

발간번호

11-1543000-000766-01

보리 및 콩을 활용한
피부미용개선 기능성식품 개발
(Development of skin cosmetic functional food
using barley and soybean)

서울대학교

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 · 농림수산식품기술기획평가원장 귀하

이 보고서를 “고부가 가치 식품개발사업 (보리 및 콩을 활용한 피부미용개선 기능성식품)” 개발에 관한 연구에 관한 보고서로 제출합니다.

2015 년 1 월 30 일

주관연구기관명 : 서울대학교

주관연구책임자 : 이기원

협동연구기관명 : 가천대학교

협동연구책임자 : 김선여

협동연구기관명 : 샘표식품(주)

협동연구책임자 : 허병석

협동연구기관명 : 영광군 농업기술센터

협동연구책임자 : 이석정

요 약 문

I. 제 목

보리 및 콩을 활용한 피부미용개선 기능성식품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

본 연구의 최종 목표는 보리 및 콩, 발효 기술을 통한 이용한 피부미용개선 기능성 신소재 2종 이상 개발 및 식품개발임. 보리 및 콩 추출물 및 유효성분을 이용한 피부주름완화, 피부보습효능 등의 피부미용개선 기능성 신소재를 발굴하고 이에 관련된 정확한 작용기작을 규명하고자 함. 이를 통해 보리 및 콩 유래의 지표물질의 표준화 및 최적화를 통한 피부미용개선 기능성 식품 제품화 하고자 함.

2. 연구 내용

보리 및 콩 유래 유효분획물 및 지표물질의 피부주름완화, 피부보습등의 피부미용개선 효능을 세포주모델, 동물모델을 이용하여 검증함. 또한 분자생물학적 기법과 컴퓨터모델링을 이용하여 보리 및 콩 유래 유효분획물 및 지표물질의 피부주름완화, 피부보습 등의 피부미용개선효능에 대한 정확한 작용기작을 규명.

임상시험을 통하여 보리 및 콩 유래의 유효분획물 및 지표물질의 피부주름완화, 피부보습 등의 피부미용개선 효능검증.

피부미용개선 효능을 가지는 보리 및 콩 유래의 유효분획물의 분석 및 프로파일링을 통한 지표물질 탐색 이후, 이 물질의 표준화 및 최적화를 이루고, 유효성분의 개별인정형 소재화 및 개별인정형 진행

표준화된 보리 및 콩 추출물 또는 발효 공정 산물의 유효성분을 이용한 기능성 미용 식품 개발. 보리 및 콩의 기능성 소재화를 위한 전용 품종 선발, 재배법 및 대량 자동화 생산법 개발.

3. 연구 개발에 따른 기대 성과

개별인정형 미용기능식품소재로 보리 및 콩을 응용하여 차별화된 제품 개발. 보리 및 콩의 표준화된 시료의 제공에 따른 다양한 부가가치를 얻을 수 있음. 보리 및 콩을 이용한 농업의 이차산업으로 새로운 바이오산업으로의 성장 토대 마련하고, 보리 및 콩 재배, 가공농가의 생산력 증대, 보리 가공식품 매출확대로 지역경제의 활성화에 기여.

1. Objective of research

The final goal of this research is to develop new 'functional skin beauty' materials (at least 2 types) and foods by utilizing barley & bean bio-convergence technologies. To develop new 'functional skin beauty' materials from barley & bean extracts, and their bioactive compounds, which can improve skin wrinkle and moisturization, and etc. To elucidate mechanism of those developed 'skin beauty-functional' materials. To commercialize 'functional skin beauty' foods by standardization and optimization of barley & bean derived ingredients.

2. Contents of research

Verifying the 'skin beauty functions' of barley & bean derived bioactive materials and index compounds by using cell line and animal experimental models. Investigating the mechanism of 'skin beauty-functions' such as improving skin wrinkles and moisturization, by using biomolecular technologies and computer modeling. Verifying the 'skin beauty functions' of bioactive materials and index compounds by clinical study. Finding the index compounds by analyzing and profiling 'skin beauty-functioning' barley & bean derived bioactive materials. Standardization and optimization of barley & bean derived 'skin beauty-functioning' compounds. Pursuing 'Individual Authorization' process on barley & bean extracts or their fermented products which has skin improvement functions. Developing 'functional skin beauty' foods by utilizing standardized barley & bean extracts or or fermented products. Developing specific strain selection methods, cultivating practices, and large scale production methods for 'functional materialization' of barley & bean.

3. Outcome of research development

Developing competitive products by utilizing barley and bean as an 'Individual Authorized' 'functional beauty food materials'. Gaining various added values from using standardized barley & bean samples. Establishing new potential bio-industry from the secondary agricultural industry utilizing barley and bean. Contributing local economy activation by cultivating barley and bean, enhancing production of processing farm, and sales enlargement of barley-processed food.

Table of Contents

First chapter	Outline of Research developing program
Second chapter	Present condition of domestic and foreign technology development
Third chapter	The content and results of research development
Fourth chapter	Contribution to related fields and goal achievement
Fifth chapter	The result of research development and application plan
Sixth chapter	The information of foreign science technology from research development process
Seventh chapter	Present condition of research facility and equipment
Eighth chapter	Reference

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요.....	7
제 2 장	국내외 기술개발 현황.....	20
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과.....	25
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	186
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획.....	191
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	195
제 7 장	연구시설·장비 현황.....	195
제 8 장	참고문헌.....	196

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구 개발의 목적

최근 우리나라는 의학의 발달 및 생활환경의 개선 등과 함께 평균 수명이 크게 연장되고 그 결과 노령화 시대에 접어들면서 사람들의 건강에 대한 인식이 바뀌고 있음. 과거에는 사람들이 사회나 가정의 발전을 위해 자신들의 건강을 뒷전으로 생각했다면 현재는 소득증가에 따른 삶의 질 향상을 따라 건강증진에 관심이 높아지고 있음. 이런 현상들은 사회 전반적으로 질병을 치료하기 위한 의료비용이 늘어난 것뿐만 아니라 질병을 예방하기 위해서 건강기능성 식품 산업이 크게 성장하고 있는 사실로 대변될 수 있을 것임. 건강기능성 식품산업은 인삼, 홍삼 등 한약재뿐만 아니라 효능에 따라 우리가 흔히 섭취하는 식재료도 소재로 활용될 수 있다는 점에서 사업의 범위가 무궁무진함. 또한 식재료들의 대부분은 농어촌에서 생산되고 있다는 점에서 식재료의 기능성 소재화는 침체되어 있는 농어촌 경제에 큰 파급효과를 미칠 것으로 생각됨.

1. 보리 및 콩의 이용 개발 필요성

가. 쌀과 함께 대표적인 주식인 보리는 기원전 7000년경부터 식용으로 이용되어왔으며 우리나라에는 기원전 108년경 중국으로부터 전래되었을 것으로 추정되고 있어 보리의 재배역사는 대단히 오래됨. 보리는 품종에 따라 차이는 있으나 대체적으로 전분 64%, 단백질 11%, β -glucan 5%내외로 구성되어 있으며 나머지 20%는 수분, 지방, 회분, 섬유소, 그리고 소량의 비타민류 등 미량성분들을 포함되어 있음. 또 우리나라에서 재배되는 보리의 품종만 하더라도 쌀보리(흰찰쌀보리, 진주찰), 겉보리(황금찰), 맥주보리(호품보리, 다진보리, 오름)등 매우 다양하고 각기 생리활성 성분의 함량 차이도 대단히 큰 것으로 알려지고 있음.

나. 보리잎에는 피부미백이나 노화에 효과적인 항산화물질을 많이 함유하고 있고 최근에는 농촌진흥청에서 새싹보리 잎으로부터 항암, 미백, 항산화 효과가 탁월한 기능성 생리활성을 가지는 폴리페놀성 물질인 루테오린, 페루릭산, 사포나린, 루토나린 등의 성분을 분리정제에 성공함으로써 보리 신소재 활용에 대한 요구도는 높다.

다. 하지만 현재 보리의 낮은 단가와 소비량 감소로 인해 재배량이 점차 줄고 있음. 보리의 가치를 좀 더 높이기 위해 다양한 보리제품을 이용하고는 있지만 농가에 실질적인 도움은 되지 못하고 있음. 보리는 콜레스테롤 저하 및 심혈관계 질환 조절 등에 효과가 있다고 알려진 β -glucan, ergosterol을 포함한 생리활성물질을 함유하고 있고 다이어트에 좋은 식이섬유를 다량 함유하고 있다고 알려져 있음. 보리 부산물인 보리순 등에도 ergosterol과 luteolin등 생리활성물질이 함유되어 있다고 알려져 보리와 보리 부산물을 이용한 기능성 소재 생산 연구 및 산업적 이용이 기대됨.

라. 최근 콩 펩타이드, 이소플라본 연구 및 생산 붐에 맞추어 콩 기능성 소재의 개발과 생산에

관련산업에 관심이 쏠리고 있으나, 아직 이를 뒷받침할 만한 기술력 및 경제성 확보가 부족한 현실임. 특히 국내 콩가공 산업에서 발생하는 다량의 생리활성물질들을 포함한 부산물은 사료 혹은 폐기물로 버려지거나, 기술력이 확보된 외국으로 수출이 진행, 가공 후 역수입되는 모순이 상존하고 있는 실정임. 부산물로부터 생리활성물질을 분리, 정제하여 제품, 소재화 함으로써 환경오염의 방지, 자원의 활용과 생산원가 절감효과를 기대할 수 있음. 따라서 현 시점에 있어 콩 부산물들인 껍질 및 배아 추출물의 기능성 평가 및 생산기술의 개발은 콩 펩타이드와 대두 아이소플라본을 통하여 발전한 기능성 소재 생산 관련 산업을 보다 경제성 있는 분야로 확대, 발전시키기 위하여 매우 필요한 연구 분야임.

2. 기능성 미용 식품 소재 및 제품의 개발 필요성

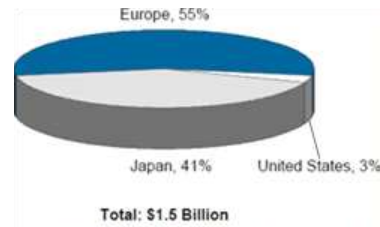
가. 기능성 식품 시장이 세계적으로 2000년도 1,500억불로 추정(중국제외)되며 2010년에는 10배 정도 증대되어 20,000억불 정도 될 것으로 예측됨. 우리나라 기능성 식품 시장은 2004년도 현재 2조원 정도이며 향후 10%-50% 이상 성장할 것으로 예측됨. 이런 측면에서 건강 유지 및 개선, 미용을 위한 기능성 식품 개발의 산업화는 매우 유망함.

나. 피부는 환경독소, UV 등에 직접 노출되어 이로 인해 발생하는 활성산소와 염증반응의 수준이 다른 조직에 비해 매우 높은 편이며, 최근 수질오염과 오존층 파괴 등의 환경 요인의 증가에 의해 노화가 촉진되고 있음. 또한 이러한 피부 노화가 장기간 지속될수록 다른 피부 질환 및 암 발생의 원인으로 작용할 수 있기 때문에 피부노화의 예방은 미용 뿐 아니라 중요한 보건상의 문제로 자리 잡고 있음.

다. 최근 건강 뿐 아니라 아름다움에 대한 욕구가 증가하면서 기능성 화장품, 미용 식품에 대한 관심이 증대되고 있음. 기능성 미용 식품은 기존의 식품의 개념에서 벗어나 피부 노화 및 질병을 예방할 수 있는 기능성을 포함하고 있으며, 따라서 피부의 미백 효과, 주름개선, 피부보습효과를 줄 수 있는 신소재에 대한 요구가 증대되고 있음.

라. 프랑스 남부 해송의 추출물인 피크노제놀(pycnogenol)은 플라보노이드, 프로시아니딘 등의 물질이 많이 들어 있는 것으로 알려져 있고 피부주름, 미백, 건선등 여러 가지 피부질환의 보호 효과를 가지는 것으로 알려지고 있고, 화장품, 의약품, 식품 소재로 널리 쓰이면서 관련 제품 판매 매출이 1~2조 원에 이름.

마. 2008년 Kline & Company의 조사에 따르면 세계 미용 식품시장 규모는 약 15억 달러이며 (그림1), 유럽이 가장 큰 시장을 형성하고 있고, 그 다음이 일본시장인 것으로 조사됨. 북미와 유럽지역의 미용 식품 시장 규모는 2000~2005년 매년 17%씩 성장했고, 2011년까지 연평균 두 자릿수 이상 성장할 것이라고 전망함.



<그림 1. 세계 미용식품 시장 규모 (kline & Company)>

사. 국내 미용 식품은 일본이나 유럽 시장과 비교해 아직 시장 진입 단계에 있지만, 최근 식품 회사, 화장품회사를 포함하여, 제약회사까지 미용식품시장에 진출하고자 함. 최근 식약청으로부터 기능성을 인정받은 개별인정형 미용 식품들이 지속적으로 출시되면서 합법적인 기능성 클레임과 신뢰성 부여로 건강기능식품 시장에서도 경쟁력을 얻고 있음.

아. 2010년 아모레퍼시픽은 저분자 마린 콜라겐 펩타이드가 함유된 미용 음료인 슈퍼콜라겐을 출시함. 아모레퍼시픽이 오랜 기간 투자한 연구 기술이 축적된 콜라겐 펩타이드 효능과 20ml 소형 앰플 제형화를 통해 차별화에 성공했고, 출시 2개월 만에 70억 매출을 달성해 국내 콜라겐 미용 식품 시장의 선두 주자로 자리매김하고 있음

제 2절. 연구개발 목표 및 내용

1. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

본 연구의 최종 목표는 보리 및 콩을 이용한 피부미용개선 기능성 신소재 및 식품개발임. 보리 및 콩 추출물 또는 발효 공정 산물에서의 유효성분을 이용한 피부주름완화, 피부보습효능 등의 피부미용개선 기능성 신소재를 발굴하고 이에 관련된 정확한 작용기작을 규명하고자 함. 보리 및 콩 유래의 지표물질의 표준화 및 최적화를 통한 피부미용개선 기능성 식품 소재화 및 제품화를 하고자 함. 초기 RFP 상 보리 및 콩 부산물을 활용하는 것으로 계획하였지만 본과제의 상위 목표인 보리 및 콩 소비 활성화를 통한 농민 소득증대와 지역경제 발전을 위해 충분한 원료공급이 가능한 원물을 이용하여 연구를 진행함.

2. 과제별(세부·협동) 연구개발의 목표 및 내용

가. 제 1 세부과제 : 서울대 이기원

(1) 세부 목표 : 세포주모델을 이용한 보리 및 콩 유래산물의 추출, 분획, 발효 방법에 따른 피부주름개선과 피부보습효능 검증 및 작용기작 규명

(2) 주요 내용 및 방법

보리 및 콩 유래산물들의 추출, 분획, 발효 방법에 따른 시료의 피부주름개선과 피부보습효능을 보이는 물질을 탐색하고, 그 효능을 검증한다. 또한 세포주모델을 이용하여 보리 및 콩 유래산물의 피부주름개선 및 피부보습효능에 대한 작용기작을 분자생물학적 기법을 이용하여 밝힌다.

(가) 세포주모델에서 보리 및 콩 유래산물의 자외선에 의해 유도되는 피부노화 및 주름개선 효능 검증

① UVB에 의해 유도되어 피부노화 과정에서 직접적으로 영향을 미치는 MMP-1 (Matrix Metalloproteinase

㉠ collagenase의 발현 및 활성 저해 효과 확인.

㉡ Western blot과 zymography를 통해 보리 및 콩 유래산물이 UVB에 의해 유도된 MMP-1과 collagenase의 발현 및 활성을 저해하는지 확인.

㉢ RT-PCR을 통해 보리 및 콩 유래산물이 UVB에 의해 유도된 MMP-1, collagenase의 mRNA level을 저해시키는지 확인.

② 세포 내외에서 교원질 및 탄력섬유 합성량의 증가 효과 확인.

㉠ 3D culture system을 이용하여 보리 및 콩 유래산물의 UVB에 의해 유도된 교원질 및 탄력섬유의 합성 증가 효과를 확인.

③ MMP-1과 collagenase 발현 및 활성과 관련된 단백질 및 전사인자의 발현 및 활성 확인.

㉠ MMP-1과 collagenase의 발현 및 활성에 관련된 단백질들 (MAPKs 등)의 발현 및 활성을 mRNA 수준, 단백질, 그리고 그의 산물 측정을 통해 검색. (zymography, western blot, RT-PCR, ELISA)

㉡ MMP-1과 collagenase의 발현에 영향을 미치는 전사인자로 알려진 AP-1, NF-kappaB의 활성 저해 효과 확인. (Luciferase assay, EMSA)

(나) 세포주모델에서 보리 및 콩 유래산물의 피부보습효능 검증

① 보리 및 콩 유래산물의 히아루론산 (Hyaluronic acid)생성 효소 활성화 효과 확인.

㉠ 보리 및 콩 유래산물들이 수분보유능력이 뛰어난 히아루론산 및 히아루로난의 단백질 발현과 mRNA수준을 증가시키는 지 western blot 및 RT-PCR을 통해 효과를 검증.

㉡ 히아루론산의 합성 효소인 Hyaluronan synthase 1 또는 2 (HAS1, HAS2)의 단백질 발현과 mRNA 수준을 western blot 및 RT-PCR 등을 이용하여 확인.

㉢ 보리 및 콩 유래산물이 HAS1 또는 HAS2의 활성을 증가시키는지 확인.

(다) 보리 및 콩 유래산물의 주름개선효능 및 보습효능에 대한 작용기작 확인

① 지표물질의 피부노화 및 보습저하에 관련된 MAPKs, PI3K 등과 같은 신호전달 체계와 관계있는 인산화 단백질 효소의 발현 및 활성에 대한 저해효과 확인.

㉠ MMP-1, collagenase, procollagen의 발현에 영향을 미치는 신호전달체계를 확인하고, 보리 및 콩 유래산물의 신호전달체계 저해효과를 western blot 등을 통해 확인.

㉡ 저해효과를 보이는 신호전달 인산화 단백질 중 표적 단백질을 탐색하고, 지표물질의 인산화 표적 단백질 활성을 직접적으로 저해시키는지 kinase assay를 통해 검증.

② 지표물질의 피부노화 및 보습저하에 관련된 직접적인 표적단백질을 탐색하고, 지표물질과 관련된 표적단백질과의 결합분자구조를 규명.

㉠ Binding assay를 통해 지표물질이 탐색된 표적단백질에 직접적으로 결합하는지 확인.

㉡ ATP competition assay를 통해 지표물질이 탐색된 표적단백질과 ATP와 경쟁적으로 결합하는지 확인.

㉢ Computer modeling을 통해 지표물질과 표적단백질의 결합 구조를 예측.

나. 제 1-1 협동과제 : 경희대 김선여

(1) 세부 목표 : 동물 모델을 이용한 선별된 보리 및 콩 지표물질의 피부주름개선 및 피부보습효능 및 작용기작 검증

(2) 주요 내용 및 방법

피부 광노화/자연노화 동물 모델에서 보리, 콩 및 최적 배합의 혼합물을 선정하여, 피부 노화 억제 효과, 피부 보습 효능 및 그 관련 기전을 규명하고자 함. 즉 피부 노화 억제 작용을 갖는 최적화 된 표준품을 선별하여 기능성 미용 식품 소재로의 개발을 위한 동물 실험을 수행함.

(가) 동물모델에서 보리 및 콩 추출물 및 유효성분의 자외선에 의해 유도되는 피부주름 억제효과 검증

① 노화가 유도된 동물 모델에서 보리 및 콩 추출물 및 유효성분의 식이 공급에 의한 영향

㉠ 표피의 증식 측정을 위한 조직학적 평가: 표피의 증식 정도를 가시적으로 측정하기 위해 표피 조직을 채취하여 5 μm 로 절단한 후 hematoxylin과 eosin (H&E staining)으로 고정 및 염색하고, 표피 두께를 측정함.

㉡ 피부 주형 제조 및 분석: 주형틀을 동물의 등에 올려놓고 light bodied silicone (SilfloR, Flexico UK) 약 1.5 g과 catalyst, thinner를 각각 1 방울씩 가하여 제조한 silicone 혼합액을 주형틀에 부었다, 완전히 마른 것을 확인한 후 피부에서 주형을 조심스럽게 떼어내어 건조한 곳에서 보관함.

㉢ 빛의 입사각을 20°로 고정하여 생성된 그림자의 명암을 CCD 카메라로 찍어 이미지 파일을 생성 한 후 C+K사(Koln, 독일) Skin viscometer SV 600 프로그램을 이용하여 주름 그림자 명암의 정도를 주름의 양으로 환산하여 정량화함.

② 동물모델에서 선별된 보리 및 콩 추출물 및 유효물질의 피부주름억제 기작 검증

㉠ Western blotting을 이용한 주름관련 생체지표 인자 procollagen type I 및 MMP-1 변화

피부조직의 진피 부분을 lysis buffer를 이용하여 homogenization을 실시함. 얼음에 30분 동안 방치하고 10,000 Xg에서 10분 동안 원심분리를 하여 상층액을 얻음. Bradford 방법으로 단백질을 정량하고 SDS-PAGE를 실시하여, 같은 양의 단백질(30 $\mu\text{g}/\text{lane}$)을 10% 또는

10% Tris-Glycine SDS-PAGE gel에 전기영동 후, nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech)으로 옮긴다. Blocking solution은 5 % skim milk가 포함된 TBS-T로 1시간 동안 상온에서 blocking 하고 4°C에서 overnight하여 primary antibody와 반응시킴. Primary antibody는 procollagen type I (Santa Cruz Biotechnology Inc.) 과 MMP-1는 (Molecular probes)를 사용하였다. washing 단계는 TBS-T로 10분 간격으로 buffer를 갈아줌. Secondary antibody는 HRP (horseradish peroxidase)가 접합되어 있는 항체를 이용하고, ECL system은 Amersham Pharmacia Biotech의 제품을 사용함.

④ 면역 조직 형광법을 이용한 피부의 주름 관련 생체지표인자 Procollagen type I와 MMP-1의 측정: 채취된 피부 조직을 10% 중성 포르말린 용액에 담겨 조직을 고정한 후 순차적인 알코올을 이용한 탈수과정과 xylene 이용한 조직 투명 과정을 거쳐 따뜻한 파라핀에 포배하고, microtomb 이용하여 5 mm 두께의 절편 조직을 준비함. Procollagen I과 MMP-1의 검출을 위하여 1차 항체 (rat anti-human procollagen I amino-terminal monoclonal antibody, rabbit anti-human MMP-1 antibody: Chemicon, USA) 을 1차 항체로, 발색을 위한 2차 항체를 rabbit polyclonal IgG conjugated fluorescein isothiocyanate (FITC; 1: 200 dilution; Sigma, USA)를 사용하여 confocal laser scanning microscopy (Carl Zeiss 510, Oberkochen, Germany) 하에서 확인함.

③ 동물모델에서 선별된 보리 및 콩 추출물 및 유효물질의 피부 보습 효능 검증

㉠ 표피의 수분 함량 측정: 광노화 유발 및 보리, 콩 혼합 식이 공급에 따른 표피 수분 함량 변화를 corneometer를 이용하여 측정함.

㉡ 보습 관련 생체지표 변화 측정: 광노화 유발 및 보리, 콩 혼합 식이 공급에 따른 보습 관련 생체지표의 변화를 HPLC, RT-PCR, western blotting, 아미노산 분석기를 이용하여 각 실험군의 표피에서 측정함.

④ 동물모델에서 선별된 콩, 보리 유래산물의 새로운 작용기작 연구

㉠ GC/MS 및 LC/MS 프로파일링을 통한 대사체 연구를 통한 새로운 작용기전: 광노화 및 자연노화 모델에서의 GC/MS 및 LC/MS 프로파일링을 통한 대사체 연구

다. 제 1-2 협동과제 : 경희대학교 피부생명공학센터 최경숙

(1) 세부 목표 : 보리 및 콩의 추출물 및 유효성분 분석법 확립, 안전성 연구 및 임상실험을 통한 효능 검증

(2) 주요 내용 및 방법

(가) 보리 및 콩의 추출물 및 유효성분 분석법 확립

① 콩의 성분 중 피부주름 및 보습에 유용한 성분 분석법을 확립

- ㉠ 품종간의 유용성분들의 변화와 함량의 차이를 분석
- ㉡ 시료의 표준화를 위한 지표성분을 탐색.
- ㉢ 콩 유래 지표성분의 시료전처리/분석법 확립.

- ② 보리의 유용성분을 분석하고 보리 추출물 및 발효물의 지표성분 분석법 확립.
 - ㉠ 보리 중 유용성분을 분석하고 지표성분을 탐색.
 - ㉡ 시료 표준화를 위한 지표성분을 탐색.
 - ㉢ 보리 추출물 및 발효물 유래 지표성분의 시료전처리/분석법 확립.

(나) 보리 및 콩 유래의 유효물질 분석 및 프로파일링

- ① 콩 유래 지표성분을 분석하고 각 시료들의 HPLC, LC-MS의 profile을 비교분석 지역, 계절 등에 따른 시료들간의 유의성을 비교.

- ② 보리 유래 지표성분을 분석하고 각 시료들의 HPLC, LC-MS의 profile을 비교분석 지역, 계절등에 따른 시료들간의 유의성을 비교.
원료의 입고시 HPLC 프로파일을 비교하여 원료성분의 규격화를 시도하며 원료별 생물전환 전, 후의 변화를 살펴 원료규격화 요인이 될 수 있도록 함. 소재의 기능성 성분 함량이 중요하므로 자수정 찰보리에 대하여는 안토시아닌 함량으로 규격화를 함.

(다) 안전성 연구 : 개발된 원료의 특성에 따라 필요한 안전성 자료를 확보함.

- ① 전통적 사용근거자료
- ② 개발 소재의 국내외 부작용 및 독성 DB 검색, 자료 확보
- ③ 섭취량 평가자료 : 국민영양 조사결과, 섭취량 실태조사결과 등을 근거로 평균섭취량과 제안된 섭취량을 비교 분석한 자료
- ④ 영양평가자료 : 다른 영양성분의 흡수,분포,대사,배설등에 영향을 미치는지를 평가한 자료
- ⑤ 독성시험자료
 - ㉠기본독성시험 : 단회투여독성시험, 3개월이상 반복투여독성, 유전독성시험
 - ㉡추가독성시험 : 생식독성시험, 면역독성시험, 항원성 시험, 발암성 시험 등

(라) 임상실험을 통한 주름 억제 및 보습 효능 검증

- ① 임상을 통한 보습 효능 평가 :제품섭취에 따른 피부 보습효능 평가
 - ㉠ 각질량 변화 측정 :tape stripping
 - ㉡ 수분량 변화 측정 :Corneometer
 - ㉢ 경피수분증발량 (TEWL) 측정
- ② 임상을 통한 피부 주름개선 효능 평가
 - ㉠ 육안평가, 설문평가
 - ㉡ Replica 제작, 영상분석을 통한 주름개선 효능평가
 - ㉢ Primos를 활용한 주름의 입체영상 분석

라. 제 2 협동과제 : 선패식품(주)

(1) 세부 목표 : 보리 및 콩을 이용한 기능성 미용 식품 최적화 및 제품화

(가) 선패식품(주)의 발효기술 65년 전통과 자체 보유한 곰팡이, 효모, 유산균 등의 발효 기술을 통한 관능 최적화 및 지표물질의 안정화에 따른 건강기능식품 개발로 “백년동안”의 기능성 및 건강 브랜드를 이용, 그 후속모델을 제품화하여 매출 100억을 목표로 함.

(나) 효모 및 유산균 발효는 제품의 맛과 기능성을 증가시키는 역할을 할 수 있음.

(다) 국내산 유래의 보리 및 콩의 발효를 통한 피부미용 개선 작용이 우수한 소재 및 유효성분에 대한 표준화 및 최적화 공정을 확립한 후 이를 이용한 건강기능성 음료, 유산균 요구르트 및 과립제제 제품 제조를 통하여 고부가가치 제품을 생산함.

(라) 또한 보리 및 콩의 추출물 및 유효성분을 응용한 제품의 표준화 및 최적화에 따른 제품방법에 관련된 특허 및 지적 재산권을 확보하며 최종 피부미용 개선 작용이 우수한 기능성 식품에 대한 상품기획/유통/마케팅/영업의 효과적 관리를 통하여 상품화/산업화에 빠르게 도입하고자 함.

(2) 주요 내용 및 방법

(가) 보리 및 콩의 발효 공정을 위한 원료 표준화 및 시장성 분석

① 국내산 보리 및 콩의 일반 분석 및 시장 자료 분석 및 실험 디자인 확립을 통한 표준화

㉠ 기능성 원료로 사용될 보리 및 콩에 대한 유효 성분 기초 분석

㉡ 기존 시장에서 보리 및 콩을 활용한 완제품 시장 조사 및 유효성분 분석을 통한 경쟁사 분석

㉢ 보리 및 콩을 이용한 발효물 제조에 대한 주요 실험 디자인 설정

㉣ 원료의 입고 시 HPLC 프로파일을 비교하여 원료성분의 규격화를 시도하며 원료별 생물전환 전, 후의 변화를 살펴 원료규격화 요인이 될 수 있도록 함.

② 피부미용 개선 기능성이 뛰어난 보리 및 콩 가공처리 기술 개발 및 발효 공정 최적화

㉠ 1차 효모 발효 2차 유산균 발효를 통하여 본 제품의 관능 최적화를 위해 발효 공정이 필요

㉡ 보리 및 콩의 최적 전 처리 가공 기술 확립

㉢ 국균(Fungi)을 이용한 발효 공정 최적화

㉣ 유산균을 이용한 발효 공정 최적화

㉤ 효모를 이용한 발효 공정 최적화

㉥ 통계학적 실험법을 통한 최적 Bioreactor의 최적 배양 조건 확립

㉦ Lab-scale 최적 발효 공정 확립

㉧ Pilot-scale 최적 발효 공정 확립

③ Scale-up을 위한 피부미용 개선 지표물질 대량 생산 체제 구축

- ㉠ 보리 및 콩을 이용, 발효 공정 최적화를 통한 대량 생산 체제 구축
 - ㉡ 500(L), 1(ton), 2.5(ton), 5(ton) Fermentor를 이용한 대량 생산 체제 확립
- ④ 지표물질의 표준화 및 발효공정 최적화 제조 공정 확립에 따른 지적 재산권 확보
- ㉠ 보리 및 콩 유래산물의 표준화 제조 방법 관련 국내 및 PCT 특허 확보 진행
 - ㉡ 최적 발효 공정 확립을 통한 보리 및 콩 유래산물 대량 생산 방법 관련 국내 및 PCT 특허 확보 진행

(나) 제형 및 시제품개발

- ① 제형 Type-1 : 기능성 음료
- ㉠ 소비자 니즈 및 동향 분석을 위한 마케팅리서치 실시: 소비자 기호도/선호도 조사
 - ㉡ 기능성 음료 제조 전문 OEM/자체 업체 선정 완료
 - ㉢ 최고 관능에 따른 최적 레시피 구축
 - ㉣ 음료 타입 및 기능성에 따른 최적 용기 선정 완료
 - ㉤ 유통기한 설정시험 구축
 - ㉥ 최종 시제품에 대한 전문 소비자 패널테스트/HUT 조사를 통 소비자 만족도 구축 완료
 - ㉦ 최종 시제품의 안전성 및 피부미용 개선 관련 기능성 발현을 조사
 - ㉧ 최종 제품 제조 관련 제조방법 및 상표 등록에 대한 지적 재산권 진행
- ② 제형 Type-2 : 유산균 요구르트
- ㉠ 소비자 니즈 및 동향 분석을 위한 마케팅리서치 실시: 소비자 기호도/선호도 조사
 - ㉡ 기능성 요구르트 제조 전문 OEM/자체 업체 선정 완료
 - ㉢ 최고 관능에 따른 최적 레시피 구축
 - ㉣ 요구르트 타입 및 기능성에 따른 최적 용기 선정 완료
 - ㉤ 유통기한 설정시험 구축
 - ㉥ 최종 시제품에 대한 전문 소비자 패널테스트/HUT 조사를 통한 소비자 만족도 구축 완료
 - ㉦ 최종 시제품의 안전성 및 피부미용 개선 관련 기능성 발현을 조사
 - ㉧ 최종 제품 제조 관련 제조방법 및 상표 등록에 대한 지적 재산권 진행
- ③ 제형 Type-3 : 과립 제제
- ㉠ 소비자 니즈 및 동향 분석을 위한 마케팅리서치 실시: 소비자 기호도/선호도 조사
 - ㉡ 과립 제제 제조 전문 OEM/자체 업체 선정 완료
 - ㉢ 최고 관능에 따른 최적 레시피 구축
 - ㉣ 과립제제 및 분말 타입 및 기능성에 따른 최적 용기 선정 완료
 - ㉤ 유통기한 설정시험 구축
 - ㉥ 최종 시제품에 대한 전문 소비자 패널테스트/HUT 조사를 통한 소비자 만족도 구축 완료
 - ㉦ 최종 시제품의 안전성 및 피부미용 개선 관련 기능성 발현을 조사
 - ㉧ 최종 제품 제조 관련 제조방법 및 상표 등록에 대한 지적 재산권 진행

- ④ 인체 적용시험 적용을 위한 최종 proto type 제품 개발
 - ㉠ 최종 상품화 전 단계로 인체 적용시험을 위한 건강기능성 음료, 유산균 요구르트, 과일 분말제품의 개발 완료
 - ㉡ 유통기한 및 보존성 설정 완료
 - ㉢ 소비자 패널 테스트/HUT 반복 시험을 통한 소비자 만족도 재현성 확보: 관능, 기호도, 기능성 발현율, 포장, 디자인
 - ㉣ 상표 등록 및 제품 관련 특허 및 지적 재산권 진행

(다) 기능성 소재/제품 개별인정형 진행

: 보습/주름개선 기능성 개별인정 절차 진행 및 보리 복합물 또는 발효물/콩 복합물 또는 발효물의 소재 및 제품 개별인정형 진행

- ① 보리 및 콩 유래 최적 발효물을 이용한 피부미용 개선 건강기능식품 기준 규격 확립
 - ㉠ 콩 추출물 및 발효물 유래의 피부미용 개선 기능성 지표 물질의 품질 기준 규격 설정 완료
 - ㉡ 보리 추출물 및 발효물 유래의 피부미용 개선 기능성 지표물질의 품질 기준 규격 설정 완료
 - ㉢ 유해물질 규격 설정 구축: 보리 콩의 추출물 및 발효물에 대한 원료 및 발효 중간 산물 중금속, 미생물, 곰팡이 독소 및 잔류농약에 대한 유해물질 규격 설정
 - ㉣ 최종 소재/제품의 안정성/안전성/보존성 확보를 통한 규격 설정 완료
- ② 개별인정형 등록을 위한 서류 취합 및 준비: *In vitro*, *In vivo*, 독성시험, 인체적용시험, 제조방법, 품질 기준규격, 유통기한 설정시험
- ③ 개별인정형 등록 전 국내, 외 지적재산권 진행
- ④ 연구/기획/마케팅/영업/유통의 효과적 관리를 통한 피부미용 개선 기능성 소재 및 식품 출시 진행

마. 제 3 협동과제 : (영광군 농업기술센터)

(1) 협동 목표

- ① 기능성 소재화 및 가공식품 개발에 적합한 영광지역 적응 우수 품종 특성평가 및 선발
- ② 지역 맞춤형 보리 재배기술 정립

(2) 주요 내용 및 방법

(가) 지역 적응형 우수 보리 품종 특성평가 및 선발

- ① 국내 유망 보리자원의 수량성, 기능성 물질 분석 등 특성 조사

② 영광지역에 재배가 용이한 품종 선발

(나) 지역 맞춤형 보리 재배기술 정립

① 보리 재배에 적합한 파종량, 파종 및 수확적기 검증

3. 연구범위 및 연구수행 방법

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
세포주모델을 이용한 보리 및 콩 유래산물의 피부주름개선과 피부보습효능 검증	<ul style="list-style-type: none"> ·피부보습 인자인 hyaluronan synthase 2(HAS2)과 피부노화 과정과 관련 있는 단백질인 MMP-1(collagenase)의 발현 및 활성을 western blot을 통해 확인 ·피부노화 과정과 관련 있는 단백질인 MMP-1(collagenase)의 발현 및 활성을 western blot, zymography 통해 단백질 수준에서 측정 	<ul style="list-style-type: none"> ·보리 및 콩 유래산물의 유효성 분석을 효율/신뢰적으로 수행하기 위하여 각 추출용매별 주름개선 및 피부보습효능 평가를 동시에 수행함으로써 피부건강에 효능이 있는 소재 확인
세포주 모델에서 자수정 찰보리 유래산물의 피부주름완화 효능 및 기작 규명	<ul style="list-style-type: none"> ·피부노화 과정과 관련 있는 단백질인 MMP-1(collagenase)의 발현 및 활성을 western blot, zymography, RT-PCR을 통해 단백질과 mRNA수준에서 측정 ·자외선에 의해 생성된 ROS의 생성 및 변화량을 DCF-DA 염색을 통하여 확인 ·ROS를 생성하는 주요 단백질인 NOX(NADPH oxidase) 저해 효과를 Pull-down assay로 확인 	<ul style="list-style-type: none"> 피부주름 형성에 주요한 역할을 하는 MMP-1 단백질의 변화를 측정하고, 이러한 주름형성은 자외선으로 유도되는 ROS에 기인한 것임을 확인함. 또한 자수정 찰보리 유래 색소 성분인 delphinidin이 NADPH oxidase의 활성을 저해함으로써 ROS 생성량을 줄여 피부주름완화 효능을 나타냄을 규명함
세포주 모델에서 자수정 찰보리 및 콩 유래산물의 피부주름개선 및 보습 효능 검증	<ul style="list-style-type: none"> ·피부주름과 관련있는 단백질인 MMP-1, collagenase의 발현 및 활성을 western blot analysis을 통하여 확인 ·피부보습과 관련있는 단백질인 AQP3, filaggrin의 발현 및 활성을 western blot analysis, immunohistochemistry를 통하여 확인 	<ul style="list-style-type: none"> ·피부 주름생성에 영향을 끼치는 인자인 MMP-1과 collagenase의 발현 및 활성을 측정하고, 피부 보습관련 인자로 알려진 AQP3와 filaggrin의 발현 정도를 측정하여 발효 자수정 찰보리와 콩 유래산물이 자외선에 의해 유도되는 주름 형성 및 피부 보습능력 향상 효능을 확인
동물모델에서 발효 콩과 자수정 찰보리 혼합물이 첨가된 식	<ul style="list-style-type: none"> ·광노화 동물모델에서 발효 자수정 찰보리와 콩 혼합물이 첨가된 식이를 공급함. 	<ul style="list-style-type: none"> ·UVB를 조사하지 않은 Normal군, UVB를 조사한 Control군, 양성대조군, 발효 자수정 찰보리와 콩의 배합

이 공급		비율이 5:5, 8:2, 2:8로 처리하는 식이균으로 나누어 총 6마리에 해당하는 광노화 동물모델에 약 4주간 일반식이를 한 후 Normal균, Control균, 양성대조(pycnogenol)균을 제외한 균에 발효 자수정 찰보리와 콩 혼합물이 첨가된 식이를 약 8주간 공급함.
동물모델에서 식이 효율 및 체중 증가 측정	·상기 식이공급에 따른 동물모델에서의 식이 효율 및 체중증가가 측정	·총 6군에 해당하는 광노화 동물모델에서의 식이에 따른 식이 효율과 체중증가를 측정하기 위해서 총기간 약 12주간 중에 매주 사료섭취량과 무게를 측정함.
광노화가 진행된 동물모델의 피부 주름 제조 및 분석	·발효 자수정 찰보리와 콩 혼합물이 첨가된 식이를 공급한 광노화 동물모델의 피부를 채취하고 분석함.	·모든 식이가 끝난 총 6군에 해당하는 광노화 동물모델에서 주름이 형성된 피부를 채취하여 피부주름을 제작하고 피부주름에 따른 주름완화 및 보습개선 효능 검증 및 면역조직화학법에 따른 피부의 변화를 알아보고 웨스턴 실험기법을 이용하여 피부주름관련 생체인자인 Procollagen type-1과 MMP-1와 피부보습관련 생체인자인 AQP3와 filaggrin의 발현 정도를 측정함.
화합물 추출 및 분획	·이차대사산물의 효율적인 추출과 분리를 용이하게 하기 위한 전과정	·유기용매를 이용한 추출 및 계통분획
단일 물질로 정제	·Chromatography를 이용한 물질 분리	·prep-HPLC, MPLC와 같은 고성능 분리 기기를 이용한 정제
구조 동정	·분광학적 기법을 통한 구조해석	·NMR측정 후 data분석을 통한 구조동정
정성 및 정량 분석	·지표성분의 확인 및 함유량 확인	·LC-MS/MS를 통한 분석
발효 공정 표준화	·Fermentor 장비를 이용한 최적 발효 조건 및 품질지표 검토 (실험계획법 적용)	·보리 품종 별 발효에 따른 품질 지표 분석: 자수정보리(알파화) -glutathione : 156.6(mg/L) - β -glucan : 105.3(mg/g) 효모 단일/복합 발효에 따른 품질 지표 분석 -High glutathione 생산균주 : <i>Candida utilis</i> -High β -glucan 생산균주 : <i>Aureobasidium pullulans</i> -복합 발효 결과(최대값) : 5.03 g-DCW/L

		<p>2.12 g-β-glucan/L</p> <p>-비 증식 속도 : 0.887 h⁻¹</p> <p>-균체 증식 수율(Av.) : 0.388 g-DCW/g-sugar</p> <p>-β-glucan 증식 수율(Av.) : 0.331 g-β-glucan/g-sugar</p> <p>회분식 /유가식 배양에 따른 품질 지표 분석</p> <p>-회분식 : 3.73 g-DCW/L : 1.48 g-β-glucan/L : 12.55 g-glutathione/L</p> <p>-유가식 : 3.47 g-DCW/L : 1.81 g-β-glucan/L : 12.62 g-glutathione/L</p>
대량 생산 표준화	Fermentor 장비를 이용한 최적화/표준화 수립 (실험계획법 적용)	<p>실험계획법(DOE)을 적용, 1ton fermentor 시생산을 통한 회분 식/유가식 배양에 따른 품질 표준화 수립</p> <p>효모 복합/회분식 최적화 :β-glucan : 283(mg/g) (자수정보리 원물 대비 약 3.5배 증 가)</p>
시제품 개발	<p>Formulation(배합) 전문 OEM 선정을 통한 배합, 레시피 구축</p> <p>1.음료 : (주)경북과학대학 식품공장</p> <p>2. 껌/캔디 : (주)대영식품</p> <p>3. 환 : (주)엘라이프</p> <p>소비자 평가(HUT) 평가: 사내 패널 기호도/ 선호도(9점 척도법)</p>	<p>보리 발효소제 : 콩 발효소제 = 75 : 25</p> <p>겔 타입 음료 파우치 1종 : 3.5% 첨가</p> <p>: HUT결과 기호도(9점척도) 77%</p> <p>껌 1종 : 1% 첨가</p> <p>환 3종 : 27-28% 첨가</p>
영광지역 적용 품 종 특성 평가 및 재배기술 정립	<p>품종별 지역적응 특성조사 발아보리의 특성 조사</p> <p>시험용 종자공급</p>	<p>품종별 생육특성 발아보리의 성분분석</p> <p>시험포산 생산종자 샘플 제공</p>

<표 1. 연구범위 및 연구수행 방법>

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1절 콩 제품의 기술개발 현황

1. 국내 콩 산업 현황

- 가. 우리 나라 콩의 연간 소비량은 약 140만 톤으로, 사료용이 96만 톤, 식용은 44만 톤 내외
나. 1인당 연간 콩 소비량은 8.0kg('09)으로 쌀과 밀 다음으로 많으며 국내 생산액은 4,358억
다. '10년 수입 콩의 소비 형태는 두부용이 62.6%로 가장 많았고, 장류용 21.1%, 두유용 14.4%,
메주용 2.1% 등으로 조사
- 가장 규모가 큰 두부시장은 '09년 기준 4,500억 원 규모이며 포장두부가 62%(2,800억)을 차지

2. 세계 콩 산업 현황

- 가. 미국 식품시장은 '09년 기준 45억불로 전년대비 7.1% 성장하였으며, 콩을 활용한 식품의 수요도 지속적으로 늘어나고 있는 추세
- 나. '08년 미국대두협회(USB)에서 조사한 미국 소비자 인식조사에서 85%가 콩 식품을 건강식품으로 인식
- 체중감소(31%), 심장병예방(31%), 암예방(23%)의 순이며, 미국 소비자의 32%는 한달에 1번 이상 콩식품이나 음료를 소비
- 다. 미국 콩 관련 식품은 두유가 가장 큰 비중인 26%를 차지하고 있고, Energy bars(18%), 콩고기류(15%), 두부(6%) 등의 순으로 구성
- 가정에서 콩을 접하는 빈도는 간장이 42%로 가장 높고, 두유 등 콩 식품이 19%, 에너지 바(bars) 15%, 팟콩 14%의 순

3. 콩 제품 연구 현황

가. 콩 기능성 연구 현황

- (1) 콩에는 이소플라본, 사포닌, 레시틴, 피틴산 등의 매우 다양한 기능성을 가진 물질이 존재하여 최상의 기능성 식품 소재
- (가) 이소플라본은 식물성 여성호르몬(에스트로겐)으로 콩을 대표하는 기능성 물질
 - (나) 여성의 유방암 감소, 폐경기 증상 완화, 전립선질환 예방, 골다공증 방지 효과 등이 보고되었으며 상품화가 가장 활발
- (2) 콩 단백질과 올리고당은 기존의 영양적 가치 이외의 콜레스테롤 조절, 노화방지 등 새로운 기능성들이 보고

나. 미래 수요 대비 기능성 R&D 강화

(1) 국내에서 보유한 다양한 유전자원을 활용한 산업화 기술 개발을 강화하고, 이와 연계된 고부가가치 콩 제품의 해외 진출 추진

(가) 고부가가치 특수 원료 콩과 관련 산업화 기술 개발을 강화하여 국내 콩 산업 활성화 및 해외 진출에 기여

(2) 국내외 연구가 미진하거나 향후 산업적 파급효과가 큰 분야의 기능성 및 산업 소재화에 대한 기술 선점 필요

(가) 콩 발효식품, 콩펩타이드, 유색종피, 콩잎, 줄기, 뿌리혹 등 콩유래 및 콩 부산물을 이용한 제품개발 잠재력이 매우 높은 편

제 2절 보리 제품의 기술개발 현황

1. 국내 보리 산업 현황

가. 보리의 주된 활용은 “가공”이며, 대부분 맥주 제조용(양조용)으로 소요되었으나 최근 혼반용, 빵 및 떡류, 국수류, 장류, 음료류 등의 개발이 활발하게 이루어지고 있는 추세임

나. 최근 “건강”의 중요성이 증대되면서 도정하지 않은 곡물(현미, 통밀, 통보리)의 가치가 새롭게 부각되고 있으며, 특히 보리의 섭취가 콜레스테롤 저하 및 당저하에 효과적인 것으로 연구됨

다. 보리를 원료로 하는 가공제품이 다양하게 개발 및 유통되고 있어 가공상품화를 통한 보리 수요 증대, 소비활성화 가능성 기대

2. 해외 보리 산업 현황

가. 전 세계 곡류 중 네 번째로 생산량이 높으며, 사료, 맥주 및 요리 용도로 두루 사용되고 있음

(1) 연간 생산량은 ‘10년 1억 2천만톤 규모로, 전체 곡류 생산량의 5%를 차지하며 네 번째로 생산량이 많은 작물

(2) 주요 생산국으로는 독일, 프랑스, 우크라이나, 러시아, 스페인 등으로, 전 세계에서 고르게 재배되는 추세

3. 보리 제품 연구 현황

가. 보리의 영양학적 가치 검증

(1) 세계인의 식단에서 흰 곡물이 성인병의 주 원인으로 지목됨에 따라, 보리나 호밀로 만든 통곡물 식품이 주목받고 있음

(가) 보리에는 성인병 및 암 예방에 좋은 베타글루칸, 식이섬유, 비타민 B, 기능성 아미노산 GABA 등이 다량 함유

(나) 아라비노자일린(Arabinoxylan)은 장을 튼튼하게 하여 대장암 예방 효과를 가지며, 먹는 심장약으로 불리는 베타글루칸은 쌀과 옥수수의 46배 이상 함유

나. 건강기능성 식품으로서의 보리

(1) 건강기능성식품의 천국인 미국, 일본에서 보리의 풍부한 기능성 성분에 주목하여 다양한 상품을 개발하는 추세

(가) 일본에서 보리싹의 영양적 가치와 건강기능성을 증명한 이래, 건강기능식품으로의 개발이 활발해져 분말 차 등 개발이 활발

(나) 보리의 어린 순인 새싹보리는 알칼리 함유량이 토마토의 11배 이상으로, 산성 식품을 많이 섭취하는 현대인의 질병 치유에 효과가 높은 것으로 밝혀짐

(다) 국내에서도 기능성이 높은 보리를 이용한 가공식품 및 기능성 제품이 시장에서 인기를 구가하고 있음

(라) 참다운녹즙의 혈당강하 기능성 ‘당스타’, 청보리 식품의 보리싹차 ‘청녹수’, 농업법인 하늘빛의 새싹전두유 ‘새싹콩후’ 등

(마) 국내의 자연주의 화장품브랜드 이니스프리는 보리새싹추출물이 함유된 스크럽, 세안제 등을 개발

제 3절 이너뷰티 제품의 기술개발 현황

1. 이너뷰티 산업 현황

가. 이너뷰티(Inner Beauty)란 피부에 바르는 화장품이 아닌 먹어서 피부관리 및 몸매관리를 하는 화장품 개념의 식품으로, 화장품영역과 건강기능성 식품 영역까지를 포함하는 분야

나. 최근 2~3년 새 한국의 이너뷰티 시장은 급격히 성장. 그러나 이웃의 일본에 비하면 아직 걸음마 단계. 일본에서는 수분 공급뿐 아니라 화이트닝, 체질 개선, 다이어트에까지 다양한 카테고리의 제품이 수도 없이 쏟아지고 있음.

다. 업계는 2009년 50억 원이던 이너뷰티 시장이 2013년 3000억 원 규모로 성장할 것으로 전망

라. 제약, 식품, 화장품 업계의 경계가 허물어지고 있음. 3각파도는 기능성 식품 분야에서 거세게 일고 있음. 제약업체는 혈액순환촉진 기능이 있거나 비타민을 첨가한 제품을 잇따라 내놓고, 건강기능식품시장에 뛰어드는 추세. 화장품업계는 체지방 감소 등에 효과가 있다는 콜라겐

음료 등 ‘먹는 화장품’으로 시장경쟁에 나섬. 식품업계는 제약과 화장품 업계의 도전에 맞서 탈모방지식품 개발에 나서는 등 영역을 확장 중.



<그림 2. 건강기능식품 시장의 변화>

2. 이너뷰티 대표제품

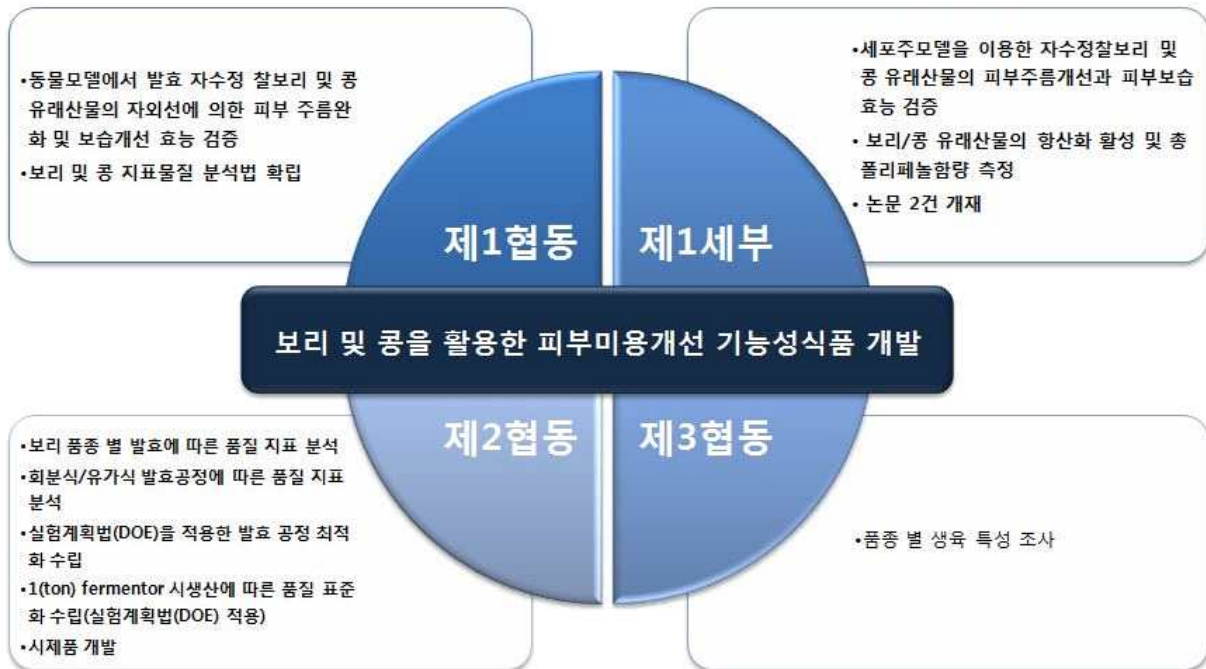
상품명	기업명	이미지	설명
씨앗 나노 콜라겐 뷰티젤리	LG 생활건강 (한국)		젤리형 타입의 나노 콜라겐 뷰티젤리. 저분자 피쉬콜라겐펩타이드 2나노콜라겐이 함유되어 있으며, 부원료로 천연 비타민C를 함유한 아세로라추출물분말 및 히알루론산혼합분말, 히비스추출물분말이 함유.
이너비 리액티브 콜라겐	CJ 제일제당 (한국)		프랑스 청정 북대서양에서 찾은 98.8% 고순도 콜렉티브콜라겐과 히알우론산이 각각 2,000mg & 120mg 함유.
이너비 뷰티 비타민	CJ 제일제당 (한국)		피부수분장벽 역할을 하는 쌀겨추출 글루코실세라마이드와 비타민C 셀레늄 비타민A 비오틴이 함유.

<p>이너비 아쿠아 बैं크</p>	<p>CJ 제일제당 (한국)</p>		<p>자기무게의 1000배의 수분을 흡수, 저장하는 피부 속 수분저장고 히알루론산 함유.</p>
<p>VB프로그램 예진생 진생베리 명작수</p>	<p>아모레퍼시픽 (한국)</p>		<p>천삼화 홍삼에 인삼 열매 진생베리를 더한 고농축 앰플형 홍삼. 피로 개선과 면역력 증진, 혈행에 도움.</p>
<p>VB프로그램 에스라이트 슬리머 DX</p>	<p>아모레퍼시픽 (한국)</p>		<p>주기능원료인 APIC 대두배아추출물은 몸 속 지방산 산화를 조절하는 효소를 활성화시켜 체지방 감소에 도움을 줌.</p>
<p>핑크퐁 콜라겐 워터</p>	<p>에뛰드 하우스 (한국)</p>		<p>흡수가 빠르도록 작게 분해한 콜라겐을 1000mg 함유한 마시는 뷰티 워터. 높은 수준의 콜라겐 함유량 대비 칼로리가 낮음.</p>

<표 2. 이너뷰티 대표제품 사례>

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구 협력 기관별 연구결과 요약



<그림 3. 연구 협력 기관별 연구결과>

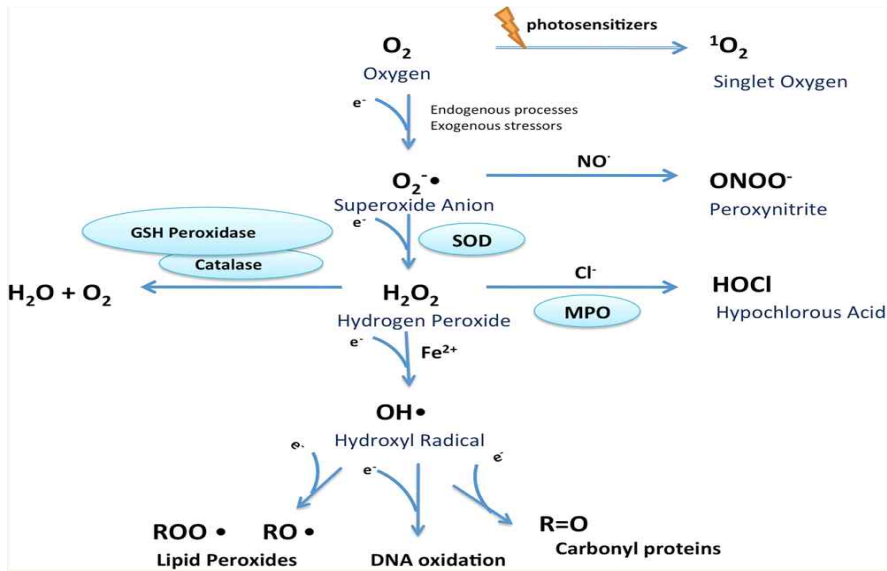
제 2 절 연구 협력 기관별 연구결과

1. 제1세부: 세포주모델을 이용한 보리 및 콩 유래산물의 피부주름개선과 피부보습효능 검증 (서울대학교)

가. 자수정 찰보리 원물 및 발효물 간의 유효성분 분석

(1) 항산화 활성

Free radical(활성산소)는 호흡하는 산소와는 다르게 불안정한 상태에 있는 산소로서 유해산소라고도하며, 환경오염과 화학물질, 자외선, 혈액순환장애, 스트레스 등으로 산소가 과잉 생산됨.

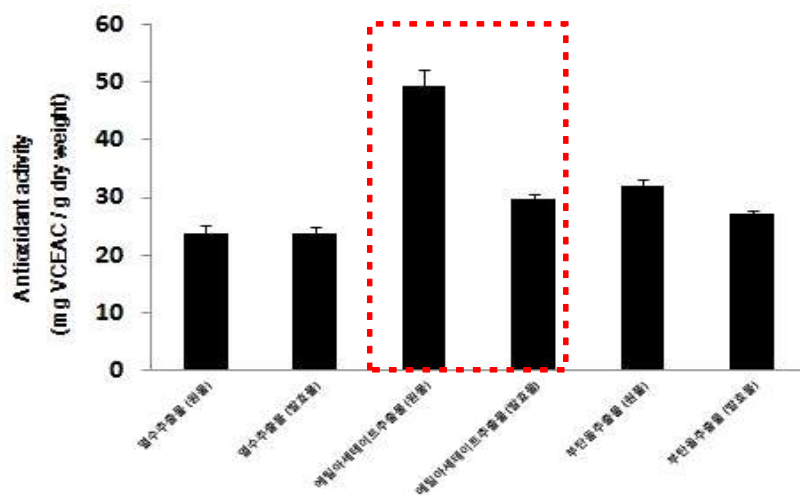


<그림 4. 활성산소 생성 기작>

이렇게 과잉 생산된 활성산소는 사람의 몸속에서 산화작용을 일으킴. 그 결과 세포막과 DNA, RNA 외의 모든 세포 구조가 손상되고 손상의 범위에 따라 세포가 기능을 잃거나 변질 됨. 이와 함께 생리적기능이 저하되어 각종 질병과 노화의 원인이 됨. 따라서 항산화 활성이 높을수록 활성산소의 산화작용을 억제시켜 피부 노화를 지연시킬 수 있음.

그러므로 자수정 찰보리 원물 및 발효물의 추출용매에 따른 항산화 능력을 측정 한 뒤 비교/분석하였음.

(가) 자수정 찰보리 원물 및 발효물 간의 항산화 활성 비교



<그림 5. 자수정 찰보리 원물/발효물 항산화 활성>

자수정 찰보리 원물 및 발효물을 각각 열수, 에틸아세테이트, 부탄올을 용매로 추출하여 각 추출물 간의 항산화활성을 DPPH scavenging activity assay 방법을 통해 비교평가 하였음. 각 용매 중 에틸아세테이트 추출물에서 항산화 활성이 가장 높았음.

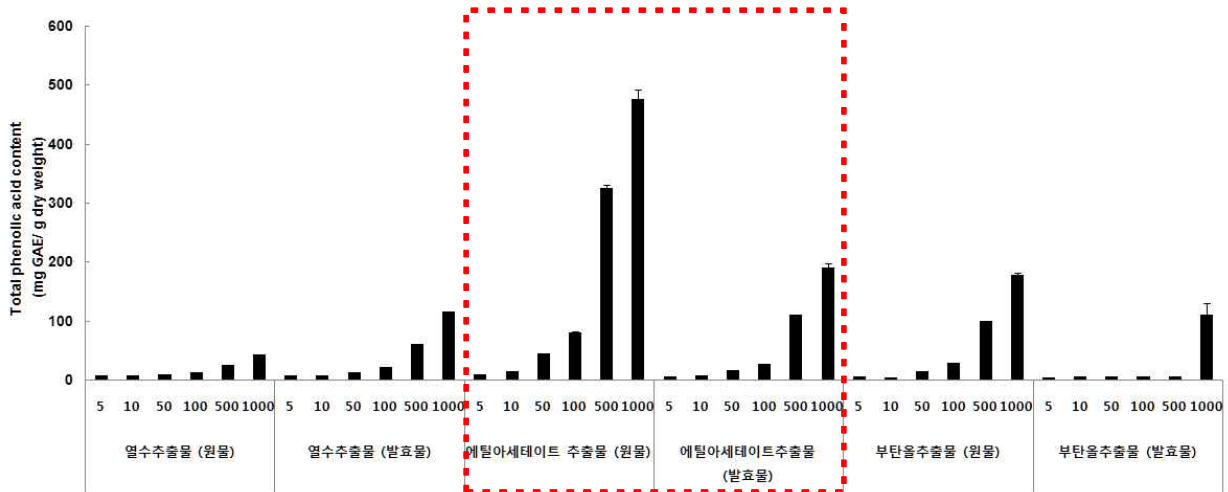
(2) 폴리페놀 함량

폴리페놀은 식물 속에 들어있는 페놀화합물(방향족 히드록시화합물)중 히드록시기가 둘 이상 있는 화합물을 통틀어 이르는 말로, 활성산소를 제거함으로써 세포와 체내 화학물질들을 보호하는 항산화제의 역할을 함. 따라서 폴리페놀의 함량이 많을수록 천연 항산화제로서의 역할을 기대할 수 있음.

그러므로 자수정 찰보리 원물 및 발효물의 추출용매에 따른 폴리페놀 함량을 측정한 뒤 비교 및 분석하였음.

(가) 자수정 찰보리 원물 및 발효물 간의 폴리페놀 함량 비교

항산화 활성 측정과 동일한 용매(열수, 에틸아세테이트, 부탄올)를 이용한 자수정 찰보리 원물 및 발효 추출물을 Total phenol phytochemical assay 방법을 이용하여 총 폴리페놀 함량을 측정하였음. 원물 및 발효물 모두 에틸아세테이트 추출물에서 폴리페놀 함량이 가장 높았음.



<그림 6. 자수정 찰보리 원물/발효물 폴리페놀 함량 비교>

(3) 고찰

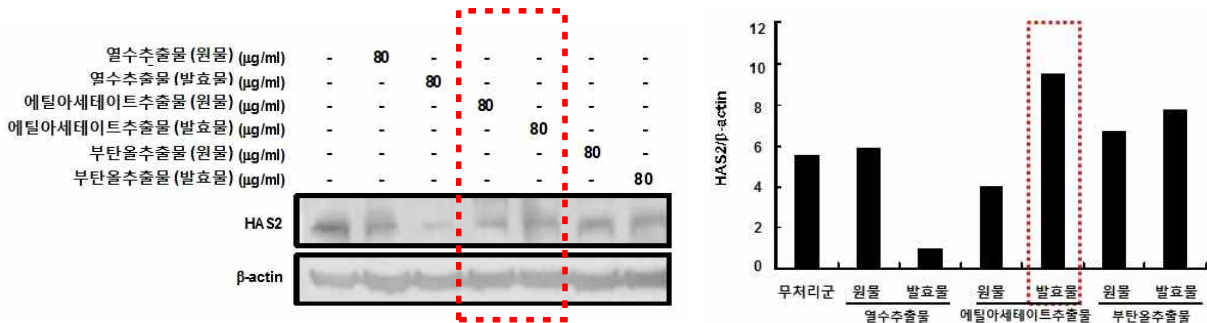
3가지 추출용매(열수, 에틸아세테이트, 부탄올)별 자수정찰보리 원물 및 발효물의 항산화 활성 및 폴리페놀 함량을 측정해 본 결과 에틸아세테이트 추출물에서 가장 유효성분이 많을 것으로 추정하였음.

하지만 총 폴리페놀 함량이 많고 항산화 활성이 좋다고 하여 피부주름개선 및 피부보습 증진 효과도 일치할 것이라고 볼 수 없으므로, 각 추출용매별 피부건강개선 효능평가를 수행하기로 결정하였음.

나. 자수정 찰보리 원물 및 발효물 간의 피부건강개선 효능평가

(1) 피부보습

자수정 찰보리 원물 및 발효물 간의 피부보습 효능평가 및 적절한 추출용매 선택을 위하여, 보습 인자인 hyaluronan synthase 2(이하 HAS2)의 발현 및 활성을 western blot을 통해 단백질 수준에서 그 효능을 확인함.

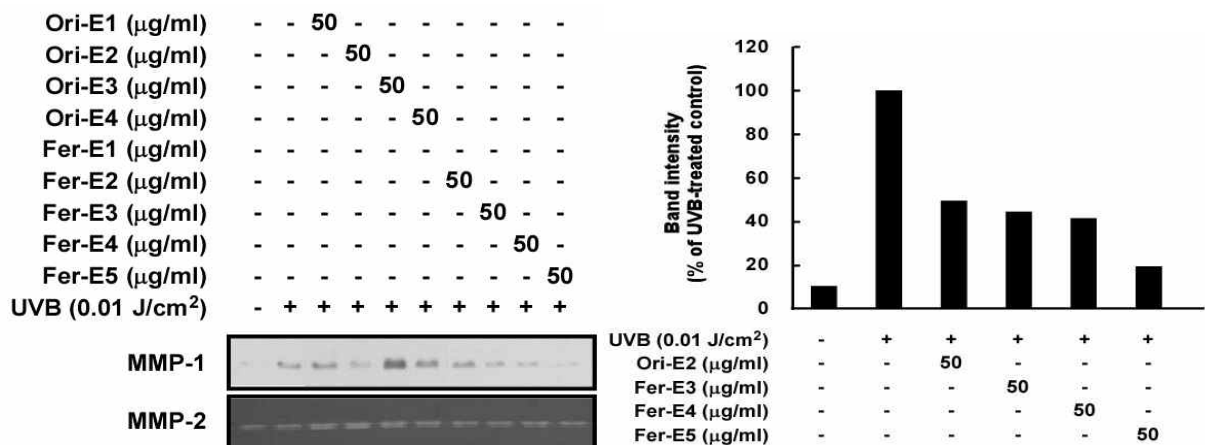


<그림 7. 자수정 찰보리 원물/발효물 HAS2 발현 비교>

각 추출용매 및 원물/발효물 중 에틸아세테이트 발효추출물에서 HAS2 발현이 가장 높았음. 이러한 경향은 항산화 활성 및 총 폴리페놀 함량 분석결과와 견주어 보았을 때, 추출용매로써 에틸아세테이트가 가장 좋음은 동일하나, 발효공정을 거쳐 총 폴리페놀 함량은 감소되었으나 실제 피부보습 개선에 효과적인 유효성분이 생성됨을 알 수 있었음. 따라서 본 결과를 본 결과를 제 1-2 협동과 공유하여 향후 유효성분 규명 시, 추출용매로 에틸아세테이트를 사용하기로 결정하였음.

(2) 피부주름개선

자외선 조사에 의한 피부노화는 MMP-1(collagenase) 단백질의 과발현 및 활성증가를 유도함. 이러한 과정은 자외선에 의한 활성산소 생성과 매우 밀접한 관련이 있으며, 그로 인한 세포손상이 주름형성을 촉진함. 따라서 항산화 활성측정 결과를 바탕으로 에틸아세테이트를 추출용매로 한 원물/발효 추출물 분획의 주름개선효능을 비교평가 하였음. 본 사항은 제 1-2 협동과 공유하여 에틸아세테이트 추출물 내 지표성분 및 기능성 물질을 발굴하기 위하여 함량 기준으로 분획물을 선정하였음.



<그림 8. 자수정 찰보리 원물/발효물 MMP-1 발현 비교>

에틸아세테이트 원물/발효 추출분획물 비교분석 결과 전반적으로 발효추출물에서 주름개선 효능이 더욱 우수하였음.

(3) 고찰

시료(자수정 찰보리 원물/발효 추출물) 내 유효성분의 함량과 실제 피부보습 및 주름개선 효능과 일치하지 않음을 확인함. 이는 발효공정을 통하여 피부건강을 증진시키는 성분들이 다수 생성되었으며, 자수정 찰보리 자체를 이용하는 것보다 발효물을 소재화하는 것이 더욱 의미 있음을 밝힘. 하지만 주름개선 효능을 보인 에틸아세테이트 발효추출물을 제 1-2협동 기관에서 구조동정을 수행하였으나, 그 함량이 매우 적어 자수정 찰보리 속 지표물질 검증을 못하였음. 따라서 본 연구기관은 보리 속의 지표성분으로 알려진 beta-glucan을 기능성 물질로 선정하고자 함. 1) DUO WEI, MD et al., Glucan stimulates human dermal fibroblast collagen biosynthesis through a nuclear factor-1 dependent mechanism, WOUND REP REG 2002;10:161 - 168의 연구결과에서는 Normal human dermal fibroblast에 glucan phosphate를 처리한 결과 type1/type3 procollagen mRNA 발현량이 증가하였고 collagen 발현량 또한 농도 의존적으로 증가함을 확인하였음. 2) K.-I. Tanaka et al., Anti-Wrinkle Therapy Significant New Findings in the Non-Invasive Cosmetic Treatment of Skin Wrinkles with Beta-Glucan, International Journal of Cosmetic Science, 2005, 27, 291 - 293의 결과 8주간의 β -glucan 얼굴도포 시, 피부 주름과 거친 정도가 유의적으로 개선됨을 규명하였음. 또한 3) 박은경 et al., β -Glucan 적용 후 피부의 수분, 유분, 멜라닌지수, 홍반지수 변화에 관한 연구, 한 피부미용교육학술지 제1권(3); 83에서는 6개월간 피부질환 경험이 없는 20대 여성 10명에게 총 4주간 2주동안 1일 2회로 β -glucan 1% essence을 도포한 결과 피부 수분함량이 증가하였고 유분도, 멜라닌지수, 홍반지수가 감소함을 밝혔음.

따라서 이를 토대로 beta-glucan이 지표물질임과 동시에 피부건강 개선 기능성 물질로 선정하기에 타당하다고 봄. 그러므로 자수정 찰보리 내 함량이 적은 polyphenols을 찾아내어 규명하는 것보다는, beta-glucan을 기능성 물질로 선정하여 향후 임상실험 및 시료 표준화, 제품화 과정에 활용함이 타당하다고 사료됨.

다. 자수정 찰보리 유효산물인 Delphinidin의 피부주름완화 효과 규명

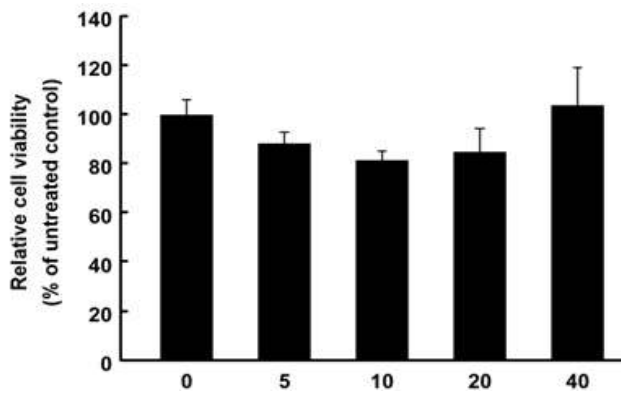
타 품종과 달리, 자수정 찰보리는 자색을 띰. Delphinidin(cyanidin 3-glucoside)은 1) Mi-Jung Kim et al., Relationship between Phenolic Compounds, Anthocyanins Content and Antioxidant Activity in Colored Barley Germplasm, J. Agric. Food Chem., 2007, 55(12), 4802 - 4809에서의 규명한 것과 같이 보라색 보리에서 가장 많이 함유된 antocyanin이며, 자색 보리 외에도 푸른색, 검은색 보리에도 가장 많은 성분임. 그 외에도 2) Guillermo G. Bellido and Trust Beta, Anthocyanin Composition and Oxygen Radical Scavenging Capacity (ORAC) of Milled and Pearled Purple, Black, and Common Barley, J. Agric. Food Chem., 2009, 57(3); 1022 - 1028, 3) D. B. Mullick et al., ANTHOCYANINS AND

ANTHOCYANIDINS OF THE BARLEY PERICARP AND ALEURONE TISSUES, Canadian Journal of Plant Science, 1958, 38(4): 445-456 에서 유색 보리 및 과피의 anthocyanin에는 delphinidin이 함유되어 있다는 선행 연구가 있음.

또한 자수정 찰보리와 유사한 자수정 찰쌀보리의 anthocyanin 성분 함량변화를 추적한 ‘농촌진흥청, 작지만 강한 농업육성을 위한 품목별 농업소득 향상 운영 매뉴얼/식량작물분야, page 39’ 자료에서 역시 delphinidin이 가장 풍부한 anthocyanin계 성분임이 제시되어 있음.

따라서 자수정 찰보리만의 차별화된 특색을 연구하고자 유색 보리 anthocyanin계열의 가장 풍부한 색 성분인 delphinidin의 자외선에 의한 주름형성을 개선함을 확인하고, 그 작용 기작을 피부세포주 모델을 통하여 규명하였음.

(1) Delphinidin의한 세포독성 확인

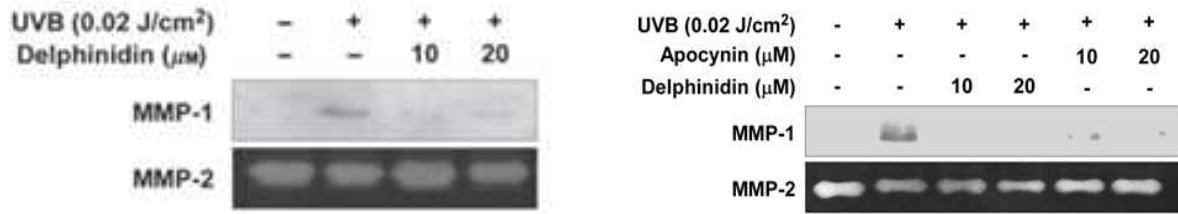


<그림 9. Delphinidin에 의한 세포독성 확인>

Delphinidin에 의한 인간섬유아세포(human dermal fibroblast)에서 세포독성 확인을 위해 MTT assay를 수행한 결과, 40 uM까지 세포독성을 나타내지 않아 추후실험의 delphinidin의 농도는 10, 20 uM로 설정하여 실험을 진행하였음.

