

11-1543  
000-001  
502-01

낙과  
(미숙과)를  
이용한  
고부가  
가치  
뷰티케어  
제품개발

최  
종  
보  
고  
서

2016

농  
림  
축  
산  
식  
품  
부

낙과(미숙과)를 이용한 고부가가치 뷰티케어 제품개발 R&D Report

발간등록번호

11-1543000-001502-01

# 낙과(미숙과)를 이용한 고부가가치 뷰티케어 제품개발

최종보고서

2016. 10. 24.

주관연구기관 / 좋은영농조합법인  
협동연구기관 / (재)전남생물산업진흥원  
식품산업연구센터  
목포대학교 산학협력단

농림축산식품부

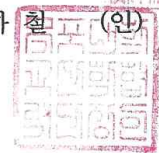
## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “낙과(미숙과)를 이용한 고부가가치 뷰티케어 제품개발” (개발기간 : 2013. 09. 25. ~ 2016. 09. 24.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2016. 10. 24.

주관연구기관명 : 좋은영농조합법인 (대표자) 이 기 선  
협동연구기관명 : (재)전남생물산업진흥원  
식품산업연구센터 (대표자) 정 기 호 (인)  
목포대학교 산학협력단 (대표자) 송 하 철 (인)



주관연구책임자 : 이 기 선  
협동연구책임자 : 방 미 애  
김 현 아

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

## 보고서 요약서

과제고유번호	313019-3	해당 단계 연구 기간	2015. 09. 25. ~ 2016. 09. 24.	단계 구분	3차 / 3차
연구 사업명	중 사업명	생명산업기술개발사업			
	세부 사업명	-			
연구 과제명	대 과제명	-			
	세부 과제명	낙과(미숙과)를 이용한 고부가가치 뷰티케어 제품개발			
연구 책임자	이기선	해당단계 참여 연구원 수	총 : 17명 내부 : 17명 외부 : 0명	해당단계 연구개발비	정부 : 200,000천원 민간 : 50,000천원 계 : 250,000천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 17명 내부: 17명 외부: 0명	총 연구개발비	정부 : 600,000천원 민간 : 150,000천원 계 : 750,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(재)전남생물산업진흥원 식품산업연구센터 목포대학교 산학협력단			참여기업명 : 해당사항없음.	
위탁연구	연구기관명 : (주)컬러핑크알앤디			연구책임자 : 이태호	
				보고서 면수 312	

## 요약문 >

		D-01			
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 연구의 목적 본 연구에서는 낙과(미숙과)유래 소재를 활용한 ‘먹으면 아름다워지는 성분’과 ‘바르면 아름다워지는 성분’을 개발하여 피부건강관련 이너뷰티소재와 스킨케어제품 개발을 통해 피부건강 및 면역기능 증진에 이바지 하고, 더불어 고기능성 소재 및 제품 개발을 통한 농가의 소득원 창출, 고용 창출 등 지역 경제 활성화를 시키고자 함.</li> <li>○ 연구의 내용                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 낙과(미숙과)유래 기능성분의 소재화 및 이너뷰티용 제품화</li> <li>- 낙과(미숙과)유래 기능성분의 표준화</li> <li>- 낙과(미숙과)유래 이너뷰티소재의 기능성 효능평가</li> <li>- 낙과(미숙과)유래 스킨케어 제품화</li> </ul> </li> </ul>				
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 낙과(미숙과)유래 기능성분의 소재화 및 이너뷰티용 제품화 - 석세포를 활용한 워터젤리, 보습, 자외선차단 제품개발 및 인체적용시험 완료</li> <li>○ 낙과(미숙과)유래 기능성분의 표준화 - 석세포 관련 소재화와 기능성 분석법 확립 및 녹색기술 적용</li> <li>○ 낙과(미숙과)유래 이너뷰티소재의 기능성 효능평가 - 석세포의 항산화능, 지질대사개선, 면역조절능관련 기능성 평가(in vivo, in vitro)</li> <li>○ 낙과(미숙과)유래 스킨케어 제품화 - 석세포를 활용한 보습제품 개발, 피부미백 제품 개발, 자외선 차단 제품 개발</li> </ul>				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 낙과(미숙과)추출물의 식품 소재화를 통한 사업화</li> <li>○ 낙과(미숙과)의 시기별, 품종별 최적의 추출조건 확립</li> <li>○ 낙과(미숙과)의 폐기처분 비용 절감 및 녹색기술을 활용한 식품 소재화</li> <li>○ 낙과(미숙과)의 소재화를 통한 신개념 먹는 화장품 개발 및 상품화</li> <li>○ 낙과(미숙과)의 소재화를 통한 아토피 개선 크림 개발 및 상품화</li> <li>○ 낙과(미숙과)추출물의 피부 건강 개선 기능성 소재의 개발 및 사업화</li> <li>○ 낙과(미숙과)를 활용한 고부가가치 생물자원으로서의 소득 효과 증대</li> </ul>				
중심어 (5개 이내)	낙과 배	면역조절능	이너뷰티	건강지향식품	피부건강

## SUMMARY >

		Code number	D-02		
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Purpose In this study we have utilized fallen fruits to develop an “ingredient/component that makes one beautiful when eaten or applied. By developing an inner beauty material and skin care product, we will contribute to advancing health and immunologic function of the skin. Furthermore we intend to contribute to boosting / reviving / contributing /vitalizing the local economy by providing a source of income and jobs in the local area.</li> <li>○ Contents                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Materializing functional agents derived from fallen fruits and it’s commercialization as a inner beauty material</li> <li>- Standardizing fuctional agents derived by fallen fruits</li> <li>- Functionality and effectivity assessment of inner beauty material derived by fallen fruits</li> <li>- Commercialization of fallen fruit derived skin care products</li> </ul> </li> </ul>				
Results	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Materializing functional agents derived from fallen fruits and it’s commercialization as a inner beauty material–development of waterjelly, moisturizer, UV sunblock using stone cell and it’s assessment on the human body has been finished</li> <li>○ Standardizing fuctional agents derived by fallen fruits – materialization of stone cell related products and development of functionality assessment, and application of green technology</li> <li>○ Functionality and effectivity assessment of inner beauty material derived by fallen fruits – functionality assessment of the antioxidant potential, lipid metabolism improving effect, immunoregulatory effect of stone cell</li> <li>○ Commercialization of fallen fruit derived skin care products – development of waterjelly, moisturizer, UV sunblock using stone cell</li> </ul>				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Commercialization of fallen fruit extract as a food material</li> <li>○ Optimization of the extraction conditions depending on the time and varieties of the fallen fruits</li> <li>○ Lowering the cost of fallen fruit disposal and materializing it as a food product using green technology</li> <li>○ Developing and commercializing a new concept of edible make-up by materializing fallen fruit</li> <li>○ Developing and commercializing atopy improving cream by materializing fallen fruit</li> <li>○ Developing and commercializing skin health improving functional material</li> <li>○ Increase in income using fallen fruits as a high value biological product</li> </ul>				
Keywords	Fallen pear	Immune regulation	Inner beauty	Health- orientated food	Skin health

6. Table of contents in English

Contents >

1. Summary of Research and Development .....

2. Internal and external Technical Development Situation .....

3. Research and Development contents & Result .....

4. Goals & Contribution of Related fields .....

5. The applicable planning of Research result .....

6. Research process at collected overseas scientific and technical intelligence

7. Security of Research and development performance .....

8. Register in NTIS research facility-equipment status .....

9. Research and Development according to the performance lab safety  
measures .....

10. Representative research performance of Research and Development .....

11. Other matters .....

12. References .....

<Exhibit> Self assessment opinion report

## 7. 본문 목차

### 목 차 >

1. 연구개발과제의개요 .....	
2. 국내외 기술개발 현황 .....	
3. 연구수행 내용 및 결과 .....	
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	
5. 연구결과의 활용계획 등 .....	
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	
7. 연구개발성과의 보안등급 .....	
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황 .....	
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	
11. 기타사항 .....	
12. 참고문헌 .....	

<별첨> 자체평가의견서

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

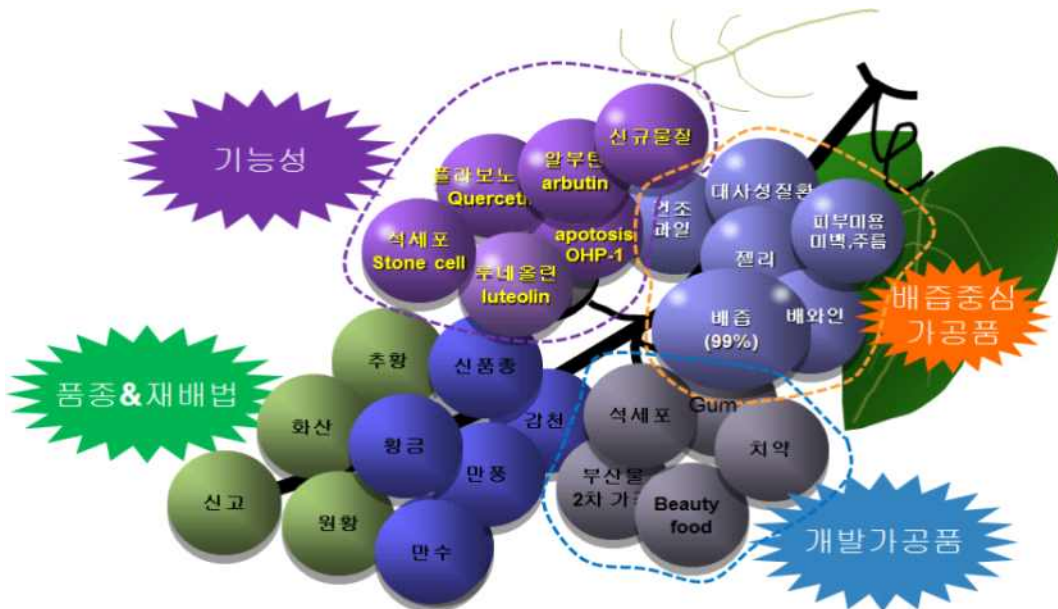
D-03

## 제 1 절 연구개발의 필요성

### 1. 배 연구의 필요성

#### 가. 배의 기능성 연구 동향에 따른 필요성

- 배는 장미과에 속하는 낙엽고목식물이며 우리나라에는 1906년 일본에서 개량된 품종들이 도입되어 전국적으로 재배되고 있는 4대 과실 중의 하나로서 기호도가 좋아 대부분 생과로 소비되고 있음.
- 예전부터 배는 호흡기계 질환이나 대사성 질환에 활용되었으며 최근 혈압강하효과와 혈류개선효과가 보고되었고 당뇨에 유의한 효과가 있음이 보고되고 있으나 Methanol 추출물을 이용한 경우가 대부분이어서 건강기능성 소재 및 식품가공적성에 연구가 미비함.
- 또한 OVA 유도형 천식모델에 배 추출물의 구강 섭취시 천식 완화효과가 있음도 보고되었음.
- 대사 및 면역기능에 유효한 작용도 보고되고 있어 지질대사 교정, 항염 및 면역기능 강화효과 등이 보고되었음.



#### 나. 나주 배 산업의 현황에 따른 필요성



- 배는 우리지역(나주)의 주요특산물로 우리나라 과수 전체 과수생산량 중 배가 2번째(감귤 25%, 배 17%)임. 이 중, 나주는 재배면적과 생산량면에서 제 1의 배 주산단지임.(13.6%)
- 나주지역 산업구조의 82%가 농업이고 이 중, 배 농업이 약 20% 차지하고 있으며 나주 내 전체 과수 생산량 중 배가 차지하는 비중이 약 93% 임.
- 비 상품과 및 준 상품과, 공급과잉에 따른 잉여생산물의 활용 미흡으로 생과 유통시장이 불안정함. 지역 내 배 가공업체(56개소)중 1억 이상 매출업체는 8개로 소득이 불안정하여 나주 배 산업의 문제점으로 대두됨.
- 배 640ton을 이용하여 배즙을 가공 생산할 경우 1차 가공부산물인 배 착즙박 량은 200ton 가량 발생함.



#### 다. 비상품성 과실 및 가공 부산물 활용 고부가가치 식품개발 필요성

- 최근 지구 기온상승으로 난지과수인 배 재배면적과 생산량의 증가되고 있어, 2010년 배 재배면적은 약 3만 ha에 이르고, 생산은 43만 8천톤에 달함.
- 우리나라의 과실 가공률은 10%에도 미치지 못하며, 배의 경우 전체 생산량의 1.5% 수준만이 가공품 형태로 소비되는 실정. 대과 위주로 소비되는 배는 소비에 간편성이 떨어지기 때문에 수용의 한계에 직면하고 있으므로 단순한 배 추출물의 형태에서 벗어나 다양한 배 가공품의 개발이 필요한 실정임.
- 또한 기능성 식품의 개발과 생산에 대한 요구가 높아짐에 따라 소재 개발 및 이용에 관한 연구가 중요하며, 이러한 소재를 이용하여 제품을 생산하고자 할 때 원료의 탐색과 확

보방안으로 미 이용 식용자원 및 식품 가공 폐기물 등의 이용 가능성에 대한 적극적인 검토가 요구됨.

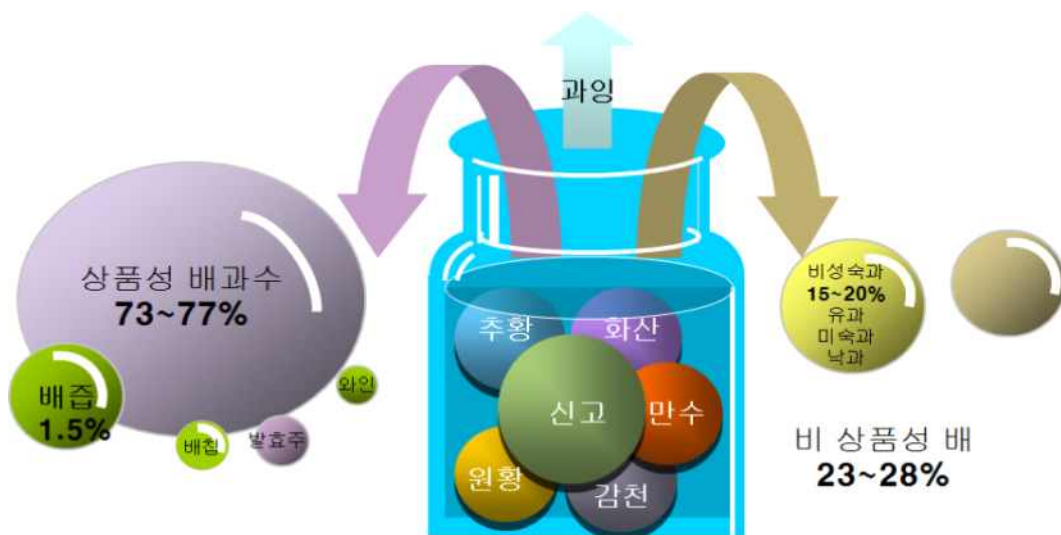
- 배는 자연재해 또는 재배기술 부족 등의 영향으로 상품성이 낮은 과실(유과, 미숙과 및 낙과수)의 발생률이 결실률의 약 15%로 상당히 많은 양이 발생하고 있으나 대부분의 비 상품성 배의 경우, 저가에 단순 추출물 가공품의 원료로 제공되어 있어 농가의 손실이 증가되고 있는 실정임. 특히 선과 선별조건 강화에 따라 앞으로 폐과율이 더 높아져 농가소득 저하로 이어질 가능성이 높음.

- 배 과실 내 석세포는 특히 미숙과에 많이 포함되어 있으며 주요성분은 Lignocellulose이며 성분별 함량은 1차 세포벽과 같이 대략 탄수화물(셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 펙틴) 82%로 구성되며 1차 세포벽에 없는 리그닌이 18~35%로 포함되어 있음.

- 농산물 부산물의 이용에 대한 보고에 따르면 재활용률은 10% 정도인 사과박과 포도박에 비해 배박(Pear pomace)의 재활용률은 거의 없는 것으로 보고되고 있음. 그러나 감, 사과 및 포도와 같은 다른 과수 가공 부산물에 비해 헤미셀룰로오스(Hemicellulose)의 함량이 1.5~4배 정도 높은 것으로 보고되어 있음. 즉 배 추출박에 많이 존재하는 석세포로 인해 식이섬유 함량이 높은 것으로 알려져 있는데 석세포 함량은 비상품성 배 및 착즙박의 경우, 생육 및 품종별, 가공처리 방법에 따라 다름.

- 가공 부산물인 배 추출박에 대한 연구는 효소처리(Exopolylgalacturonase)에 의한 펙틴 추출, 발효 배박(Fermented pear pomace)의 급여가 계육의 육질에 미치는 영향 등을 조사하여 사료화 가능성이 연구된 실정임.

- 따라서 유과, 미숙과 및 낙과 등 상품성이 낮은 과실이나 착즙 후 버려지는 배 추출박의 산업적 이용을 위한 목적으로 이를 이용한 기능성 가공품의 개발이 필요함.



## 라. 비 상품성 과실 및 가공 부산물 이용으로 농촌 경제 활성화

- 우리나라의 과실 가공률은 10%에도 미치지 못하며, 배의 경우 전체 생산량의 1.5% 수준만이 가공품 형태로 소비되는 실정임.
- 현재 판매되고 있는 대부분의 배 가공품은 추출물의 형태이거나 폐기 부산물인 배 추출박에 대한 연구는 미비한 실정임.
- 과일 및 채소, 열매류의 유통과 소비가 많아지면서 유통기한이 초과되거나 보관 불량 등으로 인해 보관 중 품질이 저하된 과일 및 채소, 열매류를 폐기 처분 해야 되는 경우가 많음. 폐기처분할 과일 및 채소, 열매류는 폐기 처분 업자를 통해서 폐기 매립, 소각 또는 퇴비화 시키는데, 폐기처분 비용도 많이 소요되고 있는 실정임.
- 따라서 폐기처분 비용 절감 및 녹색 환경식품 활용을 통한 농촌 경제 활성화에 부흥하고 유실과, 낙과 등으로 부가가치가 떨어진 비상품성 배를 농가 소득 자원으로 이용하기 위해 착즙 후 폐기되는 배 추출박과 비상품성 배에 많이 함유된 석세포를 재활용한 고부가가치 식품을 개발이 요구됨.

## 2. 기타 연구개발의 필요성

### 가. 식품시장 현황에 따른 필요성

#### (1) 식품 가공산업 분야 경쟁력 약화

- 세계 식품산업의 시장규모가 10% 이상 고성장하는 것과 반대로 국내산업 성장세 둔화.
- 대형 제약과 식품회사의 음료시장 진출로 수입산 원재료 사용 증가 추세(32%).
- 식품제조업의 약 80% 인 소규모 제조업의 매출은 겨우 8% 수준.

#### (2) 식품소비 구조의 변화

- 먹거리 안정성 보장된 웰빙식품 선호도 증가 → 푸드 마일리지 짧아야 가능.
- 라이프스타일 변화로 간편 편의식 소비 증가 → 신선한 지역농산물 필요.
- 식품유통 구조가 제조업에서 유통업체로 이전 → 지역농업과 이해관계 상충.

\*푸드 마일리지 : 식품이 생산에서 섭취까지 이동한 총 거리.

#### (3) 음료시장 트렌드의 변화

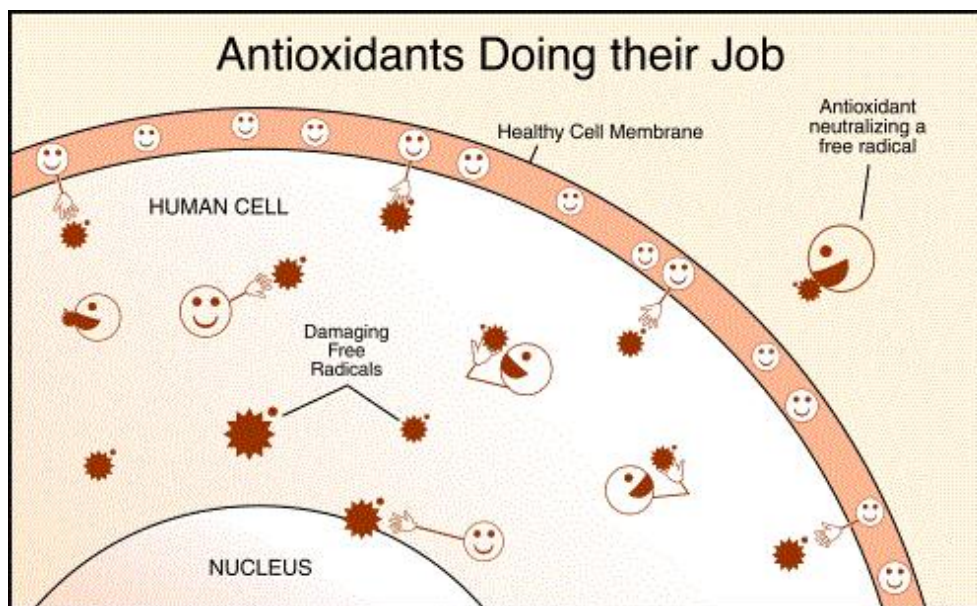
- 건강기능성 음료시장 성장세(세계 평균 7.4%)로 전체 음료 생산량의 60% 수준에 해당되

나 우리나라 연평균 성장률은 27.4%. (2011년 기준)

\*자료출처 : 식약청, 나스미디어 등

## 나. 항산화와 피부 건강

- 피부 세포 및 조직 손상을 주도하는 것은 활성 산소종 중에서 반응성이 가장 큰  $O_2$ 와  $OH$ 이다. 이들은 항산화 효소와 비효소적 항산화제들로 구성된 항산화 방어망을 파괴함으로써 산화제/항산화제 균형을 산화상태 쪽으로 기울게 함.
- 결과적으로 계속된 산화적 스트레스는 피부의 주요 성분인 지질, 단백질, DNA, 탄수화물 등을 산화시켜 변질을 초래한다. 또한 활성 산소종들은 주요 성분인 콜라겐, 엘라스틴, 단백질글리칸, 히알루론산, 피브로넥틴 등을 파괴시켜 기능 소실을 초래함.



- 자외선 및 활성산소에 의한 결합조기 손상을 예방하고, 피부세포를 보호하기 위해서는 생체 내뿐만 아니라 피부에서 활성 산소종의 과잉 생성을 억제하고 또한 생성된 활성 산소를 효율적으로 제거할 수 있는 항산화 방어 시스템 구축이 필요함.
- 천연 성분들 중에는 이러한 항산화 방어 시스템 구축에 자외선 차단제로서, 항산화제로서 또는 킬레이트제로서 적절한 역할을 할 수 있는 물질이 필요함.

## 다. 피부 미용에 관한 실정

- 현재 양의학에서는 아토피 피부염의 치료에 있어 다양한 연구가 이루어지고 있으나 여전히 치료 약물의 장기사용에 따른 부작용, 질환의 반복 발생 등은 아직 해결되지 않은 대표적인 문제점들임. 이에 대한 해답으로 제시하는 것이 한방 소재를 이용한 치료방법이 아

토피 피부염 치료에 일정 부분을 담당할 수 있는 설득력 있는 근거가 될 수 있을 것으로 사료됨.

○ 피부는 외부로부터 개체를 보호하는 장벽기능이라는 매우 중요한 역할을 수행하는데 장벽기능은 외부로부터의 다양한 자극(화학물질, 대기오염물질, 건조한 환경, 자외선 등)에 대한 방어와 피부를 통한 체내 수분의 과도한 발산을 막는 보호기능이며, 이러한 보호기능은 각질 형성 세포로 구성된 각질층이 정상적으로 형성되어 있을 경우에만 그 기능을 유지할 수 있음.

○ 표피 중에서도 가장 바깥쪽에 존재하는 각질층(Stratum corneum, horny layer)은 각질 형성 세포로부터 형성되며, 분화가 완결된 각질세포와 그를 둘러싼 지질층으로 구성되어 있음.(Marcelo C. L. et al, J. Invest. Dermatol., 80, pp37-44,1983). 각질세포는 표피 최하층에서 지속적으로 증식(Proliferation)하는 기저세포(Basal cell)가 단계적으로 형태 및 기능상의 변화를 거치며, 피부 표면까지 상승한 특징적인 세포이며, 일정 기간이 경과하면 오래된 각질세포는 피부에서 탈락되고 새로운 각질세포가 그 기능을 대신하게 되는데, 이러한 반복적인 일련의 변화 과정을 “표피 세포의 분화“ 또는 “각화(Keratinization)“라고 부름.

○ 또한, 각화과정 중에 각질 형성 세포는 천연 보습인자(Natural moisturizing factor; NMF)와 세포 간 지방질(세라마이드, 콜레스테롤, 지방산)을 생성하면서 각질층을 형성하여 각질층이 견고함과 유연성을 가지게 하여 피부 장벽(Skin barrier)으로서의 기능을 보유하게 함. 이러한 각질층은 과도한 세안이나 목욕 등의 생활 습관적 요소나 건조한 대기 오염 물질 등의 환경적인 요인 그리고 아토피성 피부나 노인성 피부 같은 내인성 질환 등으로 인해 쉽게 그 기능이 손실될 수 있으며, 실제로 현대에 들어서 더욱 늘어난 다양한 요인들로 인해 최근에는 피부건조 증상 및 이로 인한 제반 장애를 호소하는 부분들이 점점 증가하고 있는 추세임.

○ 따라서, 적절한 피부 수분을 유지하기 위하여 외부로부터 수분을 공급하거나, 체내로부터의 수분 손실을 방지하기 위한 연구가 다양하게 진행되어 왔으며, 실제로 수분 보유 능력이 있는 다양한 보습제(Moisturizer)가 개발되어 있음.

○ 피부 보습제로는 세라마이드 등의 지질성분과 필수 지방산 및 지질 복합체 등 각질층에서의 수분 보유를 증가시킬 수 있는 물질을 사용하는 것이 일반적임(Rawlings A. V. et al, J. Invest. Dermatol., 5, pp731~741, 1994). 그러나, 최근 피부에 대한 위해 요인이 점점 증가되고 있고, 식생활 양상의 변화로 각질층의 생성, 탈락 속도가 늦어지며, 각질 형성 세포의 기능 저하로 각질층의 보습인자와 지질의 양이 감소되어 각질층이 정상적인 피부 장벽 기능을 발휘하지 못하는 피부를 가진 사람들이 증가하고 있는 추세이고, 이런 피부 장벽 기능의 와해는 피부 건조증, 아토피 피부염, 접촉성 피부염, 건선 등의 다양한 피부 질환을

유발하게 됨. 이와 같은 질환들은 기존의 통상적인 수분보유 기능을 갖는 보습제 만으로도 증상 완화는 기대할 수 있지만 근본적인 치유는 어려운 실정임.

## 제 2 절 연구개발의 개요

### 1. 유효성분 전처리에서의 녹색기술 적용

- 저탄소 핵심기술의 완성 및 기술지원.
- 초임계, 초고압 추출장비를 통하여, 효율적이며 저에너지 저탄소 추출방법을 사용한 기능성 물질의 분리기술을 연계하여 확립.
- 기반구축으로 구축된 Semi-pilot 장비를 활용하여 기업의 대량생산을 위한 기본적인 시제품 생산, 연구개발에 활용.

### 초임계추출기



### 초고압처리기

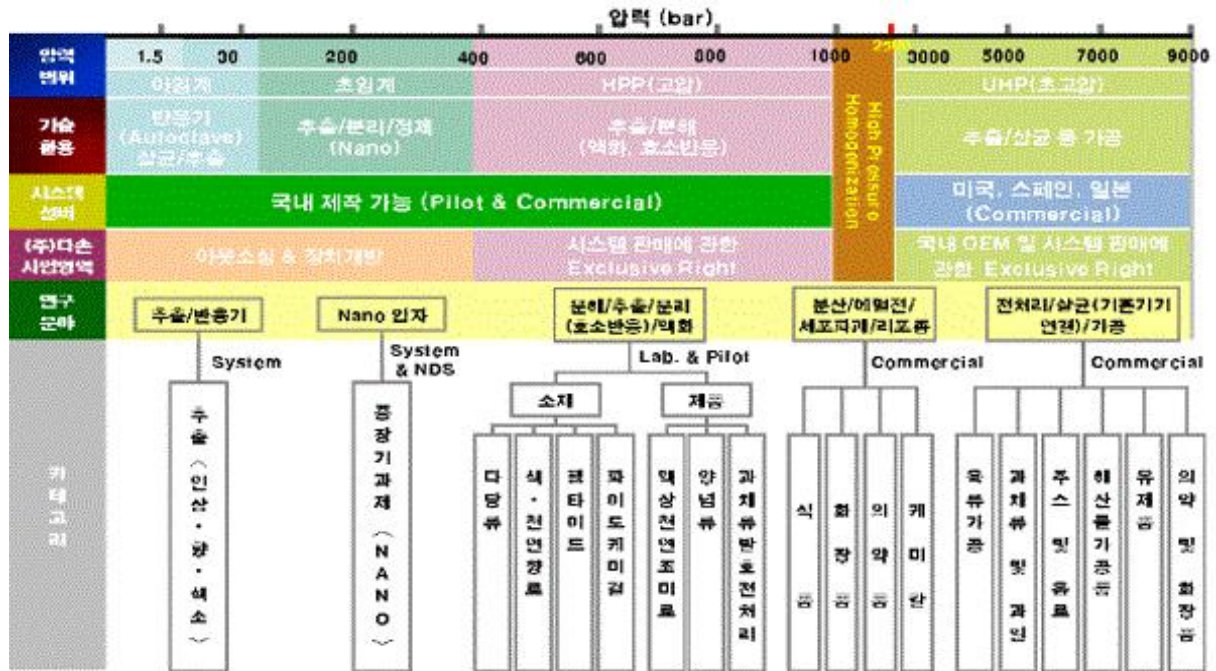


#### 가. 초고압 가공 기술

##### (1) 초고압 가공 기술의 개요

초고압 가공 기술이란 기존의 식품안전을 위한 전통적인 열처리 발식과는 달리 식품 본래의 색·맛·향·조직 등의 특성을 유지하고 제품의 보존 기간을 연장시키는 동시에 품질

과 안전을 보장하는 비열가공기술임.



그림출처 : <http://www.dasonfood.com/chokorea/inc/sub.php?id=c440>

○ 연세대학에서는 1993년경부터 국내에서는 최초로 초고압을 활용한 비열 살균기술을 연구하고 있음. 특히 초고압을 이용한 마늘에 존재하는 Allinase의 불활성화, 신선초 녹즙의 살균, 갈색화 효소의 불활성화, 저온저장 안정성 및 관능적 특성 변화, 단백질의 물성 변화, 병합처리에 의한 오렌지주스의 품질 특성, 동치미, 단무지, 배추김치에서의 살균효과, 저장안정성 및 품질특정에 관한 연구, 새로운 가공법으로서 인삼가공에 대한 유용성분 추출효과의 증진에 관한 연구 등이 있음.

○ 기존의 천연물 추출에 사용된 전통적인 방법은 추출 효율이 낮고 에너지 소비가 많으며 열로 인한 많은 유용성분의 파괴, 단백질의 변이, 성분의 손실, 가용성분 위주의 추출, 열에 대하여 불안정한 것 등의 단점을 드러내고 있음.

○ 이러한 단점을 극복하기 위하여 초고압 기술을 약용식물의 유용성분을 추출하는데 적용할 수 있음. 초고압 기술은 약용작물의 유효성분을 짧은 시간 내에 추출할 수 있으며 순도가 높은 단일 성분과 불순물이 거의 없는 추출물을 얻을 수 있음.

○ 초고압 처리는 최근 식품에서 주목받고 있는 가공기술 분야로서 식품의 보존성, 물성, 기능성을 향상시켜줌. 100~1,000MPa의 압력을 이용하여 압력매체로 물이나 기름과 같은 용액의 압력을 순간적으로 균일하게 전달시키는 원리로 식품가공에서 열처리와 압력처리는 모두 소화성을 향상시키는데, 열처리는 화학변화가 많이 일어나는데 반하여 압력 처리는 화학적으로 큰 변화를 일으키지 않는 장점이 있음.

○ 더덕과 같은 약용식물은 세포벽이 견고하여 생리활성물질을 얻기 위해서는 기존의 가공기술과 다른 초고압을 도입할 필요가 있음. 특히 약용식물에 작용한 초고압의 높은 에너지와 압력은 보통 열수추출로 얻을 수 없는 유용 생리활성물질을 얻을 수 있게 하여 약용식물에 함유한 천연물을 재평가할 수 있게 함. 약용식물의 화학성분 추출에 가장 효율적으로 활용될 수 있는 고에너지 저효율, 열에 의한 유용성분의 변성 및 손실, 가용성분 위주의 추출 등의 문제점을 개선하여 약용식물로부터 단시간에 불순물이 적은 순도 높은 단일성분의 추출이 가능할 것으로 사료됨.

## (2) 초고압 처리에 관한 국외동향

○ 일본 식품종합연구소에서는 일본의 초고압 기술개발의 선도 기관으로서 고베 제강소와 미쓰비시 등과 협력하여 시스템 개발 및 세계 최초로 과채류 및 어묵 가공에 초고압을 이용한 상용화 제품 개발(Jam, jelly 및 Juice 등)하여 상용화를 실시하였고, 현재는 추출 및 열에 민감한 생리활성 물질의 보존 가능성을 이용하여 기능성 식품 화장품 소재 및 의약소재 개발에 응용 연구시도 중.

○ 미국의 Oregon State University와 Avure사 및 US Army NSCA가 공동연구로 우주 식품으로서 저장기간이 연장된 Fruit youet제품의 Proto type을 개발함.

## 나. 초임계 추출기

### (1) 초임계 추출기의 개요

○ 초임계 유체란 어떤 물질의 임계점(Critical point) 이상의 온도와 압력 조건에서 존재하는 유체로서 액체와 기체의 중간특성을 보이며, 추출공정에 매우 적합한 열역학적 특성(높은 용해도, 선택성, 압축성, 감압에 따른 자발적 분리성)과 이동특성(낮은 표면장력과 점도, 높은 확산계수)을 갖고 있어서 추출대상 물질의 복잡한 구조 속으로 빠르게 침투하여 원하는 성분을 효율적으로 추출해 낼 수 있음.

○ 특히 초임계 이산화탄소의 경우 비교적 낮은 임계압력(73.8 bar)과 상온 근처의 임계온도(31℃)를 지니고 있어 온화한 조건에서 추출을 수행할 수 있으며, 독성, 가연성, 추출대상 물질과의 반응성 및 부식성이 없고, 고 순도의 이산화탄소를 비교적 저렴한 가격으로 구할 수 있기 때문에 초임계 유체 공정에서 가장 주목받고 있음.

○ 최근 초임계 이산화탄소를 추출 용매로 이용해 천연물로부터 생리활성 성분을 추출하려는 많은 연구가 수행되었으나, 높은 극성을 갖는 유효성분 추출의 경우 초임계 이산화탄소의 비극성에 기인한 낮은 용해도로 인해 이들 성분의 추출이 용이하지 않은 것으로 알려져 있음.

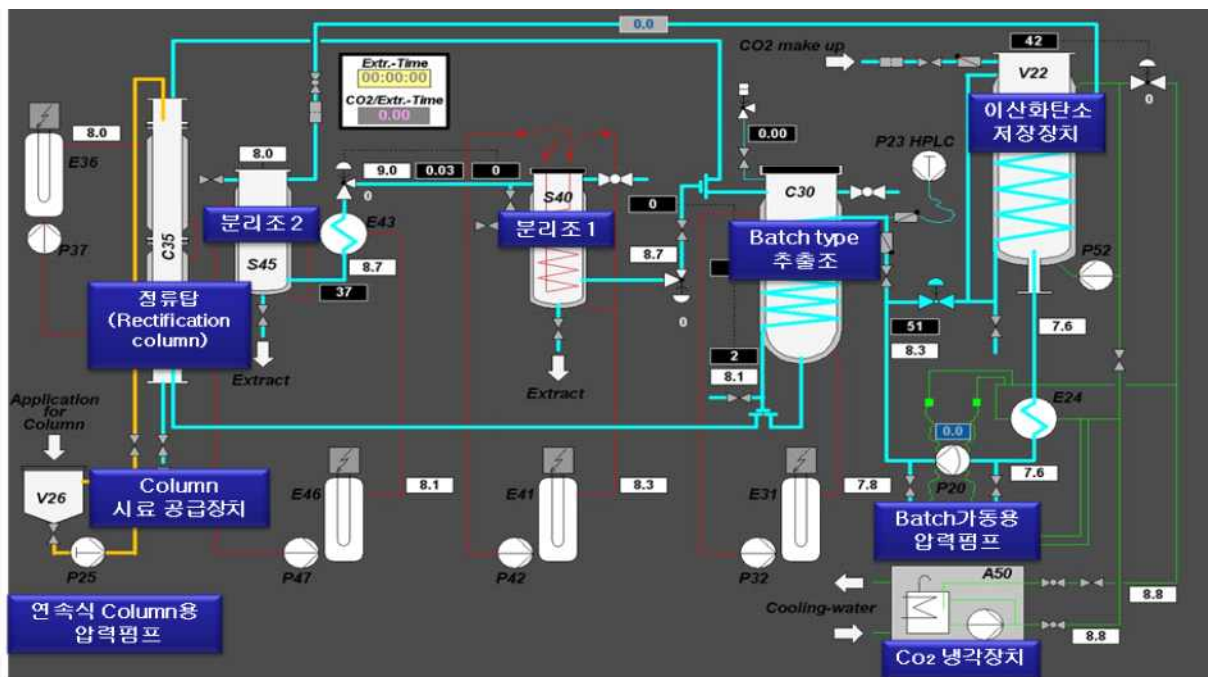


- 이와 같은 극성 유효성분에 대한 초임계 이산화탄소 추출공정의 비효율성을 극복하기 위한 방법으로 알코올류와 같은 극성 보조용매(Cosolvent 또는 modifier)를 초임계 이산화탄소에 첨가하여 이산화탄소의 극성과 용해성을 증대시킴으로써 추출효율을 향상시킬 수 있다는 결과가 보고됨.

- (재)전남생물산업진흥원 식품산업연구센터는 국내 유일 탑정방식의 정류탑(Rectification column)을 보유하고 있으며, Batch type과 연속식 Column방식을 선택적으로 운용이 가능.

(2) 초임계 추출 기술의 장점

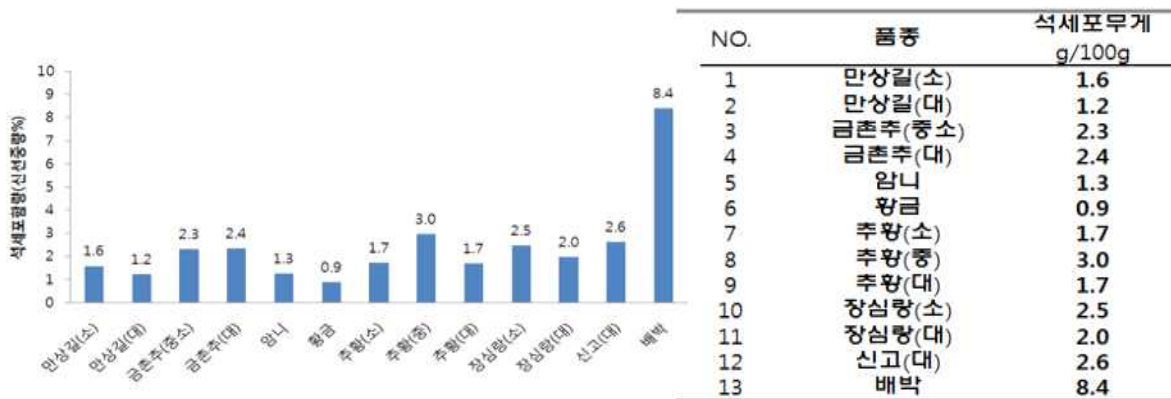
- 온도에 민감한 천연물 추출에 용이.
- 유기용매가 포함되지 않는 제품을 얻을 수 있음.
- 선택적인 추출이 가능, 목적물을 고 순도로 얻음.
- 용매 회수가 용이하고, 환경문제가 없음.
- 일반 유기용매 보다 낮은 증발열로 인해 회수에너지가 적음.
- 비교적 간단한 공정단계로 고 순도 제품을 얻을 수 있음.



