × lysis buffer (Cell Signaling Biotechnology, Beverly, MA), and the total protein concentration was measured using a dye-binding protein assay kit (Bio-Rad Laboratories). The proteins were separated with polyacrylamide gels (Bio-Rad Laboratories) and then transferred to Immobilon P membranes (Millipore, Billerica, USA). Non-specific proteins were blocked by incubating the membranes in 5% fat-free milk for 1 h. Next, the proteins were hybridized with HRP-conjugated antibodies and visualized using a chemiluminescence detection kit (GE Healthcare, Pittsburgh, USA).

2.8. Prostaglandin assay

JB6 P+ cells were seeded until reaching confluence in 100 Petri dishes using DMEM containing 10% fetal bovine serum (FBS) and 1 × penicillin-streptomycin-neomycin (PSN). JB6 P+ cells were starved in serum-free DMEM overnight. Next, the cells were pre-treated with each sample for 1 h before irradiation with sUV (at the indicated concentration). After 5 h of irradiation, the medium was collected and evaluated for prostaglandin E₂ (PGE₂) using a PGE₂ ELISA kit (Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA).

2.9. Statistical analyses

Results are expressed as the mean and standard deviation (SD). Statistical analyses were performed using SPSS software version 20 (IBM Corporation, Armonk, USA). One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test was used for comparisons between groups, and significant difference was set at $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Effect of sodium hydroxide treatment on silk cocoon

Salts at high concentration (8 M urea, 9 M lithium bromide, or 50% calcium chloride) are generally used to increase solubilization of silk

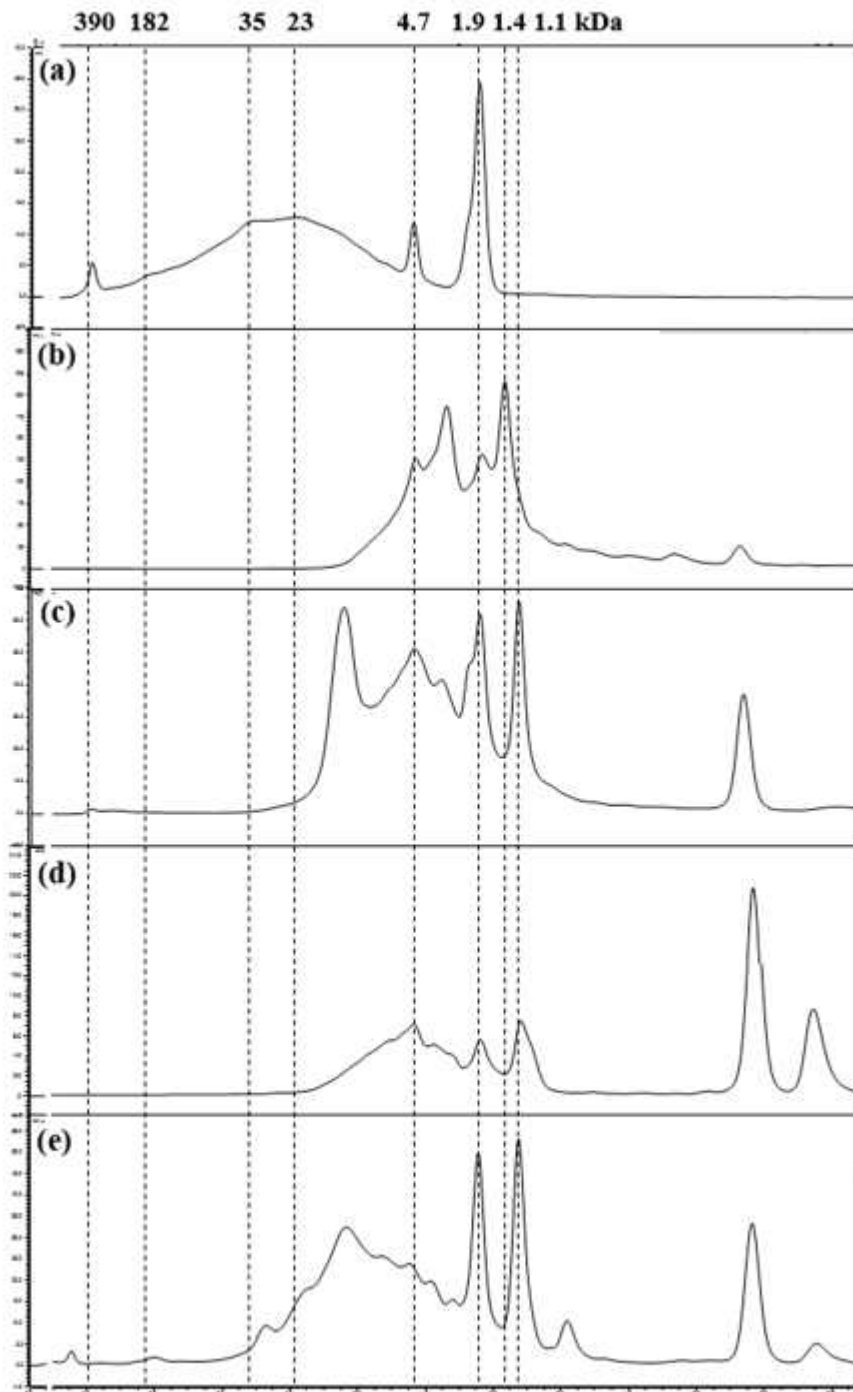


Fig. 3. Molecular weight of silk peptide treated with food additive enzymes after ultrasound treatment. (a) Silk treated with ultrasound (750 W, 80% amplitude, 20 s/20 s pulses for 4 h at 25 °C). (b) Silk treated with ultrasound and papain. (c) Silk treated with ultrasound and bromelain. (d) Silk treated with ultrasound and pancreatin. (e) Silk treated with ultrasound fungal protease from *Aspergillus oryzae*.

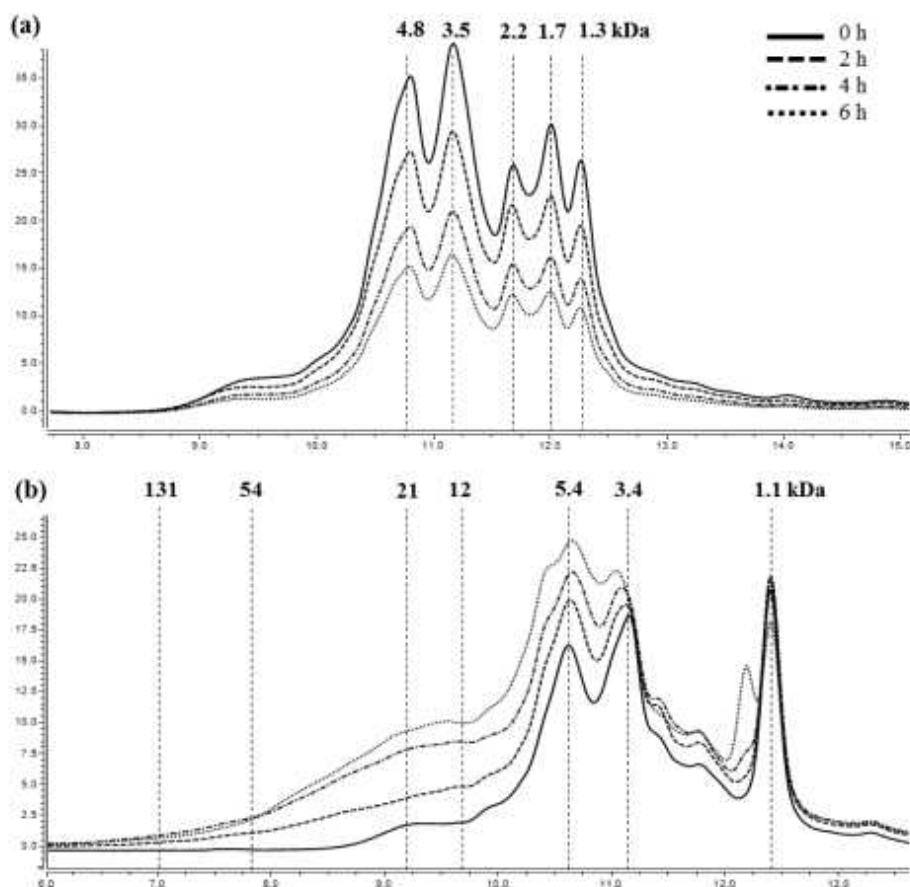


Fig. 4. GPC chromatogram of silk peptides treated with ultrasound after enzymatic treatment. (a) Ultrasound-treated silk in water after treatment with papain. (b) Ultrasound-treated silk in 0.1 N NaOH after papain treatment.

cocoon; however, from an economic standpoint, this practice is not suitable for mass production of silk [29]. Thus, we tried sodium hydroxide (NaOH), a common alkaline and neutralizing agent in food manufacturing, at concentrations of 0.10, 0.25, 0.50, and 1.0 N to dissolve 1% silk cocoon at 25 °C. Table 1 shows changes in extraction yield of silk protein from silk cocoon according to time and NaOH concentration. The higher the NaOH concentration, the higher the extraction yield of silk protein from silk cocoon. Sericin is a hydrophilic glycoprotein, and the amide bonds of sericin with fibroin are known to be easily dissolved in mild concentrations of NaOH [2]. In contrast, fibroin is insoluble in water or low concentrations of NaOH [30] because it consists of both hydrophobic and hydrophilic regions. Although the highest yield of silk cocoon protein was observed at 1.0 N NaOH for 9 h, it is necessary to reduce the concentration of NaOH and extraction time for industrial applications for economic and environmental reasons. Therefore, lower concentrations of NaOH (0.1 N and 0.25 N) was selected, and subsequent experiments were conducted to improve the extraction efficiency using ultrasonic treatment.

3.2. Effect of ultrasound treatment on silk cocoon

Ultrasonic treatment was applied to enhance the extraction yield of silk cocoon protein containing fibroin and sericin in solution with a mild concentration of NaOH. Silk cocoon (1%, w/v) was dissolved in

low concentrations of NaOH (0.1 N and 0.25 N) and then treated with ultrasound for 7.5 h. Changes in soluble silk protein content during extraction time are shown in Fig. 1a. The maximum yield of soluble silk protein was approximately 60% and was reached after 4 h at 0.1 N NaOH and after 2 h at 0.25 N NaOH. These results indicate that ultrasound-assisted extraction in low alkaline solution can increase protein content and decrease extraction time. A previous study similarly reported that ultrasonication enhances protein yield of porcine myocardium in low salt (5 mM pyrophosphate) [25]. Fig. 1b shows that ultrasound processing increased the reaction rate and kinetic constants of silk protein extraction (no treatment with ultrasound in 0.1 N NaOH: $k_{0.1} = 0.0018 \text{ min}^{-1}$, $R^2 = 0.9671$; treatment with ultrasound in 0.1 N NaOH: $k_{0.1U} = 0.0101 \text{ min}^{-1}$, $R^2 = 0.9841$). Ultrasound cavitation improves the mass transfer by reducing particle size and increasing surface area [13]. The observed effects of ultrasound are similar to those of anthraquinone extraction from *Morinda citrifolia* [31] and of polyphenol extraction from black chokeberry [32]. Ultrasonic treatment may improve the extraction efficiency by decreasing the size of substrate and increasing the surface area between the solvent and substrate [12]. Subsequent experiments were conducted with fixed conditions of ultrasound-assisted extraction in 0.1 N NaOH for 4 h because protein content reached a maximal point and barely changed after prolonged treatment under these conditions.

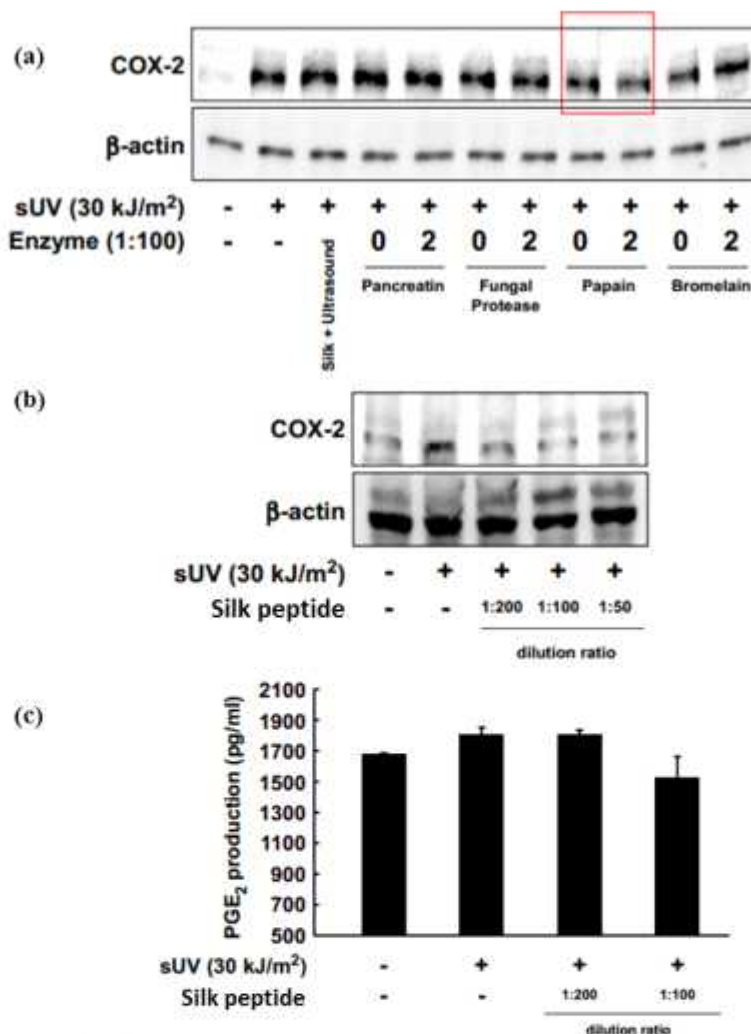


Fig. 5. Effect of silk peptide treated with ultrasound and enzyme on sUV irradiation-induced expression of COX-2 in JB6 P+ cells. (a) Inhibition of COX-2 expression by silk peptide treated with ultrasound and enzyme (pancreatin, fungal protease, papain, and bromelain). (b) Dose-dependent inhibition of COX-2 expression by silk peptide treated with ultrasound and papain. (c) Inhibition of PGE₂ production by silk peptide treated with ultrasound and papain. 0, ultrasonicated silk treated with papain for 0 day; 2, ultrasonicated silk treated with papain for 2 days.

3.3. Effect of enzymatic treatment on silk cocoon

Four enzymes approved by the Food and Drug Administration (FDA, 2018) as food additives were used to produce silk peptides as food materials. Fig. 2 shows the molecular weight distribution of soluble silk protein, enzymes, and hydrolyzed silk peptide, which were analyzed by SDS-PAGE. Silk protein had a wide range of molecular weights (upper 15 kDa); these smears result from the heavy fibroin chain [33]. Because the signal from each enzyme (0.5%, w/v) was not clearly observed, the signals (6–9) from enzyme-treated samples were considered to be those of silk peptide. All four enzymes had the ability to hydrolyze silk protein. In addition, residual insoluble silk protein after extraction seemed to be dissolved by the enzymes through hydrolysis, considering that the signal intensities of the enzyme-treated samples (Fig. 2, Lane 6–9) were higher than that of soluble silk protein (Fig. 2, Lane 1). The signal intensity was calculated according to the molecular weight range using

ImageJ, and the results showed that papain and bromelain strongly decreased the molecular weight of silk peptide to under 25 kDa (100%), compared to pancreatin (54%) and fungal protease (67.4%) (Table 2). In addition, papain and bromelain were considered suitable to control the molecular weight of silk peptide because the products of these enzymes showed molecular weight of as low as 10 kDa.

3.4. Effect of ultrasound-enzymatic treatment on silk cocoon

Fig. 3 shows the molecular weight distribution of silk peptide treated with enzyme after ultrasound treatment analyzed by GPC. The molecular weight distribution of ultrasonicated silk protein was determined to be approximately 1–390 kDa. After 48 h of enzymatic reaction, silk peptides with molecular weight below 23 kDa were detected in all samples, and small peptides with several dozen to hundreds of Da (detection time: 15.8 and 16.8 min) were observed in all enzymes

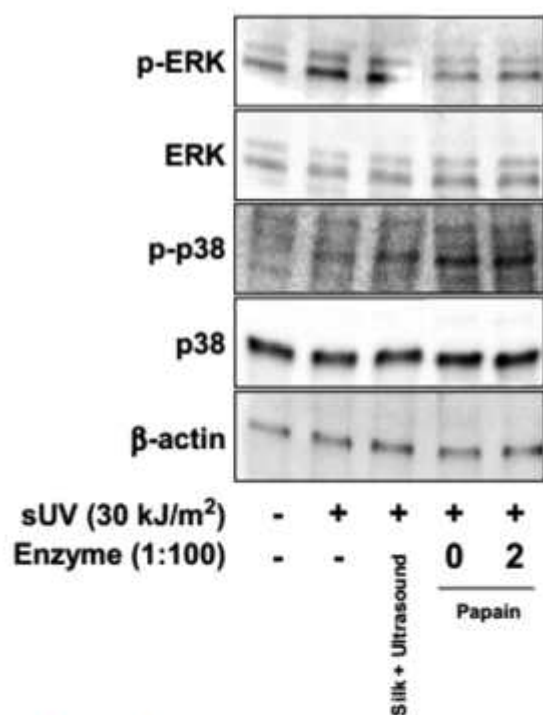


Fig. 6. Effect of silk peptide treated with ultrasound and papain on sUV irradiation-induced phosphorylation of ERK and expression of p38 in JB6 P+ cells. 0, ultrasonicated silk treated with papain for 0 day; 2, ultrasonicated silk treated with papain for 2 days.

except papain. Papain preferentially cleaves peptide bonds of basic amino acids and has a wide optimum range of pH and temperature [34]. Silk peptide hydrolyzed by papain shows glycine at the C-terminal end as analyzed by tandem mass sequencing [35], and silk contains a high proportion of glycine [23]. This is consistent with high molecular weight peptides not being detected after papain treatment of silk (Fig. 3b), although a low detection of high molecular weight peptides in papain-treated samples cannot be excluded.

Bromelain is known to be used in the degumming of silk cocoon, and it has been reported to have no effect on fibroin under reaction conditions of 2 h at 55 °C with a silk-to-enzyme ratio of 50:1 [36,37]. However, bromelain treatment of ultrasonicated silk induced decomposition of silk protein (Fig. 3c). This decomposition resulted from degradation of macromolecule peptides into small molecules through ultrasound-generated cavitation. In contrast, pancreatin and fungal enzymatic treatments appeared to have broken down macromolecule peptides into amino acids instead of low-molecular-weight peptides (Fig. 3d and e). As shown in Fig. 3, it was possible to produce peptides with different molecular weights by using different enzymes. In this study, among the enzymes studied, papain was the most suitable for producing low-molecular-weight peptides of 1–5 kDa.

Fig. 4 shows differences in the molecular weight of silk peptide extracted with ultrasound after enzymatic treatment. Silk cocoon and papain (1% each) were reacted for 24 h, then treated with ultrasound in water or treated with 0.1 N NaOH. In the case of ultrasonic treatment in a neutral phase, there were no major changes in molecular weight distribution of silk peptide (Fig. 4a). This occurred because fibrin was not extracted in a neutral state, whereas in 0.1 N NaOH solution, as the ultrasound treatment time became longer, the extracted silk peptide

showed a wide range of molecular weight (3.4–130 kDa) (Fig. 4b) and high molecular weight of silk proteins were extracted owing to ultrasonic waves [33]. Therefore, ultrasound treatment of enzyme-treated silk is not an appropriate method to produce low molecular weight silk peptides.

3.5. Effect of enzyme-treated silk peptide on sUV-induced skin inflammation

To evaluate the potential anti-inflammatory activity of silk peptide on the skin, we investigated the effect of silk peptides on inflammatory signaling pathways using sUV-induced mouse epidermal JB6 P+ cells. As presented in Fig. 5a, only the silk peptide produced by ultrasonication and following papain treatment showed inhibition of sUV-induced expression of COX-2, and dose-dependent decreases in sUV-induced COX-2 expression was shown by silk peptide (Fig. 5b). Therefore, further experiments were carried out to identify the effect of ultrasound and papain treatments on silk peptide. Compared to other enzymes, papain mainly produced peptides with molecular weight between 1 and 5 kDa (Fig. 4b), and these peptides might inhibit COX-2 expression. A study also demonstrated that low molecular weight silk peptide hydrolyzed by papain shows anti-inflammatory activity by regulating skin disease induced by cytokines such as IgE, IFN- γ , and IL-4 and by modulating the Th1/Th2 balance involved in IgE production [38].