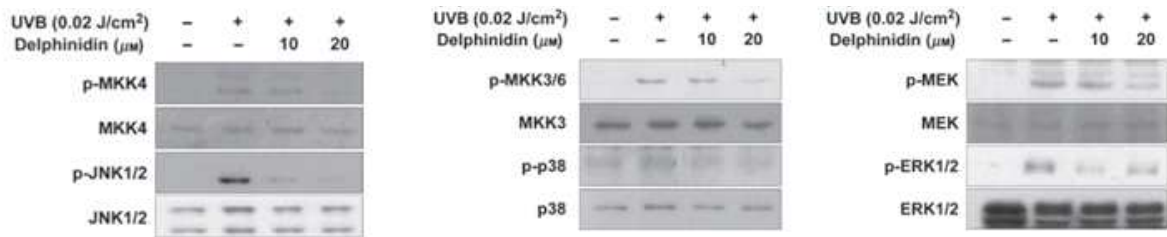
(2) Delphinidin의 피부 주름 형성 억제 효능 확인

자외선 조사에 의한 주름형성 관련 지표인 Metalloproteinases-1(이하 MMP-1)이 과발현되고 이의 지속적인 발현은 진피층을 이루고 있는 콜라겐을 분해시켜 피부주름형성을 촉진시킴. 따라서 이를 delphinidin이 억제할 수 있는지 확인한 결과, delphinidin이 효과적으로 UVB에 의해 유도된 MMP-1 발현을 농도 의존적으로 억제함. 또한 ROS 생성효소인 NADPH oxidase의 저해제인 Apocynin보다 억제효능이 좋은 것을 확인.



<그림 10. Delphinidin에 의한 피부 주름 형성 억제 효능 확인>

(3) Delphinidin의 MMP-1 발현 관련 신호전달 인산화 효소 활성 억제 효과 확인

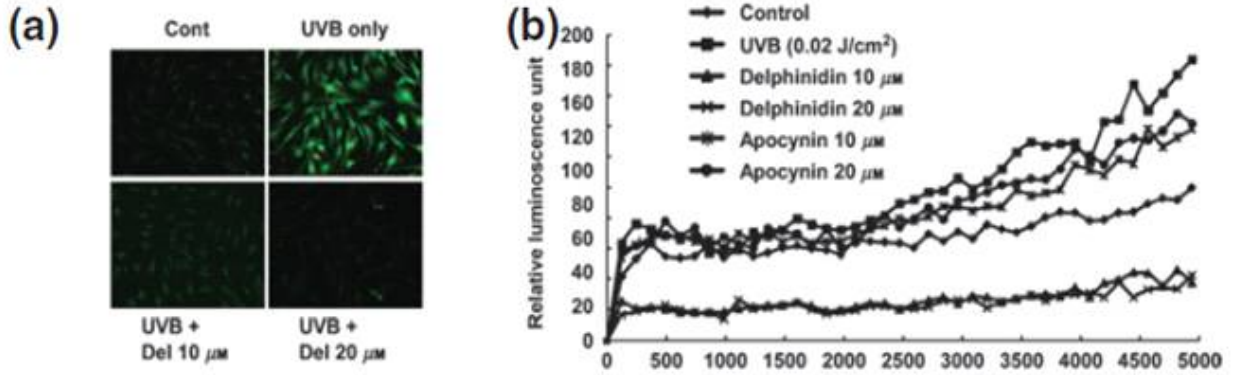


<그림 11. Delphinidin의 MMP-1 발현 관련 신호전달 인산화 효소 활성 억제 효과 확인>

세포 MMP-1 발현에 있어 주요한 역할을 하는 상위 인산화 효소 (JNK, ERK, p38)의 활성화에 delphinidin이 미치는 영향을 western blot analysis를 통해 탐색하였음. Delphinidin은 UVB에 의해 유도되는 JNK와 ERK, p38의 인산화를 농도의존적으로 억제함. 또한 JNK, ERK, p38의 상위 인산화효소인 MKK4, MKK3/6, MEK 또한 delphinidin이 농도의존적으로 인산화를 억제함을 확인함. Delphinidin이 이런 인산화효소들의 인산화를 이 모두 억제함에 따라서 자외선에 의한 주름생성에 있어서 초기단계에서 중요한 ROS 생성에 관여할 것으로 생각되어 추후실험을 delphinidin의 ROS 생성억제효능을 확인하는 방향으로 설정.

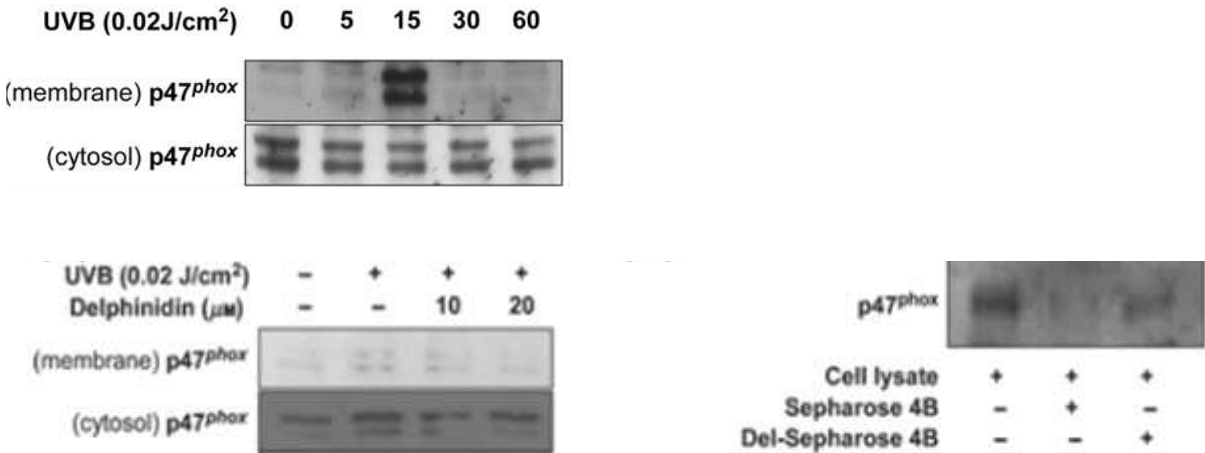
(4) Delphinidin의 ROS 생성 억제 효과 확인

자외선으로 유도되는 MMP-1 발현과정에서 초기단계에 관여하는 ROS의 생성의 delphinidin의 억제효능을 2',7'-dichloroflourescein diacetate (이하 DCF-DA) 염색을 통해 확인하고 이것의 생성효소인 NADPH oxidase(이하 NOX)의 활성을 확인하였음. Delphinidin은 자외선으로 생성되는 ROS를 농도의존적으로 억제하는 것을 확인함. 또한 ROS의 생성효소인 NOX의 활성을 이 것의 저해제인 Apocynin보다 좀 더 억제하는 것을 확인. 따라서 delphinidin의 ROS 생성 억제가 ROS의 생성효소인 NOX의 활성을 억제함에 따라 줄이는 것으로 생각되어 추후 실험을 delphinidin의 NOX에 대한 영향을 확인하는 방향으로 설정.



<그림 12. Delphinidin의 ROS 생성 억제효과 확인>

(5) Delphinidin의 NADPH oxidase 활성 억제에 의한 ROS damage 감소 확인



<그림 13. Delphinidin의 NADPH oxidase 활성 억제에 의한 ROS damage 감소 확인>

자외선으로 유도되는 NOX의 활성화는 세포질 안에 있는 단백질들이 NOX complex를 이루어 세포막으로 이동하여 ROS 생성이 이루어짐. 따라서 NOX complex의 세포막 이동을 delphinidin이 억제하는지 western blot assay를 통해 확인. NOX complex의 구성단백질인 p47^{phox}가 자외선 조사후 15분후 세포막으로 이동하는 것을 확인하였고 이것은 자외선 조사 후 15분후 NOX의 활성이 시작되는 것을 의미함. 따라서 delphinidin의 자외선으로 유도되는 p47^{phox}의 세포막 이동 억제 효능을 15분에 확인한 결과 농도의존적으로 세포막 이동을 줄이는 것을 확인. 또한 delphinidin이 p47^{phox}에 직접적인 결합을 통해서 영향을 미치는지 binding assay를 통해 확인한 결과, Delphinidin이 p47^{phox}에 직접적인 결합을 하는 것을 확인함.

(6) 연구결과

MMP-1은 자외선으로 유도되는 피부주름 형성과 관련된 가장 중요한 인자임. 보리의 유효 성분 중의 하나인 delphinidin이 UVB에 의해 유도된 MMP-1의 발현을 농도의존적으로 억제시키고, MMP-1 발현에 영향을 미치는 상위 인산화효소인 JNK, ERK, p38 그리고 이것의 상위 인산화 효소인 MKK4, MKK3/6, MEK를 농도의존적으로 억제시키는 것을 확인하였음. 이런 인산화효소들을 모두 억제함에 따라 자외선으로 인한 주름생성에 초기단계에서 중요한 ROS 생성에 관여 할 것으로 생각되어 ROS 억제효능을 확인함. 그 결과 Delphinidin은 UVB에 의해 유도되는 MMP-1 발현에 초기단계에 발생하는 ROS생성을 억제하고 이것은 ROS 생성효소인 NOX의 활성을 저해하여 억제하는 것을 확인하였음. 또한 delphinidin이 NOX의 활성 과정 중 NOX complex 형성 후 세포막으로 이동과정을 억제하는 것을 확인하였고, NOX complex의 구성단백질인 p47^{phox}에 직접적인 결합을 통해서 NOX 활성을 억제하는 것을 확인하였음.

라. 대두 원물 및 발효물 간의 피부건강개선 효능평가

본 연구진이 개발하고자 하는 개별인정 소재 및 제품은 영광군의 자수정 찰보리와 대두 발효 복합물임. 따라서 1세부는 제 1-2 협동과 연계하여 자수정 찰보리 및 대두의 지표 혹은 기능성 물질을 규명하고자 공동연구를 수행하였음. 하지만 제 1-2협동에서 해당 실험을 수행한 결과 대두의 지표물질이 Daidzien, Genistein임을 NMR을 통해 확인하였음. 하지만 이 성분들은 1) Barbara Iovine et al., A Comparative Analysis of the Photo-Protective Effects of Soy Isoflavones in Their Aglycone and Glucoside Forms, International Journal of Molecular Sciences, 2012 (13) 16444-16456에서는 UVB에 의한 피부세포의 DNA damage 및 염증발현을 감소시킴으로서, 자외선에 의한 피부노화를 억제하고. 이는 각각의 Daidzein, Genistein 개별 물질 보다 glycoside 및 aglycan mixture에서 더욱 우수한 효능을 보임을 세포수준에서 확인하였음. 2) Tsu-Man Chiu, Chieh-Chen Huang, Tzu-Ju Lin, Jia-You Fang, Nan-Lin Wu, Chi-Feng Hung., In vitro and in vivo anti-photoaging effects of an isoflavone extract from soybean cake., Journal of Ethnopharmacology., 126(1):p108-13.에서도 역시 UV로 유도한 피부노화를 isoflavone extract가 피부두께를 정상수준으로 개선하고, 표피 수분손실량을 억제하는 것을 확인하였음. 이 외에도 다수의 연구논문이 발행되어 있었음. 따라서 이들의 효능 및 기작규명을 하는 것은 무의미하다고 봄.

본 문헌을 토대로, 대두 속의 single compound인 Daidzein, Genistein 각각 보다는 추출물에서의 그 효능이 좋음을 확인하였으며, 본 연구진은 지표 및 기능성 물질로 선정된 Daidzein, Genistein 함량이 높은 발효 추출물을 통하여 더욱 우수한 효능을 나타내는 복합물을 개발하기로 하였음.

다. 보리, 콩 유래 물질의 표적단백질 규명

(1) 연구개요

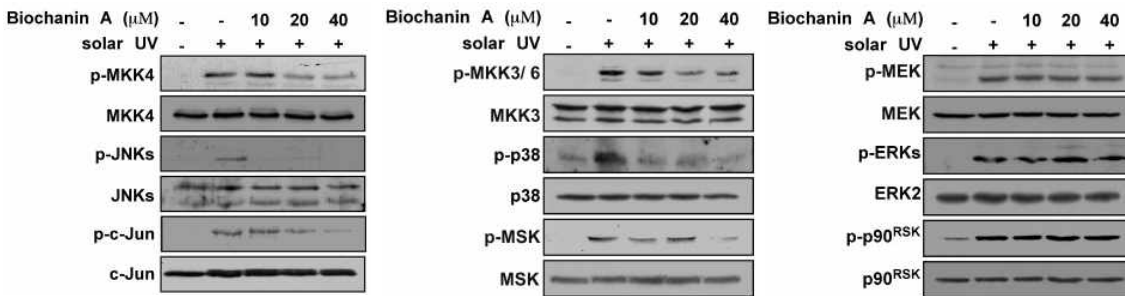
자수정 찰보리에는 Anthocyanidin계의 하나인 Delphinidin(cyanidin 3-glucoside)이외에도 Phenolic compound 중 하나인 Rutin(querctetin-3-O-rutinoside and sophorin), isoflavone 계의 biochanin A(O-methylated isoflavone)이 함유되어 있음. 콩 내에 주요 isoflavone인 daidzein은 발효 시, 6,7,4'-trihydroxyisoflavone이 생성 됨. 위에 이러한 물질들은 피부노화를

비롯한 다양한 생리 활성을 지니는 기능성 phytochemical로 알려져 있음. 하지만, 어떠한 pathway를 직접적으로 타겟하여 생리활성을 나타내는지 알려져 있지 않음.

따라서 다음 지표물질의 피부노화 및 보습 저하에 관련된 직접적인 표적단백질을 탐색하고, 지표물질과 관련된 표적단백질과의 결합분자구조를 규명함. Binding assay를 통해 지표물질이 탐색된 표적단백질에 직접적으로 결합하는지 확인 후, ATP competition assay를 통해 지표물질이 탐색된 표적단백질과 ATP와 경쟁적으로 결합하는지 확인함. 나아가 Computer modeling을 통해 좀 더 정확한 지표물질과 표적단백질의 결합 구조를 규명함.

(2) Biochanin A

(가) Biochanin A의 MKK4/JNKs/c-JUN 표적 확인

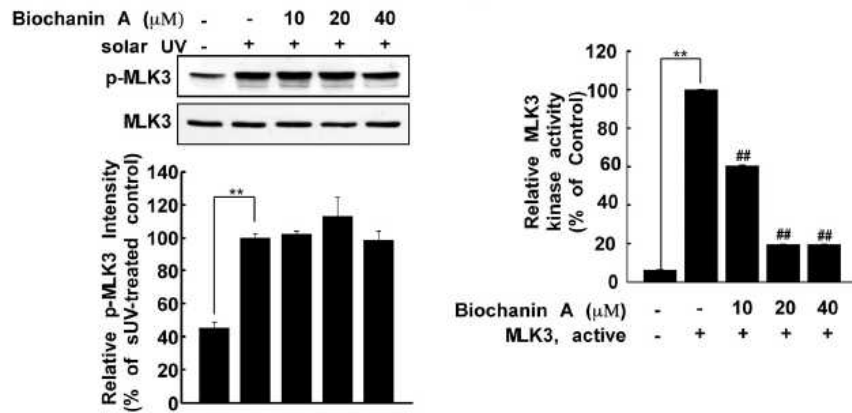


<그림 14. Biochanin A의 자외선으로 유도되는 세포신호전달체계의 변화>

피부 노화에 있어 주요한 역할을 하는 상위 인산화 효소 (JNK, ERK, p38)의 활성화에 Biochanin A가 미치는 영향을 western blot analysis를 통해 탐색하였음. Biochanin A는 solar UV에 의해 유도되는 MKK4/JNKs/c-JUN 과 MKK3/6/p38/MSK의 인산화를 억제함. 그러나, MEK/ERKs/p90RSK의 억제에 영향을 미치지 않음. MKK4/JNKs/c-JUN 과 MKK3/6/p38/MSK을 억제함을 보임에 따라, MLK3 phosphorylation의 억제를 확인하는 것으로 실험을 디자인.

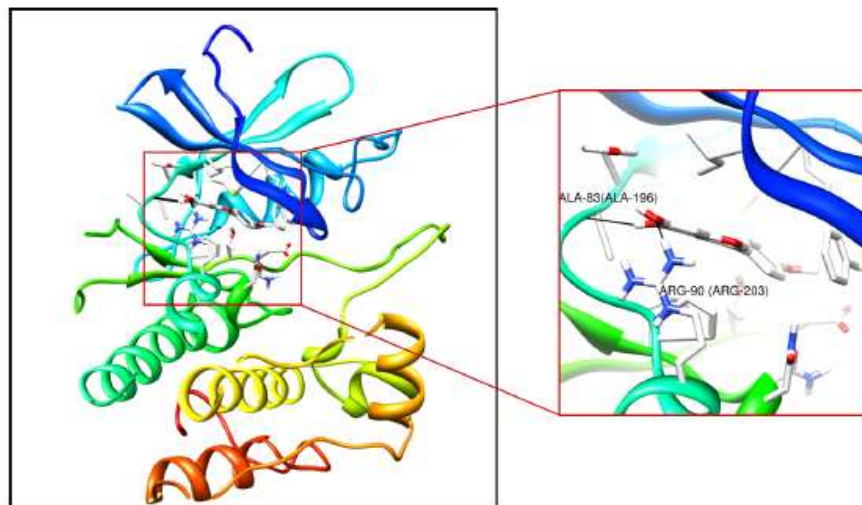
(나) Biochanin A의 MLK3 발현 억제 효과 확인

기존 몇몇의 연구에서 MLK3가 JNKs와 p38 signaling pathway에서 MKK4와 MKK3/6에 직접적으로 인산화 시키는 것으로 알려져 있었음. 실험 결과 biochanin A가 MLK3의 직접적인 인산화 효과를 나타내는 것을 확인.



<그림 15. Biochanin A의 MLK-3 저해효능 확인>

(다) Binding mode

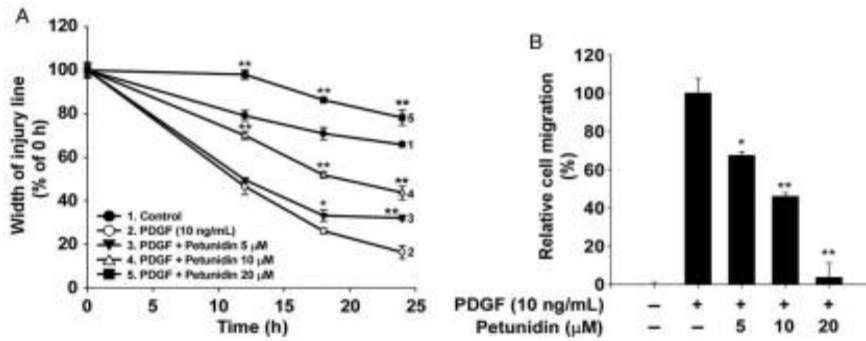


<그림 16. Biochanin computer modeling>

Biochanin A가 MLK3 ATP-binding pocket에 결합하여 ATP의 결합을 감소시킴을 확인. 위의 결과를 통해, biochanin A가 직접적으로 MLK3의 결합을 통해 signal pathway를 억제하고, 피부 노화를 막는 것을 확인.

(3) Anthocyanidins

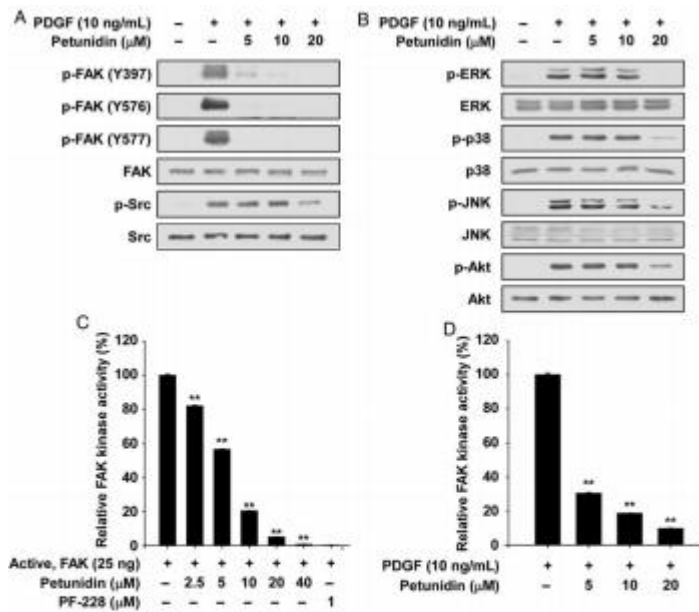
(가) Anthocyanidin의 동맥평활근세포의 이동 억제 효과 확인



<그림 17. anthocyanidin Migration assay>

Migration assay를 통해 확인한 결과 anthocyanidin의 subtype인 petunidin을 처리하였을 때, PDGF-BB로 인해 유도된 동맥평활근세포의 이동이 petunidin 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인. 농도 20 μM 이상에서는 세포의 이동을 완전히 차단하는 효과를 보였으며 세포에 독성을 나타내지도 않음을 확인.

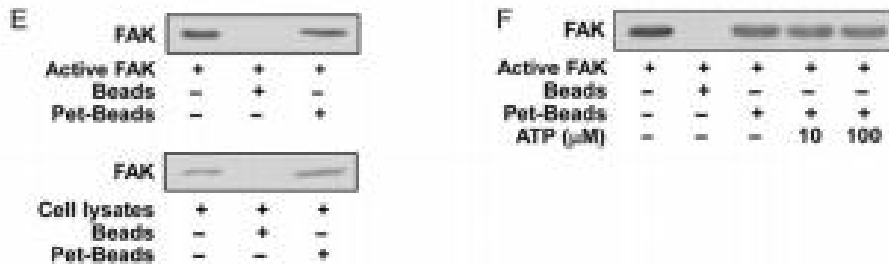
(나) Anthocyanidin의 FAK phosphorylation 억제 효과 확인



<그림 18. anthocyanidin의 FAK targeting 확인>

FAK phosphorylation 관련 pathway가 다른 signaling pathway에 비해 상대적으로 낮은 농도의 petunidin에 의해서도 차단되는 것을 확인하여, 동맥평활근세포의 이동에 FAK이 주요한 분자적 target 일 것이라고 가설을 세움. 이후 FAK activity assay를 수행한 결과, Y397, Y566, Y567에서 PDGF-BB에 의해 유도된 phosphorylation이 petunidin의 농도에 의존적으로 감소하였고, 최종적으로 FAK의 activity가 감소하는 것을 확인.

(다) Anthocyanidin과 FAK과의 binding 확인



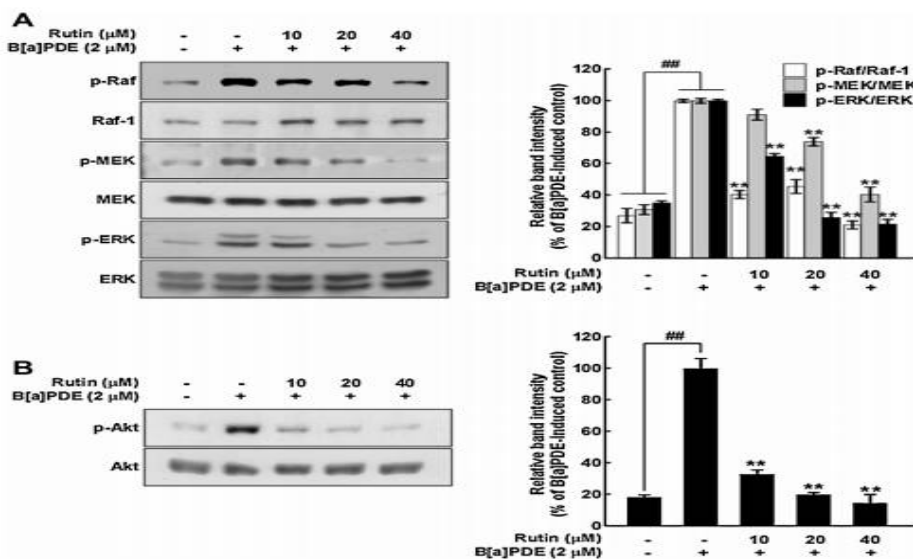
<그림 19. Anthocyanidin과 FAK binding 확인>

Petunidin이 FAK과 직접적으로 결합하는지 확인하기 위해 pull-down assay를 수행하였음. 재조합된 FAK 단백질을 이용하여 수행한 결과, control beads에는 결합하지 않고, petunidin beads에만 결합하는 것을 확인. 또한 이 결합은 ATP 농도에 비의존적인 것을 확인.

(4) Rutin

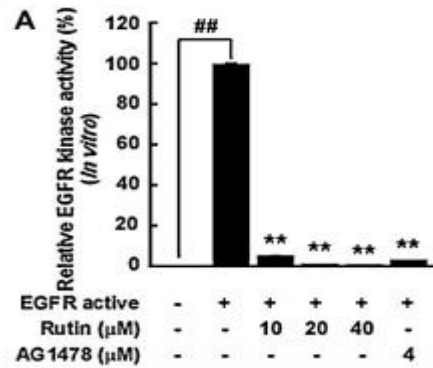
(가) Rutin의 Raf/MEK/ERK/Akt phosphorylation 확인

Rutin은 B[a]PDE에 의해 유도된 AP-1, NF-κB transcriptional activity를 감소시키며 이는 ERK, JNK 그리고 p38을 포함하는 MAPK-signaling pathway에 의해 매개된 것임을 확인. Rutin은 B[a]PDE에 의해 유도된 ERK phosphorylation과 그 상위 kinase인 MEK, Raf의 phosphorylation을 억제하는 것을 확인하였으며 또한 Akt phosphorylation도 억제하는 것을 확인.



<그림 20. Rutin의 MAPK signaling pathway 억제 확인>

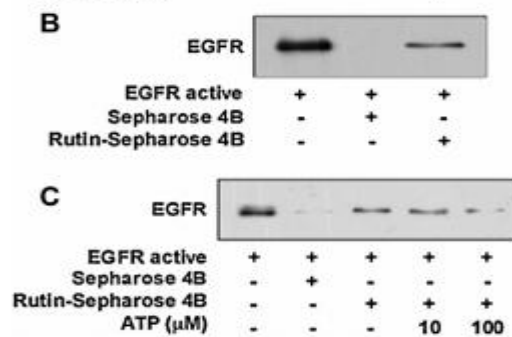
(나) Rutin의 EGFR kinase activity 감소 효과 확인



<그림 21. rutin의 EGFR kinase 억제 확인>

EGFR kinase는 MAPK와 Akt pathway의 주요 상위 kinase 중에 하나로 잘 알려져 있음. Rutin은 B[a]PDE에 의해 유도된 EGFR phosphorylation에는 영향을 주지 않으나 EGFR kinase activity는 현저하게 차단하는 것을 확인.

(다) Rutin과 EGFR와의 binding 확인

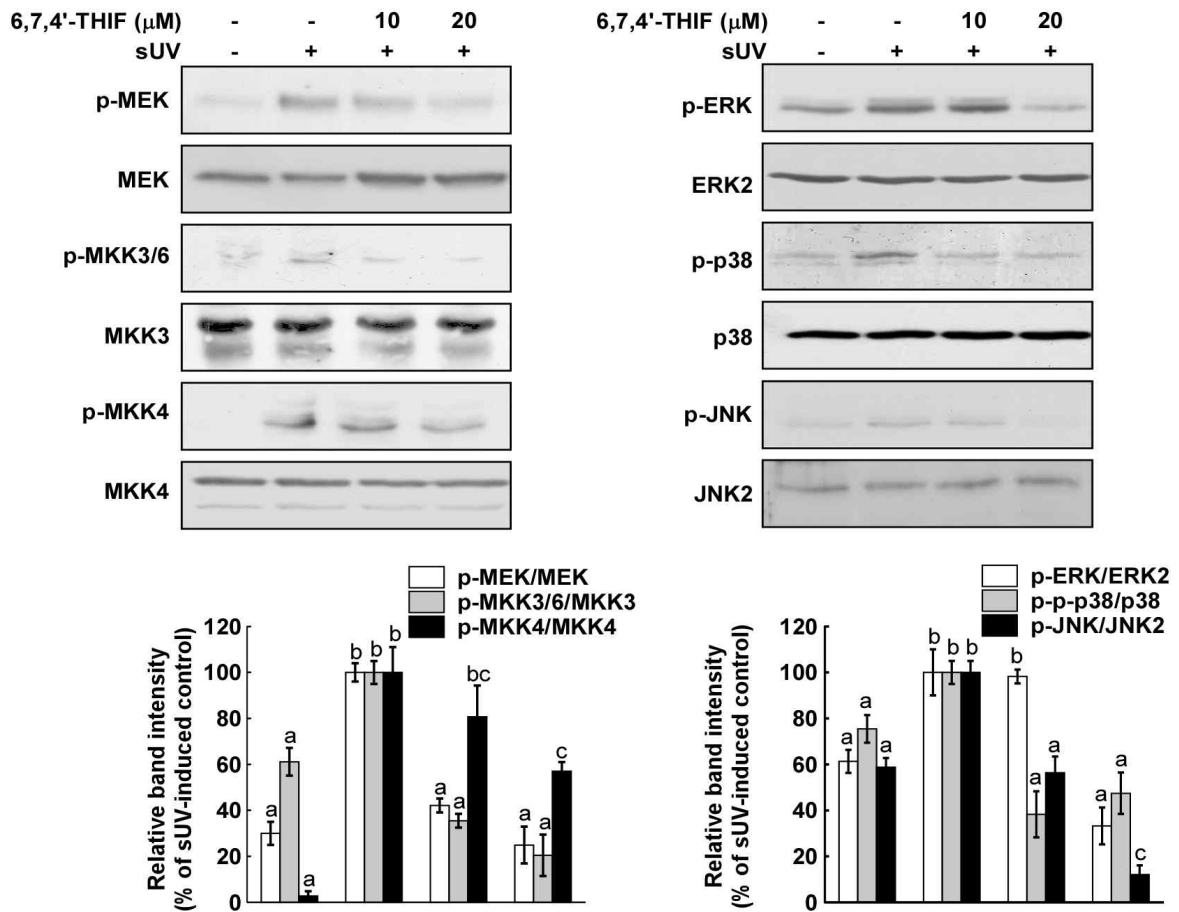


<그림 22. Rutin의 EGFR binding 확인을 위한 pull-down assay>

Rutin이 EGFR kinase activity를 감소시키는 것은 확인하였고, rutin과 EGFR이 직접적으로 결합하는지 확인하기 위해 pull-down assay를 수행하였음. EGFR 단백질은 Rutin-spharose 4B beads에 의해 잡아당겨지며 이 둘의 결합력은 ATP 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인. 결론적으로 rutin이 ATP-competitive inhibitor로써 EGFR kinase activity를 감소시킨다는 것이 증명됨.

(5) 6,7,4'-trihydroxyisoflavone

(가) MEK/ERK, MKK3/6/p38, MKK4/JNK signaling pathway

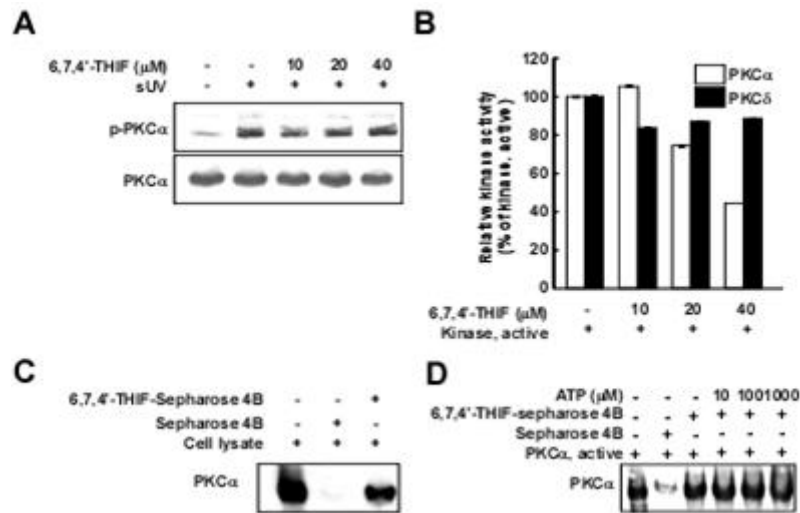


<그림 23. 6,7,4'-THIF으로 인한 자외선으로 유도되는 세포신호전달체계의 변화>

Solar UV는 Matrix metalloproteinase (MMPs) 발현에 가장 중요한 요소임. 이 중 MMP-1은 collagenase로서 피부의 collagen을 분해시킴으로서, 피부 주름을 촉진시킴. 콩 유래 isoflavone인 daidzein은 체내 대사를 통해, 6,7,4'-trihydroxyisoflavone(6,7,4'-THIF)로 만들어짐. 선행 연구를 통해, 6,7,4'-THIF의 광노화를 억제함을 확인.

따라서, 어떠한 signal을 통해, MMP-1 발현을 감소시키는지 확인하기 위해, Western blot을 통해, MAPK signal을 확인할 결과, 6,7,4'-THIF가 sUV로 유도된 MAPKK와 MAPK를 activation 시킴을 확인.

(나) PKC α Targeting



<그림 24. 6,7,4'-THIF의 PKC α 저해효능 및 직접적 결합 확인>

PKC는 MAPKKs의 상위 조절인자로 잘 알려져 있음. 최근 연구들에서, PKC α 가 MMP-1를 여러 가지 signaling pathway를 통해서 조절함이 알려짐. 따라서, 6,7,4'-THIF가 PKC α 에 binding 함을 확인한 결과, NHDF cell lysate에서 직접적으로 결합함을 확인함. 또한, ATP에 의해서 결합이 약해지지 않은 것을 확인. 다음 결과로, 6,7,4'-THIF가 sUV로 유도된 MMP-1 발현을 PKC α kinase activity를 억제함으로써 감소시키는 것을 확인.

2. 제1협동: 동물 모델을 이용한 보리 및 콩 유래산물의 피부주름개선 및 피부보습효능 검증 (가천대학교)

가. 동물모델에서 선별된 보리 및 콩 유래산물의 자외선에 의한 피부주름완화 효능 검증

(1) 동물모델에서 광노화 유도 및 콩 배아와 발아보리 혼합물이 첨가된 식이 공급

(가) 동물모델의 광노화 유도:

① 총 80마리에 해당하는 6주령 무모생쥐를 구입

(Normal(UVB-)군=N, Control(UVB+)군=C, Positive control군=PC. Collagen군=CO, 보리군=B. 보리발효군=BF, 대두군=D, 대두발효군=DF)

② 총 70마리에 해당하는 무모생쥐에 약 9주간 UV(ultra violet) B를 표 3에 해당하는 양만큼 조사

(나) 보리원물 및 보리 발효물과 대두원물 및 대두 발효물을 이용한 식이 제작 및 공급

① 보리원물 및 보리 발효물과 대두원물 및 대두 발효물 소재 입수 (샘표에서 제공)

② 입수한 상기 시료를 이용한 식이 제작

③ 광노화가 유도된 동물모델에서 약 4주간 일반식이 후 약 9주간 제작된 식이 공급

(2) 광노화가 유도된 동물모델에서 식이 효율 및 체중 증가 측정

(가) 식이 효율 측정

광노화 유도 동물모델에서 식이 섭취량을 알아보기 위하여 매2주마다 섭취한 사료의 양 측정

(나) 체중 증가 측정

광노화 유도 동물모델에서 식이에 의한 체중 변화를 알아보기 위하여 매2주마다 체중을 측정

(다) 피부 수분 측정

광노화 유도 동물모델에서 콩 배아 및 발아보리 혼합물이 첨가된 식이에 의한 피부 보습량을 측정

(3) 광노화 유도 동물모델의 피부주형 제작 및 분석

(가) 광노화 유도 동물모델의 피부주형 제작

광노화 유도 동물모델에서 채취한 피부의 주름여부를 알아보기 위하여 피부주형틀을 이용하여 피부주형을 제작

(나) 광노화 유도 동물모델의 피부를 이용하여 면역조직염색법에 따른 피부표피 및 진피층의 변화 관찰

채취한 피부를 면역조직염색법인 H&E염색법과 Masson's trichrome염색법을 이용하여 피부의 두께 및 조밀도 관찰

(다)채취한 피부를 면역조직염색법을 이용하여 cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), aquaporin-3 (AQP-3)의 발현정도와 대식세포의 양, 염증 정도를 측정

(라) 광노화 유도 동물모델의 피부를 이용하여 피부주름관련 생체인자 발현정도와 보습 관련 생체인자 발현정도 측정

① 채취한 피부를 이용해서 웨스턴블라팅 실험기법을 통하여 피부주름관련 생체인자인 Procollagen type-1과 MMP-1의 발현정도를 측정

② 채취한 피부를 이용해서 웨스턴 실험기법을 통하여 보습 관련 생체인자인 filaggrin의 발현정도를 측정

(마) 채취한 피부를 이용해서 ELISA 실험기법을 통하여 보습 관련 생체인자인 free amino acid (FAA), glycerol의 생성량 측정

(바) 채취한 피부를 이용해서 웨스턴 실험기법을 통하여 mitogen activated protein kinases (MAPKs) 기전관련 단백질의 발현정도를 측정

기간	1주차(매일)	2주차~8주차 (주3회 - 화,금,일)	9주차 (주1회 - 금)	10주차 ~ 14주차	2012.07.03
UVB dose (mJ/cm ²)	200 (2분21초)	400 (4분43초)	200 (2분21초)	-	sacrifice

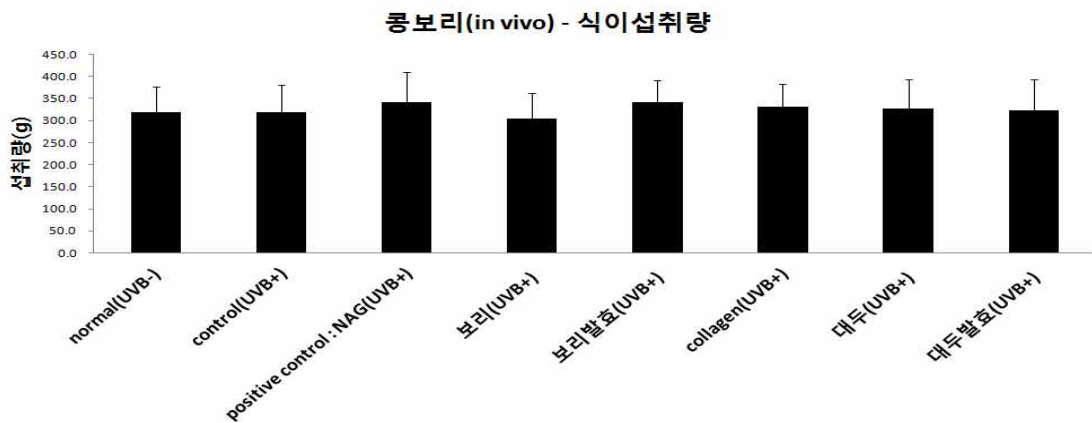
<표 3. 동물모델에 조사한 UVB양 및 기간>

(4) 연구결과

(가) 광노화가 유도된 동물모델에서 식이 효율, 체중 증가 및 피부 수분량 측정

① 식이 효율 측정

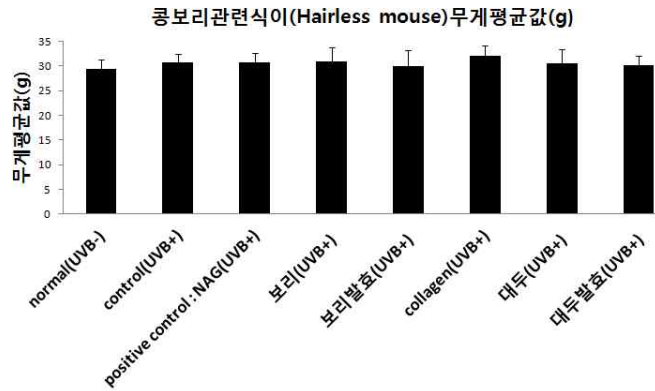
표1과 같은 UVB의 노출을 3월29일부터 시작하여 광노화를 유발시킨 무모생쥐를 5월20일부터 콩 배아 및 발아보리 혼합물이 첨가된 식이를 약 9주간 공급하는 동안 무모생쥐의 식이섭취량을 측정하여 그림 25와 같은 결과를 얻었음. 사료의 섭취량은 총 9주간 모든 처리군에 500g씩 사료를 공급해 주었으며, 총 3회 식이섭취량을 측정하였음. 데이터 분석결과 통계적 유의성은 없었으나, Normal군의 식이섭취량(318.0g)과 Control군의 식이섭취량(319.0g)에 비해 Positive control(NAG)군 (341.3g), 보리발효군 (341.0g), Collagen군 (332.0g)이 14~24g정도 증가하는 수치를 보였고, 보리군 (303.7g)이 15g정도 감소하는 수치를 보였음. 이러한 결과로 Positive control군, 보리발효, Collagen을 첨가한 식이를 섭취한 처리군은 Normal군, Control군에 비해서 식이를 더 많이 섭취함을 알 수 있었으나 통계적 유의성은 없었음.



<그림 25. 각 식이처리군에 따른 사료 식이섭취량>

② 체중 증가 측정

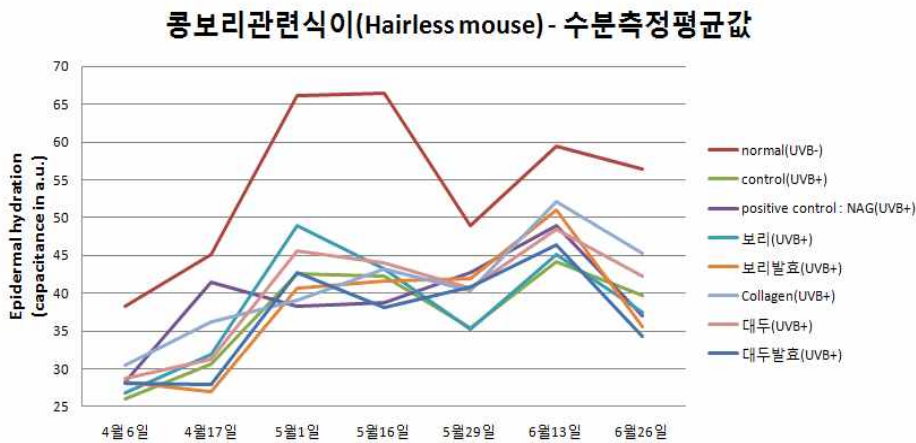
광노화가 유도된 무모생쥐를 각 처리군당 무작위로 5마리씩 선택하여 저울을 이용해 무게를 측정하였다. 14주간 총 7회 실시하였으며 각 처리군당 측정된 모든 값을 평균 처리하여 그래프로 나타내어 그림 26과 같은 결과를 얻어 내었음. 그림 27에서 알 수 있듯이 Control군 (30.63g), Positive control군 (30.80g), 보리군 (30.89g), Collagen군 (31.97g)에서 유의성 있게 무게가 증가함을 알 수 있으며, 처리군들 중에서는 Collagen군 (31.97g)의 수치가 가장 높게 나타났으나 통계적 유의성은 없었음.



<그림 26. 콩보리관련 식이에 따른 무모생쥐의 무게측정>

③ 피부 수분양 측정

광노화유도 무모생쥐를 각 처리군 모두 총 14주 동안 매2주마다 1회씩 피부의 수분량을 측정하였음. 측정은 피부측정센서 통합장치 (Courage-Khazaka electronic GMDH, Germany) protocol을 통해 이루어졌음. 측정값은 그림 27에 나타나 있으며, 이 결과에서 알 수 있듯이 UVB를 조사한 모든 군은 Normal군에 비해서 피부의 수분량이 통계적으로 유의한 수준으로 감소하였음. 콩 배아 및 발아보리 혼합물을 식이섭취한 모든 처리군은 UVB만을 처리한 Control군에 비해서 피부의 수분량이 증가하였음. 특히 자외선에 노출됨으로써 피부 수분량이 줄어든 대조군에 비하여 콩 및 보리산물 처리군은 초기에 피부의 수분량을 유지함으로써 보습기능을 가짐을 일차적으로 확인할 수 있었음.



<그림 27. 콩보리관련 식이섭취군에 따른 피부의 수분보습양 측정>

(나) 광노화 유도 동물모델의 피부 관찰 및 분석

① 피부변화 관찰

광노화가 유도된 무모생쥐의 피부를 처리군별로 관찰하여 그림 28과 같은 결과를 얻어내었음. 관찰 결과 모든 처리군은 Control군에 비해서 외관상의 피부 건강상태가 개선되었고 특히 positive 처리군과 보리발효 및 대두발효물의 처리군은 거의 정상군에 가까운 건강한 피

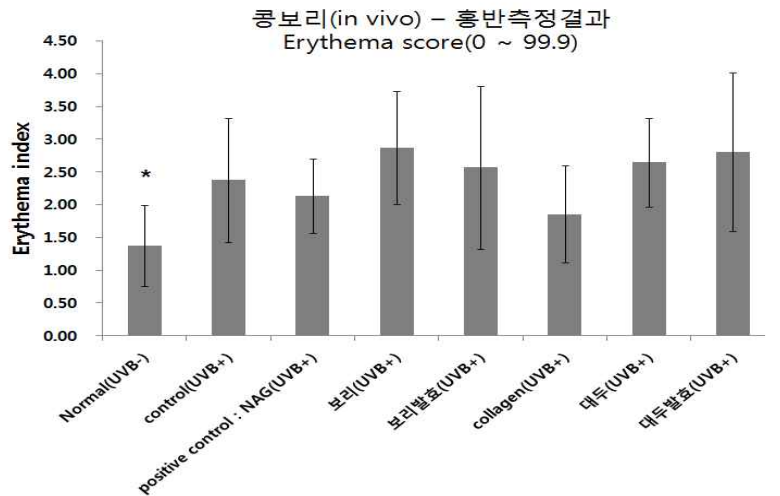
부 형태를 유지하였음. 이러한 결과로 자외선에 의한 피부 손상을 콩 및 발아보리 발효물 혼합물이 첨가된 식이를 섭취함으로써 광노화로 인한 피부손상을 회복시킬 수 있다는 가능성을 보여줌.



<그림 28. 콩보리 식이섭취군에 따른 피부관찰>

② 피부의 홍반 측정

광노화유도 무모생쥐 피부의 홍반을 측정하기 위하여 무모생쥐를 주당 3회(총 14주) UVB를 조사하였으며, Colormeter(DermaLab Skin Lab combo, Cortex Technology, Denmark)protocol을 이용하여 홍반을 측정하여 그림 29와 같은 결과를 얻어 낼 수 있었음. 측정결과 Normal군과 Control간의 통계적 유의성이 있었지만 콩 배아 및 발아보리 혼합물을 첨가한 식이를 섭취한 처리군들과 Control군 간의 큰 차이변화는 없었으나, Positive control(NAG)군, collagen 식이섭취군이 홍반측정결과 값이 낮게 나타났음.



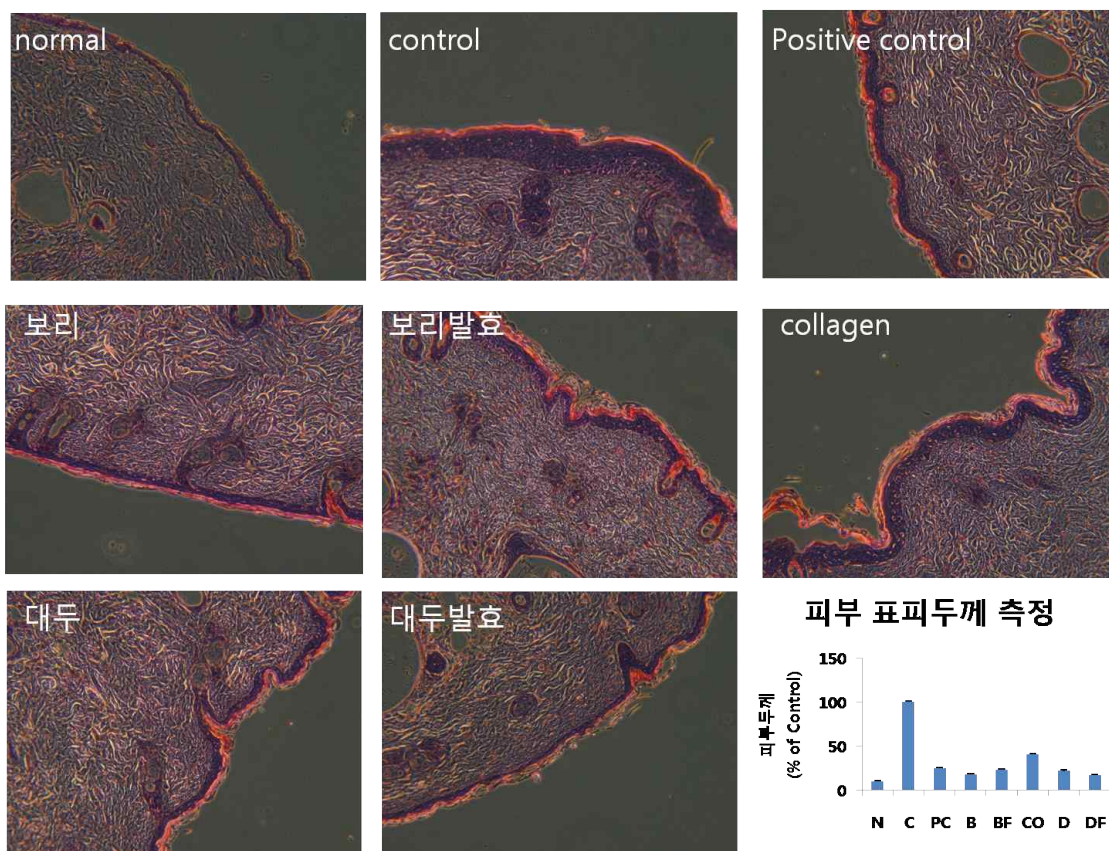
<그림 29. 콩보리 식이 처리군의 흉반 측정결과>

③ 면역조직 염색법을 이용한 피부표피층의 관찰

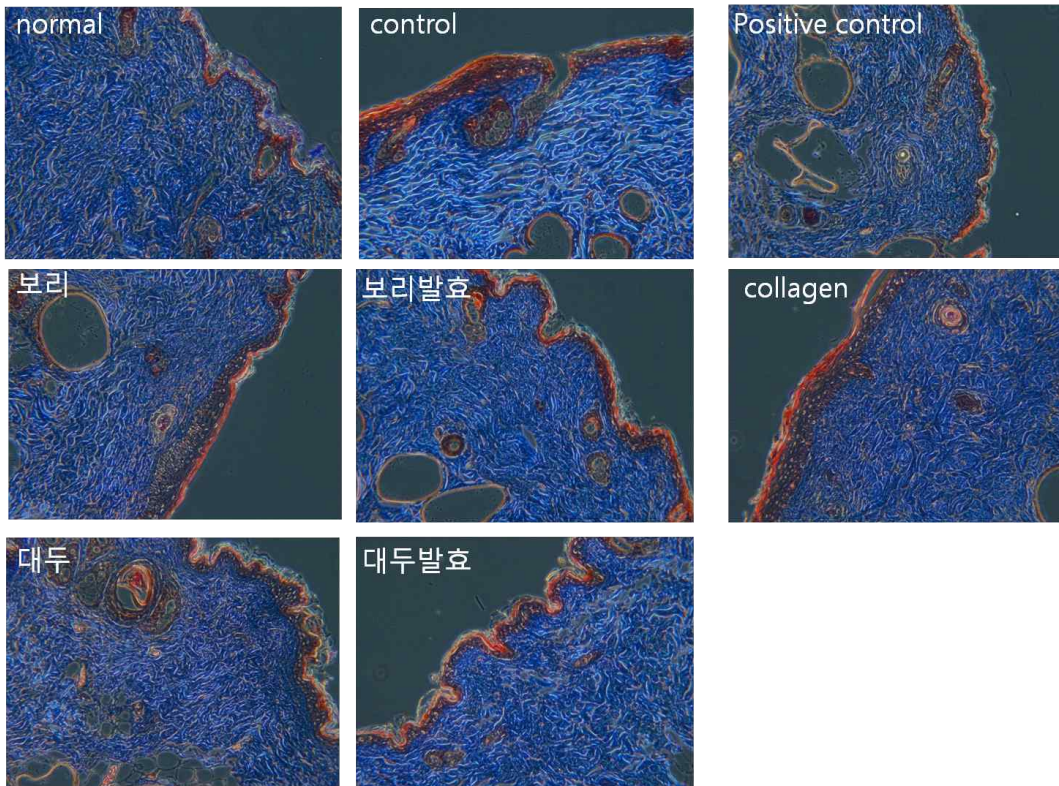
광노화유도 무모생쥐의 피부를 채취하여 면역조직 염색법중 하나인 H&E염색법을 이용하여 피부표피층의 두께를 관찰 하여 그림 30과 같은 결과를 얻어내었음. UVB를 조사하여 처리한 군인 Control군은 UVB를 조사하지 않은 군인 Normal군에 비해서 피부표피층이 두껍게 변화된 것을 알 수 있음. 하지만 UVB를 조사한 후 콩 배아 및 발아보리 혼합물을 첨가한 식이를 한 처리군들은 비교적 Control군에 비해서 피부표피층이 얇아진 것을 관찰할 수 있었음. 특히 보리발효처리군과 대두발효처리군은 Normal군에 가깝게 피부표피층이 얇아짐을 알 수 있다. 현미경 관찰은 200배율로 하여 관찰하였음.

광노화유도 무모생쥐에서 얻은 피부를 Masson's trichrome (MT) 염색법을 이용하여 피부진피층의 변화를 관찰하여 그림 31과 같은 결과를 얻어 낼 수 있었음. 콩 배아 및 발아보리 혼합물을 첨가한 식이를 섭취한 모든 처리군에서는 Control군에 비해서 진피층의 조밀도가 더욱 조밀해짐을 알 수 있었음. 현미경 관찰은 200배율로 하여 관찰하였음.

위와 같은 결과로부터 콩 및 발아보리 혼합물이 첨가된 식이를 장기간 섭취하게 되면, 자외선에 의하여 유도되는 피부 각질화 과다생성을 억제함을 확인할 수 있었음. 특히 UVB 조사에 의하여 유도된 intrahorn에 염증 및 subepithelial vacuolization같은 현상은 콩 및 발아보리 처리군에서는 확인이 안 됨. MT 염색을 통해서 볼 때 collagen이 약하게 되고 collagen fragmentation에 있어 많은 개선을 보임. 특히 콩 및 보리 시료를 발효시킴으로써 그 효과는 극대화됨을 확인할 수 있었음.



<그림 30. 광노화유도 무모생쥐의 식이섭취군에 따른 피부표피층 변화>

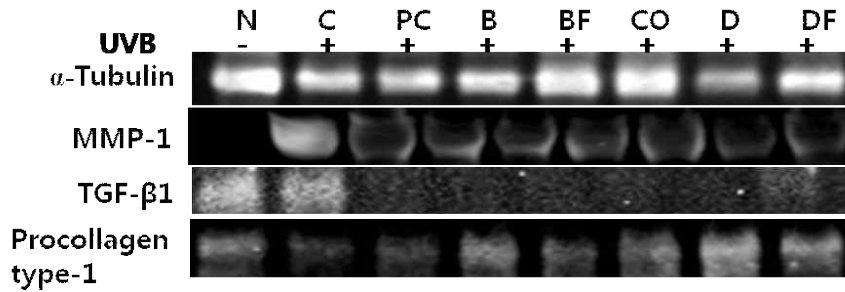


<그림 31. 광노화유도 무모생쥐의 식이섭취군에 따른 피부진피층 변화>

(다) 광노화유도 동물모델 피부에서의 작용기전 연구

① 광노화유도 무모생쥐 피부에서의 피부주름관련 생체인자의 발현양 측정

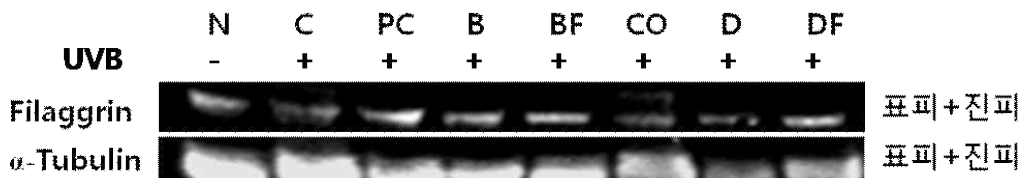
피부주름관련 생체인자인 Procollagen type-1, MMP-1 과 TGF-β1은 피부의 주름형성 및 완화에 영향을 미침. 피부에 탄력을 주거나 주름을 완화시키는 collagen의 합성은 전구체인 Procollagen type-1의 합성에 의해서 생성됨. 또한 Procollagen type-1에 의한 collagen의 합성은 TGF-β1에 의해서 촉진되거나 MMP-1에 의해서 방해받음. 따라서 콩 배아 및 발아보리 혼합물을 첨가한 식이를 섭취한 무모생쥐 피부에서의 피부주름 생성 및 완화에 따른 작용 기전을 알아보기 위해서 웨스턴블러팅 실험기법을 통해서 피부주름관련 생체인자의 발현량을 측정하였음. 광노화가 유도된 무모생쥐에서 채취된 피부를 세포분해용액을 이용하여 단백질만을 얻어서 웨스턴실험을 진행하였음. 실험결과는 그림 32에 나타내었음. 실험결과 Procollagen type-1은 Normal군에 비해 Control군은 발현양이 감소하였고, Positive control 군을 제외한 콩보리 식이섭취군 모두 발현양이 Control군에 비해서 증가하였음. TGF-β1은 Normal군, Control군과 비교하여 보았을 때 식이섭취군 모두 변화가 없었음을 알 수 있었음. MMP-1은 Normal군에 비해서 Control군은 발현양이 증가하였지만 식이섭취군 모두 Control군에 비해서 발현양이 감소하였음. 이러한 결과는 콩 배아 및 보리발효 혼합물이 첨가된 식이를 섭취함으로써 자외선에 의한 피부의 손상을 예방하여 주름의 생성을 억제할 수 있는 가능성을 보여줌.



<그림 32. 광노화유도 동물모델 피부에서의 피부주름관련 생체인자 발현양>

② 광노화유도 무모생쥐 피부에서의 피부보습관련 생체인자의 발현양 측정

자외선이 피부 내 protease, collagenase, elastase 등의 가수분해 효소를 분비하게 하여 이들의 작용으로 광노화를 일으키게 됨. 이러한 광노화가 일어나게 되면 피부의 보습능력을 조절하는 NMF(natural moisturizing factor)의 기능을 저하시키게 되어 결국에는 피부의 보습능력을 낮추게 됨. NMF는 전구체인 filaggrin에 의해서 합성되어짐. 따라서 NMF를 합성하는 전구체인 filaggrin의 발현양을 알아보기 위하여 웨스턴블랏팅 실험방법을 통해서 실험을 진행하였음. filaggrin은 피부표피층에서 NMF의 합성을 유도한다는 연구결과에 따라서 콩보리 관련식이를 통한 광노화 유도 무모생쥐에서 채취한 피부를 피부표피와 진피로 분리하였음. 분리된 피부표피, 진피층과 분리되기 전 피부에서 진행한 실험결과는 그림 33에 나타내었음. 그림 33에서 알 수 있듯이 표피와 진피 모두 존재하는 피부에서 Control군은 Normal군에 비해서 filaggrin의 발현양이 감소하였고, Positive control군, 보리와 보리발효군, 대두발효군은 Control군에 비해서 filaggrin의 발현양이 증가하였음. 이와 같은 결과로 콩 배아 및 보리발효 혼합물을 첨가한 식이를 하면 자외선에 의한 적어진 피부 수분량을 증가시키므로써 피부보습인자에 영향을 미침을 확인할 수 있었음.

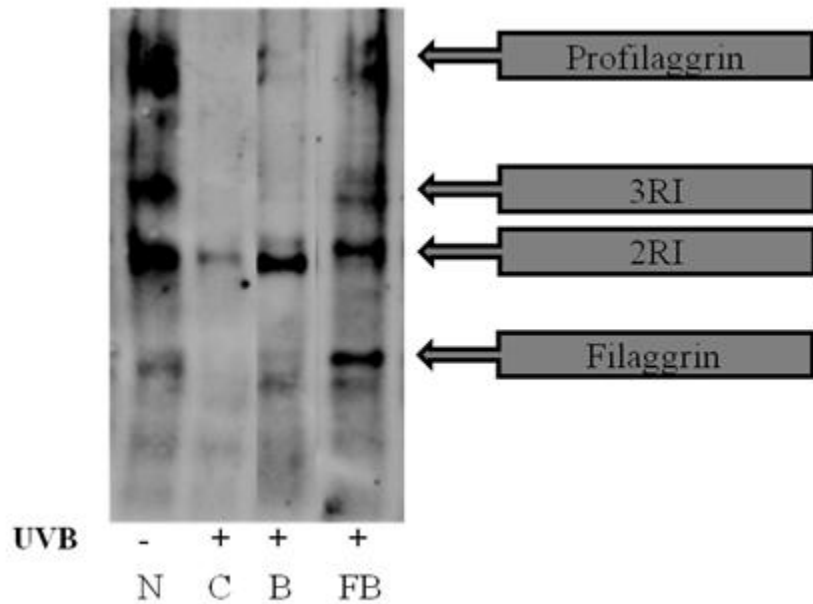


<그림 33. 광노화유도 동물모델 피부에서의 피부보습관련 생체인자 발현양>

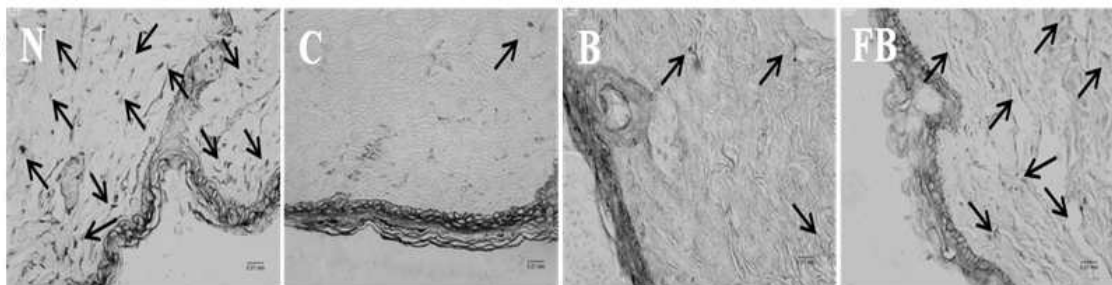
③ 광노화유도 무모생쥐 피부에서의 피부보습관련 생체인자의 발현 및 생성양 측정

Filaggrin과 aquaporin-3은 각각 FAA와 glycerol의 생성을 유도한다는 기존 연구결과에 따라서 보리와 발효보리식이를 통한 광노화 유도 무모생쥐에서 채취한 피부를 이용하여 피부표피에서의 filaggrin 발현 (그림 34), AQP-3의 발현 (그림 35)과 피부 표피에서의 FAA (그림 36), glycerol (그림 37)의 생성량에 관하여 결과를 얻었음. 도표 10에서 UVB를 조사하지 않은 Normal군은 UVB를 조사하였을 경우인 Control군과 비교하여 profilaggrin과 중간산물인 2RI, 3RI과 filaggrin의 발현이 늘었으며, 보리와 보리발효를 식이 한 B군과 FB군 역시 profilaggrin, 2RI, 3RI, filaggrin의 발현이 증가하였음. 그림 35에서는 UVB를 조사하였을 경우 AQP-3의 발현이 감소하였지만 보리와 보리발효를 식이 하면 AQP-3의 발현이 B

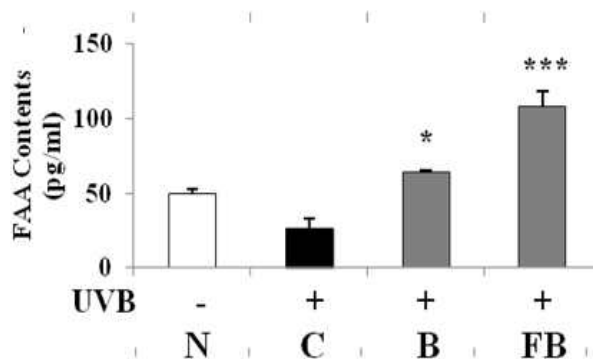
군은 AQP-3의 발현이 약간 증가하였으며 FB군은 N군에 가깝게 AQP-3의 발현이 크게 증가하였음을 알 수 있음. 그림 36과 37에서는 UVB를 조사하면 FAA와 glycerol의 생성이 크게 감소하였음. 반면에 B군과 FB군에서는 FAA와 glycerol의 생성이 크게 증가하였음. 이와 같은 결과로 보리와 보리발효 첨가한 식이를 하면 자외선에 의하여 감소된 filaggrin, AQP-3의 발현 및 FAA, glycerol의 생성을 증가시킴으로써 피부보습에 영향을 미침을 확인할 수 있었음. 특히 보리발효물을 섭취한 경우 큰 보호 효능을 가짐.



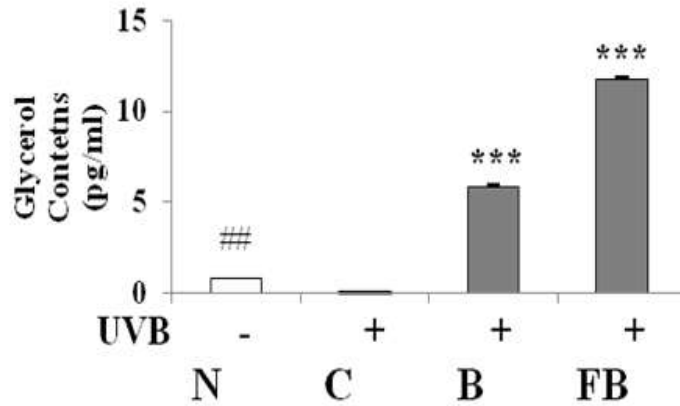
<그림 34. 광노화유도 동물모델 피부에서의 filaggrin 발현>



<그림 35. 광노화유도 동물모델 피부에서의 AQP-3 발현>



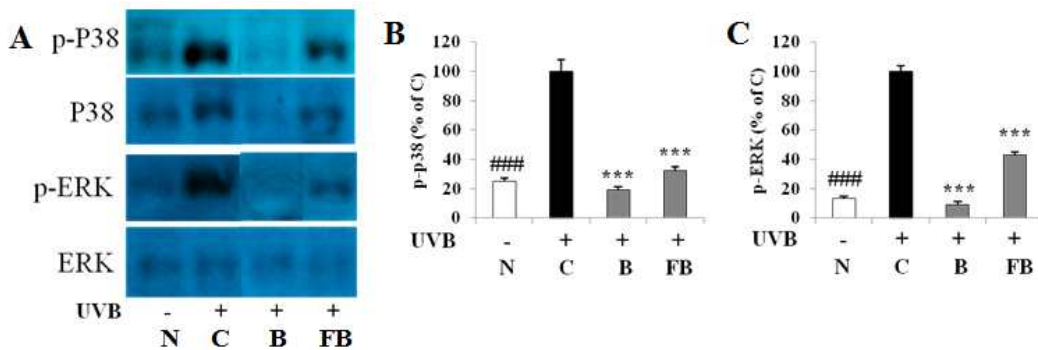
<그림 36. 광노화유도 동물모델 피부에서의 FAA 생성>



<그림 37. 광노화유도 동물모델 피부에서의 glycerol 생성>

④ 광노화유도 무모생쥐 피부에서의 보리 및 보리발효 식이에 따른 기전연구

UVB조사에 의하여 MAPKs pathway 인자인 p38과 ERK의 인산화가 증가함. 하지만 보리 및 보리발효를 식이 섭취하면 p38과 ERK의 인산화를 억제시키는 기능이 있다는 것을 그림 38 에서 확인 가능함.

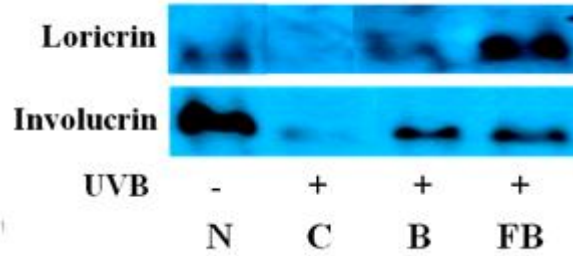


<그림 38. 광노화유도 동물모델의 보리 및 보리발효 식이에 따른 MAPKs 발현>

(라) 광노화가 유도된 동물모델에서 피부장벽 이상에 따른 변화

① 광노화 유도 동물모델에서의 보리 및 보리발효 식이에 따른 피부장벽 기능 향상을 통한 피부보습 효능 변화

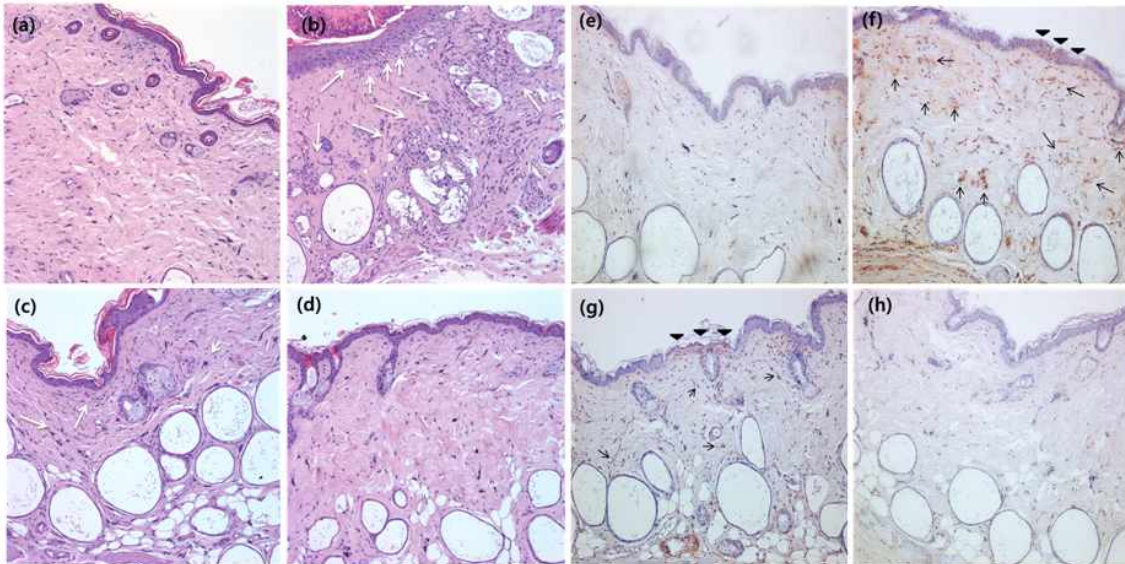
UVB조사에 의하여 피부장벽 기능에 이상이 생기면 피부의 염증 및 각질화가 심해지고 보습 기능이 저하될 수 있다는 연구결과에 따라 광노화 유도 동물모델의 피부를 이용하여 피부장벽 기능에 관여하는 인자인 involucrin과 loricrin의 발현을 측정함 (그림 39). 실험결과, UVB를 조사하면 involucrin과 loricrin의 발현이 감소하는 반면 보리 및 보리발효를 식이 섭취하면 involucrin과 loricrin의 발현을 크게 증가시켜서 피부 장벽의 기능을 개선시키는 것을 알 수 있음.



<그림 39. 광노화유도 동물모델의 보리 및 보리발효 식이에 따른 피부장벽 관련 인자 발현>

② 광노화 유도 동물모델에서의 콩 및 콩발효물 식이에 따른 피부염증 억제

UVB조사에 의하여 피부의 염증이 심해진다는 연구결과에 따라 광노화 유도 동물모델의 피부를 이용하여 염증반응이 나타났을 때의 대식세포의 증가와 염증 정도를 측정함. 실험결과, 도표 16에서 UVB를 조사하면 염증반응이 증가하면서 염증이 발생한 부위에 대식세포가 많아진다는 것을 알 수 있음. 대식세포의 발현은 대식세포에만 특수하게 발현하는 CD11B를 이용하여 그림 40의 하얀색의 화살표로 나타내었음 ((a)는 N군, (b)는 C군, (c)는 F군, (d)는 FS군)). 또한 대식세포의 증가로 인한 부위에 염증반응이 일어나는 것을 검은색 화살표로 나타내었음 ((e)는 N군, (f)는 C군, (g)는 F군, (h)는 FS군)). 실험결과, 콩 및 콩발효물을 식이 섭취하면 염증발현을 감소시킴으로써 활성화된 대식세포 역시 감소시키는 것으로 나타남.