## 2. 본 연구개발을 위한 선행연구 결과

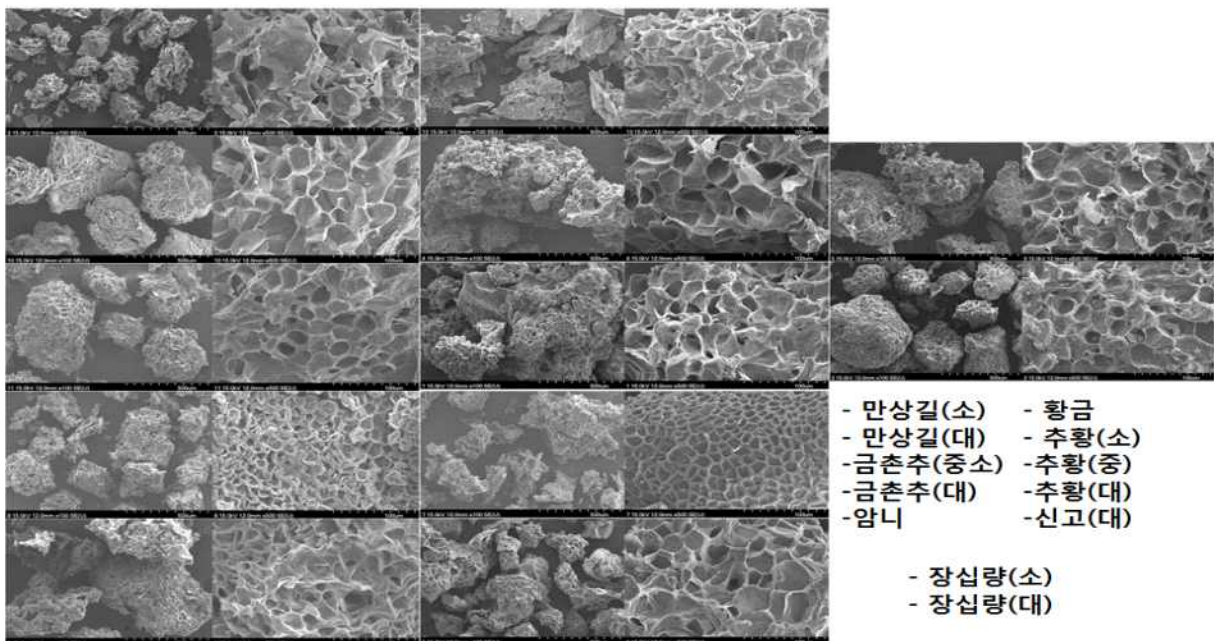
### 가. 석세포 관련 선행연구 결과

## 석세포 함량 측정



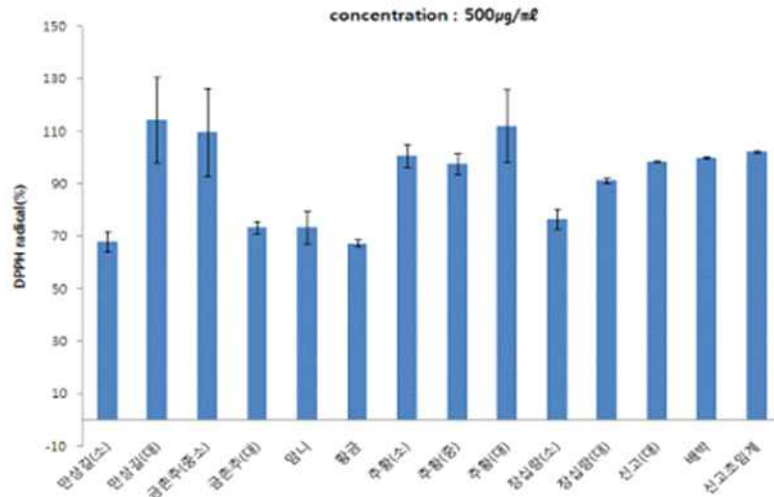
- 추황(중)>장심량(소)>신고(대)>금촌추(소중대)>배박(비열처리)
- 배품종별 및 생육별 석세포함량차이 나타남
- 추황의 유과 및 신고낙과수 석세포함량

## 품종별 석세포 모양



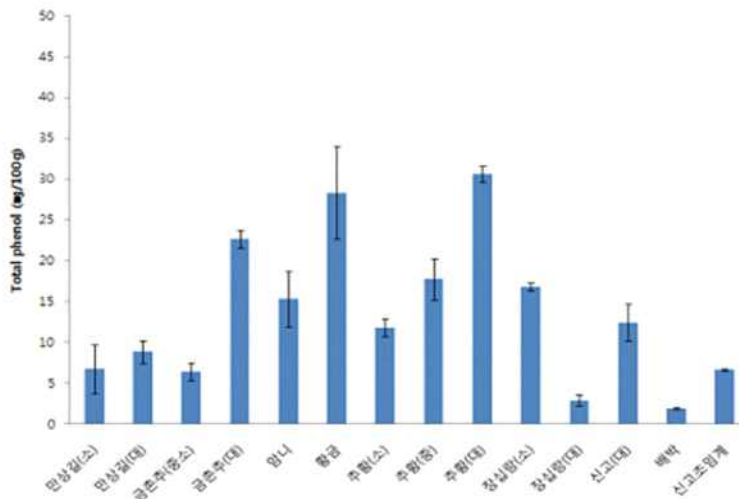
나. 배 품종별 선행연구 결과

## 항산화력 측정



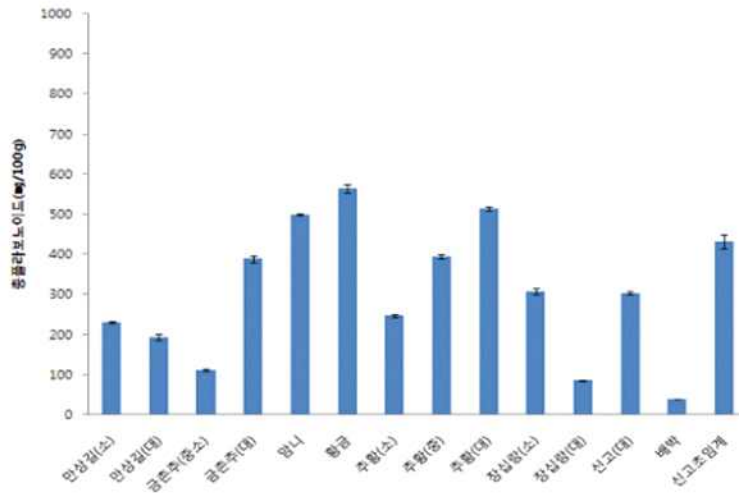
- 만상길(대), 추황, 금촌추 > 배박, 신고초임계추출물 >> 암니(중국배)

## 총페놀함량 측정



- 황금, 추황(대) > 금촌추(대) > 추황, 장십량, 암니 >> 배박, 신고초임계추출물 >> 암니(중국배)

## 총 플라보노이드함량 측정

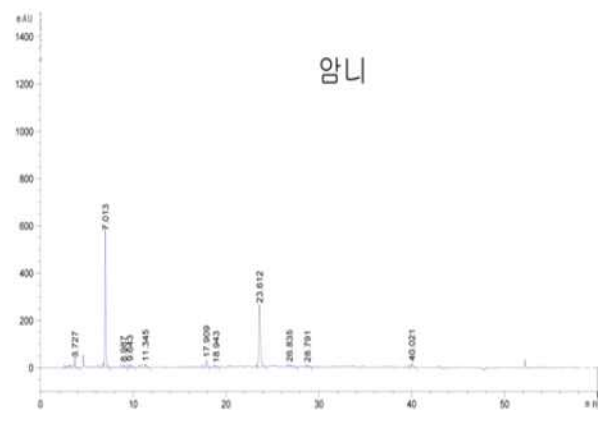
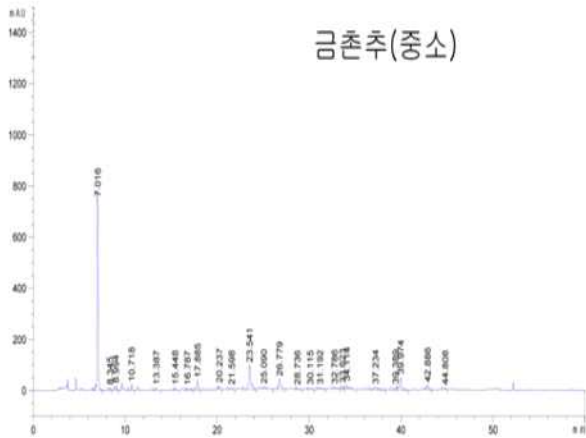
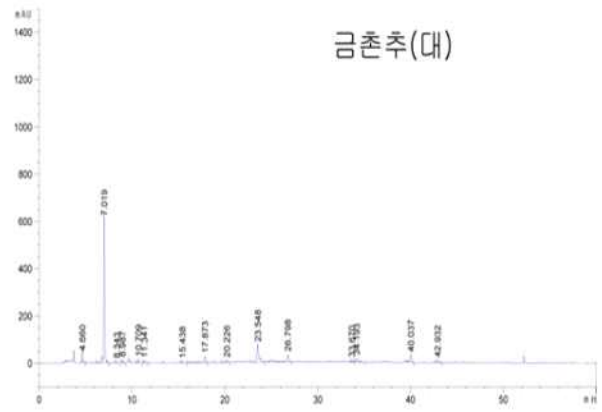
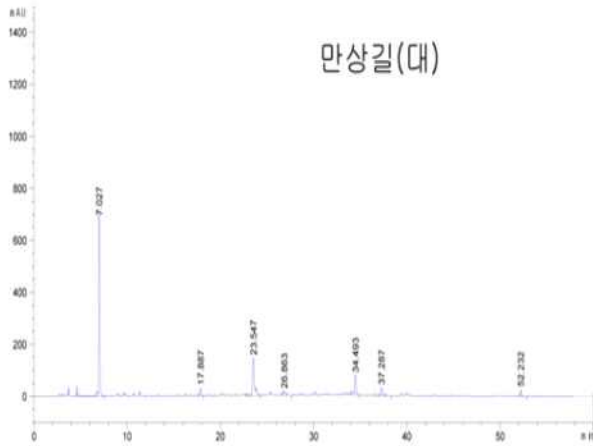
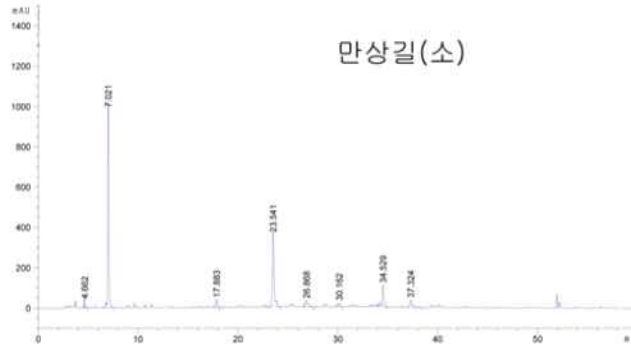
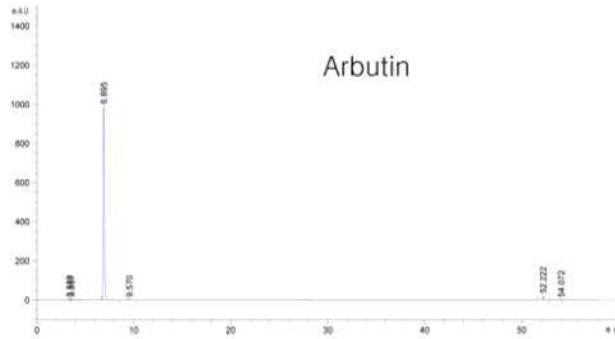


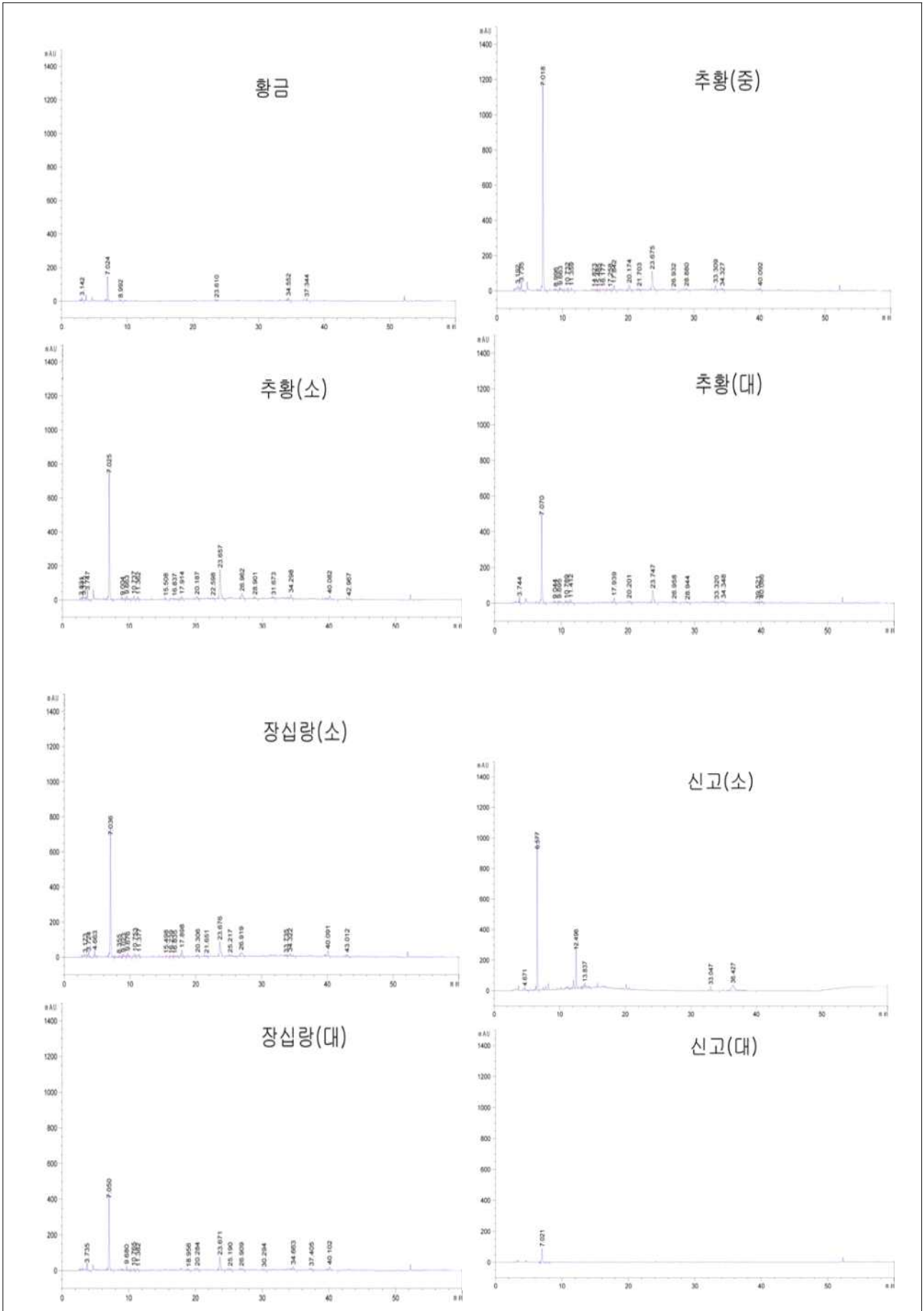
- 황금, 암니 > 추황(대), 금촌추(대), 신고초임계 > 추황, 장식량, >> 금촌추(중소) 장식량(대), 배박

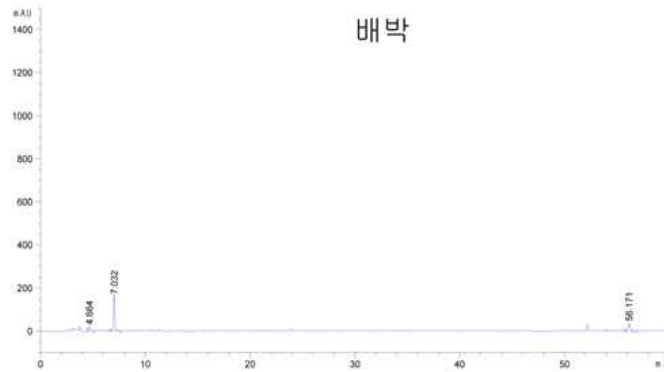
## 기능성 성분 측정

NO.	품종	DPPH	Total phenol	총 플라보노이드
		500 $\mu\text{g}/\text{ml}$	mg/100g	mg/100g
1	만상길(소)	68.1 $\pm$ 3.85	6.72 $\pm$ 2.99	229.44 $\pm$ 2.9
2	만상길(대)	114.32 $\pm$ 16.44	8.8 $\pm$ 1.43	193.64 $\pm$ 7.63
3	금촌추(중소)	109.72 $\pm$ 16.78	6.37 $\pm$ 1.09	111.28 $\pm$ 2.81
4	금촌추(대)	73.32 $\pm$ 2.39	22.67 $\pm$ 1.09	389.16 $\pm$ 8.65
5	암니	73.57 $\pm$ 6.26	15.28 $\pm$ 3.41	497.89 $\pm$ 2.68
6	황금	67.39 $\pm$ 1.51	28.3 $\pm$ 5.67	562.82 $\pm$ 9.55
7	추황(소)	100.82 $\pm$ 4.33	11.79 $\pm$ 1.13	246.32 $\pm$ 3.71
8	추황(중)	97.55 $\pm$ 3.74	17.74 $\pm$ 2.49	393.6 $\pm$ 4.83
9	추황(대)	112.04 $\pm$ 13.84	30.59 $\pm$ 1.01	514.21 $\pm$ 4.65
10	장식량(소)	76.6 $\pm$ 3.91	16.78 $\pm$ 0.5	307.11 $\pm$ 7.55
11	장식량(대)	91.17 $\pm$ 0.81	2.92 $\pm$ 0.72	84.67 $\pm$ 1.21
12	신고(대)	98.48 $\pm$ 0.11	12.45 $\pm$ 2.26	303.09 $\pm$ 4.26
13	배박	99.9 $\pm$ 0.24	1.92 $\pm$ 0.15	37.74 $\pm$ 0.35
14	신고초임계	102.21 $\pm$ 0.27	6.7 $\pm$ 0.11	431.99 $\pm$ 18.16

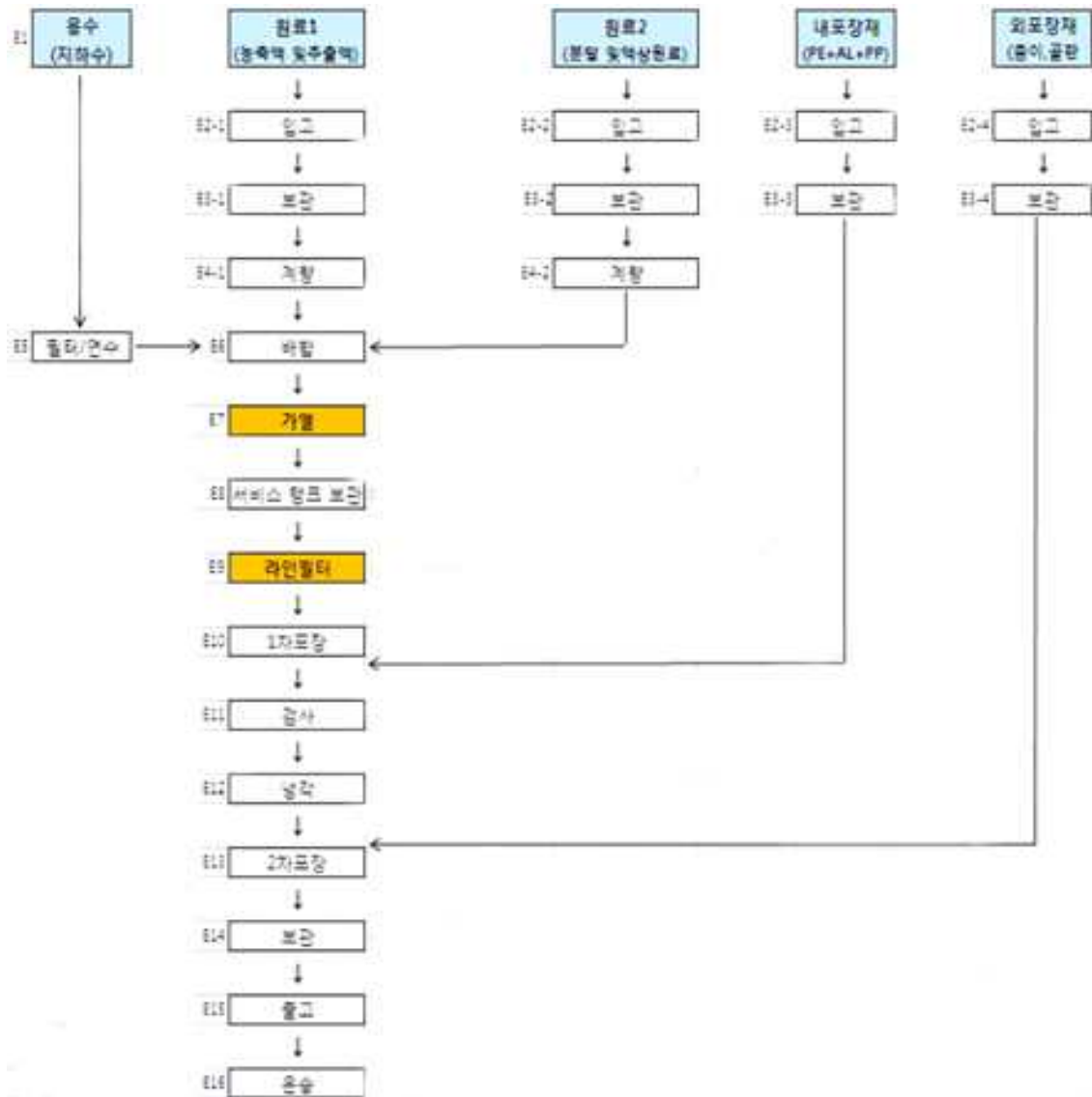
# 알부틴 함량 측정







다. 배박 추출물 대량추출 예비실험



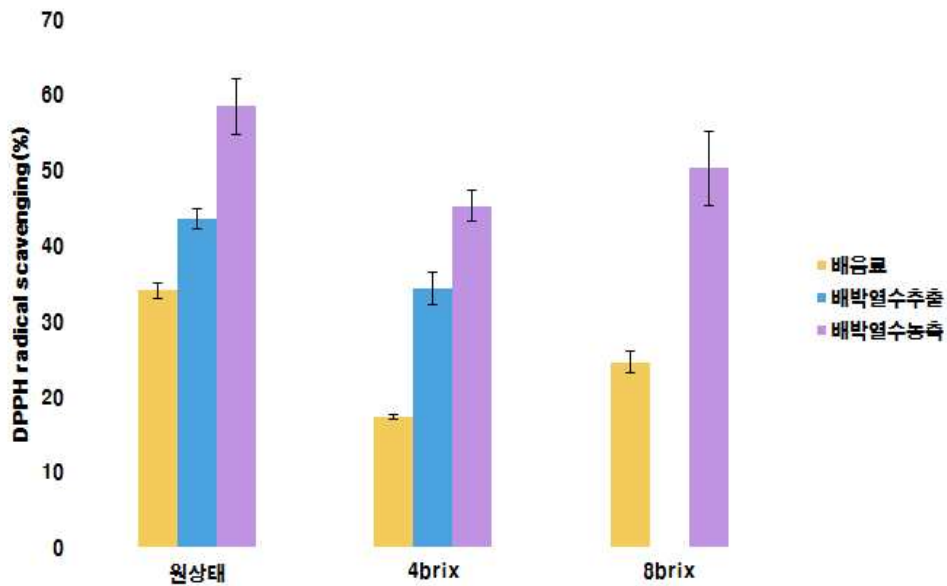
라. 배박 추출물의 음료 생리활성 평가

(1) 항산화 능력(DPPH Radical Scavenging)

• 배즙 대비 배박추출액의 라디칼소거능 2배 증가 (24.5%/50.2%, 표준물질 비타민C)

▪ 배박추출 농축액 제조

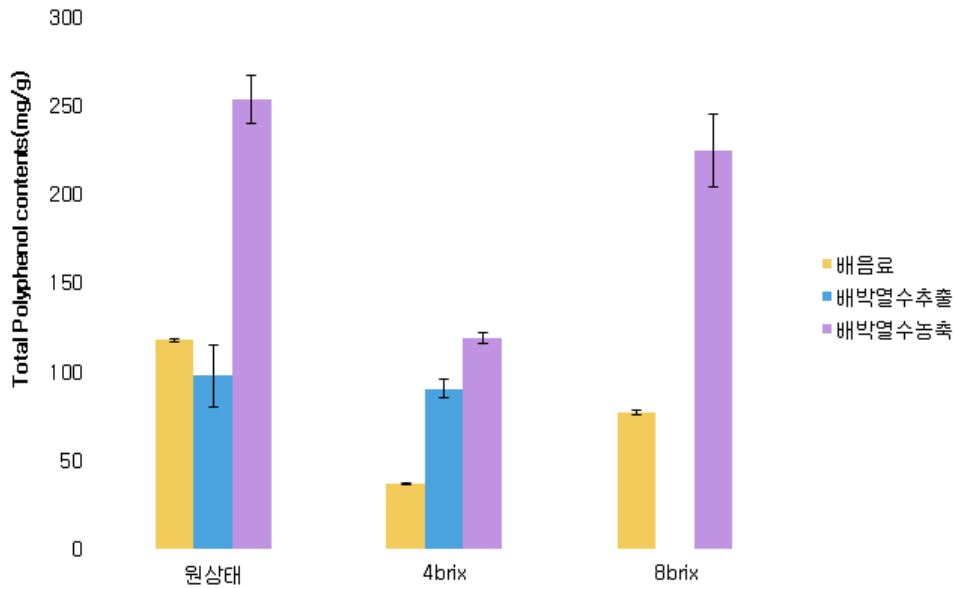
- 착즙기 : 비가식부의(씨방)분리가능
- 배 1,600kg → 착즙박 176kg
- 착즙박176kg:가수량400L  
→ 추출액 240L(농축액 60L)
- 배박추출물 제조 : 120 ℃에서 1시간(밀폐형)
- 연속식 농축기:4Brix→8Brix(농축) 30Brix까지 가능
- \* 3회 배치 생산 제조



(2) 총 폴리페놀 함량

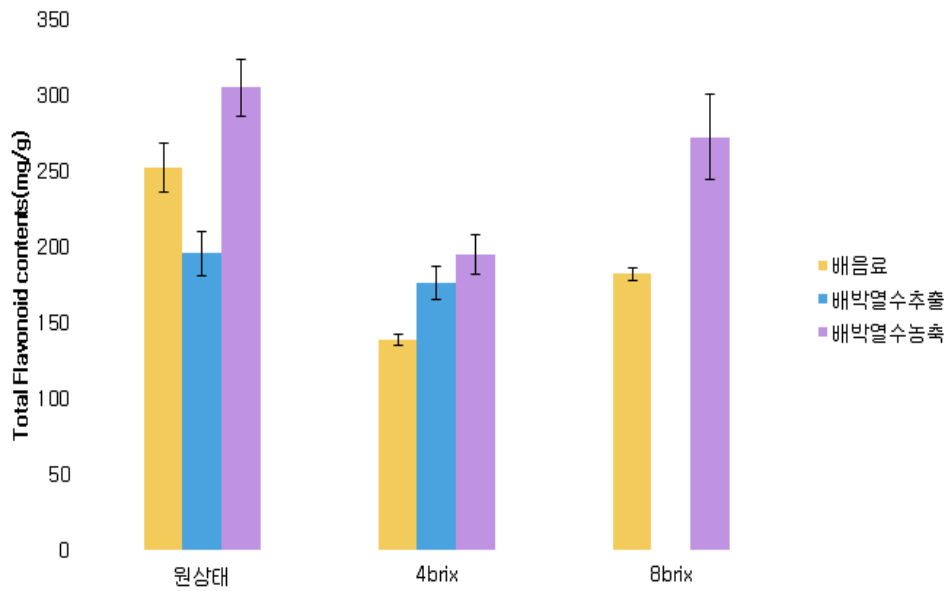
• 배즙 대비 배박추출액의 폴리페놀 함량 3배 증가 (77.6mg/224.8mg, 표준물질 Chlorogenic acid)





(3) 플라보노이드 함량

• 배즙 대비 배박추출액의 플라보노이드 함량 1.5배 증가  
(182.6mg/273.1mg, 표준물질 Quercetin)

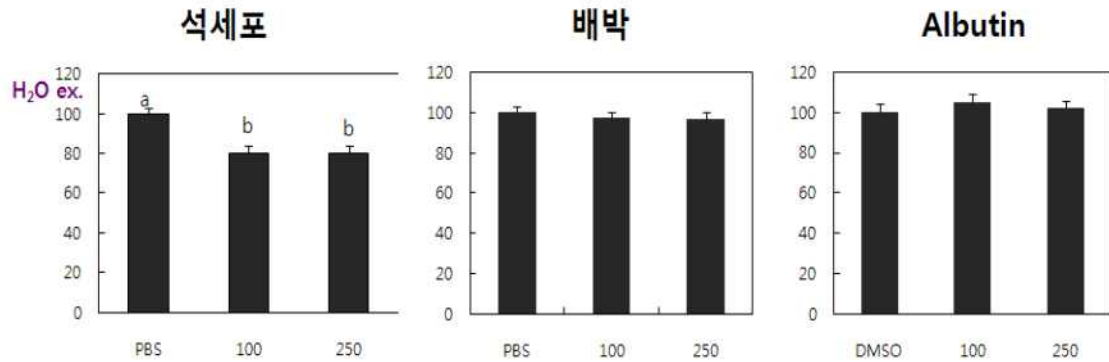


마. 비상품성 배 및 배 착즙박 유효 추출물의 항비만능 조사

(1) 배 착즙박, 석세포 및 Albutin의 물 추출물이 세포 독성에 미치는 영향

- 배의 과실, 배 착즙박 및 석세포의 MTT assay 결과

배 추출박 물 추출물은 지방 전구세포에 세포 독성이 없음을 규명.

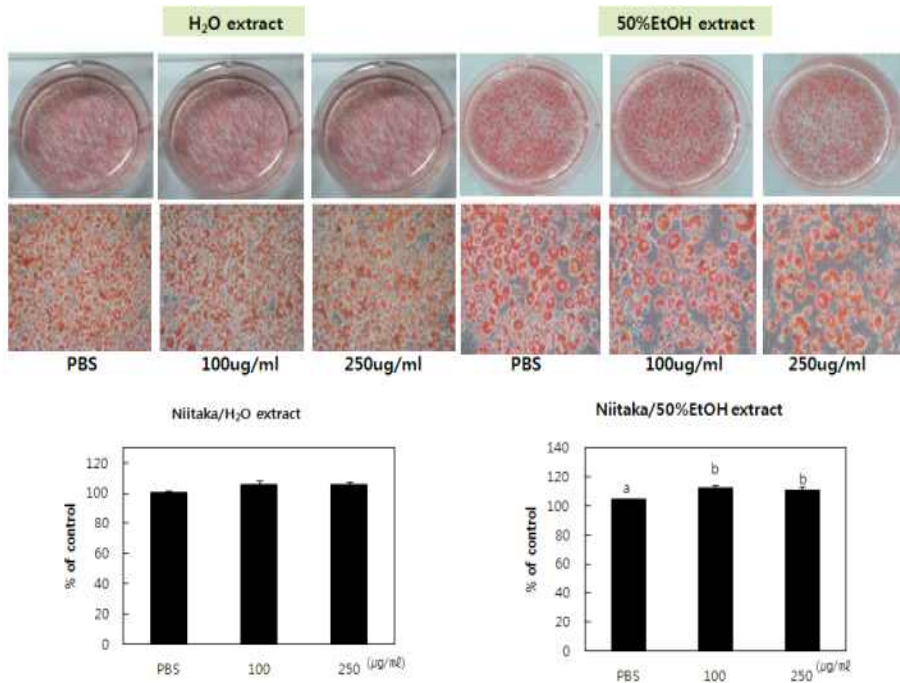


(2) 배의 과실, 배 착즙박, 석세포 및 Albutin의 지방생성 억제효과

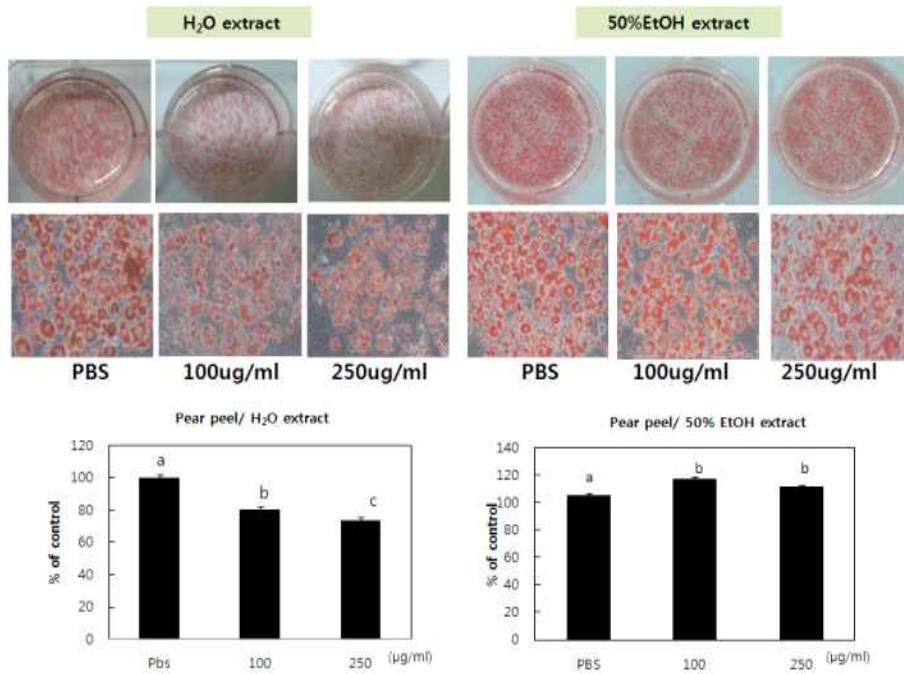
○ 배의 과실, 배 착즙박 및 석세포의 항비만 효과

신고 과육, 배 착즙박, 석세포, Arbutin의 각 추출물이 지방전구세포의 지방세포로의 분화에 미치는 영향을 살펴본 결과, 배 추출박의 물 추출물은 신고 과육이나 석세포의 물 추출물과 비교하여 지방생성 억제효과가 뛰어남을 규명.

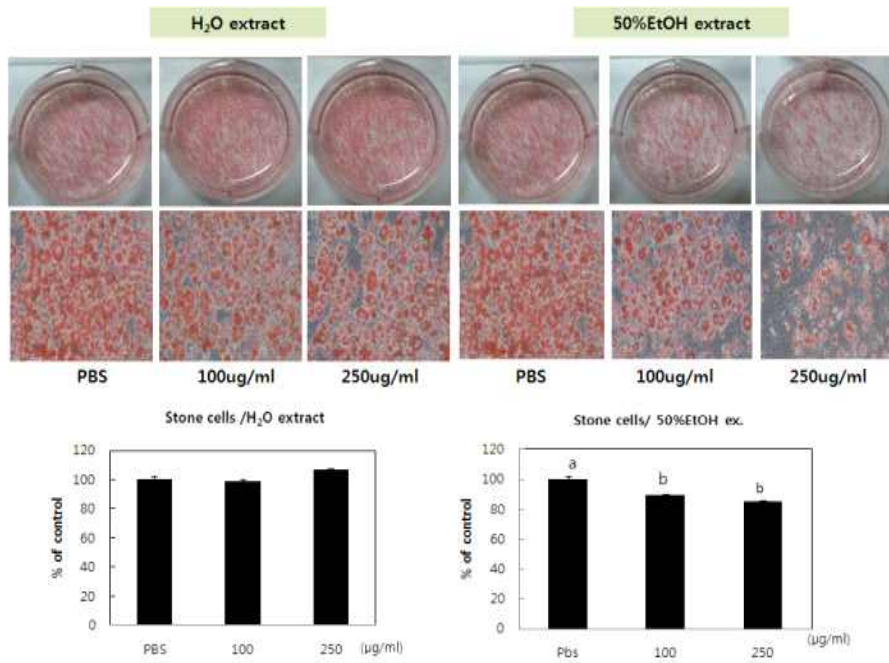
(가) 신고



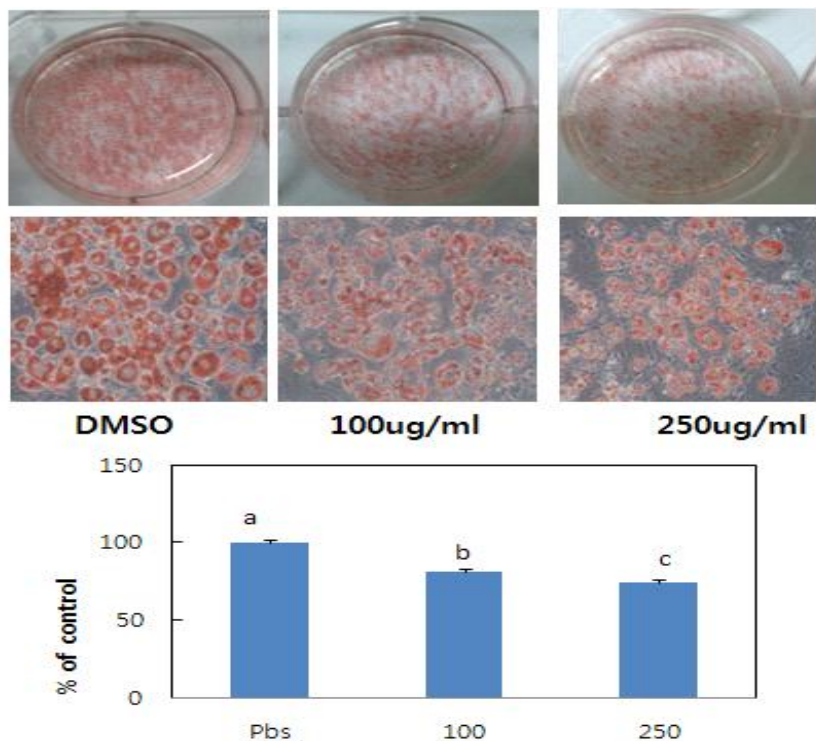
(나) 배 착즙박



(다) 석세포



(라) 알부틴



바. 배 석세포 분말의 일반성분 및 식이섬유량 분석

(1) 배 석세포의 일반성분 분석

(%)

항목	배 석세포_1	배 석세포_2	배 석세포_3	평균	비고
수분	5.9998	6.0400	-	6.0199	
회분	13.6141	13.5763	-	13.5952	
조단백	2.2491	2.2847	-	2.2669	
조지방	0.7157	0.6936	0.7151	0.7081	
탄수화물	77.4213	77.4054	-	77.4099	

(2) 배 석세포의 식이섬유량 분석

시료명	평균잔사무게 (mg)	단백질량 P(mg)	회분량 A(mg)	평균무게 (mg)	식이섬유 (%)
배석세포 분말	1018.85	0.11	116.30	1020.50	83.07

※ 계산과정

$$\text{료의 평균잔사무게 } mg = [\text{시료의 잔사무게}(g) - (\text{시료 여과기} + \text{셀라이트무게}(g))] \times 1000$$

	잔사무게(g)	항량된 유리여과기(g)	시료 잔사무게(mg)
배석세포 1	59.7203	58.6183	1102.0
배석세포 2	59.5847	58.6490	935.7
평균			<b>1018.85</b>

$$\text{단백질량}(mg) = [0.0014 \times (0.1 \text{ HCl 소비 } ml - \text{공시험 } ml) \times F \times \text{질소계수} \times 100] / 100$$

; 질소계수 : 6.25, F : 1.000

	a(0.1N HCl 소비 ml)	b(공시험 ml)	공시험 단백질량(mg)
배 석세포	0.200	12.286	<b>0.11</b>

$$\text{회분량}(mg) = [\text{회화 후 여과기와 회분의 무게}(g) - \text{항량된 여과기의 무게}(g)] \times 1000$$

	회화 후 여과기와 회분의 무게(g)	항량된 여과기의 무게(g)	회분량(mg)
배 석세포	58.7653	58.6490	<b>116.30</b>

○ 세포의 식이섭유 함량 (%) =  $\frac{1018.85 - 0.11 - 116.30 - 54.69}{1020.50} \times 100 = 83.07$

사. 비만 관련 선행 연구

(1) 세포 실험계에서 고추씨 추출물의 항비만 및 항당뇨 효과

- 고추씨 물 추출물의 지방생성 억제효과

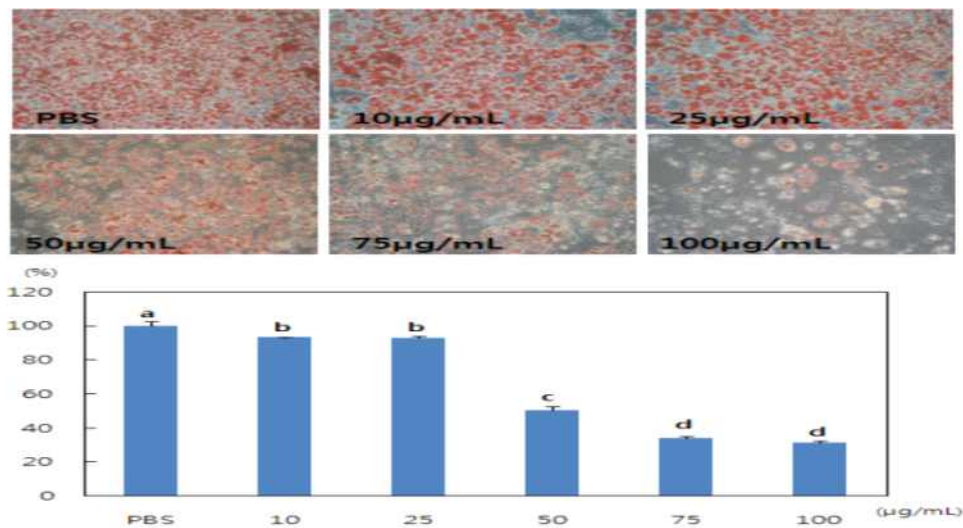


Figure. Effect of Pepper seed water extract on lipid accumulation in 3T3-L1 adipocyte.

- 포도당 수송체 발현에 미치는 영향

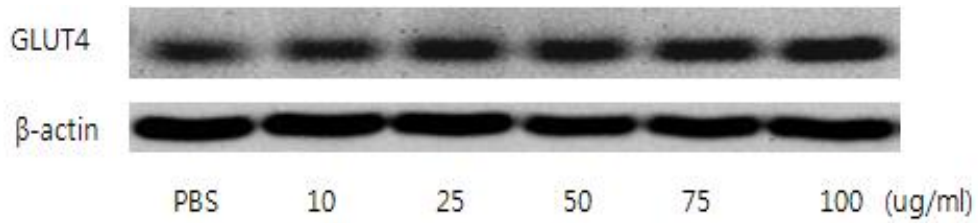


Figure. Effect of Pepper seed water extract on GLUT4 expression in 3T3-L1 adipocytes.