Because PGE₂, a product of the COX-2 enzyme, plays a critical role in sUV-induced skin inflammation [39], we determined whether the silk peptide affects sUV-induced PGE₂ production. As shown in Fig. 5c, sUV irradiation increased PGE₂ production, and the silk peptide significantly reduced PGE₂ production. Considering that upregulation of COX-2 is regulated by extracellular signal-regulated kinase (ERK) and p38 [40], we determined whether SPUP affected sUV-induced ERK and p38 phosphorylation in JB6 P+ cells. Similar to the results of previous studies [41], sUV effectively activated the ERK and p38 signaling pathway, and the silk peptide only suppressed ERK phosphorylation (Fig. 6). Overall, we conclude that silk peptide treated with ultrasonication and papain possesses anti-inflammatory activity on a mouse skin cell line by suppressing the activation of ERK but not of p38.

4. Conclusions

To enhance the industrial production of silk peptide as food materials, ultrasonic treatment can be used to decrease solvent use and extraction time, and enzymatic treatment can increase the functionality of the silk peptide. Silk peptide produced from whole silk cocoon using ultrasound and enzymatic treatments had a low molecular weight distribution and showed inhibitory effects against skin inflammation. Especially, silk treated with papain, which resulted in peptides with molecular weight of approximately 1–5 kDa, showed protective effects on the skin against sUV. This study provides fundamental knowledge of silk peptide to improve industrial utilization and mass production of silk. Future studies will be performed to establish conditions for mass production of silk peptide.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This research was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, and Forestry (IPET) through High Value-added Food Technology Development Program, funded by the Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (118060-03).

References

- [1] J.V. Diego López Barreiro, Anna Tarakanova, Francisco J. Martín-Martínez, Markus J. Buehler, Multiscale modeling of silk and silk-based biomaterials – a review, *Materials* 19 (2019) e1800253.
- [2] M.K. DeBart, R.D. Abbott, Microscopic considerations for optimizing silk biomaterials, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 11 (2019) e1534.
- [3] B. Runda, N.E. Kurland, S. Bana, C. Putra, F.B. Engel, V.K. Yadavalli, S.C. Kundu, Silk proteins for biomedical applications: biomimetic perspectives, *Prog. Poly. Sci.* 39 (2014) 251–267.
- [4] T.S. Lallepuk Lamboni, Amaraachi Rosemary Gsi, Guang Yang, *Silk Proteins: A Natural Resource for Biomaterials*, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, NJ 07030, USA, 2018.
- [5] B. Marelli, M.A. Bronckle, D.L. Kaplan, F.G. Omenetto, Silk fibroin as edible coating for perishable food preservation, *Sci. Rep.* 6 (2016) 25263.
- [6] D. Bayat, E. Ahlök, S. Ulku, O. Bayraktar, Adsorption of olive leaf (*Olea europaea* L.) antioxidants on silk fibroin, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 1227–1236.
- [7] C. Holland, K. Numata, J. Rajak-Kovacska, F.P. Seib, The Biomedical use of silk: past, present, future, *Adv. Healthc. Mater.* 8 (2019) e1800465.
- [8] T.T. Guo, Y.Q. Zhang, Processing and characterization of silk sericin from *Bombyx mori* and its application in biomaterials and biomedicines, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 61 (2018) 940–952.
- [9] J.S. Ko, K. Yoon, C.S. Ki, H.J. Kim, D.G. Bae, K.H. Lee, Y.H. Park, I.C. Um, Effect of degumming condition on the solution properties and electrospinnability of regenerated silk solution, *Int. J. Biol. Macromol.* 55 (2013) 161–168.
- [10] M. Li, M. Ogino, N. Minoura, Enzymatic degradation behavior of porous silk fibroin sheets, *Biomaterials* 24 (2003) 357–365.
- [11] K. Vilkku, R. Mawson, L. Simons, D. Bates, Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry—a review, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 9 (2008) 161–169.
- [12] A.C. Soria, M. Villamiel, Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review, *Trends Food Sci. Technol.* 21 (2010) 323–331.
- [13] F. Chemat, N. Rombaut, A.-G. Sissiou, A. Meullemiestre, A.-S. Fabiano-Pixier, M. Aerts-Vian, Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications: A review, *Ultrason. Sonochem.* 34 (2017) 540–560.
- [14] H.Y. Wang, Y.Y. Chen, Y.Q. Zhang, Processing and characterization of powdered silk micro- and nanofibers by ultrasonication, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 48 (2015) 444–452.
- [15] A.P. Schuch, N.C. Moreno, N.J. Schuch, C.F.M. Menck, C.C.M. Garcia, Sunlight damage to cellular DNA: Focus on oxidatively generated lesions, *Free Radic. Biol. Med.* 107 (2017) 110–124.
- [16] E. Biniak, K. Levl, R.H. Dauskardt, Solar UV radiation reduces the barrier function of human skin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109 (2012) 17111–17116.
- [17] S.P. Divya, X. Wang, P. Pratheeshkumar, Y.D. Son, R.V. Roy, D. Kim, J. Dai, J.A. Hiron, L. Wang, P. Asha, X. Shi, Z. Zhang, Blackberry extract inhibits UVB-induced oxidative damage and inflammation through MAP kinases and NF-kappaB signaling pathways in SKH-1 mice skin, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 284 (2015) 92–99.
- [18] T.H. Lee, M.H. Do, Y.L. Oh, D.W. Cho, S.H. Kim, S.Y. Kim, Dietary fermented soybean suppresses UVB-induced skin inflammation in hairless mice via regulation of the MAPK signaling pathway, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 8962–8972.
- [19] W. Qiyang, Q. Ma, J. Li, D. Zhang, J. Ding, Y. Huang, M.M. Xing, C. Huang, Benz[a]pyrene diol-epoxide [B[a]PDE] upregulates COX-2 expression through MAPKs/AP-1 and IKKbeta/NF-kappaB in mouse epidermal C34 cells, *Mol. Carcinog.* 46 (2007) 32–41.
- [20] J. Lee, Cyclooxygenases in the skin: pharmacological and toxicological implications, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 192 (2003) 294–306.
- [21] D.-W. Kim, H.-S. Hwang, D.-S. Kim, S.-H. Sheen, D.-H. Hoo, G.-J. Hwang, S.-H. Kang, H.-Y. Kwon, Y.-Y. Jo, S.-W. Kang, K.-G. Lee, R.-W. Park, K.-H. Han, J.-S. Park, W.-S. Eam, Y.-J. Chu, H.-C. Choi, S.-Y. Choi, Effect of silk fibroin peptide derived from silkworm *Bombyx mori* on the anti-inflammatory effect of Tat-SOD in a mice edema model, *BMB Rep.* 44 (2011) 787–792.
- [22] P. Aramwit, P. Towsean, T. Sitchana, Anti-inflammatory potential of silk sericin, *Nat. Prod. Commun.* 8 (2013) 501–504.
- [23] A. Spohner, B. Schlotz, F. Vollrath, E. Unger, F. Grosse, K. Weisshart, Characterization of the protein components of *Nephila clavipes* dragline silk, *Biochemistry* 44 (2005) 4727–4736.
- [24] A. Meullemiestre, E. Petruccioli, Z. Maache-Bezouf, F. Chemat, S.A. Rezzoug, Impact of ultrasound on solid-liquid extraction of phenolic compounds from maritime pine sawdust waste. Kinetics, optimization and large scale experiments, *Ultrason. Sonochem.* 28 (2016) 230–239.
- [25] H.K. Kim, Y.H. Kim, Y.E. Kim, S.K. Jung, N.H. Lee, K.-M. Song, Effects of salts on ultrasonic extraction of protein from porcine myocardium, *Food Bioprod. Proc.* 108 (2018) 12–17.
- [26] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [27] C.A. Schneider, W.S. Hasband, K.W. Elisei, NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nat. Methods* 9 (2012) 671–675.
- [28] G.B. Irvine, High-performance size-exclusion chromatography of peptides, *J. Biochem. Biophys. Methods* 56 (2003) 233–242.
- [29] H.Y. Wang, Y.Q. Zhang, Processing and characterization of a novel electro-polymerized silk fibroin hydrogel membrane, *Sci. Rep.* 4 (2014) 6182.
- [30] M.K. Rajan, A. Balakrishnan, K. Jayaraman, Development of an antibody against a 170-kDa fragment of fibroin isolated from cotton fibres of *Bombyx mori*, *J. Biochem. Biophys.* 25 (1992) 37–43.
- [31] S. Hännimäki, P. Pavalant, A. Shotipruk, Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*, *Ultrason. Sonochem.* 13 (2006) 543–548.
- [32] L. Galvan d'Alessandro, E. Kráa, I. Nikov, K. Dimitrov, Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry, *Sep. Purif. Technol.* 93 (2012) 42–47.
- [33] S.K. Samal, D.L. Kaplan, E. Chiellini, Ultrasound sonication effects on silk fibroin protein, *Macromol. Mater. Eng.* 298 (2013) 1201–1208.
- [34] P.K. Singh, N. Shrivastava, B.K. Ojha, Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects, Academic Press, USA, 2018, pp. 116–117.
- [35] J. Jeong, W. Hur, Even-numbered peptides from a papain hydrolysate of silk fibroin, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 836–840.
- [36] U. Ninpetch, M. Tsukada, A. Promboon, Mechanical properties of silk fabric degummed with bromelain, *J. Eng. Fibers Fabr.* 10 (2015) 69–78.
- [37] J.-S. Ha, H.-K. Cho, S.-G. Lee, Preparation of soluble silk peptides by food grade proteases, *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 34 (2006) 115–120.
- [38] Y. Ikegawa, S. Sato, G. Liu, W. Hur, K. Tanaka, M. Komori, S. Takenaka, T. Taira, Amelioration of the progression of an atopic dermatitis-like skin lesion by silk peptide and identification of functional peptides, *Bioact. Biotechnol. Biochem.* 76 (2012) 473–477.
- [39] K. Kabashima, M. Nagamachi, T. Honda, C. Nishigori, Y. Miyachi, Y. Tokura, S. Narumiya, Prostaglandin E2 is required for ultraviolet B-induced skin inflammation via EP2 and EP4 receptors, *Lab. Invest.* 87 (2007) 49–55.
- [40] A.M. Bode, Z. Dong, Signal transduction pathways: targets for chemoprevention of skin cancer, *Lancet Oncol.* 1 (2000) 181–188.
- [41] M.H. Lee, T.G. Nam, I. Lee, E.J. Shin, A.R. Han, P. Lee, S.Y. Lee, T.G. Lim, Skin anti-inflammatory activity of rose petal extract (*Rosa gallica*) through reduction of MAPK signaling pathway, *Food Sci. Nutr.* 6 (2018) 2560–2567.

[부록4-2] 논문(한국식품연구원)

- Title : Production of *Undaria pinnatifida* sporophyll extract using pilot-scale ultrasound-assisted extraction : Extract characteristics and antioxidant and anti-inflammatory activities



Production of *Undaria pinnatifida* sporophyll extract using pilot-scale ultrasound-assisted extraction: Extract characteristics and antioxidant and anti-inflammatory activities

Su Jin Eom^a, Young Eon Kim^b, Jung-Eun Kim^c, Joon Park^c, Young Ho Kim^d, Kyung-Mo Song^{a,*}, Nam Hyouck Lee^{a,*}

ARTICLE INFO

Keywords:
Anti-inflammatory activity
Antioxidant activity
Circulatory ultrasound-assisted extraction
Polysaccharide
Undaria pinnatifida sporophyll

ABSTRACT

Owing to increasing demand for eco-friendly technology, the number of studies on extraction technology using lower organic solvents for energy conservation is increasing. Previously, we developed an ultrasound-assisted extraction (UAE) method of *Undaria pinnatifida* sporophyll that reduces extraction time and improves extraction yield. In the present study, we extracted *U. pinnatifida* sporophyll, which contained polysaccharide and fucoxanthin, using solvent-free circulatory UAE. With small pilot-scale circulatory UAE, the yield of *U. pinnatifida* sporophyll extract was improved to 52%, compared to that with a conventional method (24.7%) and lab-scale beam-type UAE (43%). After 3 h of UAE, fucoxanthin was obtained at a 3% yield and low-molecular-weight polysaccharides were detected. The antioxidant activity of the extract was increased after 3 h of UAE, as assessed by DPPH-scavenging, reducing power, and ferric reducing antioxidant power assays. Pilot-scale circulatory UAE conditions were optimized to 960 W, 20 kHz, 30 °C, and 3 h; the extract obtained using this method showed inhibitory effects on nitric oxide production and activator protein-1 (AP-1) transactivity.

1. Introduction

Undaria pinnatifida (Harvey) Suringar is brown marine algae. *U. pinnatifida* has a highly reproductive cycle and competitive price. It is mainly produced in China, Japan, and Republic of Korea, with smaller commercial scale production in French, New Zealand, and Spain. These seaweed contain dietary fibers, numerous minerals, vitamins, and phytochemicals, and thus have attracted interest as functional health foods [1]. Such functionalities were known to be due to functional materials, including sulfated polysaccharides (e.g., fucoidan), carotenoids (e.g., fucoxanthin), minerals, and peptides [2]. Fucoidan is a representative bioactive material from *U. pinnatifida*. Fucoidan is a sulfated polysaccharide containing L-fucose (main sugar), galactose, xylose, mannose, and uronic acids [3]. Many studies have shown that fucoidan has beneficial biological activities, such as anti-inflammatory [4], antiangiogenic, anticoagulant, anti-adhesive [5], antitumor, immunomodulatory, antiviral, antithrombotic [6], and antioxidant activities [7]. Fucoxanthin is another representative bioactive material of *U. pinnatifida*, and is one of the most abundant carotenoids in nature [8].

Fucoxanthin, an alkenic carotenoid, is also known for its various properties, such as anticancer, anti-obesity, and antidiabetic properties [9].

For use as functional food materials, raw materials must be subjected to an extraction process. The development of alternative, eco-friendly methods has been continuously demanded to ameliorate the use of organic solvents, which have the risk of toxicity and environment pollution [10]. Ultrasonic treatment is an eco-friendly process that not only increases extraction yield but also improves extract stability as the extraction is conducted at a low temperature [11]. Ultrasound treatment on the medium generates bubbles, thereby producing a cavitation phenomenon. When a cavitation bubble collapses near the cell wall, it produces a strong impact on the surface and breaks the cell wall, allowing the solvent to effectively enter the cell, thus, facilitating extraction [12,13].

In several recent studies, enzyme, supercritical fluid, ultrasound, and microwave extraction have been conducted to extract polyphenols from plants and lipid from algae [14]. In our previous study [15], ultrasonication during *U. pinnatifida* extraction resulted in an increased extraction yield, even under reduced extraction time and solvent

<https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102039>

Received 20 April 2020; Received in revised form 3 August 2020; Accepted 3 August 2020
2211-9264/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

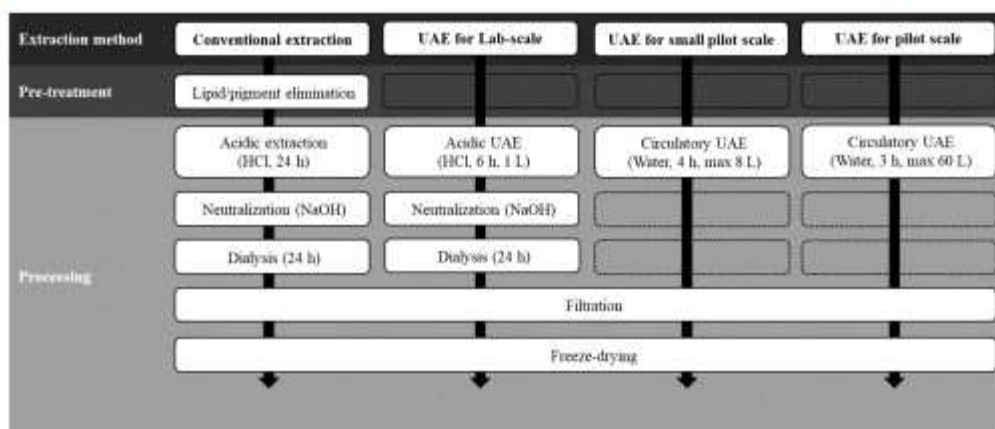


Fig. 1. Comparison of *Undaria pinnatifida* sporophyll extraction method.

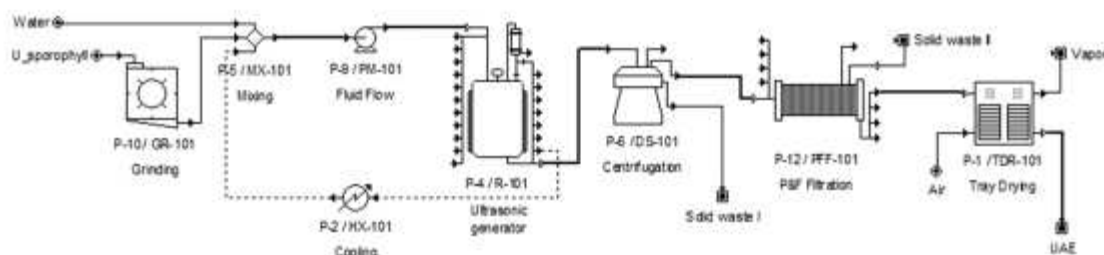


Fig. 2. Estimated flowsheet of ultrasound-assisted extraction of *Undaria pinnatifida* sporophyll in pilot scale.

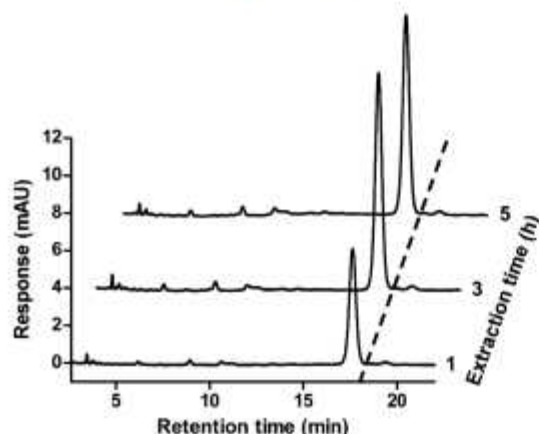


Fig. 3. High-performance liquid chromatography chromatogram of fucosanthin in *Undaria pinnatifida* extract obtained using circulatory ultrasound-assisted extraction in a small pilot-scale at each extraction time point. Peaks appeared at 17.6 min in the chromatogram.

volume, and enhanced anti-inflammatory properties associated with AP-1 pathway suppression. However, this method still requires an acid solution for extraction and a subsequent neutralization step. In the present study, an extraction method of *U. pinnatifida* was developed without the use of organic solvents or additional neutralization

processes. In addition, we conducted a pilot scale-up extraction for industrial application using our previously reported system [15]. Therefore, the present study aimed to develop an industrial ultrasound-assisted extraction (UAE) method of *U. pinnatifida*, as well as to analyze the biofunctional molecules of the extract and evaluate the antioxidant and anti-inflammatory activities of the extract.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Naturally dried sporophyll of *U. pinnatifida*, harvested in Wando (Jeollanam-do, South Korea) from March to April was purchased at a traditional market. Dried *U. pinnatifida* sporophyll was blended into a powder using a blender (HMP-3100S; Hanil Electric Co., Korea) and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use.

2.2. Extraction of *U. pinnatifida* sporophyll

2.2.1. Conventional method

A conventional extraction method using a chemical solvent and acid was used as a control for comparison with the ultrasound-assisted extraction method. Briefly, 40 g of powdered sample was combined with 4 L of 85% ethanol and incubated with stirring at $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 h. The precipitate was mixed with 4 L of 0.1 M HCl, stirred at room temperature for 3 h, and then neutralized with 0.1 M NaOH. The extract was dialyzed using Cellu-Sep T1 (MWCO 14,000–16,000 Da; Membrane Filtration Products Inc., Seguin, USA) against deionized water at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 12 h and then freeze-dried.