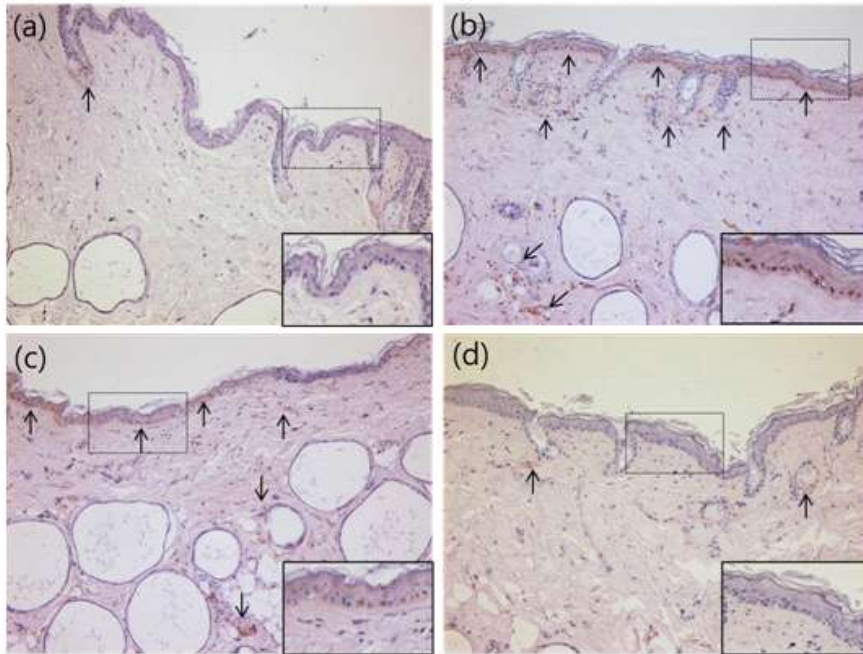


<그림 40. 광노화유도 동물모델의 콩 및 콩발효물 식이에 따른 염증반응과 대식세포의 변화>

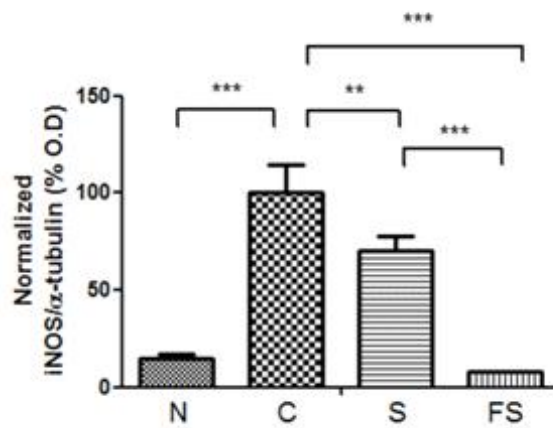
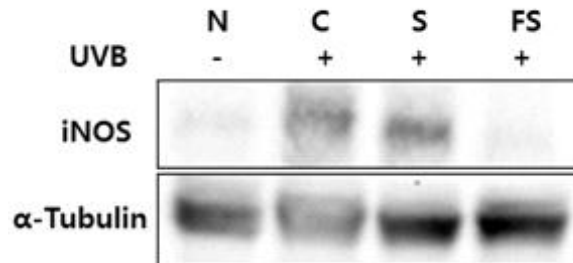
③ 광노화 유도 동물모델에서의 콩 및 콩발효물 식이에 따른 피부염증 관련 생체인자 변화 측정

UVB조사에 의하여 염증 관련 생체인자인 iNOS와 COX-2의 발현이 증가함. 도표 17과 19에서는 조직염색법을 이용하여 각각 iNOS와 COX-2의 발현 변화를 ((a)는 N군, (b)는 C군, (c)는 F군, (d)는 FS군)), 그림 42, 44에서는 웨스턴 실험기법을 이용하여 각각 iNOS와 COX-2의 발현양을 측정한 결과, 콩 및 콩 발효물을 식이 섭취하면 iNOS와 COX-2의 발

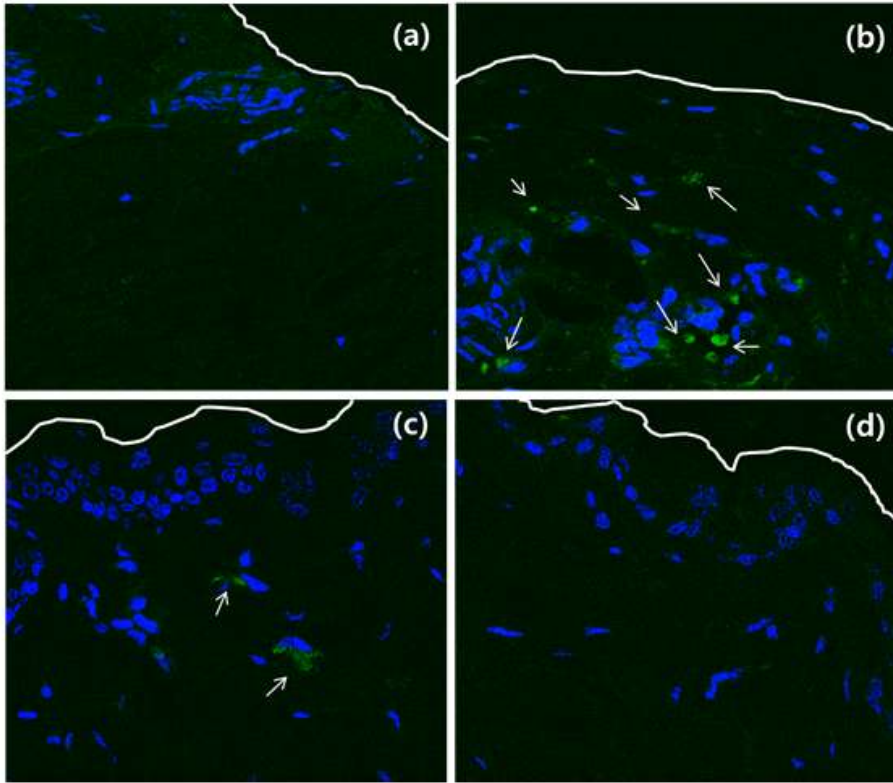
현을 감소시키는 것을 확인 가능함. 특히, 콩 발효물을 섭취하면 iNOS의 발현에 있어서 콩만을 식이 섭취하는 것보다 더욱 효능이 큰 것으로 나타남.



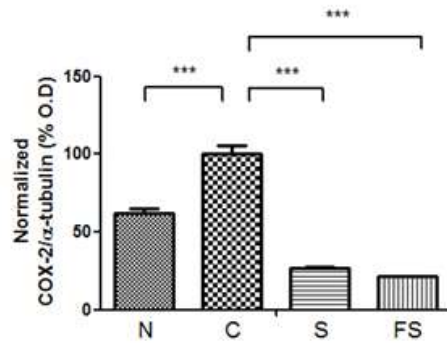
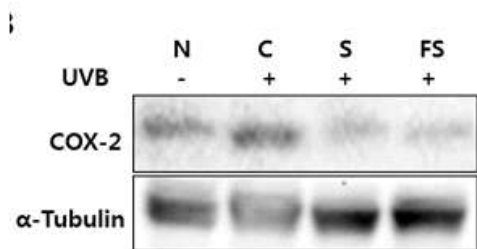
<그림 41. 광노화유도 동물모델의 콩 및 콩발효물 식이에 따른 iNOS 발현>



<그림 42. 광노화유도 동물모델의 콩 및 콩발효물 식이에 따른 iNOS 발현>

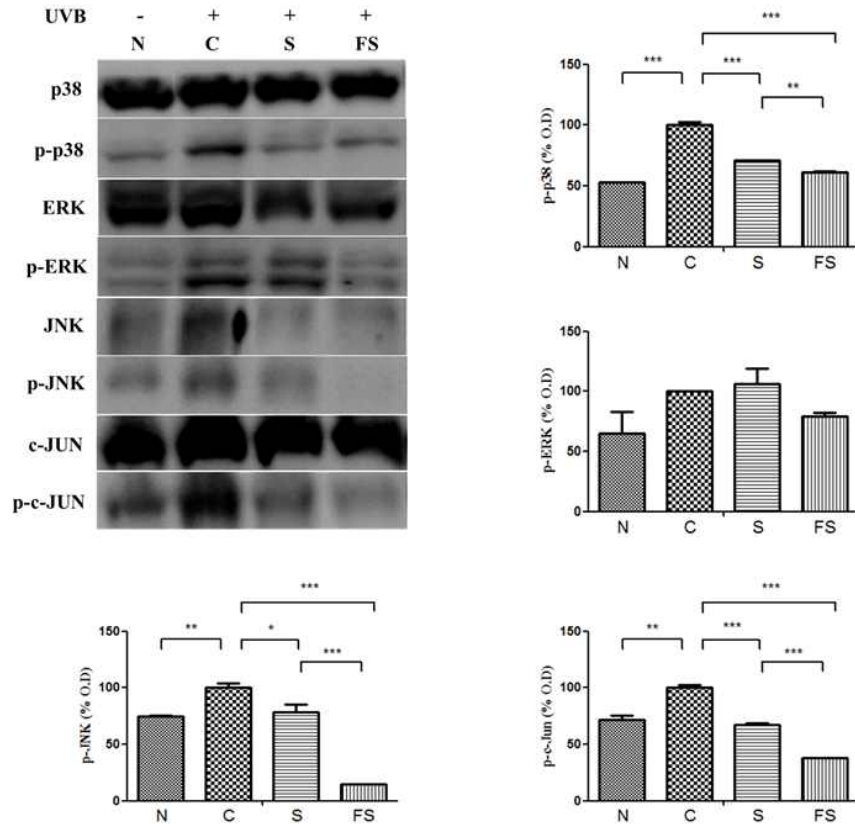


<그림 43. 광노화유도 동물모델의 콩 및 콩발효물 식이에 따른 COX-2 발현>



<그림 44. 광노화유도 동물모델의 콩 및 콩발효물 식이에 따른 COX-2 발현>

④ 광노화유도 무모생쥐 피부에서의 콩 및 콩발효물 식이에 따른 기전연구



<그림 45. MAPK kinase>

UVB조사에 의하여 MAPKs pathway 인자인 JNK, p38과 ERK 및 c-JUN의 인산화가 증가함. 하지만 콩 및 콩발효물을 식이 섭취하면 그림 45과 같이 JNK, p38과 ERK 및 c-Jun의 인산화를 억제시키는 것을 확인 할 수 있음. 특히 콩 발효물을 식이 섭취 하였을 시에 콩식이 보다 더 큰 인산화 억제 효능을 나타냄을 알 수 있음.

나. 동물모델에서 발효 자수정 찰보리 및 콩 유래산물의 자외선에 의한 피부 주름완화 및 보습 개선 효능 검증

(1) 자외선이 조사된 세포모델에서의 발효 자수정 찰보리와 콩 혼합물의 세포독성 검증

(가) 세포주 모델 준비 와 UVB 조사 및 샘플 처리에 따른 세포독성 측정

① Human keratinocyte 세포주인 HaCaT세포는 penicillin/streptomycin 1%, FBS 10%가 함유된 DMEM배지를 이용하여 유지함.

② HaCaT세포를 40mm 세포배양접시에 40×10^4 개의 개수로 분주하고 24시간 후 UVB를 $125\text{mJ}/\text{cm}^2$ 양으로 조사한 후 발효 자수정 찰보리와 콩 혼합물 및 pyconogenol을 각각 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 1, 20, 50 μM 의 농도로 처리함. 24시간 후 MTT 실험을 진행함.

(2) 동물모델에서 광노화 유도 및 발효 자수정 찰보리와 콩 혼합물이 첨가된 식이 공급

(가) 동물모델의 광노화 유도

① 총 60마리에 해당하는 6주령 무모생쥐를 구입

(Normal(UVB-)군=N, Control(UVB+)군=C, Positive control군=PC. 발효 자수정

찰보리와 콩을 5:5 배합비율로 처리한군=BS1, 발효 자수정 찰보리와 콩을 8:2 배합비율로 처리한군=BS2. 발효 자수정 찰보리와 콩을 2:8 배합비율로 처리한군=BS3)

② 총 50마리에 해당하는 무모생쥐에 약 12주간 UVB를 표4에 해당하는 양만큼 조사

(나) 자수정 찰보리 발효물과 대두 발효물을 이용한 식이 제작 및 공급

① 자수정 찰보리 발효물과 대두 발효물 소재 입수 (샘표에서 제공)

② 입수한 상기 시료를 이용한 식이 제작 (혼합물은 2.5% 함유, 단일 화합물은 0.5% 함유)

③ 광노화가 유도된 동물모델에서 약 4주간 일반식이 후 약 8주간 제작된 식이 공급 (동물 모델의 식이군은 그림 46에 표시)

(3) 광노화가 유도된 동물모델에서 식이 효율 및 체중 증가 측정

(가) 식이 효율 측정

① 광노화 유도 동물모델에서 식이 섭취량을 알아보기 위하여 매주 마다 섭취한 사료의 양 측정

(나) 체중 증가 측정

① 광노화 유도 동물모델에서 식이에 의한 체중 변화를 알아보기 위하여 매 2주 마다 체중을 측정

(다) 피부 수분 측정

① 광노화 유도 동물모델에서 발효 자수정 찰보리와 콩 혼합물이 첨가된 식이에 의한 피부 보습량을 측정

(4) 광노화 유도 동물모델에서의 주름개선 및 보습효능 검증

(가) 광노화 유도 동물모델의 피부주형 제작

광노화 유도 동물모델에서 채취한 피부의 주름여부를 알아보기 위하여 피부주형틀을 이용하여 피부주형을 제작

(나) 광노화 유도 동물모델의 피부를 이용하여 면역조직염색법에 따른 피부표피 및 진피층의 변화 관찰

채취한 피부를 면역조직염색법인 H&E염색법과 Masson's trichrome염색법을 이용하여 피부의 두께 및 콜라겐 합성 정도 관찰

(다) 광노화 유도 동물모델의 피부를 이용하여 피부주름관련 생체인자 발현정도와 보습관련 생체인자 발현정도 측정

① 채취한 피부를 이용해서 웨스턴 실험기법을 통하여 피부주름관련 생체인자인 Procollagen type-1과 MMP-1의 발현정도를 측정

② 채취한 피부를 이용해서 웨스턴 실험기법 및 면역조직화학법을 통하여 보습관련 생체인자인 filaggrin과 aquaporin-3의 발현정도를 측정

③ 채취한 피부를 이용하여 아미노산과 글리세롤 분석기를 통하여 아미노산과 글리세롤의 양을 측정

④ 채취한 피부를 이용하여 항산화 관련 인자인 superoxide dismutase (SOD)와 Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NRF-2)의 발현 및 생성 정도를 측정



* Positive control : pycnogenol

<그림 46. 광노화 모델에서 시료 처리군에 대한 그림>

기간	1주차(매일)	2주차~11주차 (주3회)	12주차 (주1회 - 금)	2013.08.16
UVB dose (mJ/cm ²)	200 (2분21초)	400 (4분43초)	200 (2분21초)	sacrifice

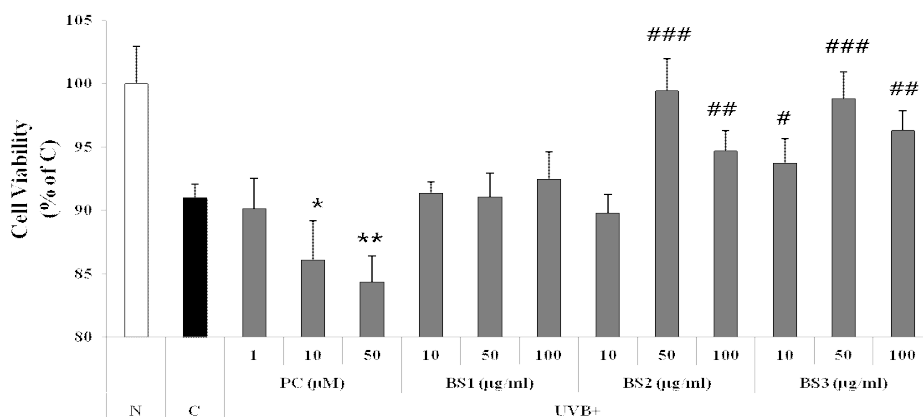
<표 4. 동물모델에 조사한 UVB양 및 기간>

(5) 동물모델에서 발효 자수정 찰보리 및 콩 유래산물의 자외선에 의한 피부 주름완화 및 보습개선 효능 검증 연구결과

(가) 자외선이 조사된 세포모델에서의 발효 자수정 찰보리와 콩 혼합물의 보습 효능 검증

① 샘플 처리에 따른 세포독성 측정

그림 47과 같이 UVB에 노출된 HaCaT세포는 세포독성을 나타냄. UVB 처리한 HaCaT 세포에 발효 자수정 찰보리와 콩혼합물 및 pycnogenol을 처리함. 그 결과, BS2과 BS3 처리군은 UVB가 조사되지 않은 보통의 상태인 즉 정상 수준의 상태로 세포증식을 회복시킴. 그러나, BS1 처리군은 효능의 변화가 거의 없었으며 PC 처리군은 오히려 농도 의존적으로 세포독성을 나타냄.

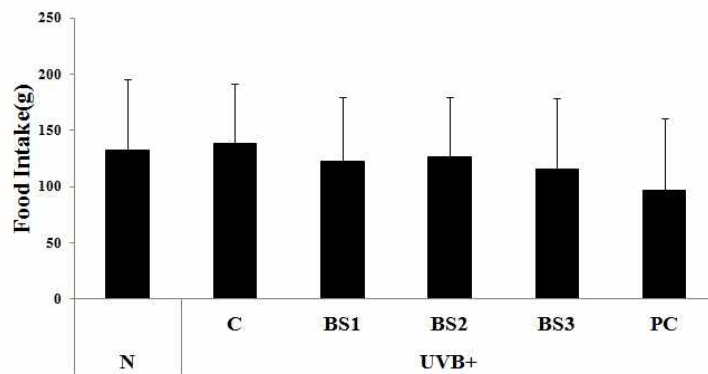


<그림 47. 샘플처리군에 따른 세포 생존률>

(나) 광노화가 유도된 동물모델에서 식이 효율, 체중 증가 및 피부 측정

① 식이 효율 측정

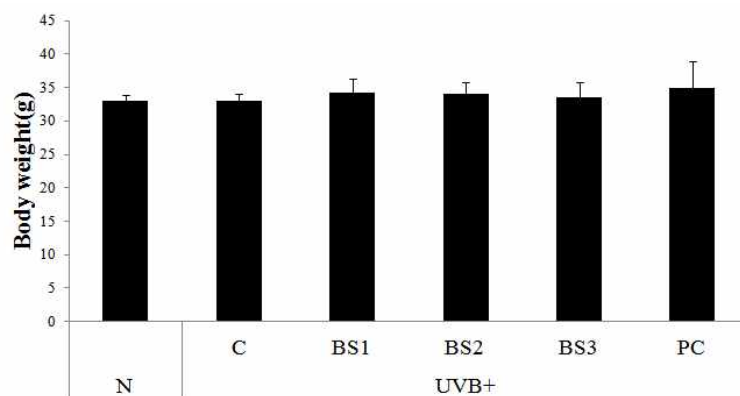
표 4와 같은 UVB의 노출을 시작하여 광노화를 유발시킨 무모생쥐를 5주차부터 발효 자수정 찰보리와 콩 혼합물이 첨가된 식이를 약 8주간 공급하는 동안 무모생쥐의 식이섭취량을 측정하여 그림 48과 같은 결과를 얻었음. 사료의 섭취량은 매주 모든 처리군에 200g씩 사료를 공급해 주었으며, 총 3회 식이섭취량을 측정하였음. 그 결과 정상군 및 UVB유도군과 비교하여 발효 자수정 찰보리와 콩 혼합물이 첨가된 식이 처리군 및 PC군에서 별다른 변화를 보이지 않았음.



<그림 48. 각 식이처리군에 따른 사료 식이섭취량>

② 체중 증가 측정

광노화가 유도된 무모생쥐를 각 처리군당 무작위로 5마리씩 선택하여 저울을 이용해 무게를 측정하였다. 12주간 총 3회 실시하였으며 각 처리군당 측정된 모든 값을 평균 처리하여 그래프로 나타내어 그림 49와 같은 결과를 얻어 내었음. 그림 49에서 알 수 있듯이 각 처리군에서 별다른 변화를 보이지 않았음.

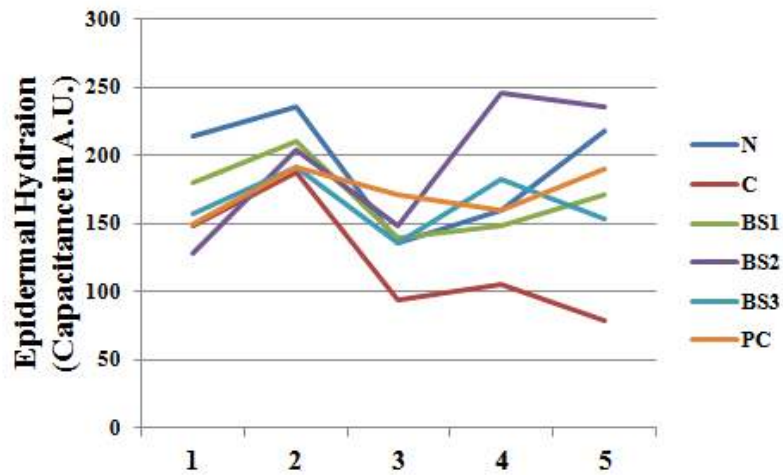


<그림 49. 콩보리관련 식이에 따른 무모생쥐의 무게측정>

③ 피부 수분량 측정

광노화유도 무모생쥐를 각 처리군 모두 총 12주 동안 매주마다 1회씩 피부의 수분량을 측정하였음 (그림 50). 피부 수분량 측정은 피부측정 센서통합장치(Courage-Khazaka electronic GMDH, Germany)protocol를 이용하여 수행하였음. 그 측정값은 도표3에 나타냄. 즉, 도표4에서 보듯이 UVB를 조사한 모든 군은 N군에 비해서 피부의 수분량이 통계적으로

유의한 수준으로 감소하였음. 발효 자수정 찰보리와 콩 혼합물을 식이섭취한 모든 처리군은 UVB만을 처리한 대조군 C군에 비해서 피부의 수분량이 증가하였음. 특히 자외선에 노출됨으로써 피부 수분량이 줄어든 대조군에 비하여 발효 자수정 찰보리와 콩 혼합물 처리군은 초기에 피부의 수분량을 유지함으로써 보습기능을 가짐을 일차적으로 확인할 수 있었음.

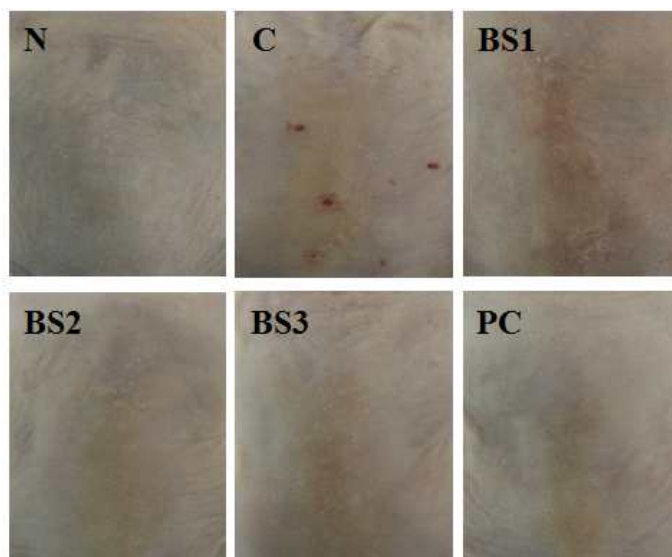


<그림 50. 콩보리관련 식이섭취군에 따른 피부의 수분보습양 측정>

(다) 광노화 유도 동물모델의 피부 관찰 및 분석

① 피부변화 관찰

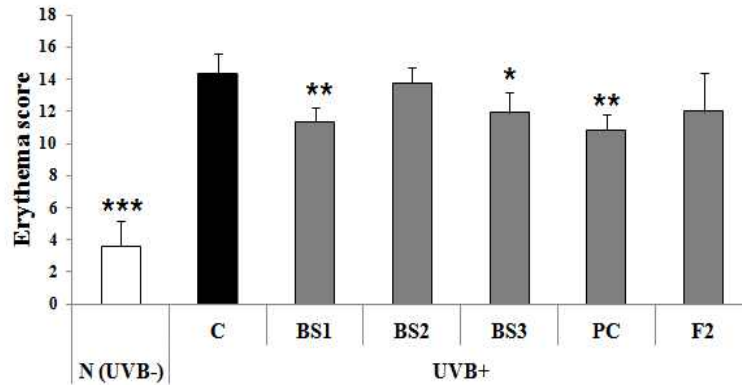
광노화가 유도된 무모생쥐의 피부를 처리군별로 관찰하여 그림 51과 같은 결과를 얻어내었음. 관찰 결과 모든 처리군은 C군에 비해서 외관상의 피부 건강상태가 개선되었고 특히 PC 처리군과 발효 자수정 찰보리 및 콩 발효물의 처리군은 거의 정상군인 N군에 가까운 건강한 피부형태를 유지하였음. 이러한 결과로 자외선에 의한 피부 손상을 발효 자수정 찰보리 및 콩 발효물 혼합물이 첨가된 식이를 섭취함으로써 광노화로 인한 피부손상을 회복시킬 수 있다는 가능성을 보여줌.



<그림 51. 콩보리관련 식이섭취군에 따른 피부의 수분량을 측정>

② 피부의 홍반 측정

광노화유도 무모생쥐 피부의 홍반을 측정하기 위하여 무모생쥐를 주당 3회(총 14주) UVB를 조사하였으며, Colormeter (DermaLab Skin Lab combo, Cortex Technology, Denmark) protocol을 이용하여 홍반을 측정하여 그림 52와 같은 결과를 얻어 낼 수 있었음. 측정결과 Normal군과 Control간의 통계적 유의성이 있었으며 특히, BS1군, BS3군 과 Positive control군에서는 Control군 보다 홍반을 크게 줄이는 것으로 나타남.

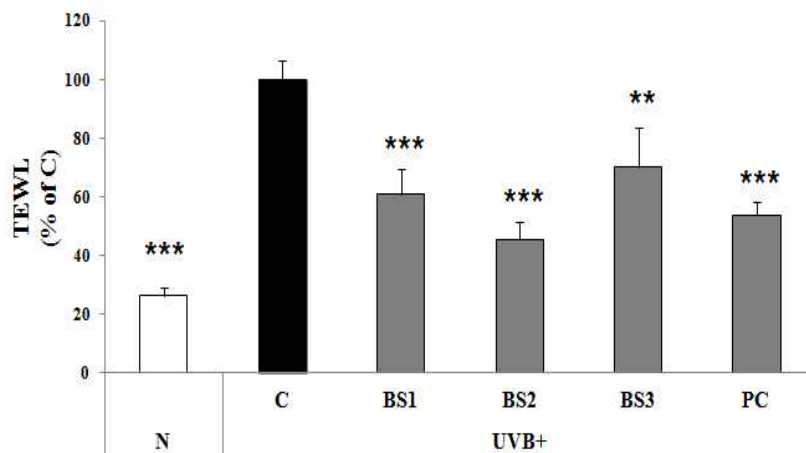


<그림 52. 자수정 찰보리 및 콩 관련 식이섭취군에 따른 피부의 홍반 측정>

③ 피부의 수분 손실량 (TEWL) 측정

광노화유도 무모생쥐 피부의 TEWL을 측정하기 위하여 무모생쥐를 주당 3회(총 12주) UVB를 조사하였으며, Colormeter(DermaLab Skin Lab combo, Cortex Technology, Denmark)protocol을 이용하여 TEWL을 측정하여 그림 53과 같은 결과를 얻어 낼 수 있었음.

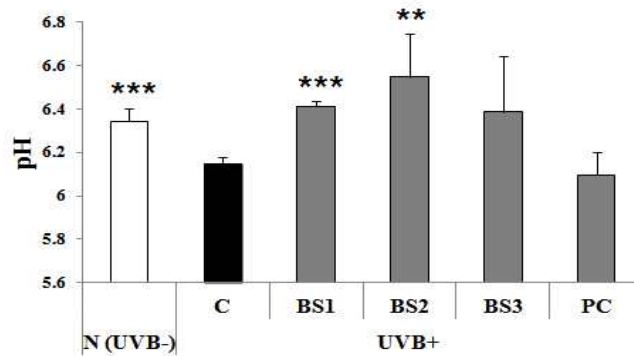
그 결과 N군과 C군간의 통계적 유의성이 있었고, 발효 자수정 찰보리와 콩 혼합물을 첨가한 식이를 섭취한 처리군인 BS1군, BS2군, BS3군과 PC군 모두 통계적으로 유의한 수준으로 UVB 처리에 따른 피부의 수분손실량을 효과적으로 방어하는 효과를 나타냄.



<그림 53. 콩보리 식이섭취군에 따른 피부관찰>

④ 피부의 pH 측정

광노화유도 무모생쥐 피부의 pH를 측정한 결과, 그림 54와 같은 결과를 얻어 낼 수 있었음. 측정 결과 N군과 C간의 통계적 유의성이 있었으며, 발효 자수정 찰보리와 발효콩 혼합물 중 BS1과 BS2 처리군은 N군의 pH 상태와 가까워짐을 알 수 있었음. 하지만 PC군과 BS3군은 C군과 차이 변화를 보이지 않았음.



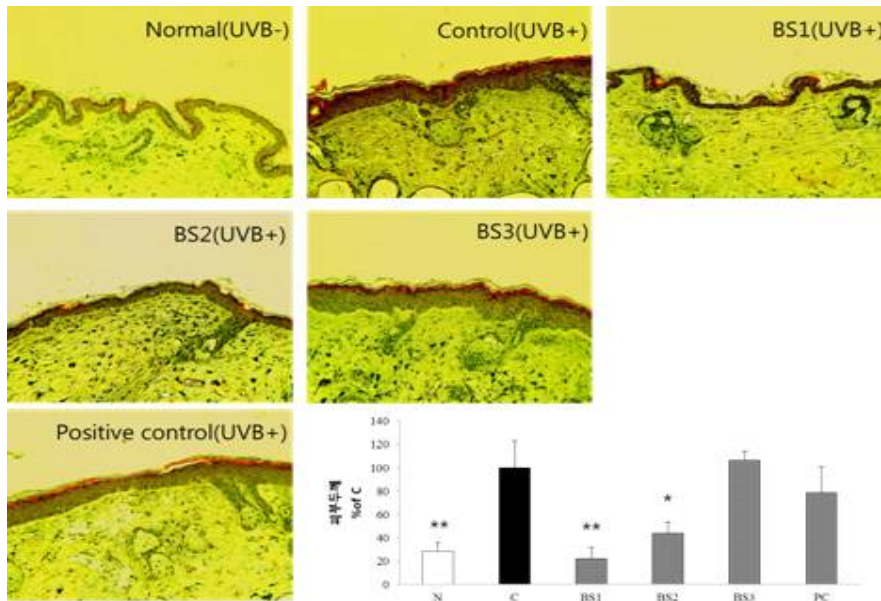
<그림 54. 콩보리 식이 처리군의 pH 측정결과>

⑤ 면역조직 염색법을 이용한 피부표피층의 관찰

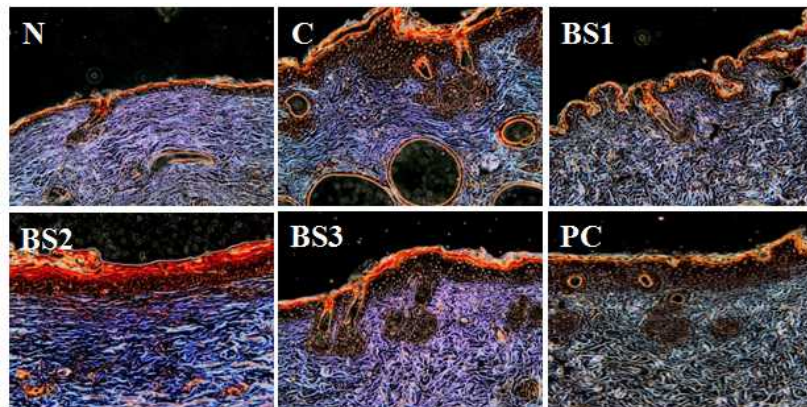
광노화유도 무모생쥐의 피부를 채취하여 면역조직 염색법중 하나인 H&E염색법을 이용하여 피부표피층의 두께를 관찰 하여 그림 55와 같은 결과를 얻어내었음. UVB를 조사하여 처리한 군인 Control군은 UVB를 조사하지 않은 군인 Normal군에 비해서 피부표피층이 두껍게 변화된 것을 알 수 있음. 하지만 UVB를 조사한 후 발효 자수정 찰보리와 발효콩 혼합물을 첨가한 식이를 한 처리군들 중에서 BS1과 BS2 처리군은 비교적 Control군에 비해서 피부표피층이 얇아진 것을 관찰할 수 있었음. 특히 발효 자수정 찰보리와 발효콩을 5:5로 처리한 BS1군은 Normal군에 가깝게 피부표피층이 얇아짐을 알 수 있음. 하지만, PC군과 BS3 처리군은 별다른 변화를 보이지 않았음. 현미경 관찰은 200배율로 하여 관찰하였음.

이번에는 광노화유도 무모생쥐에서 얻은 피부를 MT염색법을 이용하여 피부진피층의 변화를 관찰하여 그림 56과 같은 결과를 얻어 낼 수 있었음. 발효 자수정 찰보리와 발효 콩 혼합물을 첨가한 식이를 섭취한 모든 식이군에서는 C군에 비해서 진피층의 조밀도가 더욱 조밀해짐을 알 수 있었음. 현미경 관찰은 200배율로 하여 관찰하였음.

위와 같은 결과로부터 발효 자수정 찰보리와 발효콩 혼합물이 첨가된 식이를 장기간 섭취하게 되면, 자외선에 의하여 유도되는 피부 각질화 과다생성, 염증 및 콜라겐 합성 방해 작용을 억제함을 확인할 수 있었음. MT염색을 통해서 볼 때 콜라겐이 약하게 되고 콜라겐 합성 방해에 있어 많은 개선을 보임. 특히 발효 콩 및 자수정 찰보리 시료를 혼합시킴으로써 그 효과는 극대화됨을 확인할 수 있었음.



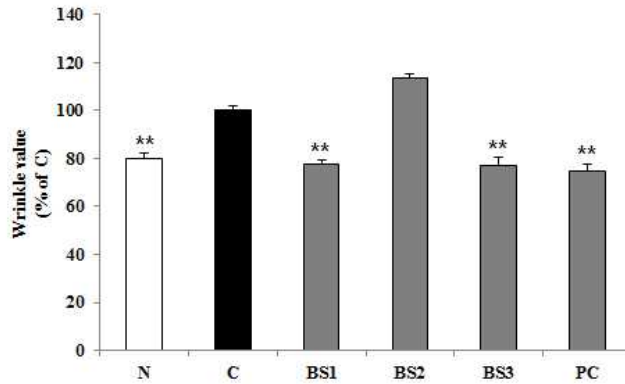
<그림 55. 콩보리 식이 처리군의 H&E staining 결과>



<그림 56. 콩보리 식이 처리군의 MT staining 결과>

⑥ 광노화유도 동물모델 피부의 주형제작 및 분석

광노화유도 무모생쥐의 피부를 채취 후 주형을 제작하여 주름의 상태를 분석한 결과 그림 57과 같은 결과를 얻어내었음. UVB를 조사하여 주름이 깊이 생긴 C군과 비교하여 피부의 주름상태가 BS2 처리군을 제외한 모든 식이군에서 주름이 N군에 비슷한 정도로 개선됨을 알 수 있었음.



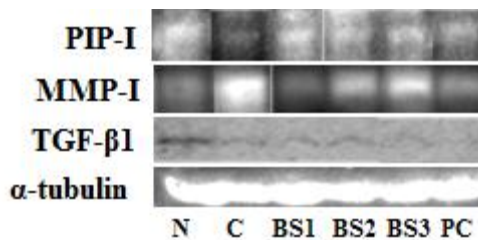
<그림 57. 콩보리 식이 처리군의 주름분석 결과>

(라) 광노화유도 동물모델 피부에서의 작용기전 연구

① 광노화유도 무모생쥐 피부에서의 피부주름관련 생체인자의 발현량 측정

피부주름관련 생체인자인 Procollagen type-1, MMP-1 과 TGF-β1은 피부의 주름형성 및 완화에 영향을 미침. 피부에 탄력을 주거나 주름을 완화시키는 collagen의 합성은 전구체인 Procollagen type-1의 합성에 의해서 생성됨. 또한 Procollagen type-1에 의한 collagen의 합성은 TGF-β1에 의해서 촉진되거나 MMP-1에 의해서 방해받음. 따라서 발효 자수정 찰보리와 발효콩 혼합물을 첨가한 식이를 섭취한 무모생쥐 피부에서의 피부주름 생성 및 완화에 따른 작용기전을 알아보기 위해서 웨스턴(Western)실험기법을 통해서 피부주름관련 생체인자의 발현량을 측정하였음. 광노화가 유도된 무모생쥐에서 채취된 피부를 세포분해용액을 이용하여 단백질만을 얻어서 웨스턴실험을 진행하였음. 실험결과는 그림 58에 나타내었음. 실험결과 Procollagen type-I은 Normal군에 비해 Control군은 발현양이 감소하였고, PC군을 제외한 콩보리 식이 섭취군 모두 발현양이 Control군에 비해서 증가하였음.

MMP-1은 Normal군에 비해서 Control군은 발현양이 증가하였고 모든 BS3처리군을 제외한 모든 식이처리군이 Control군에 비해서 발현양이 감소하였음. 하지만, TGF-β1은 Control군과 비교하여 보았을 때 식이 섭취군 모두 변화가 없었음을 알 수 있었음. 이러한 결과는 발효 자수정 찰보리와 발효콩 혼합물이 첨가된 식이를 섭취함으로써 자외선에 의한 피부의 손상을 예방하여 주름의 생성을 억제할 수 있는 가능성을 보여줌.

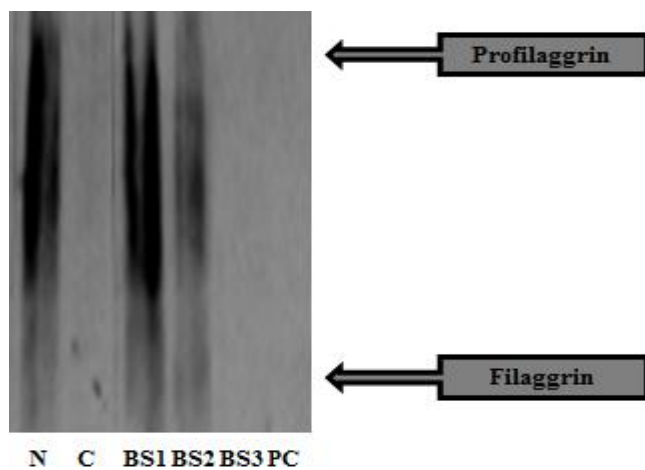


<그림 58. 콩보리 식이 처리군의 피부주름관련 단백질 발현 검증 결과>

② 광노화유도 무모생쥐 피부에서의 피부 보습 관련 생체인자의 발현량 측정

자외선이 피부 내 protease, collagenase, elastase 등의 가수분해 효소를 분비하게 하여 이들의 작용으로 광노화를 일으키게 됨. 이러한 광노화가 일어나게 되면 피부의 보습능력을 조절하는 NMF (natural moisturizing factor)의 기능을 저하시키게 되어 결국에는 피부의

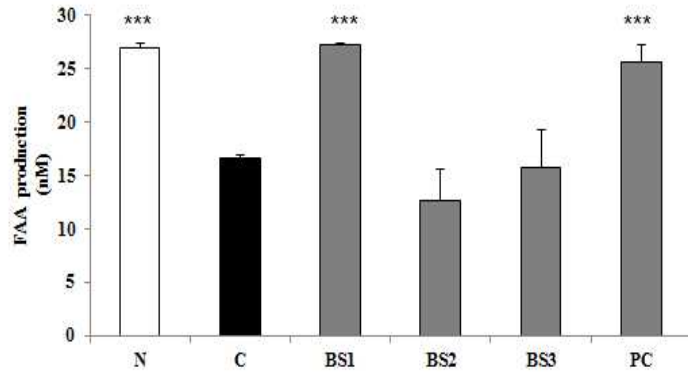
보습능력을 낮추게 됨. NMF는 전구체인 filaggrin에 의해서 합성되어짐. 따라서 NMF를 합성하는 전구체인 filaggrin의 발현양을 알아보기 위하여 웨스턴실험방법을 통해서 실험을 진행하였음, filaggrin은 피부표피층에서 NMF의 합성을 유도한다는 연구결과에 따라서 콩보리 관련식이를 통한 광노화 도 무모생쥐에서 채취한 피부를 피부표피와 진피로 분리하였음. 분리된 피부표피층에서 진행한 실험결과는 그림 59에 나타내었음. 그림 59에서 알 수 있듯이 표피층에서 Control군은 Normal군에 비해서 filaggrin의 발현양이 감소하였고, BS1과 BS2 처리군은 Control군에 비해서 filaggrin의 발현양이 증가하였음. 하지만, BS3군과 PC 처리군은 별다른 변화를 보이지 않았음. 이와 같은 결과로 발효 자수정 찰보리와 발효콩 혼합물을 5:5와 8:2로 섞어서 식이를 하면 자외선에 의한 적어진 피부 수분량을 증가시킴으로써 피부 보습인자에 영향을 미침을 확인할 수 있었음.



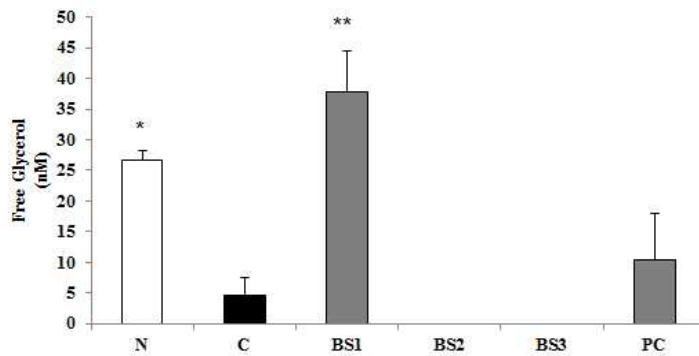
<그림 59. 콩보리 식이 처리군의 피부주름관련 단백질 발현 검증 결과>

③ 광노화유도 무모생쥐 피부에서의 피부보습관련 생체인자의 생성량 측정

자외선에 의한 피부에서 광노화가 일어나게 되면 피부의 보습능력을 조절하는 NMF(natural moisturizing factor)들 중에서도 특히 free amino acid (FAA)의 총양이 줄어들어서 피부에서의 보습기능을 저하시키게 됨. 또한, 피부에서의 수분을 holding 하고 이동시키는 기능을 가진 glycerol 역시 저하됨. 특히 FAA는 filaggrin에 의하여 구성되어진다고 알려져 있음. 따라서 FAA와 glycerol의 생성량을 알아보기 위하여 ELISA 분석기를 이용하여 실험을 진행하여 그림 60과 61에 나타냄. 실험결과, FAA와 glycerol 모두 자외선에 의하여 C군에서 생성량이 줄어들었으나, 발효 자수정 찰보리와 발효콩 혼합물을 5:5로 섞어 식이 함으로써 N 처리군 수준으로 생성량이 늘어남. PC 처리군 역시 효능이 있는 것으로 나타남. 하지만, BS2와 BS3 처리군은 C군과 비교하여 큰 변화를 보이지 않음. 또한 glycerol에서는 PC처리군도 BS2, BS3 처리군과 마찬가지로 별다른 변화를 보이지 않음.



<그림 60. 콩보리 식이 처리군의 FAA 측정 결과>

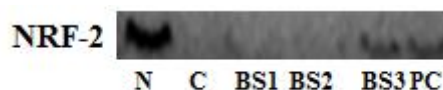


<그림 61. 콩보리 식이 처리군의 glycerol 측정 결과>

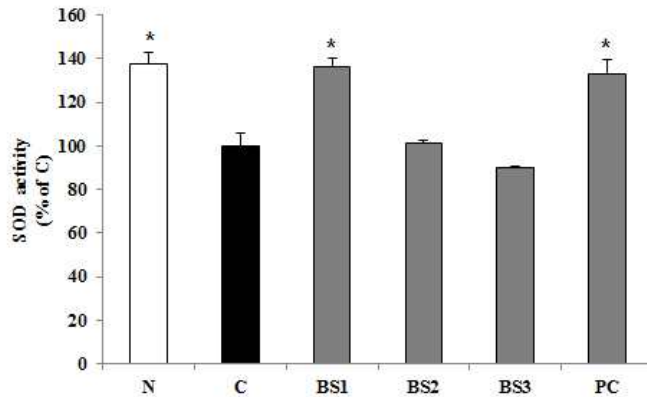
④ 광노화유도 무모생쥐 피부에서의 항산화관련 생체인자의 생성 및 발현양 측정

NRF-2는 여러 항산화 인자를 분비 및 생성유도를 한다고 알려져 있으며, SOD는 생체내에서 세포독성이 있다고 알려진 초과산화이온을 과산화수소로 바꿔주는 역할을 한다고 알려져 있음. 따라서 위 두 가지 물질은 모두 항산화 효능에 깊이 연관되어 있다고 할 수 있음. 이러한 NRF-2의 발현과 SOD의 활성화에 UVB를 조사한 동물모델에서 발효 자수정 찰보리와 발효콩 혼합물이 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 실험을 진행하여 그림 62와 63과 같은 결과를 나타내었음. 실험결과 N식이군에서는 많은 양이 발현되는 NRF-2는 UVB를 조사함으로써 줄어들게 된 C식이군과 비교하였을 시에 BS3와 강한 항산화제로 알려진 pycnogenol을 식이한 PC식이군에서는 NRF-2가 발현을 하였으나, 그 외의 BS1과 BS2 식이군에서는 발현이 되지 않음을 알 수 있었음.

또한, SOD 활성 실험결과 UVB를 조사하지 않은 N군에서는 SOD 활성이 높게 나타났으나, UVB를 조사함으로써 C군에서는 낮아짐을 알 수 있었으며 BS1군과 PC군에서는 N군 수준으로 SOD의 활성을 높였으나 그 외의 나머지 처리군에서는 별다른 변화를 보이지 않았음.



<그림 62. 콩보리 식이 처리군의 NRF-2 발현 측정 결과>



<그림 63. 콩보리 식이 처리군의 SOD 활성 측정 결과>

(마) 연구 결과 요약

12주 동안 무모생쥐에 UVB를 노출하는 경우, 피부에서는 피부 보습능력이 저하됨에 따라 피부의 각질이 두꺼워지고 건조하게 됨. 나아가 피부에 주름이 유발되며 염증이 유발되고 항산화 능력이 저하됨. 이러한 UVB조사에 의한 일련의 증상을 개선시키기 위하여 UVB를 조사한 무모 생쥐에 콩과보리등과 같이 시료가 함유된 식이를 섭취함에 따라 다음과 같은 결과를 얻었음. 즉, 발효 자수정 찰보리와 발효 대두 혼합물을 처리함으로써 UVB 처리에 의한 세포 독성은 감소함. 즉 발효 자수정 찰보리와 발효 대두를 8:2와 2:8로 섞어서 처리하였을 시에 정상 수준으로 회복하였고 모든 처리된 시료는 세포독성을 유발하지는 않았음. UVB 조사 광노화 동물모델에 장기간 식이 섭취 시 피부 보습과 건조에 대한 효능으로는 발효 자수정 찰보리와 발효 대두를 5:5 와 8:2로 섞어서 식이 섭취한 BS1과 BS2 식이 처리군에서 UVB에 의한 피부 각질화를 억제하고, filaggrin의 발현을 증가시킴. 또한 피부보습 능력과 관련된 FAA의 함량이 증가되었고 수분보유 능력에 관여하는 glycerol의 생성에도 유의적인 증가를 나타냄. 주름 생성 및 억제에 대한 효능으로는 특히 발효 자수정 찰보리와 발효 대두를 5:5 비율로 식이 섭취한 BS1 처리군에서 피부 진피에서의 콜라겐 합성 능력을 높이고, 주름 생성에 관여하는 단백질인 procollagen type-I의 발현을 증가시키고 콜라겐을 분해하는데 관여하는 MMP-1의 발현을 억제시켜 결과적으로 주름의 생성이 감소됨. 또한, 항산화 효능에 대해서는 발효 자수정 찰보리와 발효 대두를 2:8로 섞어서 식이 섭취한 BS3 군에서 항산화 관련 인자들을 유도시키는 NRF-2의 발현을 증가시켰으며, BS1 처리군에서는 항산화 능력을 높여주는 효소인 SOD의 생성을 증가시켜서 항산화 효능을 나타내었음. 결론적으로, 본 실험결과, 발효 자수정 찰보리와 발효 대두를 5:5로 섞어서 장기간 식이 섭취하는 경우 피부에서의 보습작용, 주름 개선효능, 항산화 효능 영역에서 가장 우수한 영향을 나타냄. 그러므로 발효 자수정 찰보리와 발효 대두의 피부 광노화 조절제로서의 최적 조합은 5:5로 결정하였음.

다. 세포모델에서 보리 및 콩 유래 유효 지표물질의 작용기작 규명

(1) 자외선이 조사된 세포모델에서의 발효 자수정 찰보리와 콩 혼합물의 세포독성과 주름, 보

습 개선 및 염증 억제 효능 검증

(가) 콩 및 콩발효물에서 HPLC를 이용한 콩 유래 유효물질의 분석

분석 조건은 Waters system을 이용하였으며 UV 흡광도는 200 - 400 nm. 분석 시에 다음과 같은 조건의 column (J'shpere ODS-H80, 250 mm × 4.6 mm; particle size, 4 μm; YMC Co. Ltd., Japan)을 이용하였으며, 용매는 water (1% acetic acid (solvent A)), acetonitrile (solvent B)를 이용하였음. 유량은 1.0 mL/min이며 경사도는 0.0 min, 8% B; 3.5 min, 15% B; 12.0 min, 17% B; 23.0 min, 24% B; 28.0 min, 50% B; 33.0 min, 100% B; 38.0 min, 100% B; 40.0 min, 8% B.

(나) 세포주 모델 준비와 ultra violet (UV) B 조사 및 샘플 처리에 따른 세포독성 측정

① Human keratinocyte 세포주인 HaCaT세포와 human fibroblast 세포주인 NHDF세포는 penicillin/streptomycin 1%, FBS 10%가 함유된 DMEM배지를 이용하여 유지함.

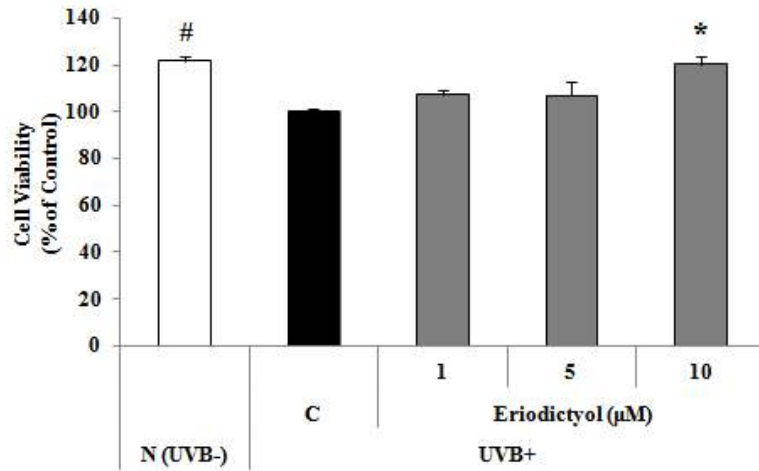
② HaCaT세포, NHDF세포, HaCaT세포와 NHDF세포의 공동배양 세포 (1:1 배율)를 각각 40mm 세포배양접시에 40 x 104개의 개수로 분주하고 24시간 후 UVB를 125mJ/cm² 양으로 조사한 후 보리 70% 에탄올 추출물, 보리 추출물의 분획체인 헥산, 클로로포름, 부탄올층을 1, 10, 100 μg/ml 또는 eriodictyol을 1, 5, 10 μM의 농도로 처리함. 24시간 후 MTT 실험을 진행함.

③ HaCaT세포, NHDF세포, HaCaT세포와 NHDF세포의 공동배양 세포를 각각 100mm 세포배양접시에 100 x 104개의 개수로 분주하고 24시간 후 UVB를 125mJ/cm² 양으로 조사한 후 보리 70% 에탄올 추출물, 보리 추출물의 분획체인 헥산, 클로로포름, 부탄올층을 1, 10, 100 μg/ml 또는 eriodictyol을 1, 5, 10 μM의 농도로 처리함. 24시간 후 western blot analysis와 ELISA 실험을 진행함.

(2) 자외선이 조사된 세포모델에서 Eriodictyol의 세포독성 실험

(가) 샘플 처리에 따른 세포독성 측정

① 그림 64와 같이 UVB에 노출된 HaCaT세포는 세포독성을 나타냄. UVB 처리한 HaCaT 세포에 Eriodictyol을 처리함. 그 결과, Eriodictyol 처리군은 농도 10 μM에서 UVB가 조사되지 않은 보통의 상태인 즉 정상 수준의 상태로 세포증식을 회복시킴.

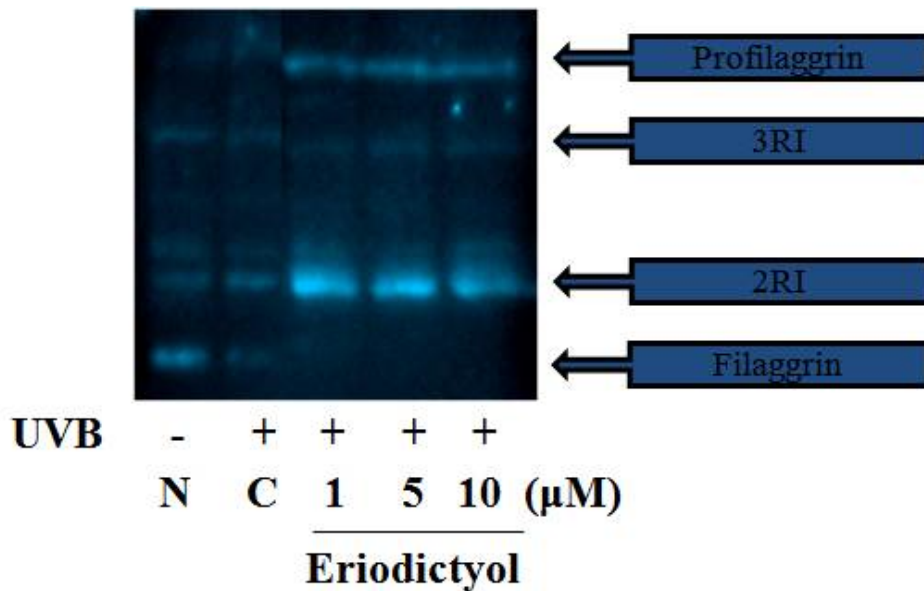


<그림 64. Eridictyol 처리군의 세포독성 측정 결과>

(2) 자외선이 조사된 세포모델에서 Eridictyol의 보습 효능 검증

(가) 샘플처리에 따른 피부보습 관련 filaggrin 발현양 측정

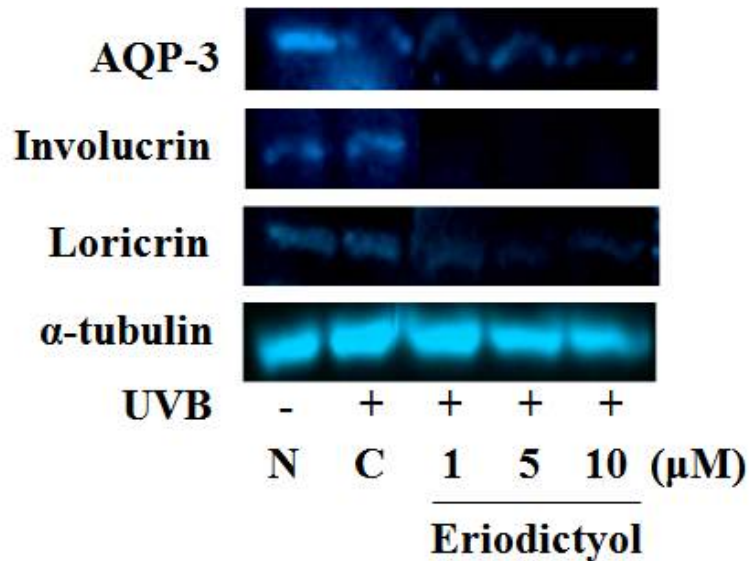
① 그림 65와 같이 UVB에 노출된 HaCaT세포에서는 filaggrin의 발현이 Normal군에 비하여 현저히 줄어드는 것을 확인 할 수 있었음. Eridictyol 처리군 역시 filaggrin의 발현이 줄어들었음.



<그림 65. Eridictyol의 filaggrin 발현양 측정>

(나) 샘플처리에 따른 피부보습 관련 filaggrin 발현양 측정

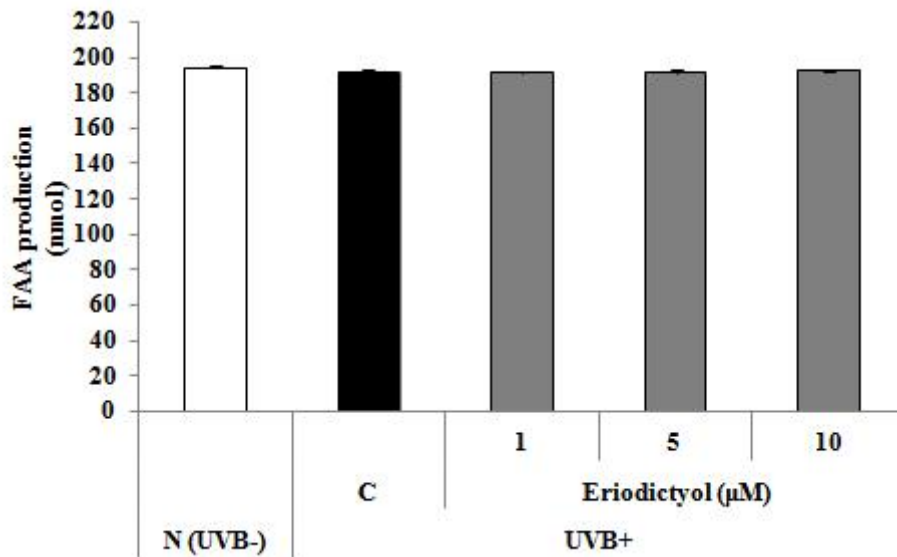
HaCaT 세포에 UVB를 조사하면, 그림 68과 같이 AQP-3과 Loricrin의 발현양은 줄어들었으며, Involucrin의 발현에는 크게 영향을 미치지 않았음을 확인 할 수 있었음. Eridictyol 역시 AQP-3, Loricrin과 Involucrin의 발현양을 늘리지 않았으며, 오히려 억제 시켰음.



<그림 66. Eriodictyol의 보습 관련 생체인자들의 발현양 측정>

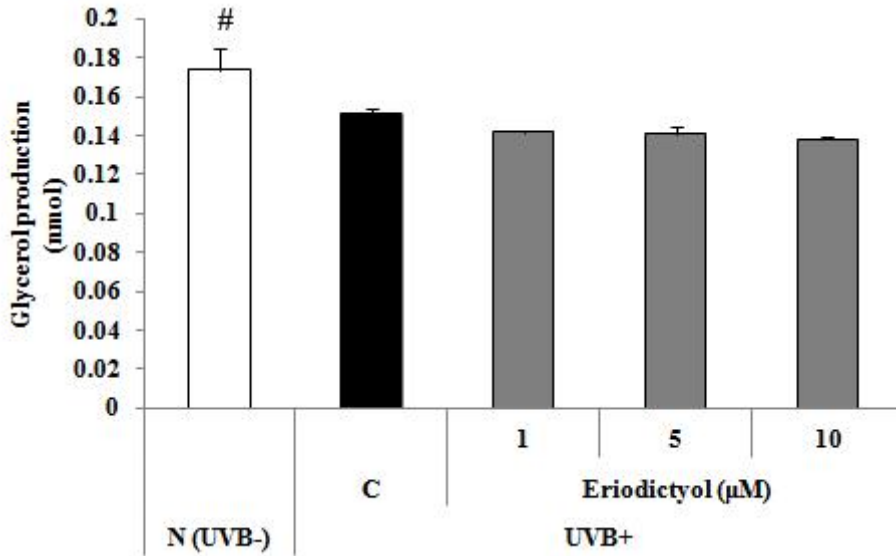
(다) 샘플처리에 따른 피부보습 관련 생산물의 측정

① HaCaT 세포에서 Free Amino Acid의 생성은 UVB를 조사하여도 큰 변화를 나타내지 않았으며, 샘플인 Eriodictyol을 처리하였을 시에도 변화를 보이지 않았음 (그림 67).



<그림 67. HaCaT세포에서의 Eriodictyol에 의한 Free Amino Acid 측정>

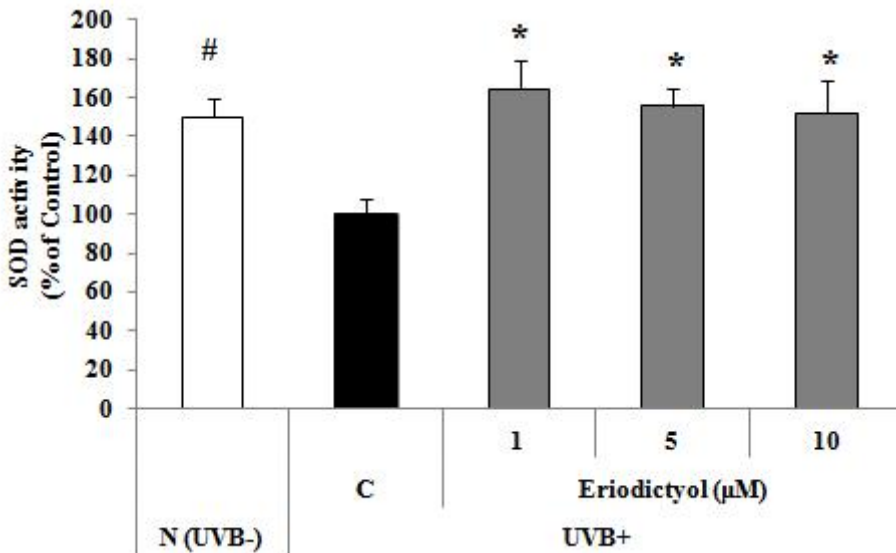
② HaCaT 세포에서 Glycerol의 생성은 UVB를 조사하였을 시에 약간의 독성을 나타내었음. Eriodictyol을 처리하였을 시 역시 UVB에 의한 독성을 복구하지 못하였음 (그림 68).



<그림 68. HaCaT세포에서의 Eriodictyol에 의한 Glycerol 측정>

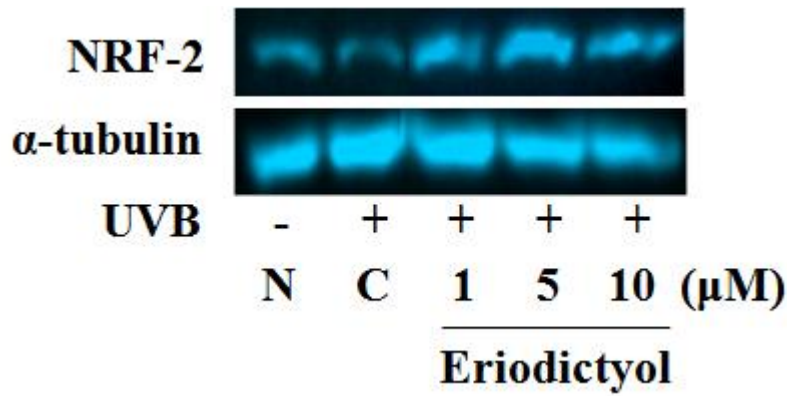
(라) 샘플처리에 따른 항산화 관련 생체인자의 활성 및 발현 측정

① HaCaT 세포에서 항산화 관련 생성물인 SOD의 활성은 UVB를 조사하였을 시에 크게 떨어지는 것을 확인 할 수 있었음. 하지만, Eriodictyol을 처리하면 SOD의 활성을 Normal 수준으로 증가 시키는 것으로 확인됨.



<그림 69. HaCaT세포에서의 Eriodictyol에 의한 SOD 활성 측정>

② HaCaT 세포에서 항산화 관련 인자인 NRF-2의 발현양은 UVB를 조사하였을 시에 줄어드는 것을 확인 할 수 있었음 (그림 70). 하지만, Eriodictyol을 처리하면 NRF-2의 발현양을 농도 의존적으로 크게 증가 시키는 것을 알 수 있음.

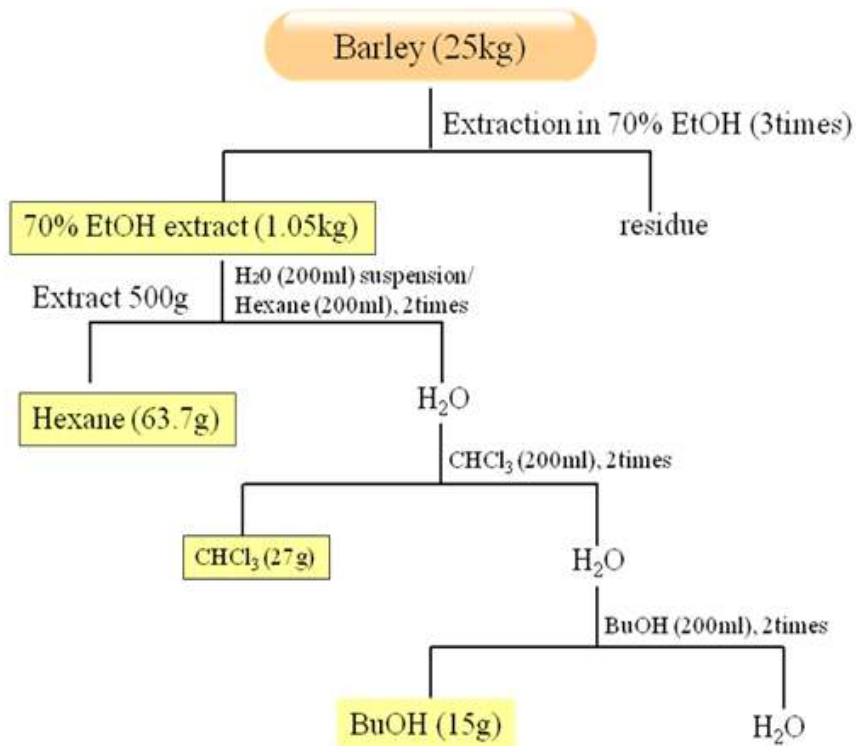


<그림 70. HaCaT세포에서의 Eriodictyol에 의한 NRF-2 발현양 측정>

(3) 자외선이 조사된 세포모델에서 보리 추출물 및 분획물의 피부주름 관련 실험

(가) 보리 추출물에서의 헥산, 클로로포름, 부탄올 층의 분획

그림 71 과 같이 보리의 70% 에탄올 추출물을 이용하여 헥산, 클로로포름 및 부탄올 층으로 분획함.

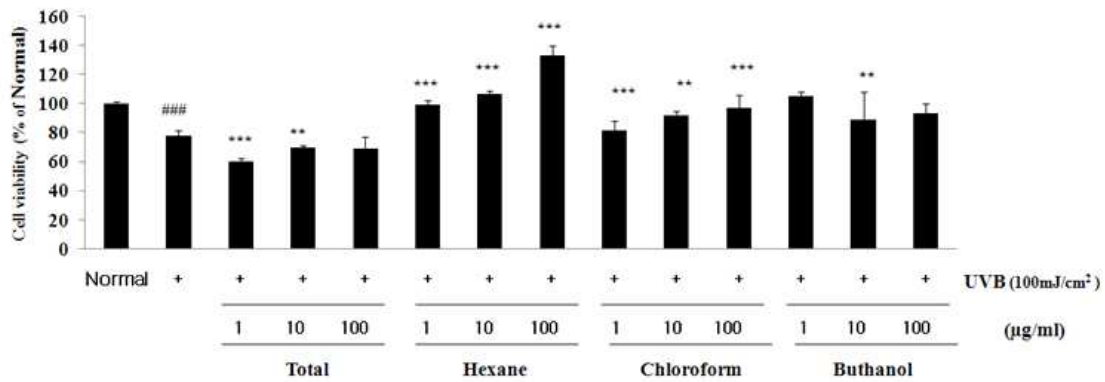


<그림 71. 보리 70% 에탄올 추출물의 분획>

(나) 분획층들의 세포독성 실험

그림 72와 같이 보리 에탄올 추출물에서의 헥산 (hexane), 클로로포름 (CHCl3)과 부탄올 (BuOH)층을 이용하여 UVB가 조사된 HaCaT세포와 NHDF세포의 공동배양세포에서의 세포독성 정도를 측정함. 실험결과, UVB가 공동배양세포에 조사하면 세포독성을 나타냄. 하

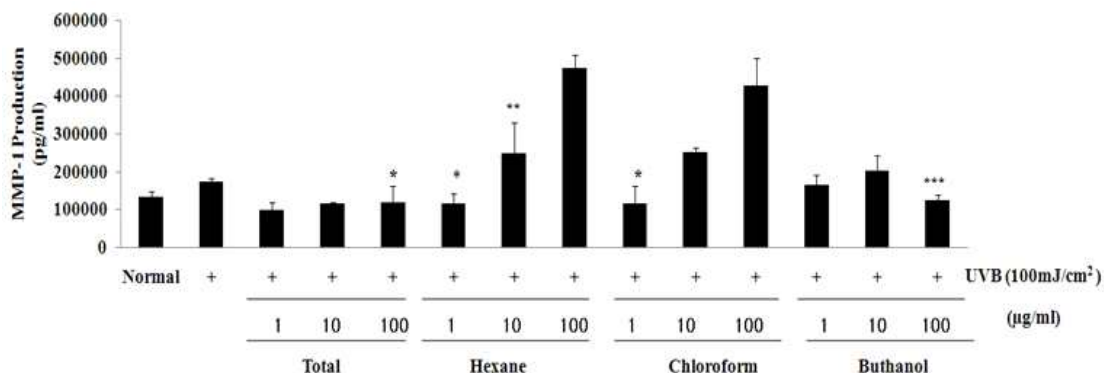
지만, 헥산층과 클로로포름층에서 세포독성을 억제하는 것으로 나타남. 특히, 헥산층에서의 세포독성 억제 효능이 가장 큰 것으로 나타남.



<그림 72. 보리 70% 에탄올 추출물과 분획층들의 세포독성 억제 실험>

(다) 분획층들의 주름관련 생체인자 발현 실험

보리 70% 에탄올 추출물과 분획층들의 피부주름 관련 인자인 MMP-1의 발현을 측정하여 도표10에 나타냄. 실험결과, UVB를 HaCaT세포와 NHDF세포 공동배양세포에 조사하면 유의성 있는 결과를 얻지는 못하였지만 MMP-1의 발현이 증가하는 것을 알 수 있음. 헥산과 클로로포름층은 저농도인 1 µg/ml의 농도에서 MMP-1의 발현을 감소시켰으며 보리 에탄올 추출물은 모든 농도에서 MMP-1의 발현을 억제시켰지만 부탄올층은 억제효능을 보이지 못하였음.

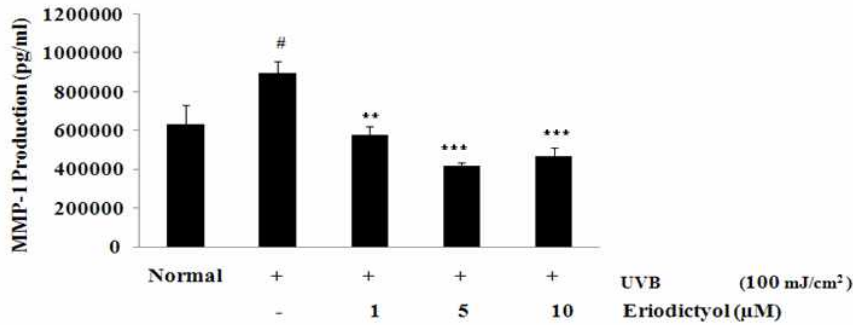


<그림 73. 보리 70% 에탄올 추출물과 분획층들의 MMP-1 발현 실험>

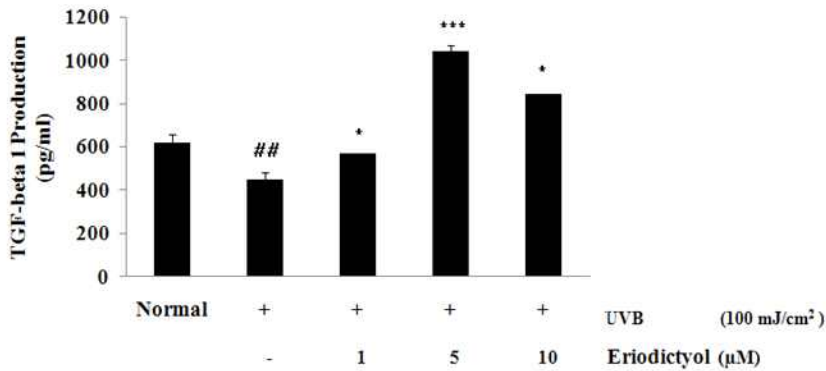
(4) 자외선이 조사된 세포모델에서 eriodictyol의 피부주름 관련 실험

(가) UVB가 조사된 세포모델에서의 eriodictyol에 의한 피부주름 관련 인자 발현 측정

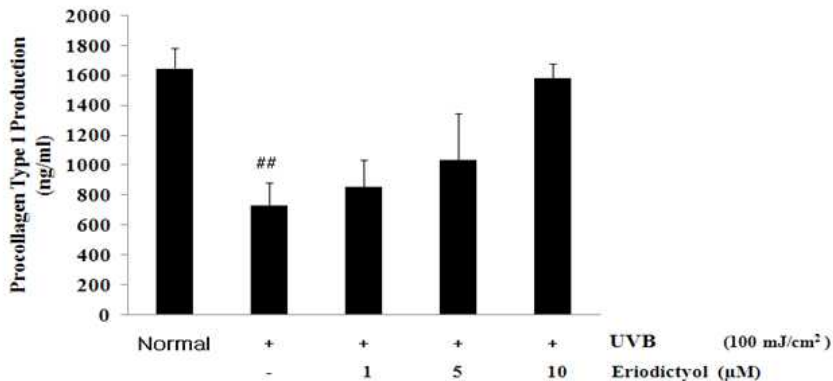
UVB가 조사된 HaCaT세포와 NHDF세포의 공동배양세포에서의 eriodictyol에 의한 피부주름 관련 인자인 MMP-1, TGF-β1, procollagen type-1 (PIP-1)의 발현 변화를 측정하기 위하여 실험한 결과, UVB를 조사하면 MMP-1의 발현은 증가하고 (그림 74), TGF-β1과 PIP-1의 발현은 감소 하였음 (그림 75, 76). 그림 74에서 UVB에 의하여 증가된 MMP-1의 발현은 eriodictyol을 처리하면 유의적으로 감소시키는 효능을 나타내었고, UVB에 의하여 감소된 TGF-β1과 PIP-1의 발현은 eriodictyol의해서 농도의존적으로 증가하는 결과를 나타내었음.