(2) 동물 모델에서 고추씨 추출물의 항비만 및 항당뇨 효과

- 고추씨 물 추출물이 체중 및 체지방량에 미치는 효과

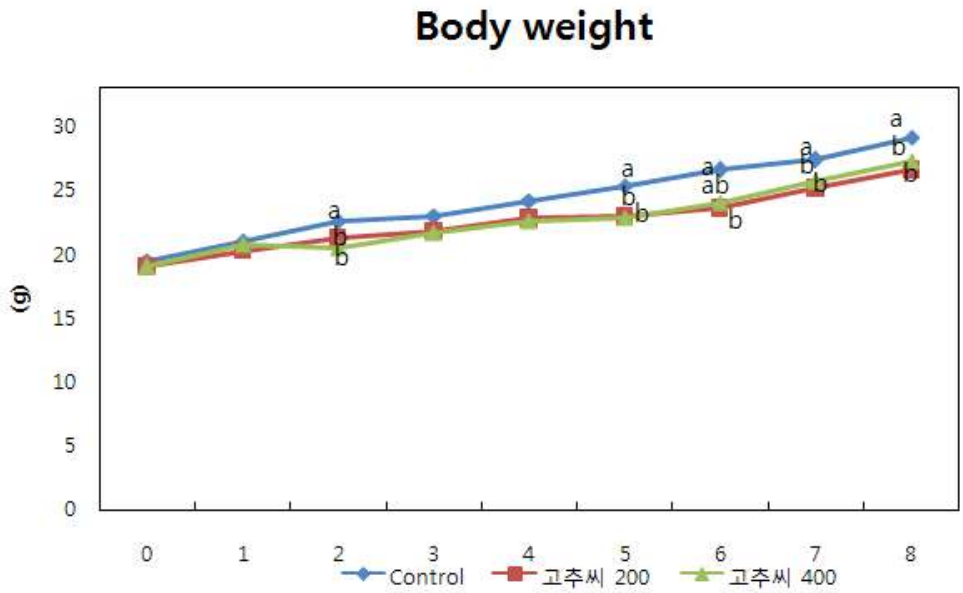


Figure. Effect of Pepper seed water extract on the body weight in C57BL/6Jms Slc mouse.

- 혈청지질 수준의 변화

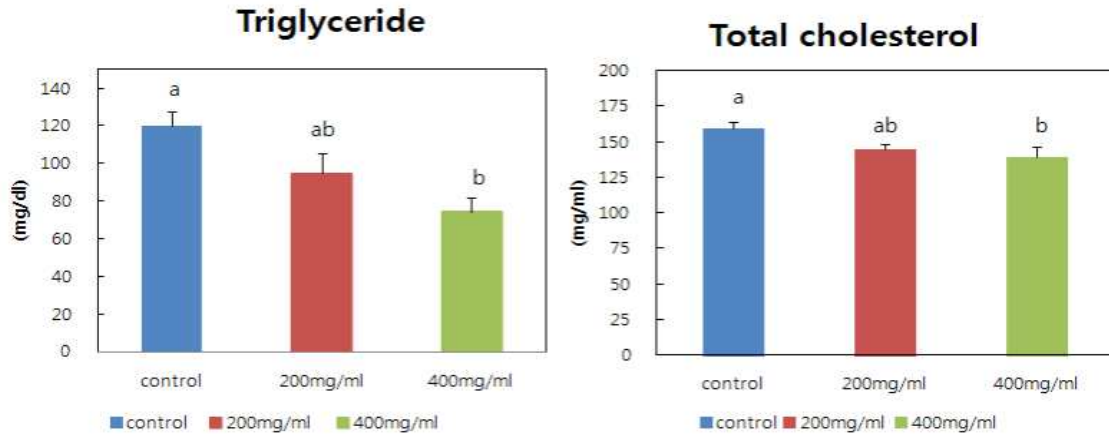


Figure. Effect of *Curcuma longa L.* extracts on the serum lipids in C57BL/6Jms Slc mouse.

○ 고추씨 추출물이 인슐린 저항성에 미치는 영향

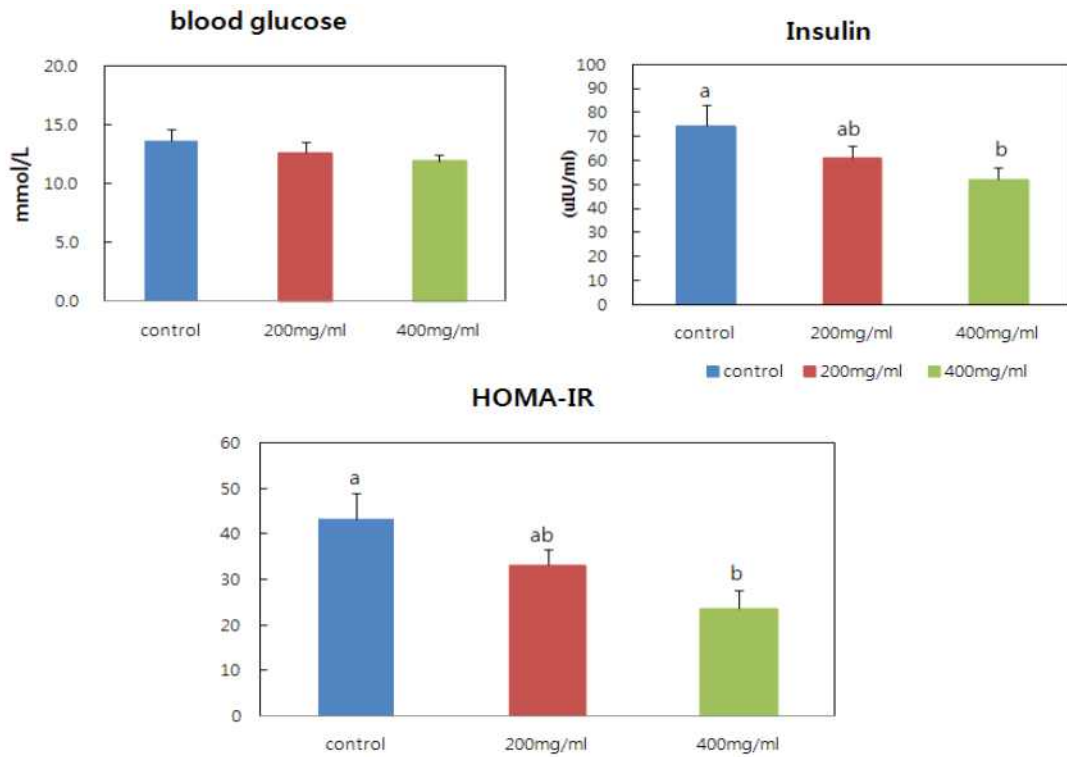


Figure. Effect of Pepper seed water extract on the fasting blood glucose, insulin and insulin resistance in C57BL/6Jms Slc mouse.

아. 면역관련 선행 연구

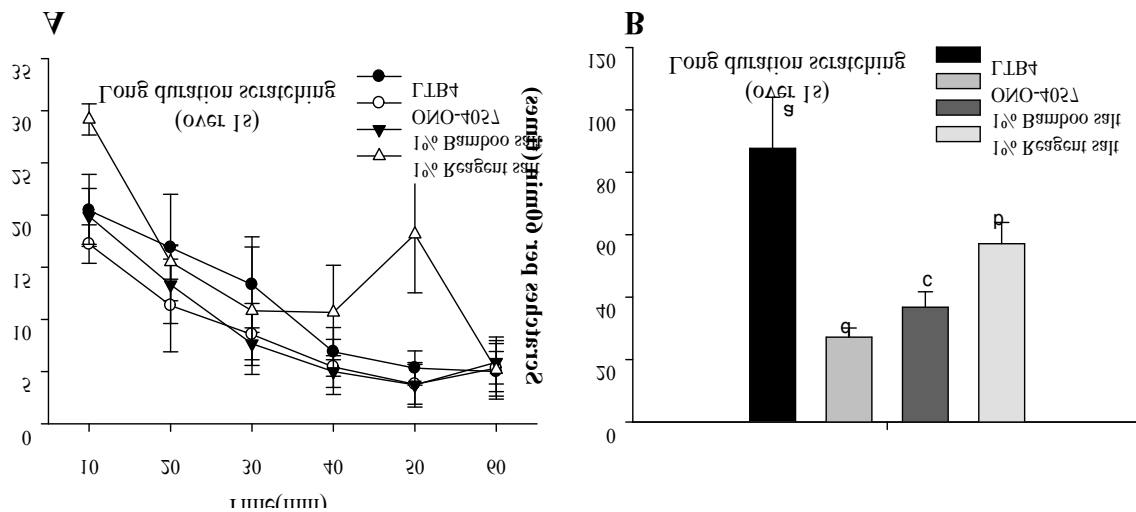


Figure 1. Inhibitory effects of bamboo salt solution on scratching number of mice. Control group (LTB<sub>4</sub>+distilled water), negative control (LTB<sub>4</sub>+ONO-4057 antagonists of LTB<sub>4</sub>), normal salt (LTB<sub>4</sub>+saline1%) and bamboo salt group LTB<sub>4</sub>+bamboo salt 1%). The scratching of the skin around the ear and back was counted for 1hour. Values are the means and S.E.M. for 6-7 animals. Values with the same letters are not significantly different at P < 0.05(a>ab>b>c).

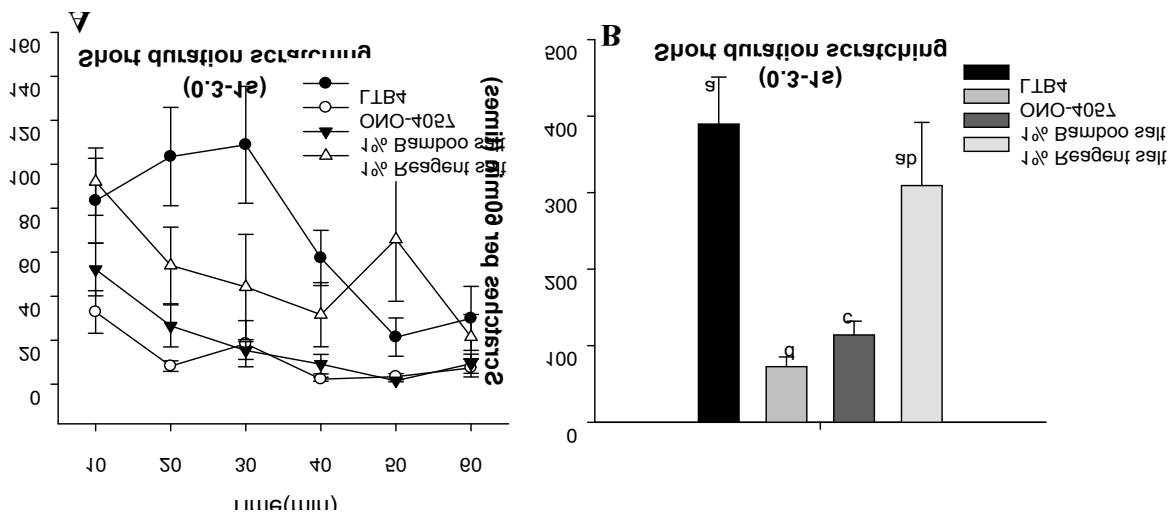


Figure 2. Inhibitory effect of bamboo salt solution on scratching number of mice. Control group (LTB<sub>4</sub>+distilled water), negative control (LTB<sub>4</sub>+ONO-4057 antagonists of LTB<sub>4</sub>), normal salt (LTB<sub>4</sub>+saline1%) and bamboo salt group (LTB<sub>4</sub>+bamboo salt 1%). The scratching of the skin around the ear and back was counted for 1hour. Values are the means and S.E.M. for 6-7 animals. Values with the same letters are not significantly different at P < 0.05(a>ab>b>c).



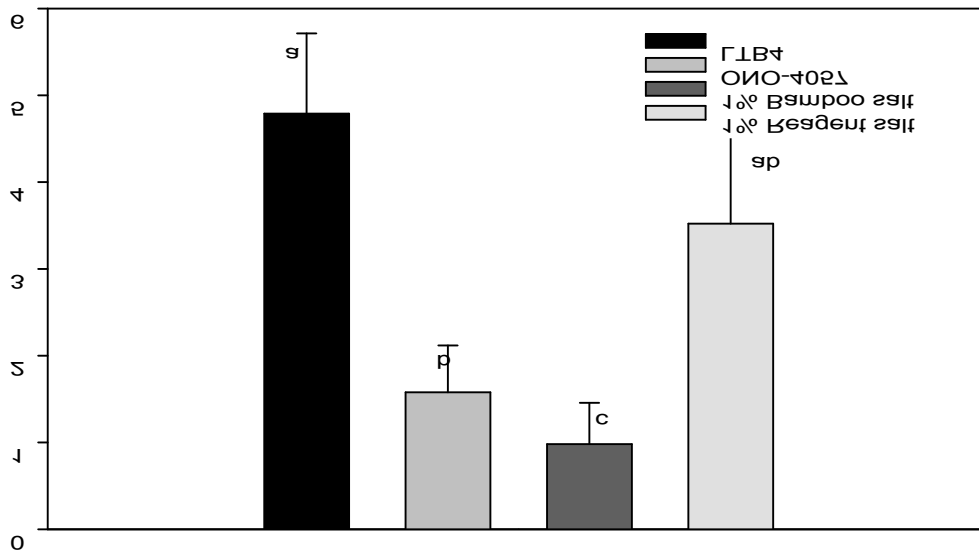


Figure 3. Serum total Interleukin-4, IFN- gamma and Skin IL-6 levels were measured by an ELISA Control group (LTB<sub>4</sub>+distilled water), negative control (LTB<sub>4</sub>+ONO-4057 antagonists of LTB<sub>4</sub>), reagent salt (LTB<sub>4</sub>+1% reagent salt) and bamboo salt group (LTB<sub>4</sub>+1%bamboo salt). Values are the means and S.E.M. for 6-7 animals. Values with the same letters are not significantly different at P < 0.05(a>ab>b>c).

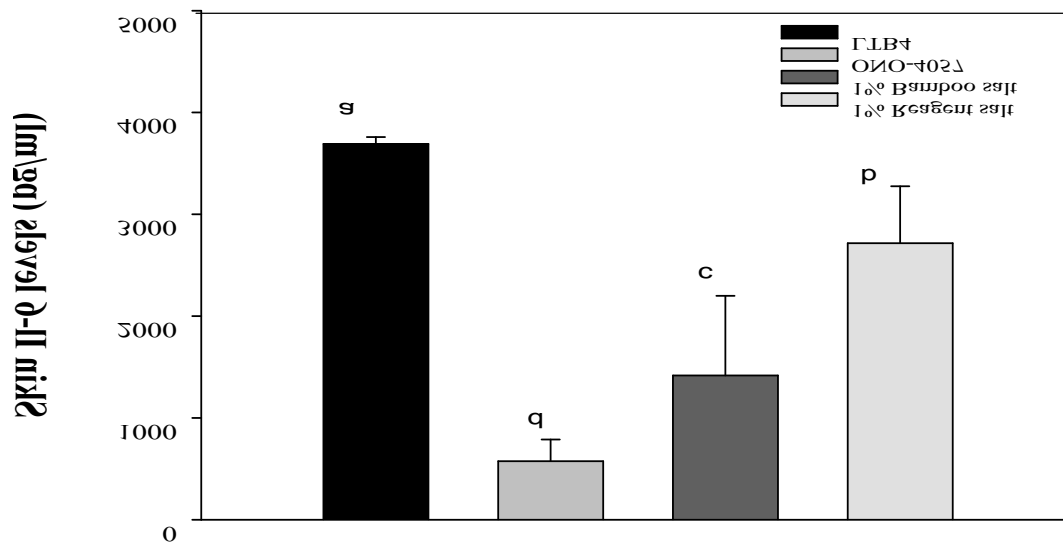


Figure 4. Serum total Interleukin-4, IFN- gamma and Skin IL-6 levels were measured by an ELISA Control group (LTB<sub>4</sub>+distilled water), negative control (LTB<sub>4</sub>+ONO-4057 antagonists of LTB<sub>4</sub>), reagent salt (LTB<sub>4</sub>+1% reagent salt) and bamboo salt group (LTB<sub>4</sub>+1%bamboo salt). Values are the means and S.E.M. for 6-7 animals. . Values with the same letters are not significantly different at P < 0.05(a>b>c>d).

자. 피부미용 관련 선행 연구

(1) 배의 품종별 미백효과 측정

- B-16 Melanoma 세포에서 Melanin 생성 억제율 측정

비상품성 배 및 배 추출박의 멜라닌 생성 억제율을 측정한 결과는 아래와 같다. 배 추출박의 경우 1mg/ml의 농도에서 81.9%의 멜라닌 생성 억제율을 나타냈고, 만상길(소) 70.4%, 장십랑(대) 62.7%, 황금 23.8%, 초임계(신고) 8.4%의 억제율을 나타냈다.

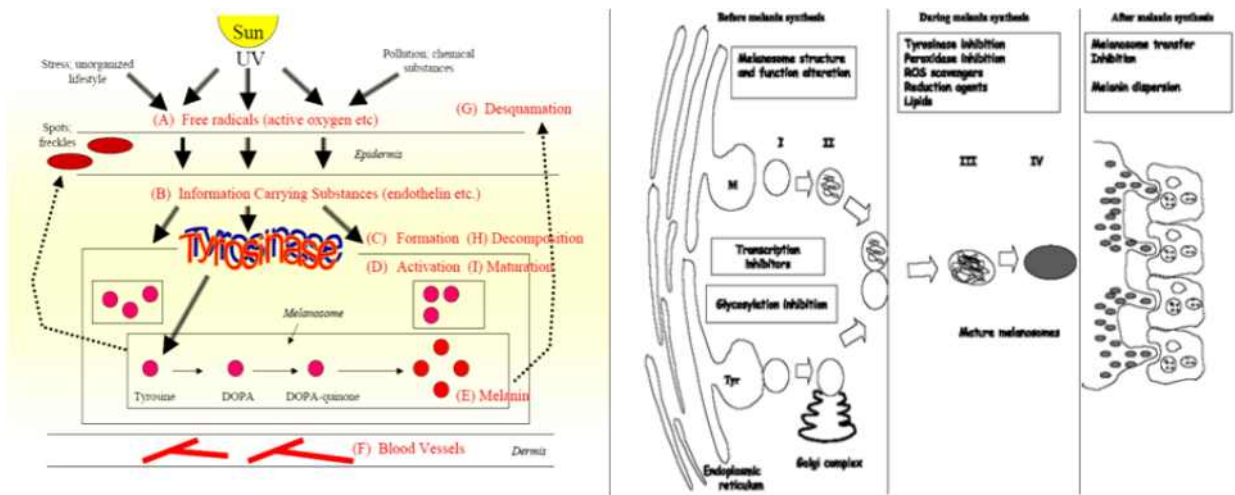
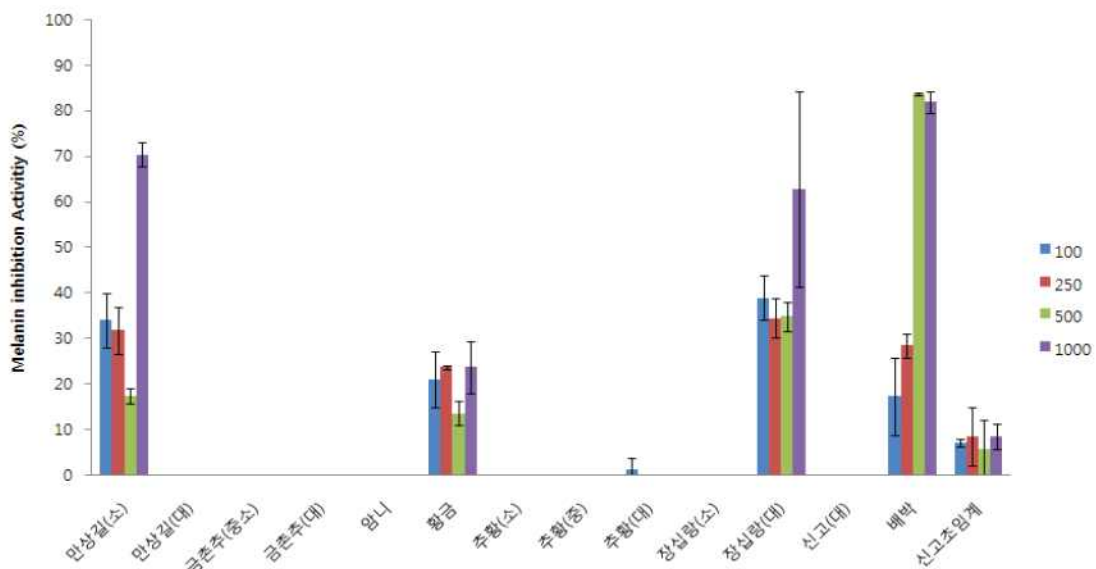
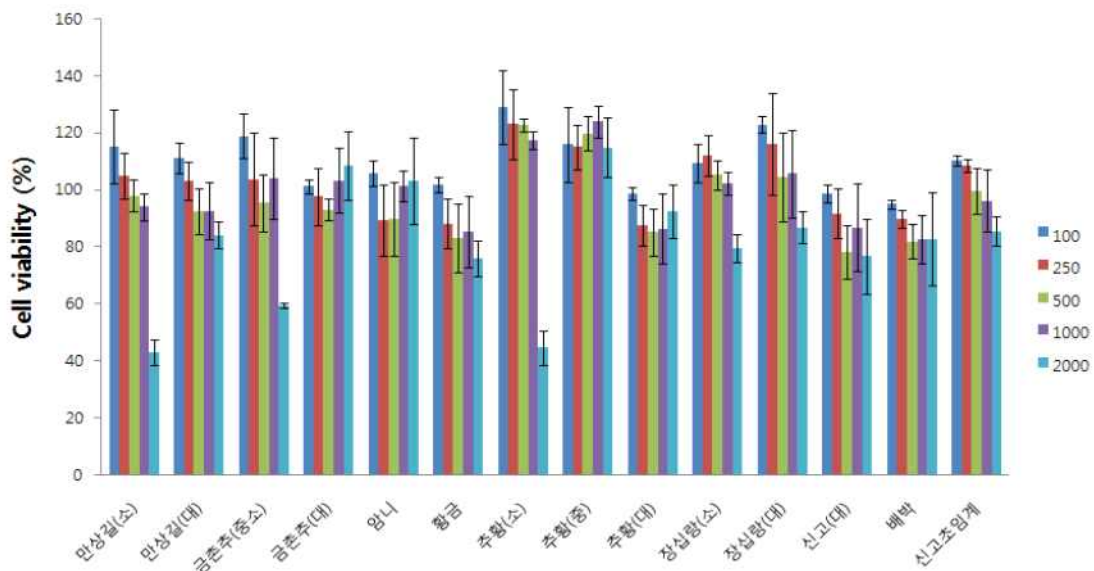


Figure. Schematic illustration of the possible approaches to interfere with melanogenesis pathway. Tyr, tyrosinase M, melanosomes ROS, reactive oxygen species.



(2) 세포 독성(MTT Assay)



## 제 2 장 국내 · 외 기술개발 현황

D-04

### 제 1 절 연구개발 관련 연구동향

#### 1. 항산화에 대한 연구 동향

- 항산화제란 기질의 양과 비교하여 적은 양으로 존재하면서 기질의 산화를 지연시키거나 억제할 수 있는 물질임.
- 항산화제의 작용기전은 몇 가지의 형태로 말 할 수 있음.
  - 개시 작용을 하는 라디칼을 소거함으로써 연쇄반응의 개시를 억제.
  - 촉매작용을 하는 전이금속과 결합함으로써 라디칼 생성의 개시반응을 억제.
  - 개시작용을 하는 라디칼로 전환될 수 없도록 과산화물을 분해.
  - 활성을 가진 라디칼에 의한 계속된 수소탈취를 할 수 없도록 연쇄반응 차단.
- 활성 산소종이란 슈퍼옥사이드와 히드록실 라디칼과 같은 산소 중심의 라디칼들, 과산화 수소나 싱글렛옥시전과 같은 비 라디칼들, 그리고 활성산소와 생체 성분과의 반응에서 유래된 과산화라디칼, 알콕실 라디칼, 히드로 과산화물 등을 포함함.
- 활성 산소종은 정상적인 대사과정에서도 생성되며 질병상태나 스트레스를 받을 때, 세균 감염이나 염증 상태에서 과잉으로 생성됨. 특히 피부는 자외선에 노출되어 있어 활성 산소종을 만드는 광화학적 반응들이 계속해서 일어남.



Figure 1 – Association of increasing reactive oxygen species (ROS) production with infertility.

○ 천연 항산화로는 페놀성 화합물, 플라본 유도체,  $\alpha$ -토코페롤, 아미노산 등이 있으며, 식품의 산화를 방지하기 위하여 합성 항산화제로는 BHA(Butylated hydroxyanisole), BHT(Butylated hydroxytoluene)등이 사용되고 있음.

## 2. 피부 건강에 대한 연구 동향

○ 오존층의 파괴로 인한 환경 변화에 의해 지표에 도달하는 자외선의 양은 점점 증가되고 있음. 피부는 자외선의 영향을 가장 받기 쉬운 기관임. 따라서 활성 산소종으로 유도된 피부의 광산화적 손상 위험이 실질적으로 증가하고 있음.

○ 피부는 외부로부터 개체를 보호하는 장벽기능이라는 매우 중요한 역할을 수행함. 장벽기능은 외부로부터의 다양한 자극(화학물질, 대기오염물질, 건조한 환경, 자외선 등)에 대한 방어와 피부를 통한 체내 수분의 과도한 발산을 막는 보호기능을 가짐.

○ 피부에는 복잡한 항산화 방어망이 발달되어 활성 산소종에 대항하여 보호 작용을 함. SOD, 카탈라아제, 글루타치온퍼옥시다제 등의 항산화효소와  $\alpha$ -토코페롤, 아스코르브산, 카로티노이드 등의 비효소적 항산화 물질들이 피부 항산화 방어망을 구축하고 있음.

○ 그러나 계속된 자외선에의 노출로 생성된 과잉의 활성 산소종은 실질적으로 피부의 효소적 그리고 비효소적 항산화 방어를 위태롭게 함.

○ 과도한 면역 응답 반응인 알러지 질환은 피부에 다양한 손상을 일으킴. I형 알러지인 아토피성 질환은 면역기능의 Down-regulation(면역 억제)작용, 광면역 억제에는 Up-regulation(면역부활)작용을 갖는 물질의 투여가 검토됨.

○ 아토피성 질환에 대한 치료효과(면역 억제작용)가 있는 생약으로는 시호, 황금, 대추, 인삼, 감초, 녹차, 우롱차 등이 알려져 있고, 최근의 연구결과로는 녹차와 우롱차 성분인 (-)-epigallocatechin gallate(EGCG), (-)-gallic acid gallate(GCG)에서 강한 활성을 보임. 광 면역 억제에 대한 면역 부활작용이 있는 생약으로는 마늘과 알로에 추출물에서 효과가 나타남.(Fukuyasu, et al., 1995)

## 제 2 절 국내·외 기술개발 현황

### 1. 배 제품 관련 국내·외 지식재산권 현황

지식재산권명	출원국/출원번호	지식재산권출원인
항산화 기능성 배-포도 혼합식초 및 그 제조방법	대한민국 / 1020060065089	한국원자력연구원
배를 이용한 스프레드 및 그의 제조방법	대한민국 / 1020070069789	안성마춤농협조합 공동사업법인
한약재와 배 추출물을 배합한 향천식 조성물 및 그의 제조방법	대한민국 / 1020050006046	동신대학교산학협력단
배 저장 중 얼룩 억제 및 품질유지를 위한 선도 유지제	대한민국 / 1020080084559	대한민국 (농촌진흥청장)
신고 배의 숙도 판정 방법 및 신고 배의 숙도 판정 칼라차트	대한민국 / 1020080075665	대한민국 (농촌진흥청장)
배 즙 제조방법 및 그에 의해 제조된 배즙	대한민국 / 1020040019992	이윤현
배 건조 스낵 제조방법	대한민국 / 1020090000120	대한민국 (농촌진흥청장)
배를 주재로 한 발효음료의 제조방법	대한민국 / 1020020056247	한국식품연구원
기능성 배 고추장의 제조 방법	대한민국 / 1020010044491	김정기
배와 도라지를 이용한 조청, 엿 및 그의 제조방법	대한민국 / 1020060038054	김명자
신고배의 당도 측정방법 및 당도 판정판	대한민국 / 1020060092724	한국농수산대학 산학협력단
배 스낵 제조 방법	대한민국 / 1020050074048	이윤현
배를 함유하는 떡 및 그 제조방법	대한민국 / 1020100031051	이호성
배 고추장 및 그의 제조방법	대한민국 / 1020000064766	김동림
배 잼의 제조방법 및 이를 이용한 배 잼	대한민국 / 1020110085192	산과들에프앤비 영농조합법인
한약재와 배 추출물을 배합한 향당뇨 식품 조성물 및 그의 제조방법	대한민국 / 1020040084308	동신대학교 산학협력단
배를 활용한 기능성 주류의 제조 방법	대한민국 / 1020070029520	동신대학교 산학협력단
배를 주재로 한 배 식초, 그를 이용한 배 식초 음료 및 그 제조방법	대한민국 / 1020070040439	강명화
유산균 배 발효유를 포함하는 소스조성물	대한민국 / 1020100076326	내추럴초이스(주) (유병현)
유산균을 이용한 배 발효물의 제조방법	대한민국 / 1020090091251	내추럴초이스(주)
배를 이용한 조청의 제조방법	대한민국 / 1020090136136	김화자
기능성 배 와인의 제조방법	대한민국 / 1020090041697	나광출, 김월수
배 유래 활성성분을 포함하는 숙취예방 및 해소용 조성물	대한민국 / 1020090111693	숙명여자대학교 산학협력단
배, 도라지 및 무의 추출 발효숙성 진액의 제조방법	대한민국 / 1020090026790	조은래
한약재와 배 추출물을 배합한 기관지 기능 개선을 위한 조성물의 제조방법 및 이 방법에 의해서 제조된	대한민국 / 1020080030687	살롬산업(주) (나창수)

배 추출물을 함유하는 조성물		
배 음료	대한민국 / 1020080080464	보평운, 박정수
Method of manufacturing japanese pickles including stone cell of pear and japanese pickles including stone cell of pear, method of manufacturing beverage including stone cell of pear and beverage including stone cell of pear, and Method of manufacturing freezed grated pear for japanese pickles or beverage and freezed grated pear for japanese pickles or beverage.	일본 / 23029158	FUKUI YUKICHI
Pear preserve	일본 / 05302165	SAITO AKIKO
Method for preventing discoloration of bottled pear	일본 / 60176024	YAMAMOTO KIMITAKA
Fermentation of pear wine	일본 / 11230524	TAX ADM AGENCY
Preservation of pear	일본 / 06077995	D A I N I P P O N PRINTING CO
Seperation of stone cell from pulp-containing fruit juice in preparation of nectar containing pear flesh	일본 / 51069443	YAMANE AKIYOSHI
Preparation of pear jelly	일본 / 59254843	BANSEI MASUMI
Preparation of pear containing jelly confectionery	일본 / 62114521	KATOO MARONIE:KK

## 2. 배의 기능성 관련 지식재산권 현황

### 가. 대사성질환 관련 기능성

지식재산권명	출원국/출원번호	지식재산권출원인
한약재와 배 추출물을 배합한 항당뇨 식품 조성물 및 그의 제조방법	대한민국 / 1020040084308	김정상, 나창수
사과 배를 이용한 간청소 음료 제조 방법	대한민국 / 1020050074607	장홍선

### 나. 미백 기능성

지식재산권명	출원국/출원번호	지식재산권출원인
피토타이트를 포함하는 미백 화장료 조성물	대한민국 / 1020020016831	(주)코리아나화장품
배나무 추출물을 함유하는 미백 화장료 조성물	대한민국 / 1020030021668	(주)코리아나화장품
배 추출물을 함유하는 피부노화억제용 주름개선 화장료 조성물	대한민국 / 1020070077271	안성마춤농협조합 공동사업법인

### 제 3 절 국내·외 시장 현황

#### 1. 국내 관련 제품생산 및 시장 현황

(가) 먹는 화장품

제품명	제품 사진	제조사	원재료
수분 흡친 사과 두알		(주)자연들	○ 사과 100%
수분 흡친 배			○ 배 100%
Fruit multi vita-C		JCM	
리헬스 네츄라비스		(주)코러스 제약	○ N- 고당, 석류농축액, 석류농축액, 히알 루론산, 생선콜라겐, 녹차, 과일·채 소 혼합분말 27가지 (사과, 바나나, 탄저린, 오렌지, 배, 파인애플, 토마 토, 당근, 키위, 호박, 로즈힙, 살구, 별꽃, 딸기, 백포도, 구아바, 망고, 멜 론, 모델로체리, 복숭아, 자두, 시금 치, 양배추, 녹완두, 레드비트, 레몬, 열대과일)



이너비		CJ 제일제당	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 3.0%(사과 과즙으로 20%, 기준당도 10Brix 이상, 칠레산), 레드자몽 농축액 1.0%(레드자몽 과즙으로 7%, 기준당도 9Brix 이상, 이스라엘산), 정제수, 폴리텍스트로스, 액상과당, 트레할로스, 에리스리톨, 갈가코올리고당, 구연산, 합성착향료(기든허브향, 피치향), 히알루론산 0.066%, 구연산삼나트륨, 사과산, 비타민C, 수크랄로스(합성감미료)</li> </ul>
이너비 잇뷰티			<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 포도당, 유당(우유), 비타민C(영국산), 스테아린산마그네슘, 합성착향료(사과향), 판토텐산칼슘, 천연식품첨가물(치자색소, 홍화황색소), 효소처리스테비아, 사과과즙분말</li> </ul>
솔라 C		고려은단	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 포도당, 유당(우유), 비타민C(영국산), 스테아린산마그네슘, 합성착향료(사과향), 판토텐산칼슘, 천연식품첨가물(치자색소, 홍화황색소), 효소처리스테비아, 사과과즙분말</li> </ul>

(나) 배 음료 제품

제품명	제품 사진	제조사	원재료
사각사각 배		롯데 칠성음료(주)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 배퓨레, 정제수, 액상과당, 합성착향료(배향), DL-사과산, 비타민C</li> </ul>

<p>갈아만든 배</p>		<p>해태음료</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>배퓨레, 정제수, 액상과당, 백설탕, 합성착향료(배향), DL-사과산, 비타민 C</li> </ul>
<p>배랑 도라지랑</p>		<p>풀무원 건강생활(주)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>정제수, 열대과일농축액, 배·도라지 발효농축액, 유산균, 포도농축액, 트로피칼프루츠, 식물성 유산균 락토바실루스 플란타룸 배양액 분말</li> </ul>

(다) 배 기타 제품

제품명	제품 사진	제조사	원재료
<p>풍당 탄산 배 마스크시트</p>		<p>(주)제일참</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>디프로필렌글라이콜, 변성알코올 40-B, 부틸렌글라이콜, 글리세린, 피이지-8, 배 추출물, 폴리메칠실세스퀴옥산, 디메치콘, 이소헥사데칸, 피이지-40 스테아레이트, 세테아릴메치콘, 스테아레스-2, 스테아레스-21, 디포타슘글리시리제이트, 소듐하이알루로네이트, 마치현추출물, 탄산수, 잔탄검, 토크페릴아세테이트, 소듐벤조에이트, 베타인, 피이지-60 하이드로제네이티드 캐스터오일, 카보머, 옥틸도데세스-16, 소듐하이드록사이드, 피이지-150디스테아레이트, 세틸에칠헥사노에이트, 에칠헥실글리세린, 알란토인, 비스-피이지-18 메칠에틸디메칠실란, 디소듐이디티에이, 페녹시에탄올, 향료</li> </ul>

2. 국외 관련 제품 생산 및 시장 현황

<p>Mark Jacobs</p>	<p>OH, LOLA!</p>	
<p>Lilien</p>	<p>Baby Oil Bath</p>	
<p>VICTORIA'S SECRET</p>	<p>Pear Glacé (body lotion)</p>	
	<p>Pear Glacé (Daily Body Wash)</p>	

	Pear Glacé (Hand & body cream)	
Freeman	Feeling Beautiful Pear Refining Facial Cleanser	
MDICLASS	PP Whitening Complex Face Spray	
St. Ives	Revitalizing Pear And Soy Body Wash	
BIOPERTIX	Pear N' Apple Scrub	

<p>Greenscape</p>	<p>Cucumber, Apple &amp; Rice Bran Cleansing Facial Mask</p>	
<p>CHAMOS ACACI</p>	<p>Apple Intensive Nutry Cream</p>	

# 제 3 장 연구수행 내용 및 결과

D-05

## 제 1 절 연구내용 및 결과

### 1. 낙과(미숙과)유래 기능성분의 소재화 및 이너뷰티용 제품화(좋은영농조합법인)

#### 결과

#### I. 서론



- 배는 배나무과(Pomoideae), 배나무속(Pyrus)에 속하는 식물로, 생식용으로 재배되고 있는 배속식물은 동양계 중 *Pyrus pyrifolia*와 *Pyrus ussuriensis* 및 유럽계인 *Pyrus communis* 등 3종류가 있다(An et al., 2004; Challice and Willams, 1968). 고품질 배의 기준은 크기, 모양, 색깔 등의 외관과 당도, 육질, 과즙, 향기 및 영양가 등의 내부품질이 종합되어 구성된다(Harada et al., 2005).
- 우리나라에서는 삼한시대와 신라의 문헌에 배에 관한기록이 있고, 고려시대에 배 재배를 장려 했다는 기록이 있다. 구한말에는 황실 배 • 청실 배 등과 같은 명칭이 있어 일반적으로 널리 재배된 것으로 보인다.
- 예로부터 배는 잎과 껍질, 과실을 민간요법으로 사용하여 왔는데, 잎은 토사광난의 약으로, 껍질은 부스럼이나 피부질환에 사용하였으며, 과일은 가래 기침, 숙취, 해열, 배변, 연육 등에 쓰여 왔다. 과일에는 많은 폴리페놀과 플라보노이드 성분 등 다양한 기능성 성분이 함유되어 있어 항산화, 항노화, 항암, 항염작용 등 효과가 있는 것으로 알려지고 있으며, 배에는 Arbutin, Chlorogenicacid 등이 함유되어 있어 다양한 기능성 활성을 나타내는 것으로 알려져 왔다.

- 특히 알부틴은 피부미백작용이 있는 물질로 배에 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. Arbutin은 멜라닌 색소가 피부에 침착되어 발생하는 기미, 주근깨의 원인이 되는 물질인 Tyrosinase의 활성을 저해함으로써 미백작용을 한다고 보고되었다. Tyrosinase효소작용을 억제하는 배의 천연 알부틴은 배 열매의 성장 시기와 부위에 따라 함유량의 차이가 있는 것으로 보고되어 있으며, 신고배 절지 추출물에서도 항산화 활성 및 tyrosinase 저해활성이 높게 나타났으며, 관련 기능성분에 대한 분석 및 정제방법이 개발되고 있다.
- 그리고 한국산 야생종과 재래종 등에 관한 연구는 한국에서 많이 재배하는 배나무속 (Pyrus)의 신고배 (P.pyrifolia var.culta)와 한국산 야생배 5종의 항산화물질의 함량 및 항산화 활성을 비교한 연구가 있으며, 한국 재래종 및 재배종 배의 잎과 과피 추출물의 항산화 활성연구, 국내 재래종과 야생종의 배에서 비교적 페놀성 화합물과 플라보노이드 함량에 대한 연구 등이 있다. 이들 연구를 살펴보면 잎에서 높은 항산화 활성 나타났으며, 재배종보다 재래종의 잎과 과피부분에서 활성이 높게 나타났음을 보고하고 있는데, 품종들 간의 성분함량에서 차이가 있음을 보여주고 있다. 또한 배의 어린 가지는 강한 항균활성이 있으며, 성장하면서 활성이 감소하는 경향이 있다.
- 배와 관련한 피부미백작용은 알부틴 이외에도 항산화, 항노화 작용이 있는 다른 폴리페놀, 플라보노이드 등의 항산화 작용과 상승효과를 가질 것이라 여겨지고 있는데, 배의 과육, 과피 등에는 폴리페놀 중 flavan-3-ol을 기본 구성단위로 하며 다양한 항염, 항암, 항산화 및 항혈전 작용 등이 있는 축합형 탄닌이 다양하게 함유되어 있는 것으로 보고되고 있다.
- 유럽 원산으로 보이는 배나무는 기원전 훨씬 이전부터 재배 되어왔다. 이탈리아가 세계 최고의 배 생산국이며 중국과 미국이 그 뒤를 따른다.
- 유럽에서는 주로 후식이나 술, 통조림용으로 많이 사용하고, 미국, 캐나다, 뉴질랜드, 아프리카 리카, 오스트레일리아에서는 주로 통조림을 만들어 먹는다.
- 배는 장미과 배나무속에 속하는 과수로 인도 북서부, 아프카니스탄, 중국 서부, 남동 유럽이 원산지이며, 배의 종류에는 우리나라와 일본이 원산지인 남방형 동양배 (Pyrus pyrifolia Nakai)와 중국이 원산지인 북방형 동양배 (Pyrusussuriensis Maxim) 그리고 유럽 및 아시아가 원산지인 서양배 (Pyrus communis Linn) 등이 있다.
- 배는 85~88%의 수분을 함유하고 있으며 주성분은 탄수화물이고, 단맛을 내는 당분은 10~13%로 품종에 따라 차이가 많으며, 일반적으로 Sucrose의 함량이 가장 많고, Fructose, Glucose, Sorbitol 순이다. 다른 과실과 비교해 볼때 단백질 함량은 0.3%로 비슷하며, 지방질은 0.2%로 다소적은 편이다. 식이섬유의 함량은 100 g당 1~2 g 정도로 과실류 중에서는 함량이 높은 편으로 다이어트와 장내 유해균을 억제하는 정상작용을 하는 것으로 알려져

있다. 식 물의 주요 2차대사산물의 하나로 알려진 폴리페놀은 항산화, 항암, 항알러지 등 다양한 생리활성 효과를 보이는 것으로 보고되어 있다. 특히 배에서 분리된 폴리페놀은 면역강화, 혈장 및 간장의 총지질, 총 콜레스테롤 및 중성 지질 감소, 항통풍, 유선암과 전립선암 등 암세포의 생육 억제효과 및 항산화활성이 우수한 것으로 보고되어 있다.