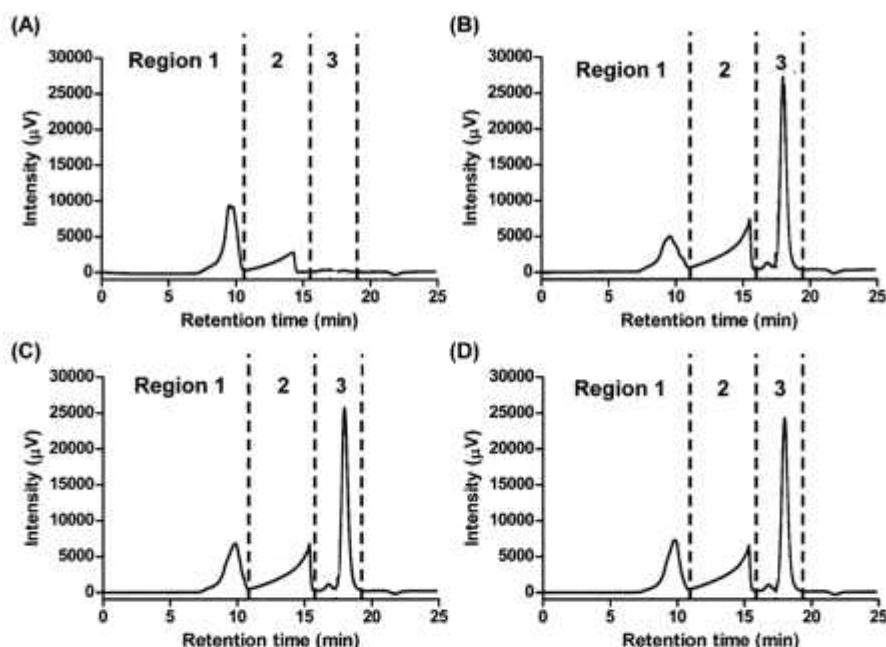


Fig. 4. Size-exclusion chromatography analysis of *Undaria pinnatifida* sporophyll. (A) Conventional extraction; (B) circulatory ultrasound-assisted extraction (UAE) for 1 h; (C) circulatory UAE for 3 h; (D), circulatory UAE for 5 h.

2.2.2. Ultrasound-assisted extraction in lab-scale

For the lab-scale UAE method, 10 g of powdered samples were extracted with 1 L of 0.1 M HCl (pH 2) using an Ultrasonic Processor VCX 750 (Sonics & Materials, Inc., Newtown, USA). Ultrasound condition adjusted at 800 W, 80% amplitude, pulse 20 s on/20 s off, and 25 °C for 6 h [15]. After UAE, extract was neutralized with 0.1 M NaOH and dialyzed using Cellu-Sep T1 and freeze-dried.

2.2.3. Ultrasound-assisted extraction in small pilot-scale

In the small pilot-scale study using circulatory UAE, 80 g of sample was combined with 8 L of deionized water and extracted using MX sonic (MX-12S2; Mirae Ultrasonic Tech., Korea) [31] at 800 W, 80% amplitude, 20 kHz, and 30 °C, for three different extraction times of 1, 3, and 5 h. The extracts were centrifuged at 4000 rpm for 15 min, and the supernatants were filtered (No. 4; Whatman International Ltd., Maidstone, England) and freeze-dried.

2.2.4. Ultrasound-assisted extraction in pilot-scale

For industrial application of UAE, 200 g of powdered sample was suspended in 20 L water and extracted using an industrial ultrasonic extraction system (at 960 W, 80% amplitude, 20 kHz, and 30 °C for 3 h) [31]. A flowsheet of the UAE process in pilot-scale was developed using SuperPro designer 10 (Intelligen Inc., Scotch Plains, NJ, USA). The yield of each *U. pinnatifida* extract was calculated by dividing the dry weight of the extract by the weight of the dry sample used for extraction.

2.3. Quantification of chemical compounds

2.3.1. Measurement of total sugar content

Total sugar content was determined by the phenol-sulfuric acid method [16]. A total of 200 μ L sample dissolved in deionized water was placed in a glass test tube, to which 200 μ L of 5% phenol was added. The mixture was then vortexed, and 1 mL of sulfuric acid was added.

After cooling the mixture to 25 °C, the absorbance of the sample solution was measured at 470 nm, and total sugar content was calculated using L-fucose as a standard.

2.3.2. Measurement of sulfate residues content

Sulfate content in sample hydrolysate was measured using the BaCl₂-gelatin method [17]. Briefly, 200 μ L of hydrolysate was plated in a test tube, to which 3.8 mL of 3% trichloroacetic acid (TCA) was added, followed by 1 mL of barium chloride-gelatin reagent. After vortexing, the mixture was kept at 25 °C for 20 min, and the absorbance was measured at 360 nm. Sulfate content was calculated using potassium sulfate as a standard.

2.3.3. Measurement of fucoxanthin using high-performance liquid chromatography (HPLC)

A 0.5 g of sample was dissolved in 10 mL methanol at 25 °C for 2 h to extract fucoxanthin. After centrifugation (3000 rpm, 15 min), the precipitate was dissolved in 10 mL methanol at 25 °C for 1 h. After centrifugation, the supernatants were evaporated and dissolved in solvent (deionized water-ethyl acetate = 1:1, v/v). The ethyl acetate layer was collected, evaporated, dissolved in 75% acetonitrile, and then analyzed using an HPLC system (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) with Inertsil ODS-3 column (4.6 \times 250 mm, 5 μ m) (GL Science, Tokyo, Japan) at 30 °C. The samples were injected at a volume of 10 μ L and eluted isocratically with 75% acetonitrile at a flow rate of 1 mL/min. The eluted peaks were detected using a UV detector at 450 nm, and qualitative and quantitative analyses were carried out using fucoxanthin standards [3].

2.4. Determination of average molecular weight using gel permeation chromatography (GPC)

Briefly, 5 mg of extract were dissolved in 1 mL deionized water, and the mixture was centrifuged at 12,000 rpm for 10 min. The

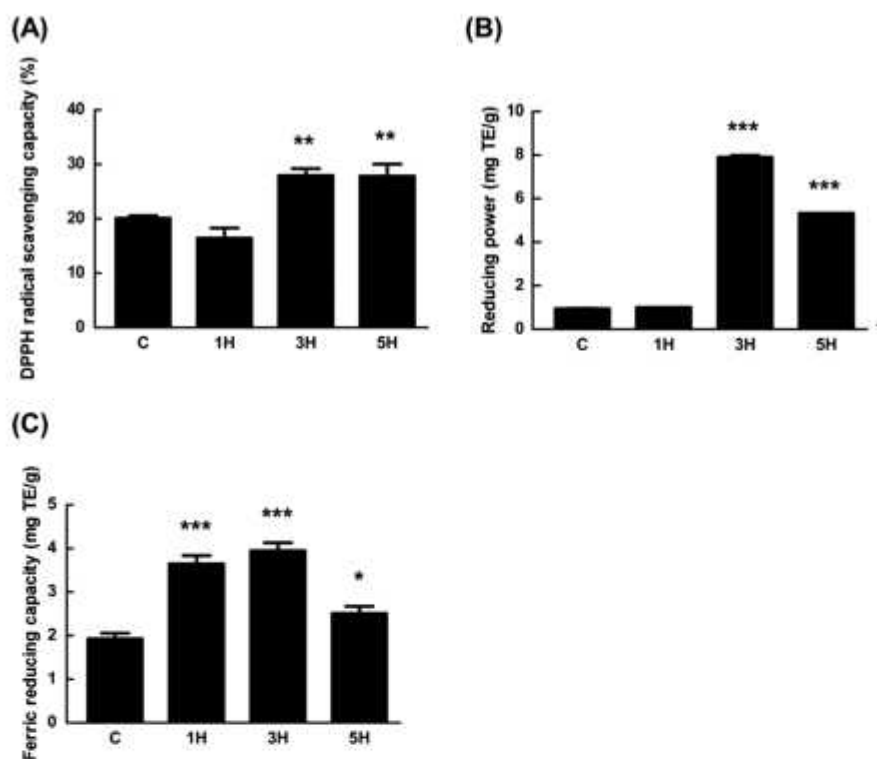


Fig. 5. Antioxidant activity of *Undaria pinnatifida* sporophyll extracted using small pilot-scale extraction. (A) 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging capacity; (B) reducing power; (C) ferric reducing antioxidant power (FRAP). C, conventional extraction; 1H, circulatory ultrasound-assisted extraction (UAE) for 1 h; 3H, circulatory UAE for 3 h; 5H, circulatory UAE for 5 h. The data represent the mean value \pm SD ($n = 3$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, compared with the conventional extraction, as analyzed by analysis of variance.

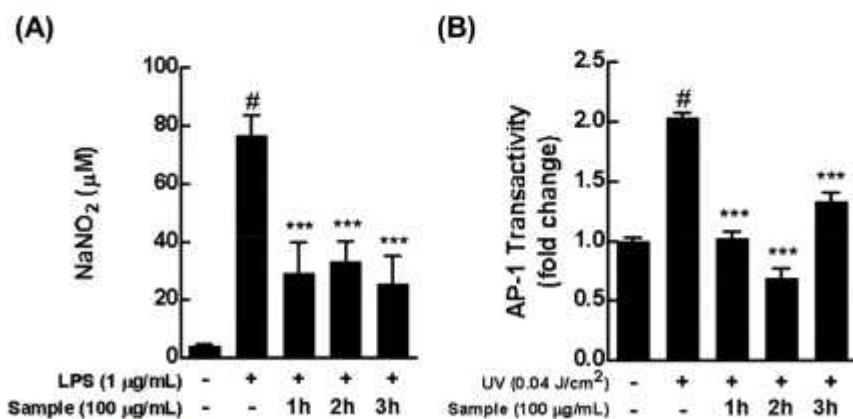


Fig. 6. Inhibition of nitric oxide production (A) and activator protein-1 (AP-1) transactivity (B) of *Undaria pinnatifida* sporophyll extract obtained using pilot-scale extraction at each extraction time point. The data represent the mean value \pm SD ($n = 3$). *** $p < 0.001$, compared with the conventional extraction, as analyzed by analysis of variance.

supernatants were injected at a volume of 20 μ L into a Jasco HPLC system and eluted isocratically with deionized water at a flow rate of 0.7 ml/min. Average molecular weight was determined using TOSHO TSKgel G5000PWXL-CP (7.8 \times 300 mm, 10 μ m) (TOSHO Bioscience, Tokyo, Japan) at 25 $^{\circ}$ C. The peaks were detected by an RI detector, and average molecular weight was calculated using pullulan standards (Shodex standard P-82; Showa Denko, Tokyo, Japan).

2.5. Antioxidant activity

2.5.1. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activity

DPPH radical-scavenging activity was performed based on the method of Huang [18]. A 0.2 mM solution of DPPH in methanol was prepared. A 200 μ L aliquot of UPE was added to 600 μ L of 0.2 mM DPPH solution, and the mixture was kept in the dark for 30 min followed by absorbance measurement at 517 nm.

2.5.2. Measurement of reducing power using potassium ferricyanide

Reducing power was measured based on the method of Sherikar and Mahanthesh [19]. A 500 μ L aliquot of sample was mixed with 1% potassium ferricyanide and phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) at 50 $^{\circ}$ C for 20 min, and then mixed with 500 μ L of 10% TCA. The mixture was added deionized water and 0.1% FeCl_3 , and the absorbance was measured at 700 nm. The results are expressed as μ g Trolox equivalent (TE) per g extract (e.g. μ g TE/g extract).

2.5.3. Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

Measurement of FRAP was performed based on the method of Sherikar and Mahanthesh [19]. The FRAP reagent used was sodium acetate buffer, 10 mM TPTZ, and 20 mM FeCl_3 . TPTZ solution was prepared as follows: 0.031 g TPTZ was added to 10 ml of 40 nM HCl, and the mixture was then dissolved by heating in a water bath at 50 $^{\circ}$ C. A 50 μ L aliquot of sample was added to 1.5 mL of the reagent for 30 min at 37 $^{\circ}$ C to create a stable solution, and the absorbance was measured at 595 nm. The results are expressed as μ g TE/g extract.

2.6. Anti-inflammation activity

2.6.1. Nitric oxide production

RAW 264.7 mouse macrophage cells were seeded (1.5×10^5 cells/mL) in 96-well plates and then incubated at 37 $^{\circ}$ C in a 5% CO_2 incubator. A 100 μ L aliquot of sample was added to well plate. The cells were then treated with lipopolysaccharide (1 mg/mL) and incubated for 20 h. To determine total NO concentration in the cultured media, Griess reagent was added to 100 μ L of supernatant, and the absorbance was measured at 550 nm using microplate reader (Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA).

2.6.2. Activator protein (AP-1) transactivity

HaCaT cells were transfected with an AP-1-luciferase plasmid based on the method of Ha [20]. The cell culture medium was replaced with fresh medium, and the cells were incubated for 24 h. The cells (8×10^3 cells/mL) were seeded on 96 well plates and starved in serum-free DMEM for 24 h. The cells were treated with sample for 1 h prior to exposure to UVB (0.04 J/cm²), followed by incubation for 5 h. Cells were disrupted using 100 μ L of lysis buffer (Thermo Scientific, USA), and the level of luminescence was measured using a luminometer (Molecular Devices, USA).

2.7. Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate and presented as the mean \pm standard deviation. The antioxidant and anti-inflammatory data were analyzed by one-way analysis of variance using SPSS 19.0 version (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results and discussion

3.1. Extraction yield and chemical composition according to extraction method

In previous studies, horn-type UAE was optimized to extract *U. pinnatifida* in a laboratory scale. For industrial application, circulatory UAE was carried out in a pilot-scale (20 L) system following a small pilot-scale test (8 L). The different extraction methods for *U. pinnatifida* sporophyll are shown in Fig. 1. Fig. 2 shows the expected process flowchart for industrialization that is divided into the grinding, extraction, separation, and drying processes. The grinding capacity of a grinder is 100 kg/h, the sigma factor of centrifuge is 0.6 m², the filter has a plate and frame filter, and the tray area of dryer is 77 m². We changed the ultrasonic system from horn-type to circulatory-type since circulatory type is advantageous for scale up.

The yields of conventional method, laboratory-scale, small pilot-scale, and pilot scale UAE were $24.67 \pm 0.34\%$, $33.00 \pm 0.40\%$, $58.50 \pm 1.50\%$, and 53% , respectively. The process was simplified by excluding lipid and pigment removal and dialysis processes, increasing the working volume, and decreasing the ultrasonic treatment time. The total sugar content of the extract obtained using the conventional method, laboratory-scale extraction method, and small pilot-scale extraction method was $20.24 \pm 0.40\%$, $19.94 \pm 0.40\%$, and $15.32 \pm 1.37\%$, respectively. Total sugar content was decreased by changing the solvent from HCl to water because extraction with acidic solutions can improve yield of crude fucoidan [21]. The sulfate content of the extract obtained using the conventional method, laboratory-scale extraction method, and small pilot-scale extraction method were $13.74 \pm 0.40\%$, $15.56 \pm 0.57\%$, and $14.77 \pm 0.15\%$, respectively, with no significant differences ($p < 0.05$). Conversely, fucoxanthin was detected at 0.031 mg/g dried extract in the extract obtained using the UAE method with 3 h extraction, rather than the conventional method (Fig. 3). Several studies reported that ultrasound treatment leads to disruption of cell wall, facilitating extraction of marine-derived fucoxanthin, such as from *Cylindrotheca closterium*, *Laminaria japonica*, *Sargassum fusiforme*, *Undaria pinnatifida*, *Phaeodactylum tricornutum*, and *Eisenia bicyclis* [22].

In extraction using ultrasonic waves, ultrasound intensity (W), sonication temperature, and sonication time affect extraction yield. Extraction yield is positively correlated with extraction strength, extraction time, and extraction temperature when extracting polysaccharide, protein, and polyphenol from marine-derived compounds [22,23]. To optimize these conditions, the content of soluble solids in the extract was measured for 5 h in a pilot-scale test (20 L). A 0.7 brix was observed when *U. pinnatifida* was subjected to pilot-scale extraction at 800 W, 4 h, and 30 $^{\circ}$ C under the same conditions as the small pilot-scale extraction. When ultrasonication power was raised to 930 W, the extract reached 0.7 brix at 3 h. However, even when the temperature was raised to 50 $^{\circ}$ C, there was no change in brix (data not shown) because the soluble extract was sufficiently eluted for 3 h at 30 $^{\circ}$ C. Thus, ultrasound conditions in the pilot-scale extraction was set at 930 W, 3 h, and 30 $^{\circ}$ C.

3.2. Average molecular weight

The molecular weight distribution of *U. pinnatifida* extract was analyzed by GPC. As shown in Fig. 4, the peak of region 3 (Fig. 4A) was not detected and it seems that the low-molecular-weight molecules were removed during dialysis. The average molecular weight (Mw) of extracts obtained using the conventional method and circulatory UAE at 3 h (Fig. 4C) in region 1/region 2/region 3 were 6338/153/0 kDa and 5877/97/0.52 kDa, respectively. The extract in region 1 (upper 700 kDa) was decomposed to region 2 (10–700 kDa), reaching the peak at 15 min (approximately 30 kDa). Crude fucoidan extract of *U. pinnatifida* from Korea had a molecular weight of 38 kDa, whereas

fucoidan extract of *U. pinnatifida* from New Zealand had a molecular weight of 27 kDa [17]. *U. pinnatifida* extract obtained using horn-type UAE had a low-molecular-weight, whereas that obtained using conventional extraction method had a high-molecular-weight [15], thereby indicating that the circulatory UAE was similar in obtaining low-molecular-weight extract. Moreover, the ultrasound power can affect the glycosidic bond of polysaccharides and partial cleavage of the glycosidic linkages [24].

3.3. Antioxidant activity of *U. pinnatifida* sporophyll extract obtained using small pilot-scale extraction

To evaluate the antioxidant activity of the extract, its DPPH radical-scavenging capacity, reducing power, and ferric reducing capacity were assessed (Fig. 5). The extract obtained from small pilot-scale extraction showed an approximately 10% higher DPPH radical-scavenging capacity than that of the extract obtained using the conventional method. The ultrasonicated extract also showed higher potassium ferricyanide and iron chloride reducing power than the extract obtained using the conventional method. Moreover, the highest antioxidant activity was observed in the extract obtained using 3 h of UAE, whereas that obtained using 5 h of UAE tended to show lower antioxidant activity. Sulfated polysaccharide in *U. pinnatifida* was reported to exert strong superoxide radical-scavenging activity [24]. After 5 h of UAE, sulfated polysaccharide content in the plant might be degraded, leading to reduction of antioxidant activity. Several studies showed that the antioxidant activity of sulfated polysaccharides has positive correlation with sulfur [25], and sulfated marine polysaccharides have been shown to exert improved radical-scavenging activity [26,27].

3.4. Anti-inflammatory activity of *U. pinnatifida* sporophyll extract obtained using pilot-scale extraction

The anti-inflammatory activity of the extract was measured according to extraction time. All extracts showed inhibitory effect on LPS-induced NO production in Raw cells (Fig. 6A) and regulatory effect on AP-1 transactivity in HaCaT cells (Fig. 6B), with no significant differences between extraction time. AP-1, which is activated by mitogen-activated protein kinase (MAPK), is crucial for inflammation, producing NO, prostaglandin E₂ (PGE₂), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) [28]. The anti-inflammatory activity of seaweed extracts was reported to be due to polysaccharides and fucoxanthin [29]. *U. pinnatifida* sporophyll extract can regulate the MAPK/ERK pathway and inhibit iNOS, COX-1, and COX-2 expression [2,30]. In addition, low-molecular-weight polysaccharide from *U. pinnatifida* suppressed Th2 immune responses and phosphorylation of c-Jun N terminal kinase (JNK) 1/2/MKK 4 and p38/MKK3/6 [15]. Overall, low-molecular-weight polysaccharide and fucoxanthin extracted by UAE from *U. pinnatifida* exerted anti-inflammatory effects.

4. Conclusions

In this study, an industrial-scale method of *U. pinnatifida* sporophyll extraction using an ultrasound system was developed. The obtained low-molecular-weight *U. pinnatifida* sporophyll extract showed antioxidant and anti-inflammatory effects. Compared to the conventional horn-type ultrasound system, the circulatory ultrasound system had fewer limitations in terms of throughput and was more advantageous to industrialization, as ultrasonic waves were applied evenly. This method can extract not only polysaccharides but also fucoxanthin from *U. pinnatifida* sporophyll. Future studies will focus on other active ingredients and safety of industrial *U. pinnatifida* extract sporophyll.

Abbreviations

AP-1	activator protein-1
DMEM	Dulbecco's modified eagle's media
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
ERK	extracellular-signal-regulated kinase
FRAP	ferric reducing antioxidant power
GPC	gel permeation chromatography
HPLC	high-performance liquid chromatography
JNK	c-Jun N terminal kinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MWCO	molecular weight cut off
NO	nitric oxide
PGE ₂	prostaglandin E ₂
TCA	trichloroacetic acid
TE	Trolox equivalent
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TPTZ	2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine
UAE	ultrasound-assisted extraction
UVB	ultraviolet B

CRediT authorship contribution statement

Su Jin Eom: Writing - original draft, Visualization. Young Eon Kim: Methodology, Formal analysis. Jung-Eun Kim: Investigation. Joong Park: Investigation. Young Ho Kim: Supervision, Resources. Kyung-Mo Song: Writing - review & editing. Nam Hyouck Lee: Writing - review & editing, Project administration.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This research was supported by Main Research Program (E0201200-01) of the Korea Food Research Institute (KFRI) funded by the Ministry of Science and ICT, South Korea and supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through High Value-added Food Technology Development Program, funded by the Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (118060-03).

Author statement

No conflicts, informed consent, human or animal rights are applicable.