<그림 74. eriodictyol의 MMP-1 발현 실험>



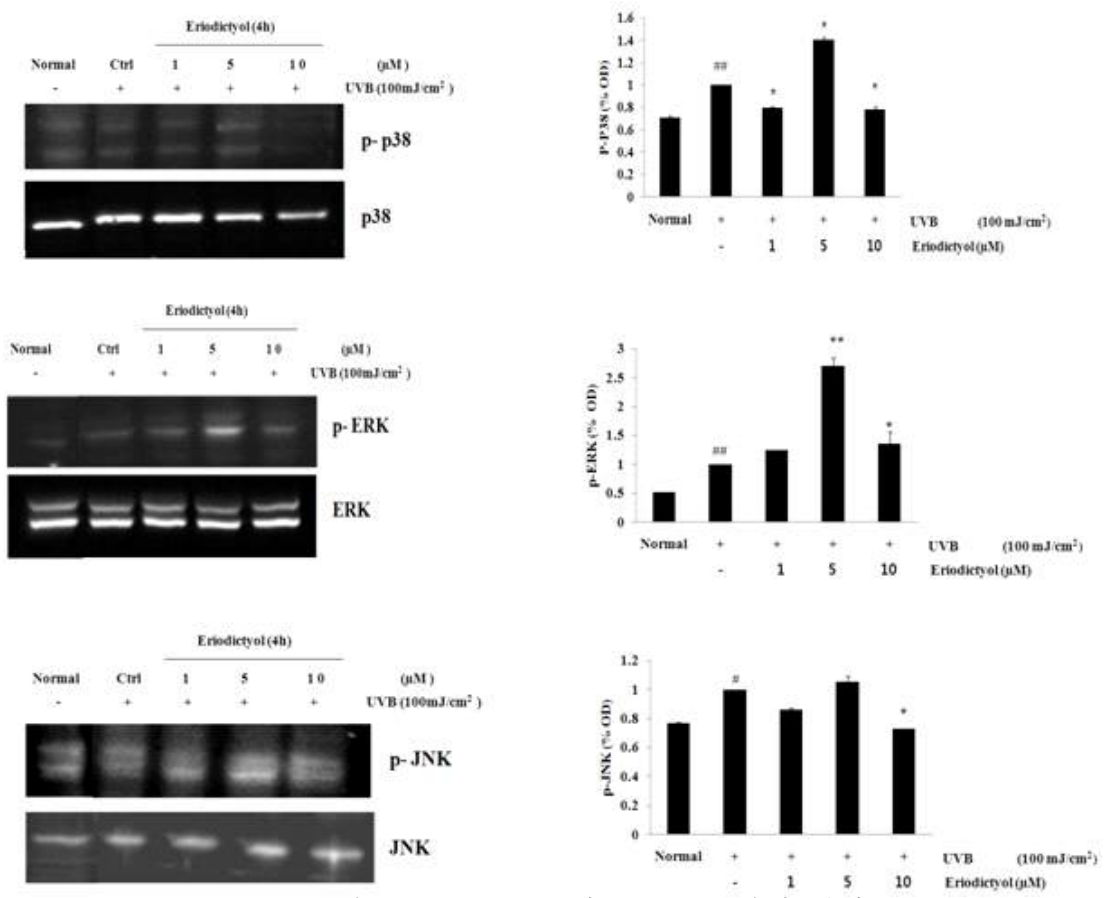
<그림 75. eriodictyol의 TGF-β1 발현 실험>



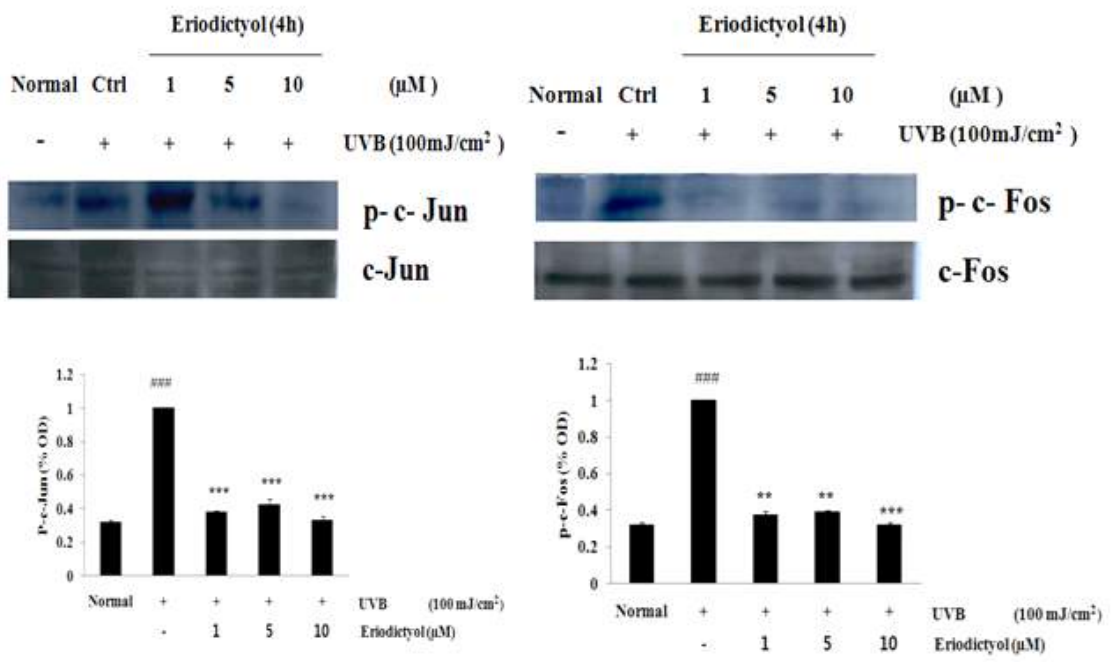
<그림 76. eriodictyol의 PIP-1 발현 실험>

(나) UVB가 조사된 세포모델에서의 eriodictyol에 의한 피부주름 기전연구

UVB가 조사된 HaCaT세포와 NHDF세포의 공동배양세포에서의 eriodictyol에 의한 MAPKs 인자인 JNK, p38, ERK (그림 77) 및 c-Jun, c-fos (그림 78)의 인산화 변화를 측정하기 위하여 western blot 실험기법을 이용하여 실험한 결과, 공동배양세포에 UVB를 조사하면 JNK, p38, ERK 및 c-Jun, c-Fos의 인산화가 증가함. Eriodictyol을 1과 10 μM 농도로 처리하면 p38와 JNK의 인산화를 감소시키고 또한 c-Jun, c-Fos의 인산화를 eriodictyol 1, 5, 10 μM 농도 처리시에 감소시킴을 알 수 있음. 하지만, ERK의 인산화를 억제시키지는 못하였음.



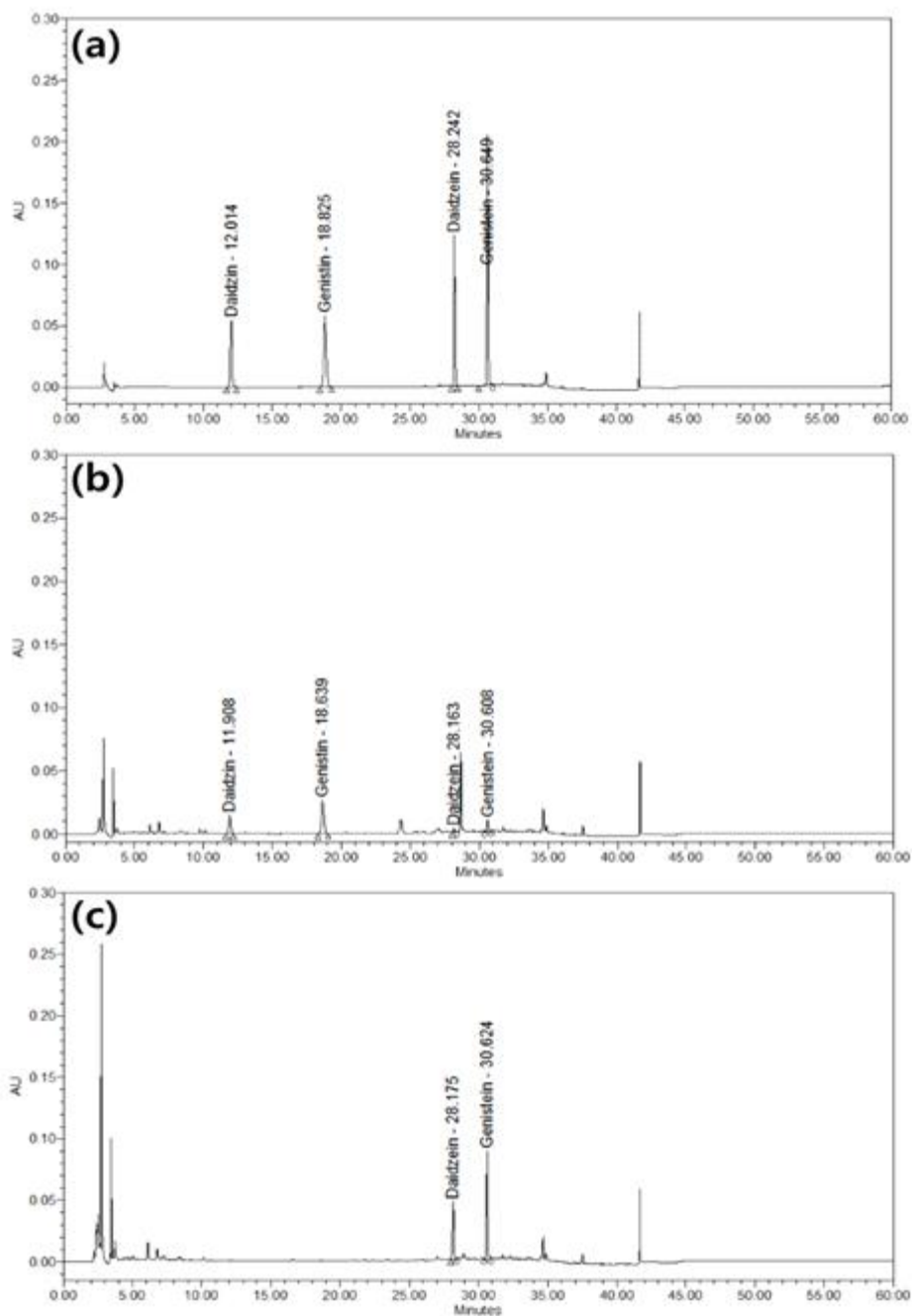
<그림 77. eriodictyol의 MAPKs 발현 실험>



<그림 78. eriodictyol의 c-Jun과 c-Fos 발현 실험>

(5) 자외선이 조사된 세포모델에서 콩 및 콩발효물 유래 지표물질의 피부 염증 효능 검증
 (가) HPLC를 이용한 콩과 콩발효물 유래 지표물질의 정량 분석

콩과 콩발효물 유래 지표물질들을 콩과 콩발효물에서 비교를 하면 HPLC 분석결과, 그림79와 같이 daidzin과 genistin은 발효과정을 통하여 콩발효물에서는 측정이 되지 않는 결과를 나타냄. 대신 daidzein과 genistein의 함유량은 콩에 비해서 콩발효물에서 월등히 높아진 결과를 나타냄. (A는 daidzin, daidzein, genistin, genistein의 standard, B는 콩에서의 지표물질 분석, C는 콩발효물에서의 지표물질 분석)

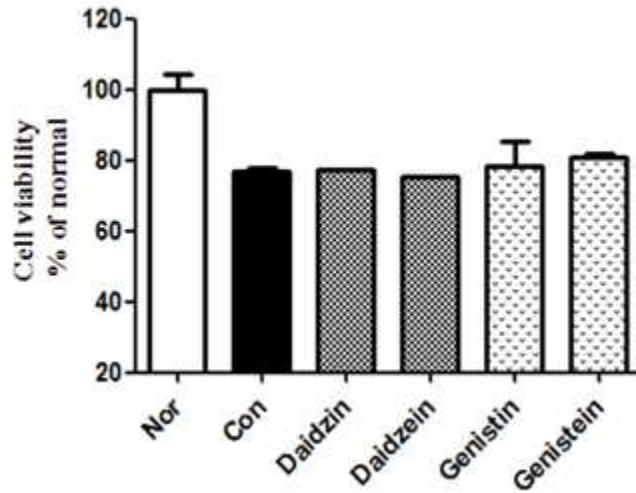


<그림 79. 콩 및 콩발효물 유래 지표물질의 분석>

(나) 콩과 콩발효물 유래 지표물질의 세포독성 실험

HaCaT세포와 NHDF세포의 1:1 배율 공동배양세포에서 UVB를 조사하면 세포독성을 나타내며, daidzin, daidzein, genistin, genistein을 처리하였을 시에 UVB를 조사한 세포와 비교

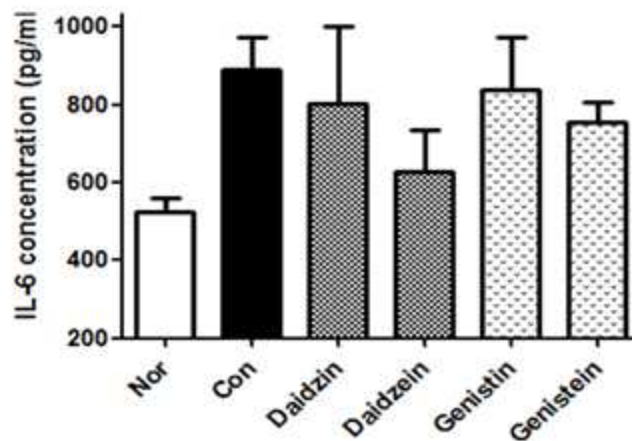
했을 시에 세포독성에 큰 변화를 보이지 않는 것으로 나타남.



<그림 80. 콩 및 콩발효물 유래 지표물질의 세포독성 실험>

(다) 콩과 콩발효물 유래 지표물질의 염증 억제 효능 검증

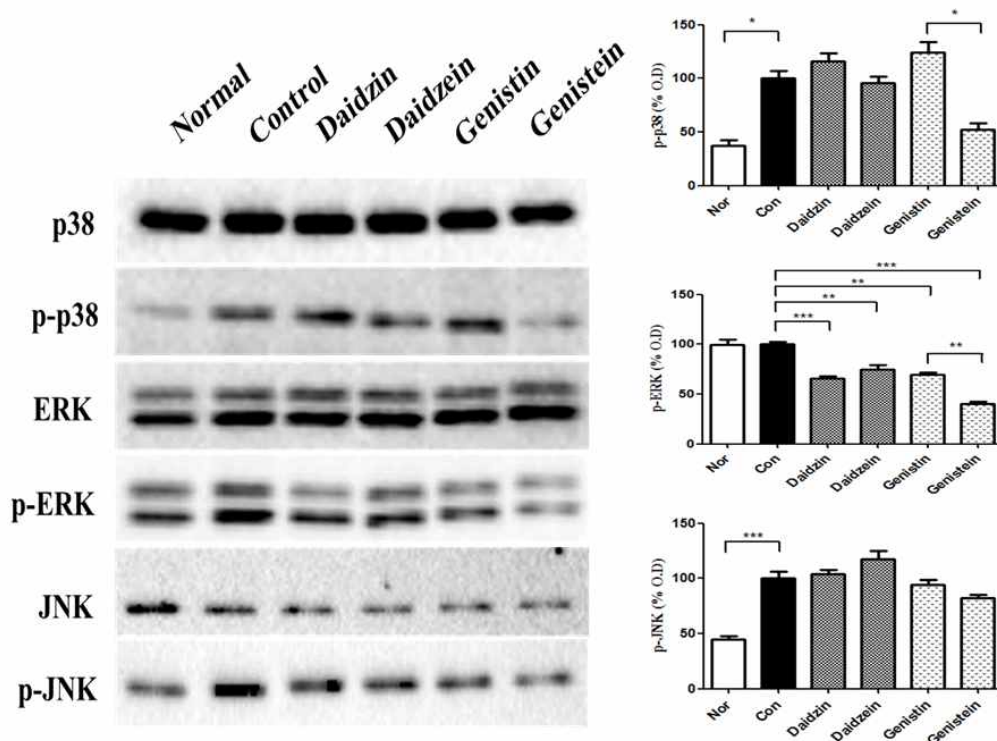
콩과 콩발효물 유래 지표물질인 daidzin, daidzein, genistin, genistein의 세포모델에서의 염증 억제 효능을 알아보기 위하여 ELISA와 western blot 실험기법을 이용하여 실험을 진행함. 실험결과, 그림81과 같이 공동배양세포에 UVB를 조사하면 염증관련 인자인 interleukin-6 (IL-6)의 생성이 늘어남. 하지만 daidzin과 genistin은 큰 변화를 나타내지 않았지만 daidzein과 genistein은 유의성은 없지만 IL-6를 억제하는 것으로 나타남.



<그림 81. 콩 및 콩발효물 유래 지표물질의 IL-6생성 측정>

(라) 콩과 콩발효물 유래 지표물질의 기전연구

콩과 콩발효물 유래 지표물질의 MAPKs의 발현 변화를 알아보기 위하여 western blot 실험기법을 이용하여 결과를 나타냄. 그림 82와 같이 공동배양세포에 UVB를 조사하게 되면 ERK의 인산화에는 큰 영향을 주지 못하였지만 p38과 JNK의 인산화를 증가시켰음. 이때 daizin, daidzein과 genistin은 p38과 JNK의 인산화에 영향을 미치지 못하였지만 genistein은 p38의 인산화를 억제하였으며, ERK의 인산화에는 콩 및 콩발효물 유래 지표물질 모두 인산화를 억제하였음.



<그림 82. 콩 및 콩발효물 유래 지표물질의 MAPKs 인산화 변화>

(6) 연구 결과 요약

Human epidermis인 HaCaT세포에 UVB를 조사하였을 경우, 보습 관련 인자인 filaggrin, AQP-3, loricrin과 항산화 관련 인자인 NRF-2 발현은 낮아짐. 하지만, involucrin의 발현은 큰 변화를 보이지 않음. 또한, 보습 관련 생성물인 glycerol과 항산화 관련 생성물인 SOD의 생성 및 활성은 낮아지지만, 보습 관련 생성물인 free amino acid의 생성에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타남. 이때, 보리 유래 지표물질중 하나인 eriodictyol을 처리하였을 시에 보습 관련 생체인자들에 대한 변화에 대해서는 크게 영향을 미치지 않은 것으로 나타남. 즉, eriodictyol은 filaggrin, AQP-3, involucrin, loricrin의 발현양에 영향을 미치지 못 하였으며, glycerol, free amino acid의 생성에도 영향을 미치지 못하였음. 하지만, 항산화 효능에 대해서는 항산화 관련 인자인 SOD의 활성을 높였으며, NRF-2의 발현양을 크게 증가 시켰음. 또한, 피부 주름 생성에 관련하여 UVB 노출에 의한 MMP-1의 증가, TGF- β 1과 PIP-1의 감소는 eriodictyol에 의해서 MMP-1의 발현을 감소시키고 TGF- β 1과 PIP-1의 발현을 증가시켜서 주름생성을 억제하는 것으로 나타남. 또한 보습, 항산화와 주름 생성에 관여하는 기전중 하나인 MAPKs와 c-Jun, c-Fos의 인산화에 있어서는 p38과 JNK의 인산화를 억제시키고 c-Jun과 c-Fos의 인산화 역시 억제시켜 주름개선 효능을 나타내는 것으로 나타남. 그러므로, eriodictyol은 비록 피부 보습 관련 생체인자들에 대한 영향은 크게 없지만, 피부 주름생성과 항산화 효능에 대한 효과는 크다고 할 수 있음. 콩 유래 지표물질인 daidzin과 genistin은 발효과정을 통하여 daidzein과 genistein으로 변환되어 함유량이 높아짐. 이때 daidzein과 genistein은 UVB에 의하여 증가된 염증 유발 인자인 IL-6의 생성을 억제시키고 특히 genistein은 염증 관련 기전 중 하나인 MAPKs 중에서 p38과 JNK의 인산화를 억제시켜서 염증억제 효능을 나타내는 것으로 나타남.

따라서, 보리 유래 지표물질인 eriodictyol은 비록 피부보습 효능을 나타내지는 않았지만, UVB에 의하여 저하된 피부 주름생성과 항산화 기능을 개선시키는 것으로 사료됨. 또한, 콩 유래 지표물질인 daidzein과 genistein은 UVB에 의하여 유발된 피부 염증을 억제시키는 효능을 갖고 있는 것으로 사료됨. 위와 같은 결과로, 보리와 발효보리는 광노화에 의한 피부 주름생성과 항산화 기능 개선, 콩과 콩발효물은 광노화에 의한 피부 염증 개선에 대한 최적의 조절제가 될 수 있다고 사료됨.

3. 제1협동: 보리 및 콩 지표물질 분석법 확립 (경희대학교 피부공학센터)

가. 보리 및 보리 발효물 비교분석 및 보리 유래산물의 지표성분 분석법 확립

(1) 보리원물 및 보리 발효물에서의 LC-MS profile 비교

(가) 보리원물 및 보리 발효물 추출

① 보리원물 및 보리 발효물 소재 입수 (샘표에서 제공)

② 70% EtOH 추출:

소재 5g 추출 시, 보리원물에서 130.1mg, 보리 발효물에서 643.3mg의 농축물 얻음

(나) 보리원물 및 발효물 분석

① 추출물의 q-TOF MS 분석조건:

Column; C18 (2.1 mm × 150 mm, 2.7 μm)

Solvent; gradient with 0.1% Formic acid in Water and Acetonitrile, 0.6ml/min

MS; ESI (+), (-)

Instrument; Agilent Technologies 6530 Q-TOF 6410 LC/MS

LC-MS 분석 시, 보리원물에서 8.7mg/ml, 보리 발효물에서 23.8mg/ml 수준으로 분석함

② 보리원물 및 발효물 DB 검색

(2) 보리 유래 화합물의 표준품 분석

(가) 보리 유래 화합물 리스트 확보 (20종)

번호	Compound
1	Ferulic acid
2	Luteolin
3	cis-Sinapic acid
4	trans-Sinapic acid
5	Vitexin
6	Hordenine
7	Gramine
8	Levulinic acid
9	Eriodictyol
10	(+)-taxifolin
11	Phytic acid
12	(2Z,4E)-5-[(1R,6S)-1-Hydroxy-6-hydroxymethyl-2,6-dimethyl-4-oxo-cyclohex-2-enyl]-3-methyl-penta-2,4-dienoic acid
13	Guanosine3',5'-cyclic monophosphate

14	Lysergol
15	Ergocalciferol
16	β -sitosterol
17	5-hydroxymethyl-2-furaldehyde
18	Esculin hydrate
19	6,7-Dihydroxycoumarin
20	b-D-Glucan

<표 5. 보리 유래 화합물 20종 목록>

① 20종 화합물 중 표준품 18종 입수 및 12종 표준품 분석 확인 하였음

(나) 보리 유래 화합물 표준품 분석

① 보리 유래 화합물의 표준품 LC/MS 분석조건:

Column; C18 (2.1 mm × 150 mm, 2.7 μ m)

Solvent; gradient with 0.1% Formic acid in Water and Acetonitrile, 0.6ml/min
MS; ESI (+), (-)

Instrument; Agilent Technologies 6530 Q-TOF 6410 Triple Quad LC/MS

(3) 보리 중 유용성분을 분석하고 지표성분을 탐색

(가) 보리원물 및 발효물에서의 보리 중 유용성분 분석

① 보리 유래 화합물 표준품 분석:

Ferulic acid, Luteolin, cis-Sinapic acid, trans-Sinapic acid, Vitexin, Hordenine, Levulinic acid, Eriodictyol, (+)-taxifolin, Guanosine3',5'-cyclic monophosphate, Esculin hydrate, 6,7-Dihydroxycoumarin 이상 12종 표준품을 보리원물 및 발효물에서 탐색함

(나) 보리원물 및 발효물에서의 보리 유래 지표성분

① 보리 유래 화합물의 표준품 LC/MS 분석조건:

Column; C18 (2.1 mm × 150 mm, 2.7 μ m)

Solvent; gradient with 0.1% Formic acid in Water and Acetonitrile, 0.6ml/min
MS; ESI (+), (-), Scan Type; MS2 SIM

Instrument; Agilent Technologies 6530 Q-TOF 6410 Triple Quad LC/MS

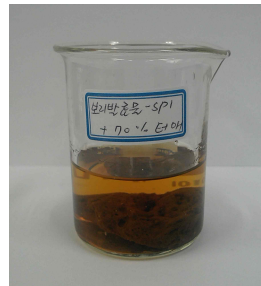
(4) 보리원물 및 보리 발효물에서의 LC-MS profile 비교

(가) 보리원물 및 보리 발효물 추출

① 보리원물 및 발효물 소재 70% EtOH 추출:



보리원물



보리 발효물

<그림 83. 보리원물 및 발효물의 추출과정>

② 샘플에서 제공된 보리원물 및 보리 발효물 소재 5g을 70% EtOH로 overnight 추출하였고, 추출결과 보리원물에서 130.1mg, 보리 발효물에서 643.3mg의 농축물 얻었음.

(나) 보리원물 및 발효물 분석

① 추출물의 q-TOF MS 분석조건:

Column; C18 (2.1 mm × 150 mm, 2.7 μm)

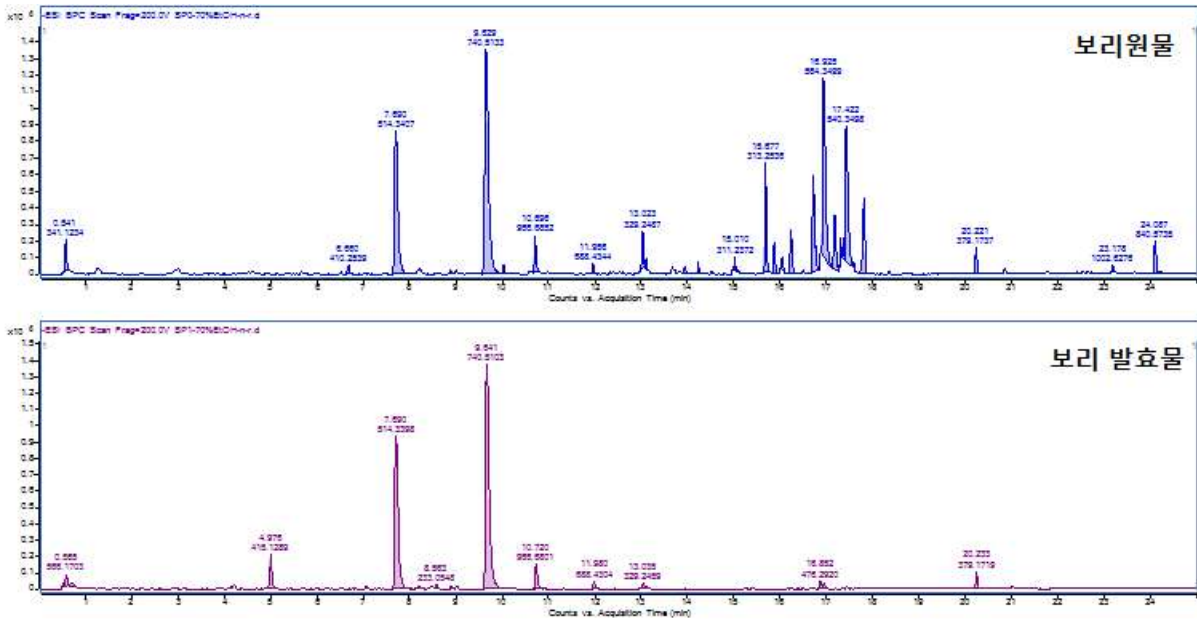
Solvent; gradient with 0.1% Formic acid in Water and Acetonitrile, 0.6ml/min

MS; ESI (+), (-)

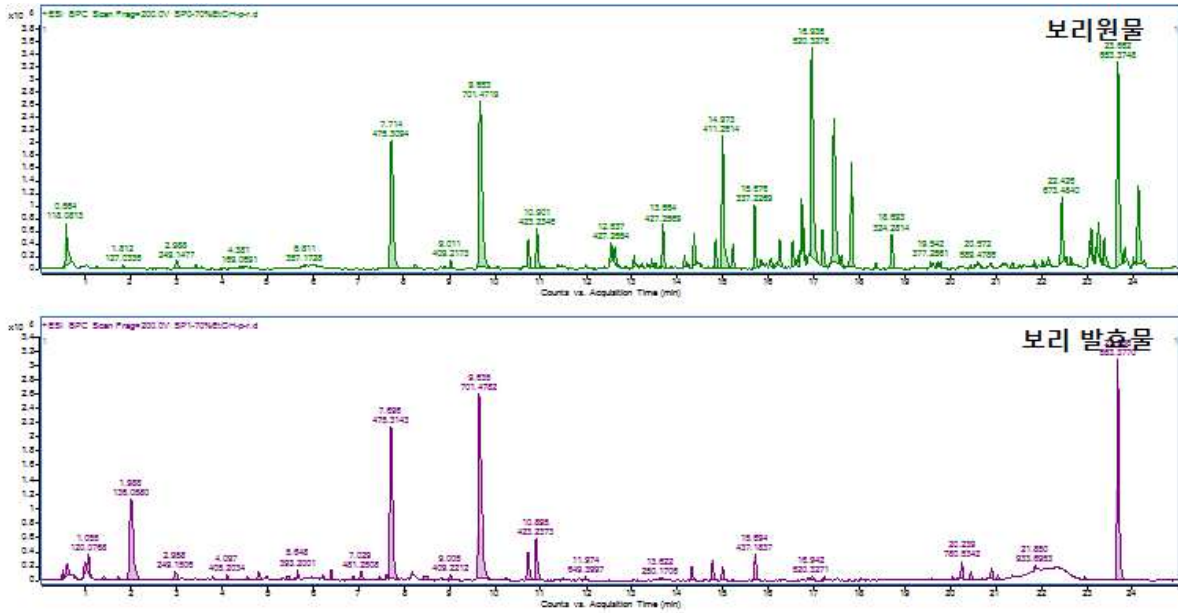
Instrument; Agilent Technologies 6530 Q-TOF 6410 LC/MS

② LC-MS 분석 시, 샘플은 추출물 원액을 사용하였으며, 샘플의 농도는 보리원물 8.7mg/ml, 보리 발효물 23.8mg/ml로 분석하였음.

㉠



㉡



<그림 84. 보리원물 및 발효물의 ESI-(A), ESI+(B) mode chromatogram>

③ 보리원물 및 발효물 DB 검색

Cp d	Name	RT	Mass	Base Peak	Formula	Score (MFG)	Score (DB)	Height	Ion Polarity
1		0.541	504.185	503.1781	C15 H32 N6 O11 S	94.27	0	93757	Negative
2	Baihuaqianhuoside	0.542	342.130	341.1234	C16 H22 O8	86.31	83.86	21154	Negative
3		0.561	378.107	377.1004	C16 H23 Cl O8	93.73	0	13300	Negative
4		0.563	540.162	539.1556	C16 H29 Cl N10 O7 S	94.01		14316	Negative
5		0.573	246.062	245.0551	C7 H10 N4 O6	76.52	0	48311	Negative
6		0.589	522.151	521.1447	C16 H27 Cl N10 O6 S	94.1	0	34627	Negative
7		0.598	161.859	160.852				49806	Negative
8		1.249	412.221	411.2142	C20 H32 N2 O7	96.69	0	34377	Negative
9		2.983	290.091	289.0841	C15 H10 N6 O	98.65	0	36715	Negative
10		6.662	411.261	410.254	C19 H29 N11	94.53	0	55873	Negative
11		7.688	498.356	497.3495	C14 H42 N16 O4	94.38	0	21642	Negative
12		7.69	515.348	514.3409	C21 H45 N11 O2 S	94.66	0	86966	Negative
13		8.208	485.245	484.2378	C24 H39 N O7 S	96.47	0	36381	Negative
14		8.21	548.241	547.234	C24 H40 N2 O10 S	94.63	0	38917	Negative
15		8.87	757.512	756.5056				34168	Negative
16		9.583	843.469	842.4618				68831	Negative

17		9.634	724.530 6	723.5233	C32 H60 N20	99.61	0	62051 1	Negati ve
18		9.636	678.522 9	713.4924	C30 H62 N16 O2	96.97	0	45714	Negati ve
19		9.639	741.520 7	740.5133	C31 H59 N21 O	98.61	0	13607 21	Negati ve
20		10.015	757.431 4	756.4242				59578	Negati ve
21		10.698	967.692 4	966.6851				23841 7	Negati ve
22		10.699	950.700 5	949.6932				44297	Negati ve
23		11.959	689.441 7	688.4345	C27 H51 N19 O3	99.18	0	68632	Negati ve
24	15alpha-Hydroxymansum binone	13.097	330.255 6	329.2483	C22 H34 O2	93.21	92.86	96472	Negati ve
25		13.657	404.293 6	403.2863	C18 H40 N6 O2 S	94.78	0	48269	Negati ve
26	15alpha-Hydroxymansum binone	14.222	330.255 5	329.2482	C22 H34 O2	91.39	91.14	74294	Negati ve
27		14.967	434.304	433.2967	C26 H42 O5	94.9	0	36034	Negati ve
28		14.967	314.259 9	313.2526	C22 H34 O	88.64	0	46629	Negati ve
29		15.013	312.244 3	311.2371	C22 H32 O	77.39	0	11153 0	Negati ve
30		15.673	382.248 3	381.241	C21 H30 N6 O	92.72	0	44615	Negati ve
31	Fritillebin A	15.673	650.493 2	649.4859	C42 H66 O5	82.88	82.91	59977	Negati ve
32		15.673	399.238 3	398.2311	C20 H29 N7 O2	93.85	0	49195	Negati ve
33		15.674	314.260 8	313.2535	C22 H34 O	90.37	0	67840 5	Negati ve
34		15.997	563.340 5	562.3332	C23 H41 N13 O4	81.06	0	54220	Negati ve
35		16.037	513.324 6	512.3174	C19 H39 N13 O4	98.64	0	10407 4	Negati ve
36		16.224	563.341 6	562.3343	C24 H37 N17	78.61	0	27469 0	Negati ve
37		16.704	1084.69 52	1083.687 9				38576	Negati ve
38		16.705	505.334 2	504.3269	C20 H43 N9 O6	98.71	0	51554	Negati ve
39		16.705	633.344 6	632.3373	C25 H47 N9 O10	98.92	0	38995	Negati ve
40		16.705	582.346 6	581.3393	C22 H42 N14 O5	99.22	0	52339	Negati ve
41		16.705	565.357 8	564.3505	C26 H51 N3 O10	98.01	0	58844 5	Negati ve
42		16.752	741.399 3	740.3921	C28 H51 N15 O9	99.6	0	52996	Negati ve
43		16.752	678.403 1	677.3958	C27 H54 N10 O10	98.95	0	98214	Negati ve
44		16.752	724.409 7	723.4024	C31 H64 O18	98.92	0	17839 3	Negati ve
45		16.848	477.302	476.2949	C18 H39 N9 O6	99.84	0	76317	Negati

		2								ve
46	16.932	1604.03 13	1603.024					35833		Negati ve
47	16.933	1084.69 7	1083.689 8					18074 9		Negati ve
48	16.935	505.334 7	504.3274	C21 H39 N13 O2	97.72	0		13409 7		Negati ve
49	16.936	565.357 7	564.3504	C26 H51 N3 O10	99.56	0		11674 45		Negati ve
50	16.938	582.346 9	581.3397	C25 H50 N4 O11	97.22	0		95954		Negati ve
51	16.944	633.344 5	632.3373	C25 H47 N9 O10	99.65	0		40557		Negati ve
52	Cucurbitacin C	17.053	560.337 3	559.3301	C32 H48 O8	86.8	86.41	35024		Negati ve
53	17.165	541.356 7	540.3494	C21 H43 N13 O4	97.64	0		35593 1		Negati ve
54	17.165	481.333 2	480.3259	C18 H43 N9 O6	98	0		36480		Negati ve
55	17.165	558.345 7	557.3384	C19 H46 N10 O9	95.67	0		34710		Negati ve
56	17.296	296.248 4	295.2412	C17 H32 N2 O2	85.74	0		22398 6		Negati ve
57	17.35	296.248 4	295.2411	C17 H32 N2 O2	86.24	0		21940 4		Negati ve
58	17.42	1036.69 47	1035.687 4					11234 6		Negati ve
59	17.422	481.333 9	480.3266	C18 H43 N9 O6	99.68	0		11286 0		Negati ve
60	17.423	541.357 1	540.3498	C24 H51 N3 O10	99	0		88731 6		Negati ve
61	17.423	558.346 1	557.3388	C20 H42 N14 O5	98.61	0		79754		Negati ve
62	17.428	609.343 7	608.3364	C22 H51 N5 O14	98.33	0		39313		Negati ve
63	Baliospermin	17.582	562.353 2	561.3459	C32 H50 O8	83.16	82.35	75255		Negati ve
64	17.76	567.371 2	566.3639	C22 H49 N9 O8	98.53	0		73245		Negati ve
65	17.794	579.343 3	578.336	C18 H37 N21 O2	96.77	0		89507		Negati ve
66	Methyl 11-oxoasiatate	17.794	516.346 6	515.3393	C31 H48 O6	91.54	91.23	66277		Negati ve
67	17.794	562.354 2	561.3469	C19 H38 N20 O	98.41	0		46129 1		Negati ve
68	20.223	380.180 9	379.1737	C24 H28 O2 S	97.16	0		16828 8		Negati ve
69	20.224	365.232 2	364.2249	C19 H31 N3 O4	96.64	0		40665		Negati ve
70	20.225	280.253 2	279.246	C17 H32 N2 O	89.36	0		70292		Negati ve
71	20.851	356.180 2	355.1729	C22 H28 O2 S	93.42	0		43326		Negati ve
72	23.181	1003.63 49	1002.627 6					56825		Negati ve
73	24.095	841.581	840.5737					20116 9		Negati ve
74	24.095	824.589	823.5823					35891		Negati

<표 6. 보리 원물의 LC/MS ESI(-)의 DB 검색 결과>

Cp d	Name	RT	Mass	Base Peak	Formula	Score (MFG)	Score (DB)	Height	Ion Polarity
1		0.55	380.0585	381.0658	C10 H16 N6 O6 S2	87.99	0	91023	Positive
2		0.5513	542.1063	543.1136	C18 H26 N2 O15 S	94.96	0	172675	Positive
3		0.571	117.074	118.0813				742805	Positive
4		0.6154	329.0404	330.0477	C13 H7 N5 O6	79.91	0	94231	Positive
5		0.6392	228.1382	229.1455	C13 H16 N4	79.68	0	117716	Positive
6		0.6521	135.0481	136.0568	C3 H9 N3 O S	37.2	0	240179	Positive
7		0.6598	134.0178	152.0516	C8 H6 S	39.12	0	126917	Positive
8		2.9956	226.1586	249.1478	C13 H22 O3	87.01	0	133489	Positive
9		7.7111	452.3201	475.3093	C20 H44 N4 O7	94.56	0	2044265	Positive
10		8.229	507.196	508.2033	C15 H29 N11 O7 S	94.89	0	88264	Positive
11		9.014	386.228	409.2172	C16 H30 N6 O5	98.93	0	146092	Positive
12		9.6519	551.4219	276.7182	C29 H61 N O6 S	94.74	0	89127	Positive
13		9.6547	678.4827	701.4719	C38 H66 N2 O8	98.73	0	2676354	Positive
14		10.7184	904.6464	927.636				493268	Positive
15		10.9053	400.2453	423.2345	C18 H28 N10 O	97.9	0	647017	Positive
16		12.5341	426.2481	427.2554	C20 H34 N4 O6	99.23	0	414933	Positive
17		12.6191	426.2481	427.2554	C20 H34 N4 O6	98.39	0	345484	Positive
18		13.032	352.213	353.2203	C18 H24 N8	93.83	0	211555	Positive
19		13.0685	424.2325	425.2398	C20 H32 N4 O6	83.1	0	93955	Positive
20		13.2051	426.2481	427.2553	C20 H34 N4 O6	99.32	0	91767	Positive
21		13.3385	553.3235	576.3127	C18 H43 N13 O5 S	95.98	0	98165	Positive
22		13.4248	426.2488	427.256	C20 H34 N4 O6	95.55	0	166905	Positive
23		13.5084	426.2484	427.2556	C20 H34 N4 O6	98.96	0	94155	Positive
24		13.6675	426.2495	427.2568	C21 H30 N8 O2	95.45	0	710428	Positive
25		14.14	357.278	380.2678	C22 H35 N3 O	90.12	0	23809	Positive

		6						3	e
26	14.231	352.213 6	353.2208	C18 H24 N8	91.53	0	10032	8	Positive
27	14.353	408.239 4	409.2467	C21 H28 N8 O	95.99	0	58217	2	Positive
28	14.448	408.238 8	409.2461	C21 H28 N8 O	99.18	0	11213	3	Positive
29	14.977	370.262 6	371.2699	C16 H34 N8 S	93.25	0	16549	6	Positive
30	14.978	410.254 2	411.2615	C21 H30 N8 O	95.84	0	21171	85	Positive
31	15.025	334.203 6	335.2108	C14 H30 N4 O3 S	92.81	0	14814	6	Positive
32	15.203	410.255	411.2623	C21 H30 N8 O	94.34	0	39633	1	Positive
33	15.683	336.219 5	337.2268	C14 H32 N4 O3 S	92.99	0	10198	20	Positive
34	15.683	278.217 2	279.2244	C9 H26 N8 O2	86.18	0	96045		Positive
35	15.686	361.250 5	362.2578	C16 H35 N5 O2 S	92.73	0	29616	9	Positive
36	15.699	436.175 9	437.1832	C24 H20 N8 O	98.81	0	22857	5	Positive
37	15.818	361.250 3	362.2575	C16 H35 N5 O2 S	91.89	0	16148	1	Positive
38	15.867	336.219	337.2262	C22 H28 N2 O	75.45	0	10168	4	Positive
39	16.045	467.289 7	468.297	C18 H41 N7 O5 S	92.39	0	19282	7	Positive
40	16.158	365.319 9	366.3272	C14 H39 N9 O2	75.81	0	11704	6	Positive
41	16.23	517.304 9	518.3122	C15 H35 N17 O4	94.57	0	48106	1	Positive
42	16.521	392.244 5	393.2517	C21 H28 N8	94.73	0	45966	6	Positive
43	16.629	392.244 2	393.2515	C21 H28 N8	95.19	0	20858	2	Positive
44	16.712	519.320 5	520.3278	C29 H45 N O7	95.7	0	10994	49	Positive
45	16.759	700.349 6	701.3568	C28 H48 N10 O11	98.87	0	64351	6	Positive
46	16.833	390.228 4	391.2357	C21 H26 N8	82.71	0	13755	7	Positive
47	16.938	1038.64 3	1039.6502				77351	4	Positive
48	16.939	1579.94 6	1580.9535				21075	9	Positive
49	16.94	622.418	623.4253	C31 H50 N12 O2	95.9	0	20693	6	Positive
50	16.941	1076.59 1	539.3027				12391	2	Positive
51	16.942	519.320 3	520.3275	C29 H45 N O7	96.54	0	34951	23	Positive
52	17.06	536.283 9	537.2912	C25 H44 O12	98.03	0	12123	5	Positive
53	17.066	390.228 5	391.2357	C21 H26 N8	96.31	0	10006	0	Positive
54	17.17	495.321	496.3284	C21 H41 N11 O	93.6	0	63662		Positive

		1		S				1	e
55	17.232	676.3487	677.3559	C23 H40 N20 O5	98.4	0	89322	1	Positive
56	17.426	598.4179	599.4252	C28 H54 N8 O6	94.78	0	155758	8	Positive
57	17.428	495.3204	496.3277	C27 H45 N O7	96.02	0	2392854	54	Positive
58	17.429	1080.609	1081.6163				87649		Positive
59	17.589	538.2994	539.3067	C25 H46 O12	98.48	0	235221	1	Positive
60	17.77	521.3351	522.3424	C29 H47 N O7	95.1	0	122752	2	Positive
61	17.778	543.3164	544.3237	C26 H45 N3 O9	96.95	0	110654	4	Positive
62	17.802	538.299	539.3063	C25 H46 O12	98.73	0	1699293	93	Positive
63	18.348	514.299	515.3063	C23 H46 O12	99.07	0	103841	1	Positive
64	18.694	323.2741	324.2814	C11 H33 N9 O2	87.24	0	563574	4	Positive
65	19.543	376.2489	377.2562	C20 H32 N4 O3	92.73	0	143091	1	Positive
66	19.696	706.4821	707.4893	C30 H58 N16 O4	98.65	0	129004	4	Positive
67	19.77	387.2641	388.2713	C21 H33 N5 O2	98.32	0	123730	0	Positive
68	20.586	688.4713	689.4785	C30 H56 N16 O3	97.63	0	133478	8	Positive
69	20.861	405.3107	406.318	C22 H39 N5 O2	99.25	0	995597	7	Positive
70	21.152	688.471	689.4782	C29 H60 N12 O7	98	0	101721	1	Positive
71	21.347	530.3442	531.3515	C25 H42 N10 O3	99.09	0	116111	1	Positive
72	21.826	688.471	689.4783	C32 H68 N2 O13	95.34	0	143887	7	Positive
73	21.996	641.4827	642.49	C29 H55 N17	97.07	0	156957	7	Positive
74	22.125	670.4608	671.4681	C30 H54 N16 O2	97.3	0	176937	7	Positive
75	22.425	673.4808	674.488	C23 H55 N21 O3	84.87	0	488778	8	Positive
76	22.429	670.4607	673.4844				1144378	78	Positive
77	22.526	686.4381	687.4453	C32 H66 N2 O11 S	95.8	0	130371	1	Positive
78	22.631	686.4387	687.4457	C35 H63 Cl N4 O7	81.84	0	171148	8	Positive
79	22.657	650.4345	653.4573				946755		Positive
80	23.036	648.4772	649.4844	C28 H56 N16 O2	98.92	0	444427	7	Positive
81	23.076	654.4672	655.4744	C30 H54 N16 O	98.46	0	642828	8	Positive
82	23.179	662.4383	663.4455	C28 H54 N16 O S	97.41	0	107319	9	Positive
83	23.19	962.571	963.5786				37606		Positive

			3					6	e
84	23.194	654.464	655.4712	C44 H62 O4	92.79	0	99418	Positive	
85	23.233	688.519	689.5268	C30 H60 N18 O	97.3	0	17359	Positive	
86	23.234	652.451	653.4592	C30 H52 N16 O	73.38	0	73855	Positive	
87	23.299	662.437	663.4451	C35 H62 N6 O2 S2	83.04	0	88853	Positive	
88	23.356	688.517	689.525	C44 H68 N2 O4	87.55	0	90240	Positive	
89	23.359	652.451	653.4588	C30 H52 N16 O	97.91	0	48912	Positive	
90	23.662	530.385	553.3746	C27 H54 N4 O4 S	95.68	0	32978	Positive	
91	23.666	588.437	589.4445	C25 H56 N12 O2 S	96.69	0	10560	Positive	
92	23.811	630.466	631.4742	C28 H54 N16 O	99.35	0	34268	Positive	
93	23.993	628.450	629.4581	C30 H64 N2 O11	95.54	0	18587	Positive	
94	24.064	628.450	629.458	C28 H52 N16 O	76.88	0	13465	Positive	
95	24.109	800.521	801.5286				13402	Positive	
96	24.134	938.570	939.578				10749	Positive	
97	24.156	628.451	629.4587	C28 H52 N16 O	99.39	0	30538	Positive	
98	24.237	628.451	629.4584	C28 H52 N16 O	99.27	0	14687	Positive	

<표 7. 보리 원물의 LC/MS ESI(+)-의 DB 검색 결과>

Cp d	Name	RT	Mass	Base Peak	Formula	Score (MFG)	Score (DB)	Height	Ion Polarity
1		0.493	159.993	158.9858	C6 H5 Cl O3	67.12	0	38084	Negative
2		0.545	702.212	701.2051	C25 H35 Cl N10 O12	96.89	0	34909	Negative
3		0.548	540.158	539.1509	C18 H29 Cl N6 O11	97.81	0	67746	Negative
4		0.548	378.103	377.0961	C11 H23 Cl N2 O10	97.16	0	37863	Negative
5		0.57	567.177	566.1703	C18 H29 N7 O14	95.97	0	94630	Negative
6		0.697	567.177	566.17	C18 H29 N7 O14	97.32	0	41434	Negative
7	Protocatechuoyl calleryanin	4.983	438.117	437.1103	C20 H22 O11	95.5	95.27	35987	Negative
8		4.983	416.136	415.1288	C16 H24 N4 O7 S	92.95	0	21693	Negative
9		7.693	498.356	497.3491	C21 H50 N6 O5 S	94.46	0	23212	Negative
10	5beta-Bufof sulfate	7.694	452.349	487.3192	C27 H48 O5	97.72	96.89	53605	Negative

11	7.695	515.347 5	514.3402	C28 H45 N5 O4	95.83	0	94157 9	Negative
12	9.649	724.527 6	723.5203	C27 H60 N22 O2	98.04	0	57635 0	Negative
13	9.651	714.497	713.4897	C26 H59 Cl N22	97.19	0	79115	Negative
14	9.653	741.517 7	740.5104	C44 H71 N O8	96.23	0	13827 52	Negative
15	10.723	967.687 3	966.6801				15544 9	Negative
16	11.979	689.437 6	688.4303	C22 H51 N21 O5	97.55	0	54212	Negative
17	13.033	330.253	329.2457	C17 H34 N2 O4	93.42	0	38627	Negative
18	16.859	477.299 4	476.2921	C14 H35 N15 O4	97.48	0	55400	Negative
19	16.946	565.353	564.3457	C19 H39 N19 O2	97.68	0	44078	Negative
20	20.23	380.179 3	379.172	C20 H24 N6 S	90.87	0	11448 1	Negative
21	20.231	365.230 9	364.2236	C19 H31 N3 O4	96.69	0	42688	Negative
22	20.232	280.251 8	279.2445	C17 H32 N2 O	99.59	0	63619	Negative

<표 8. 보리 발효물의 LC/MS ESI(-)의 DB 검색 결과>

Cpd	Name	RT	Mass	Base Peak	Formula	Score (MFG)	Score (DB)	Height	Ion Polarity
1		0.557	526.137 9	527.1451	C16 H30 O19	99.28	0	77618	Positive
2		0.558	364.088 5	365.0958	C12 H12 N8 O6	95.49	0	12256 1	Positive
3		0.594	117.074 8	118.0821				25663 6	Positive
4		0.985	274.095 6	275.1029	C14 H14 N2 O4	91.97	0	26081 9	Positive
5		1.052	119.069 5	120.0768	C3 H9 N3 O2	81.82	0	36826 5	Positive
6		1.992	118.024 1	136.0579	C4 H6 O4	70.63	0	11473 60	Positive
7		1.992	297.082 5	298.0898	C10 H15 N7 S2	93.53	0	55365 6	Positive
8		2.966	226.161 4	249.1506				13403 2	Positive
9		4.103	404.196 1	405.2034	C22 H24 N6 O2	99.47	0	82738	Positive
10		4.796	326.185 7	349.1749	C17 H22 N6 O	91.84	0	13278 7	Positive
11		5.435	410.205	433.1942	C20 H30 N2 O7	95.14	0	81266	Positive
12		5.646	370.211	393.2002	C18 H30 N2 O6	95.56	0	16735 4	Positive
13		6.198	476.212 5	477.2197	C19 H32 N4 O10	96.65	0	85061	Positive

14	6.381	414.2364	437.2256	C20 H34 N2 O7	95.12	0	164924	Positive
15	7.035	458.2616	481.2508	C19 H30 N12 O2	95.61	0	131308	Positive
16	7.051	357.2539	358.2611	C20 H31 N5 O	93.9	0	126733	Positive
17	7.601	502.2869	525.2762	C20 H38 N8 O7	96.43	0	97469	Positive
18	7.695	452.3253	475.3145	C25 H44 N2 O5	99.2	0	2160105	Positive
19	8.163	845.0635	868.0528				87476	Positive
20	8.164	865.7067	868.7219				91768	Positive
21	8.164	845.3981	868.3874				121335	Positive
22	8.203	1291.668	646.8426				83218	Positive
23	9	386.2321	409.2214	C21 H30 N4 O3	97.54	0	93707	Positive
24	9.637	551.4269	276.7207	C27 H53 N9 O3	98.92	0	91320	Positive
25	9.637	678.4899	679.4972	C33 H62 N10 O5	99.45	0	460329	Positive
26	9.641	700.4712	701.4784	C30 H60 N12 O7	96.75	0	2620751	Positive
27	10.708	926.6359	927.6431				407580	Positive
28	10.709	904.6531	475.3159				267673	Positive
29	10.893	400.248	423.2373	C22 H32 N4 O3	95.61	0	602741	Positive
30	14.299	402.1218	425.1111	C23 H18 N2 O5	97.18	0	210019	Positive
31	14.754	432.1315	455.1208	C24 H20 N2 O6	96.05	0	280633	Positive
32	14.984	372.1115	395.1008	C22 H16 N2 O4	95.1	0	205428	Positive
33	15.693	414.1943	437.1835	C26 H26 N2 O3	95.63	0	378153	Positive
34	20.234	777.5096	780.5338				266519	Positive
35	20.235	803.5264	804.5337				223286	Positive
36	20.235	780.5292	781.5365				114871	Positive
37	20.429	538.3291	539.3364	C25 H50 N2 O8 S	99.47	0	126689	Positive
38	20.888	462.2638	463.2711	C27 H34 N4 O3	97.6	0	164858	Positive
39	21.021	777.5104	780.5339				81669	Positive
40	23.662	530.3876	553.3768	C28 H50 N8 S	96.95	0	3096144	Positive
41	23.665	588.4397	589.4469	C29 H60 N6 O4 S	99.3	0	97256	Positive

<표 9. 보리 발효물의 LC/MS ESI(+)'의 DB 검색 결과>

(5) 보리 유래 화합물의 표준품 분석

(가) 보리 유래 화합물 리스트 확보 (20종)

① 20종 화합물 중 표준품 18종 입수 및 12종 표준품 분석 확인하였음.

Ferulic acid, Luteolin, cis-Sinapic acid, trans-Sinapic acid, Vitexin, Hordenine, Levulinic acid, Eriodictyol, (+)-taxifolin, Guanosine3': 5'-cyclic monophosphate, Esculin hydrate, 6,7-Dihydroxycoumarin

(나) 보리 유래 화합물 표준품 분석

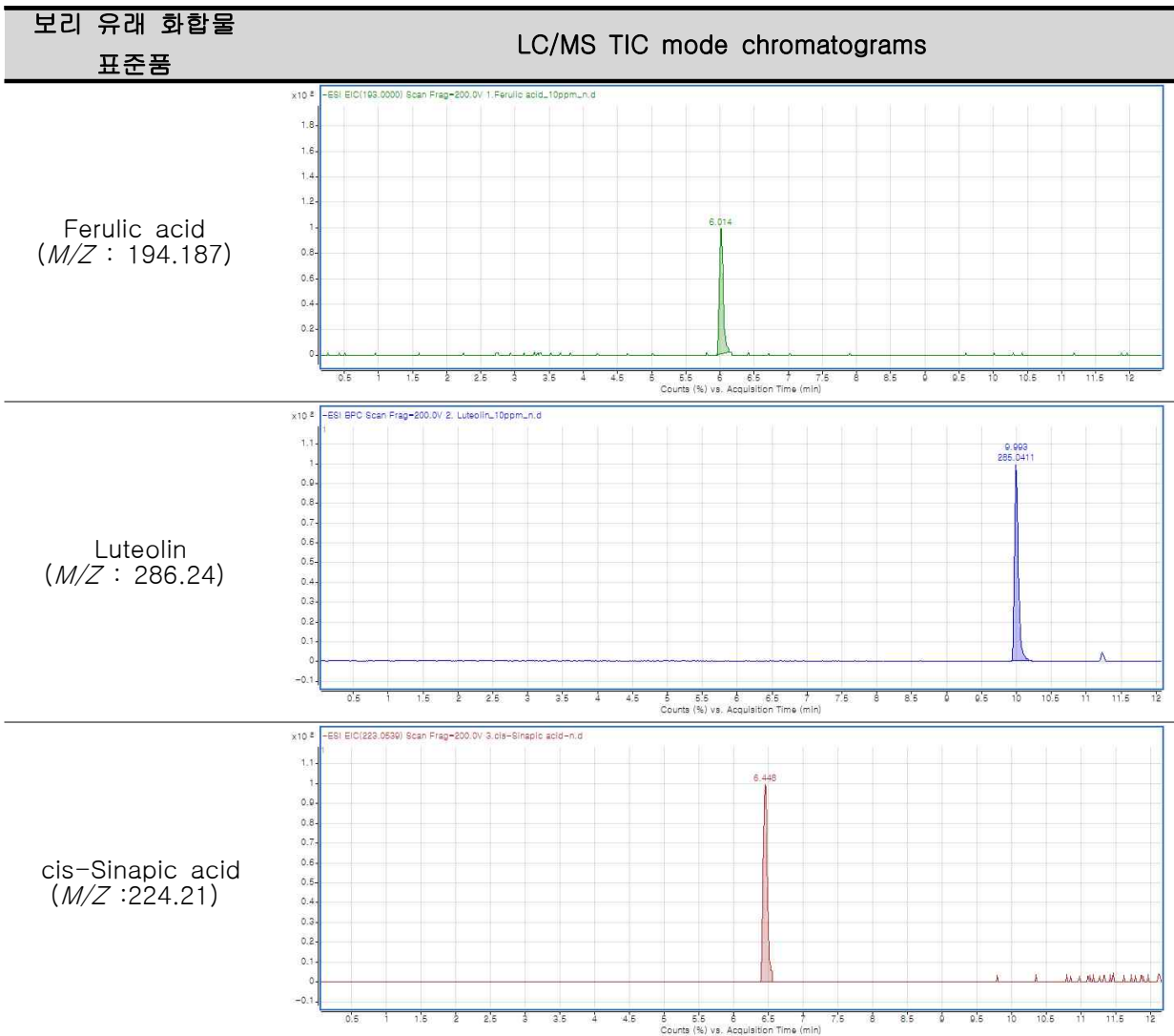
① 보리 유래 화합물의 표준품 LC/MS 분석조건:

Column; C18 (2.1 mm × 150 mm, 2.7 μm)

Solvent; gradient with 0.1% Formic acid in Water and Acetonitrile, 0.6ml/min

MS; ESI (+), (-)

Instrument; Agilent Technologies 6530 Q-TOF 6410 Triple Quad LC/MS

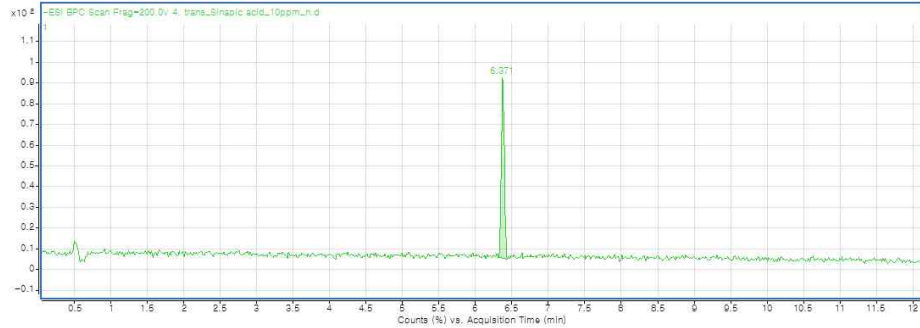


<그림 85. 보리 유래 화합물의 표준품 LC/MS chromatogram>

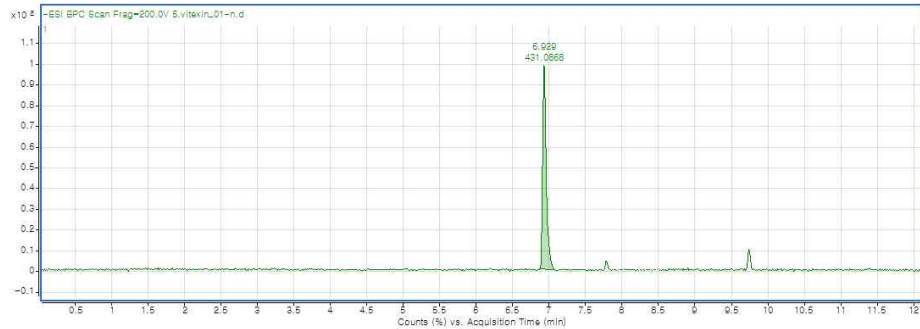
보리유래 화합물
표준품

LC/MS TIC mode chromatograms

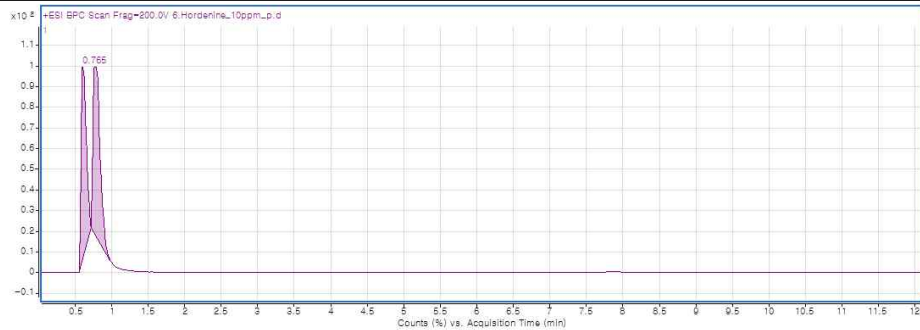
trans-Sinapic acid
(M/Z : 224.21)



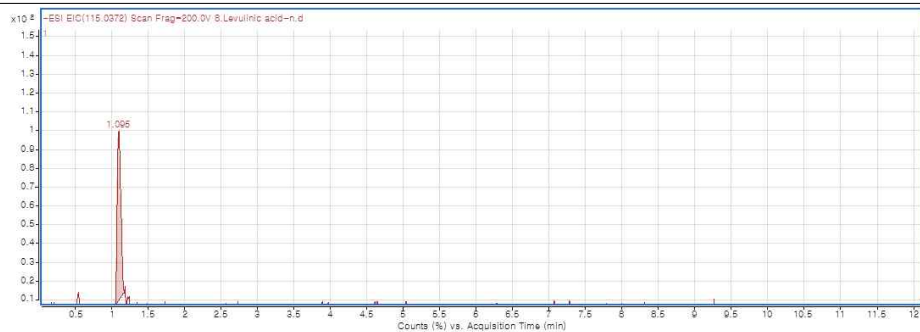
Vitexin
(M/Z : 432.38)



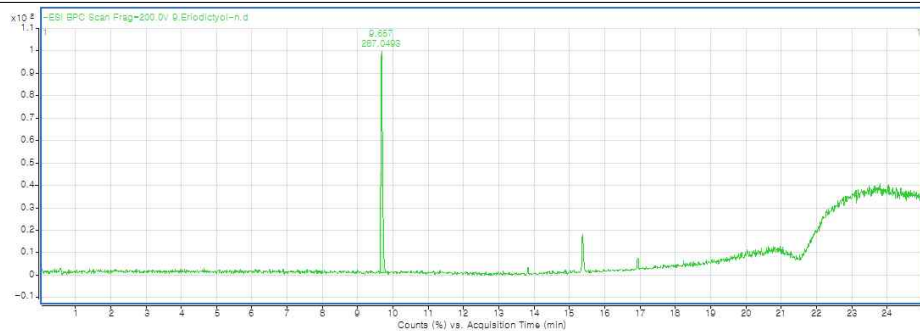
Hordenine
(M/Z : 165.23)



Levulinic acid
(M/Z : 116.12)



Eriodictyol
(M/Z : 288.25)

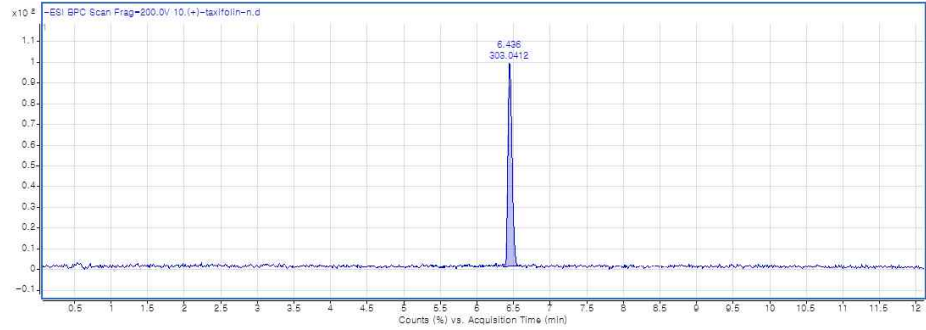


<그림 86. 보리 유래 화합물의 표준품 LC/MS chromatogram>

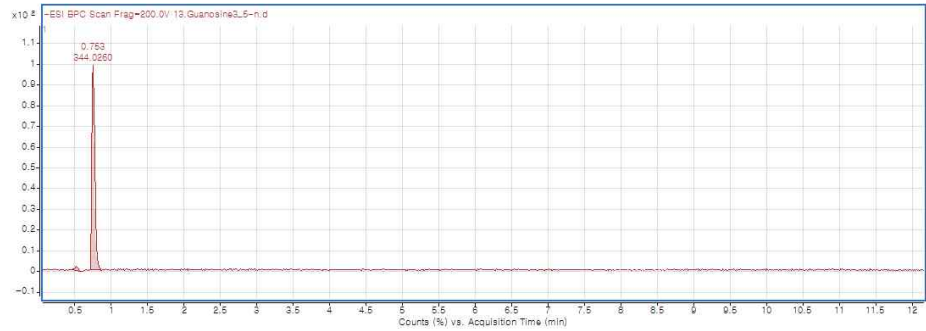
보리유래 화합물
표준품

LC/MS TIC mode chromatograms

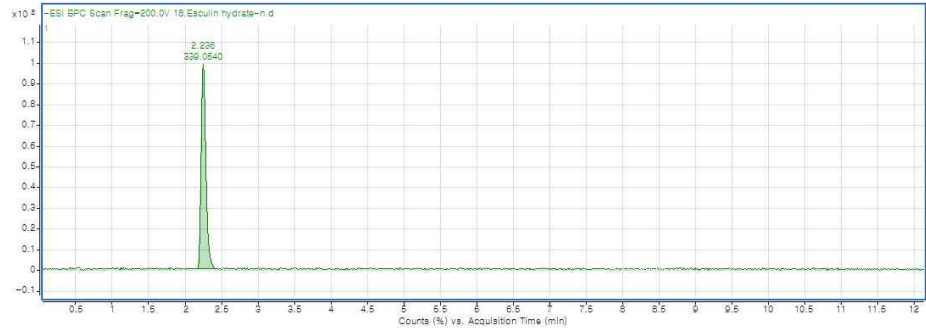
(+)-taxifolin
(M/Z :304.25)



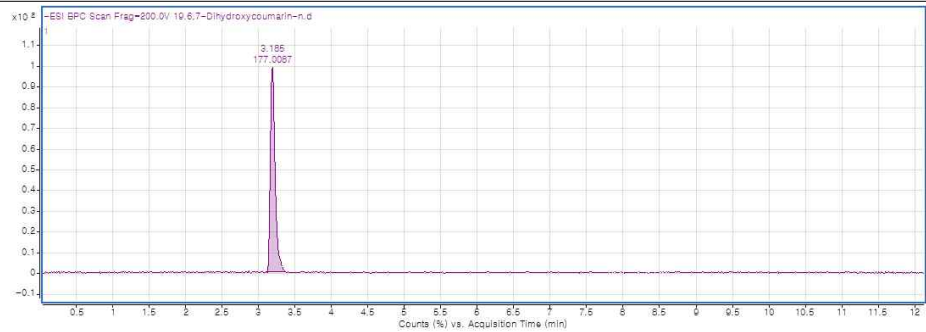
cGMP
(M/Z :345.21)



Esculin hydrate
(M/Z :340.28)



6,7-Dihydroxycoumarin
(M/Z :178.146)



<그림 87. 보리 유래 화합물의 표준품 LC/MS chromatogram>

(6) 보리 중 유용성분을 분석하고 지표성분을 탐색

(가) 보리원물 및 발효물에서의 보리 중 유용성분 분석

① 보리 유래 화합물 표준품 분석:

Ferulic acid, Luteolin, cis-Sinapic acid, trans-Sinapic acid, Vitexin, Hordenine, Levulinic acid, Eriodictyol, (+)-taxifolin, Guanosine3',5'-cyclic monophosphate, Esculin hydrate, 6,7-Dihydroxycoumarin 이상 12종 표준품을 보리원물 및 발효물에서 LC/MS Scan Type_ MS2 SIM mode에서 탐색하였음. 보리원물 및 발효물에서의 SIM mode 탐색결과, 12종 표준품 중 Guanosine3',5'-cyclic monophosphate 가 확인되었음.

(나) 보리원물 및 발효물에서의 보리 유래 지표성분

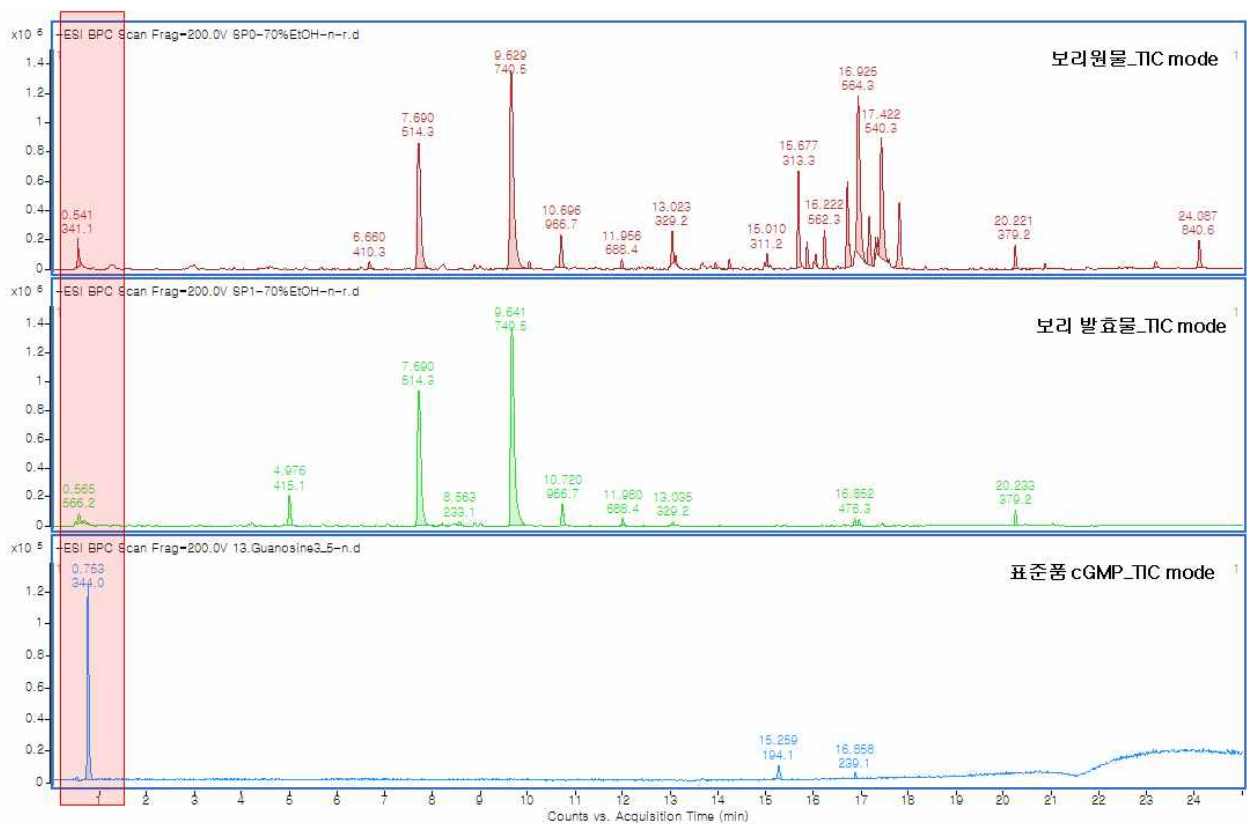
① 보리 유래 화합물의 표준품 LC/MS 분석조건:

Column; C18 (2.1 mm × 150 mm, 2.7 μm)

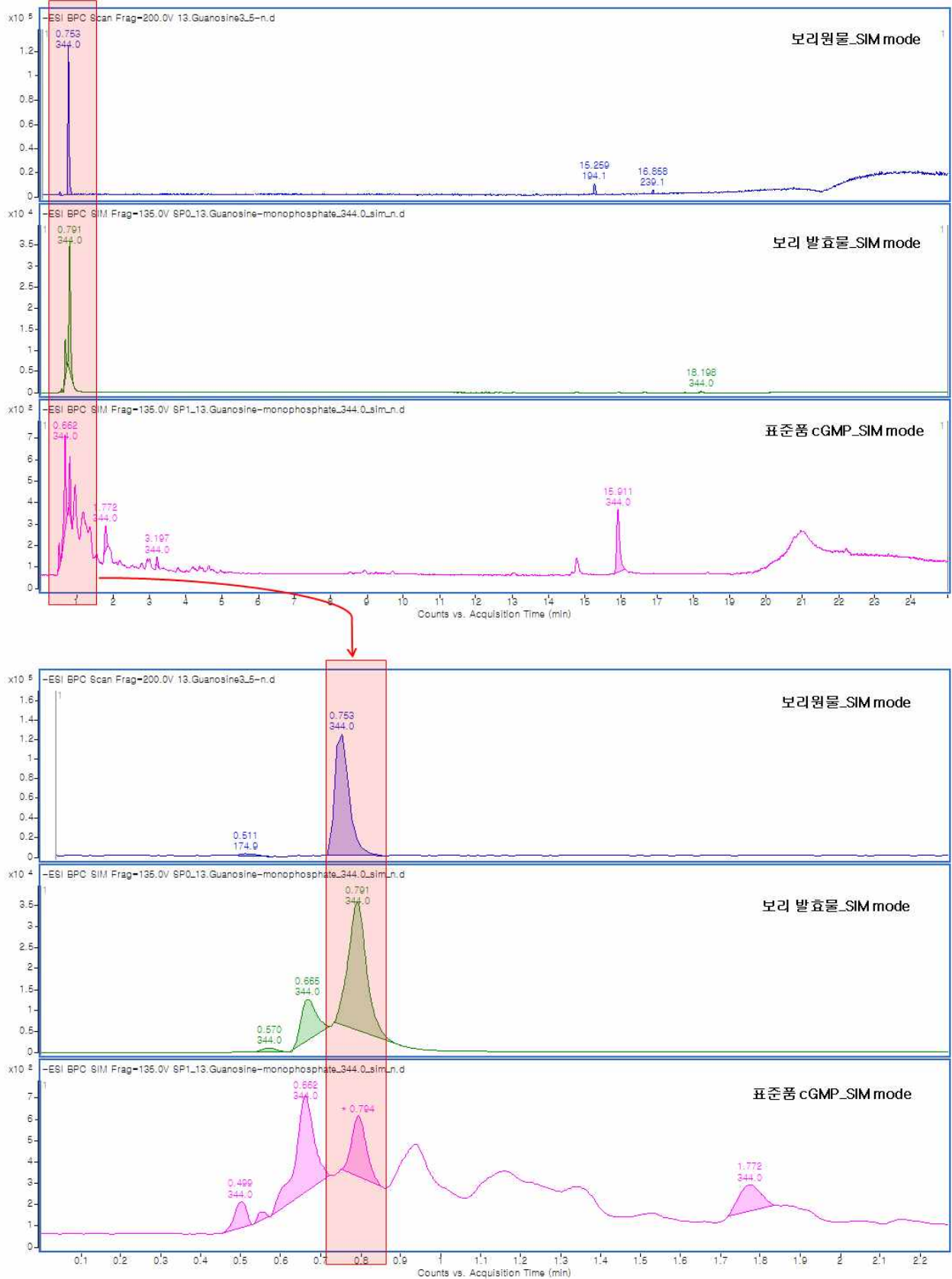
Solvent; gradient with 0.1% Formic acid in Water and Acetonitrile, 0.6ml/min

MS; ESI (+), (-), Scan Type; MS2 SIM

Instrument; Agilent Technologies 6530 Q-TOF 6410 Triple Quad LC/MS



<그림 88. 보리원물, 발효물 및 cGMP에서의 TIC mode chromatogram>



<그림 89. 보리원물, 발효물 및 cGMP에서의 MS2 SIM mode chromatogram>

② 보리원물 및 발효물에서 보리 유용성분 표준품 분석결과를 토대로 SIM mode 분석한 결과, 12종 표준품 중 Guanosine3',5'-cyclic monophosphate가 확인되었음.

③ 보리원물 소재 1g에 함유된 보리유용 성분 cGMP의 함량은 5.67ug이었으며, 보리 발효물 소재 1g에 함유된 보리유용 성분 cGMP의 함량은 66.96ng으로 확인되어 발효 유무에 따른 cGMP 함량에 차이가 있음을 확인하였음.