- 영양성분 (100g 당/신고)

영 양 분		합 량	영 양 분		합 량	영 양 분		합 량
에너지	Kcal	41	총식이섬유	g	0.7	나이아신	mg	0.1
수 분	g	88.4	수용성식이섬유	g	0.1	비타민C	mg	4
단백질	g	0.3	불용성식이섬유	g	0.6	칼슘	mg	2
지 질	g	0.1	비타민A(RE)	RE	-	인	mg	11
회 분	g	0.3	비타민A(레티놀)	μg	-	철	mg	0.2
탄수화물	g	10.9	비타민A (베타카로틴)	μg	-	나트륨	mg	3
식염상당량	g	-	비타민B1	mg	0.02	칼륨	mg	171
폐기율	%	17	비타민B2	mg	0.01	-	-	-

※ 출처 : 농촌진흥청

○ 국내 배 가공 산업의 문제점

최근 국내 소비자의 소득수준 향상과 맞물려 건강한 식습관을 위하여 과실류 및 채소류의 소비가 크게 증가하고 있고 이는 과실류 가공식품에도 큰 영향을 미쳐 그 수요가 지속적으로 증가하고 있다.(Kim and Klieber, 1997; Peter et al., 2004) 그러나 국내 과실류의 가공율은 10%에도 미치지 못하는 매우 낮은 수준으로, 특히 배는 특유의 향이나 색이 없고 산미가 부족하여 수요증가의 한계에 직면해 있다.

○ 국내 배 가공량은 2010년에 총 생산량 307,820톤 중 가공량이 8,037톤으로 이는 사과 대비 2.6% 수준으로 감귤 14.8%, 사과 6.1% 등 타 과종에 비해 낮은 수준이다. (MIFAFF, 2011),



**표2. 배 품종별 재배면적**

단위: ha, %

구 분	신 고	원 황	황금배	화 산	기 타	전 체
2011	12,614 (83.6)	899 (6.0)	338 (2.2)	197 (1.3)	1,032 (6.8)	15,081 (100.0)
2010	13,036 (80.3)	985 (6.1)	338 (2.1)	197 (1.2)	1,638 (10.4)	16,239 (100.0)
증감률	-3.2	-8.7	0.0	0.0	-38.6	-7.1

주: ( )는 전체 재배면적 중 해당 품종의 비중임

자료: 통계청, <과수재배면적>

- 국내 소비자들은 배 생산량의 97.4%를 생과로 소비하고 있으며, 생과 소비율이 높다는 것은 한편으로는 소비자들의 입맛에 맞는 다양한 가공품이 적다는 의미가 된다.
- 2010년 배 가공품의 유형별 가공 내역을 보면 배즙이 3,181톤으로 가장 많은 부분을 차지하고 있고 넥타, 주스 순으로 대부분의 가공이 주로 음료가 차지하고 있다. (KOSIS, 2010)

**표3. 배 지역별 재배면적 및 생산량 현황(2008)**

단위: ha, 톤

구분	서울	부산	대구	인천	광주	대전	울산	경기도
재배면적	41	47	17	184	39	223	1,027	3,343
생산량	1,052	933	177	1m793	1,036	4,570	22,541	83,055
구분	강원도	충북	충남	전북	전남	경북	경남	제주도
재배면적	264	943	2,798	760	4,622	2,432	1,515	22
생산량	7,589	21,609	88,460	19,080	127,188	55,511	35,536	633

자료: 통계청



표4. 주산지 시군별 재배면적 및 생산량(성과수 기준)

단위: ha, kg, 톤





주산지 시군	재배면적	10a당 수량	생산량
나주시	2,356	2,994	70,540
원안시	1,161	3,580	41,672
안성시	1,073	3,119	33,468
진주시	828	2,491	20,627
아산시	542	3,324	18,018
상주시	717	2,353	16,869
평택시	512	2,969	15,149
영암군	449	2,858	12,833
남양주시	367	2,6355	9,670
예산군	277	3,472	9,618
연기군	201	3,873	7,784
김천시	374	1,973	7,378



자료: 농림수산식품부, <2008년 사과, 배, 고추, 참깨 생산량조사 결과>, 2008

○ 가공용 배 과실의 품종별 특성

품종	사진	특성
행수		<ul style="list-style-type: none"> <li>· 숙기가 8월 하순으로 조생종인 여름 배이다.</li> <li>· 과의 중량은 300g정도이며 과형은 편원형으로 꽃자리 부위가 움푹 들어가 있다. 과피는 선황갈색이며 과즙이 많고 당도가 높아(12.4° Bx) 품질이 우수하다.</li> <li>· 흑성병과 흑반병에는 저항성이 있으나 동고병에는 약하며, 저장성력이 상온에서 10일 정도로서 매우 약하다.</li> </ul>
한아름		<ul style="list-style-type: none"> <li>· 숙기는 8월 18일 경으로 행수보다 7일 정도 빠르다.</li> <li>· 과실 모양은 수세가 안정된 성목에서는 ‘신고’와 같은 원형이지만 유목기에는 수세가 강할 경우는 꽃자리가 약간 길어져 원추형이 되기도 한다.</li> <li>· 과피색은 담황갈색으로 외관이 수려하고 육질이 아삭 아삭하고 치밀하여 식미가 매우 우수하다.</li> </ul>

		<p>수확 후에 내 부갈변, 분질화 등의 생리장해 발생이 적어 유통기간이 길다.</p>
선황		<ul style="list-style-type: none"> <li>· 과중이 390g으로 행수보다 대과이며 비교적 고당도 (13.2° Bx)로서 육질이 유연, 다즙하고 석세포가 적어 씹는 맛도 좋으며 식미가 우수하다.</li> <li>· 외관은 원형의 담황갈색으로서 수려하며 신고와 유사하다.</li> <li>· 수량성이 3,000kg/10a로 행수보다는 높으며 상온저장력은 30일정도로 같은 시기에 수확되는 다른 품종보다는 매우 강하며 저장 중 생리장해 발생이 적고 수송성이 강하다.</li> </ul>
황금		<ul style="list-style-type: none"> <li>· 과실은 비교적 대과이고 과형은 원형에 가까운 편원형이다. 과피가 황금색이고 과육은 연황백색으로서 투명하다. 육질은 유연, 치밀하고 과즙이 많다.</li> <li>· 숙기는 9월 중하순(남부)~9월 하순(중부지방)이며, 저장력은 비교적 강한 편이다. 유사흑반병, 흑성병에도 강한 편이며, 수량성은 신고 이상으로 풍산성이다.</li> </ul>
원황		<ul style="list-style-type: none"> <li>· 과실의 당도는 13.4° bx로서 장십량, 풍수보다 감미가 높고 다즙하며 숙기는 9월 초로 추석이 9월 중순 이전에 오는 해에는 크게 유리하다.</li> <li>· 과형은 편원형이고 과피색은 선명한 황갈색으로서 외관이 수려하고 과중은 560g이상으로서 만삼길 정도로 커서 동시기에 수확되는 어느 품종보다도 대과이다.</li> <li>· 보다 유연, 다즙하고 석세포가 없으며 만삼길처럼 치밀하여 씹히는 맛이 좋고 식미가 극히 우수하다.</li> </ul>
남수		<ul style="list-style-type: none"> <li>· 숙기는 만개 후 160일 전후인 9월 하순으로 중생종이고, 편원형이며 과피색은 황갈색이지만 성숙이 진행되면 적갈색이 된다.</li> <li>· 과육은 백색이며 육질은 약간 연하고 과즙이 많으며 당도는 14.3° Bx로 감미가 높고 산미는 극히 적어 식미가 우수하다. 상온저장력은 30일정도이다.</li> <li>· 흑성병에는 매우 강하며, 바이러스에 발생되는 배나 무잎검은점병(괴저성반점병)에는 발현성이</li> </ul>

<p>풍수</p>		<p>다.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· 숙기가 9월 중, 하순인 중생종이며, 수원 지방에서 수 확기는 9월 25일경이다.</li> <li>· 과중은 360g정도이고 과형은 원편원형이며 과실 측면에 골이 생기는 특징이 있다. 과피는 선황갈색으로 외관이 좋으며 과육은 육질이 극히 유연하고 과즙이 많으며 당도가 13° Bx로 높아 품질이 우수하다.</li> <li>· 흑반병에 저항성이나 흑성병에는 약한 품종이다. 수량은 3,700kg/10a로 풍산성이다. 상온 저장력은 2~30일 정도이다.</li> </ul>
<p>신일</p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>· 과형은 원형에 가까운 편원형이며, 과피색은 선명한 담황갈색으로 외관도 수려하다. 과중은 370g 정도이며 당도는 13.8° bx 정도, 육질은 유연, 다즙하고 석세포가 극히 적다. 과육색은 투명한 백색으로 아름답다.</li> <li>· 장십랑 대체 품종의 하나로서 감미가 더 높고 유연 다즙하여 식미가 우수하며, 배 재배가 상대적으로 불리한 경기북부(한강이북) 및 강원 내륙 지방에 유리하다.</li> </ul>
<p>화산배</p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>· 숙기는 10월 상순이며, 과형은 편원형으로 풍수와 비슷하고, 과피색은 밝은 황갈색이며 과육은 투명한 순백색이다. 과실당도는 13° bx 내외로서 신고보다 1° bx 정도 높고, 감미가 훨씬 높으며, 육질은 유연, 다즙하고, 식미가 극히 우수하다.</li> <li>· 유사흑반병에 강하고 흑성병에도 강한 편이다. 수량성은 10a당 3,600kg 정도이다.</li> </ul>
<p>신고</p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>· 숙기가 9월 하순(남부)에서 10월 상순(중부)으로 중생종이다.</li> <li>· 과중은 500g이상으로 대과종에 속하며 과형은 편원형이다. 과피는 담황갈색이며, 과육은 육질이 비교적 유연하고 과즙이 많으며 당도는 11.4° bx로 식미가 우수하다.</li> <li>· 흑반병과 흑성병에 비교적 내병성이다. 신고배는 결과 지 착생이 양호하고 수량성이 3,600kg/10a로 풍산성이다. 상온 저장력은 90일 정도이다.</li> </ul>
<p>추황배</p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>· 숙기는 10월 중, 하순으로 만생종이다.</li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>· 과중은 400 ~ 500g으로서 중과종에 속하며 과형은 편 원형이다. 과피는 황갈색이고 과육은 유백색으로 석세포가 적어 육질이 유연하고 치밀한 편이다. 과즙이 많고 당도가 14.1° Bx로 높아 식미가 우수하다. 흑반병과 흑성병에 저항성이 강하다.</li> <li>· 단과지 형성이 잘되며 수량이 3,700kg/10a 정도로 풍 산성인 품종이다. 상온 저장력은 120일 정도로 강하나 저온 저장 중에 과피흑변 증상이 발생될 수 있다.</li> </ul>
<p>만수</p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>· 숙기가 10월 하순이며 과중은 700g내외의 대과이다. 과형은 편원형으로서 외관이 미려하고 과형이 균일하고 안정되어 있어 감천배보다 좋다. 또한 과피색은 보기 좋은 황갈색으로서 만삼길의 수갈색과 대조가 된다.</li> <li>· 당도는 12.4° Bx 정도이고 산미가 적어 식미가 우수하다. 육질은 유연치밀 다즙하며 석세포가 극히 적어 씹는 맛이 좋다.</li> <li>· 식미는 수확 당시보다는 저장 1개월부터 고유 특성을 발휘하여 맛이 더욱 좋아진다.</li> </ul>

출처 : 농촌진흥청

○ 우리나라 배의 재배 품종으로는 신고, 황금, 감천, 풍수, 추황, 원황, 및 만수 등 여러 품종이 있는데, 그 중에서 신고 품종은 국내 배 재배면적의 80.3%를 차지하는 우리나라를 대표하는 주품종이다(KOSTAT, 2011).

○ 과실주스, 건조과실, 신선조각과일에 관한 연구

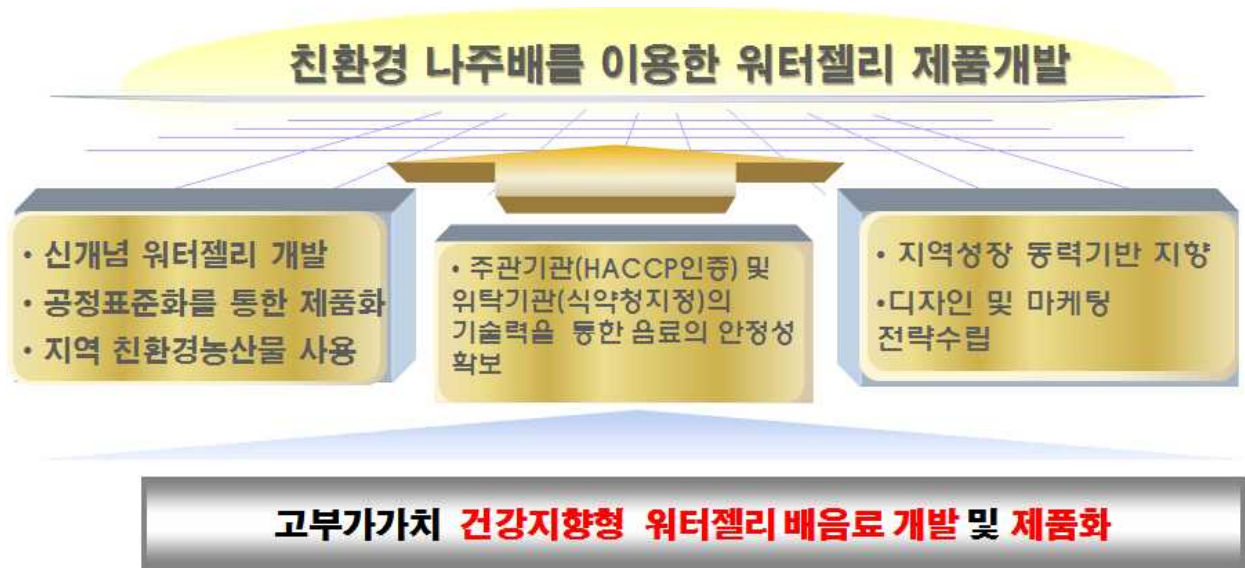
국내 과실주스는 건강지향적인 소비패턴이 정착하면서 기존의 탄산음료 보다는 천연과즙이 함유된 주스류의 음료가 각광받고 있다(Lee et al., 2008). 유형별 과실류 가공내역을 보면 주스, 과즙, 넥타 등 과실음료가 전체 과실류 가공품의 77.9%를 차지하고 있으며, 음료 중에서는 주스가 67.4%를 차지하고 있다(KOSIS, 2010). 주스와 관련하여 국내 시판 중인 포도 주스에서 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량이 높다고 보고되었고(Lee et al., 2011), 사과 주스 제조시 고온살균보다 저온살균을 할 경우 총 폴리페놀 함량이 높다고 보고되었다 (Lee et al., 2012). 배와 관련하여 배 주스를 130~140℃의 고온에서 2~3시간 열처리했을 경우 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 및 항산화 활성이 높았다고 보고 되었고(Hwang et al., 2006), 배 주스 제조시 혼탁주스와 청정주스 농축액의 리올로지 특성에 있어서 차이가 없다고 보고되었다(Choi et al., 1995).

○ 식품에 있어 건조는 수분 함량을 감소시켜 미생물 및 효소에 의한 부패나 변질을 방지하

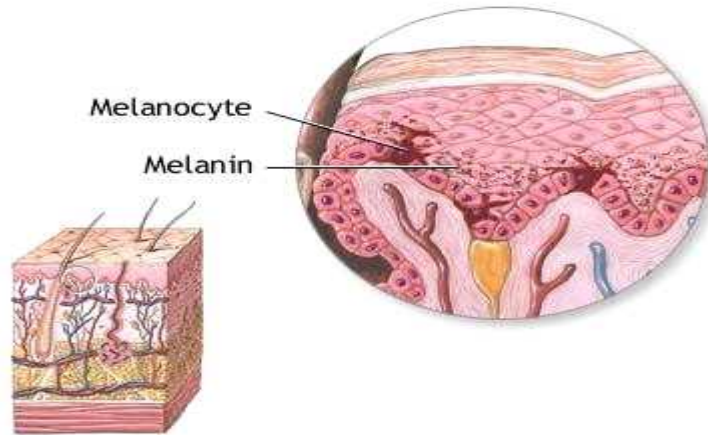
여 저장성을 향상시킨다(Barbanti et al., 1994). 그러나 높은 온도와 긴 건조시간은 가공품의 향미, 색, 영양성분 등에 영향을 미친다(Lenart, 1996). 과실류 건조 가공품과 관련하여 건조 감귤에 있어서 관능적인 향 및 맛의 경우 건조온도 및 건조시간에 영향을 받는 것으로 나타났다(Lee and Yoon, 2003). 또한 사과 건조과실에서 삼투건조에 의한 과실의 경우 외관, 조직 감, 종합적인 기호도 등이 우수하다고 보고되었고 (Choi et al., 2008), 키위 건조과실의 건조 전처리시 삼투처리가 가장 빠른 건조 양상을 보여 가장 효과적인 전처리 방법으로 보고되었다(Youn and Hong, 1999). 이와 같이 다양한 과실류의 건조과일 연구가 이루어지고 있지만 배와 관련한 가공과일 연구는 미비한 실정이다.

- 신선조각과일은 원료 농산물을 소비자의 수요에 맞도록 박피, 절단, 세척, 포장하여 냉장 유통, 판매하는 것으로 편이성과 경제성 등의 장점이 있어 1990년 초부터 유럽과 미국을 중심으로 급격히 발전하고 있는 과채류의 한 소비 형태이다(Lim et al., 2006). 특히 배의 경우 수분함량이 많고, 달고 시원한 맛 때문에 단체 급식 후식용으로 좋아 새로운 소비시장 개척이라는 측면에서 신선조각과일 가공품 개발이 시급한 실정이다 (Son, 2007).
- 신선조각과일 가공품은 제품 생산과정에서 조직의 손상에 따라 연화와 절단면의 공기 노출로 인한 미생물 오염 및 변색, 효소적 갈변이 진행되므로 원재료 상태의 과실에 비해 저장성이 현저히 떨어지는 단점이 있다(Agar et al., 1997; Gorney, 1997; Park and Jung, 2002; Sapers and Miller, 1992). 이에 신선조각과일의 품질유지를 위해 다양한 연구가 진행되고 있는데, 사과 최소가공 절편을 1% ascorbic acid 용액에 침지처리 하였을 때 갈변이 억제 되었다고 하였고 (Hwang et al., 2007), 탄수화물계인 dextrin 소재의 가식성 코팅제가 신고 품종 신선조각배의 갈변 억제에 효과가 있다고 보고되었다(Choe et al., 2001). 또한 신선조각배의 갈변 방지제 처리와 관련하여 N-acetyl cysteine과 calcium propionate의 처리시 효과가 우수하다고 보고(Park et al., 2010) 되는 등 신선조각배의 갈변과 관련하여 많은 연구가 진행되고 있으나, 품종별 신선조각배에 관한 연구는 미비한 실정이다.
- 국내 음료 산업은 2009년 약 3조 6천억 원대의 거대 시장으로서 국내 제조업에 큰 비중을 차지하고 있으며, 그 시장 또한 더욱 광범위해져가고 있다. 최근에는 웰빙 문화가 사회 전반에 뿌리내리고 있는 가운데 생활방식과 식생활의 변화, 그리고 건강에 대한 관심의 증가로 인하여 쾌속성장을 하고 있으며, 시대 변화에 발맞추어 신상품이 지속적으로 창출되고 있다.
- 고급화된 맛을 겨냥한 프리미엄급 음료들이 잇달아 출시돼 음료시장의 변화를 주도하고 있으며 이제 더 이상 음료수는 단순히 갈증 해소를 위한 것만이 아니라 젊은 층을 중심으로 새로운 문화로 발돋움하고 있다. 이런 사회적 추세와 발맞추어 지역산업의 발전 및 농가수익 보존, 그리고 지역농업의 안정화에 따른 지속적 고용창출로 인한 소득증대, 그에 따른 내외 포장재 제작, 배송, 광고, 기계설비 등 연관 산업과의 연계적인 발전을 함께 가져올 수 있을 것이다.

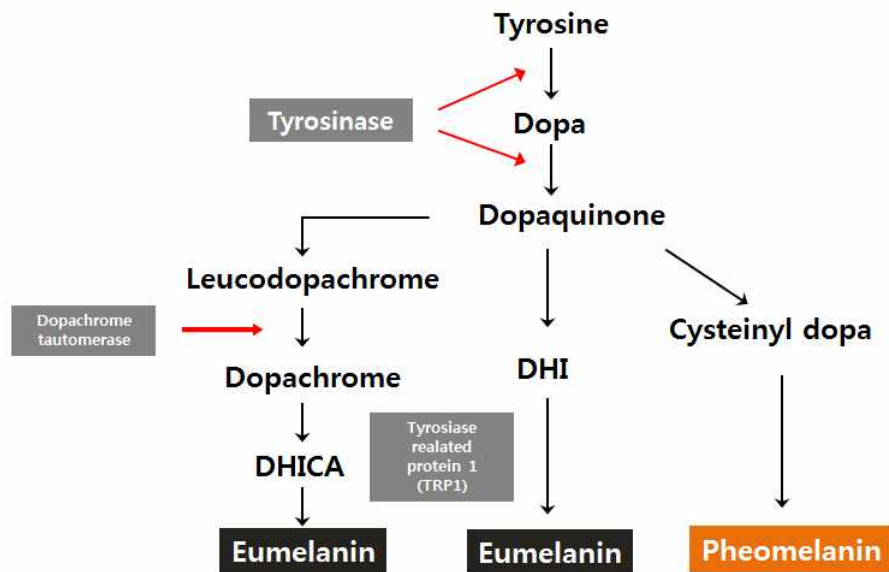
- 기존 캔디류 젤리는 다양한 형태로 대중화 되어 있으나, 흔들어 마시는 개념의 워터젤리 형태는 도입단계로, 배를 소재로 사용하는 음료는 전무한 실정이다. 또한 현재 대부분의 배 가공품의 형태는 배즙으로 다양한 소비자의 요구를 충족시켜주지 못하는 실정이기 때문에, 이를 충족시켜 주기위한 다양한 배 가공품의 개발은 소비자의 다양한 요구를 충족시키고 동시에 지역 산업의 안정화에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.
- 더욱이 타사의 과채음료가 수입산을 원재료로 사용하고 있는 반면에 자사의 경우에는 주재료인 배의 주산지라는 ‘나주’ 장점을 활용하여 신선한 원재료를 상시 수급 가능하며, 천연식물성 젤라틴의 사용, 합성보존료 및 합성착색료 등 식품첨가물의 사용을 최소화 하고 액상과당(HFCS)를 사용하지 않음으로써 건강을 중요시 하는 현대 문화에 맞추어 나가고 지역자원의 부가가치를 높이는데 기여하고자 한다.



○ 피부에서 멜라닌 생합성은 멜라닌 생성세포에서 cascade 효소 반응에 의해 생성된다. 멜라닌은 멜라닌 생성세포의 멜라노솜(melanosome)에서 합성되며, 멜라노솜에는 정상적인 멜라닌을 합성하는데 필요한 특이적인 효소들을 함유하고 있다. 이 효소들 중 가장 잘 알려진 것으로 tyrosinase, TRP-1과 dopachrome tautomerase(DCT) 등이 있다. 이들 중 tyrosinase는 melanogenesis의 속도결정단계인 초기 반응에 작용하는 효소로서, tyrosine을 3,4-dihydroxyphenylalanin(DOPA)로 전환하는 tyrosine hydroxylase 활성과 DOPA를 DOPAquinone으로 산화하는 DOPA oxidase 활성을 모두 가지고 있다. TRP1은 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid(DHICA)를 indole-5,6-quinone-2carboxylic acid로 산화하는 효소이다. DCT는 초기에 TRP2로 불려졌던 효소로서 dopachrome을 DHICA로 이성화하는 효소이다. 멜라닌은 흑, 갈색의 eumelanin과 적, 노랑색의 pheomelanin이 있다. 특히 tyrosinase는 이들 두가지 타입의 melanin 합성에 필요하며, TRP1과 DCT는 eumelanin의 합성에 더 많이 관여하는 것으로 알려져있다.



## Melanin Synthesis



## II. 세부연구수행 결과

### ■ 제 1 세부과제 : 낙과(미숙과)유래 기능성분의 소재화 및 이너뷰티용 제품화 ■

#### I. 연구재료 및 방법

##### 1. 원료 확보

##### 1) 배 원료 확보

- 본 연구에 사용한 배 시료는 나주에 소재하고 있는 배 농가에서 낙과 및 미숙과를 품종 별로 각각 수집하여 깨끗하게 세척한 후에 냉장보관하면서 사용하였다.



## 2. 피부건강개선능 미백뷰티용 소재 추출공정 확립

### 1) 낙과(미숙과) 추출물 제조 공정

- 낙과(미숙과) 원료를 추출하는 추출공정은 아래와 같다. 원료를 수집 및 세척하여 동결건조에 용이하도록 슬라이스하여 동결건조 후 분말화 하였다. 원료 분말을 참여기관에서 선정한 조건으로 추출, 여과, 농축하는 과정을 거쳐서 나온 농축액을 다시 동결건조하여 추출물을 분말화하였다. 분말화된 소재를 이용하여 이너뷰티용 음료개발 및 미백뷰티용 팩개발을 위한 제형연구에 사용하였다.

1. 낙과(미숙과) 원료 수집



2. 낙과(미숙과) 슬라이스



3. 동결건조 및 분말화



4. 추출



5. 여과 및 농축



6. 동결건조



### 3. 원료의 안전성 검사

#### 1) 납, 비소 검사

# **제일분석센터**

©152-768 서울시 구로구 디지털로 272번지 한신IT타워 913호 전화)02-869-8188 팩스)02-868-4610 담당·함주원

## 검 사 성 적 서

의뢰인	상 호	좋은영농조합법인	사업자등록번호	412-81-29873
	주 소	전라남도 나주시 노안면 이슬촌길 87번지	대 표 자	이 기 선
의뢰일자	2014. 9. 12.		시 료 명	낙과 추출분말
접수번호	14-09-F11018			

### 검 사 결 과

항 목	결 과	비 고
납(mg/kg)	건물중에 대하여	- 분 석 방 법 : 비료품질검사법
비소(mg/kg)		
수분(%)	5.44	

주) 상기 내용은 의뢰인이 당사에 제공한 시료에 대한 분석결과입니다.

2014 년 9 월 15 일

제일분석센터 대표이사 권



2) 잔류농약 검사

<별첨> 시험항목 및 결과

접수번호

14-09-P0039

번호	시험항목	기준	결과	비고	번호	시험항목	기준	결과	비고
		(mg/kg)	(mg/kg)				(mg/kg)	(mg/kg)	
1	Acetamidrid	-	검출한계 미만		48	Cymoxanil	-	검출한계 미만	
2	Acrinathrin	-	검출한계 미만		50	Cypermethrin	-	검출한계 미만	
3	Alachlor	-	검출한계 미만		51	Cyproconazole	-	검출한계 미만	
4	Aldicarb	-	검출한계 미만		52	Cyprodinil	-	검출한계 미만	
5	Aldim	-	검출한계 미만		53	DDT	-	검출한계 미만	
6	Amisulbrom	-	검출한계 미만		54	Deltamethrin	-	검출한계 미만	
7	Anilofos	-	검출한계 미만		55	Diazinon	-	검출한계 미만	
8	Azinphos-methyl	-	검출한계 미만		56	Dichlofluanid	-	검출한계 미만	
9	Azoxystrobin	-	검출한계 미만		57	Dichlorvos : DDVP	-	검출한계 미만	
10	Bendiocarb	-	검출한계 미만		58	Diclofop-methyl	-	검출한계 미만	
11	Benomyl	-	검출한계 미만		59	Dicloran	-	검출한계 미만	
12	Benthiavdicarb-isopropy	-	검출한계 미만		60	Dicofol	-	검출한계 미만	
13	Benzoximate	-	검출한계 미만		61	Dieldrin	-	검출한계 미만	
14	BHC(a,b,r,d)	-	검출한계 미만		49	Diethofencarb	-	검출한계 미만	
15	Bifenox	-	검출한계 미만		62	Difenoconazole	-	검출한계 미만	
16	Bifenthrin	-	검출한계 미만		63	Diflubenzuron	-	검출한계 미만	
17	Bitertanol	-	검출한계 미만		64	Dimepiperate	-	검출한계 미만	
18	Boscalid	-	검출한계 미만		65	Dimethenamid	-	검출한계 미만	
19	Bromobutide	-	검출한계 미만		66	Dimethoate	-	검출한계 미만	
20	Bromopropylate	-	검출한계 미만		67	Dimethomorph	-	검출한계 미만	
21	Buprofezin	-	0.091		68	Dimethylvinphos	-	검출한계 미만	
22	Butachlor	-	검출한계 미만		69	Diniconazole	-	검출한계 미만	
23	Cadusafos	-	검출한계 미만		70	Diphenamid	-	검출한계 미만	
24	Captan	-	검출한계 미만		71	Diphenylamine	-	검출한계 미만	
25	Carbaryl : NAC	-	검출한계 미만		72	Disulfoton	-	검출한계 미만	
26	Carbendazim	-	검출한계 미만		73	Dithiopyr	-	검출한계 미만	
27	Carbofuran	-	검출한계 미만		74	Diuron	-	검출한계 미만	
28	Carbophenothion	-	검출한계 미만		75	Edifenphos	-	검출한계 미만	
29	Chinomethionat	-	검출한계 미만		76	Endosulfan(a,b,sulfate)	-	검출한계 미만	
30	Chlorantraniliprole	-	검출한계 미만		77	Endrin	-	검출한계 미만	
31	Chlordane	-	검출한계 미만		78	EPN	-	1.080	
32	Chlorfenvinpyr	-	검출한계 미만		79	Esprocarb	-	검출한계 미만	
33	Chlorfenvinphos	-	검출한계 미만		80	Ethaboxam	-	검출한계 미만	
34	Chlorfluazuron	-	검출한계 미만		81	Ethalfuralin	-	검출한계 미만	
35	Chlorobenzilate	-	검출한계 미만		82	Ethiofencarb	-	검출한계 미만	
36	Chlorothalonil	-	검출한계 미만		83	Ethion	-	검출한계 미만	
37	Chlorpropham	-	검출한계 미만		84	Ethofenprox	-	검출한계 미만	
38	Chlorpyrifos	-	검출한계 미만		85	Ethoprophos	-	검출한계 미만	
39	Chlorpyrifos-methyl	-	검출한계 미만		86	Etoxazole	-	검출한계 미만	
40	Chromafenozide	-	검출한계 미만		87	Etridiazole	-	검출한계 미만	
41	Clofentezine	-	검출한계 미만		88	Etrimfos	-	검출한계 미만	
42	Clothianidin	-	검출한계 미만		89	Fenamidone	-	검출한계 미만	
43	Cyazofamid	-	검출한계 미만		90	Fenamiphos	-	검출한계 미만	
44	Cyflufenamid	-	검출한계 미만		91	Fenarimol	-	검출한계 미만	
45	Cyfluthrin	-	검출한계 미만		92	Fenazaquin	-	검출한계 미만	
46	Cyhalofop-butyl	-	검출한계 미만		93	Fenbuconazole	-	검출한계 미만	
47	Cyhalothrin	-	검출한계 미만		94	Fenitrothion : MEP	-	검출한계 미만	

번호	시험 항목	기준	결과	비고	번호	시험 항목	기준	결과	비고
		(mg/kg)	(mg/kg)				(mg/kg)	(mg/kg)	
95	Fenobucarb	-	검출한계 미만		143	Metalaxyl	-	검출한계 미만	
96	Fenothiocarb	-	검출한계 미만		144	Metamifop	-	검출한계 미만	
97	Fenoxanil	-	검출한계 미만		145	Metconazole	-	검출한계 미만	
98	Fenpropathrin	-	검출한계 미만		146	Methabenzthiazuron	-	검출한계 미만	
99	Fenpyroximate	-	검출한계 미만		147	Methidathion	-	검출한계 미만	
100	Fenthion : MPP	-	검출한계 미만		148	Methiocarb	-	검출한계 미만	
101	Fenvalerate	-	검출한계 미만		149	Methomyl	-	검출한계 미만	
102	Ferimzone	-	검출한계 미만		150	Methoxychlor	-	검출한계 미만	
103	Fipronil	-	검출한계 미만		151	Methoxyfenozide	-	검출한계 미만	
104	Fluacrypyrim	-	검출한계 미만		152	Pentachlorophenyl	-	검출한계 미만	
105	Flubendiamide	-	검출한계 미만		153	Metobromuron	-	검출한계 미만	
106	Flucythrinate	-	검출한계 미만		154	Metolachlor	-	검출한계 미만	
107	Fludioxonil	-	검출한계 미만		155	Metolcarb	-	검출한계 미만	
108	Flufenoxuron	-	검출한계 미만		156	Metribuzin	-	검출한계 미만	
109	Flumioxazine	-	검출한계 미만		157	Mevinphos	-	검출한계 미만	
110	Fluopicolide	-	검출한계 미만		158	Molinate	-	검출한계 미만	
111	Fluquinconazole	-	검출한계 미만		159	Myclobutanil	-	검출한계 미만	
112	Flusilazole	-	검출한계 미만		160	Napropamide	-	검출한계 미만	
113	Flutolanil	-	검출한계 미만		161	Novaluron	-	검출한계 미만	
114	Folpet	-	검출한계 미만		162	Nuarimol	-	검출한계 미만	
115	Forchlorfenuron	-	검출한계 미만		163	Ofurace	-	검출한계 미만	
116	Fosthiazate	-	검출한계 미만		164	Oxadiazon	-	검출한계 미만	
117	Fthalide	-	검출한계 미만		165	Oxamyl	-	검출한계 미만	
118	Furathiocarb	-	검출한계 미만		166	Oxaziolomefone	-	검출한계 미만	
119	Halfenprox	-	검출한계 미만		167	Oxyfluorfen	-	검출한계 미만	
120	Heptachlor	-	검출한계 미만		168	Paclobutrazol	-	검출한계 미만	
121	Hexaconazole	-	검출한계 미만		169	Parathion	-	검출한계 미만	
122	Hexaflumuron	-	검출한계 미만		170	Parathion-methyl	-	검출한계 미만	
123	Hexythiazox	-	검출한계 미만		171	Penconazole	-	검출한계 미만	
124	Imazalil	-	검출한계 미만		172	Pencycuron	-	검출한계 미만	
125	Imibenconazole	-	검출한계 미만		173	Pendimethalin	-	검출한계 미만	
126	Imidacloprid	-	검출한계 미만		174	Pentachloroaniline	-	검출한계 미만	
127	Indanofan	-	검출한계 미만		175	Pentoxazone	-	검출한계 미만	
128	Indoxacarb	-	검출한계 미만		176	Permethrin	-	검출한계 미만	
129	Iprobenfos	-	검출한계 미만		177	Phenthoate : PAP	-	검출한계 미만	
130	Iprodione	-	검출한계 미만		178	Phorate	-	검출한계 미만	
131	Iprovalicarb	-	검출한계 미만		179	Phosalone	-	검출한계 미만	
132	Isofenphos	-	검출한계 미만		180	Phosphamidon	-	검출한계 미만	
133	Isoprocarb : MIPC	-	검출한계 미만		181	Piperophos	-	검출한계 미만	
134	Isoprothiolane	-	검출한계 미만		182	Pirimicarb	-	검출한계 미만	
135	Kresoxim-methyl	-	검출한계 미만		183	Pirimiphos-ethyl	-	검출한계 미만	
136	Lufenuron	-	검출한계 미만		184	Pirimiphos-methyl	-	검출한계 미만	
137	Malathion	-	검출한계 미만		185	Probenazole	-	검출한계 미만	
138	Mandipropamid	-	검출한계 미만		186	Prochloraz	-	검출한계 미만	
139	Mecarbam	-	검출한계 미만		187	Procymidone	-	검출한계 미만	
140	Mefenacet	-	검출한계 미만		188	Profenofos	-	검출한계 미만	
141	Mepanipyrim	-	검출한계 미만		189	Prometryn	-	검출한계 미만	
142	Mepronil	-	검출한계 미만		190	Propanil	-	검출한계 미만	

번호	시험항목	기준	결과	비고	번호	시험항목	기준	결과	비고
		(mg/kg)	(mg/kg)				(mg/kg)	(mg/kg)	
191	Propiconazole	-	검출한계 미만		220	Tefluthrin	-	검출한계 미만	
192	Propoxur	-	검출한계 미만		221	Terbufos	-	검출한계 미만	
193	Prothiofos	-	검출한계 미만		222	Terbutylazine	-	검출한계 미만	
194	Pyraclufos	-	검출한계 미만		223	Terbutryn	-	검출한계 미만	
195	Pyraclostrobin	-	검출한계 미만		224	Tetraconazole	-	검출한계 미만	
196	Pyrazophos	-	검출한계 미만		225	Tetradifon	-	검출한계 미만	
197	Pyribenzoxim	-	검출한계 미만		226	Thiabendazole	-	검출한계 미만	
198	Pyributicarb	-	검출한계 미만		227	Thiacloprid	-	검출한계 미만	
199	Pyridaben	-	검출한계 미만		228	Thiamethoxam	-	검출한계 미만	
200	Pyridalyl	-	검출한계 미만		229	Thiazopyr	-	검출한계 미만	
201	Pyridaphenthion	-	검출한계 미만		230	Thifluzamide	-	검출한계 미만	
202	Pyrimethanil	-	검출한계 미만		231	Thiobencarb	-	검출한계 미만	
203	Pyrimidifen	-	검출한계 미만		232	Thiodicarb	-	검출한계 미만	
205	Pyriminobac-methyl	-	검출한계 미만		233	Thiophanate-methyl	-	검출한계 미만	
204	Pyriminobac-methyl(E)	-	검출한계 미만		234	Tiadinil	-	검출한계 미만	
206	Pyriproxyfen	-	검출한계 미만		235	Tolclofos-methyl	-	검출한계 미만	
207	Pyroquilon	-	검출한계 미만		236	Tolyfluanid	-	검출한계 미만	
208	Quinoclamine	-	검출한계 미만		237	Tralomethrin	-	검출한계 미만	
209	Silafloufen	-	검출한계 미만		238	Triadimefon	-	검출한계 미만	
210	Simazine	-	검출한계 미만		239	Triadimenol	-	검출한계 미만	
211	Simeconazole	-	검출한계 미만		240	Triazophos	-	검출한계 미만	
212	Simetryn	-	검출한계 미만		241	Tricyclazole	-	검출한계 미만	
213	Spirodiclofen	-	검출한계 미만		242	Trifloxystrobin	-	검출한계 미만	
214	Spiromesifen	-	검출한계 미만		243	Triflumizole	-	검출한계 미만	
215	Tebuconazole	-	검출한계 미만		244	Triflumuron	-	검출한계 미만	
216	Tebufenozide	-	검출한계 미만		245	Trifluralin	-	검출한계 미만	
217	Tebufenpyrad	-	검출한계 미만		246	Uniconazole	-	검출한계 미만	
218	Tebupirimfos	-	검출한계 미만		247	Vinclozolin	-	검출한계 미만	
219	Teflubenzuron	-	검출한계 미만		248	Zoxamide	-	검출한계 미만	

4. 피부건강 이너뷰티케어용 음료 개발

1) 최적의 원료 배합비 산출 및 레시피 개발

① 최적의 원료 배합비 산출

- 낙과(신고) 추출분말을 이용한 음료개발은 0% 주정낙과추출분말의 함량을 0.1 ~ 1.5%로 조절해가면서 이에 따라 첨가되는 물의 함량만 조절하고, 추가되는 첨가물의 함량은 일정하게 유지시켜서 5가지의 낙과추출분말의 음료 레시피를 개발하였다.

Ingredients(%)	A No.22	B No.24	C No.26	D No.28	E No.30
water	86.63	86.53	86.23	85.73	85.23
낙과추출분말	0.10	0.20	0.50	1.00	1.50
정백당	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00
올리고당	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
구연산	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
비타민 C	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
구연산삼나트륨	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
스테비오사이드	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Mixed extract	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

② 낙과 추출물 음료 레시피 및 시제품 개발

㉠ 낙과 추출물 음료의 품질 특성

- pH, Brix 및 색도 측정

- 낙과 추출물 음료의 pH 측정은 시료를 20mL을 각각 100mL 삼각플라스크에 넣고 pH meter(420A, Thermo Orion, Beverly, MA, USA)를 이용하여 3회 반복 측정 후, 평균값을 계산하여 나타내었고, Brix는 당도계(PAL- $\alpha$  Brix 0~85%, Atago, Tokyo, Japan)를 이용하여 3회 반복 측정 후 평균치를 나타내었다. 그리고 색도는 Color meter(JC 801, Color Techno System Corporation, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 먼저 기기의 측정경에 표준색판(X=94.30, Y=96.11, Z=114.55)을 설치하여 보정하였다. 시료를 원형 cell에 넣어 측정한 후 L(명도, Lightness), a(적색도, redness) 및 b(황색도, yellowness)값으로 나타내었다.