References

- [1] A. Sinyutina, W.-J. Kim, S.-M. Kim, R. Probi, A. Sinyutina, F. Evsanižba, J. Čepičková, Y.J. Park, Structure and antitumor activity of fucoidans isolated from sporophyll of Korean brown seaweed *Undaria pinnatifida*, *Carbohydr. Polym.* 91 (2010) 41–48.
- [2] L. Wang, Y.-J. Park, Y.-J. Jeon, B. Byu, Bioactivities of the edible brown seaweed, *Undaria pinnatifida*: a review, *Aquaculture* 495 (2018) 873–880.
- [3] C. Yang, D. Chung, I. Shin, H. Lee, J. Kim, Y. Lee, S. Yun, Effects of molecular weight and hydrolysis conditions on anticancer activity of fucoidans from sporophyll of *Undaria pinnatifida*, *Int. J. Biol. Macromol.* 43 (2008) 433–437.
- [4] A.R. Phull, S.J. Kim, Fucoidan as bio-functional molecule: insights into the anti-inflammatory potential and associated molecular mechanisms, *J. Funct. Foods* 38 (2017) 415–426.
- [5] A. Cumabi, N.A. Ushakova, M.E. Pembrashenskaya, A. D'Incecco, A. Piccoli, I. Totani, N. Tisati, G.E. Monzevich, A.E. Bernas, M.I. Bilan, A.I. Usov, N.E. Ustyuzhanina, A.A. Grachev, C.J. Sanderson, M. Kelly, G.A. Rabinovich, S. Iarubelli, N.E. Nifantiev, I. Consorzio Interuniversitario Nazionale per la Ri-

- Oncoflogia, A comparative study of the anti-inflammatory, antiangiogenic, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds, *Glycobiology* 17 (2007) 541–552.
- [6] K.H. Jung-Bum Lee, Misono Hashimoto, Takahisa Nakano, Toshihito Hayashi, Novel antiviral Fucoidan from Sporophyll of *Undaria pinnatifida* (Mokado), *Chem. Pharm. Bull.* 52 (2004) 1091–1094.
- [7] C.Y. Huang, S.J. Wu, W.N. Yang, A.W. Kuan, C.Y. Chen, Antioxidant activities of crude extracts of fucoidan extracted from *Sargassum glaucescens* by a compression-puffing-hydrothermal extraction process, *Food Chem.* 197 (Pt 6) (2016) 1121–1129.
- [8] J. Peng, Z.-P. Yuan, C.-F. Wu, J.-H. Wang, Fucosaminin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: metabolism and bioactivities relevant to human health, *Mar. Drugs* 9 (2011) 1806–1828.
- [9] H. Manda, M. Hasekawa, T. Sashima, Y. Yamayama, K. Miyashita, Fucosaminin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332 (2005) 392–397.
- [10] F. Chinnai, M.A. Vias, G. Cravotto, Green extraction of natural products: concept and principles, *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2012) 8615–8627.
- [11] B.K. Tiwari, Ultrasonic: a clean, green extraction technology, *Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 100–109.
- [12] M.D. Escalante, J.V. Garcia-Perez, A. Mulet, J.A. Cárcel, Ultrasound-assisted extraction of natural products, *Food Eng. Rev.* 3 (2011) 108–120.
- [13] B. Vardanega, D.T. Santos, M.A. Meireles, Intensification of bioactive compounds extraction from medicinal plants using ultrasonic irradiation, *Pharmacogn. Rev.* 8 (2014) 88–95.
- [14] K.S.P. Jorvan, V.E. Garlapati, A. Dash, P. Schulz, E. Benezise, Sustainable green solvents and techniques for lipid extraction from microalgae: a review, *Algal Res.* 21 (2017) 138–147.
- [15] E.-M. Song, S.J. Ha, J.-E. Lee, S.-H. Kim, Y.H. Kim, Y. Kim, S.P. Hong, S.K. Jung, N.H. Lee, High yield ultrasonication extraction method for *Undaria pinnatifida* sporophyll and its anti-inflammatory properties associated with AP-1 pathway suppression, *LWT Food Sci. Technol.* (2015) 1315–1322.
- [16] X. Xi, X. Wei, Y. Wang, Q. Chu, J. Xiao, Determination of ten polysaccharides in *Camellia sinensis* by a modified phenol-sulfuric acid method, *Arch. Biol. Sci.* 62 (2010) 669–676.
- [17] W. Mak, N. Hamid, T. Liu, J. Lu, W.L. White, Fucoidan from New Zealand *Undaria pinnatifida*: monthly variations and determination of antioxidant activities, *Carbohydr. Polym.* 95 (2013) 606–614.
- [18] C.Y. Huang, C.H. Kuo, P.W. Chen, Compression-puffing pretreatment enhances neuroprotective effects of fucoidans from the brown seaweed *Sargassum hemiphyllum* on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in SH-SY5Y cells, *Molecules* 23 (2017).
- [19] A.S. Sherikar, M.S. Mahabesh, Evaluation of aqueous and methanolic extract of leaves of *Epigremnum aurum* for radical scavenging activity by DPPH method, total phenolic content, reducing capacity assay and FRAP, *J. Pharmacogn. Phytochem.* 4 (2015) 36–40.
- [20] S.J. Ha, J. Lee, J. Park, Y.H. Kim, N.H. Lee, Y.E. Kim, E.M. Song, P.S. Chang, S.H. Jeong, S.B. Jung, Syngingic acid prevents skin carcinogenesis via regulation of Nox and EGFR signaling, *Biochem. Pharmacol.* 154 (2018) 435–445.
- [21] H. Kawamoto, Y. Miki, T. Kimura, K. Tanaka, T. Nakagawa, M. Kawamukai, H. Matsuda, Effects of fucoidan from Muzoku on human stomach cell lines, *Food Sci. Technol. Res.* 12 (2006) 218–222.
- [22] C. Grosso, P. Valentao, F. Ferreres, F.R. Andrade, Alternative and efficient extraction methods for marine-derived compounds, *Mar. Drugs* 13 (2015) 3183–3230.
- [23] V. Ummer, B.K. Tiwari, A.K. Jaiswal, K. Gondim, M. Garcia-Vaquero, J. O'Doherty, C. O'Donnell, G. Rajasaria, Optimisation of ultrasound frequency, extraction time and solvent for the recovery of polyphenols, phenotannins and associated antioxidant activity from brown seaweeds, *Mar. Drugs* (2020) 18.
- [24] S. Niponram, W. Torhampa, P. Rattanasatitwong, R. Singanantong, Optimization of low power ultrasound-assisted extraction of phenolic components from mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampong) peel, *Food Chem.* 241 (2018) 338–345.
- [25] H. Qi, Q. Zhang, T. Zhao, R. Chen, H. Zhang, X. Niu, Z. Li, Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro, *Int. J. Biol. Macromol.* 37 (2005) 195–199.
- [26] X. Si, Z. Zhou, D. Bu, J. Li, P. Strappe, C. Blanchard, Effect of sulfation on the antioxidant properties and in vitro cell proliferation characteristics of polysaccharides isolated from euen bran, *CYTA-J. Food* 14 (2016) 555–564.
- [27] M.C.R. Souza, C.F. Marques, C.M.G. Dore, F.R. Ferreira da Silva, H.A. Oliveira Rocha, E.L. Leite, Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds, *J. Appl. Phycol.* 19 (2007) 153–160.
- [28] J. Oh, J.H. Kim, J.G. Park, Y.S. Yi, K.W. Park, H.S. Rho, M.S. Lee, J.W. Yoo, S.H. Kang, Y.D. Hong, S.S. Shin, J.Y. Cho, Radical scavenging activity-based and AP-1-targeted anti-inflammatory effects of lutein in macrophage-like and skin keratinocyte cells, *Mediat. Inflamm.* 2013 (2013) 757042.
- [29] W.A.J.P. Wijesinghe, Y.-J. Jeon, Biological activities and potential nutraceutical applications of bioactive components from brown seaweeds: a review, *Phytochem. Rev.* 10 (2011) 431–443.
- [30] K.J. Kim, K.V. Yoon, B.Y. Lee, Low molecular weight fucoidan from the sporophyll of *Undaria pinnatifida* suppresses inflammation by promoting the inhibition of mitogen-activated protein kinase and oxidative stress in RAW264.7 cells, *Fitoterapia* 83 (2012) 1628–1635.
- [31] E.M. Song, S.K. Jung, Y.H. Kim, Y.E. Kim, N.H. Lee, Development of industrial ultrasonic system for mass production of collagen and biochemical characteristics of extracted collagen, *Food Bioprocess. Technol.* 110 (2018) 96–103.



Extraction conditions for *Rosa gallica* petal extracts with anti-skin aging activities

Eun Ju Shin¹ · Ah-ram Han¹ · Myung-hee Lee¹ · Young-Ran Song¹ · Kwang Min Lee¹ · Tae-Gyu Nam¹ · Pomjoo Lee² · Sung-Young Lee³ · Tae-Gyu Lim¹

Received: 24 January 2019/Revised: 25 February 2019/Accepted: 28 February 2019
© The Korean Society of Food Science and Technology 2019

Abstract The anti-skin inflammatory activities of rose petal extracts have been described in our previous study. Because skin inflammation is closely linked to skin aging, our study investigated the effects of *Rosa gallica* petals on skin aging-related activities such as skin whitening and anti-wrinkle properties. Each sample was prepared via extraction using different ethanol ratios with the objective of evaluating optimal extraction conditions for industrial application. Aqueous 50% (v/v) EtOH extract of *R. gallica*

petal significantly suppressed tyrosinase activity, melanin production, and solar UV-induced matrix metalloproteinase-1, a hall mark of wrinkle formation. In addition, the aqueous 50% (v/v) EtOH extract showed the highest antioxidative effect and had highest flavonoid contents, consistent with the reported anti-aging effects. Overall, our findings suggest that *R. gallica* petals extracts exhibit anti-aging effects. Furthermore, 50% EtOH extraction, in particular, was optimal for the highest anti-aging, and antioxidative effects as well as to obtain the highest flavonoid content.

Keywords *Rosa gallica* · Skin aging · Flavonoid · Antioxidative effect

Introduction

Skin plays a vital role as a protective barrier against harmful factors associated with heredity and genetics, environmental issues, hormonal changes, and metabolic processes (Mukherjee et al., 2006). Among these, environmental factors, such as exposure to solar ultraviolet (UV) radiation, act as key mediators that contribute to premature aging (Laga and Murphy, 2009). Main symptoms of skin-aging, which occurs as a result of photo-aging, included deep wrinkles, abnormal pigmentation and elasticity (Farage et al., 2013; Wlaschek et al., 2001).

Pigmentation is a symptom of aging, which is caused by an abnormal production of melanin, resulting in a variety of skin disorders including freckles, melasma, age spots, and other hyperpigmentation syndromes (D'Mello et al., 2016; Seo et al., 2003). In the melanogenesis pathway, tyrosinase is important as the rate-limiting enzymes that converts L-tyrosine to L-DOPA and oxidizes L-DOPA to

form DOPA-quinone (Akhtar et al., 2015). Therefore, inhibition of tyrosinase is strongly associated with melanin synthesis. Moreover, wrinkle formation, caused by the loss of collagen fibrils and elastase, is another characteristic of photoaging. Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), secreted by human skin fibroblasts, is mainly responsible for collagen degradation during the photo-aging process (Pandel et al., 2013). Downregulation of MMP-1 expression, which inhibits collagen degradation, may enhance wrinkle-improving functions.

For the above stated reasons, the use of tyrosinase inhibitors or MMP inhibitors is considered a promising strategy for the alleviation of skin photo-aging. Previous studies have indicated that retinol, garlic extract (caffeine acid, and S-allyl cysteine) and phytoceramide, kojic acid, arbutin, and vitamin C may act as skin aging inhibitors (Couteau and Coiffard, 2016; Kim et al., 2013). However, the use of these substance involves certain limitations such as various side effects including cytotoxicity, odor, and coloration (Yamakoshi et al., 2003). Therefore, current studies are focused on the development of safer, naturally-derived components which confer effective skin photo-protection.

Rosa species, grown worldwide, are considered as a good source of dietary supplements. Rose petal extract (RPE), which contains elements such as phenolic acid, flavonols and anthocyanins, have been reported to exhibit many beneficial effects, such as anti-skin inflammatory activities, in addition to other biological roles (Bitis et al., 2017; Lee et al., 2018; Masek et al., 2017; Navarro-Gonzalez et al., 2015). Because these properties of RPE are known to be related to skin aging, it has been proposed as a potential candidate for skin protection. However, little is known about the effect of RPE on skin aging. Additionally, water and ethanol are considered to be the best extraction solvents because of polarity differences and safety of use (Abarca-Vargas et al., 2016). Thus, samples with different ratios of water and ethanol (0, 10, 30, 50, 70, 90, and 100% ethanol RPE) were prepared via extraction.

The purpose of this study was to investigate the effect of RPE on skin whitening and wrinkle improvement. RPE extracts with different extraction solvent ratios (0, 10, 30, 50, 70, 90 and 100% ethanol/water solvents) were tested to determine the optimal solvent ratio for extraction.

Materials and methods

Reagent

Rosa gallica petals were imported from Turkey through GN Bio (Gyeonggi, Korea). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), Penicillin-

streptomycin-neomycin, and 0.5% trypsin-EDTA were purchased from GIBCO® Invitrogen (Auckland, NZ, USA). Specific antibodies against tyrosinase and β -actin were purchased from Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, CA, USA). Primary antibody of MMP-1 was obtained from R&D systems™. All other chemicals, including alpha-melanocyte stimulating hormone (α -MSH), mushroom tyrosinase, and L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) were purchased from Sigma-Aldrich Co., LLC (St. Louis, MO, USA).

Sample preparation

Rose petals were mixed with 100 mL of 0, 10, 30, 50, 70, 90, and 100% (v/v) EtOH (absolute ethanol). Soluble components were then extracted in 80 °C water using a reflux condenser. The extract was filtered through filter paper number 2 (Whatman, Maidstone, England), vacuum-concentrated and subsequently dissolved in distilled water and freeze-dried, to be used as samples for the functional analysis test.

Cell culture

B16F10 melanoma cells were purchased from the Korean Cell Line Bank (Seoul, Korea). Human dermal fibroblast (HDF) cells were obtained from Dr. Jin Ho Chung (College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea). Both cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (v/v) and 1% (v/v) penicillin under 37 °C, and 5% CO₂ conditions.

Cell viability

Cell viability was measured via MTS [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] assay. Cells were seeded on 96-well plates and grown until confluent. Then, cells were starved with serum-free DMEM overnight and treated with the samples at indicated concentrations for 24 h. After exposure to the samples, 20 μ L of MTS solution was allowed to react with the cells for 1 h. Absorbance was measured using a microplate reader (Sunrise-Basic Tecan, Tecan Austria GmbH Grödig, Austria) at 570 nm.

In vitro mushroom tyrosinase activity

The in vitro tyrosinase assay was conducted according to methods described previously (Kim et al., 2015). In brief, 40 μ L of each sample was added to the assay buffer (20 μ L of 0.1 M potassium phosphate), followed by incubation for 30 min with 20 μ L of mushroom tyrosinase (0.02 mg/mL). Then, 40 μ L of substrate (L-DOPA) was added to each

mixture. The reaction was allowed to proceed at room temperature for 15 min before the formation of dopachrome was analyzed by measuring absorbance at 475 nm using a microplate reader (Infinite[®]2000 PRO, Tecan, Switzerland).

Evaluation of melanin production

The melanin production assay was performed according to previously described-protocol (Friedmann and Gilcrest, 1987; Gordon et al., 1989). B16F10 cells (8×10^3 cells) were seeded on 6-well plates with 2 mL culture media. After 24 h, samples were pretreated with the cells for 1 h, following which α -MSH (100 nM) was exposed to the cells. The cells were collected after 72 h, and melanin production was measured using a microplate reader (Infinite[®]2000 PRO, Tecan, Switzerland) at 495 nm.

Western blot

Protein samples were obtained from cells, using $1 \times$ Cell Lysis Buffer (Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Protein concentration was estimated using a Pierce[™] BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA). Protein samples were loaded on to a 10% SDS-polyacrylamide gel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) for electrophoresis and then transferred to an Immobilon P membrane (Millipore, Billerica, MA, USA). The PVDF membrane was blocked with 5% fat-free milk for 1 h and the membrane was treated with specific primary antibody overnight at 4 °C. Protein bands were detected using a chemiluminescence detection kit (GE Healthcare, NJ, USA) after hybridization with an HRP-conjugated secondary antibody (Cell Signaling).

DPPH radical scavenging assay

DPPH radical scavenging activity was measured as follows; 0.2 mL each of extract was added to 3 mL of γ -ethanol, to which 0.8 mL of 400 μ M DPPH dissolved in ethanol was added. This mixture was vortexed for 10 s and maintained at room temperature for 10 min, and absorbance was measured at 517 nm (Wang et al., 1999). DPPH radical scavenging activity was expressed as a percentage of the absorbance of the group to which no DPPH was added. All experiments were replicated a minimum of 3 times.

Total flavonoid content

Total flavonoid content in the extracts was measured using the aluminum chloride method (Jia et al., 1999) which was modified using catechin. To 100 μ L of the extract,

500 μ L of distilled water and 30 μ L NaNO₂ were added, following which 60 μ L AlCl₃ was added 6 min later. After 5 min, 200 μ L of 1 M NaOH was added and the brought up to 1 mL with distilled water. The solution was mixed well and centrifuged at 15,928g, at 4 °C, for 5 min. After centrifugation, 200 μ L of the supernatant was obtained and absorbance was measured using a microplate reader (Infinite[®]2000 PRO; Tecan, Switzerland) at 510 nm.

Statistical analysis

Experiments were conducted in triplicate, and data are expressed as the mean \pm standard deviation (SD). Student's *t* tests were used for single statistical comparisons. Statistical significance was set at (#) = $p < 0.05$ and (##) = $p < 0.001$ for comparison with the untreated control; (*) = $p < 0.05$ and (**) = $p < 0.001$ for comparison with the α -MSH-treated group.

Results and discussion

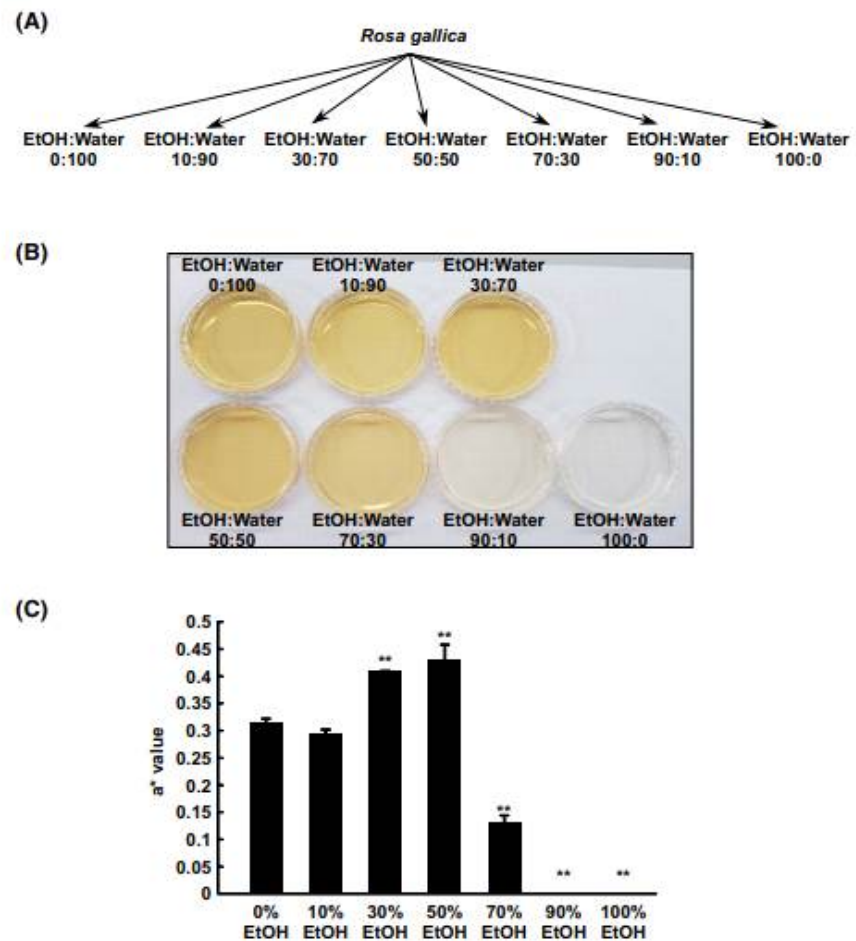
Extraction of the petals of *Rosa gallica* according to different solvent ratio

Previously RPE was produced via aqueous 70% (v/v) EtOH extraction (Lee et al., 2018). However, if RPE is intended for purposes of industrial application, extraction conditions must be optimal. In order to investigate optimal extraction conditions of RPE for anti-skin aging activity, various solvents were used for RPE (Fig. 1A). Interestingly, the color of each extract varied, based on visual observation (Fig. 1B). The color of EtOH extracts, 90% or higher, was clear, whereas 50% (v/v) EtOH extract appeared to be the most reddish. The result of colorimeter revealed an *a** value for redness for 50% EtOH, which showed the highest level among the extracts (Fig. 1C).