나. 보리 및 보리 발효물 이차대사산물 분리 및 비교

(1) 보리원물 및 보리 발효물의 분획물 제조

(가) 보리원물 및 보리 발효물 추출

- ① 보리원물 및 보리 발효물 소재 입수 (샘표에서 제공)
- ② 상온에서 70% EtOH 추출 (x3)

(나) 용매계통분획

- ① EtOAc fr., BuOH fr., 그리고 H₂O를 이용하여 분획물 제조

(2) 보리원물 및 보리 발효물 EtOAc fr.와 BuOH fr.으로부터 화합물 분리

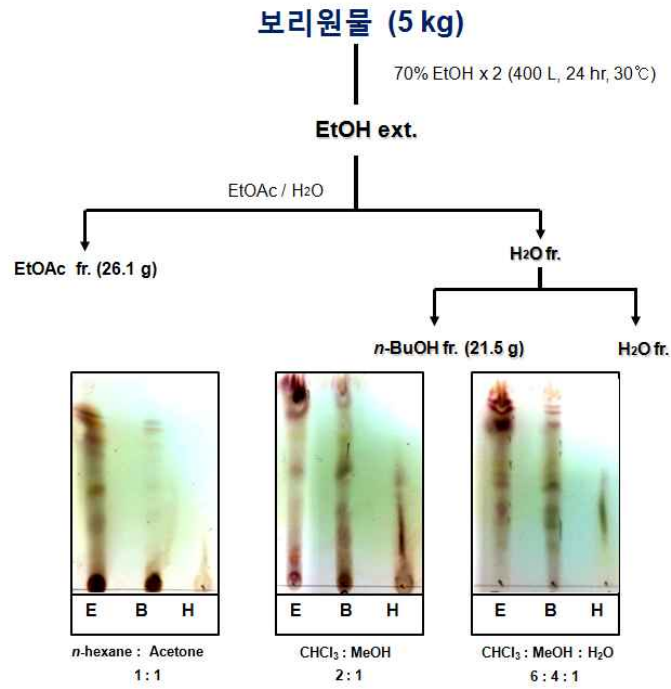
(가) prep-HPLC 조건

- ① Column; YMC Co., Ltd. DAU-50-1000S, C18 (50 mm × 1000 mm, 10 μm)
Solvent; A : D.W. B : MeOH
flow rate : 50 mL/min
loading volume : 5 mL
gradient : 60%A(20min) to 20%A, 1ml/min
100%B(20min)

Instrument : waters, preparative chromatography

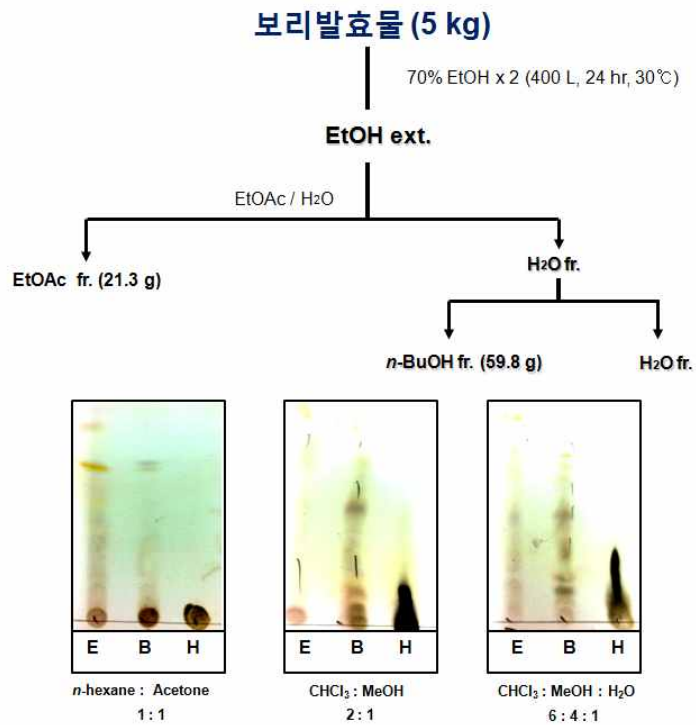
detector : UV, waters 2998

(3) 보리 원물



<그림 90. 보리 원물 추출>

(4) 보리 발효물

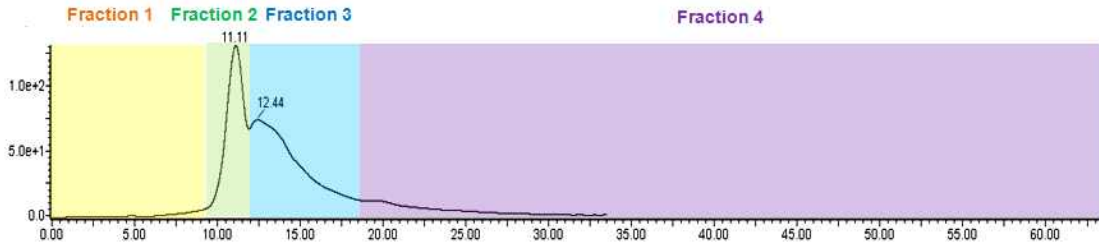


<그림 91. 보리 발효물 추출>

다. 이차대사산물 분리 과정

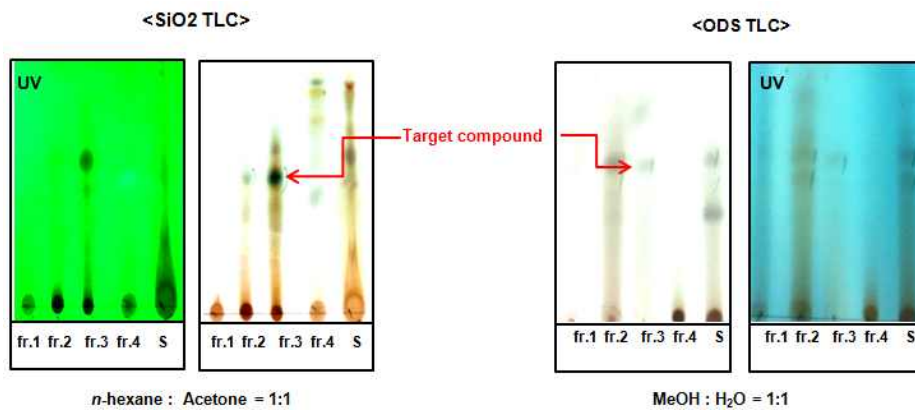
(1) 보리원물

(가) EtOAc fr.에 대한 prep-HPLC 결과



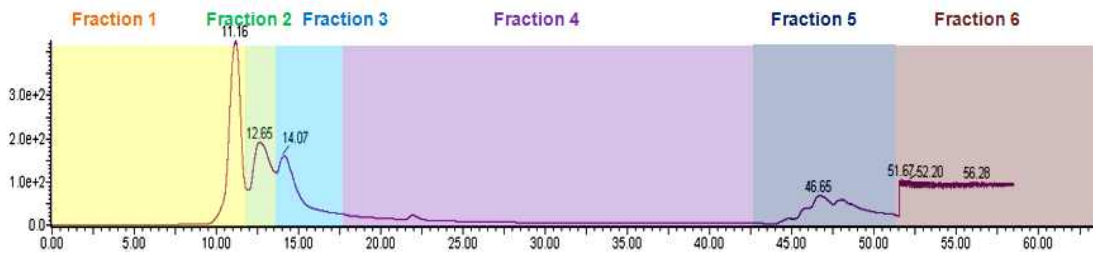
<그림 92. 보리 원물의 EtOAc fr.에 대한 prep-HPLC 결과>

① TLC 분석



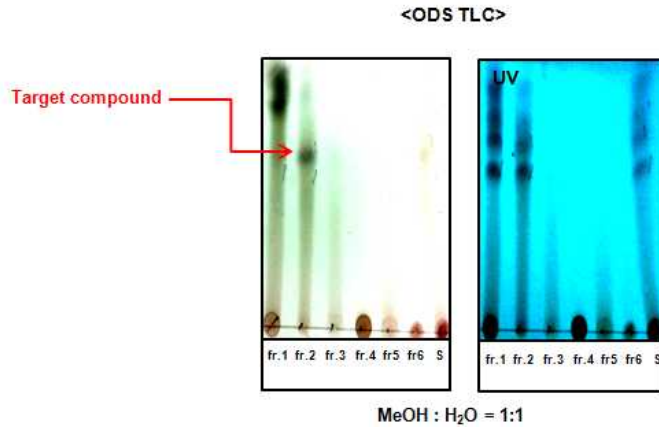
<그림 93. 보리 원물의 TLC 분석>

(나) BuOH fr.에 대한 prep-HPLC 결과



<그림 94. 보리 원물의 BuOH fr.에 대한 prep-HPLC 결과>

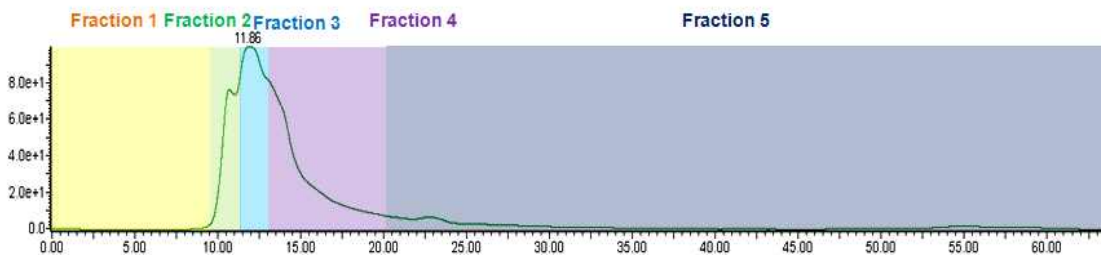
① TLC 분석



<그림 95. 보리 원물의 TLC 분석>

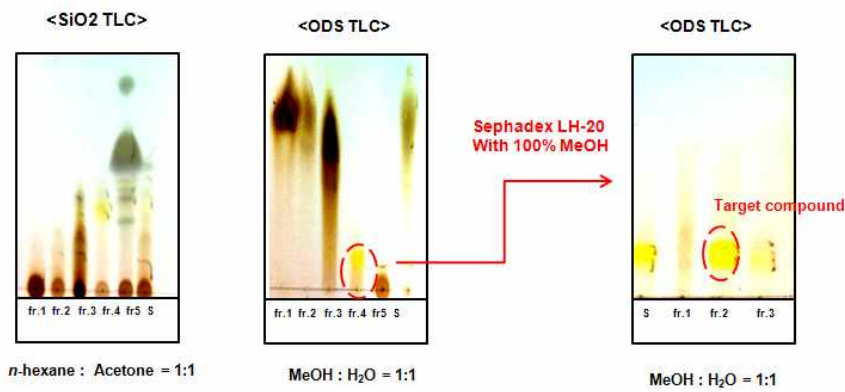
(2) 보리발효물

(가) EtOAc fr.에 대한 prep-HPLC 결과



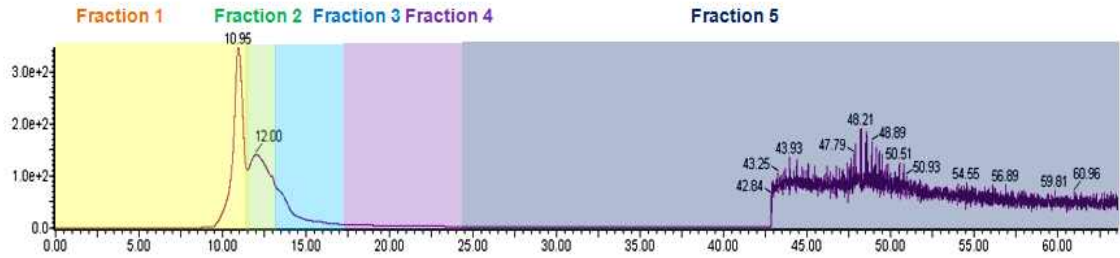
<그림 96. 보리 발효물의 EtOAc fr.에 대한 prep-HPLC 결과>

① TLC 분석



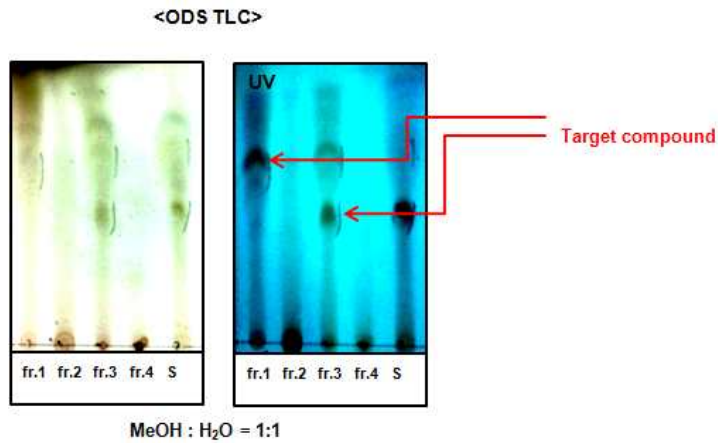
<그림 97. 보리 발효물의 TLC 분석>

(나) BuOH fr.에 대한 prep-HPLC 결과



<그림 98. 보리 발효물의 BuOH fr.에 대한 prep-HPLC 결과>

① TLC 분석



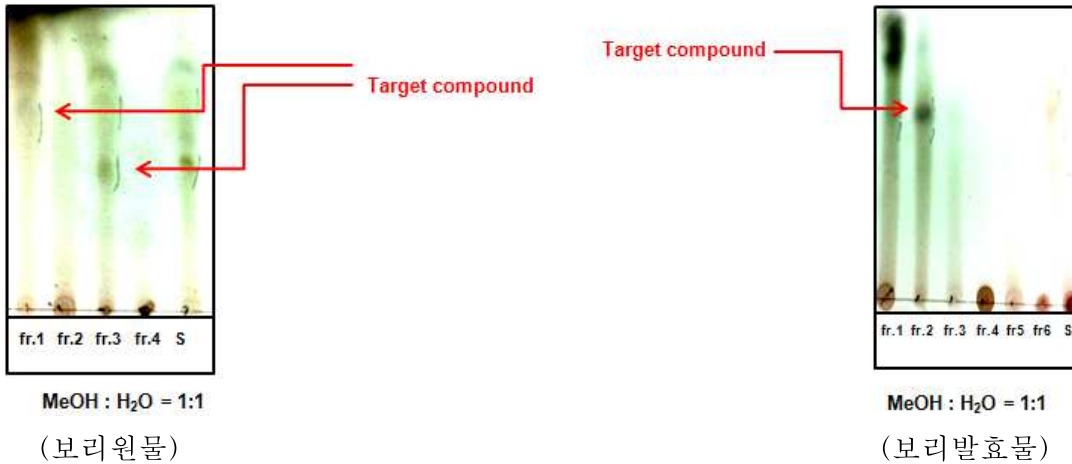
<그림 99. 보리 발효물의 TLC 분석>

(3) 보리원물과 보리발효물 EtOAc fr. major 화합물 비교



<그림 100. 보리원물과 보리발효물>

(4) 보리원물과 보리발효물 BuOH fr. major 화합물 비교



<그림 101. 보리원물과 보리발효물>

(가) Prep-HPLC 이용하여 지표물질 분리실험을 진행한 결과 chromatography 상에서 UV 흡광도가 있는 화합물들의 양상은 크게 차이가 나지 않았음. 하지만 gradient조건을 결정하는 과정에서 추출물의 용해도가 기기의 압력에 많은 영향을 주고 이에 따라 유속을 결정하게 되므로 60% Water라는 다소 극성이 높은 조건에서 시작하게 되었음. 그래서 극성이 높은 화합물들이 chromatography상에서 큰 차이를 보이지 않았던 것으로 판단되며, 실제 분리된 분획을 TLC를 통해 분석한 결과 major 화합물군에서 차이가 확인 되었음.

(나) 특히 부탄올 층에서 target compound들은 발색 양상을 통해 동일한 군의 화합물로 보여짐. 하지만 발효물에서 Rf 값이 더 낮게 나오는 것을 통해 발효 과정을 통해서 구조의 변형이 이루어진 것으로 사료됨. 자세한 차이를 확인하기 위해선 NMR 측정을 통한 화합물 구조 동정을 통한 다각적인 비교 분석이 필요함.

다. 자수정 및 자수정 발효물 비교분석

(1) 지표물질 선정과 LC-MS/MS를 통한 정량 분석

(가) 자수정, 자수정 발효물 그리고 대두 발효물 추출

- ① 자수정, 자수정 발효물 그리고 대두 발효물 소재 입수 (샘표에서 제공)
- ② 80% MeOH 추출:

소재 5g 추출 시, 자수정 보리에서 130.1mg, 자수정 보리 발효물에서 643.3mg의 농축물 얻음 대두 발효물에서는 1.7 g당 280 mg의 농축물을 얻음

(나) 지표성분 정량 분석

- ① 추출물의 MS 분석조건:

Column; C18 (2.1 mm × 150 mm, 2.7 μm)

Solvent; gradient with 0.1% Formic acid in Water and Acetonitrile, 0.6ml/min

MS; ESI (+), (-)

Instrument: Agilent Technologies Triple quad 6410 LC/MS
 LC-MS 분석 시, 시료 농도는 500ppm으로 진행하였음.

라. 자수정, 자수정 발효물 그리고 대두 발효물에서 보습 활성 화합물 분리 및 구조동정

(1) 분리 동정 과정
 가. 추출 및 분획

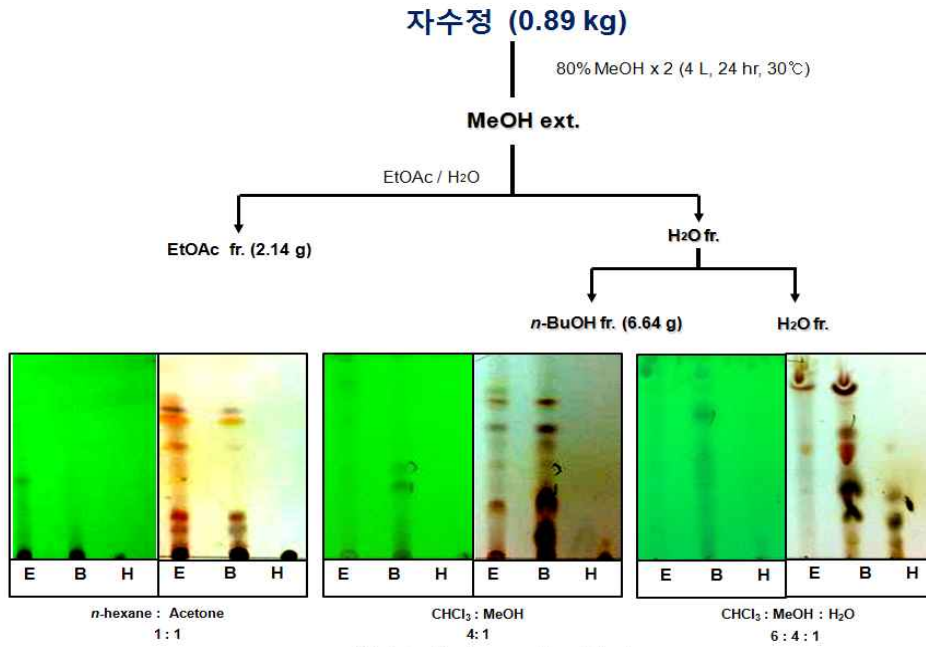
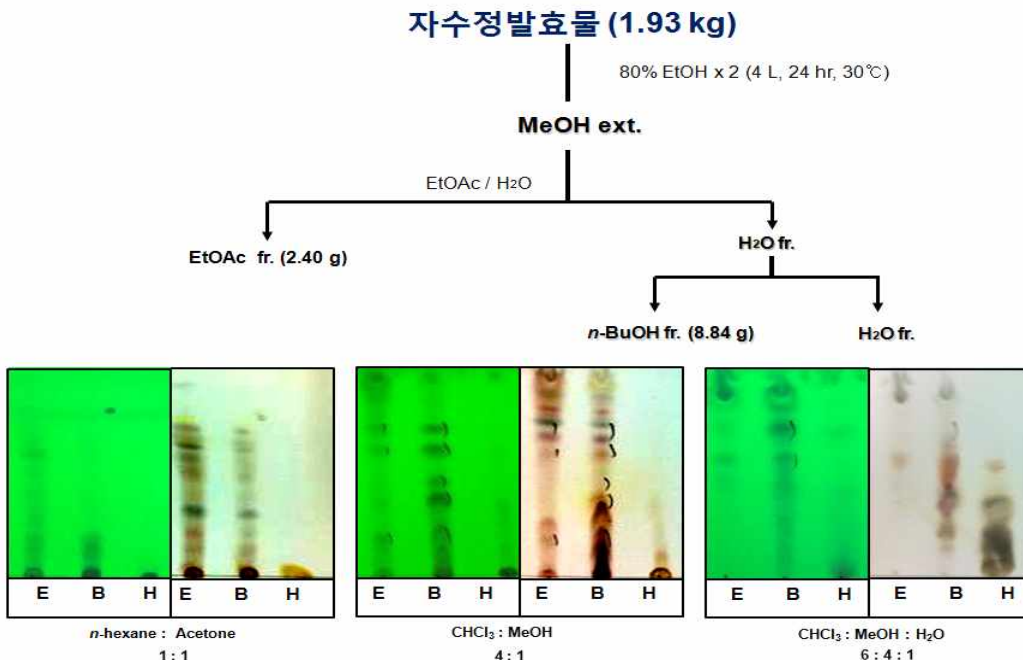
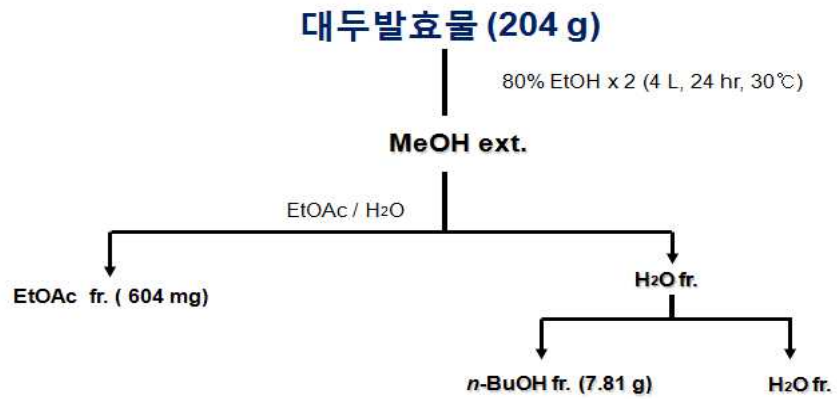


Fig. 2. Fractionation procedure of Jasujeong

<그림 102. 자수정 추출 및 분획>



<그림 103. 자수정 발효물 추출 및 분획>

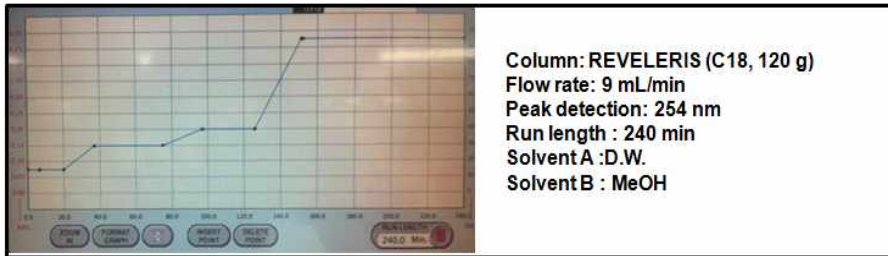


<그림 104. 대두 발효물 추출 및 분획>

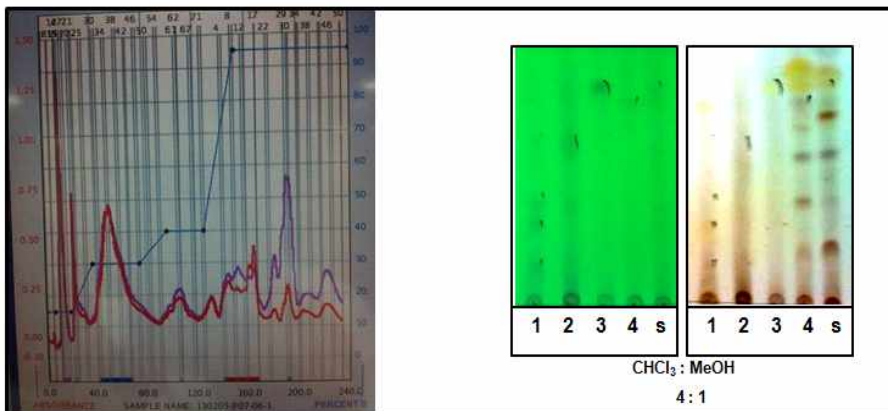
나. EtOAc fr. 분리 과정

자수정 EtOAc fr. (2.14 g)

conditions

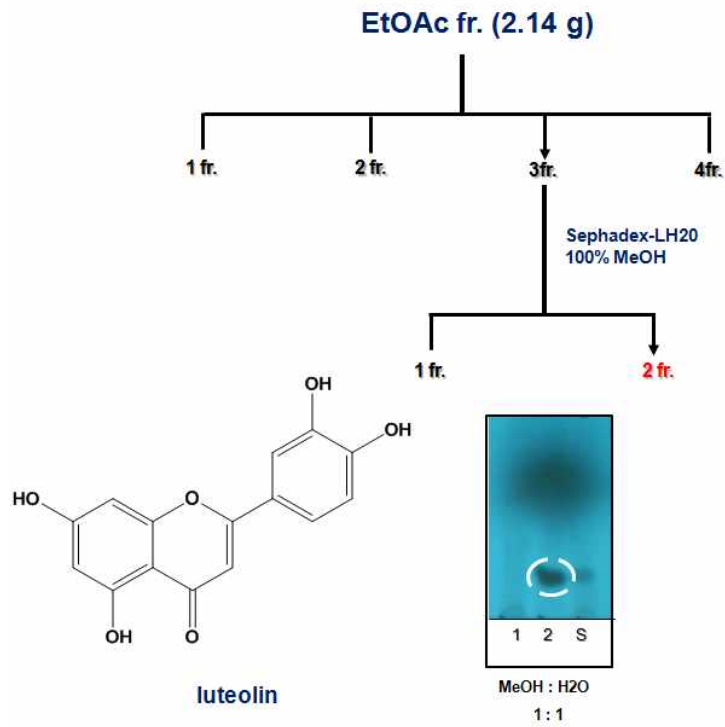


result



<그림 105. 자수정 EtOAc fr. 분리 과정>

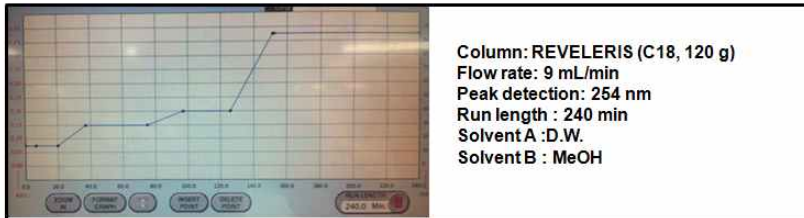
다. 구조해석



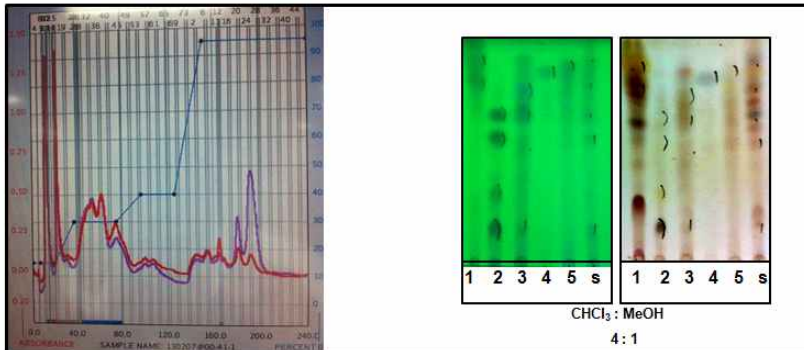
<그림 106. luteolin 분리>

자수정 발효 EtOAc fr. (2.40 g)

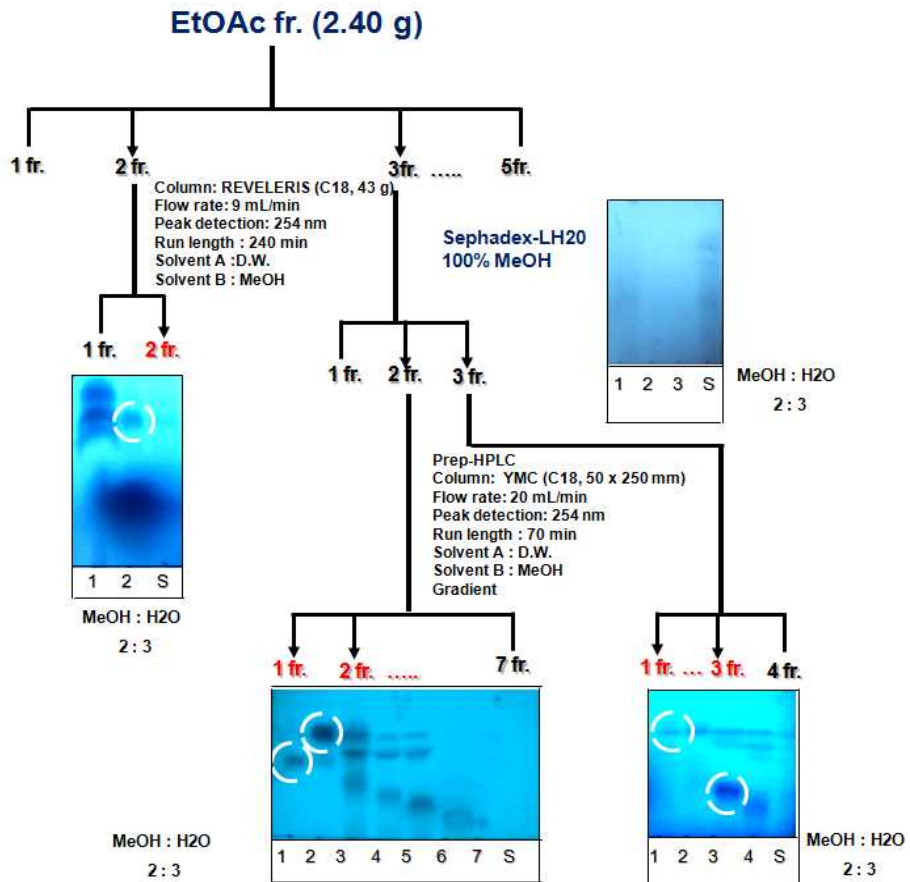
conditions



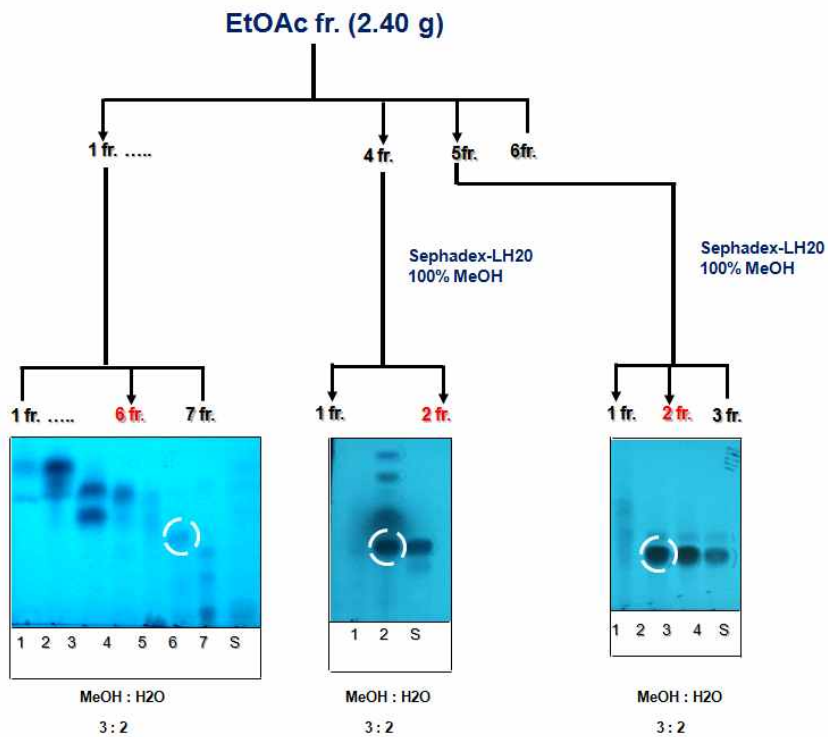
result



<그림 107. 자수정 발효물 분획>



<그림 108. 에탄올 추출물 분획>



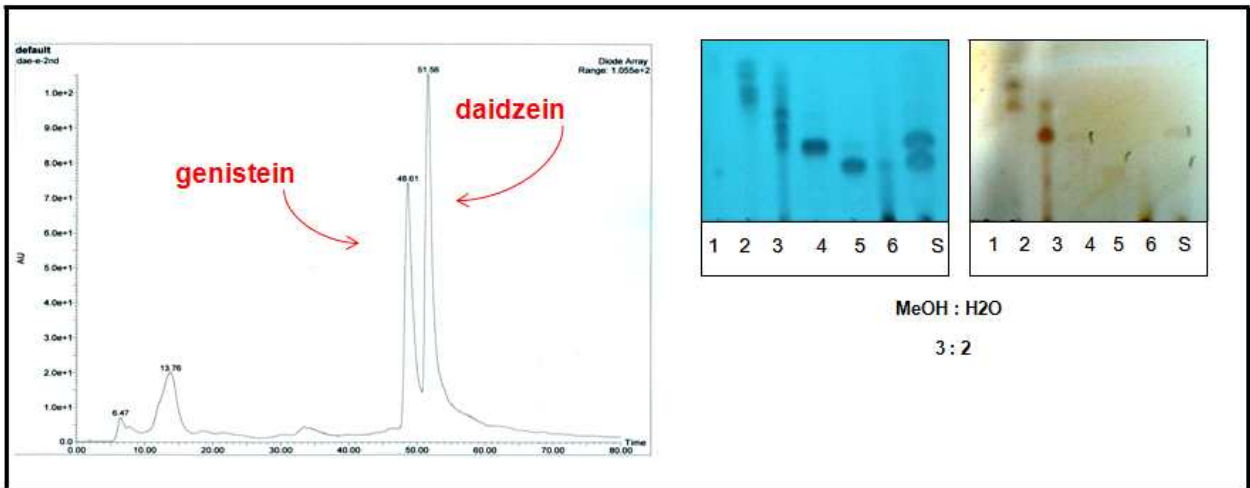
<그림 109. 메탄올 추출물 분획>

대두 발효 EtOAc fr. (g)

conditions

Prep-HPLC
 Column: YMC (C18, 50 x 250 mm)
 Flow rate: 20 mL/min
 Peak detection: 254 nm
 Run length : 70 min
 Solvent A : D.W.
 Solvent B : MeOH
 Gradient :
 40% B (30min) → 100% B (70 min)
 2%/min

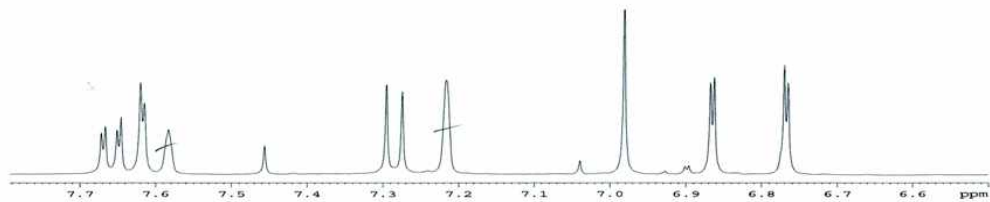
result



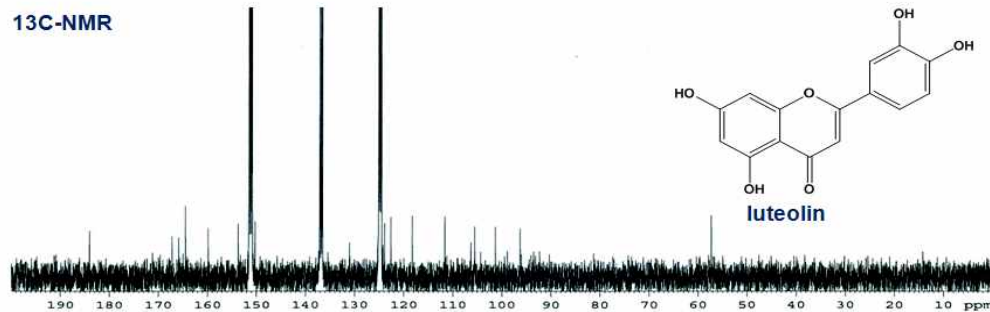
<그림 110. 대두발효물의 지표물질 탐색>

자수정 EtOAc fr. -3-2

¹H-NMR



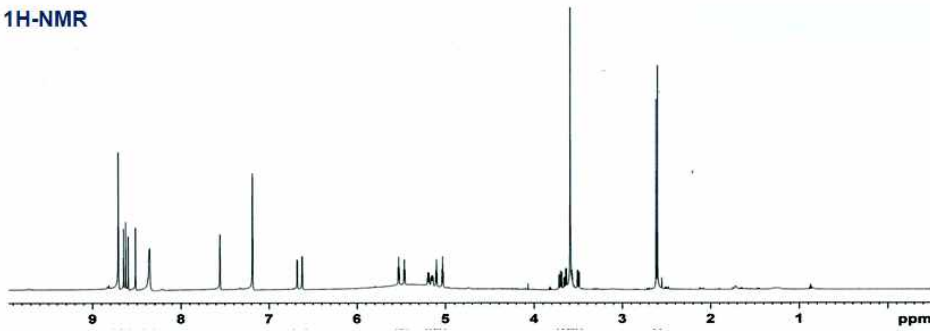
¹³C-NMR



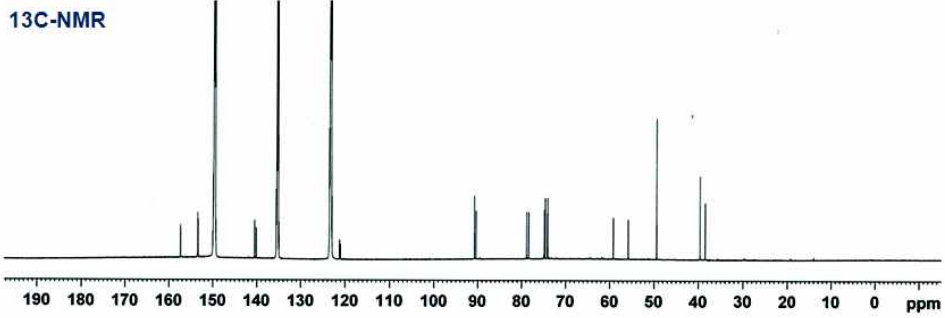
<그림 111. 자수정 발효물 내의 지표물질 분석>

자수정 발효 EtOAc fr. -2-2

¹H-NMR



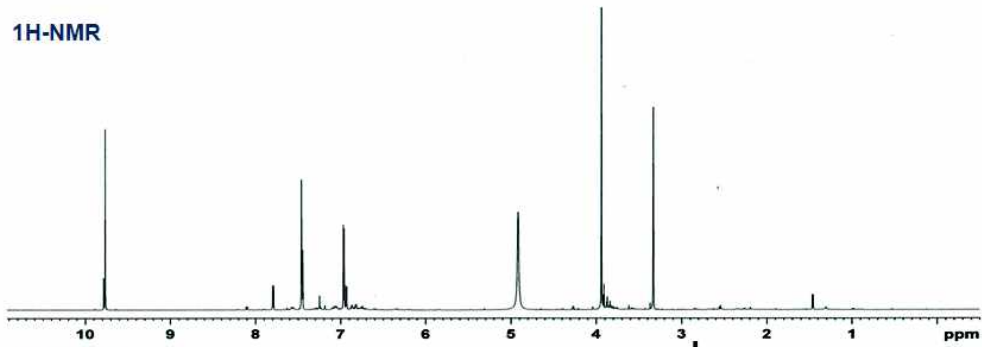
¹³C-NMR



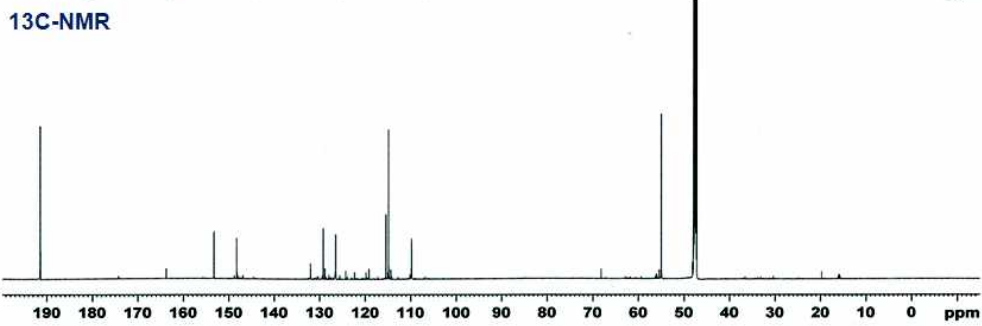
<그림 112>

자수정 발효 EtOAc fr. -3-3-3

¹H-NMR



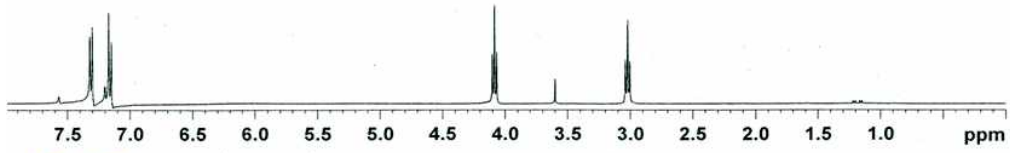
¹³C-NMR



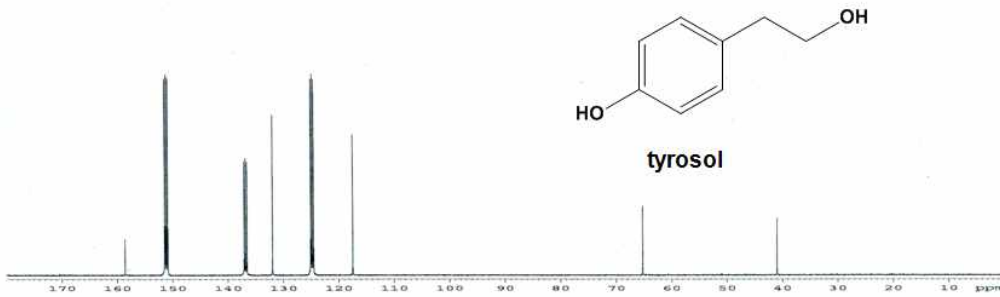
<그림 113>

대두발효 EtOAc fr. -1-6

¹H-NMR



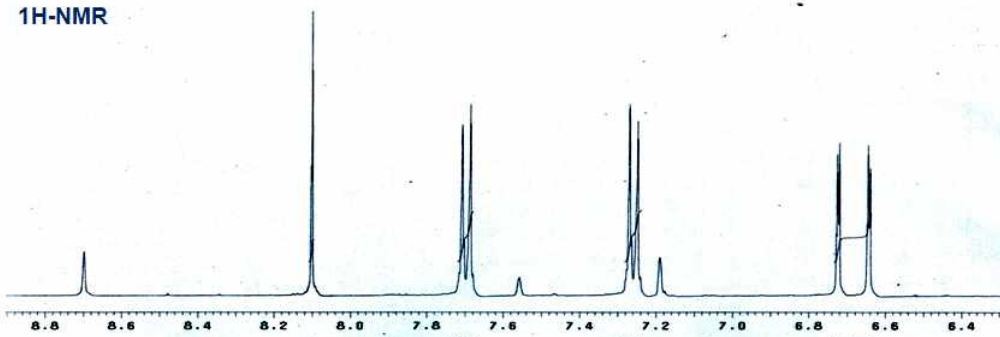
¹³C-NMR



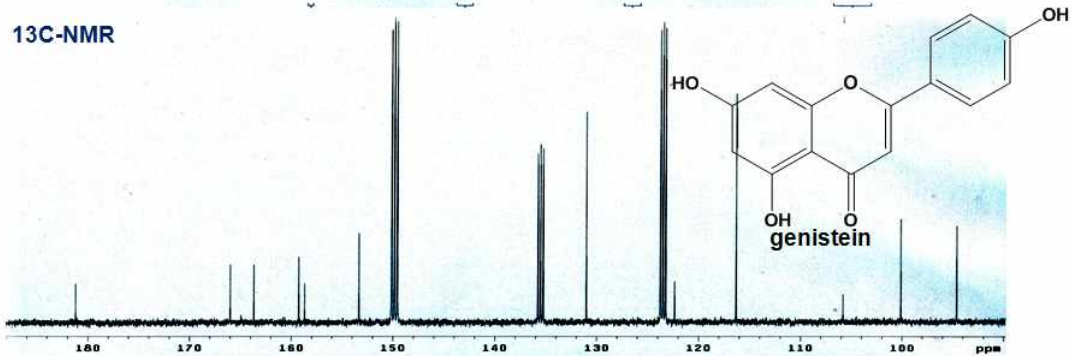
<그림 114>

대두발효 EtOAc fr. -4-2

¹H-NMR



¹³C-NMR



<그림 115>

(2) 지표성분 선정 및 전처리

(가) 기능성 지표물질 선정

위 소재들(자수정, 자수정 발효물, 그리고 대두 발효물)로부터 기능성 지표물질을 선정하기 위하여 분리된 활성 물질들을 대상으로 선정하였음. 자수정과 발효물에서는 luteolin을 포함하여 여러 polyphenol화합물이 존재하였지만 함유량이 적은 관계로 기능성 지표로 선정되기엔 부적합하였음.

대두 발효물에서는 여러 활성이 알려진 genistein과 daidzein이 다량 분리 되어 기능성 지표로 선정하였음.

(나) 시료전처리

대두 발효물 1.73 g을 80% MeOH에 담귀 상온에서 하루 동안 추출하였음
추출물을 필터하여 농축 한 결과 80% MeOH 추출물 287 mg 확보하였음.

대두 발효물에는 지표성분외에 상당량의 당과 그 외 물질들이 존재하므로 분석에 용이하게 분획을 통해서 이들을 최대한 제거하였음.

EtOAc, BuOH, 그리고 H₂O를 이용하여 계통분획을 진행 하였고, 각각 5.1mg, 68.5 mg, 그리고 210 mg을 얻었음.

물층을 제외한 EtOAc와 BuOH 분획물을 합쳐 500ppm농도로 시료를 제조하였음.

(다) STD

STD는 100ppb, 250ppb, 500ppb, 1000ppb, 5000ppb 농도로 하였음.

(라) 분석조건

Column; C18 (2.1 mm × 150 mm, 2.7 μm)

Solvent; gradient with 0.1% Formic acid in Water and Acetonitrile, 0.2ml/min

Instrument; Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MSMS

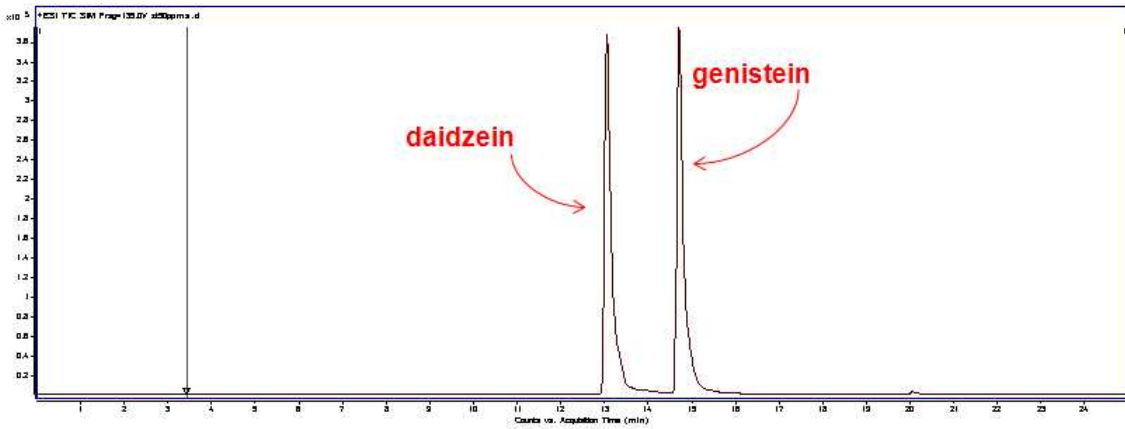
MS condition

Ionization Mode	+ESI, sim mode
Gas temp.	350 °C
Capillary volt.	4000 V
Nebulizer	40 psig
Fragmentor	190 V

<표 10. 분석 조건>

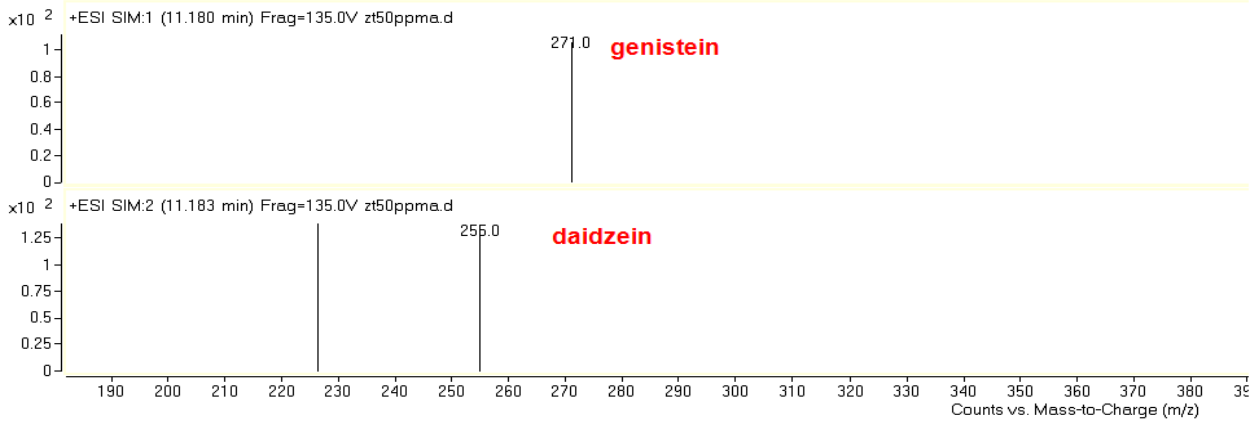
(3) 정량분석

(가) STD chromatogram



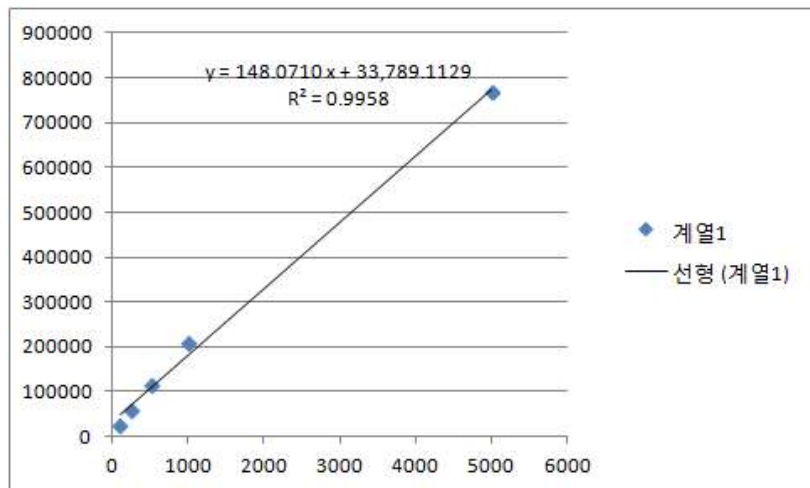
<그림 116. STD chromatogram>

(나) calibration curve



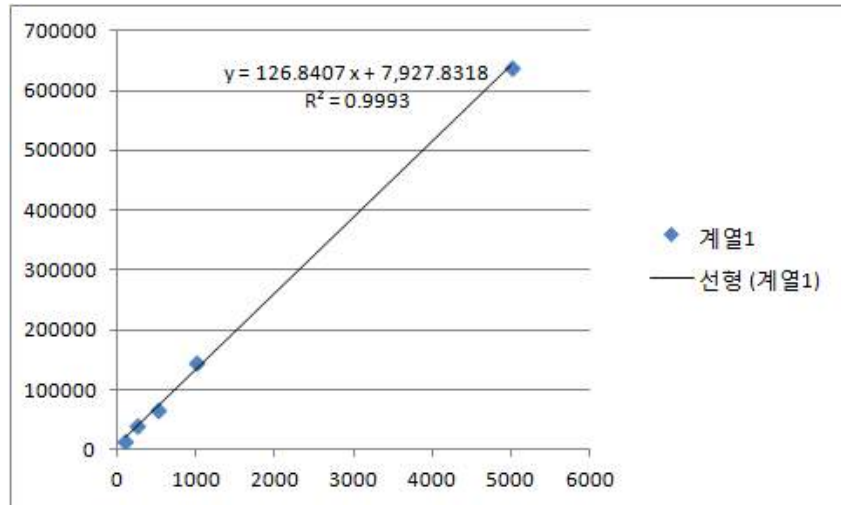
<그림 117. calibration curve>

① daidzein



<그림 118>

② genistein



<그림 119>

(다) 결과

① daidzein

analyte	Area	con.(ppb)	ng/mg
100ppb	25819	(53.83)	53.83
250ppb	61251	185.46	185.46
500ppb	116724	560.10	560.10
1000ppb	211098	1197.46	1197.46
5000ppb	768340	4960.80	4960.80
대두발효	187834	1040.34	2080.69

<표 11. daidzein 함량>

물분획물은 제외한 분획물의 양은 73.6 mg이었으므로, daidzein의 함량은 $73.6 \times 2080.69 = 153,138.78$ ng 임

② genistein

analyte	Area	con.(ppb)	ng/mg
100ppb	14544	52.16	53.83
250ppb	40671	258.14	258.14
500ppb	66958	465.39	465.39
1000ppb	145914	1087.87	1087.87
5000ppb	640411	4986.44	4986.44
대두발효	163506	1226.56	2453.13

< 표 12., genistein 함량>

genistein의 함량은 $73.6 \times 2453.13 = 180,550.37$ ng 임

대두 발효물 원물	80% MeOH	daidzein	genistein
1.73 g	280 mg	153.14 ug	180.55 ug

<표 13. daidzein 및 genistein 함량>

다. FBS-SP(발효보리와 발효콩)을 함유한 미용기능식품 1종의 인체 피부보습, 눈가주름, 피부색 밝기 및 피부 리프팅 개선 효과 평가

(1) 연구목적

본 연구는 “FBS-SP(발효보리와 발효콩)을 함유한 미용기능식품 1종의 피부보습, 눈가 주름, 피부색 밝기 및 피부 리프팅 개선 효과를 평가하기 위함이다.

(2) 연구개요

건성피부(수분량 지수 49이하-Corneometer[®]CM825 측정 시, C+K, Germany의 reference 반영)이면서 눈가주름 및 색소침착(육안평가 grade 3이상- ref. 경희대피부생명공학센터 SOP)이 생성되기 시작하거나 이미 생성된 25~60세의 한국 성인여성 피험자 65명을 대상으로 시험제품 (B) 또는 대조제품(A)을 이중맹검, block randomization을 통하여 12주간 복용하도록 한 다음, 복용 전(0주), 복용 4주 후, 복용 8주 후, 복용 12주 후 각 시점에 육안평가, 피부수분량, 각질량, 경피수분손실량(TEWL), 눈가주름 개선 정도, 피부색 밝기(L*value), 피부 리프팅, 식이조사 및 체중조사, 혈액분석(외부업체 위탁- 더웰의원 건강검진 센터), 설문평가 및 안전성평가를 실시하여 시험제품에 대한 인체 피부보습, 눈가주름, 피부색 밝기 및 피부 리프팅 개선에 대한 유효성을 평가한다.

(3) 연구방법

(가) 피험자 선정

본 연구에서는 건성피부 이면서 눈가주름이 생성되기 시작하거나 이미 생성된 25세~60세에 해당하며 피험자 선정을 만족하고, 제외기준에 포함되지 않는 여성 피험자 66명(최종 유효 인원 최소 60명 이상을 목표함)을 모집하여 연구를 개시하였다.

① 선정기준

- ㉠ 25세~60세의 여성으로 피부가 건조하고, 눈가주름 및 색소침착이 생성된 자
- ㉡ 피부질환을 포함하는 급, 만성 신체 질환이 없는 건강한 자
- ㉢ 시험의 목적, 내용 등에 관하여 시험자로부터 충분히 설명을 듣고 자발적으로 시험 동의서에 서명한 지원자
- ㉣ 시험기간 동안 추적 관찰이 가능한 지원자

② 제외기준

- ㉠ 임신 중이거나 수유 중 또는 6개월 이내에 임신을 계획하고 있는 자
- ㉡ 경구 피임약을 복용하는 자
- ㉢ 피부 질환의 치료를 위해 스테로이드가 함유된 피부외형제를 1개월 이상 사용한 자

- ㉠ 동일한 시험에 참가한 뒤 6개월이 경과되지 않은 자
- ㉡ 민감성, 과민성 피부를 가진 자
- ㉢ 시험부위에 점, 여드름, 홍반, 모세혈관확장 등의 피부 이상소견이 있는 자
- ㉣ 시험시작 3개월 이내에 시험부위에 동일 또는 유사한 성분의 화장품 또는 의약품을 사용한 자
- ㉤ 연구시작 전 6개월 이내 시험부위에 시술(피부 박피술, 보톡스, 기타 피부관리 등)을 받거나 6개월 이내 계획한 자
- ㉥ 만성 소모성 질환이 있는 자(천식, 당뇨, 고혈압 등)
- ㉦ 정신과적 질환이나 피부질환이 있는 자
- ㉧ 본 임상연구소의 임직원인 자
- ㉨ 식품에 대한 특정 알레르기 반응이 있는 자
- ㉩ 약물에 민감한 반응, 알레르기 반응을 보인 경험이 있는 자
- ㉪ 심혈관계 질환, 내분기계 질환, 소화기계 질환, 비뇨기계 질환을 가진 자

(나) 시험 중단 및 탈락 기준

본 시험에 참여한 피험자는 언제든지 시험참여를 중단 및 철회할 수 있으며 시험자는 다음의 사유가 발생하면 피험자를 본 시험에서 탈락시키도록 하고 시험결과 산정에서 제외하였다. 피험자가 탈락된 경우 시험자는 아래 중 해당하는 탈락사유 항목을 명시 하고 이외에 특이사항을 기록하여 시험책임자에게 보고하도록 하였다.

- 피험자가 참여 동의를 철회
- 시험부위의 이상반응 발생(소양감, 홍반 등)
- 프로토콜을 어김(과도한 자외선 노출, 지나친 음주, 흡연 등)
- 추적관찰 실패
- 기타

(다) 피험자의 준수사항

- ① 시험제품 복용상의 준수사항
 - ㉠ 시험기간 동안 매일 본 연구기관에서 나누어준 제품을 1포/ 1일 복용하도록 한다.
 - ㉡ 외출 시 선크림을 반드시 사용하고 가벼운 메이크업은 허용한다.
 - ㉢ 시험 제품 복용을 거르지 않도록 한다.
- ② 시험제품 보관상의 주의사항
 - ㉠ 유, 소아의 손이 닿지 않는 곳에 보관한다.
 - ㉡ 고온 내지 저온의 장소 및 일광이 닿는 곳은 피하여 보관한다.
- ③ 제한 사항
 - ㉠ 피험자는 시험기간 동안 기능성을 표시하고 있는 화장품. 의약품(아스피린, 항염제, 항히스타민제, 스테로이드제(한약 포함)) 및 건강보조식품, 기능성 식품 등의 사용 및

복용을 중지한다.

- ㉠ 평소에 사용하던 화장품이나 화장습관을 변경하지 않는다.
- ㉡ 평소 식사습관을 변경하지 않는다.
- ㉢ 시험기간 중 전박부위에 보습용 화장품이나 외용제 사용을 금지한다.
- ㉣ 시험기간 중 피부관리를 받거나 미용적, 피부과적 시술을 금지한다.
- ㉤ 시험기간 동안 예방 주사를 맞거나 면역억제제의 치료도 금지된다.
- ㉥ 일상 생활에서 보다 많은 수준의 태양광선에의 노출을 피하도록 한다. 예를 들면 옥외 수영, 스키, 등산, 장기간 여행 등의 야외 활동을 시험기간 동안 자제 하도록 한다.

④ 피험자의 의무 사항

- ㉦ 제품의 복용방법과 제한사항을 성실히 이행하며 검사일정을 준수하도록 한다.
- ㉧ 시험기간 중 피험자에게 발생하는 모든 증상을 상세하고 빠짐없이 시험자에게 보고 하도록 한다.
- ㉨ 본 시험기간 중 시험자의 질문, 설문 등 모든 자료에 성실하고 정직하게 작성 하도록 한다.
- ㉩ 본 연구소 방문 시마다 시험제품 복용일지를 가지고 오도록 한다.

(라) 피험자 수 산출 근거

본 시험은 두 군의 결과 데이터가 통계적으로 유효성 비교가 가능한 수를 산출하기 위해 피험자 수 표본크기 산출 소프트웨어 G*Power 3.1 사용하였다.

① 산출조건

㉦ 1차 유효성 평가 항목:

수분량(corneometer), 피부주름측정(visioline), 피부색 밝기(spectrophotometer), 피부리프팅(moiré)

㉧ 분석방법:

독립된 두 집단간의 평균 차이(Difference between two independent means: two groups)

㉨ 유의수준(α): 0.05 (5%)

㉩ 검정력 ($1-\beta$): 0.80

㉪ 중도탈락율 (Drop out): 중도탈락율은 각 군당 15%로 하였다 (군당 약 4명씩 총 8명)

따라서 각 군당 30명 이상(시험군 30명, 대조군 30명) 구성으로 총 피험자 60명 이상을 모집하여 실시하였다.

② 인체적용제품에 대한 정보

시료 명칭	FBS-SP(콩보리복합발효물)을 함유한 피부미용기능식품
시료 성상	Cloudy 형태의 연한 갈색의 액상 타입
시료 포장	레트로트 멸균 파우치
시료 보관	상온 보관
시료 복용주기	매일 1포 (100ml/1포)
시료 복용기간	12주간
시료 복용방법	하루 1포(식사 후 복용 권장), 침전물이 발생될 수 있으나 제품에는 문제가 없으며 가급적 흔들어서 음용하시길 권장함.
복용 시 병용 사항	시험제품 복용 2주전부터 시험종료 시점까지 기능성을 표방하는 화장품 및 외용제, 건강보조식품(한약제 포함) 섭취를 금하도록 하였다.

<표 14. 시료 정보>

(마) 측정 및 평가

피험자들은 시험제품 복용 전, 복용 4주 후, 8주 후, 12주 후 시점에 센터를 방문 하도록 하였다. 센터 방문 직후 피험자들을 block randomization을 통해 A제품 (대조제품)과 B제품 (시험제품)으로 나누고, 각 그룹 안에서 다시 A그룹과 B그룹으로 나누어 피험자의 얼굴, 전박의 좌 또는 우측을 측정부위로 정하였다. 피험자들은 세안을 한 다음 공기의 이동과 식사 광선이 없으며 항온항습조건 (22±2℃, 50±5%)이 유지되는 공간에서 30분간 피부 안정을 취한 후 육안평가, 기기측정(피부 수분량, 각질량, 경피 수분손실량, 눈가주름-레플리카, 피부색밝기, 피부리프팅), 설문평가, 체중(BMI)측정, 식이조사 및 안전성 평가에 참여하도록 하였다 <표 15>.

Actions	-2W	0W	4W	8W	12W
피험자 모집 및 wash off period°	✓				
피험자 선정 및 피험자 기초조사		✓			
식이조사 및 체중(BMI)측정		✓	✓	✓	✓
피부색/눈가주름 육안평가		✓	✓	✓	✓
VISIA®를 이용한 사진촬영 (UV/FL mode)		✓	✓	✓	✓
Corneometer®CM825를 이용한 피부 수분량 평가		✓	✓	✓	✓
Vapometer®를 이용한 경피수분손실량 (TEWL)평가		✓	✓	✓	✓
D-squame® 를 이용한 피부 각질량 평가		✓	✓	✓	✓
Visioline®VL-650를 이용한 눈가주름		✓	✓	✓	✓

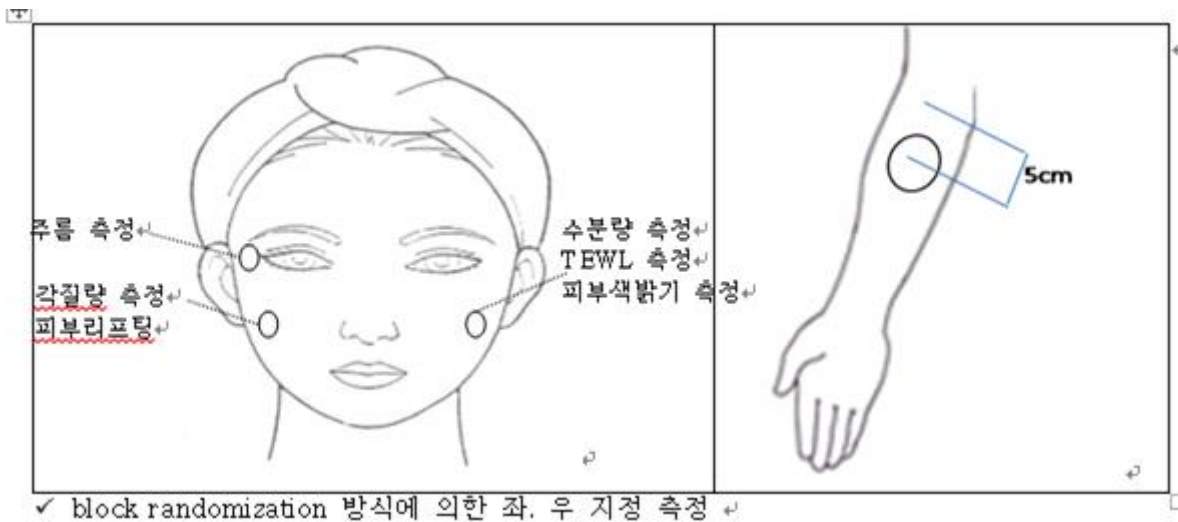
평가					
Spectrophotometer® CM-700d를 이용한 피부색 평가		✓	✓	✓	✓
Moire®를 이용한 피부 리프팅 평가		✓	✓	✓	✓
설문평가 및 전문의에 의한 안전성 평가(피부, 전신)			✓	✓	✓
전신 안전성평가(혈액검사)	✓				✓

☞ wash off period: 피험자들은 기능성을 표시하는 화장품 사용을 중단하도록 하고, 복용하고 있던 건강보조제품 등의 섭취도 중단하도록 하여 시험제품 복용에 영향을 줄 수 있는 요인 등을 소거 하였다.

<표 15. Time Table of the Study>

① 측정부위:

- ㉠ 얼굴: 피험자 얼굴의 눈꼬리와 코끝이 만나는 뺨 부위(수분량, 각질, TEWL, 피부색 밝기, 피부리프팅 측정), 색소침착 부위(피부색 밝기), 눈가 Crow's feet 부위(주름 측정)
- ㉡ 전박내측: 전박 내측의 굴측 부위에서 5cm 떨어진 부위(수분량, 각질, TEWL 측정)



<그림 120. 기기 측정 부위>

② 육안평가

㉠ 피부색 육안평가

피부색(색소침착포함)의 육안평가는 2명의 시험자가 육안 평가기준(Table 3)에 의거하여 0 ~ 9 단계로 평가하였다.

Bright & Clear(밝고 투명함)					Dark & Dull(어둡고 칙칙함)														
0	□	1	□	2	□	3	□	4	□	5	□	6	□	7	□	8	□	9	□

<표 16. 피부색 육안 평가기준>

Ref. (식품의약품안전처, 기능성화장품의 유효성평가를 위한 가이드라인, 2003년)

㉞ 가주름 육안평가

눈가주름 정도의 육안평가는 2명의 시험자가 육안 평가기준(Table 4)에 의거하여 0~9 단계로 평가하였다. 시점별 눈꼬리 부위의 주름 상태는 안면 촬영장치 (VISIA , Canfield Scientific, Inc. USA)를 이용하여 촬영하였다.

Grade	내용	Grade	내용
0	피부에 주름이 없으며 피부결이 섬세하다.	5	얕은 주름이 선명해졌으나 깊은 주름은 없다.
1	피부에 잔주름이 보이기 시작한다.	6	얕은 주름이 깊은 주름으로 진행하고 있다.
2	피부에 잔주름이 약간 생성되었다.	7	깊은 주름이 약간 생성되었다.
3	잔주름이 많고 얕은 주름으로 진행하고 있다.	8	주름이 깊고 많다.
4	얕은 주름이 약간 생성되었다.	9	주름이 매우 깊고 많다.

<표 17. 눈가주름 육안 평가기준>

Ref. (식품의약품안전처, 기능성화장품의 유효성평가를 위한 가이드라인 II, 2005.7)

③ 기기 측정

기기측정은 제품복용 전, 복용 4주 후, 8주 후, 12주 시점에서 각각 피험자들의 오른쪽 혹은 왼쪽 뺨의 피부 수분량, 경피수분손실량, 각질량, 피부색 밝기, 피부리프팅 각각을 측정하였으며 오른쪽 혹은 왼쪽 눈가의 주름을 측정하였다.

㉞ Corneometer®CM825를 이용한 피부 수분량 측정

Corneometer® CM825(Courage+Khazaka GmbH, Germany)는 전기용량(capacitance)을 측정하는 원리로 피부 각질층 아래 30~40 μ m의 수분량을 측정하는 기기이다. Probe에서 전류를 보내면 피부의 수분 함유량에 따른 피부의 전기 전도도에 따라 probe head에 남아 있는 절연이온 값이 수치화(AU: arbitrary unit)되어 나타난다. 따라서 피부에 수분함량이 많을수록 측정값은 높아진다. 본 시험에서는 정확한 측정치를 얻기 위해 평가시점 마다 시험부위(뺨, 전박내측)를 각각 3회 반복 측정 하여 그 평균값을 분석하였다.

㉞ Vapometer® 를 이용한 경피수분손실량 측정

경피수분손실은 피부로부터 발산되는 수분을 말하며 보습기능과 밀접한 관계를 가지고 있다. 건조함이 악화될 경우 TEWL값이 증가하기 때문에 보습력의 유무는 TEWL측정 정도로 판단할 수 있다. 측정기기인 Vapometer®(Delfin, Finland)는 온도와 습도 sensor가 측정 부

위의 단위 면적 당 시간 경과에 따른 수분 증발량(g/m²h)을 측정한다. 본 시험에서는 각 평가시점 마다 시험부위(뺨, 전박내측)를 측정하여 수분 증발량을 분석하였다.

㉔ D-squame®을 이용한 피부 각질량 측정

피부수분 정도를 평가하는 또 다른 지표인 각질량 측정은 D-squame®BlackTape을 이용하여 시험부위(뺨, 전박내측)의 각질을 채취한다. 본 시험에서는 D500 D-squame®DiscApplicator로 약 5초간 225g/cm²의 압력으로 피부에 부착한 후 떼어냈다. 채취한 각질표본은 Charm view(Moritex, Japan)로 700배 확대하여 촬영한 후 이미지 프로그램(Image-Pro®plus)을 이용하여 각질의 면적을 분석하였다.

㉕ Visioline ®VL-650을 이용한 눈가주름(Replica) 측정

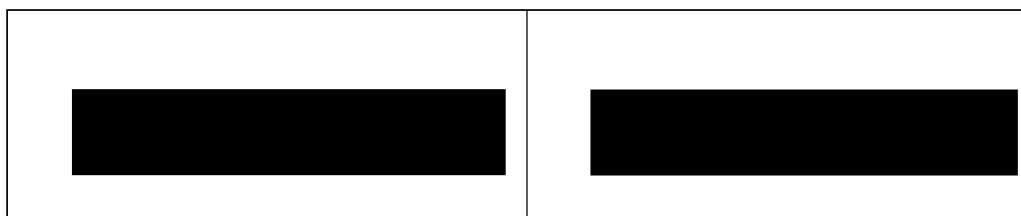
Visioline®,VL650(Courage+KhazakaGmbH, Germany)은 제작된 Replica의 주름의 깊이, 길이 등을 측정하는 장비이다. 특별한 광원이 통과되도록 제작된 표준 카트리지에 Replica를 끼우고 광원을 통과시켜 그림자 명암 영상을 CCD Camera를 이용하여 파일화 한 후 각 파라미터들(Total wrinkle area; 총 주름면적, No. of wrinkles; 주름의 수, Total length; 총 주름의 길이, Mean length; 평균 주름의 길이, Wrinkle depth; 총 주름의 깊이, Mean depth; 평균 주름의 깊이, Max wrinkle depth; 가장 깊은 주름의 깊이)을 분석한다.

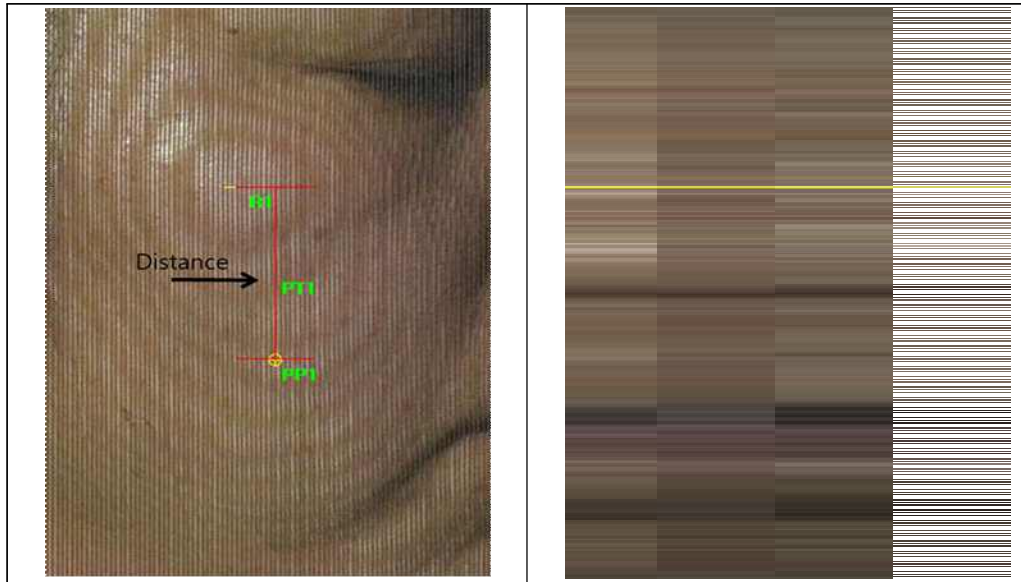
㉖ Spectrophotometer®CM-700d를 이용한 피부색 밝기(L*value) 측정

Spectrophotometer®CM-700d(Minolta, Japan)는 물체색의 분광반사율을 측정하는 장비로서 tristimulus values를 측정하여 CIELAB의 표색계인 L*, a*, b*로 계산해준다. L*a*b* 표색계에서는 명도는 L*로 표시하고, 색상과 채도를 표시하는 색도는 a*, b*로 표시한다. a*, b*는 색의 방향을 표시하고 있고, a*는 적색 방향, -a*는 녹색 방향, b*는 황색 방향, -b*는 청색 방향을 표시하고 있다. L*, a*, b* 수치가 중앙으로 됨에 따라 무채색을 나타내고, 반대가 되면 색도가 높아짐을 나타낸다. 본 시험에서는 시험부위(뺨 정면, 색소침착 부위)를 3회 측정하고 L*value의 평균값을 취하여 분석한다.