㉡ 기타 성분배합을 통한 품질 및 기능성 향상

- 각종 과실농축액의 첨가를 통한 레시피 개발

- 낙과 추출물 음료의 품질 향상을 위하여 자사 음료 기준에 맞춰 음료 Brix 10~13, 젤리 Brix 16.0~17.0 사이, PH 3.0~3.5 사이로 레시피를 잡고 감귤, 딸기, 매실, 사과, 망고, 키위 등 과실농축액과 그에 맞추어 오렌지향, 딸기향, 매실향, 망고향, 사과향, 키위향 등 향료를 첨가하여 관능 평가를 실시하였다.

Ingredients(%)	감귤 A		딸기 B		매실 C		사과, 망고 D		사과 E		키위 F	
water	81.51		86.64		85.57		82.99		80.74		84.94	
낙과추출분말	0.2		0.20		0.20		0.20		0.20		0.2	
정백당	7.15		8.60		6.43		5.82		10.50		8.9	
올리고당	3.40		3.8		5.15		1.25		4.04		4.02	
흑설탕					1.07							
과실농축액	(감귤)	7.5	(딸기)	0.50	(매실)	1.05	(사과)	0.70	(사과)	3.23	(키위)	0.60
							(망고)	8.6				
향	(오렌지향)	0.07	(딸기향)	0.13	(매실향)	0.04	(망고향)	0.17	(사과향)	0.12	(키위향)	0.14
혼합제제							0.09		0.97		0.97	
구연산	0.08		0.07		0.29		0.08		0.09		0.13	
비타민 C	0.08		0.07		0.17		0.08		0.09		0.09	
구연산삼나트륨	0.01		0.01		0.03		0.01		0.01		0.01	
스테비오사이드			0.01				0.01		0.01		0.01	
Mixed extract	100.00		100.00		100.00		100.00		100.00		100.00	

• 기타 성분배합을 통한 기능성 향상

- 낙과 추출물 음료의 기능성 향상을 위하여 피부보습을 위한 N-아세틸글루코사민을 각각의 음료 레시피에 일정량 첨가하였다.

㉔ 관능 평가

• 시료준비 및 제시

- 관능평가를 위한 시료는 제조하여 4℃ 냉장고에 보관하여 사용하였다. 외관평가를 위해 음료는 투명한 100mL의 유리컵에 일정량(50mL)을 담아 제시하였다. 이때 평가에 대한 편견이 없도록 시료용기에 난수표에서 추출한 세 자리 숫자를 표기하였다. 평가시료온도는 4±1℃가 되도록 하였다. 시료를 평가하는 사이사이 입안을 헹굴수 있도록 생수와 빨는 컵을 함께 제시 하였다.

• 평가내용 및 방법

- 낙과 추출물 음료에 대한 관능적 특성 평가는 랜덤화 완전 블록실험법에 따라 패널요원 1인이 무작위로 배치된 각각의 음료를 모두 평가하도록 하였다. 시료의 특성 평가는 단맛, 색감, 향미, 전반적인 품질순으로 평가하였다. 검사시간은 오후 3시였으며, 평가에 참여하는 관능검사원들에게는 평가 1시간 전부터 물 이외의 음료나 음식물 섭취를 피하도록 하였고, 향이 진한 화장품의 사용을 금하였다. 평가는 5점 척도법을 사용하였고, 특성강도가

강할수록 높은 점수를 부여하도록 하였다 (1점=약하다, 5점=강하다).

## 2) 피부건강 이너뷰티케어용 음료 개발 공정 확립

- 낙과 추출물을 이용한 피부건강 이너뷰티케어용 음료개발 공정 확립을 위하여 원료 입고부터 시작하여 원료의 보관, 각종 첨가물의 배합, 가열, 살균, 필터, 포장 등 일련의 음료개발공정을 확립하였다.

## 4. 피부건강 미백제품 마케팅 전략 수립

### 1) 온라인 마케팅

- 자사 홈페이지 및 쇼핑몰의 전문성을 확보하여 제품 및 기업 신뢰도를 상승시킴
- 다채널 커뮤니티를 활성화하여 소비자의 선호도 등을 피드백하는 시스템 강화

### 2) 홍보물 및 광고 제작

- 전통적인 방식으로 기업 및 제품에 대한 홍보 유인물을 제작하여 관공서, 지역특산물판매장, 중소기업지원프로그램 등을 통하여 정보제공을 함과 동시에 소비자와 소통할 수 있는 장을 마련하여 병행 활용

### 3) 직영 대리점 운영 및 관리

- 현재 운영하고 있는 30여개의 직영대리점, 쇼핑몰 및 오픈마켓을 통해 구축한 판매망의 지속적인 관리를 통해 입지를 공고히 함

### 4) 해외 마케팅

- 국제식품박람회 등의 지속적인 참가 및 여러 기관의 바이어 상담, 교류 프로그램을 적극 활용하여 수출시장 진출의 기반을 마련
- 자사 홈페이지 등에 외국어 페이지를 운영하여 바이어와 접촉할 수 있는 다양한 채널을 상시 운영

### 5) 대형업체 판매

- 대기업 판매 제품의 사은품으로 지급
- 공장, 기업체 행사(체육대회, 행사기념품 등) 답례품 활용
- CVS 생활용품 입점추진
- 다이소등 간편 소재 제품 판매처 홍보 입점추진



## II. 실험결과

### 1. 피부건강개선능 미백뷰티용 소재 추출공정 확립

#### 1) 낙과(미숙과) 추출물 제조

##### ① 낙과(미숙과) 원료 분말화

- 낙과 원료를 동결건조하기 용이하도록 하기 위하여 슬라이스 한 후, 동결건조하여 16.35kg의 낙과 분말을 얻었다.



##### ② 낙과(미숙과) 추출물 분말 제조

- 낙과 분말을 추출, 농축하는 공정을 거쳐서 얻어진 낙과 추출·농축액을 동결건조하여 분말을 얻었다.



③ 낙과(미숙과) 추출물 분말 품목제조보고서

## 품목제조보고대장

1. 품목제조보고사항

영업신고번호 제 140 호

품목보고번호	000095	제품명	낙과 추출분말		업소명	좋은영농조합법인	
식품의 유형 (식품군)	과.채가공품 (개정)			보고일자	2014-07-23		
	기타식품류 (개정)						
원재료 또는 성분명 및 배합비율	배 100%						
성 상	분말제품						
포장방법 (단위)	밀봉포장						
	o 포장단위 : 500g, 1kg, 5kg, 10kg, 20kg Kg						
용도용법	제품의 원재료로 사용						
유통기간	제조일로부터18개월까지			품질 유지기한			
품목제조조건	식품제조공정을 준수할것			기재자	직 급	지방보건주사보	
					성 명	김창균	
유통기간 설정사유	<small>(*) 본 제품의 수 성분은 낙(낙과)을 농약과 조하여 무알코올 액상분말(내연)이 주성 성분으로 말봉 포장, 보관하므로 인부의 과다 및 습기가 침투하지 못하고 미생물 생육이 억제됨                  (**) 본 제품의 제품특성이 유지할 것은 유통제품(당사제품 : Acil Comesto co.,Ltd/영국 아사이베리 과우더)의 유통기한이 제조일로부터 18개월인 것을 감안하여 식품의 유통기한 설정기준 (제. 1. D)에 따라 유통기한 설정사항을 생략하고 본 제품의 유통기한을 18개월로 설정합니다.</small>						
기타							

2. 보고사항변경보고내용

	제 품 명	
년 월 일	변 경 제 품 명	기 재 자

## 2. 피부건강 이너뷰티케어용 음료 개발

### 1) 낙과 추출물 함량에 따른 품질 특성 및 관능적 특성

#### ① 품질특성

- 낙과 추출물의 함유량을 각각 달리하여 제조한 낙과 추출물 음료 5종의 pH, Brix, 색도를 측정된 결과는 다음과 같다. 낙과 추출물 함량에 따라 A ~ E로 표기하였다, pH는 4.19 ~ 4.23, Brix는 13.5 ~13.8 brix로 거의 비슷한 값을 보였으며 색도를 측정된 결과 L값은 33, a값은 -0.39 ~ -0.35, b값은 -0.98 ~ -0.92의 값을 보였고, 육안상으로는 무색을 띠었다.

Table 1. 낙과 추출음료 품질특성

sample	pH	sugar content	Color value		
			L(Lightness)	a(Redness)	b(Yellowness)
A	4.20	13.5	33.11±0.01	-0.38±0.01	-0.93±0.02
B	4.21	13.6	33.25±0.00	-0.36±0.01	-0.93±0.03
C	4.19	13.5	33.30±0.01	-0.35±0.00	-0.92±0.00
D	4.20	13.6	33.26±0.01	-0.39±0.01	-0.98±0.01
E	4.23	13.8	33.28±0.00	-0.37±0.02	-0.94±0.00

\*. 낙과추출물 함량 : A 0.1%, B 0.2%, C 0.5%, D 1.0%, E 1.5%

#### ② 관능적 특성

- 낙과 추출물 함량에 따른 음료의 관능검사를 측정된 결과 낙과추출분말 0.2% 들어간 B Type의 음료를 선호한 결과를 얻었다. 단맛의 경우  $4.20 \pm 0.8$ , 색감의 경우  $4.13 \pm 0.7$ , 향미의 경우  $4.00 \pm 1.0$ , 전반적인 기호도의 경우  $4.67 \pm 0.5$ 의 결과를 얻었고, 기호도 조사에서 가장 선호한 결과를 얻은 B type의 음료를 선택하여 좀 더 자세한 배합비를 찾기로 하였다. 그리고 낙과추출 분말만으로는 맛이 강하지 않아 맛을 내는데 어려움이 있어 각종 농축액과 향료를 첨가하여 배와 가장 조화를 이루는 맛을 찾아보기로 하였다.

Table 2. 낙과 추출음료 관능평가 (0~5score)

구분(%)	Sweetness	Color	Flavor	Overall quality
A-낙과추출분말 0.1% No.22	4.13±0.7	3.93±0.9	3.87±0.6	4.07±0.8
B-낙과추출분말 0.2% No.24	<b>4.20±0.8</b>	<b>4.13±0.7</b>	<b>4.00±1.0</b>	<b>4.67±0.5</b>
C-낙과추출분말 0.5% No.26	4.00±0.8	4.07±0.9	4.27±0.6	3.80±0.6
D-낙과추출분말 1.0% No.28	3.93±0.7	3.80±0.9	3.67±0.7	4.33±0.6
E-낙과추출분말 1.5% No.30	3.93±1.0	3.20±0.7	3.40±0.8	4.07±0.7

2) 기타 성분 배합을 통한 품질 및 기능성 향상

① 각종 농축액 및 향료를 첨가한 음료개발

• 관능평가

- 총 6가지의 과실농축액과 향료를 첨가하여 음료를 제조, 관능평가를 측정한 결과는 다음과 같았다. 대체적으로 딸기, 키위 농축액 및 향료가 첨가된 음료에 비하여 감귤, 매실, 사과, 사과+망고 농축액이 첨가된 음료를 선호하는 것으로 나타났다.

Table 3. 낙과 추출물과 농축액 첨가 음료 관능평가 (0~5score)

구분(%)	Sweetness	Color	Flavor	Overall quality
A-낙과추출분말+감귤	<b>4.13±0.7</b>	<b>4.19±0.8</b>	<b>4.21±0.6</b>	<b>4.23±0.8</b>
B-낙과추출분말+딸기	4.00±0.8	3.71±0.8	3.87±1.0	3.96±0.5
C-낙과추출분말+매실	<b>4.10±0.8</b>	<b>3.98±0.9</b>	<b>3.91±0.7</b>	<b>4.05±0.7</b>
D-낙과추출분말+사과+망고	<b>3.93±0.7</b>	<b>3.80±0.9</b>	<b>3.67±0.7</b>	<b>4.33±0.6</b>
E-낙과추출분말+사과젤리	<b>4.07±0.8</b>	<b>4.07±0.9</b>	<b>4.13±0.6</b>	<b>4.19±0.6</b>
F-낙과추출분말+키위젤리	4.03±0.7	3.80±1.0	3.45±0.8	3.65±0.6

② 기능성 향상을 위한 성분 배합 레시피

- 과실 농축액과 향료 첨가를 통한 관능평가를 토대로 하여 선호된 4가지 낙과 추출물 음료에 각각 0.11%의 N-아세틸글루코사민을 첨가하여 피부보습 향상을 위한 레시피를 개발하였다.

Ingredients(%)	감귤 A		매실 C		사과, 망고 D		사과젤리 E	
water	81.40		85.46		82.88		80.63	
낙과추출분말	0.2		0.20		0.20		0.20	
정백당	7.15		6.43		5.82		10.50	
올리고당	3.40		5.15		1.25		4.04	
흑설탕			1.07					
N-아세틸 글루코사민	0.11		0.11		0.11		0.11	
과실농축액	(감귤)	7.5	(매실)	1.05	(사과)	0.70	(사과)	3.23
					(망고)	8.6		
향	(오렌지향)	0.07	(매실향)	0.04	(망고향)	0.17	(사과향)	0.12
혼합제제					0.09		0.97	
구연산	0.08		0.29		0.08		0.09	
비타민 C	0.08		0.17		0.08		0.09	
구연산삼나트륨	0.01		0.03		0.01		0.01	
스테비오사이드					0.01		0.01	
Mixed extract	100.00		100.00		100.00		100.00	

### 3) 피부건강 이너뷰티케어용 음료 개발

- 낙과 추출물을 이용하여 과실농축액, 향료, 첨가물들의 종류 및 각각의 배합비를 조절해 가면서 품질, 관능 평가 등을 통하여, 다음과 같은 낙과 추출물 음료 레시피를 개발하였다.

#### ① 튼튼 감귤

##### ㉠ 레시피



원재료명	배합비(%)	
정제수	81.40	
정백당	7.15	
감귤농축액	7.50	국내산, 과즙으로 50%
올리고당	3.40	
N-아세틸 글루코사민	0.11	N-아세틸글루코사민으로 100g
낙과추출분말	0.20	
비타민C	0.08	
구연산	0.08	
합성착향료 (오렌지향)	0.07	
구연산삼나트륨	0.01	
	100.00	

#### ㉡ 기준, 규격

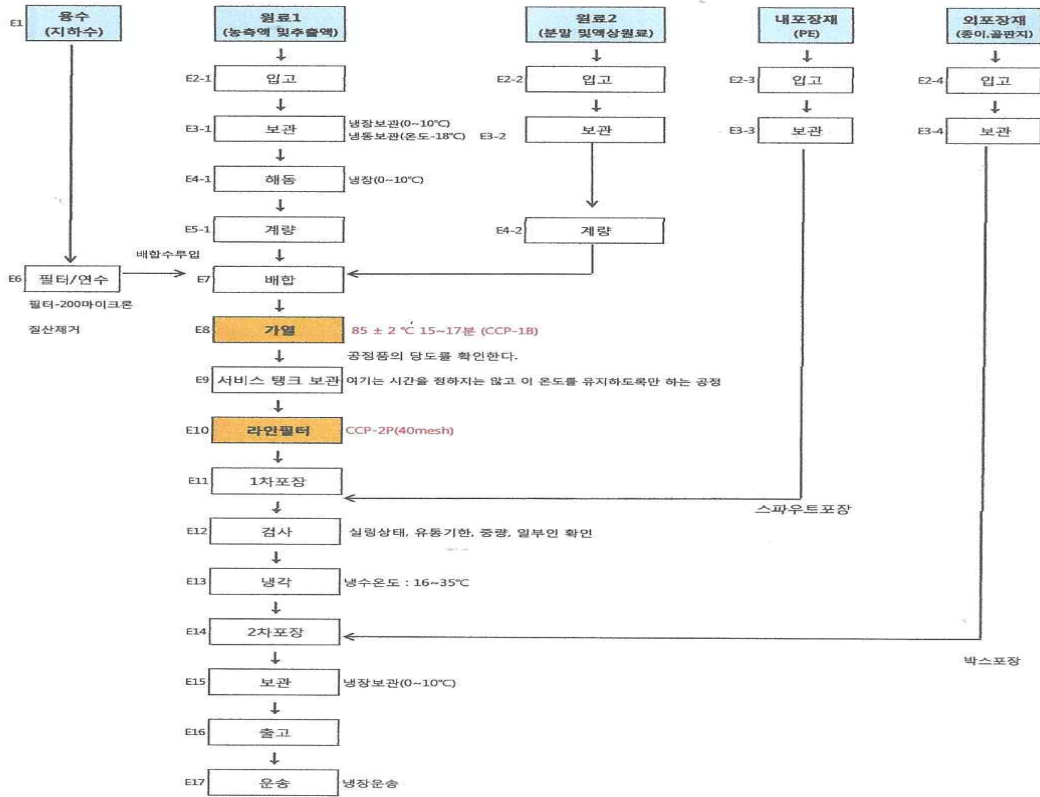
제품명	제품유형	용량	성상	Brix	PH	유통기한	비고
튼튼 감귤	과채 음료	100ml	노란색의 감귤맛이 나는 액상음료	12.0~13.0	3.0~3.5	제조일로부터 10개월	

㉔ 안정성 검사

시험항목	기준	결과
납	0.3이하(mg/kg)	0.0
대장균군	음성	음성
보존료		
그외보존료	불검출(g/kg)	불검출
안식향산으로서	0.6이하(g/kg)	불검출
세균수	100이하(mL당)	불검출
카드뮴	0.1이하(mg/kg)	0.0

㉕ 제조공정도

제품 : 과-채음료 - 튼튼 감귤



작성	검토	승인
2014.06.16	[Signature]	[Signature]

좋은영농조합법인

# 품목제조보고대장

## 1. 품목제조보고사항

영업신고번호 제 140 호

품목보고번호	000092	제품명	튼튼 감귤		업소명	좋은영농조합법인	
식품의 유형 (식품군)	과,채음료 (개정)	보고일자	2014-07-23				
	음료류 (개정)						
원재료 또는 성분명 및 배합비율	정제수 81.40%, 정백당 7.15%, 감귤농축액(국내산, 과즙으로 50%) 7.50%, 올리고당 3.40%, N-아세틸글루코사민 0.11%, 낙과 추출분말 0.20%, 비타민C 0.08%, 함수구연산 0.08%, 합성 착향료(오렌지향) 0.07%, 구연산삼나트륨 0.01%						
성 상	액체식품(가열, 살균제품)						
포장방법 (단위)	밀봉포장						
	o 포장단위 : 60ml, 75ml, 100ml, 130ml ml						
용도용법	음용						
유통기간	제조일로부터 10개월까지				품질 유지기한		
품목제조조건	식품제조공정을 준수할 것				기재자	직 급	지방보건조사보
						성 명	김창균
유통기간 설정사유	<small>                 *1 본 제품의 주 성분인 정제수, 감백당, 감귤농축액(국내산, 과즙으로 50%), 올리고당, N-아세틸글루코사민, 낙과 추출분말, 비타민C, 함수구연산, 합성착향료(오렌지향), 구연산삼나트륨(황) 중합하여 과열성분에 넣고 가열한 후 95~121℃에서 15~17분간 살균한 제품으로서, 포장재질(내면)이 폴리에틸렌(유동), 폴리프로필렌(중기)으로 밀봉 포장, 보관하므로 외부의 공기 및 습기가 침투하지 못하고 미생물 생육이 억제됨                  *2 본 제품의 제품특성이 유사한 기존 유통기한(자사제품 : 좋은영농조합법인/사과철물나기)의 유통기한이 제조일로부터 10개월인 점을 감안하여 식품의 유통기한 설정기준(제 1, 2)에 따라 유통기한 설정사항을 상향하고 본 제품의 유통기한을 10개월로 설정합니다.             </small>						
기타							

## 2. 보고서항변경보고내용

제 품 명		
년 월 일	변 경 제 품 명	기 재 자

② 튼튼 매실



㉠ 레시피



원재료명	배합비(%)	
정제수	85.46	
정백당	6.43	
올리고당	5.15	
흑설탕	1.07	
매실농축액	1.05	국내산, 과즙으로 10%
N-아세틸 글루코사민	0.11	N-아세틸글루코사민으로 100g
낙과추출분말	0.20	
구연산	0.29	
비타민C	0.17	
합성착향료 (매실향)	0.04	
구연산삼 나트륨	0.03	
	100.00	

㉡ 기준, 규격

제품명	제품유형	용량	성상	Brix	PH	유통기한	비고
튼튼 매실	과채 음료	100ml	갈색의 매실맛이 나는 액상음료	12.0 ~13.0	3.0~3.5	제조일로부터 10개월	

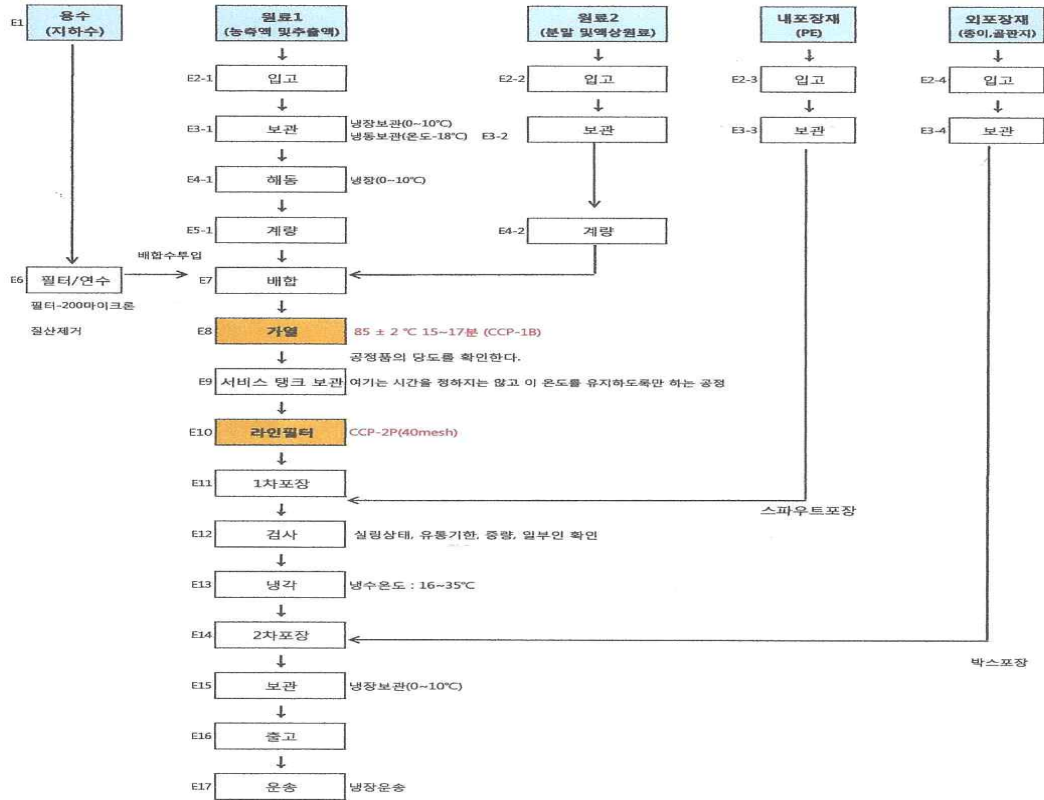
㉢ 안정성 검사

시험항목	기준	결과
납	0.3이하(mg/kg)	0.0
대장균군	음성	음성
보존료		
그외보존료	불검출(g/kg)	불검출
안식향산으로서	0.6이하(g/kg)	불검출
세균수	100이하(mL당)	불검출
카드뮴	0.1이하(mg/kg)	0.0

㉔ 제조공정도

좋은영농 조합법인	<b>5-1 공정흐름도</b>	문서번호	2014. 06. 16
	튼튼 매실	제정일자	
		개정번호	1
		페이지	

제품 : 과-채음료 - 튼튼 매실



작성	검토	승인
김민아	이정민	오민호

좋은영농조합법인



③ 튼튼 사과젤

㉠ 레시피



원재료명	배합비(%)	
정제수	80.47	
사과과즙	3.23	국내산, 과즙으로 23.3%
정백당	10.50	
올리고당	4.04	
혼합제제	0.97	
N-아세틸 글루코사민	0.11	N-아세틸글루코사민으로 100g
낙과추출분말	0.20	
젖산칼슘	0.16	
합성착향료 (사과향)	0.12	
구연산	0.09	
비타민C	0.09	
구연산삼 나트륨	0.01	
스테비오 사이드	0.01	
	100.00	

㉡ 기준, 규격

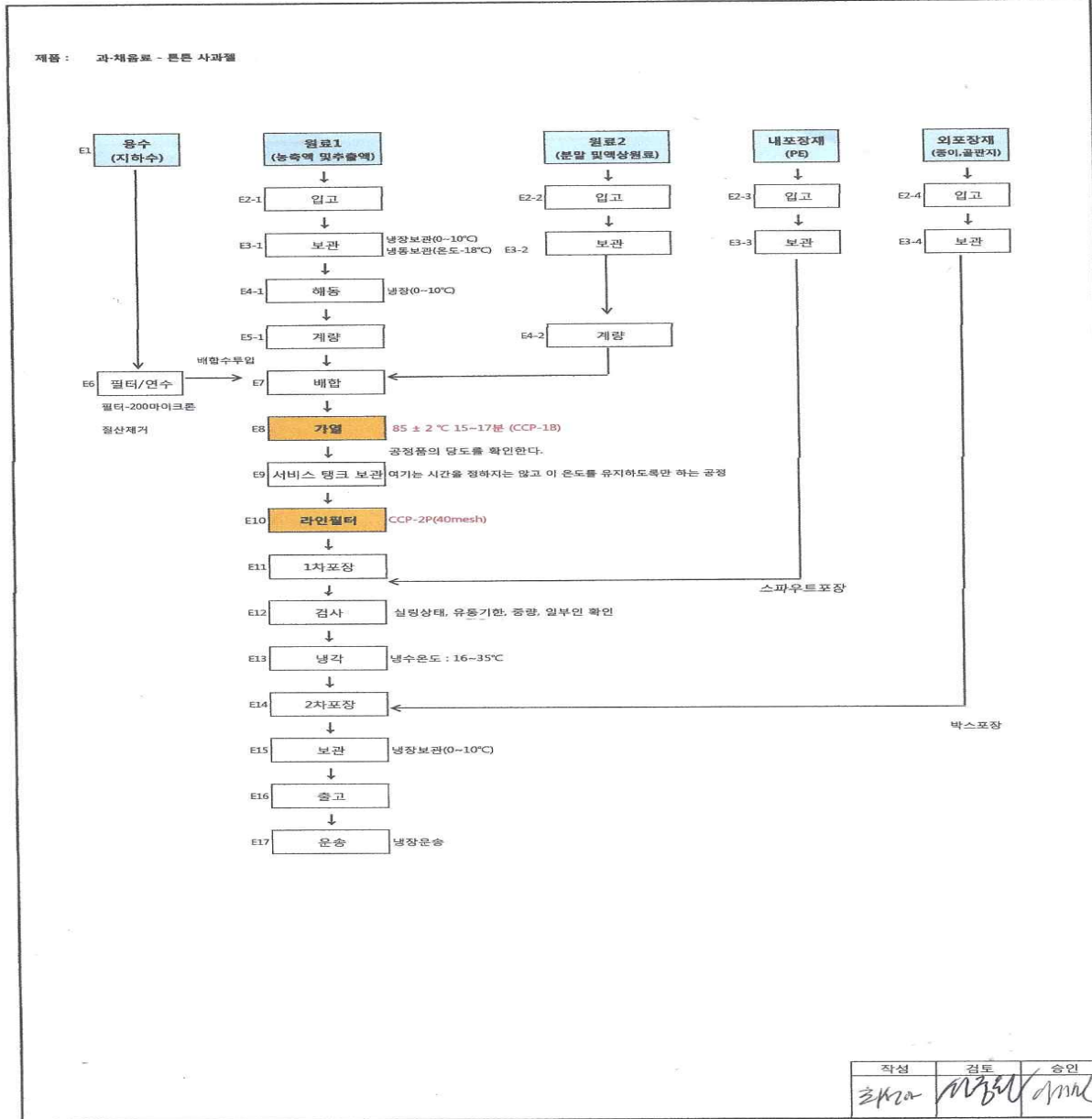
제품명	제품유형	용량	성상	Brix	PH	유통기한	비고
튼튼 사과젤	과채 음료	100ml	노란색의 사과맛이 나는 워터젤리	16.0 ~17.0	3.0~3.5	제조일로부터 10개월	

㉢ 안정성 검사

시험항목	기준	결과
납	0.3이하(mg/kg)	0.0
대장균군	음성	음성
보존료		
그외보존료	불검출(g/kg)	불검출
안식향산으로서	0.6이하(g/kg)	불검출
세균수	100이하(mL당)	불검출
카드뮴	0.1이하(mg/kg)	0.0

㉔ 제조공정도

좋은영농 조합법인	<b>5-1 공정흐름도</b>	문서번호	
	튼튼 사과젤	제정일자	2014. 06. 16
		개정번호	1
		페이지	



좋은영농조합법인

㉔ 품목제조보고서

## 품목제조보고대장

1. 품목제조보고사항

영업신고번호 제 140 호

품목보고번호	000094	제품명	튼튼 사과젤		업소명	좋은영농조합법인	
식품의 유형 (식품군)	과.채음료 (개정)	보고일자	2014-07-23				
	음료류 (개정)						
원재료 또는 성분명 및 배합비율	정제수 80.47%, 사과과즙(국내산, 과즙으로 23.3%) 3.23%, 정백당 10.50%, 올리고당 4.04%, 혼합제제 0.97%, N-아세틸 글루코사민 0.11%, 낙과 추출분말 0.20%, 젖산칼슘 0.16%, 합성착향료(사과향) 0.12%, 구연산 0.09%, 비타민C 0.09%, 구연산삼나트륨 0.01%, 스테비오사이드 0.01%						
성상	액체식품(가열, 살균제품)						
포장방법 (단위)	밀봉포장						
	o 포장단위 : 60ml, 75ml, 100ml, 130ml ml						
용도용법	음용						
유통기간	제조일로부터 10개월까지		품질 유지기한				
품목제조조건	식품제조공정을 준수할 것		기재자	직급	지방보건주사보		
				성명	김창균		
유통기간 설정사유	<small>                 * 본 제품의 주 성분은 정제수, 사과과즙(국내산, 과즙으로 23.3%), 음백당, 올리고당, 혼합제제, N-아세틸 글루코사민, 낙과 추출분말, 젖산칼슘, 합성착향료(사과향), 구연산, 비타민C, 구연산삼나트륨, 스테비오사이드(甜) 혼합지에 가열하여 냉고 가공한 후 약 85.52℃에서 15~17분간 살균한 제품으로서, 포장재질(내면)이 폴리에틸렌(PE), 폴이프로필렌(PP)으로 밀봉 포장, 보관방법은 외부의 공기 및 습기가 침투하지 못하도록 밀봉하여 직포함                  * 본 제품의 제품특성이 유사한 기존 유통제품(차사제품 - 좋은영농조합법인/사과젤링나기의 유통기한이 제조일로부터 10개월인 것을 감안하여 식품의 유통기한 설정기준 (제 1, 2)에 따라 유통기한 설정사항을 설정하고 본 제품의 유통기한을 10개월로 설정합니다.             </small>						
기타							

2. 보고사항변경보고내용

제 품 명		
년 월 일	변 경 제 품 명	기 재 자

④ 튼튼 애플망고

㉠ 레시피



원재료명	배합비(%)	
정제수	82.88	
망고농축액	8.60	과즙 15.01%(필리핀산)
정백당	5.82	
올리고당	1.25	
사과농축액	0.70	국내산, 과즙으로 5%
N-아세틸	0.11	N-아세틸글루코사민으로 100g
글루코사민		
낙과추출분말	0.20	
합성착향료 (망고향)	0.17	
비타민C	0.08	
구연산	0.08	
혼합제제 (젤믹스P)	0.07	
말토덱스트린	0.02	
구연산삼 나트륨	0.01	
스테비오 사이드	0.01	
	100.00	

㉡ 기준, 규격

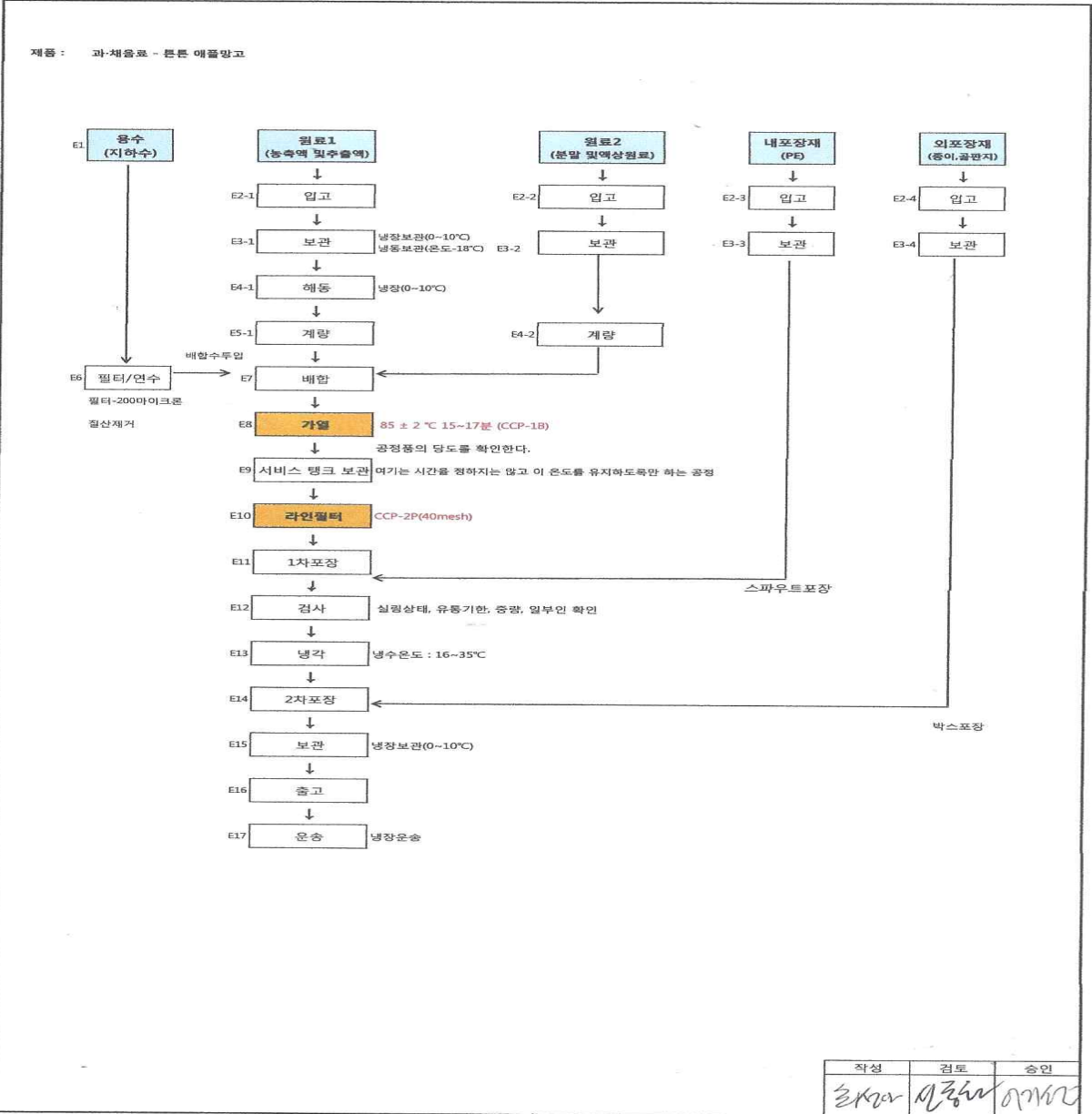
제품명	제품유형	용량	성상	Brix	PH	유통기한	비고
튼튼 애플망고	과채 음료	100ml	노란색의 망고맛이 나는 액상음료	10.0 ~12.0	3.0~3.5	제조일로부터 10개월	

㉢ 안정성 검사

시험항목	기준	결과
납	0.3이하(mg/kg)	0.0
대장균군	음성	음성
보존료		
그외보존료	불검출(g/kg)	불검출
안식향산으로서	0.6이하(g/kg)	불검출
세균수	100이하(mL당)	불검출
카드뮴	0.1이하(mg/kg)	0.0

㉞ 제조공정도





## 품목제조보고대장

**1. 품목제조보고사항**

영업신고번호 제 140 호

품목보고번호	000096	제품명	튼튼 애플망고		업소명	좋은영농조합법인	
식품의 유형 (식품군)	과.채음료 (개정)	보고일자	2014-07-23				
	음료류 (개정)						
원재료 또는 성분명 및 배합비율	정제수 82.88%, 망고농축액(필리핀산, 과즙으로 15.01%) 8.60%, 정백당 5.82%, 올리고당 1.25%, 사과농축액(국내산, 과즙으로 5%) 0.70%, N-아세틸글루코사민 0.11%, 낙과 추출분말 0.20%, 합성착향료(망고향) 0.17%, 비타민C 0.08%, 구연산 0.08%, 혼합제제(잔탄검) 0.07%, 말트덱스트린 0.02%, 구연산삼나트륨 0.01%, 스테비오사이드 0.01%						
성상	액체식품						
포장방법 (단위)	밀봉포장						
	o 포장단위 : 60ml, 75ml, 100ml, 130ml ml						
용도용법	음용						
유통기간	제조일로부터 10개월까지			품질 유지기한			
품목제조조건	식품제조공정을 준수할 것			기재자	직급	지방보건주사보	
					성명	김창균	
유통기간 설정사유	<small>(1) 본 제품은 수 성분은 정제수, 당과농축액(필리핀산, 과즙으로 15.01%), 농백당, 올리고당, 사과농축액(국내산, 과즙으로 5%), N-아세틸글루코사민, 낙과 추출분말, 합성착향료(망고향), 비타민C, 구연산, 혼합제제(잔탄검), 말트덱스트린, 구연산삼나트륨, 스테비오사이드(말)를 함유하여 기밀봉조에 넣고 기밀한 주입용기에 15 ~ 17도인 온도에서 유통한다. 포장용기(내산이 불내성인 경우), 불리된 로탈린(플라스틱) 또는 밀봉 포장 용기에 10개월간 유통하는 것이 유통기한을 보장할 수 있다.</small> <small>(2) 본 제품은 배합비율이 유사한 기존 유통제품(저산제품 : 좋은영농조합법인(사과망고나기)의 유통기한이 제조일로부터 10개월인 것을 감안하여 식품의 유통기한 설정기준 (H. 1. 다)에 따라 유통기한 설정사항을 생략하고 본 제품의 유통기한을 10개월로 설정합니다.</small>						
기타							

**2. 보고사항변경보고내용**

	제 품 명	
년 월 일	변 경 제 품 명	기 재 자

**4. 피부건강 미백제품 마케팅 전략 수립**

(1) 온라인 마케팅 적극 활용

- 온라인 마케팅에는 다양한 방법 중에서 대표적인 것

- 1) 효과적인 홈페이지 구축과 운영
- 2) 데이터베이스 마케팅
- 3) 구글 등 글로벌 포털의 키워드 검색 광고 활용
- 4) e-마켓플레이스 활용
- 5) 소셜 미디어 활용

- KOTRA가 조사한 바에 따르면 국내기업의 98%가 온라인 수출 마케팅에 관심 있어 함. 가장 많이 활용하는 수단은 홈페이지 운영(92%)이며, 해외 기업 간 거래(B2B) 사이트 활용(69%), 국내 B2B 사이트 활용(24%), 검색 엔진 최적화와 키워드 광고(17%) 등의 순임

※ tradeKorea 공식 SNS계정 주소

1	페이스북	<a href="http://www.facebook.com/KITA_tradeKorea">www.facebook.com/KITA_tradeKorea</a>
2	링크드인	<a href="http://www.linkedin.com/company/tradeKorea">www.linkedin.com/company/tradeKorea</a>
3	구글플러스	<a href="https://plus.google.com/114083964393394604158/posts">https://plus.google.com/114083964393394604158/posts</a>

국내 B2B e-마켓플레이스

사이트	운영 기관	비고
바이코리아 <a href="http://www.buyKOREA.org">www.buyKOREA.org</a>	KOTRA	KOTRA 해외 무역관에서 발굴한 구매 오퍼에 특화. 자체 결제 솔루션과 EMS 할인·연동 제공
트레이드코리아 <a href="http://www.tradeKorea.com">www.tradeKorea.com</a>	무역협회	무역협회 B2B 사이트로 한민족 네트워크와 연계한 글로벌 사업 수행
고비즈코리아 <a href="http://www.gobizKorea.com">www.gobizKorea.com</a>	중소기업진흥공단	온라인을 통한 중소기업 제품의 해외 홍보를 지원하기 위해 1996년 출범한 인터넷 중소기업관
EC21 <a href="http://www.ec21.com">www.ec21.com</a>	(주)이씨이십일	55만 개 회원사를 보유한 한국 최대 글로벌 B2B 사이트
ECPlaza <a href="http://www.ecplaza.net">www.ecplaza.net</a>	이씨플라자(주)	KTNET 자회사로 40만 개의 회원사를 보유(영·일·중·한 4개 국어 사이트 운영)