Effect of the extracts of rose petal on skin whitening activity

Since tyrosinase is a key enzyme involved in hyperpigmentation via melanin production (Chang, 2009), we analyzed the inhibitory effect of the extracts on tyrosinase activity in vitro. Most extracts, except 100% EtOH, revealed dose-dependent regression on in vitro tyrosinase activity (Fig. 2A). Furthermore, 30% and 50% EtOH extracts showed stronger inhibitory effects than ascorbic acid. Ascorbic acid was described as a skin whitening agents in previous literature (Chang, 2009). To evaluate skin whitening activity of the extracts in a cellular model, melanin production was assessed in B16F10 melanoma cells following treatment with each extract. A 100 nM

Fig. 1 Extraction of the petals of *Rosa gallica*. Sample preparation of EtOH extracts from *Rosa gallica* petals (A). Images of various EtOH extracts from *Rosa gallica* petals (B). The a^* value measurement of color-difference meter (C). Data represent 3 independent experiments, which gave similar results. The (***) sign indicates a significant ($p < 0.001$) decrease

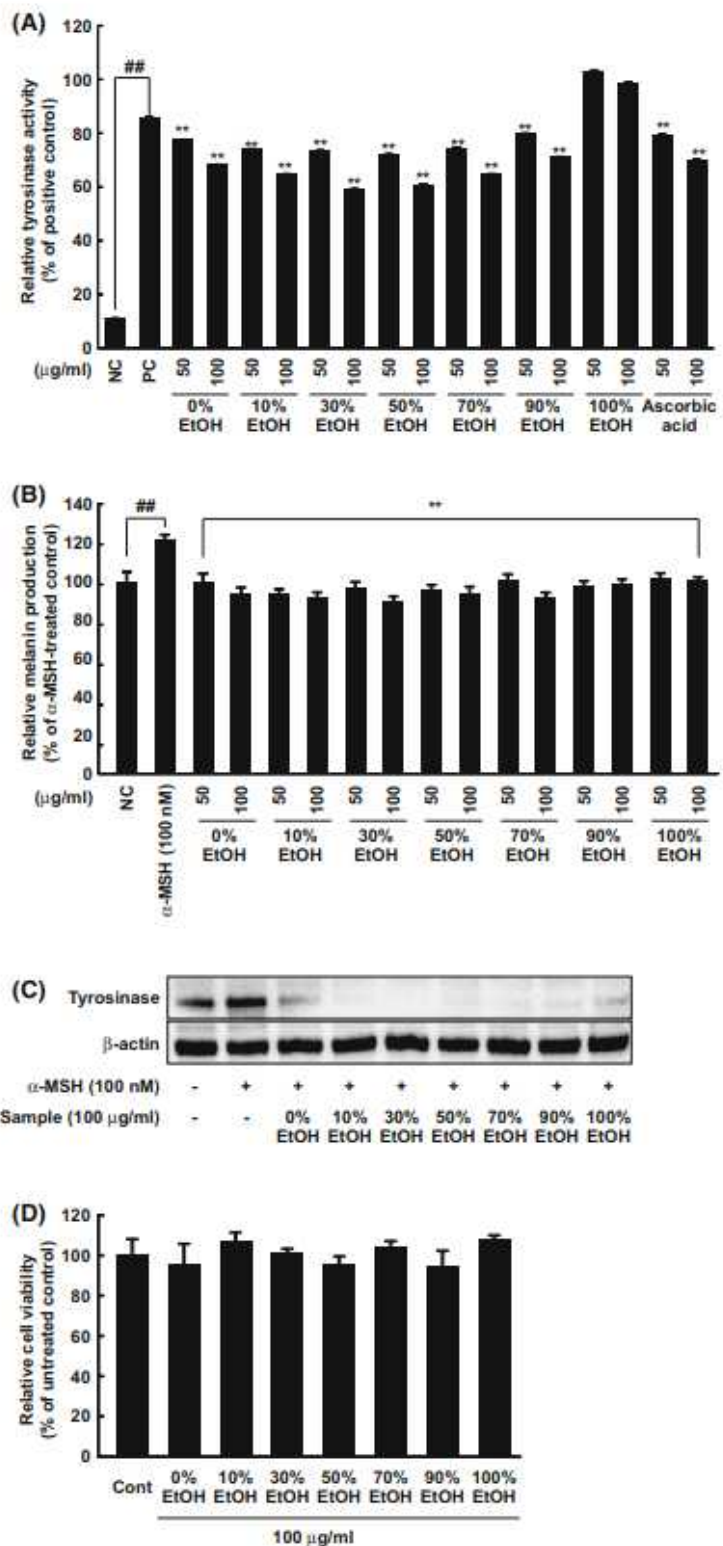


portion of α -MSH increased melanin production and every extract of rose petal inhibited melanin production (Fig. 2B). Furthermore, 30% and 50% EtOH extracts showed the strongest inhibitory effect on tyrosinase activity and melanin production in vitro, respectively. Under similar conditions, the effect of each of the extracts on tyrosinase expression was examined. Also, α -MSH increased tyrosinase expression and 100 μ g/mL each of the extracts attenuated tyrosinase expression (Fig. 2C). Treatment with extracts at 100 μ g/mL did not cause cell cytotoxicity in B16F10 melanoma cells (Fig. 2D). Thus, inhibition of melanin by RPE is attributed to the dual function of tyrosinase activity and expression the absence of cytotoxicity.

Effect of the RPE on solar UV (sUV)-induced MMP-1 expression in human dermal fibroblasts

Inhibitors of MMP-1 may be regarded as anti-wrinkle agents (Park et al., 2018; Yang et al., 2018). This is because MMP-1 is a key enzyme, responsible for wrinkle formation during the skin aging process (Pittayapruet et al., 2016). To determine anti-wrinkle effects of RPE, MMP-1 expression was evaluated in human dermal fibroblasts using Western blot analysis. MMP-1 expression was dramatically increased by sUV irradiation (30 kJ/cm^2), and all extracts inhibited sUV-induced MMP-1 expression (Fig. 3A). Whereas 100% EtOH extracts exhibited mild effect, 50% EtOH extracts displayed the strongest suppressing activity on sUV-induced MMP-1 expression. Next, we investigated MMP-1 production levels in cultured media, because MMP-1 is a secreted protein for collagen degradation. Similar to that shown in Fig. 3A, MMP-1

Fig. 2 Anti-melanogenic activity of EtOH extracts of *Rosa gallica* petals via suppression of tyrosinase expression/activity. The effect of the extracts on tyrosinase activity was evaluated using mushroom tyrosinase enzyme (NC, negative control; PC, positive control) (A). The effect of the extracts on melanin production was measured. Detailed procedure was described in Materials and methods (B). Tyrosinase expression was measured following treatment of the extracts. Western blot analysis was used to reveal the effect of the extracts on the tyrosinase expression (C). Cytotoxicity of the extracts in B16F10 melanoma cells was estimated. MTS assay was performed to verify non-cytotoxic concentration of the extracts as described in Materials and methods (Cont, untreated control) (D). Data represent 3 independent experiments, which gave similar results. The (##) sign indicates a significant ($p < 0.001$) increase, and (**) indicates a significant ($p < 0.001$) decrease



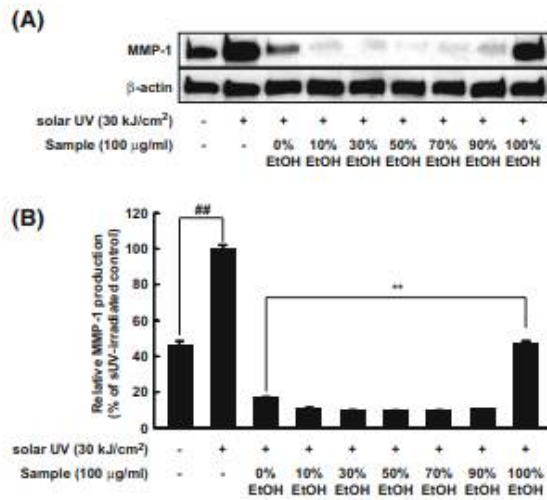


Fig. 3 Inhibitory effect of EtOH extracts of *Rosa gallica* petals on sUV-induced MMP-1 expression. Each extract was allowed to react with the cells for 1 h and sUV (solar UV) was irradiated (NC, negative control). After 48 h of sUV exposure, the media and cell lysate were collected. Specific primary antibody against MMP-1 was used for MMP-1 protein detection in cell lysate (A). Detailed procedure was represented in Materials and methods. The MMP-1 production level in cultured media was evaluated by using ELISA kit for detection active MMP-1 (B). Data represent 3 independent experiments, which gave similar results. The (##) sign indicates a significant ($p < 0.001$) increase, and (**) indicates a significant ($p < 0.001$) decrease

level in cultured media was suppressed by each extract (Fig. 3B). In particular, 50% EtOH extract showed the highest suppressive activity on sUV-induced MMP-1 expression, and 100% EtOH extract exhibited a mild effect compared to that by other extracts.

Anti-oxidative activity and total flavonoid contents of the rose petal extracts

Antioxidants that inhibit ROS production are known to reduce hyperpigmentation or prevent UV-induced melanin production (Yamakoshi et al., 2003). DPPH radical scavenging activity was determined to compare the antioxidant activity of the extracts. Interestingly, every extract showed drastic, dose-dependent, radical scavenging activity. The 500 μg/mL samples showed anti-oxidative activity similar

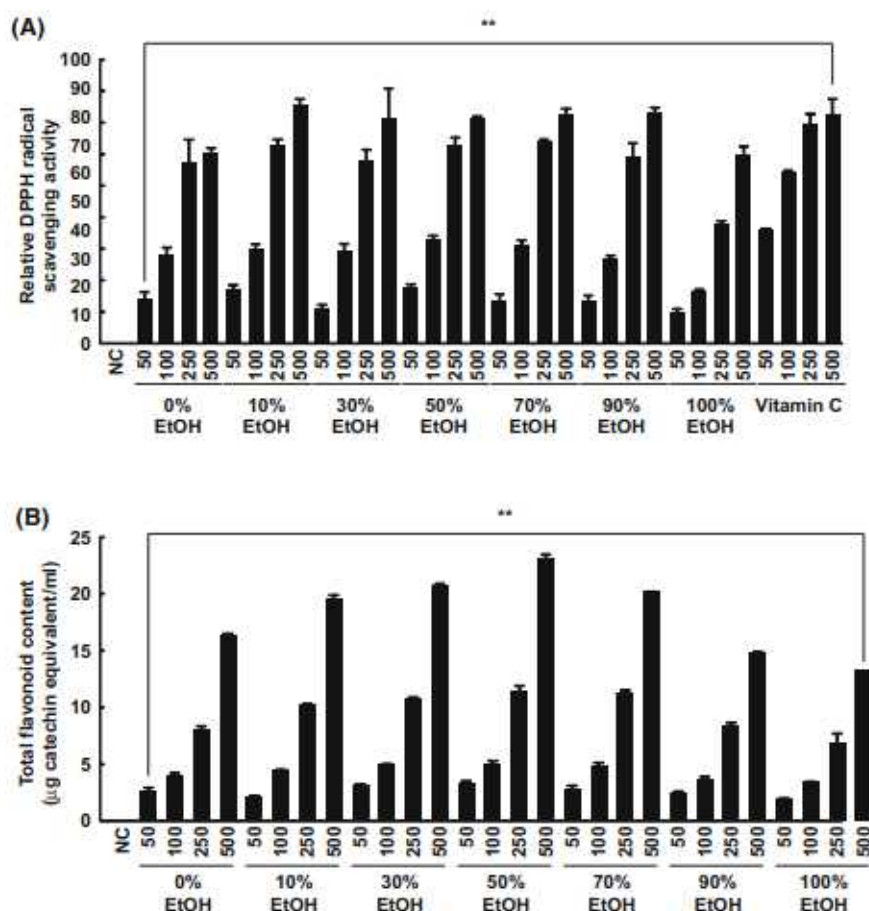
to vitamin C. Among the extracts, the 50% EtOH extract showed the strongest anti-oxidative effect at the lowest concentration (50 μg/mL) (Fig. 4A).

There are many different compounds such as terpenes, flavonoids, and anthocyanins in rose petals (Knapp et al., 1998; Kumar et al., 2008; Oka et al., 1998; Schieber et al., 2005). These chemicals represent many biological activities (Kumar et al., 2009). In particular, flavonoids have been described as the main group of phenolic compounds responsible for biological properties of antioxidant and anti-inflammatory effects (Du et al., 2016; Jung et al., 2015). Next, the total flavonoid content of each extract was measured. Large amounts of flavonoids were present in each extract (Fig. 4B). The results indicated that the 50% EtOH extract contained the highest flavonoid content among the samples. This trend was similar to that observed in the anti-oxidative assay result.

The dark red color of the 50% EtOH solvent of rose petals is assumed to be related to anthocyanin, a flavonoid (Fig. 1). This result substantiates the findings of a previous study (Oancea et al., 2012). According to the previous study, anthocyanins in blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) were best-extracted in 50% EtOH solvent than in any other solvent, including 60%, 70% and 80% EtOH (Oancea et al., 2012). Naturally, anthocyanins occur as glycosides. Thus we surmised that the polarity of the anthocyanins may have been accorded by the 50% EtOH solvent. The strong anti-oxidative activity of anthocyanins is well demonstrated in various model systems (Kalt et al., 2003; Rice-Evans et al., 1995). Because 50% EtOH rose petal extract had the highest anthocyanin content, the anti-oxidative activity of 50% EtOH extract was the strongest among the 50 μg/mL extracts.

In summary, our study demonstrated the potential of RPE as anti-skin aging ingredient. For purpose of industrial application, optimization of extraction conditions is essential in order to reduce production costs. The current study investigated solvents most suitable for Rose petal extraction, with reference to anti-skin aging activity. The flavonoids in rose petals were extracted best by the 50% EtOH solvent. This extract showed the strongest anti-oxidative activity as well as anti-skin aging activity such as skin whitening and wrinkle suppression activity. Clinical studies and stability analyses may be required to test its suitability for industrial application.

Fig. 4 Anti-oxidative activity and total flavonoid content in the extracts from the petals of *Rosa gallica*. The anti-oxidative activity of the extracts was verified by DPPH radical scavenging assay (NC, negative control) (A). Vitamin C was used as the positive control. Total flavonoid content in the extracts was measured as described in “Materials and methods” (B). Data are representative of three independent experiments. (**) denote statistical significance ($p < 0.001$) as compared with controls



Acknowledgements This research was supported by Main Research Program (E0183112-02) of the Korea Research Food Institute (KFRI) funded by the Ministry of Science, ICT & Future Planning and by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through High Value-added Food Technology Development Program, funded by the Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (118060-03-2-HD020).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest There is no conflict of interest among the authors.

References

- Abarca-Vargas R, Malacara CFP, Petricevich VL. Characterization of chemical compounds with antioxidant and cytotoxic activities in *Bougainvillea x butiana* Holtum and Standl. (var. Rose) extracts. *Antioxidants* 5: 45 (2016)
- Akhtar MN, Sakeh NM, Zareen S, Gul S, Lo KM, Ul-Haq Z, Shah SAA, Ahmad S. Design and synthesis of chalcone derivatives as potent tyrosinase inhibitors and their structural activity relationship. *J. Mol. Struct.* 1085: 97–103 (2015)
- Bitis L, Sen A, Ozsoy N, Birteksoz-Tan S, Kultur S, Melikoglu G. Flavonoids and biological activities of various extracts from *Rosa sempervirens* leaves. *Biotechnol. Equip.* 31: 299–303 (2017)
- Chang, TS. An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* 10: 2440–2475 (2009)
- Couteau C, Coiffard L. Overview of skin whitening agents: drugs and cosmetic products. *Cosmetics* 3: 27 (2016)
- D’Mello SA, Finlay GJ, Baguley BC, Askarian-Amiri ME. Signaling pathways in melanogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 17: 7 (2016)
- Du L, Sun G, Zhang X, Liu Y. Comparisons and correlations of phenolic profiles and anti-oxidant activities of seventeen varieties of pineapple. *Food Sci. Biotechnol.* 25: 445–451 (2016)
- Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Characteristics of the aging skin. *Adv. Wound Care* 2: 5–10 (2013)
- Friedmann PS, Gilchrist BA. Ultraviolet radiation directly induces pigment production by cultured human melanocytes. *J. Cell Physiol.* 133: 88–94 (1987)
- Gordon PR, Mansur CP, Gilchrist BA. Regulation of human melanocyte growth, dendricity, and melanization by keratinocyte derived factors. *J. Invest. Dermatol.* 92: 565–572 (1989)
- Jia Z, Tang MC, Wu JM. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64: 555–559 (1999)

- Jung H, Lee HJ, Cho H, Lee K, Kwak HK, Hwang KT. Antocyanins in Rubus fruits and antioxidant and anti-inflammatory activities in RAW 264.7 cells. *Food Sci. Biotechnol.* 24: 187–1886 (2015)
- Kalt W, Lawand C, Ryan DAJ, McDonald JE, Donner H, Forney CF. Oxygen radical absorbing capacity, anthocyanin and phenolic content of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) during ripening and storage. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 128: 917–923 (2003)
- Kim SR, Jung YR, An HJ, Kim DH, Jang EJ, Choi YJ, Moon KM, Park MH, Park CH, Chung KW, Bae HR, Choi YW, Kim ND, Chung HY. Anti-wrinkle and anti-inflammatory effects of active garlic components and the inhibition of MMPs via NF- κ B signalling. *PLoS ONE* 8: e73877 (2013)
- Kim JH, Baek EJ, Lee EJ, Yeom MH, Park JS, Lee KW, Kang NJ. Ginsenoside F1 attenuates hyperpigmentation in B16F10 melanoma cells by inducing dendrite retraction and activating Rho signalling. *Exp. Dermatol.* 24: 150–152 (2015)
- Knapp H, Straubinger M, Fornari S, Oka N, Watanabe N, Winterhalter P. (S)-3,7-dimethyl-5-octene-1,7-diol and related oxygenated monoterpenoids from petals of *Rosa damascena* Mill. *J. Agri. Food Chem.* 46: 1966–1970 (1998)
- Kumar N, Bhandari P, Singh B, Gupta AP, Kaul VK. Reversed phase-HPLC for rapid determination of polyphenols in flowers of rose species. *J. Sep. Sci.* 31: 262–267 (2008)
- Kumar N, Bhandari P, Singh B, Bari SS. Antioxidant activity and ultra-performance LC-electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for phenolics-based fingerprinting of Rose species: *Rosa damascena*, *Rosa bourboniana* and *Rosa brunonii*. *Food Chem. Toxicol.* 47: 361–367 (2009)
- Laga AC, Murphy GF. The translational basis of human cutaneous photoaging: on models, methods, and meaning. *Am. J. Pathol.* 174: 357–360 (2009)
- Lee MH, Nam TG, Lee I, Shin EJ, Han AR, Lee P, Lee SY, Lim TG. Skin anti-inflammatory activity of rose petal extract (*Rosa gallica*) through reduction of MAPK signaling pathway. *Food Sci. Nutr.* 6: 2560–2567 (2018)
- Masek A, Latos M, Chrzescijanska E, Zaborski M. Antioxidant properties of rose extract (*Rosa villosa* L.) measured using electrochemical and UV/Vis spectrophotometric methods. *Int. J. Electrochem. Sci.* 12: 10994–11005 (2017)
- Mukherjee S, Date A, Patravale V, Korting HC, Roeder A, Weindl G. Retinoids in the treatment of skin aging: an overview of clinical efficacy and safety. *Clin. Interv. Aging* 1: 327–348 (2006)
- Navarro-Gonzalez I, Gonzalez-Barrio R, Garcia-Valverde V, Bautista-Ortin AB, Periago MJ. Nutritional composition and antioxidant capacity in edible flowers: characterisation of phenolic compounds by HPLC-DAD-ESI/MSn. *Int. J. Mol. Sci.* 16: 805–822 (2015)
- Oancea S, Stoia M, Coman D. Effects of extraction conditions on bioactive anthocyanin content of *Vaccinium corymbosum* in the perspective of food applications. *Procedia Eng.* 42: 489–495 (2012)
- Oka N, Ikegami A, Ohki M, Sakata K, Yagi A, Watanabe N. Citronellyl disaccharide glycoside as an aroma precursor from rose flowers. *Phytochemistry* 47: 1527–1529 (1998)
- Pandel R, Poljsak B, Godic A, Dahmane R. Skin photoaging and the role of antioxidants in its prevention. *ISRN Dermatol.* 2013: 7 (2013)
- Park EK, Lee HJ, Lee H, Kim JH, Hwang J, Koo JI, Kim SH. The Anti-wrinkle mechanism of melatonin in UVB treated HaCaT keratinocytes and hairless mice via inhibition of ROS and sonic hedgehog mediated inflammatory proteins. *Int. J. Mol. Sci.* 19: 6 (2018)
- Pittayapruek P, Meephanan J, Prapapan O, Komine M, Ohtsuki M. Role of matrix metalloproteinases in photoaging and photocarcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016)
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic. Res.* 22: 375–383 (1995)
- Schieber A, Mihalev K, Berardini N, Molloy P, Carle R. Flavonol glycosides from distilled petals of *Rosa damascena* Mill. *Z. Naturforsch. C.* 60: 379–384 (2005)
- Seo SY, Sharma VK, Sharma N. Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J. Agric. Food Chem.* 51: 2837–2853 (2003)
- Wang MF, Jin Y, Ho CT. Evaluation of resveratrol derivatives as potential antioxidants and identification of a reaction product of resveratrol and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3974–3977 (1999)
- Wlaschek M, Tancheva-Poor I, Naderi L, Ma W, Schneider LA, Razi-Wolf Z, Schuller J, Scharffetter-Kochanek K. Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J. Photochem. Photobiol. B.* 63: 41–51 (2001)
- Yamakoshi J, Otsuka F, Sano A, Tokutake S, Saito M, Kikuchi M, Kubota Y. Lightening effect on ultraviolet-induced pigmentation of guinea pig skin by oral administration of a proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Pigment Cell Res.* 16: 629–638 (2003)
- Yang JE, Ngo HTT, Hwang E, Seo SA, Park SW, Yi TH. Dietary enzyme-treated *Hibiscus syriacus* L. protects skin against chronic UVB-induced photoaging via enhancement of skin hydration and collagen synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 662: 190–200 (2018)