㉗ Moire®를 이용한 피부 리프팅 측정

측정 매 시점마다 얼굴 Moire® 장치를 사용하여 피험자의 좌측과 우측 얼굴 뺨 부위에 생기는 등고선 그림자를 촬영하였다. 촬영된 영상에서 그림자의 수직거리 (Distance: 뺨 부위의 첫 번째 원 중앙부터 아래로 세 번째 원까지의 수직 거리)와 각도(Angle: 첫 번째 원 중앙을 지나는 수평선을 긋고 중앙점으로부터 300 pixels 떨어진 곳에 기준점을 찍은 후 아래로 첫 번째 원, 두 번째 원이 만나는 등고선의 접선을 그려 이들이 이루는 각도의 평균값)를 이미지 분석 프로그램(Image pro®plus7.0)을 이용하여 분석하였다.





<그림 121. 모아레 분석방법(수직거리(distance)/각도(angle))>

④ 혈액분석

시험제품 복용 전(-2주)과 복용 12주 후 피험자들의 혈액을 검사하여 시험제품이 인체 대사에 영향을 미치지 않았음을 확인하였다. 혈액검사는 외부의뢰기관에 위탁하여 시험이 종료된 후 결과를 제공받아 분석하였다.

위탁기관: 더웰의원 건강검진 센터

외과 원장/건강검진센터장: 정진형

담당자: 현호정/센터장

주소: 경기도 수원시 영통구 봉영로 1620 대우월드마크

연락처: 031-8006-4452

⑤ 식이조사 및 체중측정

피험자들의 식습관 변화가 실험결과에 영향을 미치지 않았음을 확인하고자 시험제품 복용 전, 복용 4주 후, 8주 후, 12주 후 시점에서 체중을 측정하고, 식이조사를 실시하여 시험기간 동안에 식습관이 평소처럼 유지되었는지를 확인하였다. 피험자들은 제공받은 식이조사 평가지에 본인의 식사량 정도를 자가평가 하도록 하고 방문 시에 가져오도록 하여 시험자가 확인 및 기록하였다.

㉠ 식이량 정도: (안먹음:0, 적음:1, 보통:2, 많음:3)

⑥ 설문평가

설문 내용은 의뢰인과 협의하여 작성되었으며, 시험제품 복용 4주 후, 복용 8주 후, 복용 12주 후에 피험자가 작성한 답변을 토대로 시험제품의 효능과 복용성에 대한 만족도를 평가하였다.

⑦ 안전성평가

시험제품 복용 4주 후, 복용 8주 후, 복용 12주 후 시험자가 피험자의 피부 상태를 관찰하고 피험자와의 질의응답을 통해 피부상태와 전신적 상태를 확인하여 기록, 평가 하였다. 이상반응이 있을 시 피부 이상반응 보고를 작성하도록 하며 이에 대한 시험 제품과의 관련성은 시험책임자가 판단하도록 하였다.

⑧ 데이터 분석

시험제품 복용 전, 복용 4주 후, 8주 후, 12주 후 시점에 기기 측정값의 평균 및 표준편차 값(S.D)을 각각 구하고, 측정값의 시점별, 군간별 차이유무를 통계분석 하였다.

㉑ 제품복용 시점별 비교

- Paired t-test ($p < 0.05$)

㉒ 제품의 군간 비교

- Independent t-test ($p < 0.05$)

㉓ 순응도

Chi-square test ($p < 0.05$)

통계 분석 프로그램은 SPSS@20.0을 사용했으며, 설문조사 결과는 빈도분석 하였다.

(4) 연구 결과

(가) 피험자 피부특성 및 기저치 비교

본 시험은 피험자 제외기준 및 선정기준에 준하는 건강한 한국 성인 여성 총66명을 대상으로 진행을 하였으며, 이들 중 1명이 탈락(피험자#59: 탈락기준㉑에 의거)하여 총 65명의 피험자가 시험 전 과정을 성실히 수행하였다. 피험자의 피부특성은 설문에 의해 조사되었으며, 기저치(baseline) 및 피부특성 분석 결과는 다음과 같다<표 18, 19>.

분석결과, 눈가주름 항목을 제외한 두 군 간의 기저치 값은 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

(n=65)

항목	Mean ± S.D		p-value†
	A제품(대조군) (n=33)	B제품(시험군) (n=32)	
연령	43.41 ± 4.68	42.58 ± 4.60	0.473
체중 (kg)	55.89 ± 6.26	56.96 ± 5.39	0.465
BMI (kg/m ²)	21.43 ± 1.95	21.99 ± 1.70	0.227
피부수분량 (뺨) (AU)	38.79 ± 7.28	39.46 ± 6.73	0.704
피부수분량 (전박) (AU)	35.89 ± 5.40	35.47 ± 4.81	0.741
눈가주름 (Grade)	6.11 ± 0.91	5.67 ± 0.84	0.047*

† p-value : Independent t-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 2개의 그룹간에 유의한 차이가 있음)

<표 18. 두 군 간의 기저치 비교>

(n=65)

항목	분류	A 제품(대조군)(n=33)		B 제품(시험군)(n=32)	
		빈도(수)	비율(%)	빈도(수)	비율(%)

연령	30 대	6	18.18	6	18.75
	40 대	24	72.73	22	68.75
	50 대	3	9.09	4	12.50
피부타입	건성	27	81.82	28	87.50
	중성	0	0.00	0	0.00
	지성	0	0.00	0	0.00
	복합성	6	18.18	4	12.50
	문제성피부	0	0.00	0	0.00
피부색	하얀편	4	12.12	8	25.00
	보통	21	63.64	19	59.38
	검거나 칙칙한편	8	24.24	5	15.63
피부표면상태	부드러운편	6	18.18	2	6.25
	보통	22	66.67	27	84.38
	거친편	5	15.15	3	9.38
피부유분	번들거림	0	0.00	0	0.00
	보통	14	42.42	7	21.88
	부족함	19	57.58	25	78.13
피부수분	촉촉함	0	0.00	0	0.00
	보통	2	6.06	2	6.25
	건조함	31	93.94	30	93.75
피부두께	얇은 편	16	48.48	12	37.50
	보통	16	48.48	20	62.50
	두꺼운 편	1	3.03	0	0.00
색조화장빈도	0~1 회	11	33.33	9	28.13
	2~3 회	12	36.36	12	37.50
	4~5 회	8	24.24	7	21.88
	거의 매일 함	2	6.06	4	12.50
야외활동시간	1 시간 미만	9	27.27	10	31.25
	1~3 시간	19	57.58	17	53.13
	3 시간 이상	5	15.15	5	15.63
수면시간	5 시간 이하	1	3.03	1	3.13
	5~8 시간	26	78.79	29	90.63
	8 시간 이상	6	18.18	3	9.38
흡연유무	안 핀다	33	100.00	32	100.00
	10 개피 미만	0	0.00	0	0.00
	10 개피 이상	0	0.00	0	0.00
	한 갑 이상	0	0.00	0	0.00
민감성 피부	예	10	30.30	7	21.88
	아니오	23	69.70	25	78.13
생리 중 피부변화	예	13	39.39	11	34.38
	아니오	20	60.61	21	65.63
화장품 사용후	예	2	6.06	1	3.13

(따가움, 가려움)	아니오	31	93.94	31	96.88
화장품 부작용	예	2	6.06	0	0.00
	아니오	31	93.94	32	100.00

<표 19. 피험자 특성>

(나) 순응도

매 방문 시 마다 피험자들이 지참하고 온 복용일지를 확인 및 기록하고 마지막 방문 시에 잔여량을 반납 받았다. 미복용 4회 이상이 될 경우 탈락처리 하였으며 순응도는 다음과 같다.

복용한 제품 수 = 섭취해야 할 제품 수 - 반납한 제품 수

$$\text{복용순응도(\%)} = \frac{\text{섭취한 제품 수}}{\text{섭취해야 할 제품 수}} \times 100$$

분석결과 본 시험기간 동안 섭취해야 할 수, 섭취한 수, 이에 따른 순응도도 두 군 간의 통계학적 유의한 차이가 없었다. 또한 순응도 미달로 탈락한 피험자는 없었다<표 20>.

(n=65)

항목	A 제품(대조군) n=33	B 제품(시험군) n=32	p-value†
섭취해야 할 제품 수(포)	82.33 ± 1.80	82.22 ± 2.04	0.811
섭취한 제품 수(포)	81.48 ± 1.84	81.56 ± 2.47	0.886
순응도(%)	98.98 ± 1.38	99.20 ± 1.41	0.222

† p-value : Independent t-test and Chi-square test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 2개의 그룹간에 유의한 차이가 있음)

<표 20. 순응도>

(다) 육안평가

① 시점별 제품복용 전, 후 피부색 육안평가 분석

분석결과, 제품복용 전과 비교 시 제품복용 8주, 12주시점의 B제품(시험군)에서 통계적으로 유의하게 피부색 육안평가 점수가 감소(개선)하였다(p<0.05) (Table 8, Fig. 2).

(n=65)

Group	Week	Mean ± S.D	p-value†	증감율° (%)
A제품	0주	5.20 ± 0.66	-	-
	4주	5.18 ± 0.67	0.325	▼0.38
	8주	5.17 ± 0.66	0.160	▼0.58
	12주	5.17 ± 0.66	0.160	▼0.58
B제품	0주	5.25 ± 0.74	-	-
	4주	5.23 ± 0.73	0.325	▼0.38
	8주	5.13 ± 0.77	0.030*	▼2.29
	12주	5.05 ± 0.76	0.003**	▼3.81

† p-value : Paired t-test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, 제품복용 전과 비교하여 유의한 차이가 있음)

°증감율: $(W_x - W_0)/W_0 \times 100$, calculated by mean value

<표 21. 시점별 피부색 변화에 대한 육안평가 결과>

② 시점별 군간 피부색 육안평가 변화 분석

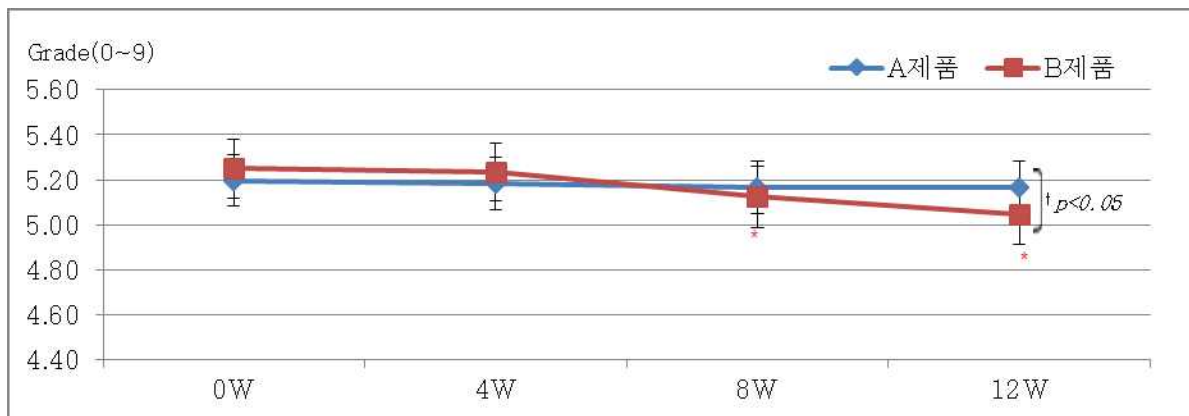
분석결과, 제품복용12주 후 시점에서 A제품(대조군)에 비해 B제품(시험군)에서 통계적으로 유의하게 피부색 육안평가 점수가 감소하였다($p<0.05$) (표 22, 그림. 122).

(n=65)

Week	Group	Δ Mean difference \pm Std. Error Mean	<i>p</i> -value†
4주	A제품	-0.02 \pm 0.02	0.983
	B제품	-0.02 \pm 0.02	
8주	A제품	-0.03 \pm 0.02	0.116
	B제품	-0.13 \pm 0.05	
12주	A제품	-0.03 \pm 0.02	0.013*
	B제품	-0.20 \pm 0.06	

† *p*-value : Independent *t*-test (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, 2개의 그룹간에 유의한 차이가 있음)

<표 22. 군간별 피부색 변화에 대한 육안평가 결과>



(Mean \pm SEM. * $p<0.05$ vs. before application, † $p<0.05$ vs. control group)

<그림 122. 시점별 피부색 육안평가 결과>

③ 시점별 제품복용 전, 후 눈가주름 육안평가 분석

분석결과, 제품복용 전과 비교 시 제품복용 12주시점의 B제품(시험군)에서 통계적으로 유의하게 눈가주름 육안평가 점수가 감소(개선)하였다($p<0.05$) (표 23, 그림. 125, 126).

(n=65)

Group	Week	Mean \pm S.D	<i>p</i> -value†	증감율° (%)
A제품	0주	5.67 \pm 0.84	-	-
	4주	5.65 \pm 0.84	0.325	▼0.35
	8주	5.65 \pm 0.84	0.325	▼0.35
	12주	5.64 \pm 0.85	0.160	▼0.53
B제품	0주	6.11 \pm 0.91	-	-
	4주	6.09 \pm 0.94	0.325	▼0.33
	8주	6.06 \pm 0.94	0.083	▼0.82

	12주	6.05 ± 0.94	0.044*	▼0.98
--	-----	-------------	--------	-------

* p-value : Paired t-test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, 제품복용 전과 비교하여 유의한 차이가 있음)

°증감율: $(W_x - W_0)/W_0 \times 100$, calculated by mean value

<표 23. 시점별 눈가주름 변화에 대한 육안평가 결과>

④ 시점별 군간 눈가주름 육안평가 변화 분석

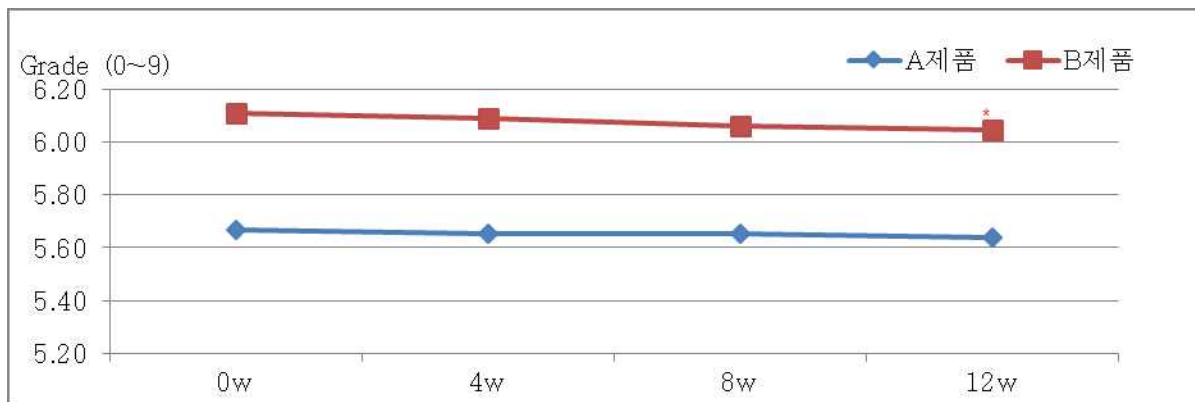
분석결과, 제품복용 4주 후, 8주 후, 12주 후 시점 모두에서 그룹 간 눈가주름의 육안평가 점수가 통계적 유의차는 없었다(표 24, 그림. 123, 124).

(n=65)

Week	Group	ΔMean difference ± Std. Error Mean	p-value†
4주	A제품	-0.02 ± 0.02	0.983
	B제품	-0.02 ± 0.02	
8주	A제품	-0.02 ± 0.02	0.299
	B제품	-0.05 ± 0.02	
12주	A제품	-0.03 ± 0.03	0.378
	B제품	-0.06 ± 0.03	





† p-value : Independent t-test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, 2개의 그룹간에 유의한 차이가 있음)

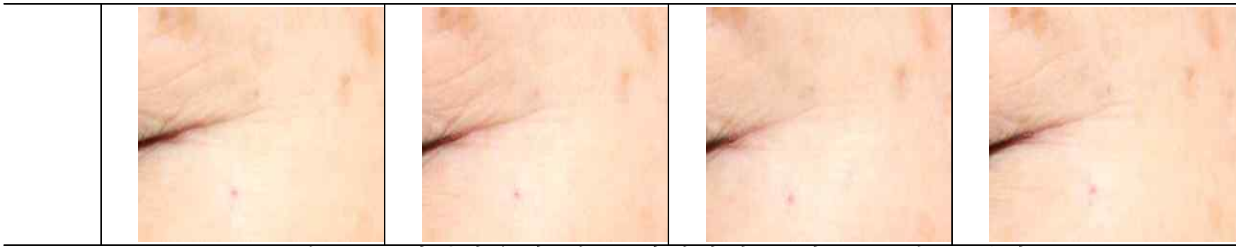
<표 24. 군간별 눈가주름 변화에 대한 육안평가 결과>



(Mean ± SEM, *p<0.05, vs. before application)

<그림 123. 시점별 눈가주름 육안평가 결과>

	제품복용 전	제품복용 4주 후	제품복용 8주 후	제품복용 12주 후
A (#64)				
B (#60)				



<그림 124. 제품복용에 따른 피험자의 눈가주름 정도 변화>

(라) 피부 수분량

① 시점별 제품복용 전, 후 피부 수분량 변화 분석

분석 결과, 제품복용 전과 비교 시 제품복용 4주 후, 8주 후, 12주 후 시점에서 얼굴, 전박 부위의 A제품(대조군)과 B제품(시험군) 모두 통계적으로 유의하게 피부 수분량이 증가(개선)하였다($p < 0.05$). 피부 수분 최대 증가율은 얼굴부위에서 A 제품이 24.02%, B제품이 42.07%로 나타났으며 전박 부위에서는 A제품이 18.07%, B제품이 27.81%로 나타났다(표. 25, 그림. 127).

(n=65)

Site	Group	Week	Mean ± S.D (A.U)	p-value†	증감율°(%)
얼굴	A제품	0주	39.46 ± 6.73	-	-
		4주	41.12 ± 6.64	0.000***	▲4.21
		8주	45.18 ± 6.73	0.000***	▲14.50
		12주	48.94 ± 8.35	0.000***	▲24.02
	B제품	0주	38.79 ± 7.28	-	-
		4주	43.15 ± 8.18	0.000***	▲11.24
		8주	51.18 ± 7.77	0.000***	▲31.94
		12주	55.11 ± 9.67	0.000***	▲42.07
전박	A제품	0주	35.47 ± 4.81	-	-
		4주	36.76 ± 4.81	0.009**	▲3.64
		8주	39.82 ± 5.35	0.000***	▲12.26
		12주	41.88 ± 5.35	0.000***	▲18.07
	B제품	0주	35.89 ± 5.40	-	-
		4주	39.64 ± 5.39	0.000***	▲10.45
		8주	43.72 ± 5.26	0.000***	▲21.82
		12주	45.87 ± 5.33	0.000***	▲27.81

† p-value : Paired t-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, 제품복용 전과 비교하여 유의한 차이가 있음)

°증감율: $(W_x - W_0)/W_0 \times 100$, calculated by mean value

<표 25. 시점별 제품복용 전, 후 피부 수분 변화량>

② 시점별 피부 수분량 변화의 구간 비교 분석

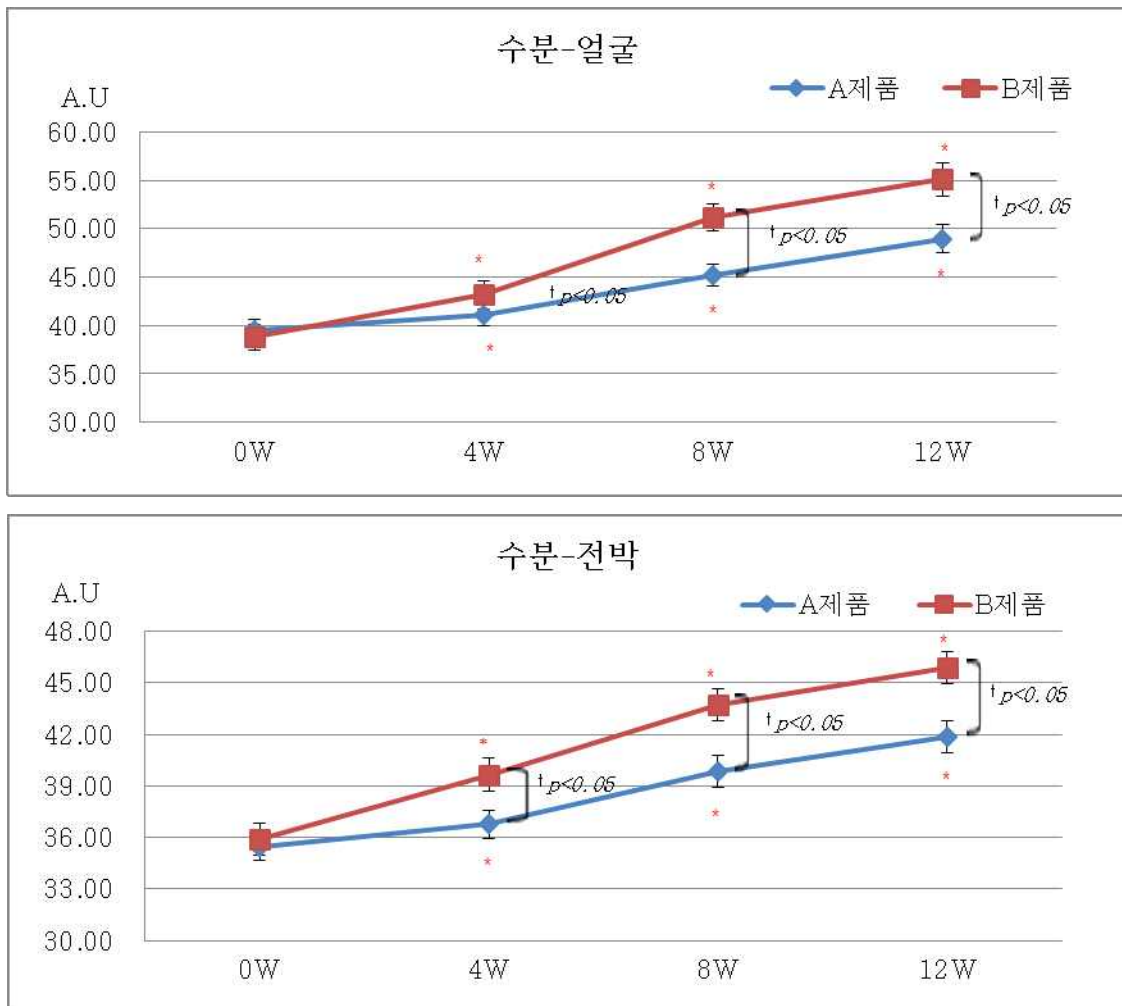
분석결과, 얼굴, 전박 부위에서 제품복용 4주 후, 8주 후, 12주 후 시점 모두에서, A제품(대조군)에 비해 B제품(시험군)에서 통계적으로 유의하게 피부 수분량이 증가 하였다($p < 0.05$) (표. 26, 그림. 125).

(n=65)

Site	Week	Group	Δ Mean difference \pm Std. Error (A.U)	p -value†
얼굴	4주	A제품	1.67 \pm 0.37	0.002**
		B제품	4.36 \pm 0.76	
	8주	A제품	5.72 \pm 1.01	0.000***
		B제품	12.38 \pm 1.10	
	12주	A제품	9.48 \pm 1.19	0.000***
		B제품	16.33 \pm 1.44	
전박	4주	A제품	1.30 \pm 0.46	0.000***
		B제품	3.76 \pm 0.49	
	8주	A제품	4.36 \pm 0.69	0.005**
		B제품	7.83 \pm 0.97	
	12주	A제품	6.41 \pm 0.74	0.006**
		B제품	9.97 \pm 1.02	

† p -value : Independent t -test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 2개의 그룹간에 유의한 차이가 있음)

<표 26. 시점별 피부 수분량 변화의 군간 비교 >



(Mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. before application, † $p < 0.05$ vs. control group)

<그림 125. 시점별 제품복용에 따른 수분량 변화>

(마) 경피수분손실량 (TEWL, Trans-epidermal water loss)

① 시점별 제품복용 전, 후 피부 TEWL변화량 분석

분석결과, 제품복용 전과 비교 시 제품복용 8주 후 시점에는 얼굴부위에서, 제품복용 12주 후 시점에서는 얼굴, 전박 모두 B제품에서 통계적으로 유의하게 TEWL이 감소(개선)하였다 ($p<0.05$). TEWL최대 감소율은 얼굴부위에서 A제품(대조군)이 4.40%, B제품(시험군)이 6.52%, 전박 부위에서 B제품이 7.37%으로 나타났다 (표 27, 그림. 125).

(n=65)

Site	Group	Week	Mean \pm S.D (g/m ² h)	p-value†	증감율°(%)
얼굴	A제품	0주	13.40 \pm 2.88	-	-
		4주	13.55 \pm 2.91	0.523	▲1.12
		8주	12.97 \pm 2.44	0.172	▼3.21
		12주	12.81 \pm 2.22	0.059	▼4.40
	B제품	0주	12.43 \pm 1.89	-	-
		4주	12.25 \pm 1.68	0.352	▼1.45
Site	Group	Week	Mean \pm S.D (g/m ² h)	p-value†	증감율°(%)
얼굴	B제품	8주	11.89 \pm 1.94	0.043*	▼4.34
		12주	11.62 \pm 1.52	0.001**	▼6.52
전박	A제품	0주	7.71 \pm 1.52	-	-
		4주	7.89 \pm 1.44	0.126	▲2.33
		8주	7.80 \pm 1.32	0.587	▲1.17
		12주	7.95 \pm 1.30	0.189	▲3.11
	B제품	0주	7.87 \pm 1.42	-	-
		4주	7.75 \pm 1.33	0.435	▼1.52
		8주	7.81 \pm 1.28	0.743	▼0.76
		12주	7.29 \pm 1.17	0.005**	▼7.37

† p-value : Paired t-test (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, 제품복용 전과 비교하여 유의한 차이가 있음)

°증감율: $(W_x - W_0)/W_0 \times 100$, calculated by mean value.

<표 27. 시점별 제품복용 전, 후 피부TEWL 변화량>

② 시점별 피부 TEWL변화량의 군간 비교 분석

분석결과, 제품복용 12주 후 시점에 전박 부위에서 A제품(대조군)에 비해 B제품 (시험군)에서 통계적으로 유의하게 TEWL이 감소하였다($p<0.05$) (표. 28, 그림. 126).

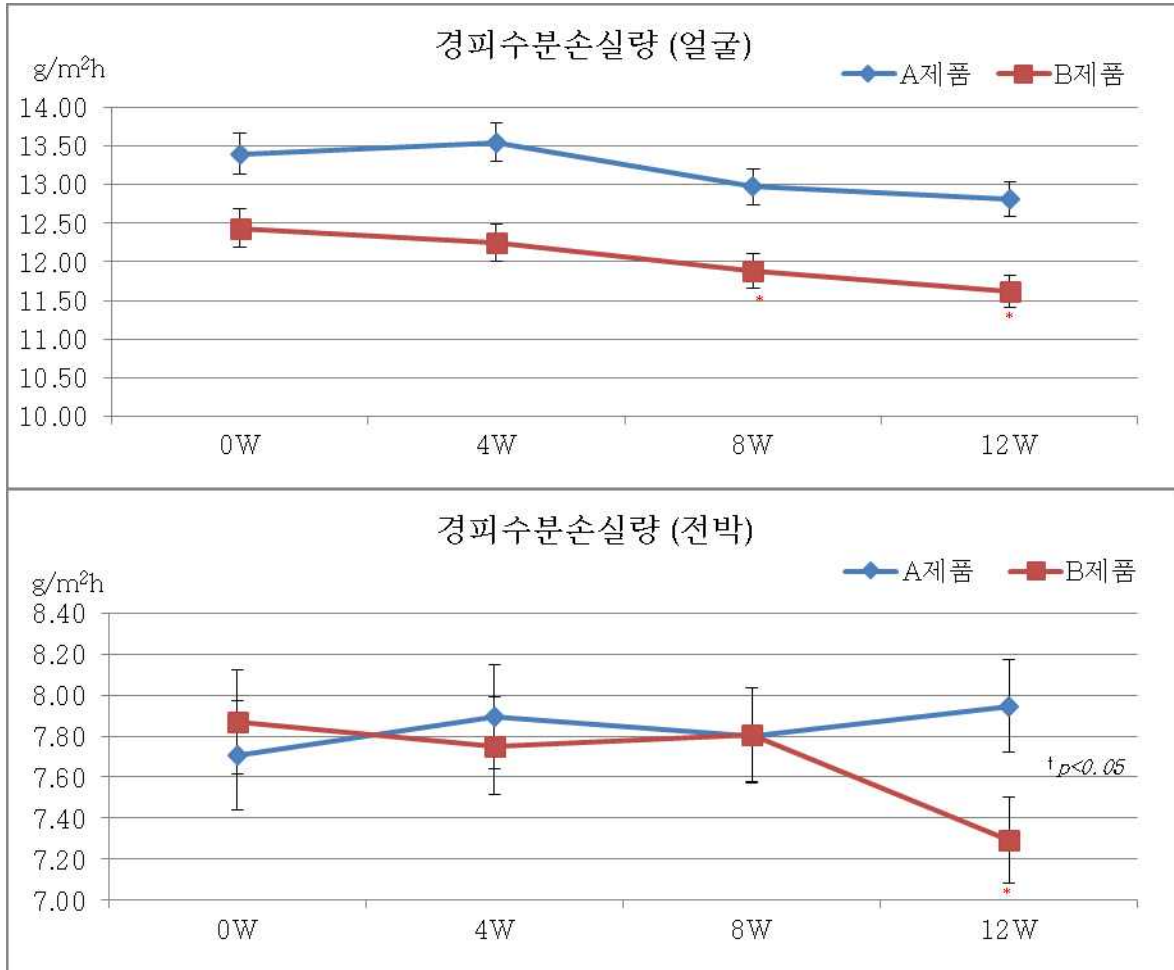
(n=65)

Site	Week	Group	Δ Mean difference \pm Std. Error (g/m ² h)	p-value†
얼굴	4주	A제품	0.15 \pm 0.23	0.275
		B제품	-0.18 \pm 0.20	
	8주	A제품	-0.43 \pm 0.31	0.767
		B제품	-0.55 \pm 0.26	
	12주	A제품	-0.59 \pm 0.30	0.547
		B제품	-0.82 \pm 0.22	
전박	4주	A제품	0.19 \pm 0.12	0.112
		B제품	-0.12 \pm 0.15	
	8주	A제품	0.10 \pm 0.18	0.539

	B제품	-0.06 ± 0.19	
12주	A제품	0.24 ± 0.18	0.003**
	B제품	-0.58 ± 0.19	

* *p*-value : Independent *t*-test (**p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001, 2개의 그룹 간에 유의한 차이가 있음)

<표 28. 시점별 피부TEWL 변화량의 군간비교>



(Mean±SEM. **p*<0.05 vs. before application, †*p*<0.05 vs. control group)

<그림 126. 시점별 제품복용에 따른 경피수분손실량 변화>

(바) 피부 각질량

① 시점별 제품복용 전, 후 피부 각질량 변화 분석

분석결과, 제품복용 전과 비교 시 제품복용 4주 후 시점에는 얼굴 부위에서, 제품 복용 8주 후, 12주 후 시점에서는 얼굴, 전박 부위 모두 B제품(시험군)에서 피부 각질량이 통계적으로 유의하게 감소(개선)하였다(*p*<0.05). 각질 최대 감소율은 제품 복용 12주 후 시점에서 얼굴 부위에서는 A제품이 3.09%, B제품은 13.15%를 나타냈으며 전박 부위에서는 A제품이 1.97%, B제품은 9.64%의 감소율을 나타냈다 (표. 29, 그림. 127, 128).

(n=65)

Site	Group	Week	Mean ± S.D (pixels)	p-value†	증감율°(%)
얼굴	A제품	0주	217,789.22 ± 34,719.07	-	-
		4주	218,283.76 ± 30,148.73	0.924	▲0.23
		8주	211,918.76 ± 27,789.98	0.246	▼2.70
		12주	211,059.66 ± 26,202.27	0.170	▼3.09
	B제품	0주	217,839.90 ± 35,581.68	-	-
		4주	203,607.72 ± 37,636.62	0.008**	▼6.53
		8주	189,419.00 ± 29,037.70	0.000***	▼13.05
		12주	189,198.23 ± 23,596.73	0.000***	▼13.15
전박	A제품	0주	247,058.08 ± 21,995.33	-	-
		4주	249,264.32 ± 17,959.49	0.314	▲0.89
		8주	248,021.28 ± 17,181.03	0.713	▲0.39
		12주	242,183.47 ± 26,857.81	0.255	▼1.97
	B제품	0주	241,094.17 ± 30,041.50	-	-
		4주	234,501.60 ± 29,069.31	0.065	▼2.73
		8주	226,351.25 ± 28,318.95	0.002**	▼6.12
		12주	217,843.81 ± 26,352.88	0.000***	▼9.64

† p-value : Paired t-test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, 제품복용 전과 비교하여 유의한 차이가 있음)

°증감율: $(W_x - W_0)/W_0 \times 100$, calculated by mean value

<표 29. 시점별 제품복용 전, 후 피부 각질 변화량>

② 시점별 피부 각질 변화량의 군간 비교 분석

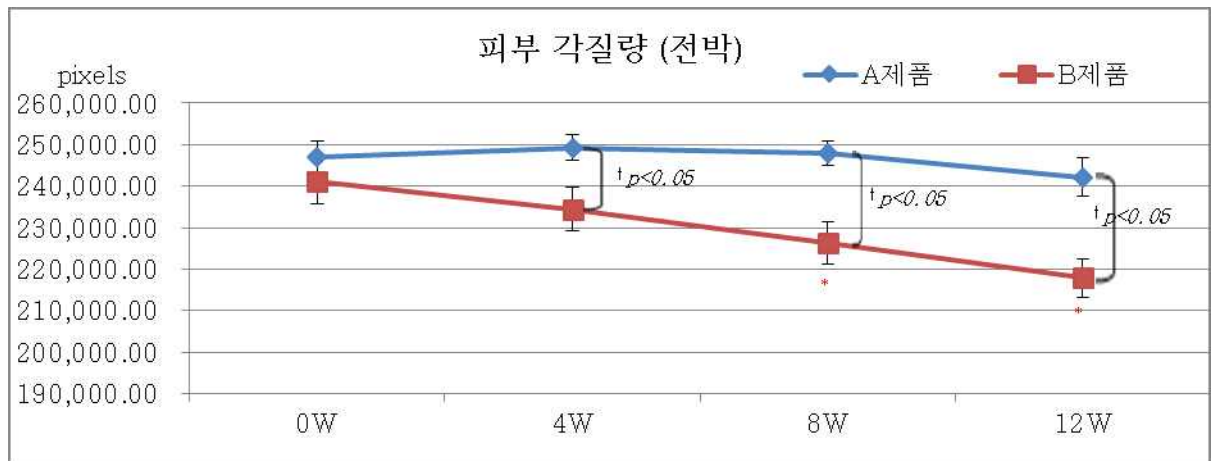
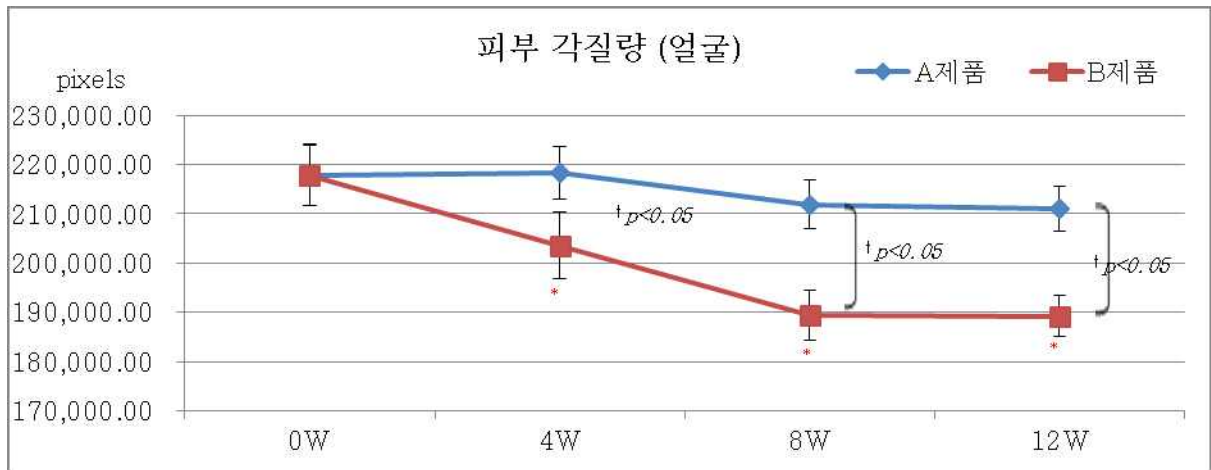
분석결과, 얼굴, 전박 부위 모두 제품복용 4주 후, 8주 후, 12주 후 시점에서 A제품 (대조군)에 비해 B제품(시험군)에서 통계적으로 유의하게 피부 각질량이 감소(개선) 하였다(p<0.05) (표 30, 그림. 127, 128).

(n=65)

Site	Week	Group	ΔMean difference ± Std. Error (pixels)	p-value†
얼굴	4주	A제품	494.54 ± 5,156.39	0.045*
		B제품	-14,232.18 ± 5,009.33	
	8주	A제품	-5,870.46 ± 4,965.86	0.001**
		B제품	-28,420.90 ± 4,053.38	
	12주	A제품	-6,729.57 ± 4,798.75	0.003**
		B제품	-28,641.67 ± 5,095.05	
전박	4주	A제품	2,206.24 ± 2,157.77	0.033*
		B제품	-6,592.56 ± 3,447.19	
	8주	A제품	963.20 ± 2,592.97	0.003**
		B제품	-14,742.92 ± 4,322.69	
	12주	A제품	-4,874.61 ± 4,202.01	0.002**
		B제품	-23,250.35 ± 3,932.10	

† p-value : Independent t-test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, 2개의 그룹간에 유의한 차이가 있음)

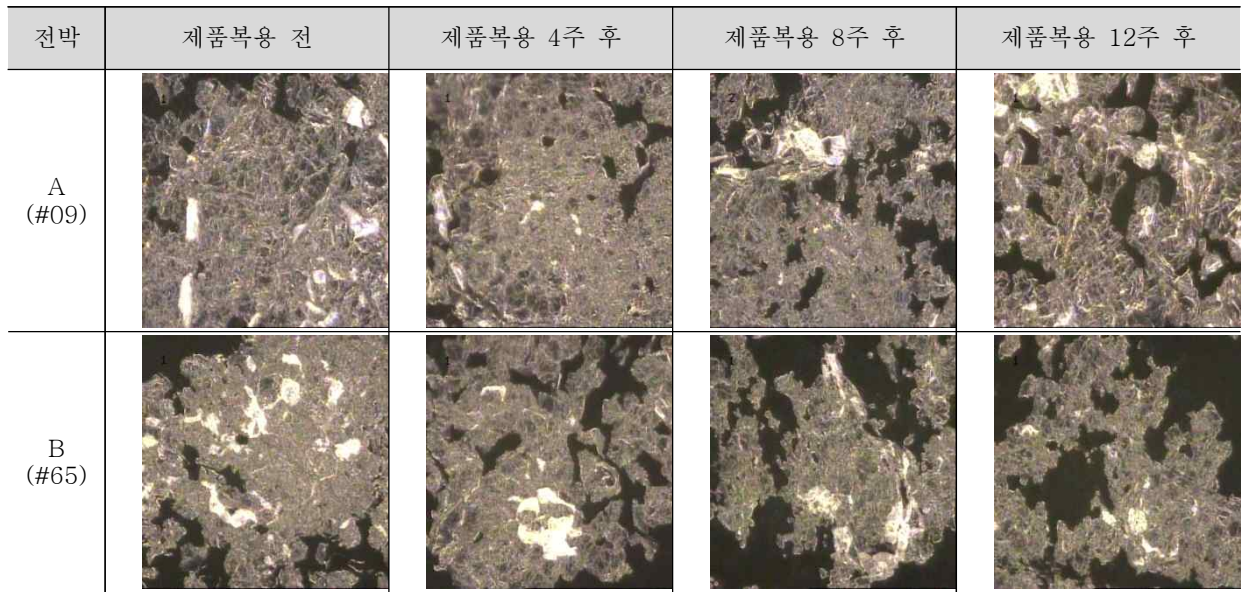
<표 30. 시점별 피부 각질 변화량의 군간 비교>



(Mean±SEM. * $p < 0.05$ vs. before application, † $p < 0.05$ vs. control group)

<그림 127. 시점별 제품복용에 따른 피부 각질량 변화>

얼굴	제품복용 전	제품복용 4주 후	제품복용 8주 후	제품복용 12주 후
A (#16)				
B (#40)				



<그림 128. 제품복용에 따른 피험자의 얼굴, 전박 부위 각질량 변화>

(사) 피부 눈가주름(Replica)

① 시점별 제품복용 전, 후 눈가주름(Replica) 변화량 분석

분석결과, 제품복용 전과 비교 시 A제품(대조군)에서 파라미터들 중 Total Wrinkle Area(주름면적)는 제품복용 4, 8, 12주 후 시점에 Mean Length(평균길이)는 제품복용 12주 후 시점에 유의하게 증가한 반면, No. of Wrinkles(주름개수)와 Wrinkle Depth(주름깊이)가 유의하게 감소(개선)하였다($p < 0.05$). 나머지 파라미터들에서는 A제품(대조군), B제품(시험군) 모두 감소하는 경향은 다소 보이나 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다(표. 31, 그림. 129, 130).

(n=65)

Parameters	Group	Week	MeanS.D	<i>p-value</i> †	증감율
Total wrinkle area (mm ²)	A제품	0주	39.41 ± 4.36	-	-
		4주	41.69 ± 4.59	0.017*	▲5.79
		8주	41.65 ± 6.05	0.018*	▲5.68
		12주	41.60 ± 5.00	0.033*	▲5.56
	B제품	0주	41.01 ± 3.95	-	-
		4주	42.09 ± 4.47	0.230	▲2.66
		8주	42.19 ± 4.21	0.183	▲2.90
		12주	41.60 ± 3.71	0.504	▲1.46
No. of wrinkles	A제품	0주	156.03 ± 32.10	-	-
		4주	153.94 ± 44.39	0.790	▼1.34
		8주	144.85 ± 44.08	0.122	▼7.17
		12주	141.76 ± 37.96	0.024*	▼9.15
	B제품	0주	132.34 ± 33.59	-	-
		4주	132.22 ± 38.27	0.986	▼0.09
		8주	129.06 ± 27.72	0.459	▼2.48
		12주	122.31 ± 29.75	0.098	▼7.58
Parameters	Group	Week	MeanS.D	<i>p-value</i> †	증감율
Total Length	A제품	0주	154.71 ± 31.72	-	-
		4주	150.51 ± 37.64	0.433	▼2.71

(mm)		8주	150.82 ± 32.50	0.461	▼2.51
		12주	156.61 ± 36.90	0.690	▲1.23
	B제품	0주	150.34 ± 32.25	-	-
		4주	143.30 ± 35.74	0.202	▼4.68
		8주	151.57 ± 35.11	0.799	▲0.81
		12주	140.78 ± 30.84	0.056	▼6.36
Mean Length (mm)	A제품	0주	1.01 ± 0.22	-	-
		4주	1.01 ± 0.23	0.949	0.00
		8주	1.10 ± 0.29	0.060	▲8.91
		12주	1.14 ± 0.28	0.005**	▲12.87
	B제품	0주	1.17 ± 0.23	-	-
		4주	1.12 ± 0.23	0.246	▼4.27
		8주	1.18 ± 0.17	0.634	▲0.85
		12주	1.18 ± 0.25	0.728	▲0.85
Wrinkle Depth (um)	A제품	0주	12,145.40 ± 2,422.23	-	-
		4주	11,839.26 ± 3,265.10	0.615	▼2.52
		8주	11,133.14 ± 2,887.92	0.064	▼8.33
		12주	10,968.31 ± 2,613.76	0.020*	▼9.69
	B제품	0주	10,294.49 ± 2,686.07	-	-
		4주	10,272.92 ± 2,872.31	0.968	▼0.21
		8주	9,967.32 ± 2,117.58	0.363	▼3.18
		12주	9,619.13 ± 2,016.94	0.223	▼6.56
Mean Depth (um)	A제품	0주	78.88 ± 12.13	-	-
		4주	77.99 ± 11.56	0.583	▼1.13
		8주	78.89 ± 13.20	0.992	▲0.01
		12주	78.88 ± 12.73	0.997	0.00
	B제품	0주	78.40 ± 10.34	-	-
		4주	78.58 ± 10.83	0.918	▲0.23
		8주	77.88 ± 8.87	0.743	▼0.66
		12주	80.01 ± 11.25	0.371	▲2.05
Max wrinkle depth (um)	A제품	0주	382.69 ± 88.92	-	-
		4주	386.86 ± 88.55	0.855	▲1.09
		8주	396.19 ± 103.76	0.551	▲3.53
		12주	396.30 ± 96.88	0.539	▲3.56
	B제품	0주	398.34 ± 90.29	-	-
		4주	406.73 ± 108.10	0.684	▲2.11
		8주	407.18 ± 69.24	0.599	▲2.22
		12주	383.81 ± 89.58	0.504	▼3.65

† p-value : Paired t-test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, 제품복용 전과 비교하여 유의한 차이가 있음)

°증감율: $(W_x - W_0)/W_0 \times 100$, calculated by mean value

<표 31. 시점별 제품복용 전, 후 눈가주름(Replica) 변화량>

② 시점별 눈가주름(Replica) 변화량의 군간 비교 분석

분석결과, 제품복용 4주 후, 8주 후, 12주 후 시점 모두에서 두 그룹간의 피부 눈가 주름 (Replica) 파라미터들의 통계적 유의한 차이는 없었다(표 32, 그림. 129, 130).

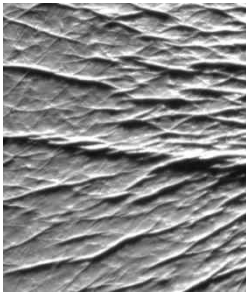
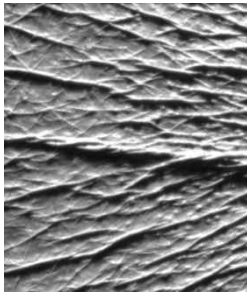
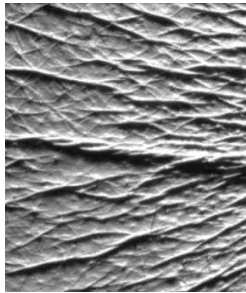
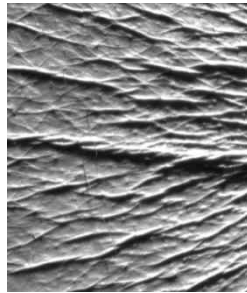
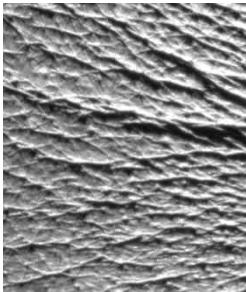
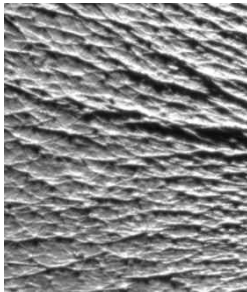
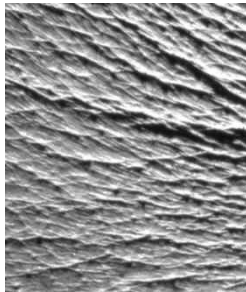
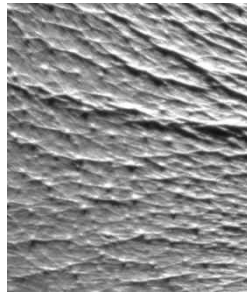
(n=65)

Parameters	Week	Group	ΔMean difference±Std. Error	p-value†
Total	4주	A제품	2.28 ± 0.90	0.346

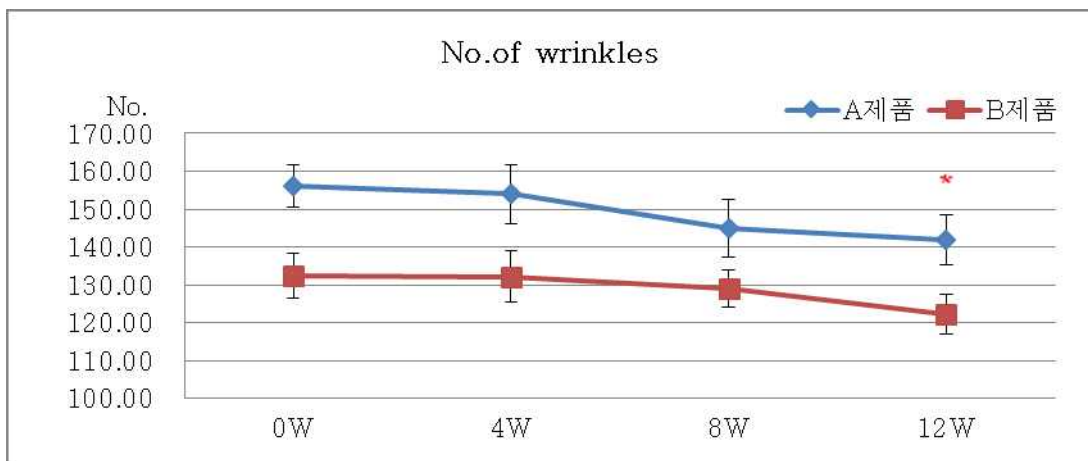
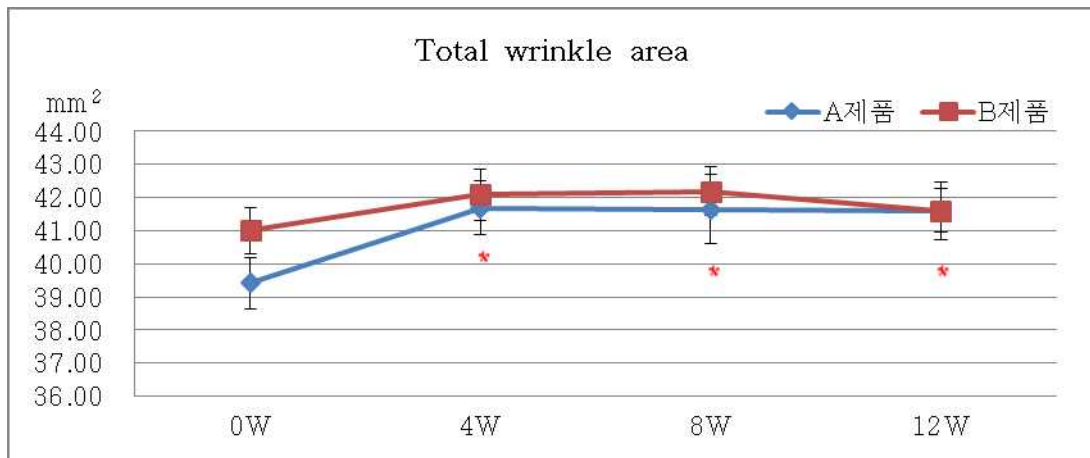
wrinkle area (mm ²)	8주	B제품	1.08 ± 0.88	0.403	
		A제품	2.24 ± 0.90		
	12주	B제품	1.18 ± 0.87	0.235	
		A제품	2.19 ± 0.98		
	No.of wrinkles	4주	A제품	-2.09 ± 7.80	0.854
			B제품	-0.13 ± 7.24	
8주		A제품	-11.18 ± 7.04	0.345	
		B제품	-3.28 ± 4.38		
12주		A제품	-14.27 ± 6.01	0.616	
		B제품	-10.03 ± 5.87		
Total Length (mm)	4주	A제품	-4.20 ± 5.29	0.708	
		B제품	-7.04 ± 5.41		
	8주	A제품	-3.88 ± 5.21	0.473	
		B제품	1.23 ± 4.78		
	12주	A제품	1.91 ± 4.74	0.094	
		B제품	-9.56 ± 4.81		
Mean Length (mm)	4주	A제품	-0.00 ± 0.04	0.402	
		B제품	-0.05 ± 0.04		
	8주	A제품	0.08 ± 0.04	0.189	
		B제품	0.01 ± 0.03		
	12주	A제품	0.13 ± 0.04	0.098	
		B제품	0.02 ± 0.05		
Wrinkle Depth (um)	4주	A제품	-306.15 ± 601.99	0.726	
		B제품	-21.57 ± 537.77		
	8주	A제품	-1,012.27 ± 528.15	0.286	
		B제품	-327.18 ± 354.23		
	12주	A제품	-1,177.10 ± 478.81	0.490	
		B제품	-675.36 ± 542.78		
Mean Depth (um)	4주	A제품	-0.89 ± 1.60	0.649	
		B제품	0.17 ± 1.68		
	8주	A제품	0.02 ± 1.61	0.812	
		B제품	-0.52 ± 1.57		
	12주	A제품	0.01 ± 1.45	0.486	
Parameters	Week	Group	ΔMean difference±Std. Error	<i>p-value</i> [†]	
Max wrinkle depth (um)	4주	B제품	1.61 ± 1.77	0.890	
		A제품	4.17 ± 22.55		
	8주	A제품	13.50 ± 22.39	0.869	
		B제품	8.84 ± 16.63		
	12주	A제품	13.61 ± 21.91	0.363	
		B제품	-14.53 ± 21.49		

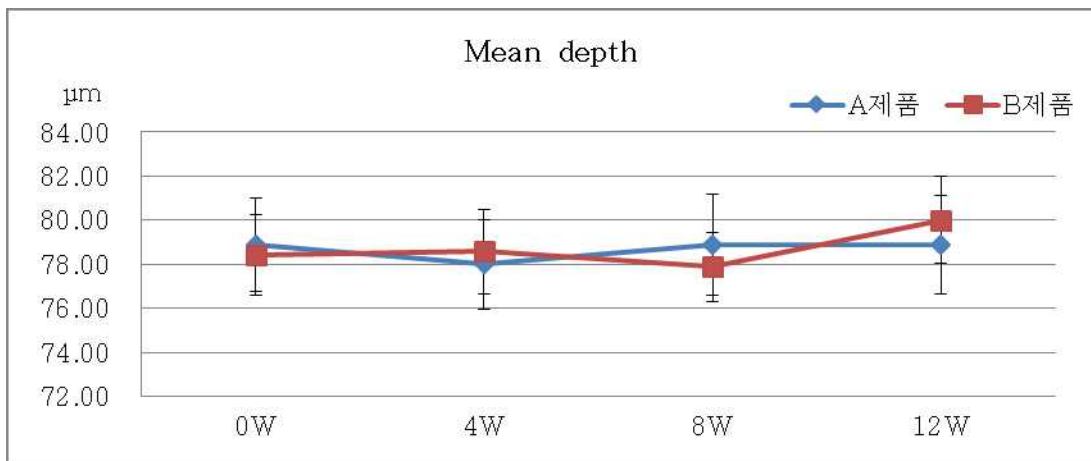
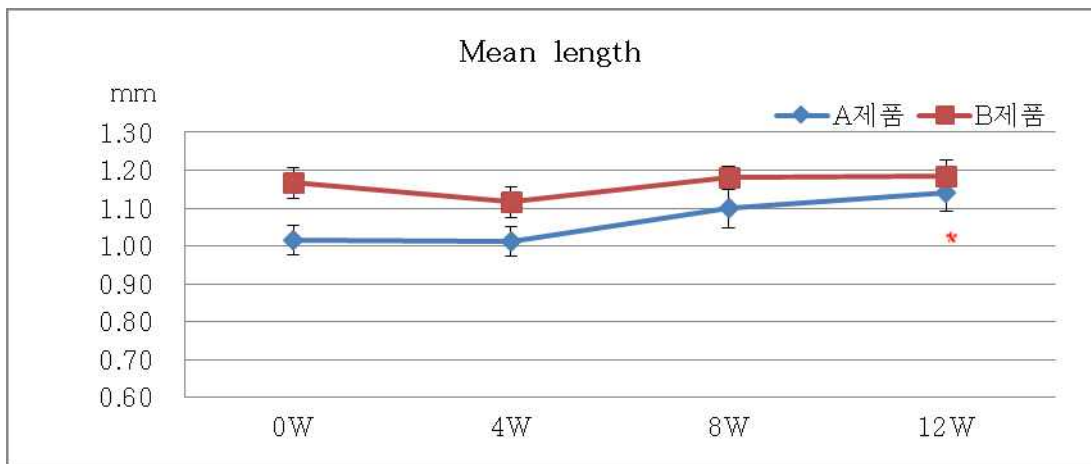
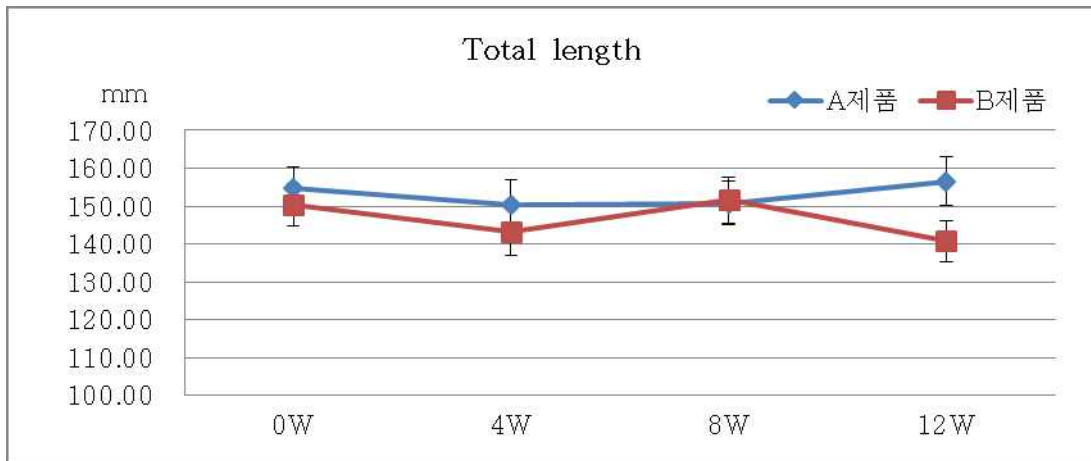
[†] *p-value* : Independent *t*-test (**p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001, 2개의 그룹간에 유의한 차이가 있음)

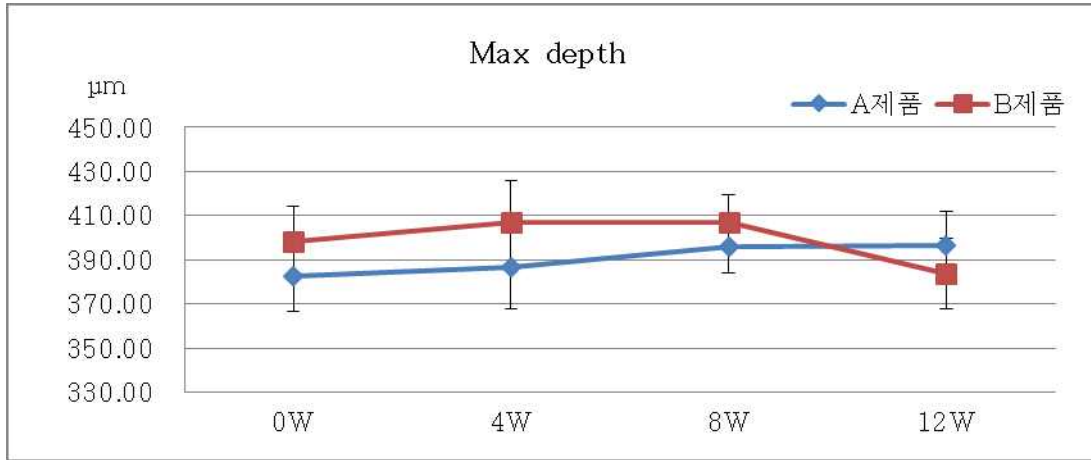
<표 32. 시점별 눈가주름(Replica) 변화량의 구간 비교>

	제품복용 전	제품복용 4주 후	제품복용 8주 후	제품복용 12주 후
A (#45)				
B (#49)				

<그림 129. 제품복용에 따른 피험자의 눈가 피부주름(Replica) 정도 변화>







(Mean±SEM. * $p < 0.05$ vs. before application, † $p < 0.05$ vs. control group)

<그림 130. 시점별 제품복용에 따른 눈가주름(Replica) 변화 >

(아) 피부색 밝기(L*value)

① 시점별 제품복용 전, 후 피부색 밝기(L*value) 변화량 분석

분석결과, 제품복용 전과 비교 시, A제품(대조군)은 제품복용 12주 후 시점에 색소침착 부위에서, B제품(시험군)은 모든 시점(4주 후, 8주 후, 12주 후)에 뺨과 색소침착 부위에서 통계적으로 유의하게 피부색 밝기(L*value)가 증가(개선) 하였다($p < 0.05$). 피부색 밝기 최대 증가율은 뺨 부위에서 B제품(시험군)이 0.59%, 색소침착 부위에서 A제품이 0.19%, B제품이 0.62%로 나타났다 (표 33, 그림. 131, 132).

Site	Group	Week	Mean ± S.D (L*value)	p-value†	증감율°(%)
뺨	A제품	0주	63.75 ± 2.04	-	-
		4주	63.72 ± 2.04	0.431	▼0.05
		8주	63.65 ± 2.04	0.089	▼0.16
		12주	63.69 ± 2.02	0.511	▼0.09
	B제품	0주	63.23 ± 1.87	-	-
		4주	63.35 ± 1.93	0.001**	▲0.19
		8주	63.45 ± 1.95	0.000***	▲0.35
		12주	63.60 ± 1.93	0.000***	▲0.59
색소 침착	A제품	0주	59.36 ± 2.21	-	-
		4주	59.39 ± 2.26	0.510	▲0.05
		8주	59.35 ± 2.25	0.799	▼0.02
		12주	59.47 ± 2.19	0.047*	▲0.19
	B제품	0주	58.49 ± 2.26	-	-
		4주	58.71 ± 2.25	0.001**	▲0.38
		8주	58.73 ± 2.29	0.001**	▲0.41
		12주	58.85 ± 2.22	0.000***	▲0.62

Table 20. (n=65)

† p-value : Paired t-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, 제품복용 전과 비교하여 유의한 차이가 있음)

°증감율: $(W_x - W_0)/W_0 \times 100$, calculated by mean value

<표 33. 시점별 제품복용 전, 후 피부색 밝기(L*value) 변화량>

② 시점별 군간 피부색 밝기(L*value) 변화량 분석









분석결과, 뺨과 색소침착 부위 모두에서 모든 시점(4주 후, 8주 후, 12주 후)에 A제품(대조군)에 비해 B제품(시험군)에서 통계적으로 유의하게 피부색 밝기(L*value)가 증가하였다 (p<0.05) (표. 34, 그림. 133, 134).

(n=65)

Site	Week	Group	ΔMean difference±Std. Error (L*value)	p-value†
뺨	4주	A제품	-0.02 ± 0.03	0.001**
		B제품	0.13 ± 0.03	
	8주	A제품	-0.10 ± 0.06	0.000***
		B제품	0.22 ± 0.05	
	12주	A제품	-0.06 ± 0.08	0.001**
		B제품	0.37 ± 0.08	
색소 침착	4주	A제품	0.03 ± 0.05	0.016*
		B제품	0.22 ± 0.06	
	8주	A제품	-0.01 ± 0.04	0.002**
		B제품	0.25 ± 0.07	
	12주	A제품	0.11 ± 0.06	0.015*
		B제품	0.35 ± 0.08	

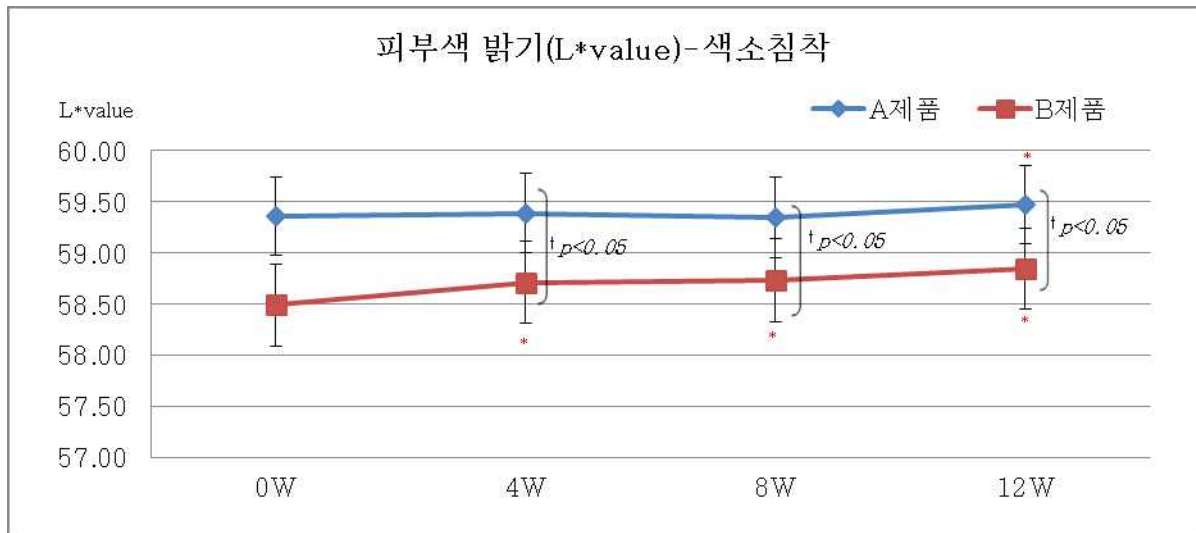
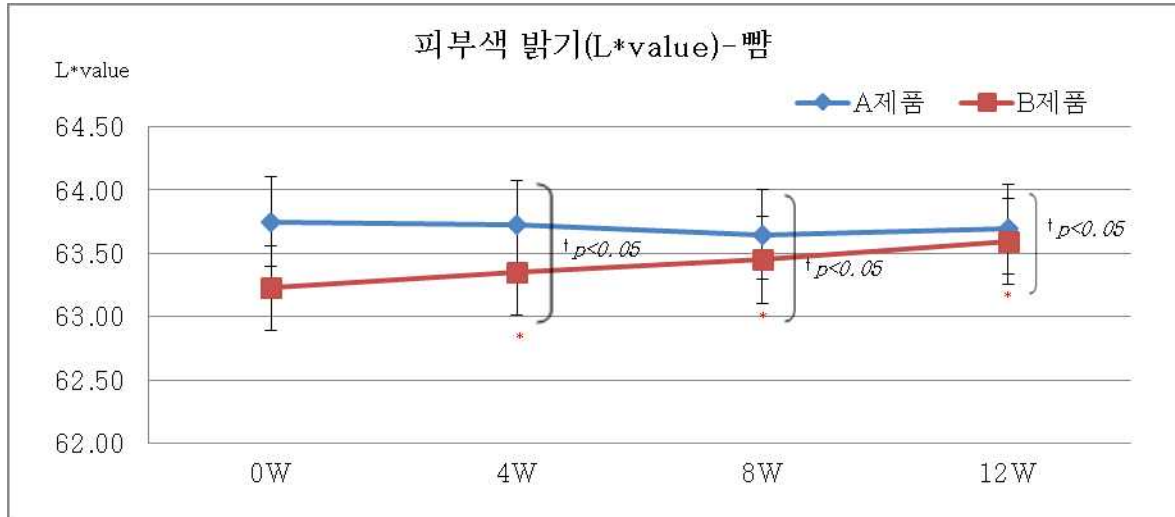
† p-value : Independent t-test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, 2개의 그룹간에 유의한 차이가 있음)

<표 34. 시점별 피부색 밝기(L*value) 변화량의 군간 비교>

얼굴	제품복용 전	제품복용 4주 후	제품복용 8주 후	제품복용 12주 후
A (#17)				
B (#60)				



<그림 131. 제품복용에 따른 피험자의 피부색 밝기 정도 변화(VISIA-UV mode)>



(Mean±SEM. * $p < 0.05$ vs. before application, † $p < 0.05$ vs. control group)

<그림. 132. 시점별 제품복용에 따른 피부색 밝기(L*value) 변화>

(자) 피부 리프팅

① 시점별 제품복용 전, 후 피부 리프팅 변화량 분석

분석결과, 제품복용 전과 비교 시 A제품(대조군)은 제품복용 4주 후, 12주 후 시점에서, B제품(시험군)은 8주 후, 12주 후 시점에서 등고선의 수직거리가 통계적으로 유의하게 감소(개

선)하였고, 각도의 평균은 B제품(시험군)이 모든 시점(4주 후, 8주 후, 12주 후)에서 통계적으로 유의하게 감소(개선)하였다($p < 0.05$). 수직거리의 최대 감소율은 A제품이 3.85%, B제품이 6.13%, 각도의 최대 감소율은 A제품이 3.76%, B제품이 4.29%로 나타났다(표 35, 그림. 133, 134).

(n=65)

Parameters	Group	Week	Mean \pm S.D	<i>p</i> -value†	증감율°(%)
Distance (pixel)	A제품	0주	239.45 \pm 41.09	-	-
		4주	231.76 \pm 36.56	0.017*	▼3.21
		8주	235.58 \pm 37.47	0.282	▼1.62
		12주	230.24 \pm 41.18	0.018*	▼3.85
	B제품	0주	227.31 \pm 41.75	-	-
		4주	226.56 \pm 43.23	0.830	▼0.33
		8주	219.69 \pm 41.90	0.005**	▼3.35
		12주	213.38 \pm 42.14	0.000***	▼6.13
Angle (°)	A제품	0주	21.56 \pm 3.23	-	-
		4주	21.07 \pm 3.08	0.239	▼2.27
		8주	21.48 \pm 3.13	0.858	▼0.37
		12주	20.75 \pm 2.95	0.078	▼3.76
	B제품	0주	20.96 \pm 2.97	-	-
		4주	20.39 \pm 2.80	0.034*	▼2.72
		8주	20.06 \pm 2.55	0.015*	▼4.29
		12주	20.16 \pm 2.82	0.011*	▼3.82

† *p*-value : Paired *t*-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, 제품복용 전과 비교하여 유의한 차이가 있음)

°증감율: $(W_x - W_0)/W_0 \times 100$, calculated by mean value

<표 35. 시점별 제품복용 전, 후 피부 리프팅 변화량>

② 시점별 군간 피부 리프팅 변화량 분석

분석결과, 모든 시점(4주 후, 8주 후, 12주 후)에서 등고선의 수직거리, 각도의 평균의 군간 유의차는 보이지 않았다(Table 36, Fig. 135, 136).









(n=65)

Parameters	Week	Group	Δ Mean difference \pm Std. Error	<i>p</i> -value†
Distance (pixel)	4주	A제품	-7.70 \pm 3.04	0.136
		B제품	-0.75 \pm 3.46	
	8주	A제품	-3.88 \pm 3.54	0.392
		B제품	-7.63 \pm 2.51	
	12주	A제품	-9.21 \pm 3.70	0.309
		B제품	-13.94 \pm 2.70	
Angle (°)	4주	A제품	-0.49 \pm 0.41	0.865
		B제품	-0.57 \pm 0.26	
	8주	A제품	-0.08 \pm 0.45	0.154
		B제품	-0.91 \pm 0.35	
	12주	A제품	-0.80 \pm 0.44	0.993
		B제품	-0.80 \pm 0.30	

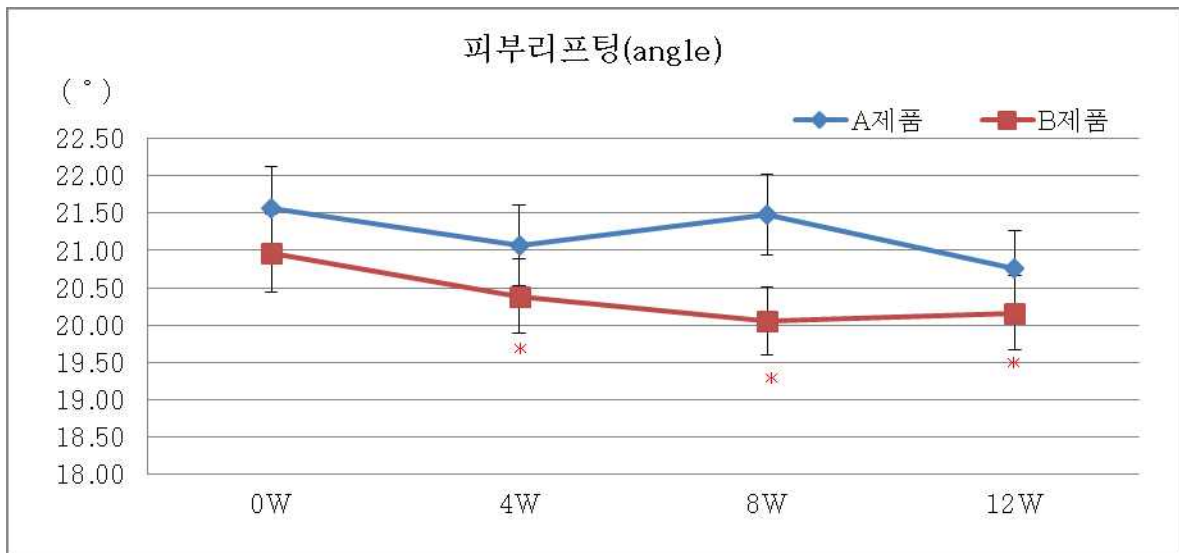
† *p*-value : Independent *t*-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, 2개의 그룹간에 유의한 차이가

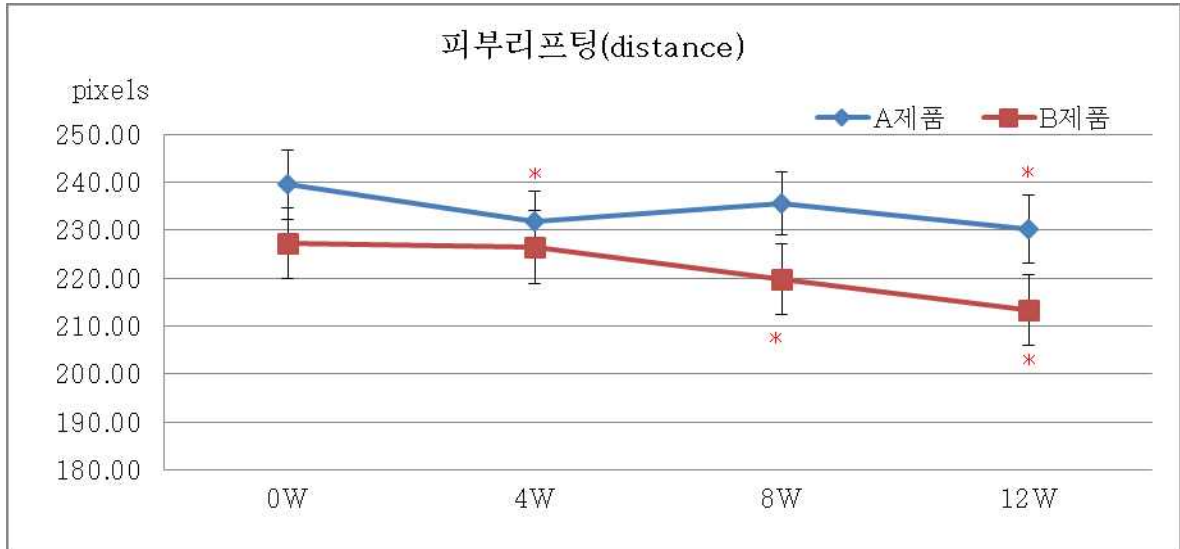
있음)

<표 36. 시점별 피부 리프팅 변화량의 구간비교>

얼굴	제품복용 전	제품복용 4주 후	제품복용 8주 후	제품복용 12주 후
A (#08)				
B (#07)				

<그림 133. 제품복용에 따른 피험자의 피부 리프팅 변화(Moire)>





(Mean±SEM. * $p<0.05$ vs. before application, † $p<0.05$ vs. control group)

<그림 134. 시점별 제품복용에 따른 피부 리프팅 변화>

(차) 혈액분석

① 시점별 제품복용 전, 후 혈액변화 분석

분석결과, 제품복용 전과 비교 시 제품복용 12후 Albumin, Creatinine, Hemoglobin 항목은 A제품(대조군)에서, T.Protein, Albumin, T.Bil, 혈당, Creatinine, Hemoglobin 항목은 B제품(시험군)에서 유의한 차이가 있었으나 파라미터들의 평균값은 모두 참고치 범위 내에 있었다($p<0.05$) (표 37).