국내외 B2C e-마켓플레이스(오픈 마켓)

사이트	국가	비고
<a href="http://www.ebay.co.kr">www.ebay.co.kr</a>	대한민국	이베이 판매자를 위한 이베이 코리아 공식 사이트
<a href="http://english.gmarket.co.kr">english.gmarket.co.kr</a>		G마켓 영문 사이트
<a href="http://english.11st.co.kr">english.11st.co.kr</a>		11번가 영문 사이트
<a href="http://www.qoo10.com">www.qoo10.com</a>		지오시스(유)와 이베이가 설립한 동아시아권 오픈 마켓 네트워크
<a href="http://www.ebay.com">www.ebay.com</a>	미국	온라인 경매 사이트로 출발한 세계 최대 오픈마켓
<a href="http://www.taobao.com">www.taobao.com</a>	중국	중국 내 점유율 1위, 세계 최대 오픈마켓
<a href="http://www.rakuten.co.jp">www.rakuten.co.jp</a>	일본	일본 최대 오픈마켓, 한국어 서비스 제공

B2B 온라인 수출 마케팅을 위한 소셜 미디어, 링크드인

사이트	링크드인	여타 소셜 미디어
용도	• 비즈니스용 인적 네트워크	• 개인용 인적 네트워크
특징	• 사용자 맞춤형 • 업체에 속한 개인의 업무성 이력서(프로필) 정보를 통해 주요 비즈니스 파트너 찾기 가능, 정확한 타기팅 가능	• 개인적, 즉각적 • 개인의 취향이나 관심도에 따라 관심 그룹이 모임
핵심 콘텐츠	• 사용자가 속한 업계와 가장 관련이 있는 최신 콘텐츠를 제공	• 사진, 개인적 삶에 대해 공유 • 일상 뉴스 공유

<전세계 SNS 이용자수>



<기업이 주로 사용하는 SNS 플랫폼(II)>

1	페이스북
2	트위터
3	링크드인
4	블로그
5	유튜브 & 비디오
6	소셜 북마크

자료 : eMarketer

자료 : Social Media Examiner(2011), Michaela stelzner(2011), 소셜 미디어 광고 효과 연구(DMC미디어, 2012) 재인용

- 기업이 발신하는 정보보다 SNS상의 지인, 유명인 등의 제품 사용 후기, 평판 등의 정보에 대한 신뢰도가 더 높아짐에 따라 기업의 SNS 활용은 중요한 마케팅 전략으로 부상. SNS 이용자의 SNS상 정보 신뢰율 42.9% (방통통신위원회 · 한국인터넷진흥원 조사결과(2012))
- 특히 소비자들은 상품(서비스) 인지 및 정보탐색의 단계보다 구매 결정의 단계에서 SNS의 평판 · 입소문 정보에 크게 의존
- 일본 소비자들은 제품인지와 구매관심까지는 주로 “TV” (70.8%, 55.7%)에 의존하나, 구매를 위한 정보 조사는 “기업 홈페이지” (25.3%)를, 실제 구입 결정시에는 “평판 · 입소문 사이트” (18.3%)를 이용하는 것으로 조사

<일본 소비자의 구매 결정까지의 중시 미디어>

	제품 인지	구매 관심	제품 조사	구매 결정
신문기사	58.1	20.9	7.9	6.3
신문광고	36.8	25.3	10.5	8.6
TV 프로그램	70.8	38.5	8.9	7.6
TV 광고	60.6	55.7	10.6	11.8
라디오	17.8	6.7	1.4	1.2
잡지	21.3	18.8	9.5	6.8
기업 홈페이지	10.5	6.8	25.3	14.7
평판 · 입소문 사이트	15.1	11.6	23.0	18.3

자료 : 일본신문협회 「2011년 전국 미디어 접촉 · 평가조사」(닛케이소비인사이트 2013.4월호) 참고하여 재작성

- 또한 기업은 SNS를 수출마케팅에 활용함으로써 신규바이어 발굴과 함께 제품, 디자인 개발에 해외 소비자의 니즈를 반영할 수 있고, 바이어 조사 및 거래성사까지의 시간 단축 등을 꾀할 수 있음

(2) 내수시장 및 수출유통망 확보


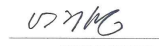
Marketing Channel	해외수출	콜롬비아 콜마사	
		홍콩 골드신/스타잼	
		홍콩 샴샤 기업마케팅	
	국내유통	약국 마케팅	체인점, 자체약국, 건강샵
		유흥 마케팅	기업마케팅 : 기업판촉물 서비스마케팅 : 모텔, 호텔, 서비스 판촉물
	B2B	소셜미디어(위메프, 쿠팡)	
자사 온라인 쇼핑몰 판매			
해외 E-catalog	EC21, 알리바바, Gobiz korea		

- 해외수출 : 콜롬비아 콜마사, 홍콩 골드신 만불 구두계약 체결. 추후 서류 계약 예정

콜롬비아 콜마 홈페이지	홍콩골드신(빅토리아 피크 면세점)
	

- 해외수출 계약건(두바이 유통, 무역회사 : Sull Aria Foodstuff Trading LLC)

**수출계약서**

<u>SALES CONTRACT</u>			
THIS IS TO CONFIRM A TRANSACTION BETWEEN "A" AND "B" SUBJECT TO THE BELOW :			
A. (IMPORTER) COMPANY NAME : Sull Aria Whole Foods LLC. ADDRESS : P.O. Box 41552 DUBAI UAE		B. (EXPORTER) COMPANY NAME : GroDTSB ADDRESS : Korea.	
COMMODITY			
Description	Quantity	Unit Price	Amount (FOB)
TOTAL : 866,736 USD (\$) *1\$=1,059.4원			
1. PACKING 2. SHIPMENT 3. LOADING PORT 4. DESTINATION 5. PAYMENT 6. TRANSACTION PERIOD		EXPORT STANDING PACKING WITHIN PERMITTED PARTIAL PORT KOREA KOREA PORT  AT SIGHT BY D/F OR T.T	
DOCUMENTS			
SIGNED COMMERCIAL INVOICE PACKING COPY OF BILL OF LANDING COPY OF MARINE INSURANCE POLICY		: TRIPPLICATE : DUPLICATE : DUPLICATE : DUPLICATE	
ACCEPTED AND CONFIRMED 07 . 04 . 2014			
A. IMPORTER   (SIGNATURE)		B. EXPORTER   (SIGNATURE)	

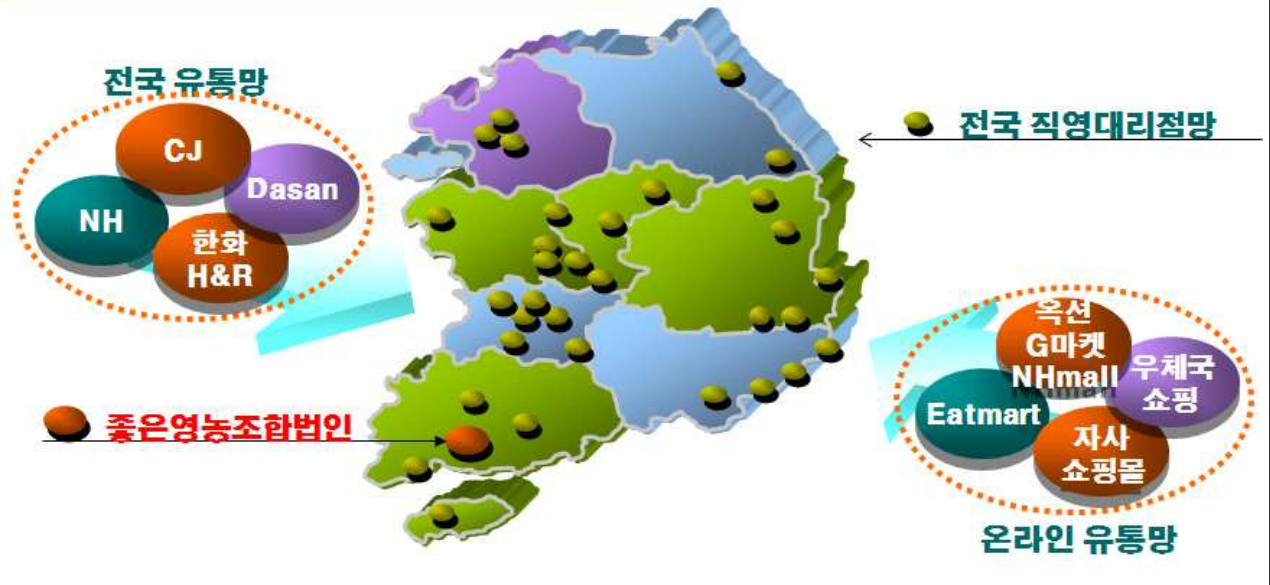


Sull Aria Foodstuff Trading LLC  
 P.O. Box 186828  
 Dubai UAE  
 TEL: +971 4 265 7220  
 Fax: +971 4 265 7230  
 Mobile: +971 50 248 3753  
 Email: muoaid.kadom@sullaria.ca  
 1017-8 Hillcrest Ave.  
 Toronto ON  
 Canada M2N 6Y6  
 www.sullaria.ca

(3) 국내유통

- 1) 홍보 유인물 제작을 통한 정보제공
- 2) 구축된 판매망을 지속적인 관리 및 거래처 확대 운영

**국내유통**



■ 제 1 세부과제 : 피부각질 개선능 이너뷰티용 소재 추출공정 확립 및 제형연구 ■

1. 연구재료 및 방법

1. 원료 확보

1) 배 원료 확보

- 본 연구에 사용한 배 시료는 나주에 소재하고 있는 배 농가에서 낙과, 미숙과를 품종별로 각각 수집하여 깨끗하게 세척한 후에 냉장보관하면서 사용하였다.
- 배즙을 짜고 남은 배 부산물을 동결건조하여 원료로 사용하였다.

2. 석세포 제조 공정 확립

1) 석세포 제조 공정

- 석세포 추출하는 추출공정은 아래와 같다. 원료를 동결건조하여 발효주정에 담아 균질화한 후 여과하여 당성분을 제거하였다. 남은 잔사에 HCL을 넣고 30분간 교반 후 여과하여 여당성분을 제거하였다. 여과한 잔사를 다시 NaOH를 넣고 30분간 교반한 후 여과하여 단백질 제거하고 최종적으로 남은 잔사를 증류수로 세척한 후에 40℃의 항온기에서 건조시켜 석세포를 제조하였다.

1. 원료 수집 및 동결건조



2. 발효주정(당성분 제거)



3. HCL(여당성분 제거)



4. NaOH(단백질 제거)



5. 세척



6. 건조



3. 원료의 안전성 검사

1) 잔류농약 검사

<b>검사성적서</b>				
접수번호	15-07-P0200-ND			
품목명	석세포			
의뢰인	업체명	풍은영농조합법인		
	사업자등록번호	412-81-29873	의뢰인	최선아
	소재지	전라남도 나주시 노안면 이슬촌길 87번지		
접수년월일	2015년 07월 21일	검사완료일	2015년 07월 23일	
검사목적	자체 품질 검사용			
<b>분석결과</b>				
시험항목	검출성분	허용기준 (mg/kg)	결과 (mg/kg)	검토의견
잔류농약 245 전성분	-	-	245 전성분 정량한계 미만	불검출
별첨: 시험항목 (1장)		시험책임자: 이지영 시험담당자: 정향미, 방보훈, 광선미		
의뢰하신 시료에 대한 분석결과를 상기와 같이 통지합니다.  2015년 7월 23일  <div style="display: flex; justify-content: center; align-items: center;">  <div style="text-align: center;"> <p><b>제일분석센터(주)</b></p> <p>주소 : (162-788) 서울시 구로구 디지털로 272 한신IT타워 918호</p> <p>농산물분석팀 : Tel. 02-882-8888, Fax. 02-888-4610</p> </div> </div>				
※ 상기 분석결과는 제출된 시료의 의뢰성분에 한정된 성적이며, 의뢰목적 이외의 광고 및 소송의 목적으로 사용하지할 수 있음을 알려드립니다.				



4. 석세포를 함유한 피부건강 개선능 이너뷰티케어용 기능성 음료 제품화

1) 최적의 원료 배합비 산출 및 레시피 개발

① 최적의 원료 배합비 산출

- 석세포를 함유한 음료개발은 석세포 함량을 0.05 ~ 0.2%로 조절해가면서 이에 따라 첨가되는 물의 함량만 조절하고 추가되는 첨가물의 함량은 일정하게 유지시켜서 4가지의 석세포 함유 음료 레시피를 개발하였다.

Ingredients(%)	A	B	C	D
	No.57	No.78	No.25	No.36
water	86.23	86.18	86.13	86.08
석세포	0.05	0.1	0.15	0.2
정백당	9.50	9.50	9.50	9.50
올리고당	4.00	4.00	4.00	4.00
구연산	0.05	0.05	0.05	0.05
비타민 C	0.15	0.15	0.15	0.15
구연산삼나트륨	0.01	0.01	0.01	0.01
스테비오사이드	0.01	0.01	0.01	0.01
Mixed extract	100.00	100.00	100.00	100.00

② 석세포 함유 음료 레시피 및 시제품 개발

㉠ 석세포 음료의 품질 특성

• pH, Brix 및 색도 측정

- 낙과 추출물 음료의 pH 측정은 시료를 20mL을 각각 100mL 삼각플라스크에 넣고 pH meter(420A, Thermo Orion, Beverly, MA, USA)를 이용하여 3회 반복 측정 후, 평균값을 계산하여 나타내었고, Brix는 당도계(PAL- $\alpha$  Brix 0~85%, Atago, Tokyo, Japan)를 이용하여 3회 반복 측정 후 평균치를 나타내었다. 그리고 색도는 Color meter(JC 801, Color Techno System Corporation, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 먼저 기기의 측정경에 표준색판(X=94.30, Y=96.11, Z=114.55)을 설치하여 보정하였다. 시료를 원형 cell에 넣어 측정 후 L(명도, Lightness), a(적색도, redness) 및 b(황색도, yellowness)값으로 나타내었다.

㉡ 기타 성분배합을 통한 품질 및 기능성 향상

• 각종 과실농축액의 첨가를 통한 레시피 개발

- 석세포 음료의 품질 향상을 위하여 사과, 배, 칼라만시, 딸기, 오디, 매실, 감귤, 포도, 유자의 농축액과 향료를 첨가하였고 단맛을 위해 설탕, 올리고당, 스테비오사이드로

11~14Brix, 신맛을 위해 구연산, 비타민C를 이용해 PH 3.0~3.5 사이로 레시피를 잡아 관능평가를 실시하였다.

Ingredients(%)	사과 A	배 B	C	딸기 D	오디 E	매실 F	감귤 G	포도 H	유자 I
water	86.17	86.29	86.41	85.97	81.55	87.63	87.05	85.43	86.05
석세포	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
정백당	9	9	9	9.5	11	8	8	9.5	9
올리고당	3	3	3	3	3	3	3	3	3
과실농축액	1.4	1.17	1.17	1.08	4	0.89	1.5	1.62	1.5
향	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
구연산	0.15	0.25	0.14	0.17	0.17	0.2	0.17	0.17	0.17
비타민 C	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
구연산삼나트륨	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
스테비오사이드	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Mixed extract	100	100	100	100	100	100	100	100	100

- 맛과 기능성 향상을 위해 과실농축액을 2가지 이상 혼합하여 11~14Brix, PH 3.0~3.5로 맞춰 레시피를 잡아 관능평가를 실시하였다.

Ingredients(%)	사과, 배		배, 양배추, 포도, 푸룬, 배퓨레		배, 칼라만시, 레몬, 감귤, 오렌지, 유자		배, 딸기, 오디		배, 매실, 양배추	
	A		B		C		D		E	
water	85.91		80.82		85.46		81.28		86.97	
석세포	0.1		0.1		0.1		0.1		0.1	
정백당	7		9		7		7		7	
올리고당	4		4		4		4		4	
과실농축액	사과	2.1	배	0.41	배	0.41	배	1.04	배	0.35
			양배추	0.57	칼라만시	1.17				
	배	0.6	포도	1.3	레몬	0.25	딸기	6	매실	0.89
			푸룬	0.3	감귤	0.40				
			배퓨레	3	오렌지	0.51	오디	0.1	양배추	0.19
					유자	0.20				
향	사과	0.12	포도	0.15	레몬	0.15	딸기	0.15	매실	0.15
구연산	0.13		0.3		0.3		0.28		0.3	
비타민 C	0.01		0.01		0.01		0.01		0.01	
구연산삼나트륨	0.02		0.03		0.03		0.03		0.03	
스테비오사이드	0.01		0.01		0.01		0.01		0.01	
Mixed extract	100.00		100.00		100.00		100.00		100.00	

- 석세포가 음료에 가라앉아 이물감이 느껴져 혼합제제를 이용하여 액상젤리로 성상을 변화시켰다.

Ingredients(%)	사과, 배		배, 양배추, 포도, 푸룬, 배퓨레		배, 칼라만시, 레몬, 감귤, 오렌지, 유자		배, 딸기, 오디		배, 매실, 양배추	
	A		B		C		D		E	
water	81.75		75.72		81.3		76.75		82.88	
석세포	0.1		0.1		0.1		0.1		0.1	
정백당	10		13		10		10.5		10.	
올리고당	4		4		4		4		4	
과실농축액	사과	2.1	배	0.41	배	0.41	배	1.04	배	0.35
			양배추	0.57	칼라만시	1.17				
			포도	1.3	레몬	0.25				
	배	0.6	푸룬	0.3	감귤	0.40	딸기	6	매실	0.89
			배퓨레	3	오렌지	0.51				
					유자	0.20				
향	사과	0.25	포도	0.25	레몬	0.25	딸기	0.2	매실	0.23
구연산	0.25		0.39		0.44		0.35		0.4	
CK-302	0.6		0.6		0.6		0.6		0.6	
젤믹스 W	0.2		0.2		0.2		0.2		0.2	
잔탄검	0.1		0.1		0.1		0.1		0.1	
비타민 C	0.01		0.01		0.01		0.01		0.01	
구연산삼나트륨	0.03		0.04		0.05		0.04		0.04	
스테비오사이드	0.01		0.01		0.01		0.01		0.01	
Mixed extract	100.00		100.00		100.00		100.00		100.00	

• 기타 성분배합을 통한 기능성 향상

- 석세포 음료의 기능성 향상을 위하여 피부보습을 위한 N-아세틸글루코사민, 장건강을 위한 폴리덱스트로스를 각각 음료 레시피에 일정량 첨가하였다.

㊤ 관능평가

• 시료준비 및 제시

- 관능평가를 위한 시료는 제조하여 4℃ 냉장고에 보관하여 사용하였다. 외관평가를 위해 음료는 투명한 100mL의 유리컵에 일정량(50mL)을 담아 제시하였다. 이때 평가에 대한 편견이 없도록 시료용기에 난수표에서 추출한 세 자리 숫자를 표기하였다. 평가시료온도는 4±1℃가 되도록 하였다. 시료를 평가하는 사이사이 입안을 헹굴 수 있도록 생수와 빨는 컵을 함께 제시 하였다.

• 평가내용 및 방법

- 낙과 추출물 음료에 대한 관능적 특성 평가는 랜덤화 완전 블록실험법에 따라 패널요원 1인이 무작위로 배치된 각각의 음료를 모두 평가하도록 하였다. 시료의 특성 평가는 단맛, 색깔, 향미, 전반적인 품질순으로 평가하였다. 검사시간은 오후 3시였으며, 평가에 참여하는 관능검사원들에게는 평가 1시간 전부터 물 이외의 음료나 음식물 섭취를 피하도록 하였고, 향이 진한 화장품의 사용을 금하였다. 평가는 5점 척도법을 사용하였고, 특성 강도가 강할수록 높은 점수를 부여하도록 하였다 (1점=약하다, 5점=강하다).

2) 석세포를 함유한 피부건강 개선능 이너뷰티케어용 음료 개발 공정 확립

- 석세포를 함유한 피부건강 개선능 이너뷰티케어용 음료 개발 공정을 확립을 위하여 원료 입고부터 원료 보관, 계량, 배합, 가열·살균, 필터, 포장 등 일련의 음료개발 공정을 확립하였다.

5. 석세포를 함유한 피부건강 개선능 이너뷰티케어용 음료제품 마케팅 전략 수립

1) 직영대리점 운영 및 관리

- 50여개의 직영대리점을 통해 구축한 판매망의 지속적인 관리

2) 해외 바이어를 통한 수출유통망 확보

- 기존 해외 바이어를 통한 판매처 확보
- 국제식품박람회 등의 지속적인 참가 및 바이어 상담, 교류 프로그램을 적극 활용하여 수출시장 진출의 기반 마련

3) 온라인 마케팅

- 국내 자사 쇼핑몰의 전문성 확보하여 제품 및 기업 신뢰도를 상승시킴
- 외국 홈페이지를 운영하여 해외 바이어, 외국 소비자들과 접촉할 수 있는 다양한 채널 상시 운영

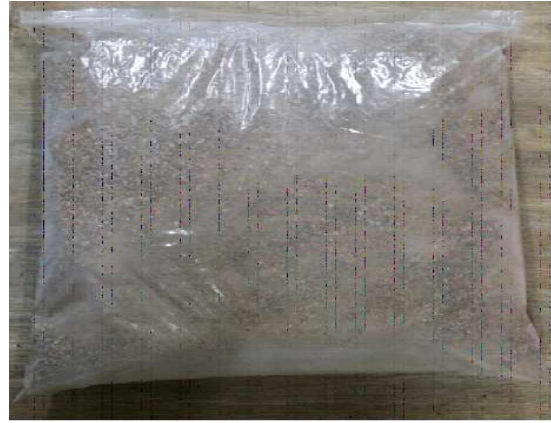
## II. 실험결과

### 1. 석세포 제조 공정 확립

#### 1) 석세포 제조

##### ① 원료 분말화

- 낙과, 미숙과, 배 부산물 원료를 동결건조하여 원료로 사용할 분말을 얻었다.



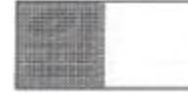
##### ② 석세포 분말 제조

- 낙과, 미숙과, 배 부산물에 발효주정, 1N HCL, 1N NaOH를 차례로 넣어 당 및 단백질을 제거하고 정제수로 깨끗이 씻어 건조하여 석세포를 얻었다.



③ 석세포 품목제조보고서

발급번호 : 11K1-SMTY-FLXR-MP79-MJCT



식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명	생년월일		
	이기선			
	주소	전화번호	061 3359630	
		휴대전화		
영업소	명칭(상호)			
	좋은영농조합법인			
	소재지			
	전라남도 나주시 이슬촌길 87(.31-3.31-42)			
제품정보	식품의 유형	과,채 가공품	영업신고번호	20060512128
	제품명	석세포		
	유통기한	제조일로부터 12개월		
	품질유지기한			
	원재료 또는 성분명, 배합비율	뽕장애 기재		
	용도 용법	뽕장애 기재		
	보관방법 및 포장재질	실온보관 폴리에틸렌(내연)		
	포장방법 및 포장단위	밀봉포장, 100g, 200g, 300g, 500g, 1kg, 2kg		
	성상	분말		
	고열량·저영양 식품 해당 여부	[ ]예 [ ]아니오 [O]해당 없음		
기타				

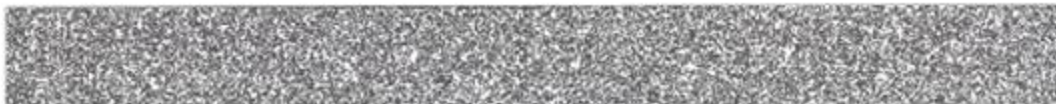
「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2015년 07월 21일

보고인 이기선

전라남도 나주시장 귀하

품목보고일	20060512128132				
처리부서	보건소 보건위생과	처리자성명	윤정현	처리일자	2015년 07월 23일



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

2. 석세포를 함유한 피부건강 개선능 이너뷰티케어용 기능성 음료 제품화

1) 석세포 함량에 따른 품질 특성 및 관능적 특성

① 품질특성

- 석세포 함유량을 각각 달리하여 제조한 음료 4종의 pH, Brix, 색도를 측정한 결과는 다음과 같다.

Table 4. 석세포음료 품질특성

sample	pH	sugar content	Color value		
			L(Lightness)	a(Redness)	b(Yellowness)
A	3.51	12.4	21.08±0.02	-0.18±0.01	-0.38±0.01
B	3.52	12.5	21.13±0.01	-0.25±0.02	-0.42±0.02
C	3.51	12.5	21.04±0.02	-0.28±0.01	-0.33±0.01
D	3.51	12.4	21.22±0.02	-0.19±0.01	-0.40±0.02

\* 석세포 함량 : A 0.05%, B 0.1%, C 0.15%, D 0.2%

② 관능적 특성

- 석세포 함량에 따른 음료의 관능검사를 측정한 결과 석세포분말 0.1% 들어간 B Type의 음료를 선호한 결과를 얻었다. 색감의 경우 3.57±0.4, 향미의 경우 3.71±0.5, 식감의 경우 3.96±0.4, 전반적인 기호도의 경우 4.21±0.4의 결과를 얻었고, 기호도 조사에서 가장 선호한 결과를 얻은 B type의 음료를 선택하여 좀 더 자세한 배합비를 찾기로 하였다. 그리고 석세포만으로는 맛을 내는데 어려움이 있어 각종 농축액과 향료를 첨가하여 가장 조화를 이루는 맛을 찾아보기로 하였다.

Table 5. 석세포 추출음료 관능평가 (0~5score)

구분(%)	Color	Flavor	texture	Overall quality
A-석세포 0.05% No.57	3.48±0.5	3.42±0.3	3.87±0.5	4.01±0.6
<b>B-석세포 0.1% No.78</b>	<b>3.57±0.4</b>	<b>3.71±0.5</b>	<b>3.96±0.4</b>	<b>4.21±0.4</b>
C-석세포 0.15% No.25	3.52±0.6	3.65±0.5	3.45±0.5	3.84±0.3
D-석세포 0.2% No.36	3.61±0.4	3.26±0.4	3.18±0.2	3.58±0.3



2) 기타 성분 배합을 통한 품질 및 기능성 향상

① 각종 농축액 및 향료를 첨가한 음료개발

• 관능평가

- 총 9가지의 과실농축액과 향료를 첨가하여 음료를 제조하여 관능평가를 측정한 결과는 다음과 같았다. 대체적으로 사과, 칼라만시, 딸기, 매실, 감귤, 포도 농축액이 첨가된 음료를 선호하는 것으로 나타났다.

Table 6. 석세포와 농축액 첨가 음료 관능평가 (0~5score)

구분(%)	Sweetness	Color	Flavor	texture	Overall quality
A-석세포+사과	4.12±0.4	3.98±0.3	4.07±0.2	3.75±0.3	4.02±0.5
B-석세포+배	4.11±0.2	3.87±0.4	3.98±0.3	3.69±0.5	3.93±0.4
C-석세포+칼라만시	4.15±0.5	4.01±0.5	4.01±0.5	3.81±0.1	4.10±0.3
D-석세포+딸기	4.09±0.2	4.11±0.3	4.03±0.7	3.93±0.4	4.05±0.3
E-석세포+오디	3.88±0.5	3.98±0.4	3.79±0.4	3.54±0.2	3.86±0.2
F-석세포+매실	4.08±0.3	4.03±0.2	4.11±0.5	3.68±0.6	4.01±0.4
G-석세포+감귤	4.20±0.6	4.05±0.6	4.09±0.2	3.86±0.4	4.15±0.3
H-석세포+포도	4.14±0.3	4.14±0.2	4.15±0.3	3.91±0.5	4.12±0.6
I-석세포+유자	3.97±0.5	3.79±0.3	4.05±0.6	3.72±0.2	3.86±0.5

- 관능평가 결과 단일농축액보다는 맛과 기능성 향상을 위해 과실농축액을 2가지 이상 혼합하자는 의견이 나왔다. 따라서 아래와 같이 총 5가지 음료를 제조하여 관능평가를 측정한 결과는 다음과 같았다. 대체적으로 B, D 음료를 선호하는 것으로 나타났다.

Table 7. 석세포와 혼합농축액 첨가 음료 관능평가 (0~5score)

구분(%)	Sweetness	Color	Flavor	texture	Overall quality
A-석세포+사과,배	4.08±0.5	3.87±0.4	4.03±0.3	3.79±0.4	4.01±0.2
B-석세포+배, 양배추, 포도, 푸룬, 배푸레	4.15±0.3	4.04±0.5	4.31±0.5	3.88±0.2	4.21±0.5
C-석세포+배, 칼라만시, 레몬, 감귤, 오렌지, 유자	4.11±0.4	3.96±0.3	4.12±0.7	3.76±0.3	4.10±0.3
D-석세포+배, 딸기, 오디	4.20±0.3	4.12±0.4	4.25±0.4	3.82±0.6	4.18±0.4
E-석세포+배, 매실, 양배추	4.03±0.4	3.79±0.6	4.08±0.2	3.81±0.5	3.98±0.5

- 대체적으로 단맛, 향, 색감에서는 선호도가 높았으나 식감에서 석세포의 이물감이 느껴져 선호도가 낮은 것으로 조사되었다. 따라서 겔화제를 이용하여 성상에 변화를 주어 음료를

제조하여 관능평가를 측정한 결과는 다음과 같다.

**Table 8. 석세포와 혼합농축액, 겔화제 첨가 음료 관능평가 (0~5score)**

구분(%)	Sweetness	Color	Flavor	texture	Overall quality
A-석세포+사과,배	4.18±0.4	4.01±0.5	4.12±0.3	4.01±0.5	4.13±0.2
<b>B-석세포+배, 양배추, 포도, 푸룬, 배푸레</b>	<b>4.12±0.2</b>	<b>4.21±0.4</b>	<b>4.28±0.3</b>	<b>4.04±0.6</b>	<b>4.26±0.4</b>
C-석세포+배, 칼라만시, 레몬, 감귤, 오렌지, 유자	4.09±0.3	4.05±0.3	4.09±0.2	3.99±0.4	4.08±0.5
D-석세포+배, 딸기, 오디	<b>4.21±0.5</b>	<b>4.10±0.2</b>	<b>4.21±0.7</b>	<b>4.11±0.5</b>	<b>4.32±0.3</b>
E-석세포+배, 매실, 양배추	4.05±0.3	3.99±0.2	4.06±0.5	4.05±0.4	4.02±0.6

② 기능성 향상을 위한 성분 배합 레시피

- 과일 농축액과 향료, 겔화제 첨가를 통한 관능평가를 토대로 하여 선호된 2가지 석세포 음료에 피부보습을 위한 N-아세틸글루코사민과 장건강을 위한 폴리덱스트로스를 첨가하여 레시피를 개발하였다.

Ingredients(%)	아삭한 포도배		아삭한 딸기배	
water	67.97		76.19	
석세포	0.1		0.1	
정백당	13		10.5	
올리고당	4		4	
과실농축액	배	0.41	배	1.04
	양배추	0.57	딸기	6
	포도	1.3		
	푸룬	0.3		
	배퓨레	3	오디	0.1
향	포도	0.25	딸기	0.2
구연산	0.39		0.35	
CK-302	0.6		0.6	
젤믹스 W	0.2		0.2	
잔탄검	0.1		0.1	
젯산칼슘	0.05			
N-아세틸글루코사민			0.56	
폴리덱스트로스	7.7			
비타민 C	0.01		0.01	
구연산삼나트륨	0.04		0.04	
스테비오사이드	0.01		0.01	
Mixed extract	100.00		100.00	

### 3) 석세포를 함유한 피부건강 개선능 이너뷰티케어용 음료개발

#### ① 아삭한 포도배

#### ㉠ 레시피



원재료명	배합비(%)	
정제수	67.97	
백설탕	13.00	
폴리덱스트로스	7.70	
올리고당	4.00	
배퓨레	3.00	
콩코드포도농축액	1.30	미국산, 과즙으로 8%
혼합제제(CK-302)	0.60	
양배추농축액	0.57	국내산, 양배추즙으로 3%
배농축액	0.41	국내산, 과즙으로 3.5%
구연산	0.39	

푸른농축액	0.30	미국산, 과즙으로 3.5%
포도향	0.25	합성착향료
혼합제제(젤믹스W)	0.20	
잔탄검	0.10	
석세포	0.10	
젯산칼슘	0.05	
구연산삼나트륨	0.04	
비타민C	0.01	
효소처리스테비아	0.01	
	100.00	

㉠ 기준, 규격

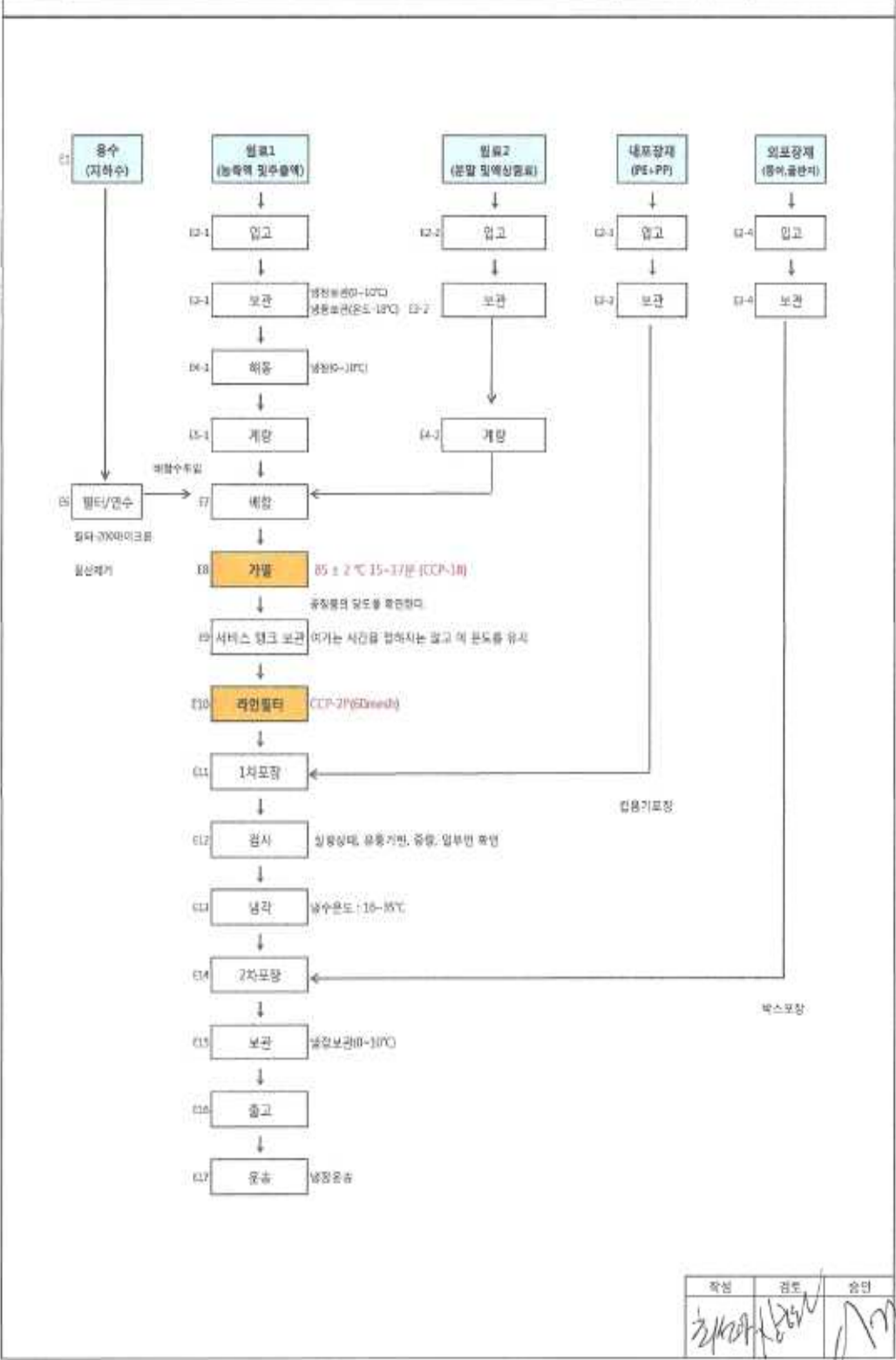
제품명	제품유형	용량	성상	Brix	PH	유통기한	비고
아삭한 포도배	과·채 음료	100ml	보라색의 포도맛이 나는 액상젤리	23.5~24.5	3.0~3.5	제조일로부터 10개월	

㉡ 안정성 검사

시험항목	기준	결과
납	0.3이하(mg/kg)	0.0
대장균군	음성	음성
보존료		
그외보존료	불검출(g/kg)	불검출
안식향산으로서	0.6이하(g/kg)	불검출
세균수	100이하(mL당)	불검출
카드뮴	0.1이하(mg/kg)	0.0

㉢ 제조공정도

품목명 주요업역	<b>5-4. 공정흐름도</b>	문서번호	GH-01-첨부2	
		제정일자	2015.07.22	
	아삭한 포도배(과·재 음료)		개정번호	1
			페이지	



㊤ 품목제조보고서

발급번호 : 11K1-VN2Y-2LNR-0P19-42FY



## 식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명 이기선	생년월일		
	주소	전화번호	061 3359630	
		휴대전화		
영업소	영칭(상호) 좋은영농조합법인			
	소재지 전라남도 나주시 이슬촌길 87(31-3,31-42)			
제품정보	식품의 유형	과,채음료	영업신고번호	20060512128
	제품명	아삭한 포도배		
	유통기한	제조일로부터 10개월까지		
	품질유지기온			
	원재료 또는 성분명, 배합비율	맛장애 기재		
	용도 용법	맛장애 기재		
	보관방법 및 포장재질	직사광선을 피하여 서늘한 곳에 보관. 밀봉내면 및 랩 : 폴리에틸렌(PE)		
	포장방법 및 포장단위	밀봉포장 / 80ml, 100ml, 120ml, 130ml		
	성상	액상필리		
	고열량·저영양 식품 해당 여부	[ ]예 [ ]아니오 [O]해당 없음		
기타				

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2015년 07월 22일

보고인 이기선

**전라남도 나주시장 귀하**

품목보고필	20060512128134				
처리부서	보건소 보건위생과	처리자성명	윤정현	처리일자	2015년 07월 23일



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

② 아삭한 딸기배

㉠ 레시피



원재료명	배합비(%)	
정제수	76.19	
백설탕	10.50	
냉동딸기	6.00	
올리고당	4.00	
배농축액	1.04	국내산 과즙으로 8.9%
혼합제제(CK-302)	0.60	
N-아세틸글루코사민	0.56	
구연산	0.35	
딸기향	0.20	합성착향료
혼합제제(젤믹스W)	0.20	
무농약 오디	0.10	
잔탄검	0.10	
석세포	0.10	
구연산삼나트륨	0.04	
비타민C	0.01	
효소처리스테비아	0.01	
	100.00	

㉡ 기준, 규격

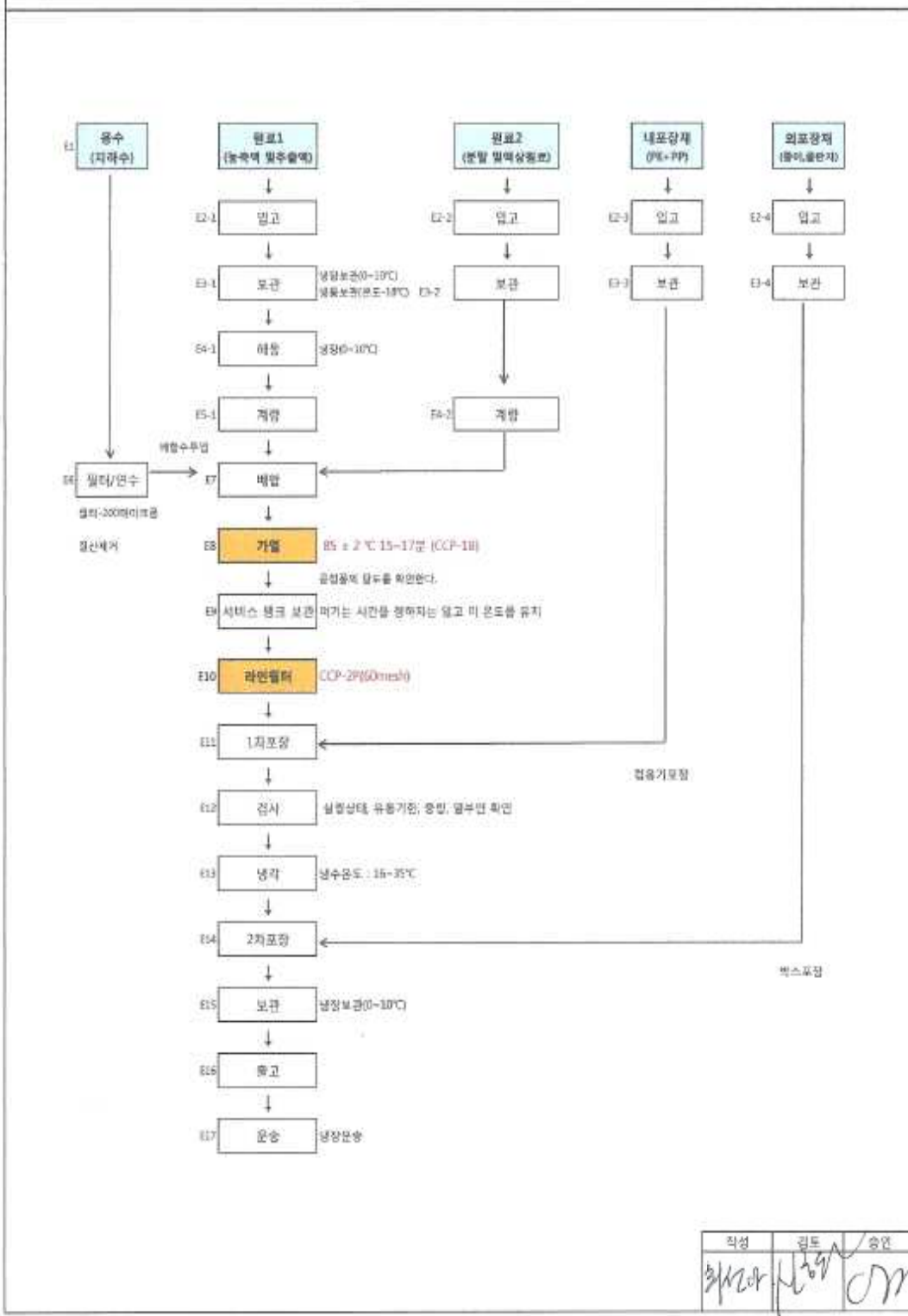
제품명	제품유형	용량	성상	Brix	PH	유통기한	비고
아삭한 딸기배	과·채 음료	100ml	붉은색의 딸기맛이 나는 액상젤리	16.5~17.5	3.0~3.5	제조일로부터 10개월	