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

고부가가치식품기술개발사업 디자인완료보고서

과제명	초음파 활용 실크웹타이드 제조기술 개발			
수요기업	업체명	농업회사법인 에스에스바이오팜 주식회사	대 표 자	김○희
	주 소	충청남도 천안시 서북구 입장면 홍천당곡길 56-3		
공급기관	업체명	이○○지	대 표 자	박○래
	주 소	경기도 군포시 ○○로		

1. 세부 내용

제품설명	<p>· 고부가가치식품기술개발사업 ‘초음파 활용 실크웹타이드 제조기술 개발’ 과제를 통해 개발한 실크웹타이드 원료를 사용하여 시작품(시제품) 제작</p> <p>· 제품은 실크젤리, (SS)에스에스스킨솔루션, (SS)에스에스혈행솔루션 세가지 제품이다.</p> <p>① 실크젤리는 초음파를 이용한 실크웹타이드와 석류농축액 등을 함유하는 일반식품으로 소비자들이 접근하기 쉽고 간단하게 섭취할 수 있는 젤리 제형으로 만들었다.</p> <p>② (SS)에스에스스킨솔루션은 초음파를 이용한 실크웹타이드와 피부보습에 도움을 주며, 결합조직 형성과 기능유지, 철의 흡수, 유해산소로부터 세포를 보호하는데 필요한 기능성 원료 2가지(히알루론산, 비타민C)를 함유하는 건강기능식품이다.</p> <p>③ (SS)에스에스혈행솔루션은 초음파를 이용한 실크웹타이드와 기능성 원료 7가지(은행잎추출물, 나이아신, 아연, 판토텐산, 비타민B6, 비타민B2, 비타민B1)를 함유하는 건강기능식품으로 혈행 개선, 기억력 개선에 도움을 줄 수 있으며 정상적인 면역기능, 세포분열에 필요, 지방, 탄수화물, 단백질 대사와 에너지 생성에 필요, 혈액의 호모시스테인 수준을 정상으</p>
-------------	--

	<p>로 유지하는데 필요한 성분을 함유하고 있다.</p>
<p>제품사진</p>	<p>· 소포장 단위로 소비자가 쉽게 소지할 수 있도록 제작하며, 제품의 특성과 소비자층을 고려한 디자인으로 기획하여 제품의 가치를 향상시킴</p> <p>[실크젤리 Packaging]</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 대박스(1개월 분) : 상쪽과 하쪽이 분리되어 완전히 열고 닫을 수 있는 패키지 박스 컨셉으로 정제형태의 제품을 소박스 3개가 들어갈 수 있는 크기로 제작 ✓ 소박스(10일 분) : 소박스의 상단부분을 열고 닫을 수 있는 패키지로 설정하며, 젤리형태로 15g씩 스틱 포장하여 10개씩 소박스에 넣는 방식으로 포장 ✓ 1일 1회, 1회 1포 먹는 것으로 설정 <p>[(SS)에스에스스킨솔루션 Packaging]</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 단박스(30일 분) : 단박스의 상단부분을 열고 닫을 수 있는 패키지로 설정하며, 1병씩 단박스에 넣는 방식으로 포장 ✓ 병 : 이지캡으로 되어있어 여닫기 편한 병으로 설정하며, 1병에 90정씩 넣는 방식으로 포장. <p>[(SS)에스에스혈솔루션 Packaging]</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 단박스(60일 분) : 단박스의 상단부분을 열고 닫을 수 있는 패키지로 설정하며, 1병씩 단박스에 넣는 방식으로 포장 ✓ 병 : 이지캡으로 되어있어 여닫기 편한 병으로 설정하며, 1병에 120정씩 넣는 방식으로 포장.



[그림1] '실크젤리' 디자인 기획안



[그림2] '(SS)에스에스스킨솔루션' 디자인 기획안



[그림3] '(SS)에스에스혈행솔루션' 디자인 기획안

· ‘실크젤리’ 제품의 포장 디자인 (대박스-상쪽+하쪽, 소박스, 스틱포), ‘(SS)에스에스스킨솔루션(단박스, 병라벨), (SS)에스에스혈행솔루션(단박스, 병라벨)은 이패키지에서 디자인 기획 및 제작 후 에스에스바이오팜(주)에서 검토하여 최종적으로 디자인 선정

[실크젤리]

- 대박스(상쪽) : 디자인 컨셉 설정을 위한 회의 및 시안제작 컨펌 후 최종 디자인 선정



-> 피부 건강 관리를 타깃으로 한 것을 감안하여 실크의 고급스러운 색감으로 디자인



->피부 건강 관리를 타깃으로 한 것을 감안하여 실크의 고급스러운 색감으로 디자인



-> 제품명이 실크젤리로 변경되면서 남녀노소 모두가 접근하기 쉽고 실크펩타이드를 강조할 수 있도록 사진을 넣어 심플하게 디자인

[그림4] '실크젤리' 제품의 대박스 초안



[그림5] '실크젤리' 제품의 포장디자인(최종본)

[(SS)에스에스스킨솔루션]

- 단박스 : 디자인 컨셉 설정을 위한 회의 및 시안제작 컨펌 후 최종 디자인 선정



-> 여성의 피부 건강 관리를 타깃으로 한 것을 감안하여 화려한 색감으로 디자인



-> 실크펩타이드를 강조하여 디자인



-> 실크펩타이드를 강조하면서 피부의 보습 등의 기능을 시각적으로 표현한 디자인

[그림6] '실크젤리' 제품의 대박스 초안



[그림기] '(SS)에스에스스킨솔루션' 제품의 포장디자인(최종본)

[(SS)에스에스혈행솔루션]

- 단박스 : 디자인 컨셉 설정을 위한 회의 및 시안제작 컨펌 후 최종 디자인 선정



-> 혈행개선의 기능성을 시각적으로 표현한 디자인



-> 은행잎추출물의 혈행개선의 기능성을 시각적으로 표현하여 강조함과 동시에 뒤쪽 배경에 누에고치를 넣어 실크펩타이드가 함유되어 있음을 표현한 디자인



-> 실크펩타이드를 강조하면서 혈행개선 기능을 색감으로 표현한 디자인

[그림8] ‘(SS)에스에스혈행솔루션’ 제품의 대박스 초안



[그림9] ‘(SS)에스에스혈행솔루션’ 제품의 포장디자인(최종본)

[부록6] 특허출원

① 피부염증 개선 활성이 우수한 누에고치 유래 파파인 효소 분해물 및 이의 용도

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2019.05.31
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 창조번호(78488)
 출원번호 10-2019-0064606 (접수번호 1-1-2019-0562396-49)
 출원인명칭 한국식품연구원(3-1998-007755-3)
 대리인성명 특허법인 남앤남(9-2012-100182-6)
 발명자성명 송경모 염수진 이남혁 임태규
 발명의명칭 피부염증 개선 활성이 우수한 누에고치 유래 파파인 효소 분해물 및 이의 용도

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 영세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허-실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허-실용신안은 12개월, 상표-디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

② 혈관 이완능 및 항염 활성이 우수한 누에고치 유래 브로멜라인 효소분해물 및 이의 용도

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2019.05.31
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(78489)
출원번호 10-2019-0064628 (접수번호 1-1-2019-0562582-35)
출원인명칭 한국식품연구원(3-1998-007755-3)
대리인성명 특허법인 남앤남(9-2012-100182-6)
발명자성명 송경모 엄수진 이남혁 임태규
발명의명칭 혈관 이완능 및 항염 활성이 우수한 누에고치 유래 브로멜라인 효소 분해물 및 이의 용도

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받하고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

[부록7] 특허등록

① 피부염증 개선 활성이 우수한 누에고치 유래 파파인 효소 분해물 및 이의 용도



② 혈관 이완능 및 항염 활성이 우수한 누에고치 유래 브로멜라인 효소분해물 및 이의 용도



[부록8] 기술실시

[별지 13의2]

기술실시보고서						
(단위 : 원)						
연구개발과제 현황	사업명	고부가가치식품기술개발사업		연구과제번호	118060-03	
	연구과제명	초음파 활용 심크렙타이드 제조기술 개발				
	연구기관명	에스에스바이오팜	연구책임자	기업명	한국식품연구원	
	연구협약일	2018.04.30	연구기간	2018.04.30~2020.12.31(33개월)		
	연구개발비	정부출연금	기업부담금	기타 ()	계	
298,000,000원		186,251,000원	-	484,251,000원		
기술실시계약 및 성과활용 현황	계약(활용)명	초음파 활용 심크렙타이드 제조기술 개발				
	계약(활용)일	2021.01.01	실시(활용)기간	2021.01.01. - 2028.12.31		
	지재권 종류	노하우	실시권 유형	직접 실시		
	* 지재권이 특허(출원, 등록) 인 경우	명 칭	-			
		번호	-		일자	-
	실시(활용)기관	기관명	에스에스바이오팜(주)		기관유형	중소기업
		주 소	충남 천안시 서북구 입장면 홍천당곡길 56-3		대 표 자	
사업자번호				전화번호		
부내담당자				e-mail		
기술로산정내역						
기 술 료	정액기술료		감상기술료		기타 조건	
	정수(납부)예정일	정수(납부)금액	확수기본료	정수(납부)예정일		정수(납부)금액
	2021.01.29	4,172,000원	매출에 따른 기술료	정수(납부)시작일		결산일
				-		-
	계	4,172,000원		정수(납부)종료일		정수율
		-	-			
기타특기사항						
<p>국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제22조 제2항에 따라 위와 같이 기술실시계약이 체결되었음을 보고합니다.</p> <p>붙임 1. 연구개발과제협약서 사본 1부(직접실시시).</p> <p style="text-align: right;">2020년 12월 22일</p> <p style="text-align: right;">주관연구기관 에스에스바이오팜(주)의 대표이사인</p> <p style="text-align: right;">농림식품기술기획평가원장 귀하</p>						



〈별첨 1〉 융합기술 실시 경우 (중소/중견/대기업용)

실시기업 의견서

사업명: 중소/중견/대기업용 융합기술개발사업 연구과제번호: 119055-03		지원금: 119,055,000원	
		연구기관명: 중소/중견/대기업용 융합기술개발사업	
연구개발과제명: 스마트스마트이오팜 (주)	연구지원명: 연구개발비	연구기간: 2018.04.30 - 2018.04.30	연구책임자: 김대기
	연구지원내역: 연구개발비	지원부담금: 201,000,000원	지원금: 119,055,000원
	연구개발비: 494,251,000원	중소기업: 201,000,000원	연구책임자: 김대기

사업명: 중소/중견/대기업용 융합기술개발사업 연구과제번호: 119055-03	연구기관명: 연구개발비	연구기간: 2018.04.30 - 2018.04.30	연구책임자: 김대기
	연구지원내역: 연구개발비	지원부담금: 201,000,000원	지원금: 119,055,000원
	연구개발비: 494,251,000원	중소기업: 201,000,000원	연구책임자: 김대기
	연구개발비: 494,251,000원	중소기업: 201,000,000원	연구책임자: 김대기

사업명: 중소/중견/대기업용 융합기술개발사업 연구과제번호: 119055-03	연구기관명: 연구개발비	연구기간: 2018.04.30 - 2018.04.30	연구책임자: 김대기
	연구지원내역: 연구개발비	지원부담금: 201,000,000원	지원금: 119,055,000원

기술실시내용
 스마트스마트이오팜 (주)는 스마트스마트이오팜 (주)에 의해, 본 연구과제의 참여기업에 해당하여 중소기업 지원금(201,000,000원)을 지원받게 되며, 연구개발비(119,055,000원)를 지원받게 된다.

지원금
 중소기업: 201,000,000원
 연구개발비: 119,055,000원

기술실시내용
 스마트스마트이오팜 (주)는 스마트스마트이오팜 (주)에 의해, 본 연구과제의 참여기업에 해당하여 중소기업 지원금(201,000,000원)을 지원받게 되며, 연구개발비(119,055,000원)를 지원받게 된다.

농림축산식품부 소관 연구개발사업 운영규정 제35조 제9항에 따라 위와 같이 기술로 감면신청서를 제출합니다.

별첨 1. 연구개발과제 개요 1부
 2. 연구계획서 또는 연구결과보고서 등 1부, 끝.

2020년 12월 16일
 주관연구기관 스마트스마트이오팜(주) 대표 **김대기**
농림축산식품부 융합기술기회평가원장 귀하

신청기업명: 스마트스마트이오팜(주)	대표명: 김대기
사업등록번호: 314-85-20007	과학기술인 등록번호:
기업유형: <input type="checkbox"/> 대기업 <input checked="" type="checkbox"/> 중기업(연예) <input type="checkbox"/> 대기업()	업종: 제조 부문: 식품
창업일시: 2014년 3월	조차 및 인원: 30명
사업장주소: 충청남도 서천군 임정면 송천동 19-3	담당자: 김대기 연락처: 010-5080-2231

지원금: 119,055,000원	연구개발비: 119,055,000원
중소기업: 201,000,000원	연구개발비: 119,055,000원

연구기관명: 연구개발비	연구기간: 2018.04.30 - 2018.04.30	연구책임자: 김대기
연구지원내역: 연구개발비	지원부담금: 201,000,000원	지원금: 119,055,000원
연구개발비: 494,251,000원	중소기업: 201,000,000원	연구책임자: 김대기

기술실시내용
 스마트스마트이오팜 (주)는 스마트스마트이오팜 (주)에 의해, 본 연구과제의 참여기업에 해당하여 중소기업 지원금(201,000,000원)을 지원받게 되며, 연구개발비(119,055,000원)를 지원받게 된다.

지원금
 중소기업: 201,000,000원
 연구개발비: 119,055,000원

기술실시내용
 스마트스마트이오팜 (주)는 스마트스마트이오팜 (주)에 의해, 본 연구과제의 참여기업에 해당하여 중소기업 지원금(201,000,000원)을 지원받게 되며, 연구개발비(119,055,000원)를 지원받게 된다.

농림축산식품부 소관 연구개발사업 운영규정 제35조 제9항에 따라 위와 같이 기술로 감면신청서를 제출합니다.

별첨 1. 사업자동료금 서부 2부
 2. 중소기업임용 증명할 수 있는 서류 1부, 끝.

2020년 12월 16일
 주관연구기관 스마트스마트이오팜(주) 대표 **김대기**
주관연구기관장 귀하



농림식품기술기획평가원



수신자 (농)메소메소바이오모빌(주) 대표이사

(장유)

제목 : 고부가가치식약품기술개발사업 기술료 결정 승인 알림(우편영구복합과 마감부)

1. 농림축산식품 연구개발사업 운영규정 제85조(기술료의 산수) 및 88조 제 2(2012.12.16) (2020.12.16.)의 규정을 준수합니다.
2. 귀 기관의 기술료 결정 금액 신청을 다음과 같이 승인하나 원시기업에서는 **2021.01.29.** [금]까지 기술료를 납입하고 기술서비스보고서를 제출해 주시기 바랍니다.

기. 승인 내역

사업명 (연구연도)	주요명 기술이전연구 / 식약개발사업	주요연구기관 원시기업	정액승인금액 합산(기술료만)	최종 기술료
고부가가치 식품기술개발 사업 11930-08	우유로 우유를 응고시킨 유제품 제조기술 개발	원시기업 원시기업	298,000,000원	4,172,000원 (최대 한도 상소기업 80% 한도 정산한 30% 추가 승인)

1. 본과가 정액승인금액을 승인
 2. 정부출연연구 및 연구비 수납에서 정액승인 금액으로 확정되는 정부출연연구비

나. 정부출연연구비 승인 금액 계좌: 신한은행 5921459223315

붙임 기술서비스보고서 1부, 1점.

농림식품기술기획평가원



※ 우편보내는 경우 **기출시** **일부 취조**

첨과자

서울 : 서울관인길-992 (02) 2121-1111 관수
 부산 : (052) 250-1111 나주시 교육길-250 (061) 250-1111 / <http://www.nifds.go.kr>
 전화 : 061-568-0764 관수 : 061-568-0764 / handbook@nifds.go.kr / handbook@nifds.go.kr
 / handbook@nifds.go.kr / handbook@nifds.go.kr

[부록9] 기타성과(수상)



충청남도기업인대상 창업대상



무역의날표창+백만불수출의탑



한국산학연합회장상

[부록11] 실크젤리 관능검사 보고서

- 실크젤리 관능검사 보고서

Sensory Evaluation Results

검사 일자 : 20. 12. 11

최종 수정 일자 : 20. 12. 14

최종 확인 : 에스에스바이오팜 (인)



I . Sensory Evaluation	1
Sensory Evaluation 정의	1
Sensory Evaluation 종류	1
Sensory Evaluation 요인 및 기법	2
Sensory Evaluation Data	3
II . Sensory Evaluation process and results	4
조사 개요	4
항목별 결과	5
III . 제품의 개선방안	14
개선 방안 및 소견	14

I . Sensory Evaluation

1) Sensory Evaluation 정의

- Sensory Evaluation 란, 감각평가(관능검사)의 의미를 가지고 있다. 미국 IFT (Institute of Technologists)에서는 관능검사란 사람이 측정기구가 되어 물질의 특성을 평가하는 방법으로 시각, 후각, 미각, 촉각 및 청각으로 감지되는 물질의 특성을 측정, 분석 및 해석하는 과학의 한 분야로 정의하고 있다.

한가지 주의할 것은 사람이 측정기구가 되었다고 해서 관능검사의 결과값을 소수점 몇자리의 질량까지도 재현성있게 측정해주는 정밀저울과 같은 객관적 계측량처럼 생각해서는 안된다는 것이다. 물론 일정 수준의 훈련과정을 거친 패널 10명이 어떤 식품의 단맛 강도를 점수로 평가 한다면 일반 소비자 10명이 단맛 강도 평가 점수에 비해서는 상당히 정밀도가 높은 결과를 얻을 수는 있겠지만 근본적으로 사람이 기계일 수는 없다.

관능검사의 정의를 다시 한 번 정리한다면 인간의 인식기관을 통해 얻어지는 물질 특성에 대한 객관적 또는 주관적 반응을 측정하고 이를 분석, 해석하고자 하는 과학으로 정신물리학, 가정학, 제품개발, 통계학 및 마케팅의 복합적인 학문 영역이다.

2) Sensory Evaluation 종류

- Sensory Evaluation는 검사목적에 따라 크게 차이식별검사와 묘사분석, 소비자(기호/선호) 검사 그리고 관능품질 관리검사로 분류할 수 있으며 차이식별 검사의 경우 세부적으로 종합적 차이식별검사와 특성차이식별 검사로 나눌 수 있다.
- 통계적인 자료분석은 검사를 통해 데이터를 얻은 상태에서 각종 의사결정에 필요한 통계량 지표를 계산해내는 과정이다.
- 그러므로 목적에 적합한 검사방법을 선택하고 올바른 운영 절차(랜덤화, 시료관리, 판단의 독립성 보장)를 준수했는지가 신뢰할 수 있는 통계분석 자료의 출발점이다.
- 관능검사의 진행방법은 목적에 따라 수가 다양하다. 대체로 검사하고자 하는 시료들을 한자리에서 모두 평가하는 식의 진행으로 제조방법, 재료, 포장, 저장, 맛, 냄새, 이물감 등의 관한 질문에 답하여 대조 및 통계를 내어 결과를 해석한다.