(n=65)

Group	Items	Week	MeanS.D	p-value†
A제품	T.Protein	-2주	7.10 ± 0.42	-
		12주	7.23 ± 0.41	0.131
	Albumin	-2주	4.46 ± 0.17	-
		12주	4.32 ± 0.16	0.000***
Group	Items	Week	MeanS.D	p-value†
A제품	T.Bil	-2주	0.82 ± 0.25	-
		12주	0.79 ± 0.25	0.530
	SGOT	-2주	19.79 ± 3.16	-
		12주	19.55 ± 4.21	0.774
	SGPT	-2주	14.48 ± 4.60	-
		12주	16.30 ± 5.87	0.136
	T.Chol	-2주	193.55 ± 26.73	-
		12주	188.12 ± 25.07	0.195
	Triglyceride	-2주	71.91 ± 22.39	-
		12주	69.00 ± 23.60	0.594
	혈당(식전)	-2주	94.21 ± 6.07	-
		12주	92.48 ± 7.62	0.178
	BUN (요소질소)	-2주	13.20 ± 3.20	-
		12주	13.39 ± 2.12	0.701
Creatinine	-2주	0.69 ± 0.12	-	

		12주	0.73 ± 0.08	0.040*
	Hemoglobin	-2주	13.38 ± 1.00	
		12주	12.91 ± 0.91	0.000***
B제품	T.Protein	-2주	7.08 ± 0.42	-
		12주	7.36 ± 0.49	0.002**
	Albumin	-2주	4.47 ± 0.18	-
		12주	4.37 ± 0.21	0.013*
	T.Bil	-2주	0.84 ± 0.27	-
		12주	0.75 ± 0.31	0.031*
	SGOT	-2주	20.50 ± 3.53	-
		12주	19.81 ± 4.03	0.296
	SGPT	-2주	13.75 ± 3.77	-
		12주	14.31 ± 4.92	0.340
	T.Chol	-2주	194.34 ± 26.43	-
		12주	189.78 ± 25.53	0.145
	Triglyceride	-2주	74.38 ± 29.90	
		12주	66.44 ± 26.76	0.124
	혈당(식전)	-2주	96.16 ± 7.79	-
		12주	93.56 ± 6.67	0.046*
	BUN(요소질소)	-2주	12.57 ± 2.91	-
	BUN(요소질소)	12주	12.66 ± 3.17	0.872
Creatinine	-2주	0.70 ± 0.09	-	
	12주	0.75 ± 0.08	0.006**	
Hemoglobin	-2주	13.24 ± 0.93	-	
	12주	12.84 ± 0.93	0.001**	

† *p*-value: Paired *t*-test (**p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001, 제품복용 전과 비교하여 유의한 차이가 있음),

<표 37. 제품복용 전, 후 혈액변화>

② 시점별 혈액 분석 구간 비교

분석결과, 구간 비교 시 Creatinine 파라미터에서 제품복용 12주 후 시점에서 통계 적으로 유의한 차이(*p*<0.05)를 보였으며 나머지 모든 파라미터에서는 유의한 차이를 보이지 않았다 (표 38).

(n=65)

Items	Group	ΔMean difference±Std. Error	<i>p</i> -value†
T.Protein	A제품	0.12 ± 0.08	0.164
	B제품	0.29 ± 0.08	
Albumin	A제품	-0.13 ± 0.03	0.445
	B제품	-0.10 ± 0.04	
T.Bil	A제품	-0.03 ± 0.04	0.293
	B제품	-0.09 ± 0.04	
SGOT	A제품	-0.24 ± 0.84	0.676
	B제품	-0.69 ± 0.65	
SGPT	A제품	1.82 ± 1.19	0.347
	B제품	0.56 ± 0.58	
T.Chol	A제품	-5.42 ± 4.10	0.867
	B제품	-4.56 ± 3.05	

Triglyceride	A제품	-2.91 ± 5.40	0.498
	B제품	-7.94 ± 5.02	
혈당(식전)	A제품	-1.73 ± 1.25	0.626
	B제품	-2.59 ± 1.25	
BUN (요소질소)	A제품	0.19 ± 0.49	0.893
	B제품	0.09 ± 0.56	
Creatinine	A제품	0.69 ± 0.02	0.000***
	B제품	0.05 ± 0.02	
Hemoglobin	A제품	-0.46 ± 0.10	0.666
	B제품	-0.40 ± 0.11	

* *p*-value : Independent *t*-test (**p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001, 2개의 그룹간에 유의한 차이가 있음)

<표 38. 제품복용에 따른 혈액분석 구간 비교>

(카) 식이조사 및 체중조사

① 시점별 식이조사 및 체중조사 변화 분석

분석결과, 제품복용 전과 비교 시 제품복용 12주 후 시점 A제품(대조군)에서 체중, BMI지수가 유의하게 감소(*p*<0.05)한 것을 제외하고, B제품(시험군)에서는 모든 항목에서 제품복용 4주 후, 8주 후, 12주 시점에서 유의한 차이가 없었다(표 39).

(n=65)

Items	Group	Week	MeanS.D	<i>p</i> -value†
식이조사	A제품	0주	2.00 ± 0.06	-
		4주	1.99 ± 0.07	0.888
		8주	1.99 ± 0.04	0.392
		12주	2.00 ± 0.05	0.870
	B제품	0주	2.01 ± 0.06	-
		4주	1.99 ± 0.05	0.228
		8주	1.99 ± 0.04	0.080
		12주	2.00 ± 0.03	0.508
체중	A제품	0주	56.96 ± 5.39	-
		4주	56.86 ± 5.57	0.595
		8주	56.74 ± 5.54	0.311
		12주	56.49 ± 5.22	0.005**
	B제품	0주	55.89 ± 6.26	-
		4주	55.83 ± 6.72	0.733
		8주	55.84 ± 6.70	0.755
		12주	55.71 ± 6.49	0.239
BMI지수	A제품	0주	21.99 ± 1.70	-
		4주	21.92 ± 1.76	0.458
		8주	21.83 ± 1.70	0.076
		12주	21.75 ± 1.60	0.002**
	B제품	0주	21.43 ± 1.95	-
		4주	21.45 ± 2.18	0.872
		8주	21.38 ± 2.18	0.440
		12주	21.39 ± 2.08	0.474

† *p*-value: Paired *t*-test (**p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001, 제품복용 전과 비교하여 유의한 차이가 있음)

<표 39. 시점별 식이조사 및 체중조사 변화량>

② 시점별 군간 식이조사 및 체중조사 변화 분석

분석결과, 제품복용 12주 후 시점에서 BMI지수에서 군간의 유의한 차이(p<0.05)를 보였으며 나머지 식이조사, 체중에는 군간 유의한 차이를 보이지 않았다(표 40).

(n=65)

Items	Week	Group	ΔMean difference±Std. Error	p-value†
식이조사	4주	A제품	-0.00 ± 0.01	0.448
		B제품	-0.02 ± 0.01	
	8주	A제품	-0.01 ± 0.01	0.384
		B제품	-0.02 ± 0.01	
	12주	A제품	-0.00 ± 0.01	0.696
		B제품	-0.01 ± 0.01	
체중	4주	A제품	-0.10 ± 0.19	0.886
		B제품	-0.06 ± 0.18	
Items	Week	Group	ΔMean difference±Std. Error	p-value†
체중	8주	A제품	-0.22 ± 0.21	0.558
		B제품	-0.06 ± 0.18	
	12주	A제품	-0.47 ± 0.16	0.198
		B제품	-0.18 ± 0.15	
BMI지수	4주	A제품	-0.07 ± 0.09	0.504
		B제품	0.01 ± 0.08	
	8주	A제품	-0.16 ± 0.09	0.371
		B제품	-0.06 ± 0.07	
	12주	A제품	-0.24 ± 0.07	0.041*
		B제품	-0.04 ± 0.06	

† p-value : Independent t-test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, 2개의 그룹간에 유의한 차이가 있음)

<표 40. 시점별 군간 식이조사 및 체중조사 변화량>

(타) 설문평가

① 효능에 관한 설문평가

시험제품 복용 4주 후, 복용 8주 후, 복용 12주 후에 피험자가 작성한 답변을 토대로 시험제품의 효능에 대한 만족도를 평가하였다. 평가결과는 다음과 같다(표 41, 그림 135).

(n=65)

Items	Week	A 제품 (n=33)		B 제품 (n=32)	
		Positive responses (N)	Satisfaction (%)	Positive responses (N)	Satisfaction (%)
피부보습개선정도†	4 주	6	18.18	7	21.88

	8 주	20	60.61	11	34.38
	12 주	19	57.58	13	40.63
피부색개선정도†	4 주	7	21.21	5	15.63
	8 주	14	42.42	8	25.00
	12 주	12	36.36	9	28.13
피부주름개선정도†	4 주	2	6.06	7	21.88
	8 주	6	18.18	8	25.00
	12 주	11	33.33	11	34.38
1.촉촉해짐	4 주	16	48.48	13	40.63
	8 주	24	72.73	21	65.63
	12 주	21	63.64	22	68.75
2.부드러워짐	4 주	22	66.67	23	71.88
	8 주	25	75.76	23	71.88
	12 주	26	78.79	28	87.50
3.당김이 줄어들음	4 주	16	48.48	16	50.00
	8 주	21	63.64	20	62.50
	12 주	18	54.55	20	62.50
Items	Week	A 제품 (n=33)		B 제품 (n=32)	
		Positive responses (N)	Satisfaction (%)	Positive responses (N)	Satisfaction (%)
4.각질이 줄어들음	4 주	12	36.36	13	40.63
	8 주	16	48.48	19	59.38
	12 주	17	51.52	16	50.00
5.겉이 정돈됨	4 주	12	36.36	15	46.88
	8 주	15	45.45	20	62.50
	12 주	20	60.61	19	59.38
6.치짐이 줄어들음	4 주	6	18.18	11	34.38
	8 주	11	33.33	13	40.63
	12 주	10	30.30	13	40.63
7.피부 톤 밝아짐	4 주	14	42.42	14	43.75
	8 주	19	57.58	13	40.63
	12 주	17	51.52	17	53.13
8.피부가 건강해짐	4 주	15	45.45	16	50.00
	8 주	19	57.58	17	53.13
	12 주	22	66.67	18	56.25
9.잔주름 감소	4 주	7	21.21	8	25.00
	8 주	10	30.30	9	28.13
	12 주	11	33.33	12	37.50

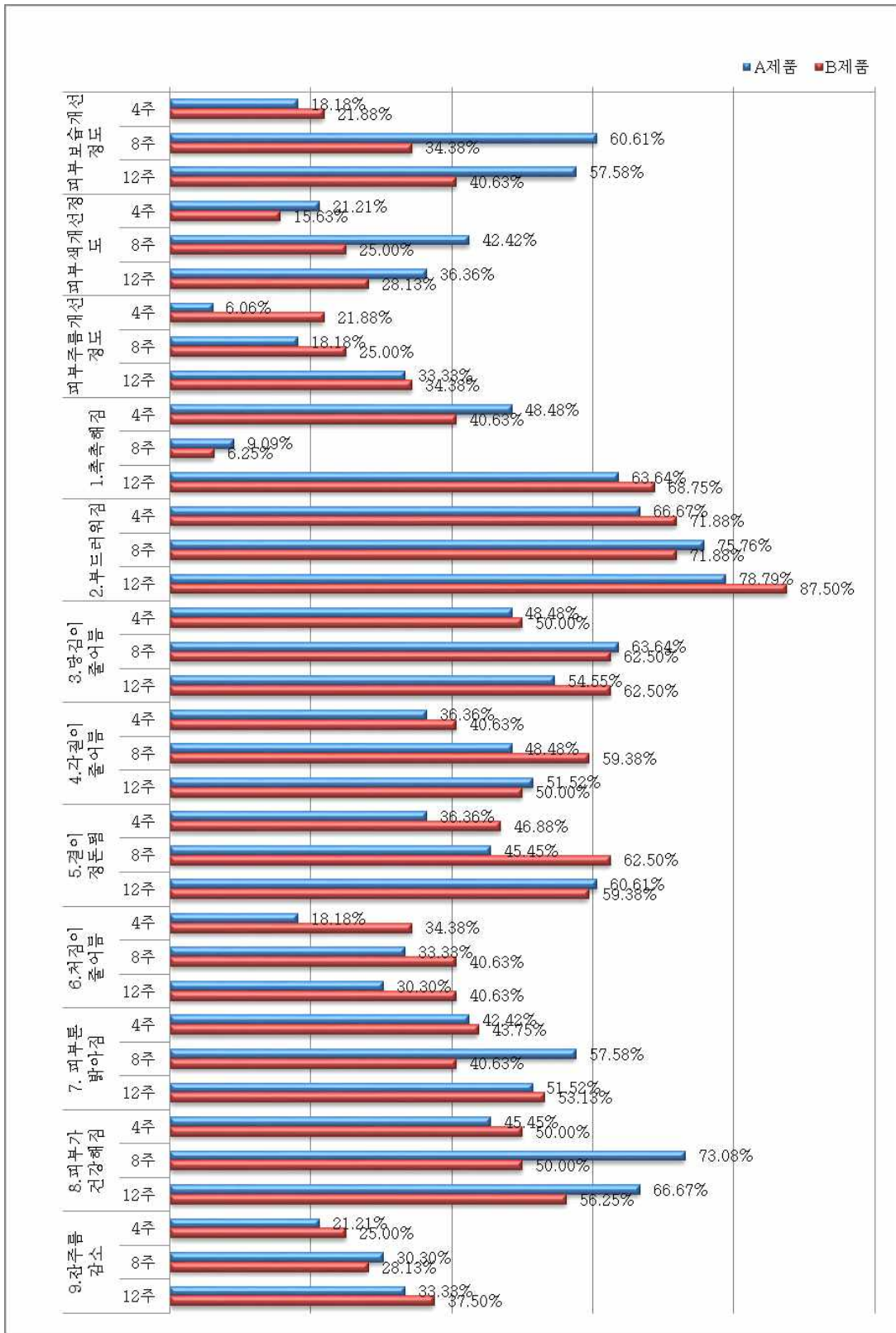
㉠ 설문척도* : 0,변화없음/ 1,미미한 변화는 느껴지나 모르겠음/ 2,약간 개선됨을 느낌/ 3,개선됨을 느낌/ 4,매우 개선되었음.

-긍정적으로 답변한 피험자(%): 2~4

㉔ 설문척도: 1.아주 그렇지 않다/2.그렇지 않다/3.그렇지 않은 것 같다/4.그런 것 같다/5.그렇다 /6.아주 그렇다.

-긍정적으로 답변한 피험자(%): 4~6

<표 41. 시점별 효능에 관한 설문평가 결과>



<그림 135. 제품복용 4주 후, 8주 후, 12주 후 효능평가 결과(긍정응답수%)>

② 제품 복용성 설문 평가

시험제품 복용 12주 후에 피험자가 작성한 답변을 토대로 시험제품의 복용에 관한 만족도를 평가하였다. 평가결과는 다음과 같다(표. 42, 그림. 136).

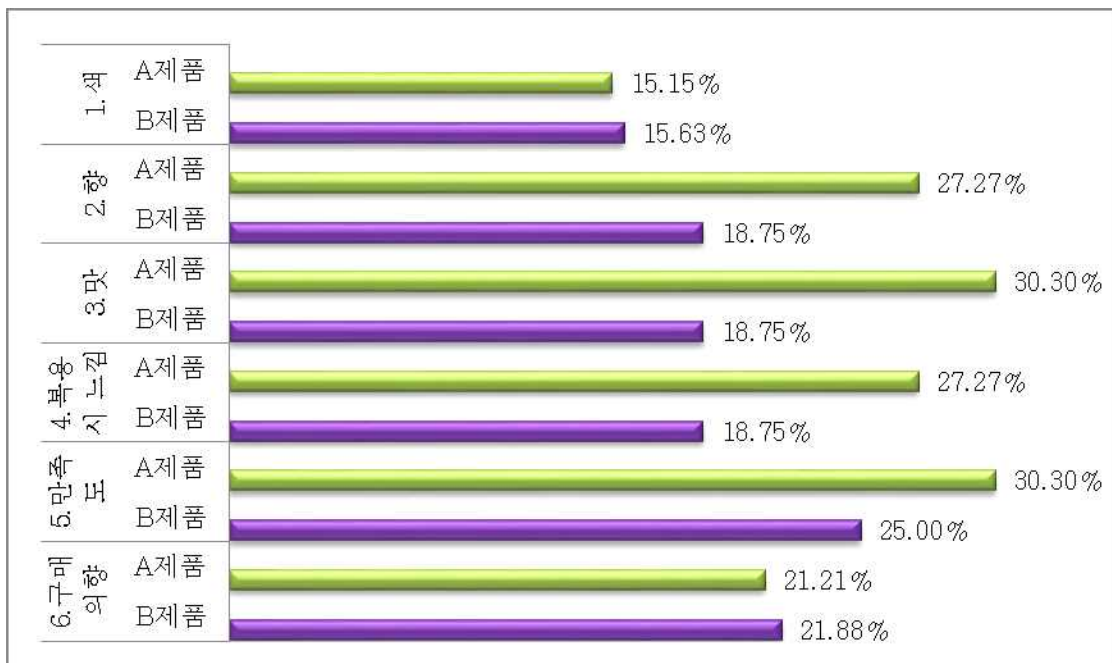
(n=65)

Items	A 제품 (n=33)		B 제품 (n=32)	
	Positive responses (N)	Satisfaction (%)	Positive responses (N)	Satisfaction (%)
1.제품의 색은 어떻습니까?	5	15.15	5	15.63
2.제품의 향은 어떻습니까?	9	27.27	6	18.75
1.제품의 맛은 어떻습니까?	10	30.30	6	18.75
4.제품의 복용 시 느낌이 어떻습니까?	9	27.27	6	18.75
5.전체적으로 제품에 대해 만족하십니까?	10	30.30	8	25.00
6.제품이 출시되면 구매의향이 있으십니까?	7	21.21	7	21.88

㉠ 설문척도: 1.전혀 좋지 않다/2.좋지 않은 편이다/3.보통이다/4.좋은 편이다/5.매우 좋다

㉡ 긍정적으로 답변한 피험자(%): 4~5

<표 42. 제품사용 후 사용성에 관한 설문>



<그림 136. 제품 사용성에 관한 설문평가 결과(긍정응답수%)>

(파) 안전성 평가

본 시험기간 동안 모든 피험자에게서 피부, 전신적 증상에 이상반응이 관찰되지 않았다 (표 43).

(n=65)

Symptoms		A제품 (n=33)			B제품 (n=32)		
		4W	8W	12W	4W	8W	12W
피부	가려움	0	0	0	0	0	0
	찌르는듯아픔	0	0	0	0	0	0
	근질거림	0	0	0	0	0	0
	화끈거림	0	0	0	0	0	0
	따끔거림	0	0	0	0	0	0
	뻣뻣함	0	0	0	0	0	0
	당김	0	0	0	0	0	0
	홍반	0	0	0	0	0	0
	부종	0	0	0	0	0	0
	각질	0	0	0	0	0	0
	뾰드락지,좁쌀	0	0	0	0	0	0
전신	두통	0	0	0	0	0	0
	어지러움	0	0	0	0	0	0
	발열	0	0	0	0	0	0
	식욕결핍	0	0	0	0	0	0
	메스꺼움	0	0	0	0	0	0
	구토	0	0	0	0	0	0
	소화불량	0	0	0	0	0	0
	변비	0	0	0	0	0	0
	설사	0	0	0	0	0	0
이상반응자 수 (계)		0	0	0	0	0	0

<표 43. 안전성 평가: 피부 및 전신적 이상반응>

(5) 결론

(가) 육안평가

① 피부색

군간 비교 시, 제품복용 12주 후 시점에서 A제품에 비해 B제품에서 통계적으로 유의하게 피부색 육안평가 점수가 감소(개선)하였다($p < 0.05$).

② 눈가주름

군간 비교 시, 제품복용 4주 후, 8주 후, 12주 후 시점에서 그룹 간 눈가주름 육안평가 점수의 통계적 유의차는 없었다.

(나) 기기평가

① 피부 수분량

군간 비교 시, 제품복용 4주 후, 8주 후, 12주 후 시점에서 얼굴, 전박 부위 모두 A제품에 비해 B제품에서 통계적으로 유의하게 피부 수분량이 증가(개선)하였다($p < 0.05$).

② 경피수분손실량(TEWL)

군간 비교 시, 제품복용 12주 후 시점에 전박 부위에서 A제품에 비해 B제품에서 통계적으로 유의하게 TEWL이 감소(개선)하였다($p < 0.05$).

③ 피부 각질량

군간 비교 시, 제품복용 4주 후, 8주 후, 12주 후 시점에서 얼굴, 전박 부위 모두 A제품에 비해 B제품에서 통계적으로 유의하게 피부 각질량이 감소(개선)하였다($p < 0.05$).

④ 눈가주름(Replica)

군간 비교 시, 제품복용 4주 후, 8주 후, 12주 후 시점 모두에서 두 그룹간의 피부 눈가주름(Replica) 파라미터들의 통계적 유의한 차이는 없었다.

⑤ 피부색 밝기(L*value)

군간 비교 시, 뺨과 색소침착 부위 모두에서 모든 시점(제품 복용 4주 후, 8주 후, 12주 후)에 A제품에 비해 B제품에서 통계적으로 유의하게 피부색 밝기(L*value)가 증가(개선)하였다($p < 0.05$).

⑥ 피부 리프팅(Moire)

군간 비교 시, 모든 시점에서 등고선의 수직거리, 각도의 평균의 군간 유의차는 보이지 않았다.

⑦ 혈액분석

군간 비교 시, Creatinine이 제품복용 12주 후 시점에서 A제품이 B제품에 비해 유의하게 증가($p < 0.05$)하였으나 나머지 모든 파라미터에서는 유의한 차이는 보이지 않았다.

⑧ 식이조사 및 체중

군간 비교 시, 제품복용 12주 후 시점에서 BMI지수에서 군간의 유의한 차이 ($p < 0.05$)를 보였으며 나머지 식이조사, 체중에는 군간 유의한 차이를 보이지 않았다.

(다) 설문 평가 결과

① 효능에 관한 설문 분석결과, 대부분의 항목에서 A제품(대조군), B제품(시험군) 모두 제품 복용 경과 시 피부개선에 관한 만족도가 다소 증가하는 경향을 보였다. 특히 '부드러워짐' 항목은 복용 12주 후 시점에서 B제품에서 피험자들의 85% 이상이 피부 개선에 대한 만족도를 보였으며 A제품에 비해 10%정도 높은 만족도를 보였다.

② 제품 복용성에 관한 설문 분석결과, 대부분의 항목에서 피험자들의 30% 이하로 A제품(대조군), B제품(시험군) 모두에 다소 낮은 만족도를 보였다.

(라) 안전성 평가 결과

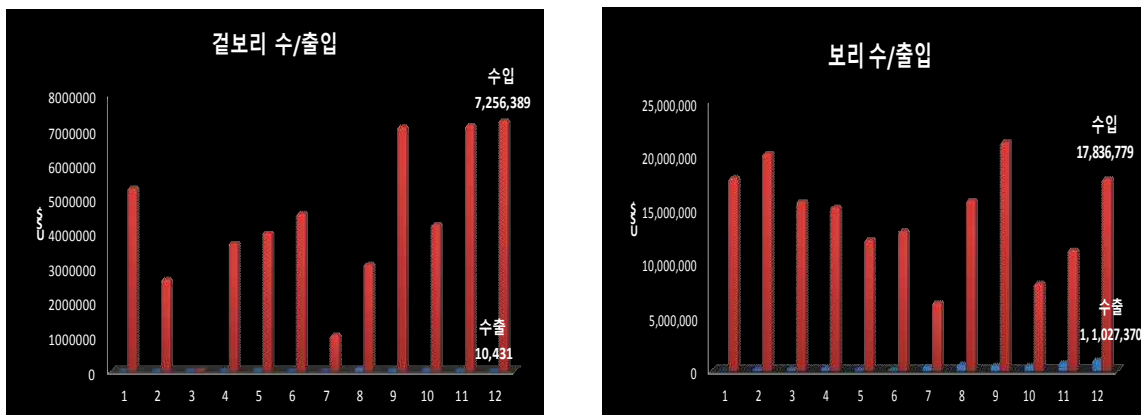
본 시험기간 동안 모든 피험자에게서 피부, 전신적 증상에 이상반응이 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 본 B제품 (FBS-SP(발효 보리와 발효콩)) 은 인체 피부보습 및 피부색 밝기 개선에 도움을 주는 것으로 판단된다.

4. 제2협동: 보리 및 콩을 이용한 기능성 식품 최적화 및 제품화 (샘포식품)

가. 보리 가격 동향 및 생산 현황

(1) 보리 수입/수출 현황(2001년-2012년(최근 10년간), 한국무역협회 참조)



<그림 137. 보리 수입/수출 현황(2001년-2012년)>

(2) 보리 생산 현황(영광군, 전라남도, 전국 상호 비교, 2005년-2011년(최근 6년간))

구분	맥류별	구분	'05	'06	'07	'08	'09	'10	'11
영광	쌀보리	재배면적(ha)	2,675	2,332	2,177	3,018	2,473	2,575	1,058
		10a당수량(kg)	351	273	359	305	291	315	
		생산량(톤)	9,389	6,366	7,815	9,205	7,196	8,111	
	겉보리	재배면적(ha)	95.0	27.0	50.0	38	57		44
		10a당수량(kg)	287	226	301	277	271		
		생산량(톤)	273	61	151	105	154		
	맥주 보리	재배면적(ha)	58	130	217	44	148		70
		10a당수량(kg)	298	208	321	329	309		
		생산량(톤)	173	270	697	145	457		
전남	쌀보리	재배면적(ha)	15,000	14,206	12,616	12,813	12,431	9,373	6,203
		10a당수량(kg)	315	234	302	283	284	167	200
		생산량(톤)	47,250	33,242	38,100	36,233	35,291	15,690	12,397
	겉보리	재배면적(ha)	122	33	50	38	155	48	96
		10a당수량(kg)	288	205	301	277	264	237	174
		생산량(톤)	351	68	151	105	410	114	167
	맥주 보리	재배면적(ha)	16,813	17,257	15,333	13,495	11,549	7,811	5,014
		10a당수량(kg)	327	257	309	330	304	192	270
		생산량(톤)	54,979	44,350	47,379	44,494	35,104	14,981	13,554
전국	쌀보리	재배면적(ha)	28,362	25,423	24,374	26,327	25,169	21,341	17,469
		10a당수량(kg)	338	254	315	312	306	200	250
		생산량(톤)	95,994	64,652	76,856	82,013	76,962	42,584	43,752
	겉보리	재배면적(ha)	7,760	7,601	7,548	8,082	6,557	5,197	4,591
		10a당수량(kg)	288	259	296	274	276	239	253
		생산량(톤)	22,319	19,655	22,376	22,142	18,112	12,444	11,595
	맥주 보리	재배면적(ha)	22,332	23,520	21,814	19,362	16,890	11,995	6,994
		10a당수량(kg)	334	271	319	340	317	218	288
		생산량(톤)	74,494	63,685	69,659	65,898	53,550	26,188	20,173

<표 44. 보리 생산 현황(영광군, 전라남도, 전국 상호 비교, 2005년-2011년)>

(3) 보리 수매 가격 동향(영광군, 2009년-2012년(최근 4년간))

년도	품종	수매가격(원/40kg)	비고
2012	자수정찰보리	일반-40,000원, 무농약-45,000원	농협수매
		새찰쌀보리	
	흰찰쌀보리	35,000	농협수매
	새쌀보리	47,000	농협수매
2011	자수정찰보리	일반-40,000원	농협수매
		새찰쌀보리	
	흰찰쌀보리	35,000	농협수매
	새쌀보리	27,320	정부수매가
2010	자수정찰보리	일반-40,000원	농협수매
		새찰쌀보리	
	흰찰쌀보리	32,000	농협수매

	새쌀보리	29,060	정부수매가
2009	자수정찰보리	일반-40,000원	농협수매
	새찰쌀보리	32,000	농협수매
	흰찰쌀보리	32,000	농협수매
	새쌀보리	30,910	정부수매가

<표 45. 보리 수매 가격 동향(영광군, 2009년-2012년)>

(4) 영광군 자생 보리 일반 분석(영광군, 2009년-2012년(최근 4년간))

	고형분 (%)	유리당 (%)	관능평가 (5점척도)
발아찰보리쌀	20.0	11.12	3.5
찰보리쌀	20.0	11.17	3.0
발아쌀보리	20.0	10.93	2.5
검정찰보리	20.0	12.11	3.0
자수정찰보리	35.0	25.23	4.5

<표 46. 영광군 자생 보리 일반 분석(영광군, 2009년-2012년)>

나. 제품 concept 및 설계(specification)

(1) 제품의 컨셉

- (가) 전남 영광 100% 국내산 보리를 활용하여 발효한 기능성 발효보리 소재개발
- (나) 미생물 발효를 통해 보리의 식이섬유(β -(1,3)/(1,4)-glucan)와 미생물의 식이섬유 (β -(1,3)/(1,6)-glucan)함량이 매우 증가된 소재 개발
- (다) 발효보리소재 자체만으로도 어떠한 첨가물 없이 대부분의 타겟 별 일일섭취량을 만족 할 만한 영양 밸런스를 갖추고 있는 소재 및 미용 건강식품 관련 완제품에 응용될 수 있는 품질을 만족하는 소재 개발

제품이름	제조사	특징	품종	단백질함량 (%)	수분 (%)	총당 (%)	베타글루칸 (%)	안토시아닌 ($\mu\text{g/g}$)
발아찰보리쌀	바우보리주식회사	발아 베타글루칸, 가바함량 높음	일반계	12.14	6.76			
찰보리쌀	군남농협		새찰보리	9.43	10.38			
발아쌀보리	바우보리			10.16	8.38			
검정찰보리	영광농협			9.40	10.52			
자수정찰보리	영광농협	안토시아닌 성분높음, 베타글루칸, 무농약인증	자수정	10.12	10.62	76.7	7.2	65.0

<표 47. 현재 시장에 출시되어 있는 보리관련 제품>

(2) 목표 규격

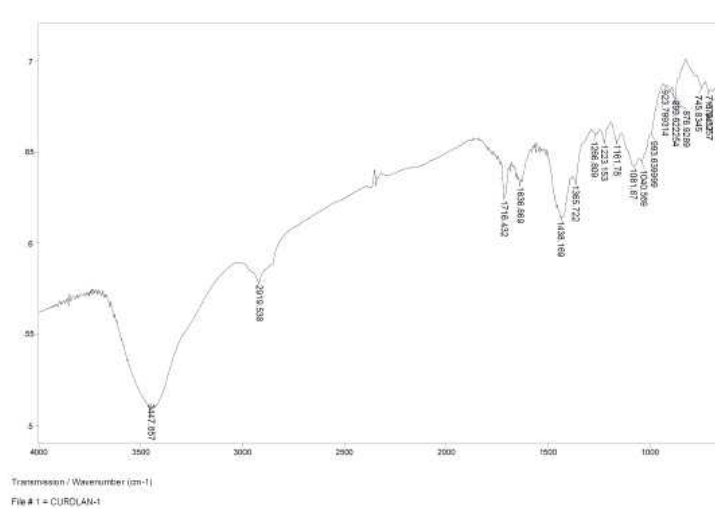
Parameters	Target value
Sample name	보리발효물-sp
주요성분	보리, 효모
복합 β -glucan (% , v/v)	20mg/ml 이상(배양액 고형분 5%기준)
β -(1,3)/(1,6)-glucan (% , v/v)	0.05mg/ml 이상(배양액 고형분 5%기준)
수분(% , w/w)	8.0이하(2.6%)
pH	4.0-7.0(5.8)
비소	1.5ppm이하
납	10ppm이하
일반세균	1,000CFU/g이하
대장균군	음성

<표 48. 기능성 보리 제품화를 위한 목표 규격>

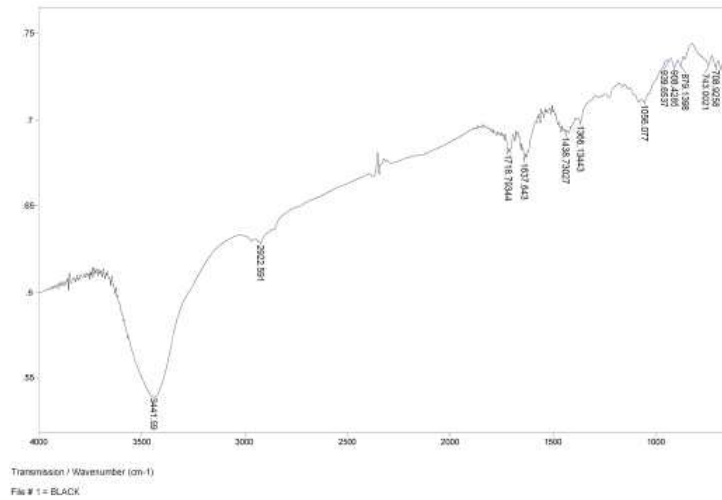
다. 제품 개발 결과

(1) FT-IR 분석 결과

β -(1,3)-glucan 구조의 표준물질인 curdlan과 보리발효물의 구조 분석을 위하여 KBr-disc 방법을 이용한 IR spectrum에서 나타난 흡수피크는 그림 138, 139와 같음. Curdlan과 보리발효물 spectrum에서 작용기 주파수 영역의 3440 cm^{-1} 부근의 O-H stretching, 2900 cm^{-1} 부근에서 C-H bond, 1600 cm^{-1} 부근에서 C=O bond가 나타났음. 그리고 891 cm^{-1} 부근에서의 β -configuration이 관찰되었음. 이는 효모가 생산하는 β -glucan가 D-glucose의 β -configuration으로 구성된 β -glucan임을 알 수 있음.



<그림 138. β -(1,3)-glucan 구조의 표준물질인 curdlan의 FT-IR spectrum>

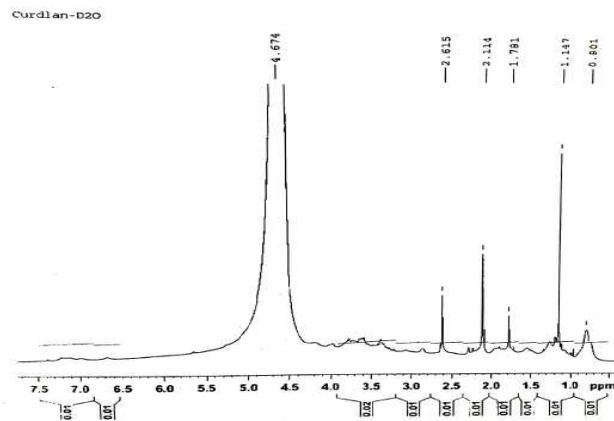


<그림 139. 보리발효물에서의 FT-IR spectrum>

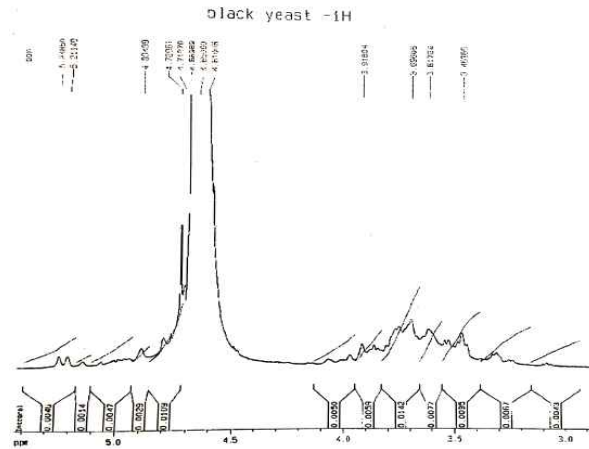
(2) 1H-NMR 분석 결과

보리발효물에서 생성된 고분자 중합체의 구조를 확인하기 위하여 1H-NMR를 이용하여 β -(1,3)-glucan의 표준물질인 curdlan과 함께 보리발효물의 구조를 분석하였음.

그림 140은 β -(1,3)- 결합으로 연결된 curdlan의 1H-NMR의 spectrum으로 4.674 ppm에서 β -(1,3) 결합과 관련된 peak가 확인되었음. 보리발효물에서의 1H-NMR의 spectrum으로 curdlan과 비슷한 ppm대에서 peak가 확인되어 β -(1,3)을 가지고 있음을 확인 할 수 있었음(그림 140, 141). 다른 연구 결과들에 따르면 1H-NMR로 분석하는 경우, β -(1,3)-glucan은 4.7~4.8ppm 에서 관찰되고, β -(1,6)-glucan은 4.5~4.6ppm에서 관찰된다고 보고되고 있음. 본 연구에서는 정확하게 β -(1,3)-glucan과 β -(1,6)-glucan의 peak를 분리하여 확인하지는 못하였으나, 비슷한 ppm에서 peak가 확인되어 우리가 배양한 보리발효물에서 β -glucan이 있음을 확인할 수 있었음.



<그림 140. β -(1,3)-glucan 구조의 표준물질인 curdlan의 400 MHz 1H-NMR spectrum>



<그림 141. 보리발효물에서의 400 MHz 1H-NMR spectrum>

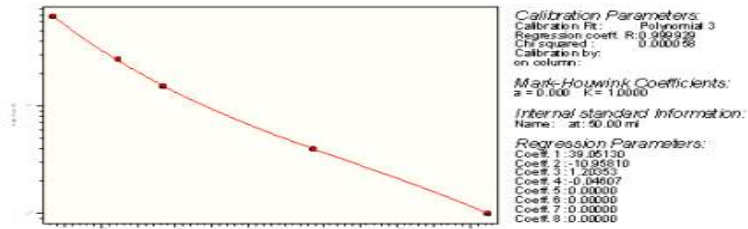
다. GPC 분자량 분석 결과

β -glucan 분자량 분석을 위한 dextran 분자량의 표준품의 retention time의 결과는 그림 142과 같음. β -glucan은 분자량 100,000-200,000이상의 물질들이 생리활성이 높으며, 5,000-10,000의 저분자의 물질에서는 활성이 거의 없는 것으로 보고되고 있음. 분자량 분석의 sample로 보리발효물 농축액을 사용하였으며 분자량을 측정된 결과는 그림 143과 같음. GPC 시스템을 사용하여 보리발효물의 분자량을 분석한 결과 약 7.91×10^6 Dalton 정도의 분자량으로 분석되었음. 분자량 10,000 Dalton인 피크의 면적이 대략 5%이며, 1,000,000 Dalton 이상의 주요 피크가 90% 이상을 차지하고 있음.

기기분석을 통하여 β -glucan의 정성분석 및 분자량은 정확히 확인할 수 있었고 보리발효물의 기능성 효능 평가에서 알 수 있듯이 개별인정형으로 인정되어진 N-아세틸글루코사민보다 피부수분량에서 유의적인 차이가 있는 것으로 보아 β -glucan의 함량에 따라 피부 보습에 대한 기능성을 확인할 수 있었음.

GPC Addon Calibration Report

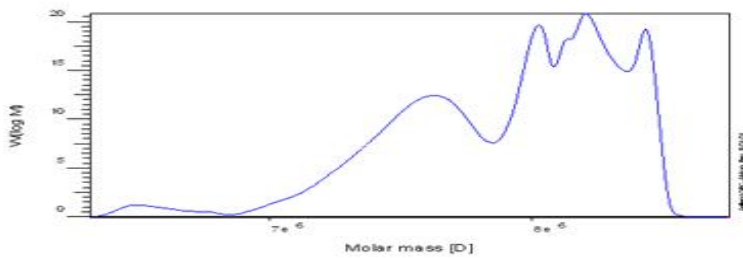
File: C:\Chem32\GPC\calib\black yeast 2011-12-05.CAL
 Comment:



Calibration Table:

Elution Volume [ml]	Molar Mass [D]	Sample Name	Slope	Deviation [%]
6.67	670000.00	dextran 670000	-1.05	0.76
7.11	270000.00	dextran 270000	-0.83	-2.85
7.42	150000.00	dextran 150000	-0.71	2.55
8.44	40000.00	dextran 40000	-0.49	-0.45
9.62	10000.00	dextran 10000	-0.59	0.07

<그림 142. Dextran 분자량 표준품의 GPC 시스템을 이용한 분자량 std curve>



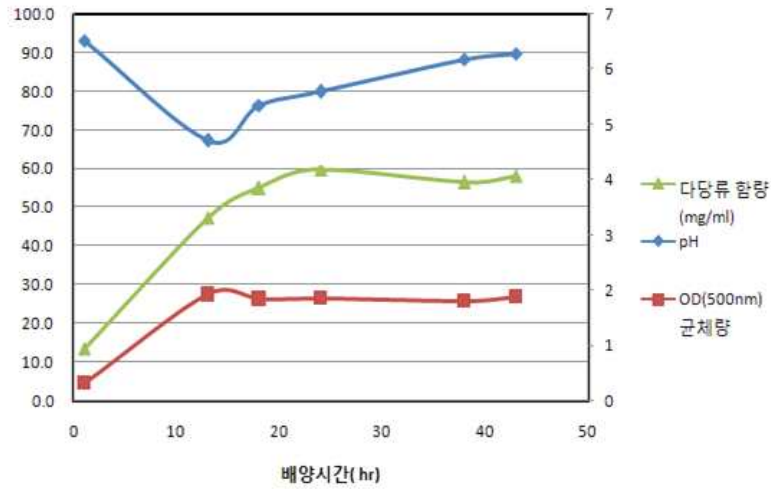
Sample:	Black yeast	Baseline to:	10.103 min
Injection Date:	Default.CAL	Integration to:	10.103 min
Calibration File:	Default.CAL	File:	0.000000E+00.mrg
Calibration Date:	3.105 min	Flow rate:	1.0000 ml/min
Baseline to m:	3.105 min	Inject volume:	10.000 µl
Integration to m:	1.000000E+0	Temperature:	23.000 C
File:	D:\y	Delay volume:	0.000 ml
Eluent:	D2O	Acquisition time/vol:	0.430 s/c
Concentration:	1.000 g/l		
Column 1:			
Detector 1:	RID A, Refractive Index Signal		
Operator:	Black yeast 20 11-12		
LOGS			
EBD:	7.5500e6	g/mol	
EBW:	7.5110e6	g/mol	
EBZ:	7.5350e6	g/mol	
EBV:	7.5110e6	g/mol	
D:	1.0032e0	mg/g	
DM:	0.000000	mg/g	
VP:	4.6720e0	ml/g	
VP:	5.5200e0	ml/g	
A:	3.0024e3	ml/g	
T0:	7.3300e6	g/mol	
T0:	7.2630e6	g/mol	
T0:	8.0033e6	g/mol	
T0:	8.2030e6	g/mol	
T0:	8.4510e6	g/mol	

<그림 143. 보리발효물의 GPC 시스템을 이용한 분자량 분석>

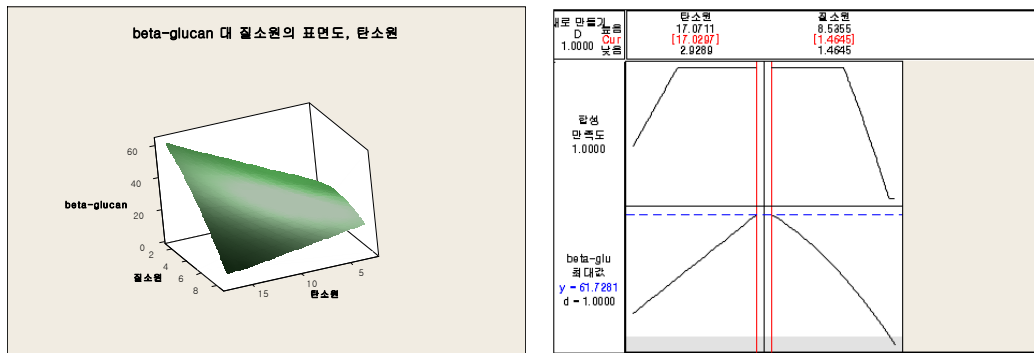
라. 효모 최적 배양 조건 검토



<그림 144. 효모 성장 패턴 관찰 실험-Fermentor>



<그림 145. 효모의 Growth curve>



<그림 146. 실험 계획법(DOE)에 의한 최적 배지 검토>

탄소원과 질소원의 최적농도를 찾기 위해 3수준의 RSM 실험결과 주효과항의 p수준이 0.05 이하의 값을 나타내어(p=0.004) 전체적인 실험값들이 유의적인 결과를 얻었음. 탄소원으로 선정된 glucose 5가지 농도 중 가장 높은 첨가 농도인 17.1g/L에서 가장 높은 β -glucan 생성을 보이는 것으로 나타났다. 질소원으로 선정된 ammonium nitrate의 경우 5가지 농도수준에서 가장 낮은 첨가 농도인 1.5g/L에서 가장 높은 β -glucan 생성을 보이는 것으로 나타나 β -glucan의 생성량은 탄소원과는 양의 상관 관계를 가졌고 질소원과는 음의 상관관계를 가짐을 알 수 있었음(그림 146).

마. Proto-type 개발

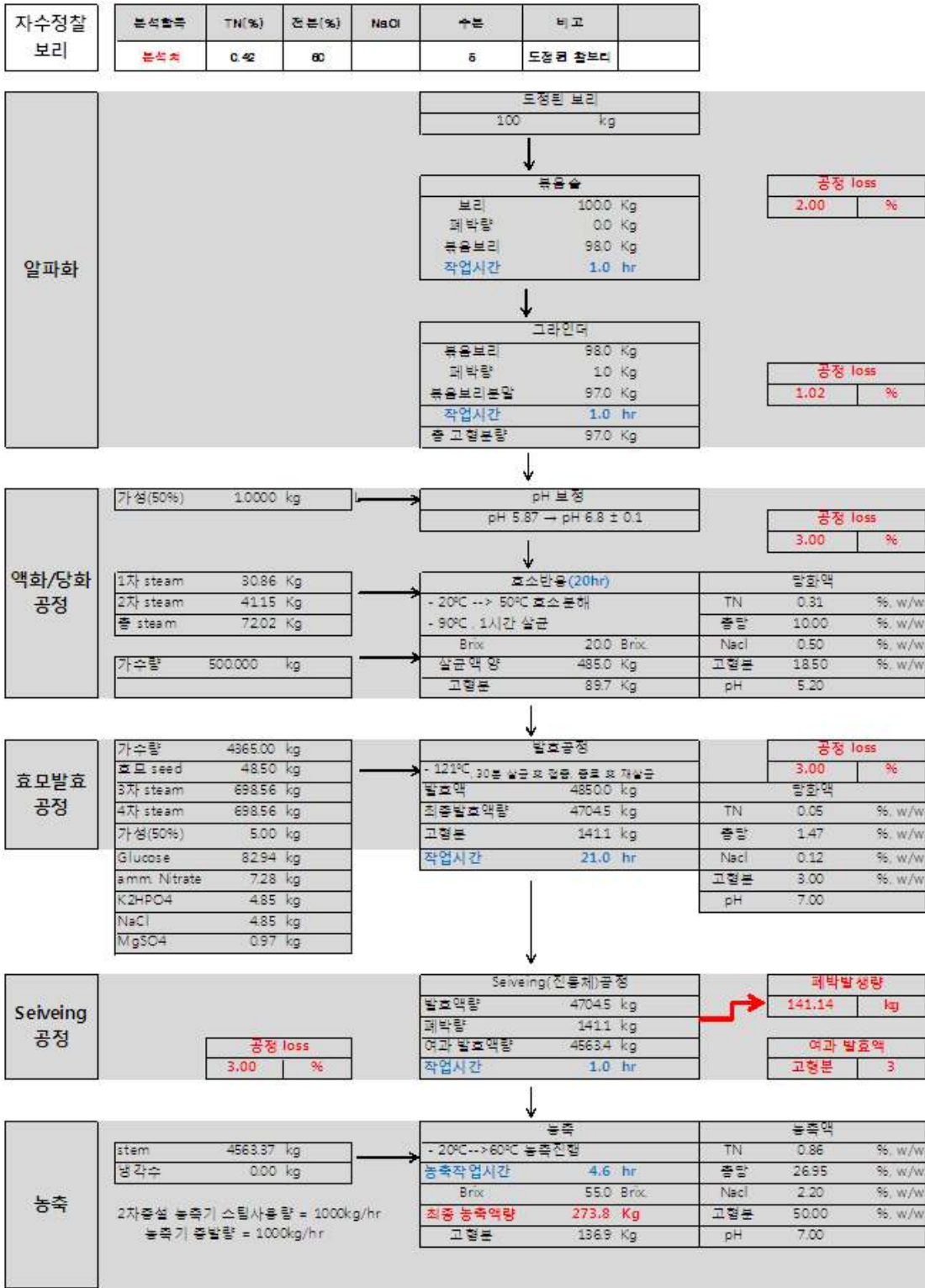
(1) 생산 개요(보리 100kg 작업 기준)

	사용 설비	비 고
알파화 공정	볶음솥	대두/보리를 90℃ 이상의 온도에서 볶음

	대형 그라인더	100 mesh이상으로 분말화 하는 작업
액/당화 공정	반응기 5ton 1기	Amylase, glucoamylase첨가 효소분해 Protease 처리
효모/유산균 발효 공정	발효조 5 L 1기	발효 전 준비 최적배지, 30℃
	발효조 50 L 1기	발효 전 준비 최적배지, 30℃
	발효조 5 ton 1기	본 배양 최적배지, 30℃
세포 파쇄 공정 (disruption)	Cell disruptor	100mesh
여과 공정 (Seiveing)	Seiver 1기	100mesh
배합 공정	배합기 1기	증발량1,000kg/hr
농축 공정	농축기 1기	증발량1,000kg/hr
포장	농축액 포장기 1기	

<표 49. proto-type 개발을 위한 생산 개요(보리 100kg 작업 기준)>

(2) 생산 프로세스(보리 100kg 작업 기준)



<그림 147. proto-type 개발을 위한 생산 process(보리 100kg 작업 기준)>

(3) 생산 Material Balance (보리 100kg 작업 기준)

원료	총당	수분	고형분	β -glucan	β -1,3,1,4-glucan	β -1,3,1,6-glucan
	%(w/w)	%(w/w)	%(w/w)	mg/g	mg/g	mg/g
알파화	총당	수분	고형분	β -glucan	β -1,3,1,4-glucan	β -1,3,1,6-glucan
	%(w/w)	%(w/w)	%(w/w)	mg/g	mg/g	mg/g
	66.63	4.33	95.67	70.36	70.36	
액화/당화	총당	수분	고형분	β -glucan	β -1,3,1,4-glucan	β -1,3,1,6-glucan
	%(w/w)	%(w/w)	%(w/w)	mg/ml	mg/ml	mg/ml
	18.41	79.1	20	18.23	17.33	0.9
효모발효	총당	수분	고형분	β -glucan	β -1,3,1,4-glucan	β -1,3,1,6-glucan
	%(w/w)	%(w/w)	%(w/w)	mg/ml	mg/ml	mg/ml
	1.43	96.13	3.75	29.01	28.26	0.75
여과공정 (seiveing)	총당	수분	고형분	β -glucan	β -1,3,1,4-glucan	β -1,3,1,6-glucan
	%(w/w)	%(w/w)	%(w/w)	mg/ml	mg/ml	mg/ml
	1.39	93.25	3.64	28.14	27.41	0.73
배합	총당	수분	고형분	β -glucan	β -1,3,1,4-glucan	β -1,3,1,6-glucan
	%(w/w)	%(w/w)	%(w/w)	mg/ml	mg/ml	mg/ml
	1.39	93.25	3.64	28.14	27.41	0.73
농축	총당	수분	고형분	β -glucan	β -1,3,1,4-glucan	β -1,3,1,6-glucan
	%(w/w)	%(w/w)	%(w/w)	mg/ml	mg/ml	mg/ml
	20.97	45.00	55.00	425.48	414.48	11.00

<표 50. proto-type 개발을 위한 생산 Material Balance(보리 100kg 작업 기준)>

(4) 보리발효물 최종 Specipication.

Parameters	Target value
Sample name	보리발효물-sp
성상 및 물성	특이 취를 가지고 있음, 이미, 이물 없음
고형분	55.0% 이상
β -glucan (% , v/v)	40.0% 이상
β -(1,3)/(1,6)-glucan (% , v/v)	1.0% 이상
수분(% , w/w)	8.0이하(2.6%)
pH	4.0-7.0(5.8)
비소	1.5ppm이하
납	10ppm이하
일반세균	1,000CFU/g이하
대장균군	음성

<표 51. 보리발효물 최종 Specification.>

바. 1차 시제품 개발 및 소비자 기호도 조사

(1) 보리발효유-sp 1차 시제품



<그림 148. 보리발효유-sp 1차 시제품>

(2) 소비자 기호도 조사 결과

샘표식품 배합표 (1차시험생산용)				샘표식품(주) 보리발효유 제조공정도			
재품명	시생산일자	개량처수	규격번호	시생산일자	개량처수	규격번호	생산공장
2011. 10. 10			내용-----	2011. 10. 10			한양대학교농업생명대학 연구소
1. 적용범위 본 규격은 송원공장에서 생산되는 '샘표 음료스' 시생산 규격에 대하여 적용한다.				2. 배합비			
순량	분량	비율(%)	비율비	순량	분량	비율(%)	비율비
1	종결수 (99±2%)	85.0000	700.00	1	종결수 (99±2%)	85.0000	700.00
2	보리 발효물-SP	10.0000	200.00	2	보리 발효물-SP	10.0000	200.00
3	원산수소나트륨	0.1700	2.40	3	원산수소나트륨	0.1700	2.40
4	OPP-SP	2.0000	40.00	4	OPP-SP	2.0000	40.00
5	대두 단백질 분말	0.1000	2.00	5	대두 단백질 분말	0.1000	2.00
6	카르복시 셀룰로스	0.8100	0.50	6	카르복시 셀룰로스	0.8100	0.50
7	관상물중화제	0.2500	5.00	7	관상물중화제	0.2500	5.00
8	카르복시 셀룰로스	0.5000	10.00	8	카르복시 셀룰로스	0.5000	10.00
9	면밀수용액	0.7000	14.00	9	면밀수용액	0.7000	14.00
10	밀 시럽	1.5000	30.00	10	밀 시럽	1.5000	30.00
11	프렌치콜리그로	6.0000	120.00	11	프렌치콜리그로	6.0000	120.00
12	락타제 분유	5.0000	100.00	12	락타제 분유	5.0000	100.00
13	코코넛지방산	1.0000	20.00	13	코코넛지방산	1.0000	20.00
보리수 1104103		0.2500	5.00	보리수 1104103		0.2500	5.00
종결수(75±5%)		37.5150	750.50	종결수(75±5%)		37.5150	750.50
총 계		##0.0000	2,000.00	총 계		##0.0000	2,000.00
재품 규격				미혼생산량			
구분	원재료	배합액(규격량)	비고	구분	원재료	배합액(규격량)	비고
단위(%)	19.9 ±0.2	19.8 ±0.2	배합오차 준수	단위(%)	19.9 ±0.2	19.8 ±0.2	배합오차 준수
pH	7.0 ±0.1	7.0 ±0.1		pH	7.0 ±0.1	7.0 ±0.1	
중량(g)		27		중량(g)		27	
비중	1.0726	1.0726		비중	1.0726	1.0726	

	맛(관능)	향	용량	외관	최종 선호도(%)
샘표 보리발효물-SP 발효유 (실험군)	3.82	4.02	4.22	3.28	3.94
일반 시판 두유 (대조군)	3.54	3.96	-	-	3.68
유의 수준	0.28	0.16	0.20	0.18	0.24

< 그림 149. 보리 발효유 소비자 기호도 조사 결과 >

- (가) 목적 : 보리 발효유의 소비자 인지도 및 선호도 조사를 통한 시제품 포지셔닝
- (나) 설문 기관 : 샘표식품(주) 기술연구소/마케팅리서치
- (다) 설문 기간 : 2011년 10월 24일-10월27일(4일, 전남 농업인대회)
- (라) 설문 방식 : 설문지 응답
- (마) 설문 대상 : 전라남도 농업인대회 참석자(보리 재배 농민, 관공서 관련 종사자)
- (바) 설문 인원 : 344명

사. 보리 품종 별 발효에 따른 품질 지표 분석

(1) 실험 재료 및 방법

(가) 균주 및 배지

- ① 사용 균주: *Aureobasidium pullulans*, *Candida utilis*를 배양액에 5 %가 되도록 접종
- ② 사용 배지: YM Broth(전 배양 배지)
1.71 % glucose, 0.15 % ammonium nitrate, 0.1 % K₂H₂PO₄, 0.1 % NaCl, 0.02 % MgSO₄ (기본 배지 조성)

(나) 세포 농도 (DCW) 측정

- ① *Aureobasidium pullulans* (흑효모), *Candida utilis*(고 글루타치온 효모)를 각각 100 mL YM broth에서 130 rpm, 30°C에서 24시간 pre incubation 한 후 3 L 발효조에 각각 또는 동시에 5 %가 되도록 접종하여 30°C, 24시간 배양함
- ② 칭량된 conical tube에 배양액을 30 mL 회수하여 10 분간 3000 rpm으로 원심분리 후 균체를 증류수로 3회 세척함
- ③ 상등 액을 제거한 후 남은 균체를 105°C에서 등량이 될 때까지 건조함
- ④ 건조 후 tube의 무게에서 conical tube의 무게를 뺀 값을 측정하여 건조 균체량을 구함

(다) Residual reducing sugar 측정

- ① 배양액을 적당한 농도로 희석한 후 DNS 발색시약을 사용해 580 nm에서 흡광도를 측정하여 잔류 환원당의 농도를 구함

(라) β-glucan 정량

- ① 건강기능식품 공전의 III.3.4.3 β -glucan 시험법을 이용
 - ② 배양액의 β -glucan을 glucose 형태로 분해하고 발색시켜 470 nm에서 흡광도를 측정하여 β -glucan의 함량을 정량함
 - ③ Glucose를 표준물질로 사용하여 최대 흡수 파장인 470 nm에서 정량함
- (마) Glutathione 정량
- ① Alloxan reagent method를 이용하여 글루타치온을 발색 법으로 정량

(2) 실험 결과

	고형분 함량(%)	Brix	환원당 (%)-DNS	glutathione (mg/L)	β -glucan (mg/g)	T.N. (%)
자수정보리(볶음->분쇄)	94.2				76.2	2.30
자수정보리 당화	10.3	9.0	6.08	79.6	61.9	0.29
자수정보리 발효	5.42	4.5	0.53	135.9	87.1	0.38
알파화 자수정보리	95.7				81.2	2.30
알파화 자수정보리 당화	10.8	9.1	5.60	78.8	69.3	0.29
알파화 자수정보리 발효	5.75	4.5	0.58	156.6	105.3	0.31
새 쌀보리	87.9				79.1	1.67
새 쌀보리 당화	10.9	9.5	6.25	84.8	84	0.19
새 쌀보리 발효	5.5	4.8	0.50	150.9	97.9	0.27
발아보리원곡	79.08				86.2	1.79
발아보리원곡 당화	10.0	9.0	5.32	91.6	83.7	0.21
발아보리원곡 발효	5.38	4.2	0.46	136.2	102.4	0.35
발아보리쌀	78.63				68.7	1.55
발아보리쌀 당화	10.4	9.8	55.92	75.8	37.6	0.29
발아보리쌀 발효	5.24	5.0	0.52	140.4	68.5	0.55

< 표 52. 보리 품종에 따른 효모 복합 발효를 통한 품질 지표 분석 >

(3) 고찰

4 종류의 보리에 흑효모와 고 글루타치온 효모를 동시 배양한 결과, 발효물의 β -glucan 함량이 원료에 비해 자수정보리 중 알파화한 것이 가장 함량이 뛰어났음. glutathione 함량은 156.6(mg/L) 으로 쌀보리나 발아보리와 평균값에 대한 유의적 차이가 크게 없었으나 β -glucan 함량은 105.3(mg/g)으로 가장 높은 수치를 나타내었음.

아. 효모 단일/복합 발효에 따른 품질 지표 분석

(1) 실험 재료 및 방법

(가) 균주 및 배지

- ① 사용 균주: *Aureobasidium pullulans*, *Candida utilis*를 배양액에 5 %가 되도록 접종
- ② 사용 배지: YM Broth(전 배양 배지)

1.71 % glucose, 0.15 % ammonium nitrate, 0.1 % K₂H₂PO₄, 0.1 % NaCl, 0.02 % MgSO₄ (기본 배지 조성)

(나) 세포 농도 (DCW) 측정

- ① *Aureobasidium pullulans* (흑효모), *Candida utilis*(고 글루타치온 효모)를 각각 100 mL YM broth에서 130 rpm, 30°C에서 24시간 pre incubation 한 후 3 L 발효조에 각각 또는 동시에 5 %가 되도록 접종하여 30°C, 24시간 배양함
- ② 칭량된 conical tube에 배양액을 30 mL 회수하여 10 분간 3000 rpm으로 원심분리 후 균체를 증류수로 3회 세척함
- ③ 상등 액을 제거한 후 남은 균체를 105°C에서 등량이 될 때까지 건조함
- ④ 건조 후 tube의 무게에서 conical tube의 무게를 뺀 값을 측정하여 건조 균체량을 구함

(다) Residual reducing sugar 측정

- ① 배양액을 적당한 농도로 희석한 후 DNS 발색시약을 사용해 580 nm에서 흡광도를 측정하여 잔류 환원당의 농도를 구함

(라) β-glucan 정량

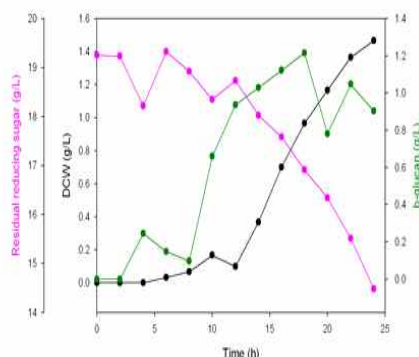
- ① 건강기능 식품 공전의 III.3.4.3 β-glucan 시험법을 이용
- ② 배양액의 β-glucan을 glucose 형태로 분해하고 발색시켜 470 nm에서 흡광도를 측정하여 β-glucan의 함량을 정량함
- ③ Glucose를 표준물질로 사용하여 최대 흡수 파장인 470 nm에서 정량함

(마) Glutathione 정량

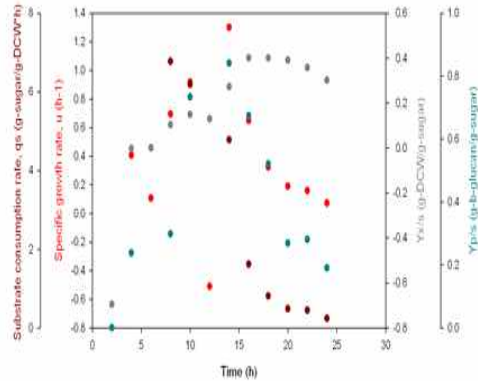
- ① Alloxan reagent method를 이용하여 글루타치온을 발색 법으로 정량

(2) 실험 결과

(가) 고 베타글루칸 생성 효모 단독 배양 시의 생육 특성 및 발효변수의 변화

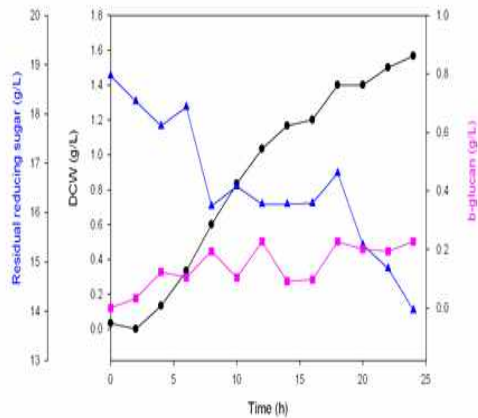


(●), DCW (g/L); (●), Residual reducing sugar (g/L); (●), β -glucan (g/L)
 < 그림 150. 고 베타글루칸 효모 단독 배양 시 시간에 대한 세포 농도, 기질 소모량, β -glucan 농도의 변화 >

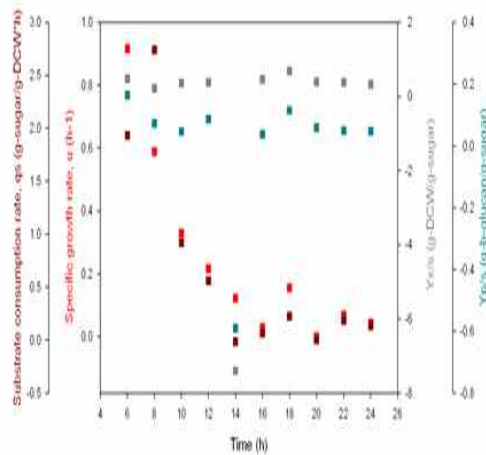


(●), 비 증식 속도; (●), 증식 수율; (●), β -glucan 생산 수율; (●), 기질 소모 속도
 < 그림 151. 고 베타글루칸 효모 단독 배양 시 시간에 대한 발효변수들의 변화 >

2) 고 글루타치온 생성 효모 단독 배양 시의 생육 특성 및 발효변수의 변화



(■), DCW (g/L); (■), Residual reducing sugar (g/L); (■), β -glucan (g/L)
 < 그림 152. 고 글루타치온 효모 단독 배양 시 시간에 대한 세포 농도, 기질 소모량, β -glucan 농도의 변화 >



비 증식 속도; (■), 증식 수율; (■), β-glucan 생산 수율; (■). 기질 소모 속도; (■)
 < 그림 153. 고 글루타치온 효모 단독 배양 시 시간에 대한 발효변수들의 변화 >

(3) 고찰

동일한 배양시간, 배양조건에서 균체량, β-glucan 함량 등을 비교한 결과, 최대 비 증식 속도인 0.887 h^{-1} 를 나타내고, 균체 증식 수율의 평균값은 $0.388 \text{ g-DCW/g-sugar}$, β-glucan 증식 수율의 평균값은 $0.331 \text{ g-}\beta\text{-glucan/g-sugar}$ 로 효모를 단독 배양하는 것 보다 동시 배양하는 것이 β-glucan 생산 수율을 높이는 데 적절할 것으로 판단됨.

자. 회분식/유가식 발효공정에 따른 품질 지표 분석

(1) 실험 재료 및 방법

(가) 균주 및 배지

- ① 사용 균주: *Aureobasidium pullulans*, *Candida utilis*를 배양액에 5%가 되도록 접종
- ② 사용 배지: YM Broth(전 배양 배지)

1.71 % glucose, 0.15 % ammonium nitrate, 0.1 % $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.1 % NaCl, 0.02 % MgSO_4 (기본 배지 조성)

(나) 세포 농도 (DCW) 측정

- ① *Aureobasidium pullulans* (흑효모), *Candida utilis*(고 글루타치온 효모)를 각각 100 mL YM broth에서 130 rpm, 30°C에서 24시간 pre incubation 한 후 3 L 발효조에 각각 또는 동시에 5%가 되도록 접종하여 30°C, 24시간 배양함
- ② 칭량된 conical tube에 배양액을 30 mL 회수하여 10 분간 3000 rpm으로 원심분리 후 균체를 증류수로 3회 세척함
- ③ 상등액을 제거한 후 남은 균체를 105°C에서 등량이 될 때까지 건조함
- ④ 건조 후 tube의 무게에서 conical tube의 무게를 뺀 값을 측정하여 건조 균체량을 구함

(다) Residual reducing sugar 측정

① 배양액을 적당한 농도로 희석한 후 DNS 발색시약을 사용해 580 nm에서 흡광도를 측정하여 잔류 환원당의 농도를 구함

(라) β -glucan 정량

① 건강기능 식품 공전의 III.3.4.3 β -glucan 시험법을 이용

② 배양액의 β -glucan을 glucose 형태로 분해하고 발색시켜 470 nm에서 흡광도를 측정하여 β -glucan의 함량을 정량함

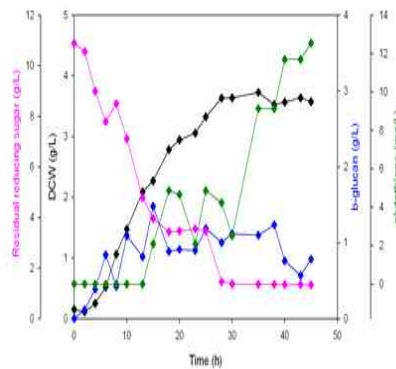
③ Glucose를 표준물질로 사용하여 최대 흡수 파장인 470 nm에서 정량함

(마) Glutathione 정량

① Alloxan reagent method를 이용하여 글루타치온을 발색 법으로 정량

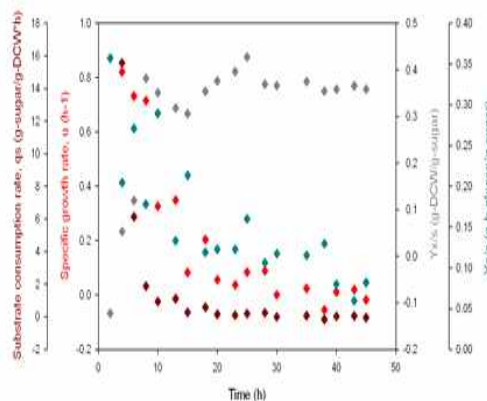
(2) 실험 결과

(가) 회분식 배양



(◆), β -glucan 농도 (◆), glutathione 농도 (◆), 기질 소모량 (◆)의 변화.

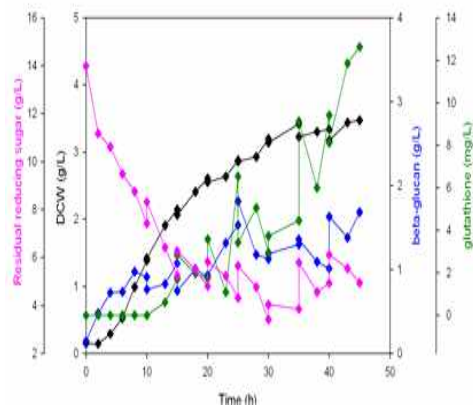
< 그림 154. 45시간 회분배양 실험에서 시간에 대한 세포 농도 >



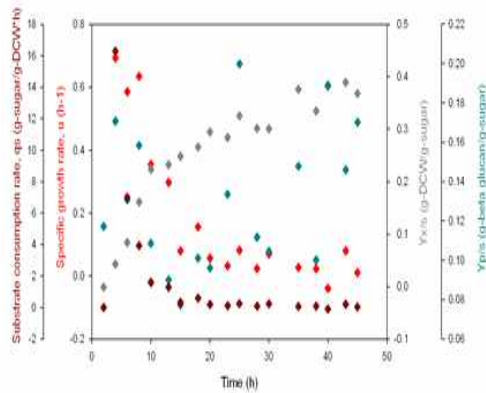
(◆), 증식 수율 (◆), β -glucan생산 수율 (◆), 기질 소모 속도 (◆)의 변화.

< 그림 155. 45시간 회분배양 실험에서 시간에 대한 비 증식 속도 >

(나) 유가식 배양



(◆), β-glucan 농도 (◆), glutathione 농도 (◆), 기질 소모량 (◆)의 변화.
 < 그림 156. 45시간 유가 식 배양 실험에서 시간에 대한 세포 농도 >



(◆), 증식 수율 (◆), β-glucan 생산 수율 (◆), 기질 소모 속도 (◆)의 변화.
 < 그림 157. 45시간 회분배양 실험에서 시간에 대한 비 증식 속도 >

(3) 고찰

유가식 배양으로 기본 배지 조건에서 glucose 함량을 1.7 %에서 1.0 %로 줄이고 5 L 발효 조에서 45시간 배양. 배양 10 시간부터 매 5시간 마다 기질용액(1 g/L glucose)을 7번에 걸쳐 공급하였음.

회분식과 비교하여 최대 세포 농도는 배양 45시간에서 나타난 3.47 g-DCW/L이고 β-glucan 농도는 배양 25시간에서 나타난 1.81 g-β-glucan/L이었고 Glutathione의 농도는 배양 45시간에서 12.62 g-glutathione/L로 가장 높게 나타남.

유가식의 경우, 추가로 공급되는 glucose가 꾸준히 소모되고 있음에도 회분 배양과 비교하여 세포 농도와 β-glucan 농도, glutathione의 농도에 큰 차이가 없는 것으로 보아 추가 공급 기질액에 대한 희석 또는, 배양액 내 용존 산소의 양이 부족하여 탄소 원의 소모가 균체 증식 보다는 에탄올과 같은 부산물 생성 쪽으로 유도되어 회분식 배양과 큰 차이가 없었음.