㉢ 안정성 검사

시험항목	기준	결과
납	0.3이하(mg/kg)	0.0
대장균군	음성	음성
보존료		
그외보존료	불검출(g/kg)	불검출
안식향산으로서	0.6이하(g/kg)	불검출
세균수	100이하(mL당)	불검출
카드뮴	0.1이하(mg/kg)	0.0

㉣ 제조공정도

품질 담당 조희진	<b>5-4. 공정흐름도</b>	문서번호	GH-01-첨부2
	아삭한 딸기배(과·채 음료)	제정일자	2015.07.22
		개정번호	1
		페이지	



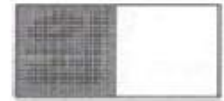
작성	검토	승인
조희진	김도	김민우



㉔ 영양성분 분석 성적서



발급번호 : 11K1-RNDY-GLXR-IP49-UEMS



## 식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명 이기선	생년월일	
	주소	전화번호	061 3359630
		휴대전화	

영양소	명칭(상호) 좋은영농조합법인 소재지 전라남도 나주시 예술촌길 87(.31-3.31-42)
-----	--

제품정보	식품의 유형	과,제품료	영업신고번호	20060512129
	제품명	야식한 말기배		
	유통기한	제조일로부터 10개월까지		
	품질유지기한			
	원재료 또는 성분명, 배합비율	뽕장애 기재		
	용도 용법	뽕장애 기재		
	포장방법 및 포장재질	적시공전을 피하여 서늘한 곳에 보관. 필름내면 및 겉 : 폴리에틸렌(PE)		
	포장방법 및 포장단위	밀봉포장 / 90ml, 100ml, 120ml, 130ml		
	첨상	액상필리		
고열량·과당당·식품 해당 여부	[ ]예 [ ]아니오 [O]해당 없음			

기타	
----	--

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2015년 07월 22일

보고인 이기선

**전라남도 나주시장 귀하**

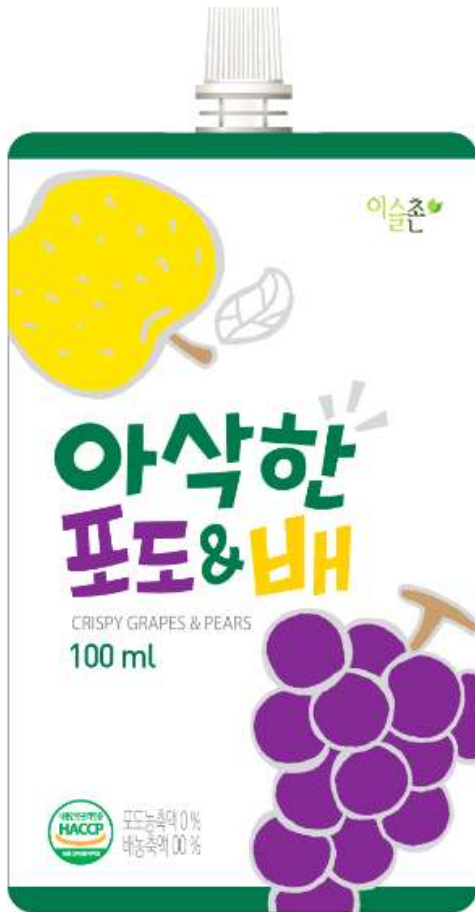
품목보고일	20060512128133				
처리부서	보건소 보건무생과	처리과장명	윤정현	처리일자	2015년 07월 23일



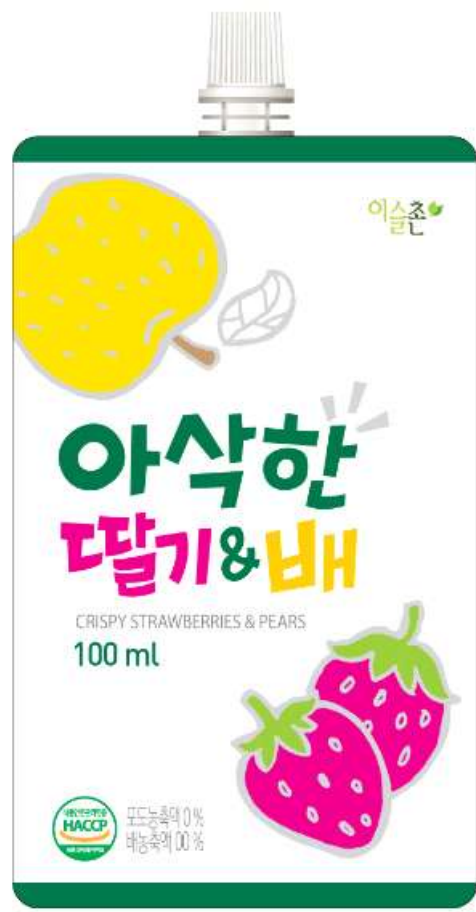
본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetymkorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

3. 석세포를 함유한 피부건강 개선능 이너뷰티케어용 음료제품 디자인 개발

아삭한 포도배



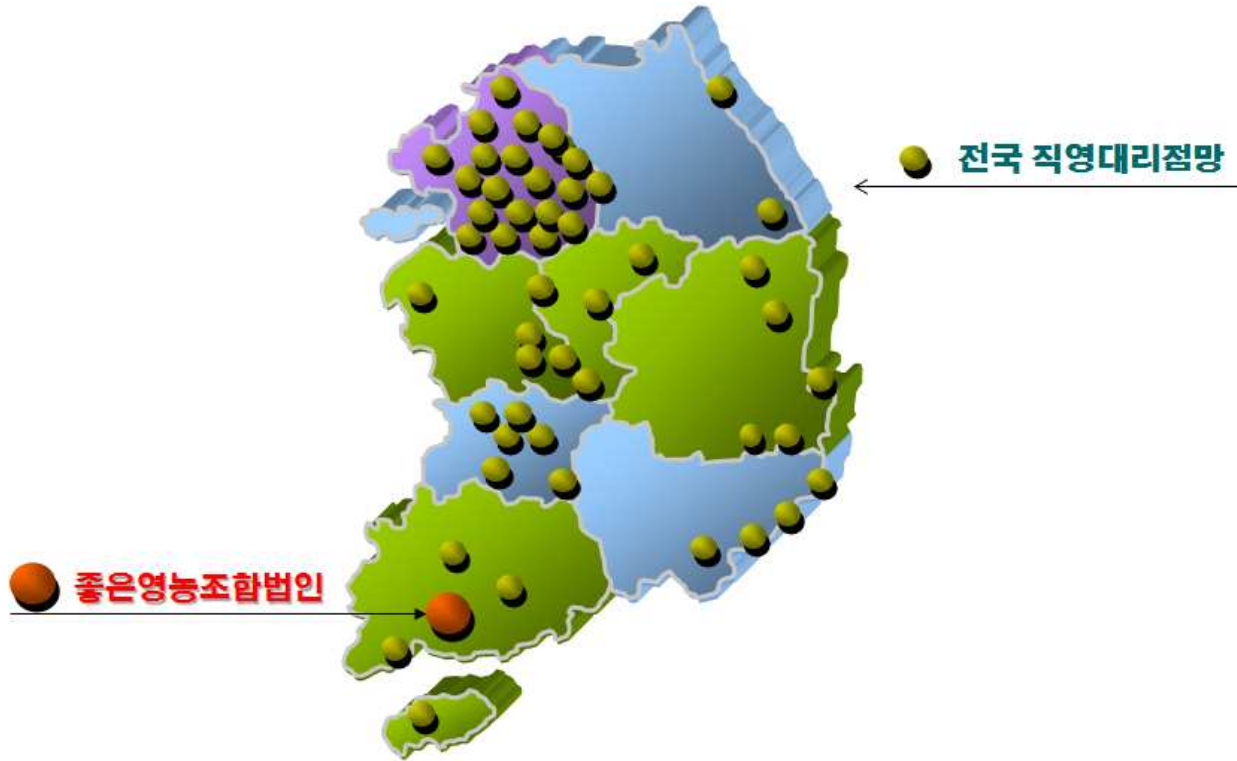
아삭한 딸기배



4. 석세포를 함유한 피부건강 개선능 이너뷰티케어용 음료제품 마케팅 전략 수립

1) 직영 대리점 운영 및 관리

- 자사 보유 50여개 직영대리점의 지속적인 관리를 통해 탄탄한 판매망 구축



2) 해외 바이어를 통한 수출유통망 확보

- 수출계약서

북경영순락강 상무유한회사	위해한미원무역유한공사	복건 야지푸드																																												
<p style="text-align: center;"><b>SALES CONTRACT</b></p> <p>THIS IS TO CONFIRM A TRANSACTION BETWEEN "A" AND "B" SUBJECT TO THE BELOW : 이 문서는 아래 조항에 의거하여 "A"와 "B"간의 거래를 확인하는 것입니다.</p> <p>A. IMPORTER(수입자) COMPANY NAME(회사명) : 북경영순락강 상무유한회사</p> <p>B. EXPORTER(수출자) COMPANY NAME(회사명) : <b>좋은영농조합법인</b></p> <p>ADDRESS(주소) : ADDRESS(주소) :</p> <p>COMMODITY(상품)</p> <table border="1"> <tr> <th>Description/명세</th> <th>Quantity/수량</th> <th>Unit /Price/단가</th> <th>Amount(FOB)분적인도가격</th> </tr> <tr> <td>130ml</td> <td>1</td> <td>140원</td> <td></td> </tr> <tr> <td>100ml</td> <td>1</td> <td>235원</td> <td></td> </tr> </table> <p>TOTAL/합계 : 200,000 \$ (1\$= 원)</p> <p>1. PACKING(포장방법) : EXPORT STANDING PACKING WITH PERMITTED PASTEL, JAPAN, KOREA. (일본/중국/한국이 허용된 박스형태에 완성된것가능, 한국에 발주)</p> <p>2. SHIPMENT(운송조건)</p> <p>3. LOADING PORT(선적항)</p> <p>4. DESTINATION(목적지)</p> <p>5. PAYMENT(지급방법)</p> <p>6. TRANSACTION FOREIGN(외국인)</p> <p>AT SKIHT BY D/F OR T/T (입찰금/착수금 또는 신용장)</p> <p>DOCUMENTS(서류)</p> <p>SIGNED COMMERCIAL INVOICE(계명장 증명서) : TRIPlicate(3부) PACKING SLIP(포장세척) : Duplicate(2부) COPY OF BILL OF LADING(항구계명장) : Duplicate(2부) COPY OF MARINE INSURANCE POLICY(해상보험증권) : Duplicate(2부)</p> <p>ACCEPTED AND CONFIRMED 위 내용이 이상없음을 확인함 Apr. 1, 2015</p> <p>A. IMPORTER(수입자) : <b>북경영순락강 상무유한회사</b> (SIGNATURE/서인)</p> <p>B. EXPORTER(수출자) : <b>좋은영농조합법인</b> (SIGNATURE/서인)</p>	Description/명세	Quantity/수량	Unit /Price/단가	Amount(FOB)분적인도가격	130ml	1	140원		100ml	1	235원		<p style="text-align: center;"><b>계약서</b></p> <p>THIS IS TO CONFIRM A TRANSACTION BETWEEN "A" AND "B" SUBJECT TO THE BELOW : 이 문서는 아래 조항에 의거하여 "A"와 "B"간의 거래를 확인하는 것입니다.</p> <p>A. IMPORTER(수입자) COMPANY NAME(회사명) : 위해한미원무역유한공사</p> <p>B. EXPORTER(수출자) COMPANY NAME(회사명) : <b>좋은영농조합법인</b></p> <p>ADDRESS(주소) : ADDRESS(주소) :</p> <p>COMMODITY(상품)</p> <table border="1"> <tr> <th>Description/명세</th> <th>Quantity/수량</th> <th>Unit /Price/단가</th> <th>Amount(FOB)분적인도가격</th> </tr> <tr> <td>130ml</td> <td>1</td> <td>140원</td> <td></td> </tr> <tr> <td>100ml</td> <td>1</td> <td>235원</td> <td></td> </tr> </table> <p>TOTAL/합계 : 200,000 \$ (1\$= 원)</p> <p>1. PACKING(포장방법) : EXPORT STANDING PACKING WITH PERMITTED PASTEL, JAPAN, KOREA. (일본/중국/한국이 허용된 박스형태에 완성된것가능, 한국에 발주)</p> <p>2. SHIPMENT(운송조건)</p> <p>3. LOADING PORT(선적항)</p> <p>4. DESTINATION(목적지)</p> <p>5. PAYMENT(지급방법)</p> <p>6. TRANSACTION FOREIGN(외국인)</p> <p>AT SKIHT BY D/F OR T/T (입찰금/착수금 또는 신용장)</p> <p>DOCUMENTS(서류)</p> <p>SIGNED COMMERCIAL INVOICE(계명장 증명서) : TRIPlicate(3부) PACKING SLIP(포장세척) : Duplicate(2부) COPY OF BILL OF LADING(항구계명장) : Duplicate(2부) COPY OF MARINE INSURANCE POLICY(해상보험증권) : Duplicate(2부)</p> <p>ACCEPTED AND CONFIRMED 위 내용이 이상없음을 확인함 Apr. 1, 2015</p> <p>A. IMPORTER(수입자) : <b>위해한미원무역유한공사</b> (SIGNATURE/서인)</p> <p>B. EXPORTER(수출자) : <b>좋은영농조합법인</b> (SIGNATURE/서인)</p>	Description/명세	Quantity/수량	Unit /Price/단가	Amount(FOB)분적인도가격	130ml	1	140원		100ml	1	235원		<p style="text-align: center;"><b>GOOD F&amp;B co.,Ltd</b> SALES CONTRACT</p> <p>CONTRACT NO. : 20150327</p> <p>SELLER : Good F&amp;B Corporation</p> <p>ADDRESS : #1, Saichon-gil, Naeon-myeon, Naju-City, Jeollanam-do</p> <p>BUYER : FUJIAN YAB FOOD CO.,LTD</p> <p>ADDRESS : THE 4TH FLOOR BUILDING A, QUANZHOU PEI SE KA LA GARMENT CO.,LTD, F-17BLOCK WESTERN AREA ECONOMIC AND TECHNOLOGICAL DEVELOPMENT ZONE,QUANZHOU</p> <p>DATE : 2015. 03. 27</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>NAME</th> <th>QTY</th> <th>UNIT PRICE</th> <th>AMOUNT</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>APPLE JELLY STORY</td> <td>180</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>GRAPE JELLY STORY</td> <td>180</td> <td>626.92</td> <td>\$10,884</td> </tr> <tr> <td>KIWI JELLY STORY</td> <td>180</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>PEAR N BANANA JELLY</td> <td>180</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>BUYER : FUJIAN YAB FOOD CO.,LTD</p> <p>SELLER : <b>좋은영농조합법인</b> Good F&amp;B Corporation</p>	NAME	QTY	UNIT PRICE	AMOUNT	APPLE JELLY STORY	180			GRAPE JELLY STORY	180	626.92	\$10,884	KIWI JELLY STORY	180			PEAR N BANANA JELLY	180		
Description/명세	Quantity/수량	Unit /Price/단가	Amount(FOB)분적인도가격																																											
130ml	1	140원																																												
100ml	1	235원																																												
Description/명세	Quantity/수량	Unit /Price/단가	Amount(FOB)분적인도가격																																											
130ml	1	140원																																												
100ml	1	235원																																												
NAME	QTY	UNIT PRICE	AMOUNT																																											
APPLE JELLY STORY	180																																													
GRAPE JELLY STORY	180	626.92	\$10,884																																											
KIWI JELLY STORY	180																																													
PEAR N BANANA JELLY	180																																													

- 국제식품박람회 참가



3) 온라인 마케팅

- 국내 자사 쇼핑몰 운영



- 외국 홈페이지 운영



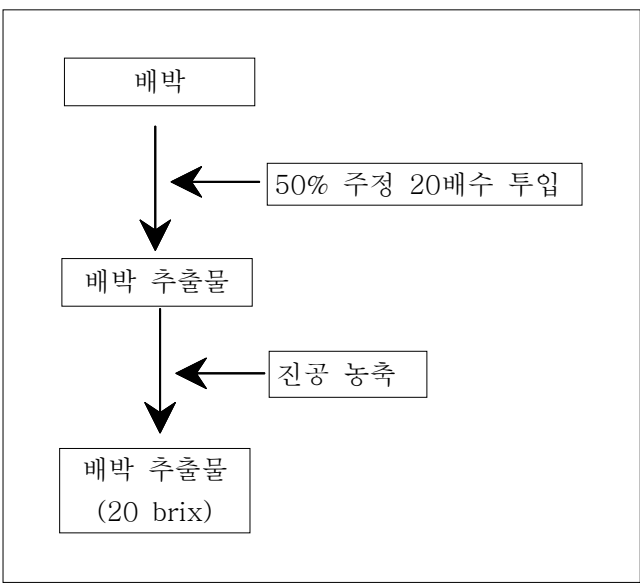
■ 제 1 세부과제 : 피부건강 면역조절용 소재추출공정 확립 ■

I. 연구재료 및 방법

1) 피부건강 면역조절용 소재 추출 공정 확립

협동기관의 이너뷰티케어 소재의 면역조절 효과 규명과 이너뷰티케어(면역조절능관련 성분) 소재의 in vivo 기능성 평가 결과에 따라 배박 50% 주정 추출물(이하 배 주정추출물)이 면역조절능이 있어서 가려움증 개선 등의 피부건강 개선능이 있음을 확인하였다. 따라서 주관기관은 이러한 결과를 토대로하여 배박 50% 주정 추출물을 사용하여 피부건강 면역조절용 소재 추출공정을 확립하였다.

배박 동결건조물에 50% 주정을 20배수 되게 넣고 실온에서 24시간 추출하였다. 주정을 제거하기 위하여 65℃에서 진공 농축하여 부피가 50% 되도록 증발시킨 다음, 원래 부피의 25%의 증류수를 넣고 20 brix가 될 때까지 진공 농축하여 주정을 완전히 제거한다. 주정계로 측정하여 알코올 함량이 0%가 되는지 확인하여 음료 제품 개발 원료로 사용하였다.



[그림1] 면역조절능이 있는 배박 50% 주정 추출물 제조 공정

2) 최적의 원료 배합비 산출 및 레시피 개발

① 최적의 원료 배합비 산출

배박 50% 주정 추출물을 함유한 음료개발은 배 주정추출물 섭취량을 4g(분말기준) 섭취하는 함량으로 정하고 추가되는 첨가물의 함량을 조절하여 섭취하기 용이한 배박 50% 주정 추출물 함유 음료 레시피를 개발하였다.

Ingredients(%)	A	B	C	D
water	82.35	882.28	82.26	82.24
배 주정추출물	4.00	4.00	4.00	4.00
정백당	9.50	9.50	9.50	9.50
올리고당	4.00	4.00	4.00	4.00
구연산	0.03	0.05	0.07	0.09
비타민 C	0.10	0.15	0.15	0.15
구연산삼나트륨	0.01	0.01	0.01	0.01
스테비오사이드	0.01	0.01	0.01	0.01
합계	100.00	900.00	100.00	100.00

② 배박 50% 주정 추출물 함유 음료 레시피 및 시제품 개발

㉠ 배박 50% 주정 추출물 함유 음료의 품질 특성



- pH와 Brix 측정

- 배박 50% 주정 추출물 음료의 pH 측정은 시료를 20mL을 각각 100mL 삼각플라스크에 넣고 pH meter(Inolab, 독일)를 이용하여 3회 반복 측정 후, 평균값을 계산하여 나타내었고, Brix는 당도계(PAL- $\alpha$  Brix 0~85%, Atago, Tokyo, Japan)를 이용하여 3회 반복 측정 후 평균치를 나타내었다.

㉠ 기타 성분배합을 통한 품질 및 기능성 향상

- 각종 과실농축액의 첨가를 통한 레시피 개발

- 배박 50% 주정 추출물 음료의 품질 향상을 위하여 사과, 배, 칼라만시, 딸기, 오디, 매실, 감귤, 포도, 유자의 농축액과 향료를 첨가하였고 단맛을 위해 설탕, 올리고당, 스테비오사이드로 11~14Brix, 신맛을 위해 구연산, 비타민C를 이용해 PH 3.0~3.5 사이로 레시피를 잡아 관능평가를 실시하였다.

Ingredients(%)	사과 A	배 B	C	딸기 D	오디 E	매실 F	감귤 G	포도 H	유자 I
water	81.57	81.69	81.81	81.87	78.95	82.03	81.45	81.33	81.45
배 주정추출물	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
정백당	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5
올리고당	3	3	3	3	3	3	3	3	3
과실농축액	1.4	1.17	1.17	1.08	4	0.89	1.5	1.62	1.5
젤믹스 W	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
N-아세틸글루코사민	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
향	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
구연산	0.15	0.25	0.14	0.17	0.17	0.2	0.17	0.17	0.17
비타민 C	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
구연산삼나트륨	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
스테비오사이드	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Mixed extract	100	100	100	100	100	100	100	100	100

- 맛과 기능성 향상을 위해 과실농축액을 2가지 이상 혼합하여 11~14Brix, PH 3.0~3.5로 맞춰 레시피를 잡아 관능평가를 실시하였다.

- 기타 성분배합을 통한 기능성 향상

- 배박 50% 주정 추출물 음료의 기능성 향상을 위하여 피부보습을 위한 N-아세틸글루코사민을 각각 음료 레시피에 일정량 첨가하였다.

㉔ 관능평가

• 시료준비 및 제시

- 관능평가를 위한 시료는 제조하여 4℃ 냉장고에 보관하여 사용하였다. 외관평가를 위해 음료는 투명한 100mL의 유리컵에 일정량(50mL)을 담아 제시하였다. 이때 평가에 대한 편견이 없도록 시료용기에 난수표에서 추출한 세 자리 숫자를 표기하였다. 평가시료온도는 4±1℃가 되도록 하였다. 시료를 평가하는 사이사이 입안을 헹굴 수 있도록 생수와 빨는 컵을 함께 제시 하였다.

• 평가내용 및 방법

- 배박 50% 주정 추출물 음료에 대한 관능적 특성 평가는 랜덤화 완전 블록실험법에 따라 패널요원 1인이 무작위로 배치된 각각의 음료를 모두 평가하도록 하였다. 시료의 특성 평가는 단맛, 색감, 향미, 전반적인 품질순으로 평가하였다. 검사시간은 오후 4시였으며, 평가에 참여하는 관능검사원들에게는 평가 1시간 전부터 물 이외의 음료나 음식물 섭취를 피하도록 하였고, 향이 진한 화장품의 사용을 금하였다. 평가는 5점 척도법을 사용하였고, 특성강도가 강할수록 높은 점수를 부여하도록 하였다 (1점=약하다, 5점=강하다).

3) 배박 50% 주정 추출물을 함유한 피부건강 개선능 이너뷰티케어용 음료 개발 공정 확립

- 배박 50% 주정 추출물을 함유한 피부건강 개선능 이너뷰티케어용 음료 개발 공정 확립을 위하여 원료 입고부터 원료 보관, 계량, 배합, 가열·살균, 필터, 포장 등 일련의 음료개발 공정을 확립하였다.

4) 제품 디자인

제품명을 “이슬촌 포도배” 와 “이슬촌 딸기배” 로 정하고 디자인을 개발 하였다.

① 이슬촌 포도배

㉕ 레시피



원재료명	배합비(%)	
정제수	81.33	
백설탕	9.50	
배 주정추출물	4.00	
올리고당	3.00	
포도농축액	1.62	미국산, 과즙으로 8%
젤믹스 W	0.10	
N-아세틸글루코사민	0.10	
포도향	0.10	합성착향료
구연산	0.17	
비타민C	0.05	
구연산삼나트륨	0.02	
효소처리스테비아	0.01	
	100	

㉠ 기준, 규격

제품명	제품유형	용량	성상	Brix	PH	유통기한	비고
이슬촌 포도배	과·채 음료	100ml	보라색의 포도맛이 나는 액상젤리	22.5~25.5	3.0~3.5	제조일로부터 10개월	

㉡ 안정성 검사

시험항목	기준	결과
납	0.3이하(mg/kg)	0.0
대장균군	음성	음성
보존료		
그외보존료	불검출(g/kg)	불검출
안식향산으로서	0.6이하(g/kg)	불검출
세균수	100이하(mL당)	불검출
카드뮴	0.1이하(mg/kg)	0.0

㉢ 제조공정도

배 주정추출물을 함유한 피부건강 개선능 이너뷰티케어용 음료 개발 공정 확립을 위하여 원료 입고부터 원료 보관, 계량, 배합, 가열·살균, 필터, 포장 등 일련의 음료개발 공정을 HACCP 기준에 맞추어 확립하였다.

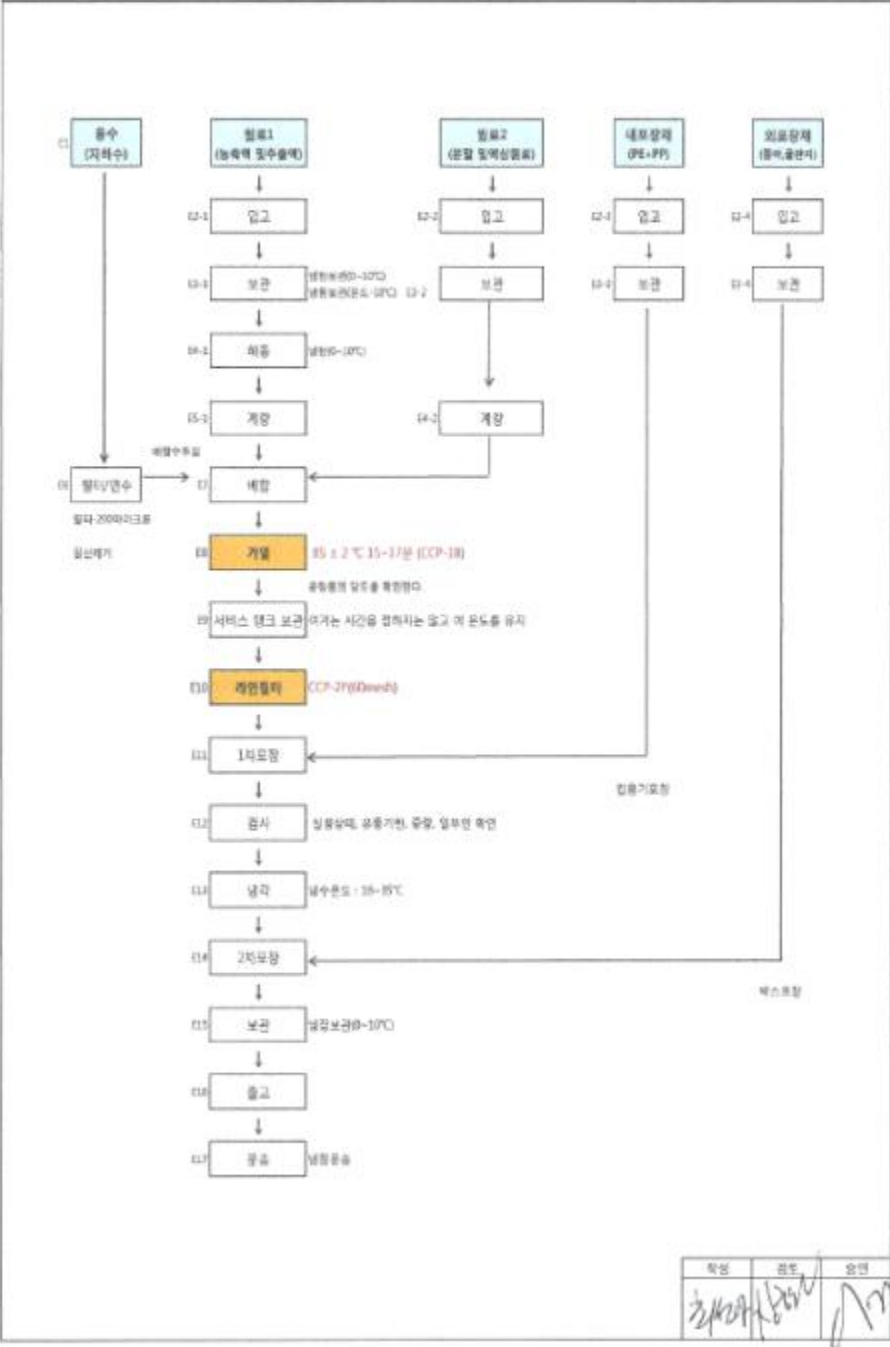
② 이슬촌 딸기배

㉠ 레시피



원재료명	배합비(%)	
정제수	81.87	
백설탕	9.50	
배 주정추출물	4.00	
올리고당	3.00	
냉동딸기	1.08	
젤믹스 W	0.10	
N-아세틸글루코사민	0.10	
딸기향	0.10	합성착향료

품질영역 조관업인	<b>5-4. 공정흐름도</b>	문서번호	GH-01-정부2
	이슬추 포도배(과채 음료)	제정일자	2015.07.22
		개정번호	1
		페이지	



작성	검토	승인
<i>[Handwritten Signature]</i>	<i>[Handwritten Signature]</i>	<i>[Handwritten Signature]</i>

Ⓢ 기준, 규격

제품명	제품유형	용량	성상	Brix	PH	유통기한	비고
이슬촌 딸기배	과·채 음료	100ml	붉은색의 딸기맛이 나는 액상젤리	15.5~18.5	3.0~3.5	제조일로부터 10개월	

㉔ 안정성 검사

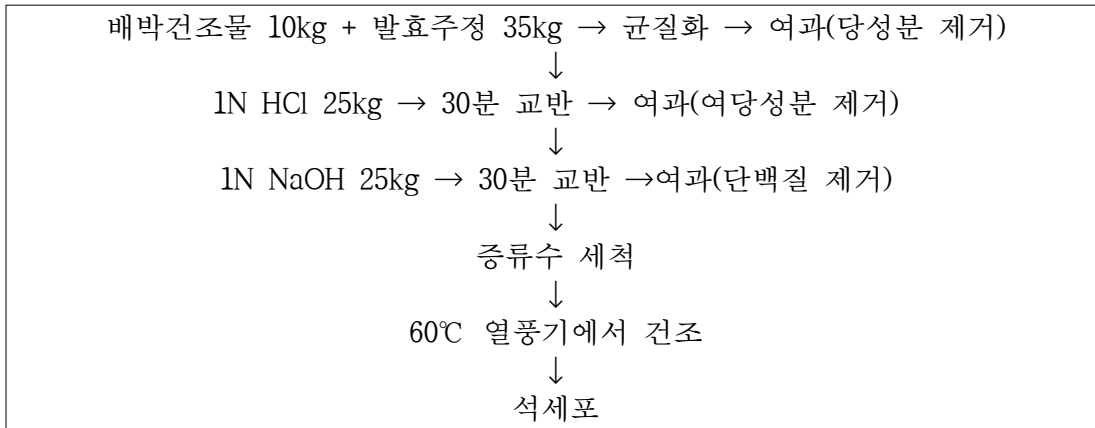
시험항목	기준	결과
납	0.3이하(mg/kg)	0.0
대장균군	음성	음성
보존료		
그외보존료	불검출(g/kg)	불검출
안식향산으로서	0.6이하(g/kg)	불검출
세균수	100이하(mL당)	불검출
카드뮴	0.1이하(mg/kg)	0.0

2) 배 주정추출물을 함유한 피부건강 면역조절용 건강지향음 제품 디자인 개발



5) 석세포 추출공정 및 대량 추출방법 확립

배를 착즙하고 나오는 배박을 원료로 사용하였다. 배박을 동결건조하여 배박건조물을 제조하였다. 배박건조물의 3.5배의 주정을 넣고 균질화한다음 상등액을 제거하여 당성분을 제거하였다. 다음 공정으로 배박건조물의 2.5배되게 1N 염산을 넣고 30분 교반하고 상등액을 제거하여 여당 성분을 제거하였다. 다음공정으로 배박건조물의 2.5배되게 1N NaOH를 넣고 30분 교반하고 상등액을 제거하여 단백질을 제거하였다.



(4.96kg)-수율 49.6%

① 배박 동결건조

배박을 대량으로 동결건조하기 위하여 샬롬산업의 동결건조기를 사용하였다.



[그림2] 대용량 동결건조기(샬롬산업)

② 석세포 건조 및 분말화

40~60℃에서 수분이 수분 5± 2% 되도록 열풍 건조하고 분쇄기에 80 메쉬망을 설치하고 분쇄하여 석세포를 제조하였다.



[그림3] 분쇄기

③ 석세포 품질관리

◎ 물질안전 보건자료(MSDS)

석세포를 화장품 원료로 사용할 수 있도록 안전한 물질임을 증명할 수 있는 물질안전 보건 자료(MSDS)를 발행하였다.

### 안전 보건 자료 (MSDS)

1. 제품과 회사에 관한 정보	
제 품 명 : 석세포	
제 조 회 사: 좋은영농조합법인	대표이사 : 이 기 선 (인)
전라남도 나주시 노안면 이슬촌길 87	
전화번호 061-335-9630 팩스번호 061-335-9680	
2. 성분에 관한 정보	
INCI Name : 석세포 100%	
위험물:	없음
3. 위험 유해성	
응급을 위한 개요	
외관변화 : 흡습성	
색상 : 갈색의 분말	
물리적 상태 : 분말	

냄새 : 특이취

주요한 건강위험성 : 석세포 분말이 눈이나 호흡기에 들어가지 않도록 주의

잠재적 건강영향

피부접촉 : 자극 없음

눈 접촉 : 단기간 노출 시 자극

호흡기 흡입 : 기침 또는 재채기 유발

섭취 : 많은 양을 삼켰다면 의사의 치료를 받도록 할 것

4. 응급조치 요령

피부접촉 : 위험하지 않음

눈 접촉 : 다량의 물을 사용하여 세척

호흡기 흡입 : 기침이나 재채기로 제거, 다량 흡입 시 의사의 진료 받을 것

5. 폭발 화재 시 대처방법

화재 및 폭발 위험 : 화재 및 폭발 위험 : 분진 폭발 위험성 있으므로 분진이 잘 제거되는 공간에서 작업하고 정전기 발생되지 않도록 작업 할 것

유해한 연소물: 탄소 산화물, 이산화탄소

6. 누출 사고 시 대처 방법

작업적 조치 누출을 중단시킬 수 있으면 중단시킬 것

분진폭발의 위험성이 있으므로 정전기나 스파크 발생 주의

환경적 조치

소량 유출 시 수거

다량 유출 시 수거

7. 취급 및 저장 방법

저장용기 : 인습되지 않는 비닐 또는 밀폐용기에 보관 할 것

저장 및 보관 방법 : 서늘하고 건조한 장소에 보관할 것

사용 후 잔량은 완전 밀봉 후 보관할 것

8. 노출 방지 및 개인 보호구

노출기준 : 작업적 노출 기준 없음

개인 보호구 : 보안경 및 산업안전 기준에 적합한 마스크

9. 물리 화학적 특성



물리적 상태 : 분말  
 외관 : 갈색의 분말  
 색상 : 갈색  
 외관변화 : 흡습성  
 구조 : 유동성 있는 분말  
 냄새 : 특이 취  
 맛 : 특이한 맛 없음  
 비중 : 0.7-1.0  
 강열잔류물(550℃ 4시간) : 3-4%  
 수소이온 지수 (2% pH) : 6.5-7.0

10. 안전성 및 반응성

반응성 : 상온 상압에 안정함  
 피해야할 조건 : 열, 화염, 스파크 및 기타 점화원 피할 것  
 혼합금지 물질 : 없음  
 위험한 분해생성물 : 불완전 연소로 인한 일산화탄소, 탄소 산화물  
 중합 반응 : 중합반응하지 않음

11. 독성에 관한 정보

독성 없음

12. 환경에 미치는 영향

없음

13. 폐기 시 주의사항

적용 규정에 따라 폐기할 것

14. 운송에 필요한 정보

던지거나 낙하 시 파손 시 오염의 문제 발생하여 사용 불가함.

15. 법적 규제 현황

한국 규정

- 산업안전보건법 : 미규정
- 유해화학물질관리법 : 미규정
- 위험물안전관리법 : 미규정

미국규정 : 규제대상 아님

유럽연합 규정 : 규제대상 아님

16. 기타 참고사항 법적 규제 현황

적용분야 : 식품, 화장품

최대 사용량 : 제한 없음

이 정보는 현재까지 알려진 지식 정보에 근거한다.

이 물질안전보건자료의 목적은 물질, 취급자, 환경에 대한 안전성 및 보건성 확보에 있다.

이 물질안전보건자료의 자료는 이 물질의 특성에 관한 사항에 대해서는 보증하지 아니한다.

-끝-

작성일 : 2016년 8월 18일

작성자 : 신 궁 원

# 검 사 성 적 서

좋은영농조합법인

우편번호 : 520-812 주소 전라남도 나주시 노안면 이슬촌길 87  
 전 화: 061-335-9630 팩 스: 061-335-9680 인터넷 : http://www.goodfnb.com  
 대표 이사 : 이 기 선

제 품 명 : 석세포

식품 유형 : 과채가공품

## 시험항목 및 결과(Certificate Of Analysis)

시험 항목	기 준	결 과	시험법
pH	5~7	0.5% : 6.5	pH 미터
		1% : 6.7	
		2% : 6.7	
타르색소	불검출	불검출	식품공전
대장균군	음 성	음 성	건조필름법
일반세균	100CFU 이하 / 1g	0	건조필름법
입도	40~100mesh	40 mesh : 26.4%	mesh 망 통과량 %
		60 mesh : 23.35%	
		80 mesh : 9.36%	
		100 mesh : 40.89%	
납	0.1 mg/kg	pass	식품공전
카드뮴	0.05 mg/kg	pass	식품공전
수분	10%이하	8.34%	식품공전
		-이하여백-	
판 정 년 월 일	2016 년 8 월 10 일		
판 정 결 과	적 합		
검 사 자	품질관리 담당자 장 유 선		

좋은영농조합법인

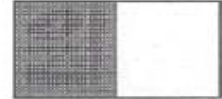
### ④ 검사 성적서

식품공전에 의한 기준과 자체 기준에 의해 품질관리를 할 수 있게 검사 성적서를 발행하였다.

### ⑤ 품목제조보고서

석세포를 과채가공품으로 품목제조보고하였다.

발급번호 : 11K1-SNTY-RLXR-MP79-WJCT



## 식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명 이기선	생년월일	
	주소	전화번호	061 3359630
		휴대전화	

영업소	명칭(상호) <div style="display: flex; align-items: center;"> <span>좋은영농조합법인</span> </div>
	소재지 전라남도 나주시 이슬촌길 87(,31-3,31-42)

제품정보	식품의 유형	과.채가공품	영업신고번호	20060512128
	제품명	석세포		
	유통기한	제조일로부터 12개월		
	품질유지기한			
	원재료 또는 성분명, 배합비율	뫼장에 기재		
	용도 용법	뫼장에 기재		
	보관방법 및 포장재질	실온보관 폴리에틸렌(내면)		
	포장방법 및 포장단위	일봉포장, 100g, 200g, 300g, 500g, 1kg, 2kg		
	성상	분말		
	고열량·저영양 식품 해당 여부	[ ]예 [ ]아니오 [O]해당 없음		

기타	
----	--

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2015년 07월 21일

보고인 이기선

**전라남도 나주시장 귀하**

품목보고필	20060512128132				
처리부서	보건소 보건위생과	처리자성명	윤정현	처리일자	2015년 07월 23일



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

⑥ 규격서

성분, 수분, 강열잔류물, 일반세균, 대장균군, 입도 및 pH를 규정하는 규격서를 만들었다.