3) Sensory Evaluation 요인 및 기법

3-1) Sensory Evaluation 요인

- 반응 값에 영향을 줄 수 있는 요인은 무수히 많다. 이런 요인들 중 가장 중요하다고 경험적으로 판단되는 요인들을 몇 개 골라 실험을 하되 관심 요인들의 수준을 제외한 나머지 요인들은 반드시 동일 조건으로 놓아야 한다. 동일 조건 하에서 실험을 한다고 함은 선택된 관심요인을 제외한 나머지 요인들의 효과가 전부 같은 상태에서 실험하는 것을 의미한다. 그러나 이와 같은 완벽한 동질성 확보는 불가능하기 때문에 비교 실험의 통계적 해석을 가능하게 하기 위하여 랜덤화, 반복, 블록화 세가지 원리를 반복 적용한다.

3-2) Sensory Evaluation 기법

3-2-1) 랜덤화(Randomization)

- 랜덤화(Randomization)은 실험의 객관성을 보장하는 방법으로 실험 단위의 배정 및 실험 순서들을 랜덤하게 결정하는 것을 의미한다. 난수표 사용, 주사위 던지기와 같은 랜덤 메커니즘을 이용한다.

3-2-2) 반복(Replication)

- 반복(Replication)은 각각의 처리를 둘 이상의 실험단위에 가함을 의미한다. 실험결과의 정밀성 유지를 위해 필요하다. 반복실험을 하면 실험오차의 수량화가 가능하다. 그러나 지나친 횟수의 반복은 비용의 낭비로 이어진다.

3-2-3) 블록화(Blocking)

- 블록화(Blocking)는 실험의 정밀도를 향상시키는 기법이다. 관심요인의 효과를 비교하는 것이 실험의 목표인데 실험단위의 동질성 유지가 힘들다고 판단되는 경우(예를 들어 음료의 관능검사에서 실험단위인 패널요원들의 강도 감지차이가 걱정되는 경우, 수확량 비료실험에서 관심요인인 품종효과 말고도 토질에 따른 수확량 차이가 의심스러운 경우) 이러한 실험단위를 블록으로 하여 각 블록 별로 독립적인 랜덤화가 이루어지게 한다. 조사연구에서는 층화(stratification)라는 용어를 사용한다.

4) Sensory Evaluation Data

4-1) 분포(Distributions)의 조사

○ 평균, 표준편차, 중위수, 4분위수 등 자료의 분포를 설명해주는 통계량 계산도 중요하지만 그래프를 사용해서 자료의 분포를 조사하는 것이 제일 중요하다. 방법은 Bar Graph, Pie Chart, Histogram, Stemplot, Time plot, Box plot 등으로 표현한다.

4-2) 관계(Relationships)의 조사

○ 흔히 종속변수라고 말하는 반응변수는 조사나 실험의 결과로서 측정된 값이며 독립변수라고 말하는 설명변수는 반응변수를 설명 또는 이 값의 변화에 영향을 주는 요인이다. 반응변수 간의 관계, 설명변수와 반응변수 사이의 관계는 변수 개개의 분포를 조사하는 것만큼 중요하다. 방법은 상관(Correlation r), 최소제곱회귀(Least-Square Regression)로 표현된다.

II. Sensory Evaluation process and results

1) 조사 개요

○ 시제품 샘플의 Sensory Evaluation는 20.12.11 일자에 실시하였다. 참가자는 모두 10명으로 20대가 4명, 30대가 2명, 40대가 1명, 50대가 3명이며, 직업군은 직장인이다.

<참여자 정보>

(단위 : 명)

분류	20대	30대	40대	50대 이상
참여자 수	4	2	1	3

○ 해당 조사는 실크젤리 샘플에 대한 조사로 외관(색상), 질감(입안에서의 느낌), 냄새(향), 맛(단맛), 맛(신맛)의 항목검사를 실시했으며, 시식 리스트와 항목별 검사지를 함께 배포하였다. 또한 샘플에 대해 시식은 조금씩 빈번하게 진행하였으며, 정확한 결과를 위해 시식 전 입 행균을 주기적으로 실행하였다.

<시음 방법 리스트>

관능평가 방법 리스트

관능평가에 참여해주셔서 감사의 말씀을 드립니다. 다음 내용은 샘플의 시식에 대하여 좀 더 구체적인 내용과 어떠한 점을 중점으로 두는지 도움을 드리고자 하는 내용입니다. 시식은 각 샘플에 맛과 향, 색채 등을 고려하여 시식해주시고 검사표 작성을 통해 솔직한 의견을 남겨주시면 감사하겠습니다.

★뒷장의 검사표와 함께 진행해주세요!!★

※시식하시기 전에 정확한 검사를 위하여 1개의 시료씩 검사를 진행해주세요.※

1. 시식하고자 하시는 제품을 시식 전에물로 입안을 충분히 씻어주세요.
2. 검사표를 보시고 실크젤리 ①, 실크젤리 ②, 실크젤리 ③ 의 항목에 √표 해주세요.
3. 시료의 향목이 잘 느껴지지 않는다면 물로 입안을 씻어준 후에 재시식 해주세요.
4. 검사가 끝났다면 에트사항 및 개선사항, 기타의견이 있다면 적어주세요.

※ 제품의 평가가 완료되었다면 중재적 의견 및 개선사항이 있다면 아래 빈칸에 적어주세요.

기타 의견: _____

<항목 검사지>

관능평가 설문지

실험방법 : 제시된 시료에 대한 관능평가요소의 강도를 1에서 9까지의 범위 내에서 평가하도록 한다. 시료는 반드시 전체의 양을 입안에서 다 넣은 후 확인하는 것을 원칙으로 하고 시료 사이에는 반드시 물로 입안을 헹군다.

실크젤리 ① () 실크젤리 ② () 실크젤리 ③ ()	남() 여()
	① 20대 ② 30대 ③ 40대 ④ 50대
검사 일시 :	
외관(색상)	① 나쁨 ② ③ ④ 보통 ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ 좋음
질감(입안에서 느낌)	① 나쁨 ② ③ ④ 보통 ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ 좋음
냄새(향)	① 나쁨 ② ③ ④ 보통 ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ 좋음
맛(신맛)	① 나쁨 ② ③ ④ 보통 ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ 좋음
맛(단맛)	① 나쁨 ② ③ ④ 보통 ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ 좋음
종합적인 기호도	① 나쁨 ② ③ ④ 보통 ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ 좋음

2) 항목별 결과

2-1) 실크젤리①

- 본 검사는 9점 척도 평가로 나쁨은 1점, 좋음은 9점을 두고 항목별 분포도를 그래프로 표현하였다.

<외관의 색상>



- 외관 색채의 분포는 5점 : 2명, 6점 : 6명, 7점 : 2명이며, 색상의 점수는 평균적으로 6점을 받아 보통이상의 수치를 나타내고 있다.

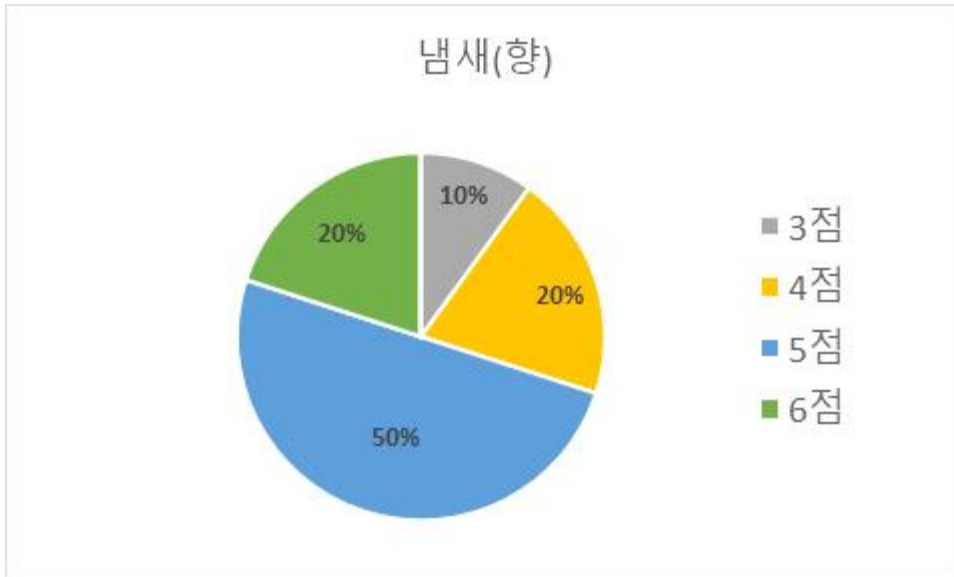
<질감(입안느낌)>



- 질감(입안느낌)의 점수의 분포는 5점 : 2명, 6점 : 6명, 7점 : 2명이며, 질감(입안느낌)의 점수는 평균적으로 6점의 점수를 받아 보통이상의 수치를 나타내었다. 50대 이상에서 높은 점수를 받았고, 20대 30대 40대

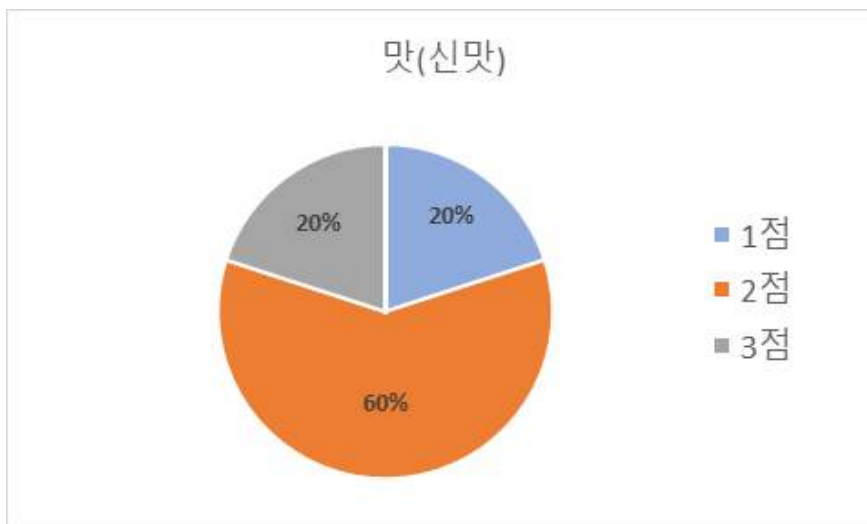
는 보통점수를 주었다.

<냄새(향)>



- 냄새(향) 점수의 분포는 3점 : 1명, 4점 : 2명, 5점 : 5명, 6점 : 2명이며, 평균적으로 4.8점의 점수를 받아 보통이하의 수치를 나타내었다, 냄새(향)의 경우 30대, 40대, 50대에게 보통의 점수를 받았으나, 20대에게는 다른 나이대에 비해 낮은 점수를 받았다.

<맛(신맛)>



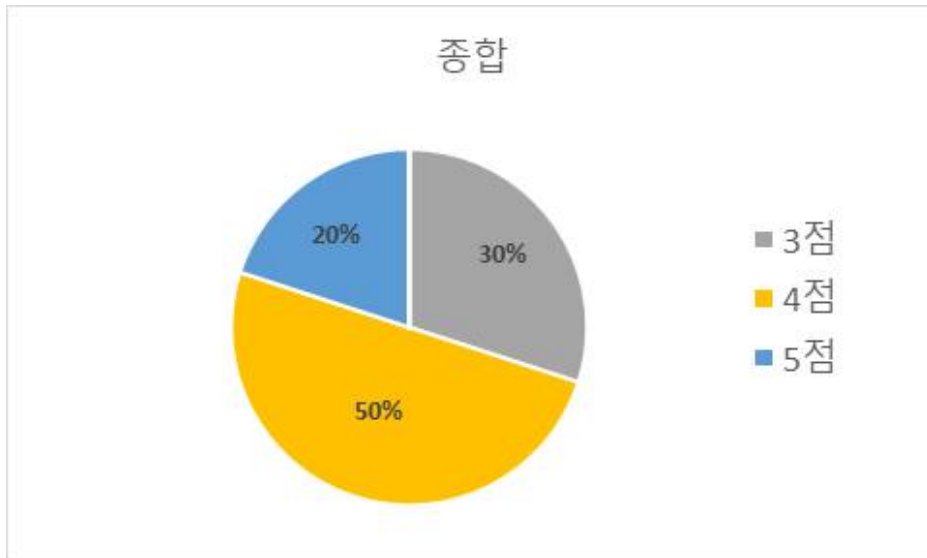
- 맛(신맛) 점수의 분포는 1점 : 2명, 2점 : 6명, 3점 : 2명이며, 평균적으로 2점의 점수를 받아 낮은 수치를 내고 있다. 맛(신맛)은 모든 나이대에서 낮은 점수를 받았다.

<맛(단맛)>



- 맛(단맛) 점수의 분포는 4점 : 3명, 5점 : 5명, 6점 : 2명이며, 평균적으로 4.9점의 점수를 받아 평균이하의 수치를 내고 있다. 맛(단맛)은 전체적으로 보통의 점수를 받았으나, 다른 나이에 비해 20대에게 낮은 점수를 받았다.

<종합점수>



- 코로나 19의 영향으로 인해 당사 직원들 대상으로 진행을 하였다. 전체적으로 낮은 점수를 받아 보통 이하라는 결과가 나왔다.

2-2) 실크젤리②

- 본 검사는 9점 척도 평가로 나뉘은 1점, 좋음은 9점을 두고 항목별분포도를 그래프로

표현하였다.

<외관의 색상>



- 외관(색상)의 점수는 분포는 5점 : 3명, 6점 : 4명, 7점 : 3명이며, 평균 6점으로 색상은 보통의 수치를 나타내고 있다.

<질감(입안느낌)>



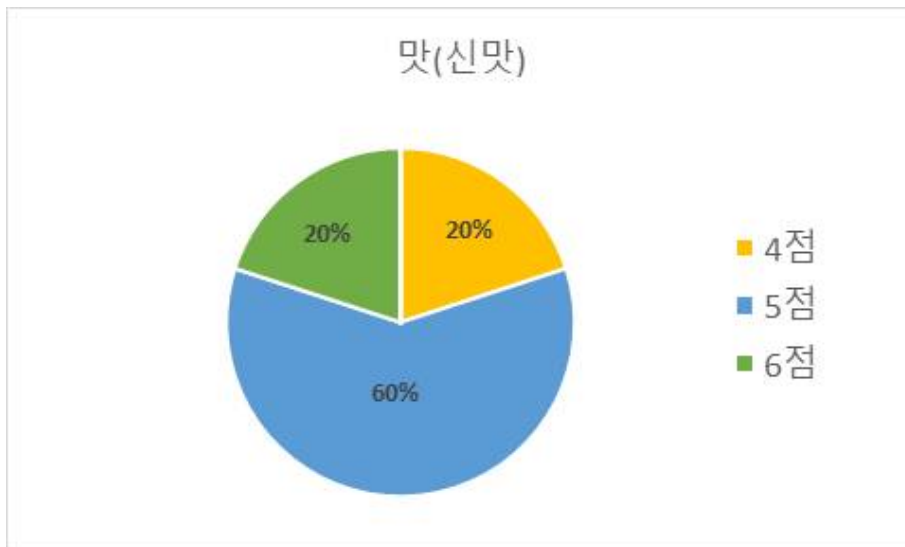
- 질감(입안느낌)의 점수는 6점 : 6명, 7점 : 4명을 받았으며, 평균 6.4점으로 보통 이상을 나타내었다. 질감(입안느낌)은 모든 나이대에서 전체적으로 보통이상의 점수를 주었다.

<냄새(향)>



- 냄새(향) 점수의 분포는 5점 : 5명, 6점 : 5명으로 평균 5.5점으로 보통의 수치를 나타내었다. 냄새(향)은 모든 나이대에서 전체적으로 보통의 점수를 주었다.

<맛(신맛)>



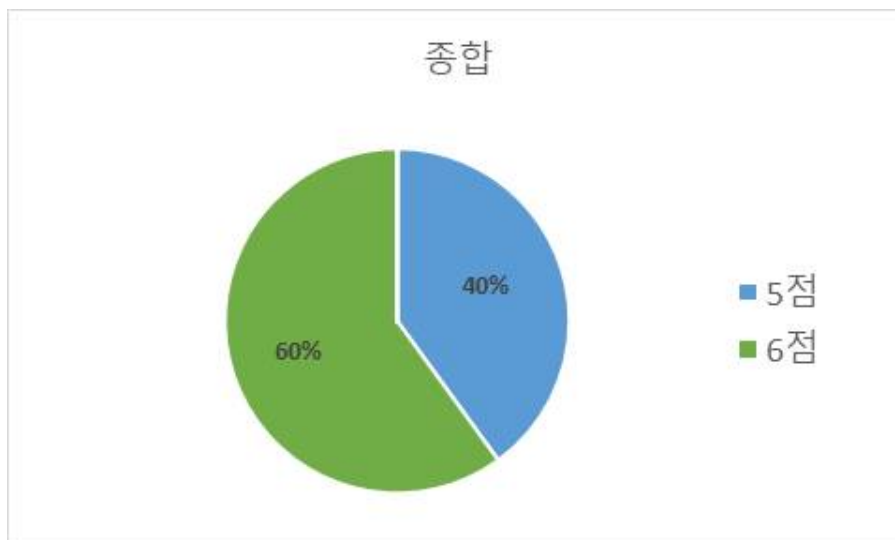
- 맛(신맛) 점수의 분포는 4점 : 2명, 5점 : 6명, 6점 : 2명이며, 평균 : 5점으로 점수 분포는 보통 수치를 나타내고 있다. 맛(신맛)의 점수는 냄새(향)의 점수와 마찬가지로 모든 나이대에서 전체적으로 보통의 점수를 주었다.

<맛(단맛)>



- 맛(단맛) 점수의 분포는 6점 : 2명, 7점 : 6명, 8점 : 2명이며, 평균 7점으로 점수 분포는 보통 이상의 수치를 나타내고 있다. 맛(단맛)의 점수는 모든 나이대에서 전체적으로 보통 이상의 점수를 주었지만 특히 30대에서 높은 점수를 주었다.

<종합점수>



- 코로나 19의 영향으로 인해 당사 직원들 대상으로 진행을 하였다. 전체적으로 보통 정도의 수준이라고 결과가 나왔다.

2-3) 실크젤리③

- 본 검사는 9점 척도 평가로 나쁨은 1점, 좋음은 9점을 두고 항목별분포도를 그래프로

표현하였다.

<외관의 색상>



- 외관(색상) 점수의 분포는 6점 : 3명, 7점 : 4명, 8점 : 3명이며, 평균 7점으로 외관(색상)의 점수는 보통 이상의 수치를 나타내고 있으며, 전체적으로 모든 나이대에서 높은 점수를 주었다.

<질감(입안느낌)>



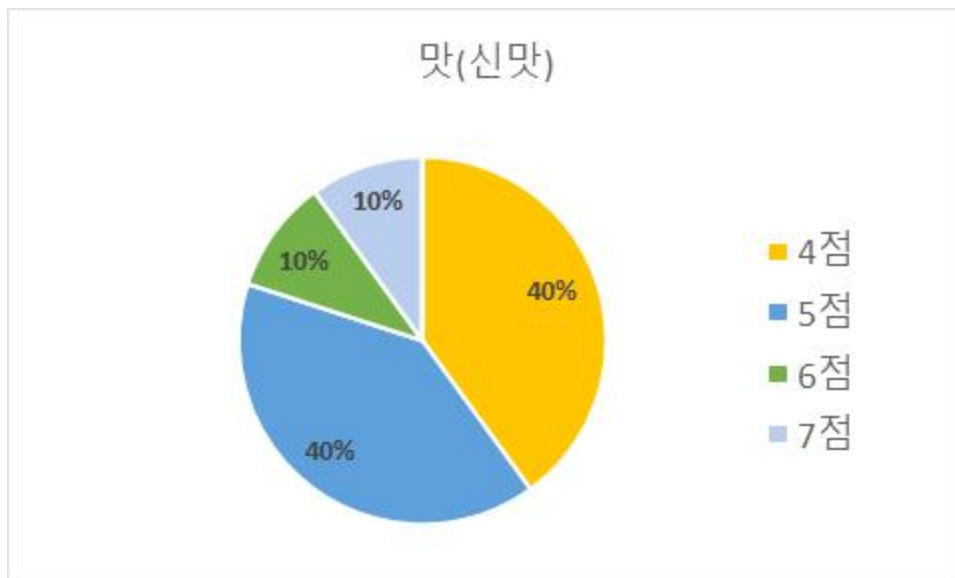
- 질감(입안느낌)의 점수 분포는 6점 : 4명, 7점 : 2명, 8점 : 4명, 이며, 평균 7점으로 보통 이상의 수치를 나타내었다. 전체적으로 보통 이상의 점수를 주었지만 특히 20대에서 높은 점수를 주었다.