차. 실험계획법(DOE)을 적용한 발효 공정 최적화 수립

(1) RSM (Response Surface Design)을 이용하여 보리/콩 발효의 최적 조건 검색

(가) 중심합성계획법에 의한 실험 설계

- ① 2요인 설계, 입방체 점, 중심점으로 구성하여 설계
- ② 보리 당화물: low- 10, high- 30
- ③ 효모 ext.: low- 5, high- 10
- ④ 반복 수: 2

(2) 실험 방법

- ① 보리 용액은 amylase, glucosidase 등의 효소를 0.5 % 씩 첨가하여 20시간 동안 60℃에서 당화하여 준비
- ② 보리 당화물과 효모 ext.를 Table 2에 표시된 만큼씩 섞어 50 mL 배양액 기준으로 혼합하고 121℃에서 15분간 멸균, 고베타글루칸 생성 효모와 고 글루타치온 효모를 각 5%씩 접종하고 24시간 배양

표준 오차	런 순서	점 유형	블록 할당	보리 당화물 (g/L)	효모 ext.(g/L)	β-glucan (g/L)
1	1	1	1	10	5	3.3
4	2	1	1	30	10	5.6
22	3	0	1	20	7.5	3.9
16	4	1	1	10	10	4.7
20	5	-1	1	20	3.964	3.2
14	6	1	1	10	5	2.3
5	7	-1	1	5.858	7.5	5.8
21	8	-1	1	20	11.036	4.8
15	9	1	1	30	5	4.2
17	10	1	1	30	10	5.9
10	11	0	1	20	7.5	4.1
12	12	0	1	20	7.5	3.6
23	13	0	1	20	7.5	3.8
6	14	-1	1	34.142	7.5	4.9
7	15	-1	1	20	3.964	2.8
8	16	-1	1	20	11.036	4.7
3	17	1	1	10	10	3.6
9	18	0	1	20	7.5	3.6
2	19	1	1	30	5	4.3
25	20	0	1	20	7.5	2.9
18	21	-1	1	5.858	7.5	2.8
26	22	0	1	20	7.5	3.7
11	23	0	1	20	7.5	3.7
19	24	-1	1	34.142	7.5	4.2
24	25	0	1	20	7.5	3.5
13	26	0	1	20	7.5	3.4

< 표 53. 중심합성계획에 따른 설계 결과 및 β-glucan 농도 >

(3) 실험 결과

표준 오차	런 순서	점 유형	블록 할당	보리 당화물(g/L)	효모 ext.(g/L)	β-glucan (g/L)
----------	---------	---------	----------	-------------	--------------	----------------

5	5	1	1	40	10	8.2
7	7	1	1	40	20	11.5
9	9	0	1	50	15	12.4
2	2	1	1	60	10	11.8
8	8	1	1	60	20	13.6
3	3	1	1	40	20	12.0
6	6	1	1	60	10	12.1
1	1	1	1	40	10	8.3
4	4	1	1	60	20	14.5

< 표 54. Factorial design에 따른 설계 결과 및 β -glucan 농도 >

Term	Effect	Coef	SE Coef	T	P
Constant		11.504	0.1337	86.06	0
보리 당화물	3.0171	1.5086	0.1337	11.28	0
효모 액기스	2.7655	1.3828	0.1337	10.34	0
보리 당화물*효모 액기스	-0.6986	-0.3493	0.1337	-2.61	0.059
Ct Pt		0.897	0.4011	2.24	0.089

R-Sq = 98.40 %

< 표 55. Factorial fit: β -glucan versus 보리 당화물, 효모 ext.의 계수 값 >

(4) 고찰

- (가) 1차 RSM, 2차 2수준 factorial design을 통하여 최적 보리 당화물, 효모ext. 첨가량 결정 실험을 실시한 결과, 보리 당화물 40g/L, 효모액기스 10g/L 이상의 모든 첨가 구에서 최소 8.231 g/L에서 최대 14.491 g/L의 β -glucan 생산량을 보였음.
- (나) 보리 당화물 40-50g/L 첨가 구에서 가장 높은 β -glucan 증가량을 보였으며, 50-60g/L 첨가 구간에서는 증가율이 감소하는 경향을 나타냈음. 또한 보리 당화물 50g/L 이상 실험구에서 점성이 매우 증가하여 발효조에서의 배양 시 용존 산소(DO) 조절이 매우 힘들 것으로 예상됨.
- (다) 보리 당화물 첨가량 50-60g/L, 효모액기스 첨가량이 15-20g/L인 실험 구에서 배지에 의한 β -glucan 생산량과 미생물에 의한 β -glucan 생산량의 비가 6:4 정도로 파악되었으며, 미생물에 의한 β -glucan 생산능이 가장 우수하였음.

카. 회분식 및 유가식 배양 최적 조건 검토

(1) 실험 방법

- (가) 회분식: 50L 발효조에 보리 당화물의 농도가 40g/L, 효모 ext. 10g/L가 되도록 넣고 30℃에서 72시간 회분식 배양
- (나) 유가식 1 타입: 보리 당화물의 초기 농도를 10 g/L가 되도록 넣고 배양 20시간 후부터 7시간마다 6 g/L씩 5번 공급하여 총 보리 당화물의 농도가 40 g/L가 되도록 하여 30℃에서 72시간 배양함. 효모 액기스의 농도는 대조구와 동일함.
- (다) 유가식 2 타입: 보리 당화물의 초기 농도를 10 g/L가 되도록 넣고 배양 20시간 후부터 7시간마다 6 g/L씩 8번 공급하여 총 보리 당화물의 농도가 58 g/L가 되도록 하여 30℃에서 72시간 배양함. 효모 액기스의 농도는 대조구와 동일함.

(라) 발효에 의한 증가 (g/L)의 경우, 총 β -glucan 함량 (g/L) 에서 배양액에 포함된 보리 및 효모의 g 당 β -glucan 함량에 보리와 효모의 g 수를 곱한 값을 제하여 구함.

$$\text{발효에 의한 증가} = \beta\text{-glucan 함량} - \{(\text{보리 g 당 } \beta\text{-glucan 함량}) \times (\text{보리 g}) + (\text{효모 g 당 } \beta\text{-glucan 함량}) \times (\text{효모 g})\}$$

(2) 실험 결과

회분식 배양 타입				
hr	보리	효모	β -glucan (g/L)	발효에 의한 증가 (g/L)
0	40	10	6.9	1.3
5	40	10	7.7	2.1
20	40	10	8.9	3.3
27	40	10	8.7	3.1
34	40	10	9.5	3.9
41	40	10	9.7	4.1
48	40	10	10.1	4.5
55	40	10	10.6	5.0
62	40	10	10.4	4.8
69	40	10	10.2	4.6
72	40	10	9.3	3.7

< 표 56. 회분 식 배양에 따른 β -glucan 농도 및 발효에 의한 β -glucan 증가 량 >

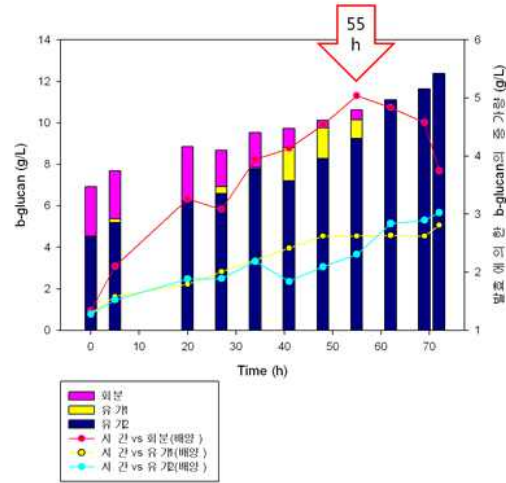
유가식 배양 1타입				
hr	보리	효모	β -glucan (g/L)	발효에 의한 증가 (g/L)
0	10	10	4.5	0.8
5	10	10	5.4	1.6
20	10	10	6.0	2.2
20	16	10	6.0	1.9
27	16	10	6.9	2.8
27	22	10	7.0	2.5
34	22	10	7.9	3.4
34	28	10	7.7	2.8
41	28	10	8.8	4.0
41	34	10	8.5	3.3
48	34	10	9.8	4.5
48	40	10	10.0	4.4
55	40	10	10.1	4.5
62	40	10	10.2	4.6
69	40	10	10.1	4.5
72	40	10	10.7	5.1

< 표 57. 유가 식 배양에 따른 β -glucan 농도 및 발효에 의한 β -glucan 증가 량 >

유가식 배양 2타입				
hr	보리	효모	β -glucan (g/L)	발효에 의한 증가 (g/L)
0	10	10	4.5	0.8
5	10	10	5.2	1.5
20	10	10	6.2	2.5
20	16	10	5.7	1.6
27	16	10	6.6	2.5
27	22	10	6.4	1.9
34	22	10	7.8	3.3
34	28	10	6.4	1.5
41	28	10	7.2	2.4
41	34	10	7.4	2.2
48	34	10	8.3	3.1

48	40	10	7.5	1.9
55	40	10	9.2	3.7
55	46	10	10.2	4.3
62	46	10	11.1	5.1
62	52	10	11.1	4.7
69	52	10	11.6	5.3
69	58	10	11.4	4.7
72	58	10	12.4	5.7

< 표 58. 유가 식 배양에 따른 β -glucan 농도 및 발효에 의한 β -glucan 증가 량 >



<그림 158. 회분, 유가식 배양 시 시간에 따른 β -glucan 함량의 변화 및 발효에 의한 증가량의 변화 >

최적 발효 생산에 따른 품질 표준화			
hr	β -glucan (g/L)	β -glucan (mg/g)	발효에 의한 증가 (g/L)
0.000	7.2	137	1.6
10.000	7.8	182	2.2
24.000	9.3	266	3.7
33.000	9.7	300	4.1
48.000	10.3	349	4.7
55.000	10.9	391	5.3

< 표 59. 최적화 배양 조건에서의 확인 실험 결과 >

(3) 고찰

(가) 회분식 배양 결과, 최대 β -glucan 농도는 배양 55시간에서 10.630 g/L로 나타남.

(나) 유가식 배양 결과, 1 타입에서는 배양 72시간에서 가장 높은 β -glucan 농도인

10.652 g/L를 보였으며, 2 타입의 경우, 배양 72시간에서 β -glucan 농도가 12.381 g/L로 나타냄.

(다) 유가식 배양 2 타입의 경우, 회분식과 1타입의 값보다 높은 수치를 보이지만, 이는

보리 당화물 첨가에 의한 것으로 발효에 의한 β -glucan의 증가량은 큰 차이를 보이지

않음.

(라) 회분식과 유가식 배양 모두 발효에 의한 β -glucan의 증가량에 차이를 보이지 않아 회분식 발효 공정으로 최적화 함.

(마) 회분식 배양 55시간에서의 β -glucan 농도 및 발효에 의한 β -glucan의 증가량이 가장 높게 나타나므로 이 조건을 최적 배양 및 배지 조건으로 결정함.

타. 1(ton) fermentor 시생산에 따른 품질 표준화 수립(실험계획법(DOE) 적용)

원료	알파화 자수정 보리 가루(95%고형분)					
				고형분	93.4	%
				수분	6.6	%
				알파화 자수정 보리가루	36.0	kg
				효모 ext.	12.0	kg

보리당화공정	투입 자수정 보리 가루	36.00	kg			
	가수 액	600.00	kg	60°C, 12~24h		
	A효소 접종 량	0.72	kg			
	B효소 접종 량	0.72	kg			

살균공정	살균공정					
				살균액	636	kg

효모발효공정	투입 자수정 보리 가루	36.00	kg	효모발효		
	가수 액	600.00	kg	발효액	648	kg
	A효소 접종 량	0.72	kg	고형분	48	kg
	B효소 접종 량	0.72	kg	Brix(실측, 발효 전)		%
	효모 액기스	12.00	kg	고형분		kg
	고 베타글루칸 효모 접종 량	6.00	kg	초기 pH	7	
	고 글루타치온 효모 접종 량	6.00	kg	발효시간	48	hr
				Brix(실측, 발효 후)		%
				고형 분		kg

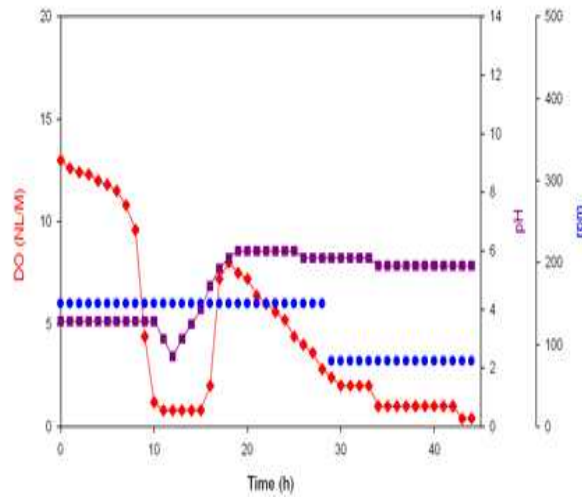
살균공정	살균공정					
				살균액	648	kg
				Brix(실측, 살균 후)		%
				고형 분		kg

농축공정	농축공정					
				살균액	648	kg
				농축액 목표 Brix	8	%
				최종 농축액	0	kg

				고형분	0	kg
분말화	건조 공정					
				최종분말	32	kg

< 표 60. 시 생산 계획표 >

(1) 1(ton) 시생산 결과



< 그림 159. 1(ton) 시생산 parameter. 시간에 대한 DO (◆), pH (■), rpm (●), 의 변화 >

1(ton) 시생산 결과			
hr	β -glucan (g/L)	β -glucan (mg/g)	발효에 의한 증가 (g/L)
0	13.0	161	6.0
5	12.9	177	5.9
20	14.6	211	7.6
25	14.6	221	7.6
30	15.1	239	8.1
45	16.8	283	9.8

< 표 61. 1(ton) 시생산 조건에서 시간에 따른 β -glucan 농도, 함량 및 발효에 의한 증가량 변화 >

(2) 고찰

1(ton) Fermentor의 Scale-up을 통하여 45시간 배양에서 발효에 의한 β -glucan의 증가량이 9.846 g/L를 나타냈고, 고형분 대비 β -glucan 함량은 282.646 mg/g으로 자수정

보리 원물에 비해 약 3.5배 높은 값을 나타냄.

(3) 품질 규격서

Parameters	Target value
Sample name	보리 발효-SP
성상 및 물성	보리, 효모 특이 취를 가지고 있음, 이미, 이물 없음
주요성분	보리, 효모 배양액 100%
고형분	55.0% 이상
β -glucan (% , v/v) (건강기능식품 공전의 III.3.4.3 β -glucan 시험법 준함)	40.0% 이상
pH	4.0-7.0(5.8)
비소	1.0ppm이하
납	5.0ppm이하
일반세균	1,000 CFU/g이하
대장균군	음성

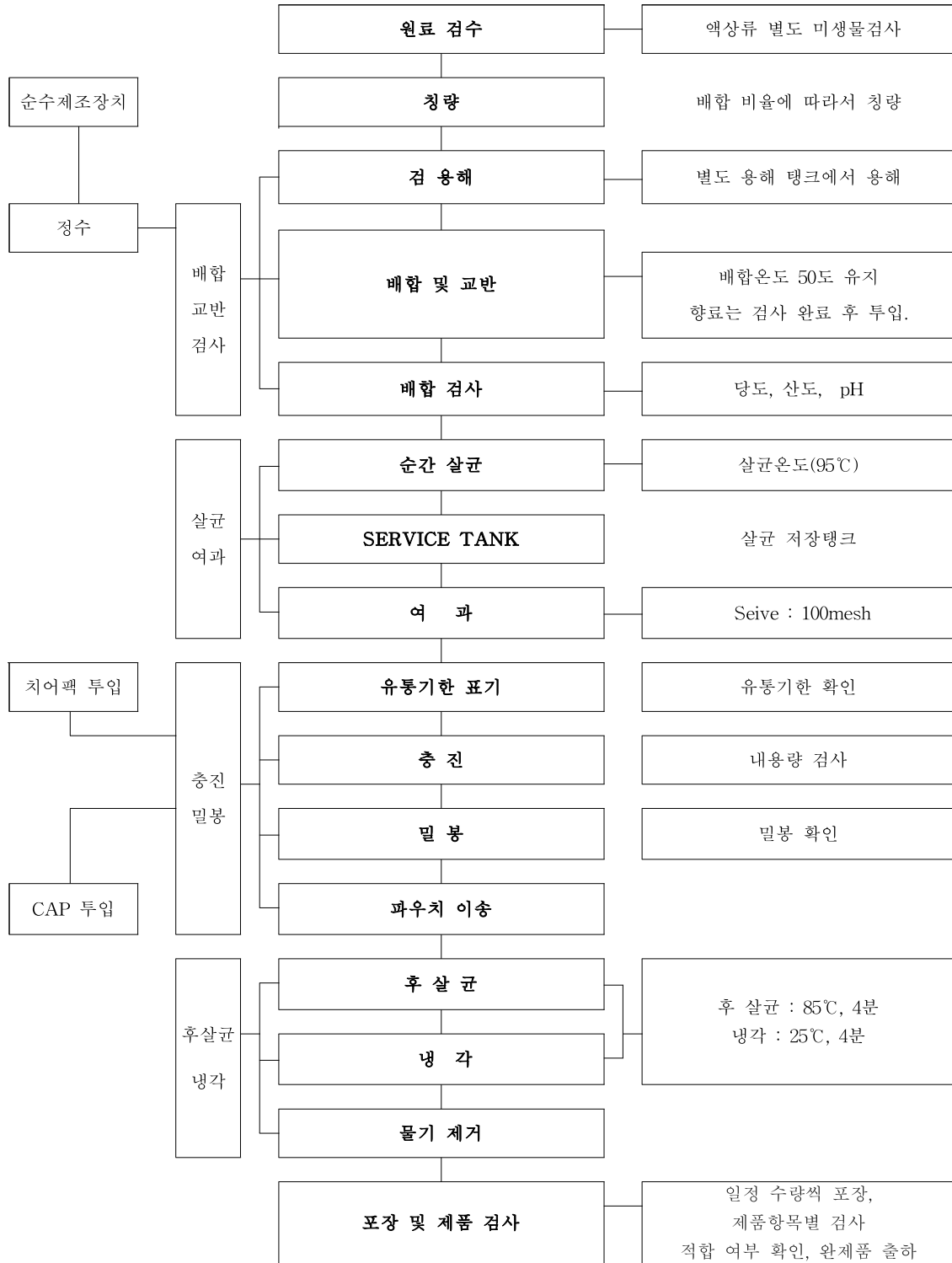
< 표 62. 보리 발효 소재(농축액) 품질 규격서 >

Parameters	Target value
Sample name	콩 발효-SP
성상 및 물성	대두, 효모 배양액 특이 취를 가지고 있음, 이미, 이물 없음
주요성분	콩, 효모 배양액 100%
고형분	55.0% 이상
β -glucan (% , v/v) (건강기능식품 공전의 III.3.4.3 β -glucan 시험법 준함)	40.0% 이상
pH	4.0-7.0(5.8)
비소	1.0ppm이하
납	5.0ppm이하
일반세균	1,000 CFU/g이하
대장균군	음성

< 표 63. 콩 발효 소재(농축액) 품질 규격서 >

파. 시제품 개발

(1) 켈 파우치 음료 타입



< 표 64. 젤 파우치 음료 제조공정도 >

제품명	Sempio Foods company 피부미용 기능성 음료 - 젤 파우치 타입(최종)
-----	---

순번	원재료명	제조사 (원산지)	배합 비율 (%)	1Kg당 배합 비율(g)	7,000 (EA) 배합량(kg)	비 고
1	보리/콩 발효물-SP	-	3.500	35.000	31.500	샘표식품
2	Peprich 마린콜라겐펩타이드	-	1.000	4.500	4.050	샘표식품
3	비타민C	허베이웰컴	0.450	4.500	4.050	경북과학대학
4	프락토올리고당	삼양제넥스	2.500	25.000	22.500	경북과학대학
5	수크랄로스	Hebei. LTD	0.008	0.080	0.072	경북과학대학
6	자일리톨	다니스코	0.100	1.000	0.900	경북과학대학
7	블루베리농축액(65%) [미국산]	YBBSTALERFRIT (호주산)	3.200	32.000	28.800	경북과학대학
8	석류농축액 [이란산]	Sibestan Agro Industrial Co (이란)	1.000	10.000	9.000	경북과학대학
9	무수구연산	신원산업	0.040	0.400	0.360	경북과학대학
10	사과산	용산화학	0.040	0.400	0.360	경북과학대학
11	블루베리향 [삼정-샘표준비]	삼정향료	0.400	4.000	3.600	샘표식품
12	연잎복합추출물	벤스랩	0.050	0.500	0.450	경북과학대학
13	사과농축액(70%) [경북농금]	경북농금	3.000	30.000	27.000	경북과학대학
14	γ -싸이클로덱스트린	Wacker Chemical Corporation	0.300	3.000	2.700	경북과학대학
15	β -싸이클로덱스트린	대상	1.000	10.000	9.000	경북과학대학
16	L-methol	보락	0.00015	0.00150	0.00135	경북과학대학
17	정제수		83.4118	844.118	759.70665	경북과학대학
	합계		100.000	1000.000	900.00000	Loss : 200(L)
제품 규격	특징	이미,이취없음, 달콤한 맛이 진함				
	규격	100(ml) 기준				
	성상	불투명				
	당도	15(brix) 이하				
	산도	0.38 이하				
	pH	3.8 이하				
	비중	1.0 이상				

< 표 65. 보리/콩 발효 소재 및 자사 콜라겐펩타이드 적용 쥬 파우치 음료 최종 레시피 >



Peprich® 콜라겐 펩타이드 음료

INNER BEAUTY Anti-aging

For younger skin

권장섭취량 : 1일 3회
효능 : 피부미용(주름개선, 보습, 미백)

100 ml
연구용

< 그림 160. 보리/콩 발효 소재 및 자사 콜라겐펩타이드 적용 겔 파우치 음료 시제품 최종 디자인 >

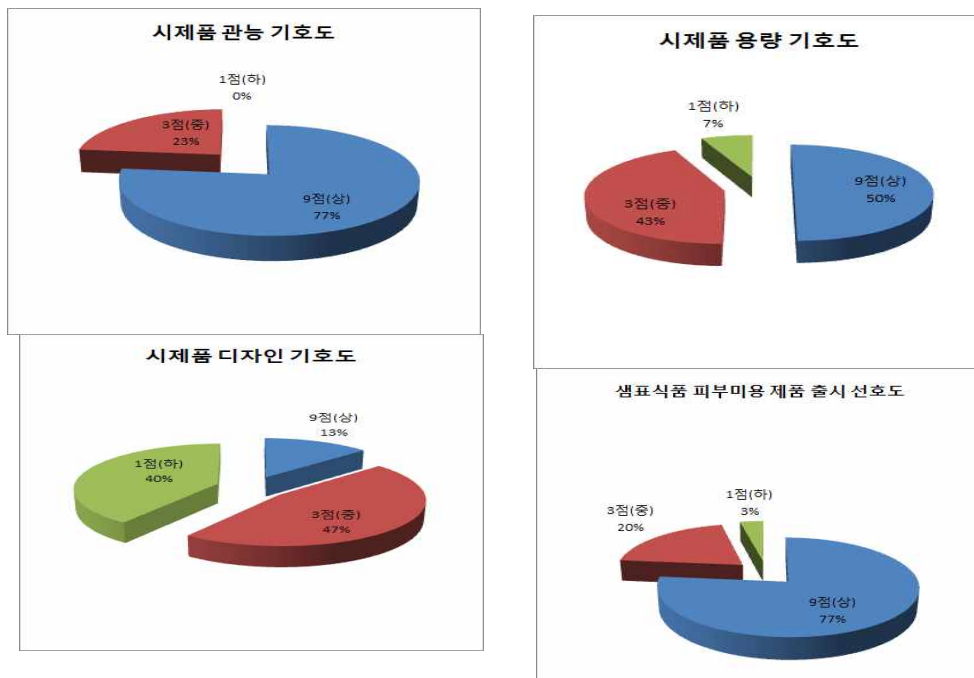
(2) 사내 패널 대상 HUT 조사 결과

(가) 조사 방법 : 취식 전, 후 설문 조사

(나) 조사 인원 : 사내 패널 77명

(다) 조사 방법 : 겔 타입 파우치 음료 시제품 2주 취식 전, 후 설문 조사

(라) 주요 사항 : 기호도, 선호도



< 그림 161. 겔 파우치 음료 시제품 HUT 기호도/선호도 평가 결과 >

(3) 껌/캔디 제재 타입

Product : Limemint(샘표식품(주))

No.	Ingredients	Rate(%)
-----	-------------	---------

1	Gum Base	Vela-T Soft	17.8750
2	Xylitol		42.9000
3	샘표 피부미용 소재 (식물성 발효물)	보리, 콩 유래	1.0004
4	Maltitol Pwd	P-35	1.6250
5	L-Menthol	82Brix	0.3250
6	Aspartame		0.0319
7	Sweet Lasting Pwd	SKF-26107	0.0455
8	Limemint Flavor	SKF-23071	0.9100
9	Liquid Menthol	SKF-22663	0.2600
10	Isomalt	PF	0.2223
11	Maltitol	P-200	30.3679
12	Gum Arabic		1.3598
13	Hydrogenated Glucose Syrup		2.8749
14	Gardenia Blue	K-8897	0.0443
15	Cathamus Yellow	SF-8201	0.0812
16	Carnauba Wax		0.0202
17	Shellac		0.0566
Total			100.0000

<표 66. 보리/콩 발효 소재 및 자사 콜라겐펩타이드 적용 껌 제재 최종 레시피 >



< 그림 162. 보리/콩 발효 소재 및 자사 콜라겐펩타이드 적용 껌 제재 >

(4) 환 제재 타입

샘표식품

녹두대

2010.07.28

A(DHC-1)		B(SHC-2)		C(STHC-1)	
원료명	투입량(g)	원료명	투입량(g)	원료명	투입량(g)
엑기스	270	엑기스	280	엑기스	280
인진숙분말	250	인진숙분말	250	인진숙분말	200
계	520	계	530	계	480


< 그림 163. 보리/콩 발효 소재 및 자사 콜라겐펩타이드 적용 환 제재 최종 레시피 >




< 그림 164. 보리/콩 발효 소재 및 자사 콜라겐펩타이드 적용 환 제재 >

하. 대량 생산을 위한 제조공정도 표준

(1) 콩발효물 공정도 표준

 샘표식품	공 정 도	문서번호	
	공 발효물	개정일자	
		개정번호	
		페이지	

공정명	작업명	사용설비	관리 또는 검사방법				검사설비
			항목	기준	주기	방법	
작업준비	기자재 C.I.P	복용술 세척제 살균제 NaOH	이물	불검출	작업시	육안	
			이취	불검출	작업시	육안	
원료준비	콩 (Glycine max MERR.) (국내산) 250kg 투입	HPLC	Genistein+ Daidzein(μg/g)	30 μg/g 이상	작업시	분석	HPLC
			이물	불검출	작업시	육안	
			이취	불검출	작업시	육안	
전처리	콩 알파화	복용술	온도 시간	150-180℃ 10-20분	작업시	육안	온도계 타이머
	콩 분말화	분쇄기	RPM 시간 mesh	10,000 10분-20분 60 이상	작업시	육안	타이머
	가수	유량계 발효기	가수량	전체 작업량 의 90% (5분작업 시 4.5톤)	작업시	육안	유량계
	가온	발효기	온도	55℃	작업시	육안	온도계
	콩 분말	발효기	투입량	작업량의 5% (5분작업 시 250 kg)	작업시	육안	질량계
	pH조절	pH 미터	NaOH 첨가량	1.5L±0.5	작업시	육안	
			pH	7.0±0.1	작업시	육안	pH 미터
	효소투입	발효기	첨가량	alcalase 2.4 L (Novozyme, Denmark) (콩분말 단백질 1%)	작업시	육안	질량계
	효소분해	발효기	반응시간	5시간	작업시	육안	타이머
			반응온도	60℃	작업시	육안	온도계
반응pH			초기 7.0	작업시	육안	pH meter	

 샘표식품	공 정 도	문서번호	
	공 발효물	개정일자	
		개정번호	
		페이지	

공정명	작업명	사용설비	관리 또는 검사방법				검사설비
			항목	기준	주기	방법	
살균	살균	스팀	살균온도	92±2℃	작업시	육안	온도계 이치
			살균시간	30분	작업시	육안	타이머
냉각	냉각	냉각수	냉각온도	35℃	작업시	육안	온도계 이치
			항온온도	30℃	작업시	육안	
발효과정	본배양	발효기	효모(피키아자디나) 투입량	효모(피키아자디나) 반응액 5%(v/v)	작업시	육안	질량계
			교반속도	100 rpm	압착전	육안	게이지
			발효온도	30℃	작업시	육안	온도계 이치
			발효시간	20시간	작업시	육안	타이머
			발효 pH	7.0	작업시	육안	pH meter
	살균	발효기	살균온도	92±2℃	작업시	육안	온도계 이치
			살균시간	30분	작업시	육안	타이머
	냉각	발효기	냉각온도	65℃	작업시	육안	온도계 이치
			항온온도	55℃	작업시	육안	온도계 이치
			Genistein+ Daidzein(μg/g)	8 μg/g 이상 (반응액 5brix 기준)	Lot당 측정	육안	HPLC
분말화	SD초기 점검	SD	기기류, 벨트 및 벨브점검	기준표준 참조	Lot당	육안	
			반응액 최종 고형분(Brix)	5 brix 이상	작업시	육안	당도계
	SD가동 (SD고정수율 92% 이상)	SD	Inlet Tem.	185±3℃	작업시	육안	온도계 이치
			Outlet Tem.	85±3℃	작업시	육안	온도계 이치
		Feeding Pump	28±5.0	작업시	육안	게이지	
포장	포장기	포장 (205±5kg) 최종 수율 82±2%	충진 및 관리	작업표준	작업시	육안	
			라벨링	작업표준	작업시	육안	

	공 정 도	문서번호	
	콩 발효물	개정일자	
		개정번호	
		페이지	

공정명	작업명	사용설비	관리 또는 검사방법				
			항목	기준	주기	방법	검사설비
완제품검사	수분분석	수분측정기	수분(%)	10% 이하	Lot당	측정	수분측정기
	중금속분석	중금속분석기	중금속(납, ppm)	2ppm 이하	Lot당	측정	중금속분석기
	지표물질분석	HPLC	Genistein+Daidzein(µg/g)	150 µg/g 이상	Lot당	측정	HPLC
	미생물분석	배양기	대장균(<i>E. Coli</i>)	음성	Lot당	측정	배양기
일반세균(CFU/g)			1×10 ⁷ /g 이하	Lot당	측정	배양기	

<그림 165. 콩발효물 공정도 표준>

(2) 보리발효물 공정도 표준

	공 정 도		문서번호	
	보리 발효물		개정일자	2024. 11. 14
			개정번호	
			페이지	2/2

공정명	작업명	사용설비	관리 또는 검사방법				
			항목	기준	주기	방법	검사설비
작업준비	기차제 C.I.P	복용순 세척제 살균제 NaOH	이물	불검출	작업시	육안	
			이취	불검출	작업시	육안	
원료준비	자수정보리 (<i>Hordeum vulgare</i>) (즉대산) 250kg 투입	HPLC	β-glucan(mg/g)	5.0 mg/g 이상	작업시	분석	UV-Spectrophotometer
			이물	불검출	작업시	육안	
전처리	자수정보리 알파화	볶음솥	온도	150~180℃	작업시	육안	온도계 타이머
			시간	10~20분			
	자수정보리 분말화	분쇄기	RPM	10,000	작업시	육안	타이머
			시간	10분~20분			
	가수	유량제 발효기	가수량	전체 작업량의 90% (5분작업 시 4.5분)	작업시	육안	유량계
	가온	발효기	온도	55℃	작업시	육안	온도계
	자수정보리 분말	발효기	투입량	작업량의 5% (5분작업 시 250 kg)	작업시	육안	질량계
pH조정	pH 미터	NaOH 첨가량	1.5L±0.5	작업시	육안	pH 미터	
		pH	7.0±0.1				
효소투입	발효기	첨가량	α-amylase (biocatalyst, UK) (보리분말 단백질 1%)	작업시	육안	질량계	
			sumizyme (Shin-Nihon Chemical Co., Japan) (보리분말 단백질 1%)				
효소분해	발효기	반응시간	5시간	작업시	육안	타이머	
		반응온도	60℃				
		반응pH	초기 7.0				

	공 정 도		문서번호	
	보리 발효물		개정일자	
			개정번호	
			페이지	

공정명	작업명	사용설비	관리 또는 검사방법					
			항목	기준	주기	방법	검사설비	
살균	살균	스팀	살균온도	92±2℃	작업시	육안	온도계	
			살균시간	30분				
냉각	냉각	냉각수	냉각온도	35℃	작업시	육안	온도계	
			항온온도	30℃				
발효공정	분배양	발효기	효모(비키아자티니) 투입량	효모(비키아자티니) 반응액 5%(v/v)	작업시	육안	질량계	
			교반속도	100 rpm				
			발효온도	30℃				
	살균	발효기	발효시간	20시간	작업시	육안	타이머	
				발효 pH				7.0
				살균온도				92±2℃
	냉각	발효기	냉각시간	30분	작업시	육안	타이머	
				냉각온도				65℃
	냉각	발효기	항온온도	55℃	작업시	육안	온도계	
분말화	SD초기 점점	SD	기기류, 벨트 및 벨브 점검	기술표준 참조	Lot당	육안		
			반응액 최종 교형분 (Brix)	5 brix 이상				
	SD가동 (SD가동수율 92% 이상)	SD	Inlet Tem.	185±3℃	작업시	육안	온도계	
			Outlet Tem.	85±3℃				
			Feeding Pump	28±5.0				
	포장	포장 (225±5kg) 라벨 수율 90±2%	포장기	충진 및 라벨	작업표준	작업시	육안	레이저
라벨링				작업표준				

	공 정 도		문서번호	
	보리 발효물		개정일자	
			개정번호	
			페이지	

공정명	작업명	사용설비	관리 또는 검사방법				
			항목	기준	주기	방법	검사설비
완제품검사	수분분석	수분측정기	수분(%)	10% 이하	Lot당	측정	수분측정기
	중금속분석	중금속분석기	중금속(납, ppm)	2 ppm 이하	Lot당	측정	중금속분석기
	지표물질분석	HPLC	β-glucan(mg/g)	15 mg/g 이상	Lot당	측정	UV-Spectrophotometer
	미생물분석	배양기	대장균(<i>E. Coli</i>)	음성	Lot당	측정	배양기
일반세균(CFU/g)			1×10 ⁷ /g 이하	Lot당	측정	배양기	

<그림 166. 보리발효물 공정도 표준>

(3) 콩보리 발효복합물

샘표 식품			공 정 도			문서번호	
			콩보리 발효 복합물			개정일자	
						2019년 12월 10일 2020년 12월 10일	
공정명	작업명	사용설비	관리 또는 검사방법				
			항목	기준	주기	방법	장사설비
작업준비	기자제 C.I.P	브이믹서 세척제 살균제 NaOH	이물	불검출	작업시	속안	
			이취	불검출	작업시	속안	
원료준비	콩 발효물 100kg	HPLC	Genistein+ Daidzein($\mu\text{g/g}$)	150 $\mu\text{g/g}$ 이상	Lot당	속정	HPLC
			이물	불검출	작업시	속안	
	보리 발효물 100kg	HPLC	β -glucan(mg/g)	15 mg/g 이상	Lot당	속정	UV-Spectrophotometer
배합공정	혼합 (혼합 수율 95%이상)	브이믹서	혼합비율	콩 발효물 : 보리 발효물 = 1:1(w/w)	작업시	속안	절량계
			혼합조건	100 rpm, 10분	작업시	속안	
포장	포장 (최중 195 \pm 2kg)	포장기	충진 및 판터	작업표준	작업시	속안	
			라벨링	작업표준	작업시	속안	
완제품검사	수분속정기	수분속정기	수분(%)	10% 이하	Lot당	속정	수분속정기
	중금속분석기	중금속분석기	중금속(μg , ppm)	2ppm 이하	Lot당	속정	중금속분석기
	지표물질분석기	HPLC	β -glucan(mg/g)	8 mg/g 이상	Lot당	속정	UV-Spectrophotometer
			Genistein+ Daidzein($\mu\text{g/g}$)	80 $\mu\text{g/g}$ 이상	Lot당	속정	HPLC
	미생물 분석	배양기	대장균(<i>E. Coli</i>)	음성	Lot당	속정	배양기
일반세균(CFU/g)			1 \times 10 ⁴ /g 이하	Lot당	속정	배양기	

<그림 167. 콩보리 발효 복합물 공정도 표준>

(4) 콩보리 발효복합물 완제품 규격서

<그림 168. 콩보리 발효 복합물 완제품 검사 규격>

(5) 콩보리 발효복합물 성적서

샘표 샘표식품	완제품 검사 규격	문서번호	
	콩보리 발효복합물	개정일자	
		개정번호	
		페이지	

1. 적용 범위
이 규격은 당사에서 생산하는 "콩보리 발효복합물" 완제품의 제품규격 및 완제품 검사에 적용한다.

2. 품질
콩보리 발효복합물의 품질은 다음 표.1의 기준에 적합하여야 한다.

표.1 콩보리 발효복합물의 품질 기준

항 목	기 준
성 상	탁한 황갈색의 분말
수 분(%)	10% 이하
중금속(납, ppm)	2 ppm 이하
β-glucan(mg/g)	8mg/g 이상
Genistein+Daidzein(μg/g)	80μg/g 이상
일반세균 (CFU/g)	1×10 ⁴ /g 이하
대장균(<i>E. Coli</i>)	음성

3. 검사 방법

3.1 검사항목, 방식, 조건 및 주기는 다음 표.2에 따른다.

표.2 콩보리 발효복합물의 검사 방법

검사 항목	검사 방식	검사 조건	검사 주기
성상, 수분, 중금속(납), β-glucan, Genistein+Daidzein	체크검사	n=1, C=0	매 LOT별
일반세균, 대장균			

* 단, 년 2회(1회/6개월)이상 식품안전성의 적부향상에 대한 공인기관의 시험성적서를 받아 보관한다.

3.2 검사 Lot의 형성방법

샘표 샘표식품	완제품 검사 규격	문서번호	
	콩보리 발효복합물	개정일자	
		개정번호	
		페이지	

생산일별 1회 생산량을 1 검사 Lot로 하고 1개의 제품을 1검사단위로 한다.
3.3 시료 채취방법
1 검사 Lot 중에서 검사용 시료 1개를 채취한다.

4. 시험 방법
Peprich 시험표준에 따른다.

5. 검사
4.에 따라 시험하여 2.의 기준에 적합하여야 한다.

6. 합,부 판정 기준
합,부 판정 기준은 다음 표.3에 따른다.

표.3

검사항목	합,부 판정 기준
	2.항을 만족하여야 한다.

7. 검사Lot의 처리방법

7.1 합격 Lot의 처리
검사 결과 합격 Lot는 물류관리 절차서에 따라 입고 조치한다.
7.2 불합격 Lot의 처리
검사 결과 불합격 Lot는 부적합물관리 절차서에 따라 조치한다.

8. 검사 및 기록관리
검사 및 시험업무 절차서에 따른다.

SEMPIO FOODS SAFETY CENTER Tel 031)644-4644 Fax 031)644-4609 #231 Maegok-ri, Hobeop-myeon Icheon-si, Gyeonggi-do, 467-820, Korea				
TEST REPORT				
1. Customer	Gachon Univ.	2. Receipt No.	R-S-004	
Company	Gachon Univ.	3. Date of Receipt	2014. 07.14	
Representative	kim Sun-yeu	4. Date of Test	2014. 07.02	
Address	Incheon.(Korea)	5. Use of Report	Sample	
TEST RESULTS				
Sample	Test Item / Unit	Standard Limit	Result	Method
콩보리 발효복합물 Sample	Appearance	Dark brown powder	Fitness	-
	Moisture (% w/w)	Max. 10.0	4.8	Food Code 7.1.1)
	β-glucan (mg/g)	Min. 8.0	10.1	건강기능식품공전
	Genistein+Daidzein (μg/g)	Min. 80.0	152.8 (76.6+76.2)	건강기능식품공전
	Heavy Metal (Pb, ppm)	Max. 2.0	N.D	Food Code 7.6.2)
	General Bacteria (CFU/g)	Max. 1 X 10 ⁴	3.4 X 10 ²	Food Code 8.2)
	<i>E. coli</i>	Negative	Negative	Food Code 8.6)
Raw Material	Soybean, Barley			
* The above test report is the result of sample which is offered by customer				
Affirmation	Technician Kim dae-eung (Signature)	Approval	Technical Manager Jung kyung-hoon (Signature)	
14 / July / 2014				
PRESIDENT, SEMPIO FOODS SAFETY CENTER				
The above test certificate is the accredited test results by Korea Laboratory Accreditation Scheme, which signed the ILAC-MRA.				
Page (1) of (1)				
SSCP	26-03 Rev. No.05	SEMPIO FOODS SAFETY CENTER	A4(210×297mm)	

<그림 169. 콩보리 발효복합물 성적서>

(6) 콩보리 발효복합물 외부 공인기관 의뢰 지표물질 성적서
(한국기능식품연구원, 8월)

제 D2014071843 호			
검 사 성 적 서			
검체명	FBS-SP(콩보리발효복합물)	제조일자 (유통기한)	2014-07-01 (2016-07-01)
의뢰인	입재명 생표식품(주)오송연주소	상 명	박진선
주소	충청북도 영주시 흥덕구 오송읍 만수리 471	검수년월일	2014-07-31
제조번호	FBS-140701	검체접수번호	D2014071843
검사의뢰목적	제출용		
귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자: 김 원 희			
시험항목	결과	검사담당자	
베타글루칸(mg/g)	11.89mg/g	이수아	
Baidzein(mg/g)	0.10mg/g	조미주	
Genistein(mg/g)	0.10mg/g	조미주	
건강기능식품공전			
2014년 8월 12일			
한국기능식품연구원			
<small>(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.kdifi.or.kr 전화: 02-550-0100 FAX: 02-550-0400-1</small>			

<그림 170. 콩보리 발효복합물 외부 공인기관 의뢰 지표물질 성적서>

(가) 베타글루칸

실험보고서

실험연구원 : 이수아

기기분석 조건

- Instrument	8453 UV-Visible Spectrophotometer
- Detector	UV(470nm)
- 대조액	공시험 용액

표준용액 조제

Standard	Concentration(μg/ml)					stock solution
	D-(+)-Glucose	10.468	15.702	31.404	62.809	
D-(+)-Glucose	10.468	15.702	31.404	62.809	125.62	502.480

표준물질명	제조사	규격	Cat. No.	Lot. No.	순도 %
D-(+)-Glucose	SIGMA	250g	G7528	BCBC1163	99.9

실험결과

1) 계산식

$$\text{베타글루칸함량(mg/g)} = S \times \frac{a}{\text{시료재취량}} \times 0.9 \times \frac{1}{1000} \times 10$$

S : 시험용액중의 글루코오스 농도(μg/ml)
a : 시험용액의 전량(ml)
0.9 : 베타글루칸 전환계수(162/180)
10 : 시험용액의 희석배수

2) 실험결과

	시험용액중의 글루코오스 농도 (μg/ml)	시험용액의 전량 (ml)	시료재취량 (g)	희석배수	베타글루칸함량 (mg/g)
1	14.00400	200	2.0890	10	12.0666
2	17.78100	200	2.7230	10	11.7208
평균					11.8937

판 경

검사항목	결과값 (mg/g)	검체 표시량 (mg/g)	표시량 대비율 (%)	규격기준	적부판정
베타글루칸함량	11.89				

참고문헌

참고사항



접수번호 : D2014071843
검 체 명 : FBS-SP(콩보리발효복합물)
식품유형 : 기타
시험항목 : 베타글루칸
시험일자 : 2014-08-07 ~ 2014-08-08
검사목적 : 제출용

시험법근거 건강기능식품공전 4, 건강기능식품 시험법 3, 개별 성분별 시험법 3-25 베타글루칸 시험법에 준함

표준용액 조제

- 글루코오스 표준용액 증류수에 녹여 표준용액을 만든다. (1mg/ml)
- 증류수에 희석하여 표준용액 (μg/ml) 농도별 표준용액 (μg/ml) 을 만든다.

전처리방법

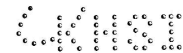
- 검체 및 공시험용 등시에 실시한다.
- 검체를 정량이 많아 물 100ml로 정량한다.
- 아말리아(재취한 시료 g당 약 400unit)를 40~200mg 취하여 넣고 0.1N NaOH로 pH 6.9로 한 후 20℃에서 2시간 진탕한다.
- 0.1N HCl로 pH 5.0으로 하고 셀룰라아제(재취한 시료 g당 약 10unit)를 넣고 37℃에서 2시간 진탕한다.
- 프로테아제(재취한 시료 g당 약 55unit) 약 15~80mg를 넣고 0.1N NaOH로 pH 7.5로 한 후 37℃에서 2시간 진탕한다.
- 아밀로글루코시다제(재취한 시료 g당 약 890unit) 약 20~100mg를 넣고 0.1N HCl로 pH 4.8로 한 후 60℃에서 2시간 진탕한다.
- 효소분해물에 95% 에탄올 400ml를 가하여 4℃에서 12시간동안 침전 후 원상분리(10000rpm, 10분)하여 취한다.
- 다시 80% 에탄올 500ml를 침전물에 가하여 4℃에서 1시간동안 침전 후 원상분리(10000rpm, 10분)한다.
- 침전물에 물 20ml를 가한 후 초순게나리지를 이용하여 균질화 하고 용로 100ml 되도록 증용한다.
- 적정농도로 희석하여 시험용액으로 한다.

시험조건

- 각각의 25ml 시험관에 5% 파닐용액 1ml를 넣고 농도별 표준용액을 각각 1ml를 가한다.
- 시험용액으로 0.1ml와 증류수 0.3ml를 가한 후 10초간 잘 흔들어서 섞어 용액 5ml를 가한다.
- 20분간 상온반응 시켜 470nm에서 측정한다.

시약

- Thermostable α-amylase: Megazyme, E-BLAAM
- Cellulase: Sigma, C8546
- Protease: Megazyme, E-SPRIT
- Amyloglucosidase: Megazyme, E-AMGDF



<그림 171. 콩보리 발효복합물 외부 공인기관 의뢰 지표물질 성적서:베타글루칸>

(나) 다이드제인, 제니스테인

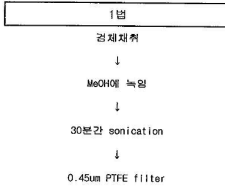
실험보고서

접수번호 : D2014071843
 검체명 : FBS-SP(콩보리복합발효물)
 식염유형 : 기타
 시험항목 : Daidzein, Genistein
 시험일자 : 2014-08-06
 검사목적 : 참고용
 시험법근거 : 건강기능식품공전 제 4. 건강기능식품 시험법 3. 개별 성분별 시험법 3-54 (대두이소플라본)

실험연구원 : 조미주

1. 실험방법

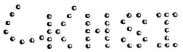
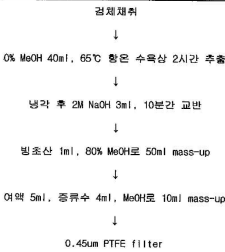
1) 전처리 과정



2) 표준용액의 조제

회사명 (Cat. No.)	Lot. No	순도(%)	stock (ug/ml)
Daidzin wako (040-27741)	PDJ6842	99.7	334.19
Glycitin wako (077-04891)	PDH1023	98.9	357.23
Genistin wako (070-04681)	PDQ1057	100.0	359.60
Daidzein wako (043-29071)	PDE5682	98.7	326.50
Glycitein wako (070-04701)	PDL4780	99.6	368.52
Genistein wako (073-05531)	PDH1168	99.8	388.00
STD2	STD3을 1/5로 희석		
STD8	STD4을 1/5로 희석		
STD4	STD5을 1/5로 희석		
STD5	STD6을 1/5로 희석		
STD6	stock solution		

2. 2.0g 검체채취



3) 기기분석 조건

HPLC 분석조건

- Column: Capcellpak UG120 C18 (250mm x 4.6mm, 5)
- Column temperature: 40°C
- Injection volume: 5ul
- Mobile phase: A : 물/메탄올/초산(88:10:2)
B : 메탄올/초산(98:2)

Time	A(%)	B(%)	Flow rate(ml/min)
0	90	10	1.0
21	60	40	1.0
32	60	40	1.0
35	40	60	1.0
36	90	10	1.0
45	90	10	1.0

- Detector

Signal(nm)	Bw(nm)
260	8

2. 실험결과

1) 계산식
$$\text{량량 (mg/g)} = \frac{A \times B \times V}{C \times 1000}$$

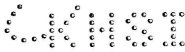
 A: 시험용액의 농도(ug/ml)
 B: 최종량(ml)
 C: 검체채취량(g)
 V: 희석배수

2) 실험결과

	검광선 결과 (ug/ml)	용액량 (ml)	시료무게 (g)	희석배수	결과값 (mg/g)
Daidzein	20.82956	50	10.0434	1	0.103696
Genistein	19.23891	50	10.0434	1	0.095779

3. 결과 판정

	결과값 (mg/g)	표시량 (mg/g)	표시량 대비율(%)	기준규격	적부판정
Daidzein	0.10				
Genistein	0.10				



<그림 172. 콩보리 발효복합물 외부 공인기관 의뢰 지표물질 성적서:다이드제인,제니스테인>

(7) 콩보리 발효복합물 외부 공인기관 의뢰 일반 성분 및 잔류농약 외 성적서
 (한국기능식품연구원, 8월)

제 D2014090663 호 **검 사 성 적 서**

검체명	콩보리발효복합물	제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업체명 생표식품(주)오송연구소 주소 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 만수리 471 성명 박진진	검사년월일	2014-09-16
계조번호	140714	검체검수번호	D2014090663
검사의뢰목적	제출용		

귀하가 우리 연구원에 검사뢰의한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자:김 천 희

시험항목	결과	검사담당자
대장균	음성	이정미
납(mg/kg)	0.0457mg/kg	류미진
총비소(mg/kg)	0.1404mg/kg	류미진
중수준(mg/kg)	0.006mg/kg	박세롬이
카드뮴(mg/kg)	0.0410mg/kg	류미진
열량(Kcal/100g)	442.98Kcal/100g	한아름
탄수화물(%)	30.21%	한아름
조지방질(%)	47.68%	이정미
조지방(%)	14.60%	주은선
수분(%)	0.00%	김혜윤
회분(%)	7.51%	김혜윤
나트륨(mg/100g)	220.66mg/100g	남은진
성상	이미, 이취가 있고 고유외 향미가 있는 타한 황갈색의 분말	이선경
총아플라톡신(µg/kg)	불검출	박세롬이
푸로니신(µg/kg)	0.0036µg/kg	박세롬이
오르라톡신A(µg/kg)	불검출	박세롬이
데옥시니발레논(mg/kg)	불검출	박세롬이
제랄렌(µg/kg)	불검출	박세롬이
비에치세(mg/kg)	불검출	김용수
비펜스린(mg/kg)	불검출	김용수
카보후린(mg/kg)	불검출	김소영
탈로트루나리프(mg/kg)	불검출	김용수
글로트루나리프(mg/kg)	불검출	김용수
클로트루나리프(mg/kg)	불검출	김용수
클로트루나리프-메틸(mg/kg)	불검출	김용수

귀하가 우리 연구원에 검사뢰의한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자:김 천 희

시험항목	결과	검사담당자
싸이알로프렌(mg/kg)	불검출	김용수
싸이피메트렌(mg/kg)	불검출	김용수
싸이프로디닐(mg/kg)	불검출	김용수
디디미(mg/kg)	불검출	김용수
다이아지논(mg/kg)	불검출	김용수
디크보로스(mg/kg)	불검출	김용수
디드롤(mg/kg)	불검출	김용수
엔도살판(mg/kg)	불검출	김용수
페나리올(mg/kg)	불검출	김용수
페니트로지온(mg/kg)	불검출	김용수
펜프로파스틴(mg/kg)	불검출	김용수
펜탈라레이프(mg/kg)	불검출	김용수
후투디속소닐(mg/kg)	불검출	김용수
이마자린(mg/kg)	불검출	김용수
이프로디온(mg/kg)	불검출	김용수
이소프로요안(mg/kg)	불검출	김용수
밀라치온(mg/kg)	불검출	김용수
메스델(mg/kg)	불검출	김소영
메티다지온(mg/kg)	불검출	김용수
파클로부타돈(mg/kg)	불검출	김용수
파라치온(mg/kg)	불검출	김용수
파라치온-에틸(mg/kg)	불검출	김용수
파메스린(mg/kg)	불검출	김용수
펜트에이브(mg/kg)	불검출	김용수
포스메트(mg/kg)	불검출	김용수
피리미카브(mg/kg)	불검출	김용수
프로시미논(mg/kg)	불검출	김용수
퀴트렌(mg/kg)	불검출	김용수
트리아디메톤(mg/kg)	불검출	김용수
트리프로무미클(mg/kg)	불검출	김용수
트리아조포스(mg/kg)	불검출	김용수
프로탈라트즈(mg/kg)	불검출	김용수
메복시페노자이드(mg/kg)	불검출	김소영
보스알리드(mg/kg)	불검출	김소영
아세타미프이드(mg/kg)	불검출	김소영

귀하가 우리 연구원에 검사뢰의한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자:김 천 희

시험항목	결과	검사담당자
아주시스트로린(mg/kg)	불검출	김소영
아트라진(mg/kg)	불검출	김용수
에치온(mg/kg)	불검출	김용수
이프로발리카브(mg/kg)	불검출	김용수
카바릴(mg/kg)	불검출	김소영
랩탈(mg/kg)	불검출	김용수
들크로포스메일(mg/kg)	불검출	김용수
트리플루무론(mg/kg)	불검출	김용수
티아미복삼(mg/kg)	불검출	김소영
펜레사미드(mg/kg)	불검출	김소영
프로피노스(mg/kg)	불검출	김용수
플루벤디아마이드(mg/kg)	불검출	김소영
플루페낙수론(mg/kg)	불검출	김소영
피마크로스트로빈(mg/kg)	불검출	김소영
피리메타닐(mg/kg)	불검출	김소영
피리미포스-메틸(mg/kg)	불검출	김용수
렉사프로무론(mg/kg)	불검출	김소영

2014년 9월 23일
한국기능식품연구원

(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.khfi.or.kr> (031)628-0400-1

<그림 173. 콩보리 발효복합물 외부 공인기관 의뢰 일반 성분 및 잔류농약 외 성적서>

5. 제3협동: 기능성 소재화 및 가공식품개발에 적합한 영광지역 적응 우수 품종 특성평가 및 선발(영광농업기술센터)

(1) 품종별 생육 특성 조사 결과

(가) 파종일 : 2012. 10. 24

(나) 품 종 : 흰찰쌀보리, 새찰쌀보리, 보석찰쌀보리, 자수정찰쌀보리, 강호청쌀보리,

(다) 생육특성

품종	형태적 특성	간장(cm)	출수기	천립중(g)	이삭수(개/㎡)	영화수(개/이삭)	비고
흰찰쌀보리	까락 짧음, 열은 녹색, 6조, 찰성	63~67	4.23	25.0	531.2	54.2	
새찰쌀보리	이삭이 작고, 알이 굵음, 6조, 찰성	83~87	4.24	29.4	548.3	57.1	
자수정찰보리	자색, 6조, 찰성	70~75	4.26	27.2	585.1	57.3	
보석찰보리	자색, 6조, 찰성	74~83	4.25	29.0	546.2	56.2	
강호청보리	청색, 6조, 메성, 까락이 긴 편입	73~74	4.23	30.0	536.2	56.2	

<표 67. 품종별 생육 특성 조사 결과>

(나) 파종후('12.10.24) 기상악화로 생육 부진 → 적기 파종시기는 10월 20일 ~ 27일 판단됨

(다) 간장은 쌀보리는 전년·평년보다 약간 길고, 이삭수가 적은 것은 재생기(2.14) 이후 최저기온이 낮아 분얼이 적었던 것으로 판단됨

(라) 1이삭당 영화수는 전년·평년과 비슷한 수준임

(마) 발아보리 제조(바우보리연구소)후 기능성 성분 분석(경희대학교) 의뢰중

① 발아보리 제조 : 자수정찰보리 외 4품종(100kg/품종별 20kg)

[별지 제 1호 서식]

접 수 증			
접수번호	2014-0368700	회사명	샘표식품(주)
건 명	콩보리 발효복합물		
담당 과	식품안전정책국 건강기능식품기준과	접수자	서정훈
위 건명의 민원사안을 접수하였습니다.			

접수일시 : 2014. 10. 24 17:43

<그림 174. 개별인정형 접수증>

-본 연구결과를 바탕으로 콩보리 발효복합물의 제품화 및 시장에서 성공을 위하여 식품의약품

안전처에 그림 174와 같이 개별인정형 인증을 신청하였음.

제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연차별 연구개발 목표 및 수행현황

가. 1차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2012)	세포주모델을 이용한 보리 및 콩 유래산물의 피부주름개선과 피부보습효능 검증 및 작용기작 규명	보리 및 콩 유래산물의 추출, 분획, 발효방법에 따른 항산화 활성 및 총 폴리페놀 함량 측정	100	<ul style="list-style-type: none"> - 보리 및 콩 분말 및 발효물의 항산화 활성을 측정하기 위해 DPPH scavenging activity assay 수행 - 총 폴리페놀 함량을 측정하기 위해 Total phenol phytochemical assay를 수행
		보리 및 콩의 추출 분획, 발효방법에 따른 시료의 피부주름완화 효능을 세포주 모델을 활용하여 검증	100	<ul style="list-style-type: none"> - 피부노화 조절 효소인 MMP-1, 발현에 미치는 효과 확인 (zymography, western blot, RT-PCR, ELISA). - MMP-1 발현조절 전사인자인 AP-1 활성억제 효과 확인 (Luciferase assay). - 보리 및 콩 유래산물의 세포 내에서 교원질 및 탄력섬유 합성량의 증가 효과 확인. - 결과를 바탕으로 피부주름완화 효능이 뛰어난 보리 및 콩 유래 소재 선별
		동물모델에서 선별된 보리 및 콩 유래산물의 자외선에 의한 피부주름완화 효능 검증	100	<ul style="list-style-type: none"> - 콩 배아와 발아보리 혼합물이 첨가된 식이 공급 - 식이 효율 및 체중 증가 측정 - 매주 식이 공급량 및 잔존량, 동물의 체중을 측정함. - 피부 주형 제조 및 분석 procollagen type 및 MMP-1 변화 - 면역 조직 형광법을 이용한 피부의 주름 관련 생체지표인자 Procollagen type I와 MMP-1의 측정
		보리 및 콩 유래산물의 분석법 확립	90	<ul style="list-style-type: none"> - 보리원물 및 보리 발효물에서의 LC-MS profile 비교

				<ul style="list-style-type: none"> - 보리 중 유용성분을 분석하고 보리원물 및 보리 발효물에서의 지표성분을 탐색 - Prep-HPLC 분리조건을 위한 method develop
1차년도 (2011)	보리 및 콩을 이용한 기능성 식품 최적화 및 제품화	보리 및 콩 발효 공정을 위한 원료의 표준화 및 시장 분석	100	보리 및 콩의 발효 공정을 위한 시장 분석 진행: 보리 전남 영광군 자생 보리 (2009-11년, 3년) 자료 분석 보리 및 콩의 발효 공정을 위한 원료 표준화: 효모 균주(1종) 스크리닝 및 최적 배양 조건 확립 보리 및 콩 유래산물의 분석법 확립 보리 및 콩 발효 공정을 통한 지표물질 분석법 확립: 베타글루칸/식이섬유 보리 및 콩 발효 공정 표준화: Lab scale(5L, 50L), Pilot scale(300L, 3(ton)) 보리/콩 발효 소재 표준화 진행: 보리발효물-SP Lot 별 (3개 이상) 지표물질 분석 진행 보리 발효 공정을 통한 기능성 소재 시제품 개발: 보리발효유 1종
	영광지역 적응종 특성 평가 재배기술 정립	지역 적응형 우수보리 품종 특성평가 및 선발	100	품종별 생육특성 조사 -초장, 경수, 출수기, 수확기 등 품종별 기능성 성분 조사

나. 2차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차년도 (2013)	세포주모델을 이용한 보리 및 콩 유래산물의 피부 주름개선과 피부 보습효능 검증 및 작용기작 규명	세포주모델에서 보리 및 콩 유래산물의 피부보습효능 검증	100	<ul style="list-style-type: none"> * 피부보습 인자인 hyaluronan synthase 2 (HAS2)의 발현 및 활성을 western blot, RT-PCR을 통해 단백질 수준 및 mRNA수준을 확인 * 피부보습 활성에 대한 효능을 기존에 판매되는 소재인 세라마이드와 비교
	자연노화 모델에서 선별된 보리 및 콩 지표물질의 피부보습 효능 검증 보리 및 콩 유래산물 분석 및 프로파일링	자연노화모델에서 보리 및 콩 유래산물의 피부보습효능 검증	100	<ul style="list-style-type: none"> * 표피의 수분 함량 측정 -광노화 유발 및 보리, 콩 혼합식이 공급에 따른 표피 수분 함량 변화를 corneometer를 이용하여 측정함. * 보습 관련 생체지표 변화 측정 -자연노화모델에서의 보리콩 혼합식이 공급에 따른 보습 관련 생체지표의 변화를 HPLC,

			RT-PCR, western blotting, 아미노산 분석기를 이용하여 각 실험군의 표피에서 측정함.
	보리 및 콩 유래산물의 분석 및 프로파일링	100	* 콩의 지표성분을 분석하고 각 시료들의 HPLC, LC-MS의 profile을 비교분석 * 보리의 지표성분을 분석하고 각 시료들의 HPLC, LC-MS의 profile을 비교분석
	보리 및 콩 유래산물의 안전성 연구	90	* 안전성 연구 : 개발된 원료의 특성에 따라 필요한 안전성 자료를 확보함
	자수정 찰보리 유래 지표물질의 분석, 프로파일링	100	* 자수정 찰보리 유래산물의 LC-MS profile 및 분석법 확립, 지표물질의 분석
	자수정 찰보리 유래 활성물질 분리	100	* prep HPLC를 이용한 효율적인 분리를 위한 조건 확립
보리 및 콩을 이용한 기능성 식품 최적화 및 제품화	보리 및 콩 유래 추출물 또는 발효공정 최적화	100	* 보리 품종 별 효모 발효를 통한 품질 지표 최적화 * 5L/50L fermentor를 통한 효모 단일/복합 발효 최적화 * 회분식/유가식 발효공정에 따른 품질 지표 비교 * 실험계획법(DOE)을 적용한 발효 공정 최적화 수립
	Scale-up을 통한 최적화를 통한 대량 생산 체제 구축	100	* Scale-up을 통한 회분식/유가식 발효공정에 따른 품질 지표 비교 * 1ton fermentation 생산 공정 표준화 수립 * 실험계획법(DOE)을 적용한 품질 표준화 및 대량생산 표준화 수립
	시제품 개발	100	* 콩/보리 발효 소재와 자사 기존 피부미용 소재 응용을 통한 피부미용 기능성 시제품 3종 제품개발 - 겔 타입 파우치 음료 1종 - 겜 제재 1종 - 환 제재 3종 * 시제품 관련 사내 패널 HUT 조사

				<ul style="list-style-type: none"> - 파우치 음료 1종 대상 - 기호도 - 선호도
	영광지역 적응 품종 특성 평가 및 재배기술 정립	품종별 지역적응 특성 조사 밭아 보리의 특성 조사	100	<ul style="list-style-type: none"> * 품종별 생육특성 * 밭아보리의 성분분석

다. 3차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구내용	달성도 (%)	연구범위
3차 년도 (2014)	세포주모델을 이용한 보리 및 콩 유래 산물의 피부주름개선과 피부보습효능 검증 및 작용기작 규명	세포주 모델에서 보리 및 콩 유래 유효 기능성물질의 작용기작을 분자생물학적 기법 및 컴퓨터 모델링을 이용하여 규명	100	<ul style="list-style-type: none"> * 기능성물질의 피부노화 및 보습저하에 관련된 MAPKs, PI3K 등과 같은 신호전달 체계와 관계 있는 인산화 단백질 효소의 발현 및 활성화에 대한 저해효과 확인 (Western blot, Kinase assay) * 기능성물질의 피부노화 및 보습저하에 관련된 직접적인 표적 단백질을 탐색하고, 기능성물질과 관련된 표적단백질과의 결합분자 구조를 규명 (Binding assay, ATP competition assay, computer modeling)
	동물모델에서 보리 및 콩 유래 효 지표물질의 용기작 규명	동물모델에서 보리 및 콩 유래 산물의 피부주름완화 및 보습효능에 대한 작용기작 규명 및 최적배합비에 따른 시료의 최적용량비 결정	100	<ul style="list-style-type: none"> * 혈액 및 피부표피/진피에서의 항산화 생체 지표 변화 측정 <ul style="list-style-type: none"> - 광노화 유발 및 콩보리 식이 공급에 따른 적혈구의 항산화 효소 (SOD/Catalase/GSH-Px) 활성 및 혈장의 TRAP 활성을 측정함. -동물모델에서의 최적배합비에 따른 시료의 최적용량비 결정
	임상실험을 통한 피부주름 및 보습 효능 검증	임상실험을 통한 보리 및 콩 유래 산물의 피부주름완화 및 보습 효능 검증	100	<ul style="list-style-type: none"> * 임상을 통한 보습 효능 평가 : 제품섭취에 따른 피부 보습효능 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 각질량 변화 측정 :tape stripping - 수분량 변화 측정 :Corneometer - 경피수분증발량 (TEWL) 측정 * 임상을 통한 피부 주름개선 효능 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 육안평가, 설문평가

				<ul style="list-style-type: none"> - Replica 제작, 영상분석을 통한 주름개선 효능평가 - Primos를 활용한 주름의 입체 영상 분석
인체 적용시험 적용을 위한 최종 prototype 제품 개발	제형화 및 소비자 조사	100	<ul style="list-style-type: none"> * 음료/요구르트/과립 타입 * 소비자 포지셔닝/기호도 조사 * 기능성 발현을 피드백 조사 	
	유통기한 설정 및 안정성 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> * 유통기한 설정 * 기능성/품질 지표의 안정성 	
	상표 등록 및 지적재산권 확보	100	상표 /용도 특허 검토	
피부미용 관련 소재/제품 개별 인정형 신청	기능성 원료 또는 제품에 대한 개별인정 진행	100	<ul style="list-style-type: none"> * 콩/보리 발효물 관련 기준규격 완료 * 식약처 상담을 통한 신청 서류 준비 및 제출완료 	
전사적 관리를 통한 피부미용 개선 기능성식품 사업화 구축	기획/마케팅/디자인/유통/영업 관련 부서의 공유를 통한 사업화 구축	100	* 기획/마케팅/디자인/유통/영업 관련 부서의 공유를 통한 사업화 구축	
영광지역 적응 품종 특성 평가 및 재배기술 정립	자수정찰쌀보리 지역적응 특성 조사 -자수정찰쌀보리 특성 조사	100	<ul style="list-style-type: none"> * 자수정찰쌀보리 생육특성 <ul style="list-style-type: none"> - 생육상황 특성 <ul style="list-style-type: none"> · 초장 79cm, 수량 395kg/10a ※ 다른 품종보다 초장은 약간 큰 편이며 수량은 낮은 편임(15%) · 비료성분(질소질)이 많을 경우 자수정 색깔 발현이 적게 나옴. · 생육특성상 타 품종보다 수확기가 늦음으로서 6월 중순 수확 · 도정시 타 품종보다 도정 비율을 높게 도정 <ul style="list-style-type: none"> →일반보리 80% 자수정보리 85% 도정 - 연구과제 원료곡 공급 <ul style="list-style-type: none"> · 음료, 기능성가공업체 원료공급 	

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

가. 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분	특허		학술발표		강연	소재개발	제품화	논문		기타
	출원	등록	구두발표	포스터 발표	공개강연			SCI	비SCI	
1차 년도	목표	1						1		
	달성	0		1	1	1				
2차 년도	목표	1			1	1		2		
	달성	3		1	1	1	3	2		
3차 년도	목표		1	1		1	3	4		
	달성	2	2	1	2	3		6		
계	목표	2	1	2	1	2	2	3	7	
	달성	5	2	3	4	4	2	3	8	

* 연차별 연구성과 목표는 향후 연차평가 등의 정량적 평가지표로 활용됨

** 연구성과는 연구계획에 따라 도출된 것으로 예시와 같이 작성

나. 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	1	1		1	2
	달성				1	

2. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	공동저자	교신저자				
2013. April	Luteolin suppresses UVB-induced photoaging by targeting JNK1 and p90RSK2	Sung Hwan Lim	Sung Keun Jung, Sanguine Byun, Eun Jung Lee, Jung Ah Hwan	Ki Won Lee, Hyong Joo Lee	Journal of Cellular and Molecular Medicine	Vol.17(5), 672 - 680	국외	SCI
2013. April	NADPH oxidase is a novel target of delphinidin to inhibits	Tae Gyu Lim	Sung Keun Jung, Jong-eun Kim, Yoona	Ki Won Lee	Experimental Dermatology	Vol.22(6), 428-430	국외	SCI

	UVB-induced MMP-1 expression in human dermal fibroblasts		Kim, Hyong Joo Lee, Tae Su Jang,					
2013. November	Rutin inhibits B[a]PDE-induced cyclooxygenase-2 expression by targeting EGFR kinase activity	Seunghwan Choi,	Tae-Gyu Lim, Mun Kyung Hwang, Yoon-A Kim, Jiyoung Kim, Nam Joo Kang, Tae Su Jang, Jun-Seong Park, Myeong Hun Yeom, Ki Won Lee	Ki Won Lee	Biochemical pharmacology	Vol.86(10), 1468-75	국외	SCI
2013. October	MLK3 is a direct target of biochanin A, which plays a role in solar UV-induced COX-2 expression in human keratinocytes	Tae-Gyu Lim	Jong-Eun Kim, Sung Keun Jung, Yan Li, Ann M. Bode, Jun-Seong Park, Myeong Hun Yeom, Zigang Dong,	Ki Won Lee	Biochemical pharmacology	Vol.86(7),896-903	국외	SCI
2014. March	Anthocyanidins, novel FAK inhibitors, attenuate PDGF-BB-induced aortic smooth muscle cell migration and neointima formation	Joe Eun Son	Eunjung Lee, Sung Keun Jung, Jong Eun Kim, Min-Ho Oak, Ki Won Lee	Hyong Joo Lee	Cardiovascular Research	Vol.101 503-512	국외	SCI
2014	6,7,4'-trihydroxyisoflavanone suppressed solar UV induced Matrix Metalloproteinase 1 through targeting PKC α directly	Tae-Gyu Lim	Jong-Eun Kim, Sung-Young Lee, Jun Seoung Park, Myung Hun Yeom, Hanyong Chen, Ann M. Bode, Zigang Dong	Ki Won Lee	International Journal of Molecular Science	Accepted	국외	SCIE
2014. September	Dietary Fermented Soybean Suppressed UVB-Induced	Taek Hwan Lee	Moon Ho Do, Young Lyun Oh, Dong Woon Cho,	Sun Yeou Kim	Journal of Agricultural and Food Chemistry	Vol.62(36) 8962-8972	국외	SCI

	Skin Inflammation in Hairless Mice via Regulation of the MAPK Signaling Pathway		Seung Hyun Kim					
	Effects of fermented soybean and barley extract on UV irradiation-induced skin aging in hairless mice	Oh Wook Kwon	Ramu Venkatesan, Moon Ho Do, Eunhee Ji, Dong, Woon Cho, Ki Won Lee	Sun Yeou Kim	Food Science and Biotechnology	Accepted	국내	SCIE

3. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2013	보리 추출물 또는 에리오딕티올을 포함하는 콜라겐 분해 방지 또는 콜라겐 합성 촉진용 조성물	가천대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0005764	2013	보리의 기능성 다당류를 증가시키는 방법	샘표식품(주)	대한민국	10-1343944-0000
2013	복합효모발효 보리를 함유하는 피부 주름 개선 및 피부 보습용 식품 및 화장료 조성물	가천대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0054658	2014	복합효모 발효 보리를 함유하는 피부 주름 개선 및 피부 보습용 식품 및 화장료 조성물	가천대학교 산학협력단	대한민국	10-1449282

2013	복합효모 대두 발효물을 함유하는 피부 주름 개선 및 피부 보습용 식품 및 화장료 조성물	가천대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0054659					
2014	콩 및 보리의 발효복합물을 포함하는 기능성 식품 조성물	샘표식품 (주)	대한민국	10-2014-013367					
2014	콩 및 보리의 발효복합물을 포함하는 기능성 화장품 조성물	샘표식품 (주)	대한민국	10-2014-013368					

4. 기술료 징수 현황

기 징수액	당해년도 징수액	향후 징수액	합계

5. 사업화 현황

사업화명	사업화내용	사업화 업체 개요				기매출액	당해년도 매출액	매출액 합계
		업체명	대표자	종업원수	사업화형태			

6. 인력활용/양성 성과

가. 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
(1세부)1	0	2	0	0	0	2	2	0	0
(1협동)3	1	2	0	0	1	2	3	0	0

나. 장·단기 연수지원 성과

장기 (2월 이상)		단기 (2월 미만)	
국내	국외	국내	국외

다. 산업기술인력 양성 성과

프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원

7. 경제사회 파급효과

산업지원 성과 (단위 : 건)				고용창출 성과 (단위 : 명)		
기술지도	기술이전	기술평가	합계	창업	사업체 확장	합계

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당사항 없음

제 7 장 연구시설·장비 현황

*구매금액이 3천만원 이상인 연구시설·장비 구매현황 (해당없음)

연구시설·장비명	구매금액 (원)	구매일자	연구시설·장비 활용용도	설치장소	국가과학기술지식정보 시스템 등록번호

제 8 장 참고문헌

- 1) 서형필 외 (2002), Production of β -1,3/1,6-glucan by *Aureobasidium pullans* SM-2001, Korean J. Biotechnol. Bioeng. 17; 376-380.
- 2) Naohito et al (1999), Solubilization of yeast cell-wall β -(1,3)-D-glucan by sodium hypochlorite and dimethyl sulfoxide extraction, Carbohydr. Research 16; 161-172.
- 3) Bobek, p et al (2001), Effect of pleuran (beta-glucan from pleurotus ostrealus) on the antioxidant status of the organism and on dimethylhydrazine-induced precancerous lesion in rat colon, Br. J. Biomed. Sci. 58(3), 164-168.
- 4) 김정희 외 (2006), Determination of glucan from *Mycellium* and its activity against methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus*, The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 19 : 55-59.
- 5) 이석준 외 (2009), *Aureobasidium pullans* IMS-822가 생산하는 β -(1-3)(1-6)-glucan의 특성 분석, The Korean Journal of Microbiology. 45:63-68.
- 6) 서형필 외 (2002), Production of β -1,3/1,6-glucan by *Aureobasidium pullans* SM-2001, Korean J. Biotechnol. Bioeng. 17:376-380.
- 7) 최희돈 (2000), 메성 및 찰성보리 β -glucan의 분자구조, 식품기순 제 13권 제 1호.
- 8) Hee-kyoung Jung et al (2007), Production and physicochemical characterization of β -glucan produced by *Paenibacillus polymyxa* JB115, Biotechnology and bioprocess engineering 12; 713-719.
- 9) 류강 외 (2001), The structure analysis and biosynthesis of β -glucan by *Alcaligenes faecalis*, J. Biotechnol, Bioeng 4; 409-414.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.