<냄새(향)>



- 냄새(향)의 점수 분포는 5점 : 3명, 6점 : 4명, 7점 : 3명이며, 평균 6점으로 보통 이상의 수치를 나타내었다. 전체적으로 보통 이상의 점수를 주었으나 특히 30대에서 높은 점수를 주었다.

<맛(신맛)>



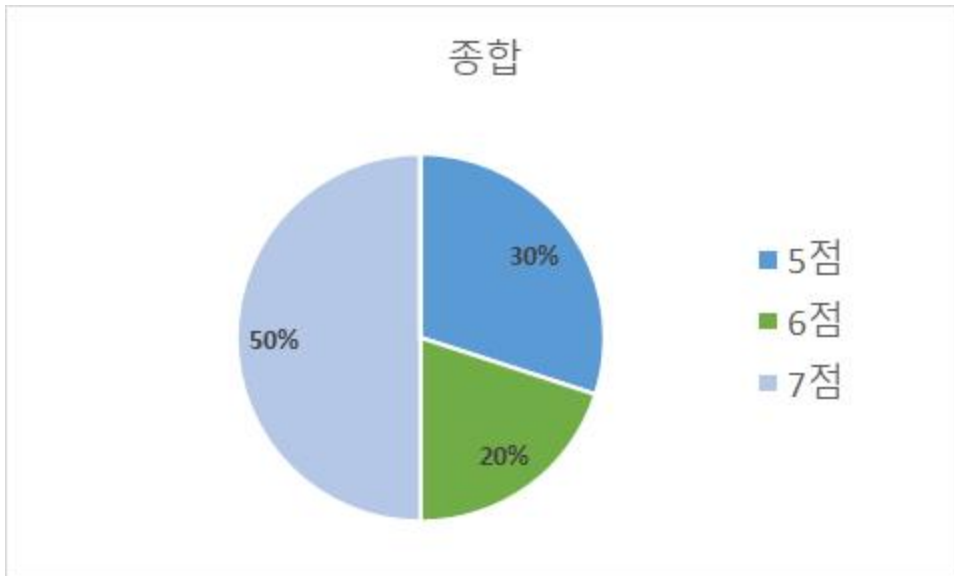
- 맛(신맛)의 점수 분포는 4점 : 4명, 5점 : 4명, 6점 : 1명, 7점 : 1명이며, 평균 4.9점으로 점수 분포는 보통 이하의 수치를 나타내고 있다.

<맛(단맛)>



- 맛(단맛)의 점수 분포는 7점 : 3명, 8점 : 4명, 9점 : 3명이며, 평균 8점으로 점수 분포는 보통 이상의 수치를 나타내고 있다. 전체적으로 모든 나이대에서 좋은 점수를 주었다.

<종합점수>



- 코로나 19의 영향으로 인해 당사 직원들 대상으로 진행을 하였다. 전체적으로 보통 이상의 수준이라고 결과가 나왔다.

III. 제품의 개선 방안

1) 개선 방안 및 소견

젤리의 경우 맛, 외관, 질감에 의해 호불호가 많이 결정되는 품목이기에 최종적인 샘플의 맛, 외관, 질감을 결정하기 위해 맛과 점증제의 정도를 달리하여 샘플 세 가지를 만들어 관능검사는 외(색상), 질감(입안느낌), 냄새(향), 맛(신맛), 맛(단맛)에 대해 실사 하였다.

실크젤리 ①의 경우 종합적인 의견은 보통 이하의 점수를 받았다. 특히 맛(신맛)에 대하여 낮은 점수를 받았으며, 외관(색상), 질감(입안느낌)은 보통이상의 점수를, 맛(신맛), 맛(단맛)의 경우에는 보통이하의 점수를 받았다.

실크젤리②의 경우 종합적인 의견은 보통의 점수를 받았다. 특히 맛(단맛)의 항목에서는 높은 점수를 받았으며, 특히 30대에서 높은 점수를 받았다. 외관(색상), 질감(입안느낌)의 항목에서는 보통이상의 점수를, 냄새(향), 맛(신맛)의 항목에서 보통수준의 점수를 받았다.

실크젤리③의 경우 종합적인 의견의 보통 이상의 점수를 받았다. 특히 맛(단맛)의 경우에는 전체적으로 모든 나이 대에서 높은 점수를 받았으며, 외관(색상), 질감(입안느낌), 냄새(향)의 경우에도 전체적으로 보통 이상 점수를 받았다. 특히 외관(색상), 냄새(향)의 경우 30대에서 높은 점수를 받았으며, 질감(입안느낌)은 20대에서 좋은 점수를 받았다. 맛(신맛)의 경우 다른 항목에 비해 낮은 점수를 받았으며 보통 이하의 점수를 받았다.

샘플 세 가지를 관능평가 해 본 결과 전체적으로 좋은 점수를 받았던 실크젤리③으로 샘플 작업을 진행하기로 결정하였다. 전체적으로 보통이상의 점수를 받았던 항목과 달리 보통 이하의 점수를 받았던 맛(신맛)의 경우 요청사항에 따라 변경할 필요가 있다. 또한 보통이상의 점수를 받았던 항목들도 타사와의 경쟁력을 높이기 위해서는 더 개선해야 할 필요가 있다.

맛(신맛) 원료의 배합량을 조절하여 개선하고, 색은 원료의 배합량을 조절하여 개선하고, 질감(입안느낌)의 경우에는 젤리를 만들 때 쓰이는 점증제의 종류 및 양을 조절하여 개선해야 할 것이다. 색상, 냄새(향), 맛(단맛)의 경우는 맛(신맛)을 개선하기 위해 원료의 배합량을 조절하면서 동시에 진행할 예정이다. 젤리제품의 경우 다른 고형제 제품에 비해 맛, 향, 질감 등 호불호가 결정되는 변수가 다양하고, 모든 나이 대의 소비자가 접근하기에 더 쉬운 제형의 특성상 모든 나이 대의 니즈를 갖추기 위해 지속적인 R&D를 통하여 개선할 예정이다.

<별첨작성 양식>

연구개발보고서 초록

[별첨 1]

과 제 명	(국문) 초음파 활용 실크펩타이드 제조기술 개발				
	(영문) Development of Ultrasound-based Silkpeptide Manufacturing Technology				
주관연구기관	농업회사법인 에스에스바이오팜(주)		주 관 연 구 자 책 임 자	(소속) 부설연구소	
참 여 기 업	한국식품연구원			(성명) 이○우	
총 연구개발비 (931,250천원)	계	931,250,000	총 연 구 기 간	2018. 04. 30 ~ 2020.0 12. 31.(2년 9월)	
	정부출연 연구개발비	745,000,000	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	18명
	기업부담금	186,250,000		내부인원	18명
	연구기관부담금			외부인원	0명
○ 연구개발 목표 및 성과					
1. 연구개발 목표					
- 초음파 활용 실크 펩타이드 제조 공정 개발					
- 용매 염농도 저감, 공정 시간 단축 및 공정 간소화					
-실크 펩타이드의 분자량 조절을 통한 생리활성 강화					
2. 연구개발성과					
1) 건강기능식품 2개, 일반식품 1개 제품개발					
- 건강기능식품 : (SS)에스에스혈행솔루션(품목제조신고번호 : 제 20160012278113호), (SS)에스에스스킨솔루션(품목제조신고번호 : 제 20160012278117호)					
- 일반식품 : 실크젤리(품목제조보고번호 : 2015044907463)					
- 초음파 활용 실크펩타이드를 이용한 2개의 건강기능식품((SS)에스에스혈행솔루션, (SS)에스에스스킨솔루션)과 1개의 일반식품(실크젤리) 제조를 위한 제조공정표준화 수립					
2) 논문발표 3건					
① Food science and biotechnology / Extraction conditions for Rosa gallica petal extracts with anti-skin aging activities / 2019.02					
② Ultrasonics Sonochemistry / Silk peptide production from whole silkworm cocoon using ultrasound and enzymatic treatment and its suppression of solar ultraviolet-induced skin inflammation / 2020.03					
③ Algal research / Production of Undaria pinnatifida sporophyll extract using pilot-scale ultrasound-assisted extraction: Extract characteristics and antioxidant and anti-inflammatory activities / 2020.04					

3) 특허출원 2건

① 피부염증 개선 활성이 우수한 누에고치 유래 파파인 효소 분해물 및 이의 용도 / 10-2019-0064606

② 혈관 이완능 및 항염 활성이 우수한 누에고치 유래 브로멜라인 효소분해물 및 이의 용도 / 10-2019-0064628

4) 특허등록 2건

① 피부염증 개선 활성이 우수한 누에고치 유래 파파인 효소 분해물 및 이의 용도 / 10-2152077

② 혈관 이완능 및 항염 활성이 우수한 누에고치 유래 브로멜라인 효소 분해물 및 이의 용도 / 10-2161454

5) 고용과급효과

- 기술개발 진행단계에서 총 10명 고용 창출

6) 기술실시

-성과활용명 : 초음파 활용 실크펩타이드 제조기술 개발/직접실시/노하우

7) 기타성과

-충청남도기업인대상 창업대상 수상

-무역의 날 수출탑 표창장 및 백만불 수출의 탑 수상

-한국산학연합회장상 수상

3. 연구내용 및 결과

1) 기능성 실크펩타이드 제조 기술 개발

- 실크단백질에 4종의 단백질 분해효소(papain, pancreatin, bromelain, fungal protease)를 처리하여 SDS-PAGE 분석한 결과 4 효소 모두 단백질을 분해하였으나 파파인 처리 샘플이 5 kDa 이하에서 전반적으로 좁은 범위의 분자량 분포를 보이는 반면, 다른 3종 효소는 수십 kDa에서 수백 Da의 넓은 범위의 분자량 분포를 보임.

- 누에고치에 0.1 M NaOH를 100 배량 가하여 4시간 초음파 처리(20 kHz, 600 W, 25°C) 후 pH 7로 중화한 용액에 파파인을 처리했을 때 반응 30분만에 대부분이 5kDa 이하로 분해되었으며, 24시간 후에는 1.4kDa 부근에서 가장 높은 피크가 검출되었으며, 최종적으로 크로마토그램 상에서 5kDa 이하의 분자량을 가지는 펩타이드의 면적비가 79%로 확인.

- 파파인에 의해 분해된 펩타이드는 JB6 P+에서 COX-2의 발현 및 대사산물인 PGE2 억제를 통해 피부염증 완화에 효과가 있으며 이와 관련된 인자가 ERK인 것을 확인.

- 브로멜라인에 의해 분해된 펩타이드는 인간혈관세포 HUVEC에서 NO 생산량이 가장 높게 관측되었으며 이는 혈관 이완 효과가 있음을 확인

2) 초음파 활용 실크펩타이드 생산 기술 개발

- 누에고치에 100배량(w/v)의 0.1 M 의 수산화나트륨 용액을 가하여 25°C, 4시간, 600W, pulse on/off 20s/20s 조건에서 초음파 처리한 결과 수산화나트륨을 가용화 용매로 사용하고 초음파를 병행 처리하였을 때 기존의 공정에 비해 세리신 정련 과정 생략 등으로 가용화처리 단계를 간소화할 수 있으며 낮은 농도의 염을 사용하면서도 높은 수율의 가용화 단백질을 얻을 수 있음을 확인.

- 효소처리 시 초음파 병행 처리에 의한 시너지 효과를 기대하였으나, 효소 단독 처리구에 비해 초음파 병행 처리구에서 10kDa 이상 고분자 분획이 많이 남아 있는 결과를 보아 효소 단독으로 처리하는 것이 저분자 실크 펩타이드 제조에 유리할 것으로 판단.
- 파일럿 및 대량생산 규모의 초음파 장치를 활용한 생산 공정을 확립하기 위해 한국식품연구원이 원천기술을 보유하고 주관기관인 에스에스바이오팜이 기술이전하여 보유하고 있는 순환형 초음파 장치를 활용
- 분쇄한 누에고치를 0.1M NaOH과 함께 1시간 상온에서 순환형 초음파 장치를 활용하여 초음파 처리 (20kHz, 출력 800W 이상)하는 과정을 2회 반복 시 70% 이상 가용화 확인
- 상기 조건에서 가용화한 용액에 파파인 효소 5%(w/w)를 24시간 처리 시 분자량 10kDa 및 5kDa 이하 펩타이드 비율이 87.8%, 61.7%로 검출

3) 초음파 활용 실크펩타이드 대량생산 공정 표준화

- 기능성 실크 펩타이드의 생산 최적화를 위한 초음파 활용 공정 표준화

→ 기존 방법 대비 염농도 96% 이상 감소 (50%→0.4%)

→ 전체 공정시간 25% 이상 단축(4일→3일)

→ 최종수율 70% 이상

○ 활용계획: 저분자 실크 펩타이드 생산 공정을 개발하여 스포츠 식품, 제과류를 포함한 식음료 제품 개발

-식음료품 분야: 식품첨가물의 대체재 역할, 원료비용 절감, 베이커리 제과 분야에 활용 가능

-조제약 분야: 효율 편리성으로 인해 제약 및 의료 산업에서도 관심이 증가하는 추세이므로 활용 기대

○ 기대성과

- 공정 중 케미컬 사용량 저감, 공정 단계 간소화, 공정 시간 단축 등으로 생산 원가는 절감하고 생산 수율은 증진시킴으로써 가격 경쟁력이 확보된 제품 생산 기대

- 펩타이드의 분자량 조절을 통해 특정 기능성 강화 제품 생산

- 기존 업체들이 시장을 선점한 상황에서 신규 기능성 제시 혹은 기능성 강화 소재 생산으로 경쟁력 확보 기대

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제 현황

		과제번호	118060-03-1-CG000		
사업구분					
연구분야				과제구분	단위
사업명	고부가가치식품기술개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	초음파 활용 실크캡타이드 제조기술 개발			과제유형	(개발)
연구기관				연구책임자	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2018.04.30. ~ 2018.12.31	214,000	53,500	267,500
	2차연도	2019.01.01. ~ 2019.12.31	265,000	66,250	331,250
	3차연도	2020.01.01. ~ 2020.12.31	266,000	66,500	332,500
	4차연도				
	5차연도				
	계		745,000	186,250	931,250
참여기업	한국식품연구원				
상대국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2021.02.05

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
에스에스바이오팜	연구소장	이강우

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확인하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	이강우
----	-----

. 연구개발실적

다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

우수

- 초음파 실크 펩타이드 전처리 단계 공정 개선으로 시간 절감 및 염농도 감소
- 단백질 가수분해 효소 활용 실크단백질 가수분해물(과파인, 브로멜라인)의 혈관염증 완화 및 피부염증 완화 기능성 특허 등록

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

우수

- 고용파급효과 10명
- 건강기능식품 2개, 일반식품 1개 시제품 개발

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

우수

- 개발한 저분자 실크 펩타이드를 활용하여 스포츠 식품, 제과류를 포함한 식음료 제품 개발
- 식음료품 분야: 식품첨가물의 대체재 역할, 원료비용 절감, 베이커리 제과 분야에 활용 가능
- 조제약 분야: 단백질은 인체가 면역력을 높이는데 영향을 미치는 필수 아미노산과 연관되어 있기 때문에 제약 및 의료 산업에서도 관심이 증가하는 추세이므로 활용 기대

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

우수

- 실험실-파일럿-대량생산 규모에서 공정 확립을 위한 연구 수행
- 실크 펩타이드의 기능성 및 관련인자 규명

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지식소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

우수

- 논문발표(SCI급) : 3건

① Food science and biotechnology (IF 1.513) / Extraction conditions for Rosa gallica petal extracts with anti-skin aging activities / 2019.02

② Ultrasonics Sonochemistry (IF 6.513) / Silk peptide production from whole silkworm cocoon using ultrasound and enzymatic treatment and its suppression of solar ultraviolet-induced skin inflammation / 2020.03

③ Algal research (IF 4.008) / Production of Undaria pinnatifida sporophyll extract using pilot-scale ultrasound-assisted extraction: Extract characteristics and antioxidant and anti-inflammatory activities / 2020.04

- 특허출원 2건

① 피부염증 개선 활성이 우수한 누에고치 유래 파파인 효소 분해물 및 이의 용도 / 10-2019-0064606

② 혈관 이완능 및 항염 활성이 우수한 누에고치 유래 브로멜라인 효소분해물 및 이의 용도 / 10-2019-0064628

- 특허등록 2건

① 피부염증 개선 활성이 우수한 누에고치 유래 파파인 효소 분해물 및 이의 용도 / 10-2152077

② 혈관 이완능 및 항염 활성이 우수한 누에고치 유래 브로멜라인 효소 분해물 및 이의 용도 / 10-2161454

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
초음파 활용 실크펩타이드 제조 공정 개발	40	100	우수
용매 염농도 저감, 공정 시간 단축 및 공정 간소화	30	90	보통
실크 펩타이드의 분자량 조절을 통한 생리활성 강화	40	100	우수
합계	100점		

III. 종합의견

1. 대한 종합의견

본 사업을 통해 효소를 이용하여 저분자 실크펩타이드를 제조하였고, 피부염증과 혈관염증의 완화에 효과가 있음을 확인. 초음파를 활용하여 실크단백질을 가용화 한 결과 기존의 방법에 비해 염농도 96% 이상 감소 달성 및 세리신 정련 과정 생략, 탈염 단계 생략 등으로 공정 간소화 성과를 달성함. 최종적으로 개발 소재의 상용화를 위한 대량 생산 공정개발을 하여 생산시스템을 구축함.

본 사업을 진행하며 최종목표인 기능성 실크 펩타이드의 생산 최적화를 위한 초음파 활용 공정개발에 대해 긍정적인 결과를 이끌어 냄.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 초음파 기술 적용에 의한 공정 저감화의 산업적 유용성
- 산업형 초음파 시스템 등 주관기관 보유 설비 활용에 의한 높은 사업화 가능성

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 공정 중 케미컬 사용량 저감, 공정 단계 간소화, 공정 시간 단축 등으로 생산 원가는 절감하고 생산수율은 증진시킴으로써 가격 경쟁력이 확보된 제품 생산 기대
- 펩타이드의 분자량 조절을 통해 특정 기능성 강화 제품 생산 기대
- 개발 소재를 함유하는 건강기능식품 및 일반식품 개발

IV. 보안성 검토

o 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 의견

--

2. 연구기관 자체의 검토결과

--

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	개발	
연구과제명	초음파 활용 실크펩타이드 제조기술 개발			
주관연구기관	에스에스바이오팜	주관연구책임자	이○우	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	745,000,000	186,250,000		931,250,000
연구개발기간	2018.04.30.-2020.12.31			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
초음파 활용 실크펩타이드 제조 공정 개발	순환형 초음파 장치를 활용한 실크펩타이드 제조 공정 확립
용매 염농도 저감, 공정 시간 단축 및 공정 간소화	용매 변경 및 초음파 기술 적용으로 세리신 정련과정, 효소처리 전 탈염 단계 생략 등 공정 단축 및 염 농도 감소(염 농도 96% 감소, 공정시간 25% 감소 (4일→3일))
실크 펩타이드의 분자량 조절을 통한 생리활성 강화	브로멜라인 효소 처리 실크펩타이드의 혈관 이완능 검증 파파인 효소 처리 시 분자량 10 kDa 및 5 kDa 이하 펩타이드 비율이 87.8%, 61.7%로 검출 -> 피부염증 완화능 검증

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기 타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
												SC I	비 SC I						논 문 평 균 IF	
단위	건	건	건	건	만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	10	10		10	5	15	20	15	15											
최종목표	2	2				7	1,800	60	6			1	2							
연구기간내 달성실적	2	2				3	0	0	10			3							1	
달성율(%)	10 0	10 0				43	0	0	16 7			30 0								

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	기능성 실크 펩타이드의 생산 최적화를 위한 조음과 활용 공정 개발

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업제이전 (상품화)	현장애로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술	v					v				

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	- 실크펩타이드 제조 공정 개선에 의한 원가절감 및 환경친화적 공정 개발로 마케팅 효과 기대 - 가격경쟁력 및 우수한 기능성이 확보된 건강기능식품 및 일반식품 개발

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치	10	10		10	5	15	20	15	15										
최종목표	2	2				7	1,800	60	6			1	2						
연구기간 내 달성실적	2	2		1	4.172	3	0	0	10			3							
연구종료 후 성과창출 계획						4	1,800	60	2										

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.