# 규격서

좋은영농조합법인

우편번호 : 520-812 주소 전라남도 나주시 노안면 이슬촌길 87

전 화: 061-335-9630 팩스 : 061-335-9680 인터넷 :

<http://www.goodfb.com>

대표 이사 : 이 기 선



제 품 명 : 석세포

식품 유형 : 과채가공품

항목	규격
성분	석세포 100%
수분	불검출
강열잔류물	음성
일반세균	100CFU 이하 / 1g
대장균군	음성
입도	40~100mesh
pH	5-7

-이하여백-

좋은영농조합법인

⑦ 잔류농약검사서



제CTRPC5915호		<b>검정증명서</b> (Certificate of Analysis)			
신청인 (Applicant)	성명 : 좋은영농조합법인 이기선		생년월일 : -		
	주소(Address) : 전남 나주시 노안면 이슬촌길 87		전화번호 : 061-335-9630		
접수번호	CP16-01883	접수일자	2016-08-18		
검정 품목 (Name of Product)	석세포				
시료 점수 및 중량 (Quantity of Samples)	1점				
검정 항목 (Analytical Items)	잔류농약검사245성분				
검정 목적 (Analytical Purpose)	참고용				
검정 결과 (Analytical Results)	아래 검출항목외 나머지 성분은 불검출 (검출 6항목)				
	순번	검출항목	단 위	잔류허용기준	검출결과
	1	Boscalid	mg/kg	인과류 1.0	0.027
	2	Buprofezin	mg/kg	배 0.5	0.052
	3	Cyprodinil	mg/kg	배 1.0	0.047
	4	Difenoconazole	mg/kg	인과류 1.0	0.017
	5	Fenitrothion	mg/kg	인과류 최저 0.5	0.015
	6	Tebuconazole	mg/kg	인과류 0.5	0.024

비고 : 건조 등의 과정으로 인하여 수분 함량이 변화된 경우는 수분 함량을 고려하여 적용한다.

「농수산물 품질관리법」 제98조 및 같은 법 시행규칙 제126조에 따라 검정한 시료에 대한 검정성적임을 위와 같이 증명합니다.  
(We hereby certify that the above mentioned samples have been analyzed in accordance with the provisions of Article 98 of the Agricultural and fishery Products Quality Management Act, and Article 126 of the Enforcement Rule of the Act.)

2016년 8월 24일

**다산생명과학원 (주)**

62371 광주광역시 광산구 사암리106번길 119 (우산동) T.062) 942-6600 F.062) 942-6691

환경과 생명을 소중히 하는 아름다운 기업      분석과학을 선도하는 기업      다산생명과학원(주)

6)피부건강 면역조절능 (가려움개선) 제품에 관한 마케팅 전략 확립

① 직영대리점 활용

이슬촌 포도배와 이슬촌 딸기배를 전국 50여개의 직영 대리점을 통해 구축한 판매망을 지속적인 관리를 통하여 판매.



② 해외 바이어를 통한 수출유통망 확보

- 국제식품박람회 지속적인 참가 및 여러 기관의 바이어 상담, 교류 프로그램을 적극 활용하여 수출시장 진출의 기반을 마련

가. 국제식품박람회 참가

a. 멕시코 현지 조사



기코노 유통



멕시코 유통사

b. 중국시안 박람회



칭타오 유화업체



이우 유통사



시안 유통사

c. 베트남 박람회



푸치 유통



하노이 유통사



d. 폴란드 전시회



Interpallen 제약(폴란드)

초콜릿 제조사(헝가리)

나. 온라인 마케팅

- 자사 홈페이지 및 쇼핑몰의 전문성을 확보하여 제품 및 기업 신뢰도를 상승시킴
- 다채널 커뮤니티를 활성화하여 소비자의 선호도 등을 피드백하는 시스템 강화

**이슬촌 쇼핑몰 운영**

다) 외국 홈페이지를 운영

자사 영문 홈페이지	HIT500	중문마케팅-aT중국홍보관

## 7) 피부건강 소재를 이용한 보습 및 자외선차단 인체적용시험

세명대 산학협력단에 임상시험 의뢰(보습 및 자외선차단지수, 자외선A차단지수 평가시험)

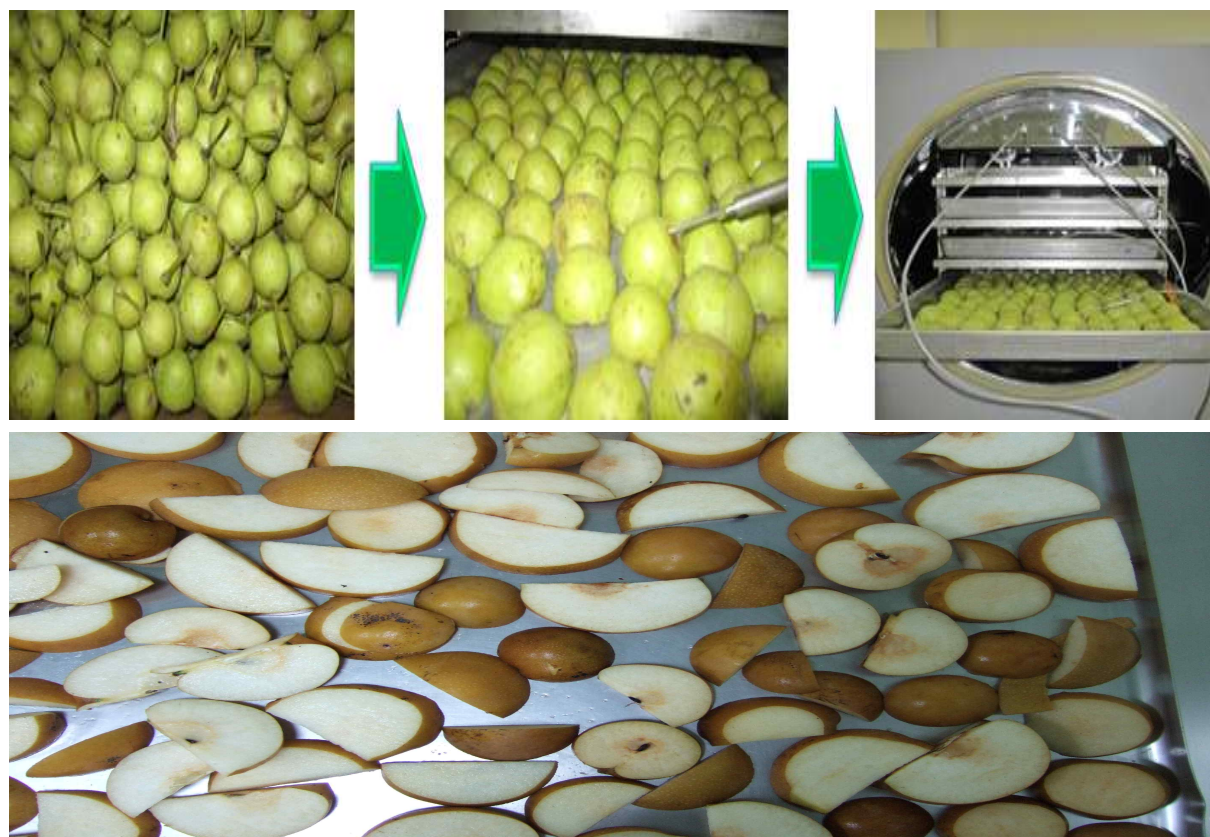
\*임상시험보고서 별첨

### ■ 낙과(미숙과)유래 기능성분의 표준화 ■

#### 가. 원료 확보 및 시료 준비

##### (1) 실험방법

본 실험에 사용한 낙과, 미숙과 시료는 제 1세부기관인 좋은영농조합법인으로부터 제공 받은 배 원료를 동결건조(FD)하여 이를 분쇄하여 분말화한 것을 냉동보관하면서 시료로 사용하였다. 그리고 배박 시료는 배 원료를 배즙으로 가공하고 난 후, 나온 박을 수득하여 이를 동결건조하여 분쇄기로 분쇄한 건조물을 시료로 사용하였다. 시료의 건조방법에는 열풍 건조, 동결건조 등의 건조 방법이 있는데 열풍건조의 경우에는 시료가 건조시에 돌처럼 딱딱하게 굳어지는 단점이 있는 관계로 하여 동결건조 방법을 선택하였다.



[그림4] Freeze drying Process of Pear.

Table 9. Condition of 80L Freeze dry.

Temperature (°C)	-25	-15	0	10	20	30	40	40
Time (hr)	4	5	4	4	4	4	4	∞

(2) 실험결과

낙과의 대량 건조 수율은 아래 Table 10.과 같이 18.56%로 20%에 가까운 건조 수율을 보였다.

Table 10. Yield of dry for pear.

Sample	Wet Weight (kg)	Dry Weight (kg)	Yield of Dry (%)
Pear	88.09	16,35	18.56

나. 낙과(미숙과)유래 조알부턴 등 미백 추출물의 소재화

(1) 실험방법

(가) 가공조건 확립

낙과의 이너뷰티용 가공조건 확립 실험을 위하여 75Brix의 낙과 추출 농축액을 정제수를 사용하여 10, 20, 30Brix로 희석한 것에 Dextrin 0, 5, 10, 20%를 잘 혼합하여 동일 조건으로 동결건조 하였을 때, Bumping이 일어나지 않고 곱게 분말화가 되는 조건을 육안으로 확인한다.

(나) 추출 조건별 낙과 추출물 제조

미백 기능성 평가를 위하여 주관기관에서 제공받은 낙과 동결건조 분말을 사용하여 추출물을 제조하였다. 낙과 시료 100g을 20배수의 증류수, 50% EtOH, 100% EtOH 3가지의 용매로 추출하였다. 상온에서 24시간 추출하여 Whatman No.1 여과지로 감압여과 한 후, 농축하여 동결건조한 것을 실험에 사용하였다.

Table 11. 사용 기기의 개요 및 용도

장비명	제조사	용도
진공농축기	BuchiR-205 Rotary evaporator	시료 추출물 농축
Ultra sonicbath	Elma사의 Tranasonic890/H	시료 추출을 위한 전처리 장비
Shaker	JEIO TECH사의 SI-600R	시료 추출을 위한 혼합
Freeze dry	Ilshin lab사의 PVTFD 10R	시료 추출물 건조

(다) 소재의 기능성 조사

① 세포독성실험

마우스 흑색종 세포(B16F10) 세포를 96Well plate에  $5 \times 10^4$  cells/well이 되도록 분주하여 24시간 동안 배양한 후, 시료를 농도별로 조제하여 처리하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> Incubator에서 4~5일 동안 배양하였다. 여기에 5mg/ml의 농도로 제조한 MTT 용액 0.02ml를 첨가하여 4시간 배양한 후, 배양액을 제거하고 각 Well당 Dimethyl sulfoxide(DMSO)를 0.2ml씩 넣어 Formazan crystal 생성물을 용해시켰다. ELISA reader로 570nm 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 세포 성장률은 다음 식에 의해 산출하였다.

$$\text{포 생존률 (\%)} = \left( \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{시료 무첨가구의 흡광도}} \right) \times 100$$

② 기질에 따른 타이로신나아제(Tyrosinase) 측정

타이로신나아제(Tyrosinase)활성은 L-DOPA(3,4-dehydroxy L phenylalanin)를 기질로 사용하여 측정하였다. L-DOPA는 100mM Sodium phosphate buffer(pH 6.8)로 완전히 녹이고, Tyrosinase는 Potassium phosphate buffer(pH 6.5)로 완전히 녹였다. Eppendorf tube에 100mM Sodium phosphate buffer(pH 6.8) 350 $\mu$ l, 10mM L-DOPA를 50 $\mu$ l를 넣고, 시료는 최종 농도를 조절하여 50 $\mu$ l 가했다. Tyrosinase는 최종 농도가 25unit/ml이 되도록 계산하여 50 $\mu$ l를 처치하였으며 37°C에서 5분간 반응 시킨 다음 475nm에서 흡광도를 측정하였다.

③ 마우스 흑색종 세포(B16F10)에서의 Melanin 생성 측정

마우스 흑색종 세포(B16F10)세포로 부터의 Melanin 생합성 저해 측정은 Hosoi 등의 방법을 변형하여 측정하였다. DMEM 배지로 배양된 Melanoma 세포를 6Well plate에 적정 세포수 ( $2 \times 10^4$ /well)로 분주하였으며, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> Incubator에서 24시간 배양한 후, 시료를 처치하였다. 4~5일 배양 후, 인산완충액(pH 7.4)으로 세척한 후 원심분리하여 세포 침전물을 얻었다. 10% DMSO가 첨가된 1N NaOH 용액을 130 $\mu$ l 첨가하고 60°C에서 1시간 용해시켰

으며 405nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 정량은 대조군의 멜라닌 양에 대한 백분율로 계산하여 다음 식에 의해 산출하였다.

$$\text{라닌 양 (\%)} = \left( \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{시료 무 첨가구의 흡광도}} \right) \times 100$$

#### ④ 마우스 흑색종 세포(B16F10)내에서 Tyrosinase 활성 측정

B16F10 세포에 약물 처치 후 배양이 끝나면 1%(w/v) Triton X-100을 함유한 10mM Phosphate buffer(pH 6.8)를 100  $\mu$ l를 가하고 5분간 Shaking 한 후, 세포와 용액을 모두 Eppendorf tube로 이전시키고 원심분리하여 상층액을 Tyrosinase 활성과 단백질 정량에 이용하였다. 약물처치 후 얻은 상층액은 96-well plate에 40  $\mu$ l를 분주하고, 0.1M Sodium phosphate buffer(pH 7.2)에 녹인 10mM L-DOPA 200  $\mu$ l를 가하여 37°C에서 30분 동안 배양하였다. Tyrosinase에 의해 생성된 DOPA chrome은 475nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### ⑤ 항산화 평가

##### ㉠ 폴리페놀

시료를 5mg/ml로 희석한 후, 48well에 시료 25  $\mu$ l을 넣고 Ciocaltean 50  $\mu$ l 첨가하였다. 3분간 반응 시킨 후, 2% Sodium carbonate 1ml 혼합하여 효소면역분석기로 750nm에서 측정 하였으며 표준물질은 Chlorogenic acid 5, 10, 25  $\mu$ g/ml를 사용하였다.

##### ㉡ 플라보노이드

시료를 5mg/ml로 희석한 후, 48well에 시료 25  $\mu$ l을 넣고 Diethylene glycol 500  $\mu$ l과 1N NaOH 50  $\mu$ l를 37°C에서 1시간 방치 후 효소면역분석기로 420nm에서 측정 하였다. 표준물질은 Quercetin 10, 25, 50, 100  $\mu$ g/ml를 사용하였다.

#### ⑥ Western blot 분석

시료를 72시간 처리한 B16F10 Melanoma 세포를 RIPA buffer로 용해하고 원심분리 하였다. 여기서 얻은 상층액을 10% SDS-PAGE를 이용해 전기영동하고 이를 Nitrocellulose membrane으로 이전시켰다. 이를 5% Skim milk로 블로킹한 후, 1차 항체를 4°C에서 Overnight 반응시켰다. 이어서 1% Skim milk가 함유된 Tris-buffer에서 2차 항체를 붙인 후, ECL solution을 이용하여 발색시켜 확인하였다.






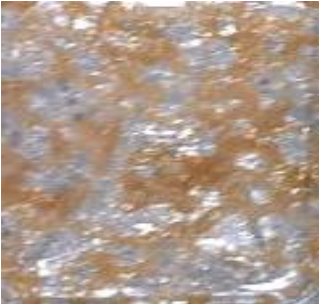
#### ⑦ Realtime PCR을 통한 미백 관련 mRNA의 발현 측정

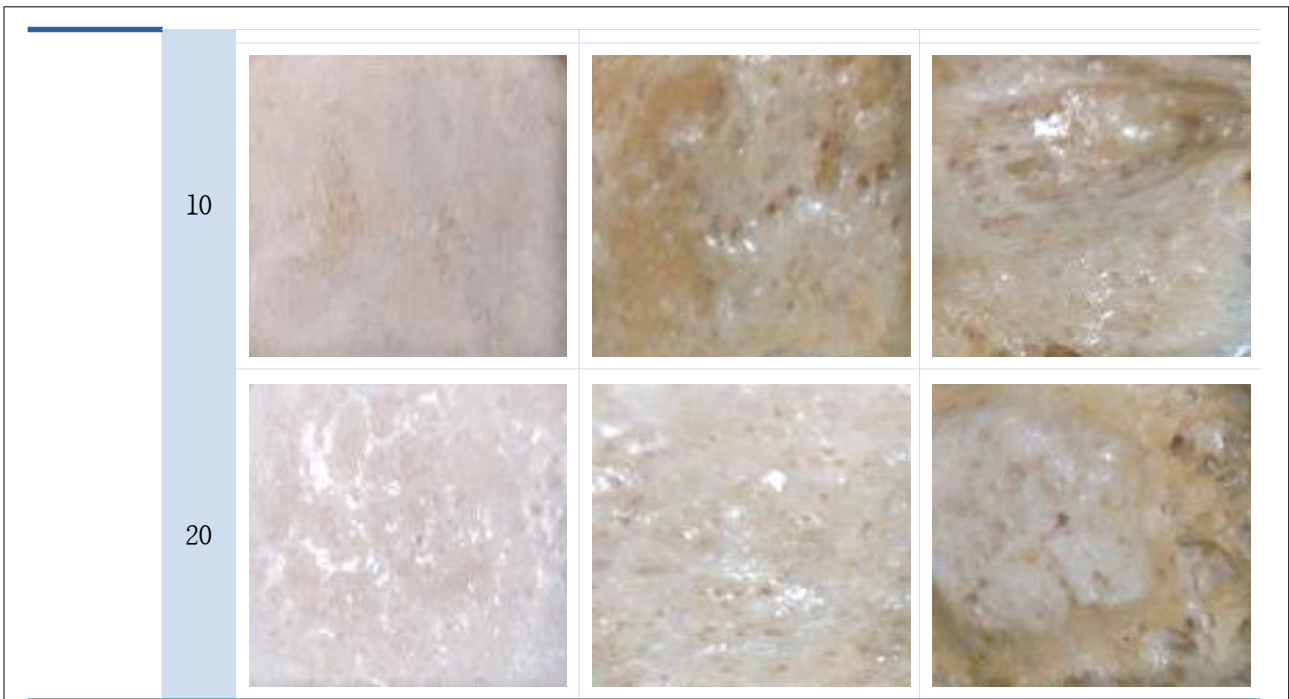
Total RNA 추출은 RNeasy mini kit를 이용하였다. cDNA 합성은 2 $\mu$ g의 Total RNA를 Reverse transcription kit를 이용하여 역전사시켜 합성하였다. cDNA는 고성능 cDNA 합성 kit를 사용하여 증폭시켰다. Realtime PCR은 SYBR green premix을 이용하여 제조사의 지시된 방법에 따라 수행하였다. 프라이머는 Bloneer에서 합성 제작되었다. 결과 값은 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)의 상대적인 값으로 보정하였다.

## (2) 실험결과

### (가) 가공조건 확립

낙과(미숙과)의 가공조건 확립실험은 75Brix의 배 농축액을 10, 20, 30Brix로 희석한 것에 Dextrin을 0, 5, 10, 20% 첨가하여 잘 혼합한 후, 동결건조(FD)하였을 때 곱게 분말화가 되는 조건을 육안으로 확인하였다. Figure 2.와 같이 동결건조 결과 대체적으로 Dextrin의 첨가량이 증가할수록, 그리고 배 농축액의 Brix가 낮을수록 동결건조가 잘 되는 것을 확인할 수 있었다. 그 중에서도 10Brix에 20%의 Dextrin을 첨가한 조건에서는 시료가 건조되지 않고 부풀어 오르는 현상이 일어나지 않고 곱게 분말화가 되는 것으로 확인이 되었고, 나머지 혼합조건에서는 건조 정도의 차이가 있겠으나, 모든 시료에서 시료가 부풀어 오르거나 건조가 잘 되지 않는 것을 알 수 있었다. 따라서 동결건조 시 10Brix의 배 추출액에 20%의 Dextrin을 첨가한 것이 낙과(미숙과) 추출물의 최적의 가공조건임을 확인할 수 있었다.

		Brix		
		10	20	30
Dextrin (%)	0			
	5			



[그림5] Photographs of freeze dry for concentrated pear.

(나) 조건별 낙과 추출물 제조

주관기관에서 낙과(미숙과)를 공급받아 추출한 낙과(미숙과) 추출물의 추출 수율은 다음 Table 12.와 같다.

Table 12. Yield of Extract(w/w, %).

	0% EtOH	50% EtOH	100% EtOH
Sample 1 (1차 낙과)	25	30	25
Sample 2 (2차 낙과)	36	28	21
Sample 3 (미숙과)	18	16	10

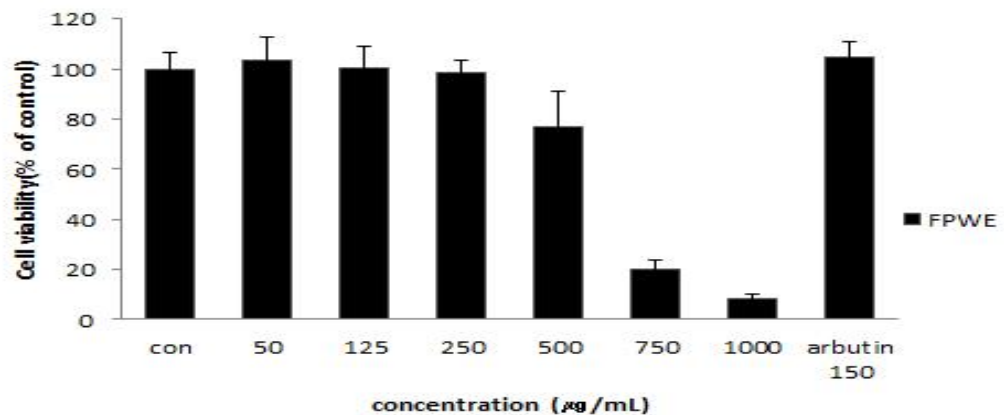
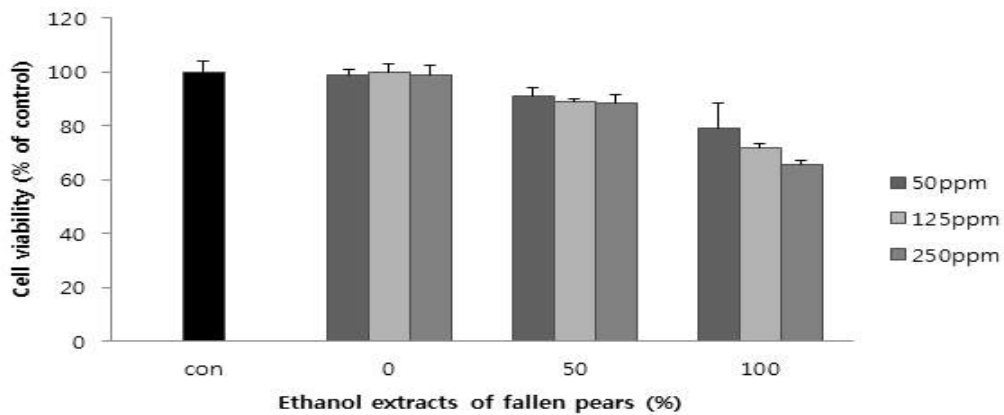
(다) 소재의 기능성 조사

① 세포독성실험

○ 낙과 EtOH 추출물(0, 50, 100%)을 장시간 세포에 노출하는 실험에서 세포 독성이 있는지를 확인하기 위하여 MTT를 이용한 세포 독성을 측정하였다. 0%와 50% EtOH 추출물에서는 250ppm이하의 농도로 처리했을 때 세포생존율은 90% 이상으로 나타났으나, 100% EtOH 추출물에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 80% 이하로 농도에 따라 유의하게 감

소하였다.

○ 낙과 물 추출물의 미백 실험에 사용될 농도 범위 결정을 위해 고농도 50~1000 ppm까지 세분화하여 72시간 처리하여 세포독성을 측정하였다. 그 결과, 낙과 물 추출물은 250ppm 이하의 농도로 처리 시 세포 생존률이 98% 이상으로 나타났으며, 그 이상의 농도에서는 생존율이 저하되었다.



[그림6] Cytotoxic effects of ethanol extracts from fallen pears on B16F10 melanoma cells. Cells were treated with various concentrations (50-250 or 50-1000 µg/mL) of FPWE. The cells were incubated with FPWE for 48h or 72h in 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. The amount of living cells was measured using MTT.

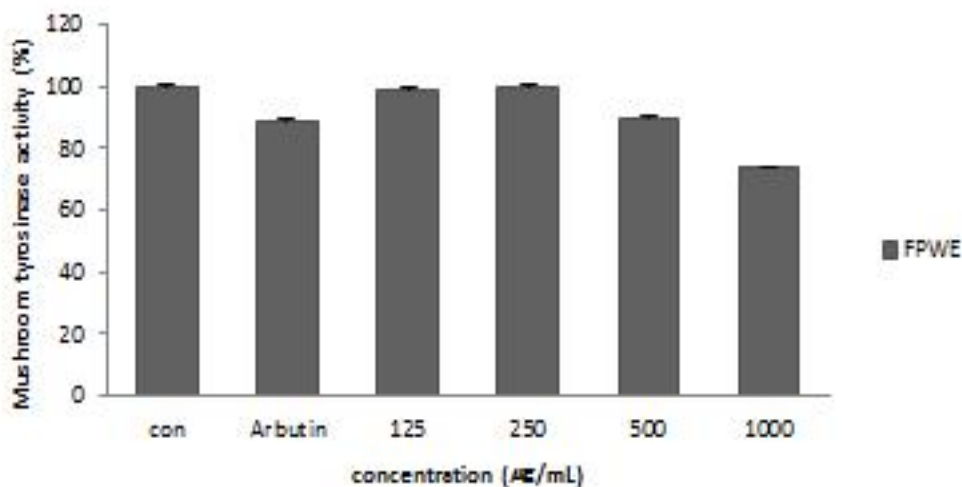
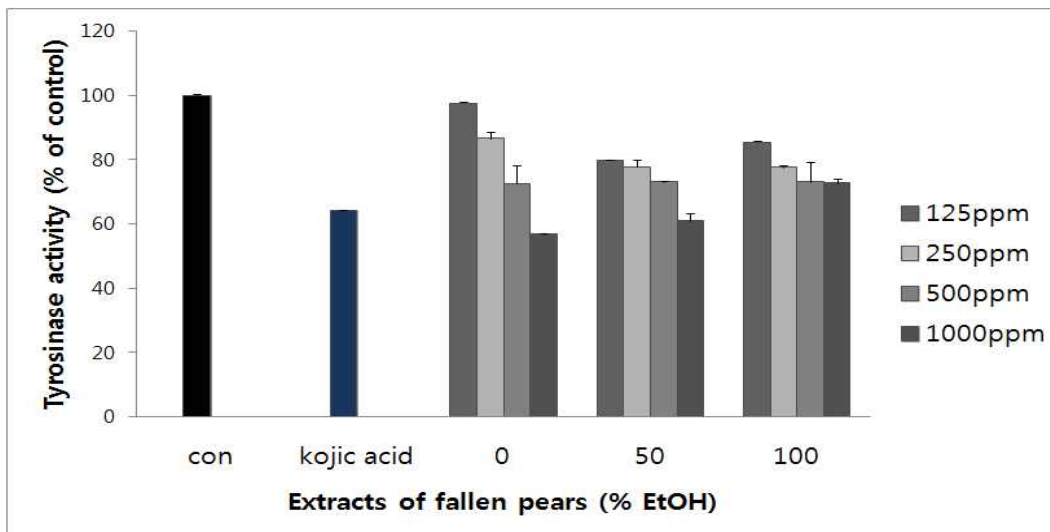
② 낙과 추출물이 Mushroom tyrosinase 활성에 미치는 영향

○ Tyrosinase는 L-tyrosine을 L-DOPA로 전화시키고 이어서 L-DOPA를 L-DOPA Quinone으로 산화시킨다. 이때 Cysteine이나 Thiol기를 갖는 물질이 없을 때 자발적으로 L-DOPA chrome이 형성된다. 이 실험에서는 Tyrosinase의 기질을 L-tyrosine과 L-DOPA를 이용하여 Purified mushroom tyrosinase의 활성을 측정하였다.



○ 낙과 추출물의 미백 효과를 측정하기 위해 앞서 Melanin 생성에 중요한 작용을 하는 Tyrosinase에 직접적인 작용을 관찰하였다. 낙과 0%, 50%, 100% 3가지 EtOH 추출물을 대상으로 농도별 Tyrosinase 저해활성을 측정하였다. 낙과 0%, 50%, 100% EtOH 추출물 1000  $\mu$ g/ml에서 각각 43.3, 39.2, 27.3%로 0% EtOH 추출물이 가장 높은 저해율을 나타냈으며, 농도 의존적으로 감소시키는 양상을 나타냈다. 반면에 50% EtOH 추출물은 낮은 농도에서부터 높은 저해율을 나타냈다.

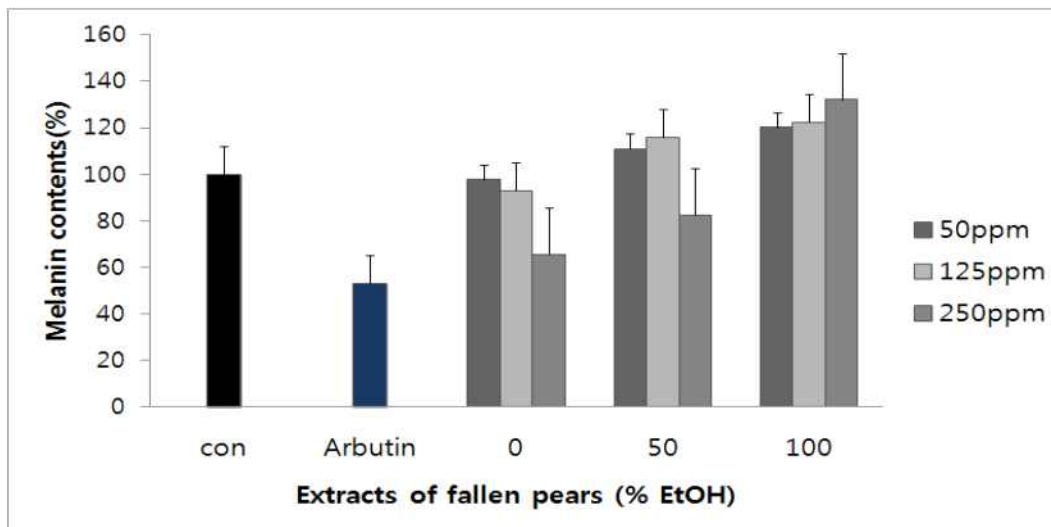
○ Arbutin은 Tyrosinase에 기질이 결합하는 부위에서 작용하여 기질이 Tyrosinase에 결합하는 것을 방해하는 것으로 알려져 있다. 기질은 L-DOPA와 L-tyrosine을 사용하였으며, 각각 양성대조군은 Kojic acid와 Arbutin을 이용하였다. 낙과 물 추출물은 1000ppm 농도에서 Kojic acid와 Arbutin보다 Tyrosinase 활성 억제효과를 높게 나타냈다.



[그림7] Effect of fallen pears extracts on mushroom tyrosinase. Purified tyrosinase was mixed with fallen pears extracts and incubated with 10mM L-DOPA or 0.3 mg/ml L-tyrosine for 30min at 37°C, respectively.

### ③ B16F10 세포 내 멜라닌 생성량 측정

낙과 EtOH 추출물을 각 50, 125, 250μg/ml의 농도로 처리하여 Melanoma 세포에서의 Melanin 생합성 저해활성을 측정하였다. 100% EtOH 추출물은 대조군에 비해 100% 이상으로 오히려 증가하여 Melanin 생합성을 촉진시켜 미백효과가 전혀 나타나지 않았다. 반면에 0% EtOH 추출물은 농도 의존적으로 감소함을 확인하였으며, 250μg/ml 농도에서 Melanin 생합성 35%의 저해 효과를 나타냈다. 또한, 미백제로 알려진 Arbutin 양성대조군과 비교하였을 때, Arbutin의 47% 저해 효과보다 낮았지만 우수한 Melanin 저해 효과를 확인하였다.



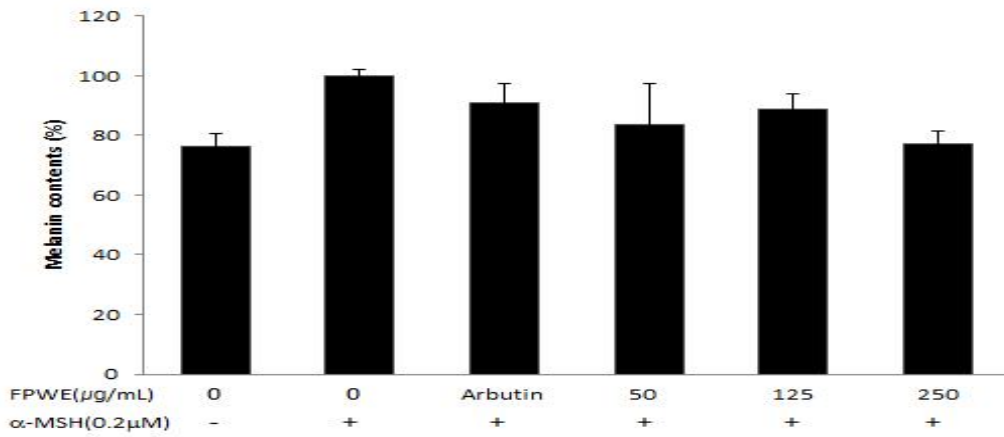
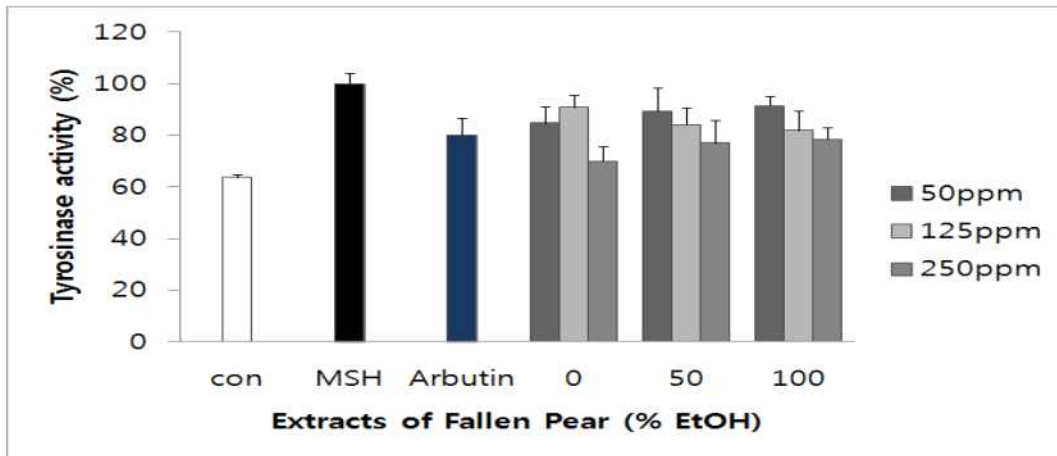
[그림8] Inhibition melanin synthesis of ethanol extracts from fallen pears on B16F10 melanoma cells. The cells were incubated with fallen pears extracts for 4day in 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C.

#### ④ B16 melanoma 세포 내에서 Tyrosinase 활성 측정

○ 미백성분의 선별을 위한 미백활성의 평가는 멜라닌 생성 과정의 저해를 위한 Tyrosinase 활성 억제도와 멜라닌 생성량 저해효과 등을 측정하여 이루어진다.

○ 낙과 추출물이 Melanin을 생성하는 세포 수준에서 미백효과가 있는지를 확인하기 위하여  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone( $\alpha$ -MSH)로 자극한 B16F10 melanoma 세포에서 Tyrosinase 활성을 측정하였다. B16F10 melanoma 세포에서  $\alpha$ -MSH는 tyrosinase 활성을 증가시켰다. 이러한  $\alpha$ -MSH에 의한 Tyrosinase 활성 증가는 낙과 추출물에 의해 억제되었음을 확인하였다. 또한, 20% 활성 억제를 보인 Arbutin보다 0% EtOH 낙과 추출물은 30% 활성을 억제시킴으로써 더 우수한 Tyrosinase 활성 저해 효과를 나타냄을 확인하였다.

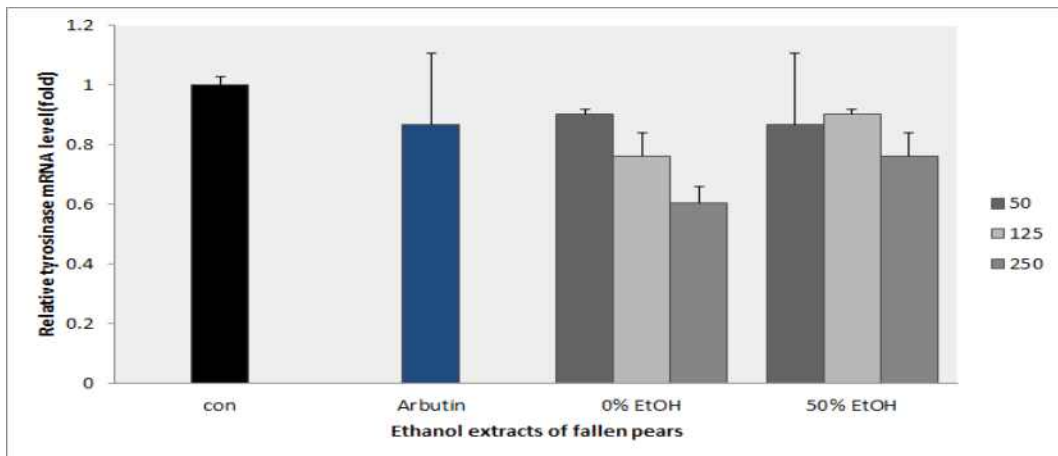
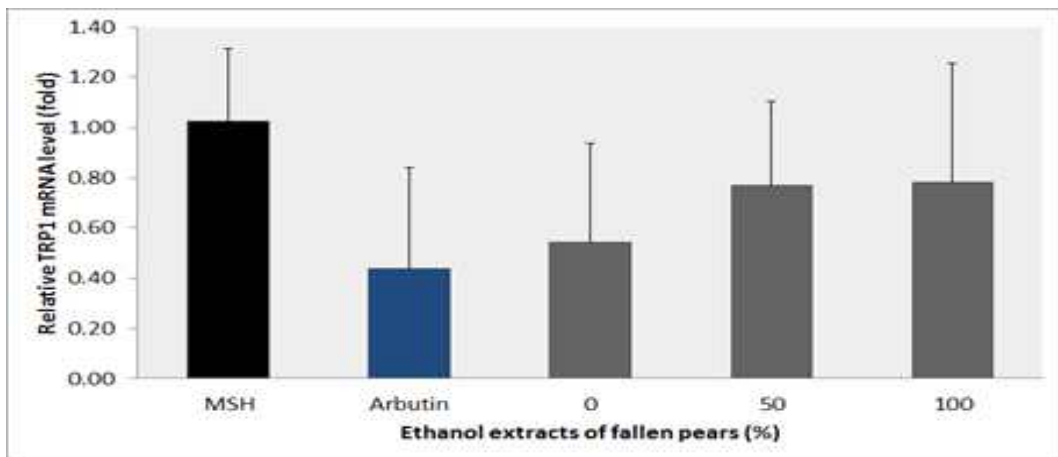
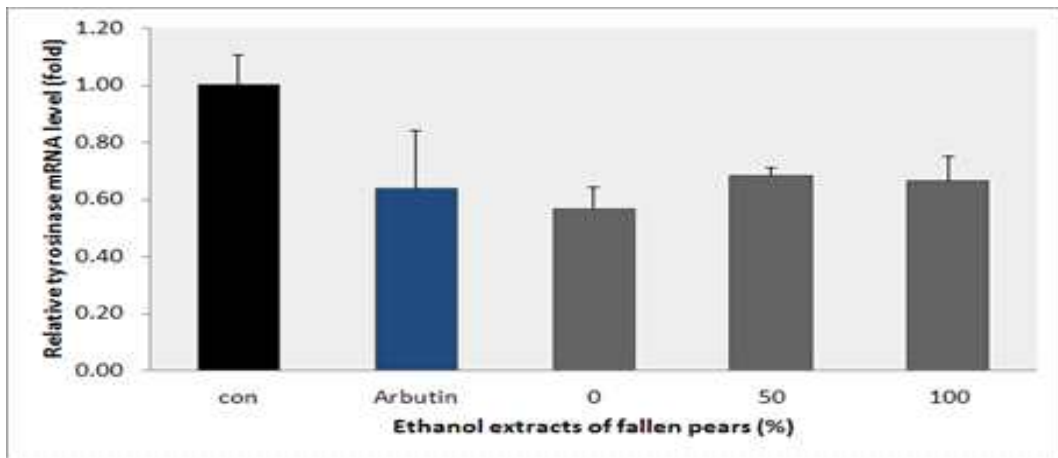
○ Tyrosinase 활성 측정과 마찬가지로 B16F10 melanoma 세포에  $\alpha$ -MSH로 자극하여 멜라닌 생합성 저해효과를 낙과 물 추출물을 처리하여 확인하였다. 그 결과, Tyrosinase 활성 억제와 멜라닌 생성량 저해효과가 같은 양상을 보였으며, 250ppm의 농도에서는 Arbutin보다 tyrosinase 활성 및 멜라닌 생성 저해효과를 볼 수 있었다.



[그림9] Effect of fallen pears extracts on tyrosinase activity in B16F10 melanoma cells. The cells were incubated with fallen pears extracts for 72h in 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C.

⑤ B16F10 melanoma 세포 내에서 Tyrosinase mRNA 발현 저해 효과

낙과 추출물이 Melanin 생합성에 관여하는 유전자의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과는 Figure 7.과 같았으며 낙과 0, 50, 100% EtOH 추출물은 250μg/ml 농도에서 Tyrosinase와 TRP1 mRNA 발현을 확인하였으며, 낙과 0%, 50% EtOH 추출물을 50, 125, 250μg/ml 농도별 Tyrosinase 발현을 측정하였다. 그 결과 낙과 0% EtOH 추출물이 Tyrosinase와 TRP1 발현 억제효과가 좋았으며, 농도 의존적으로 Tyrosinase mRNA 발현을 저해하는 것으로 나타났다.

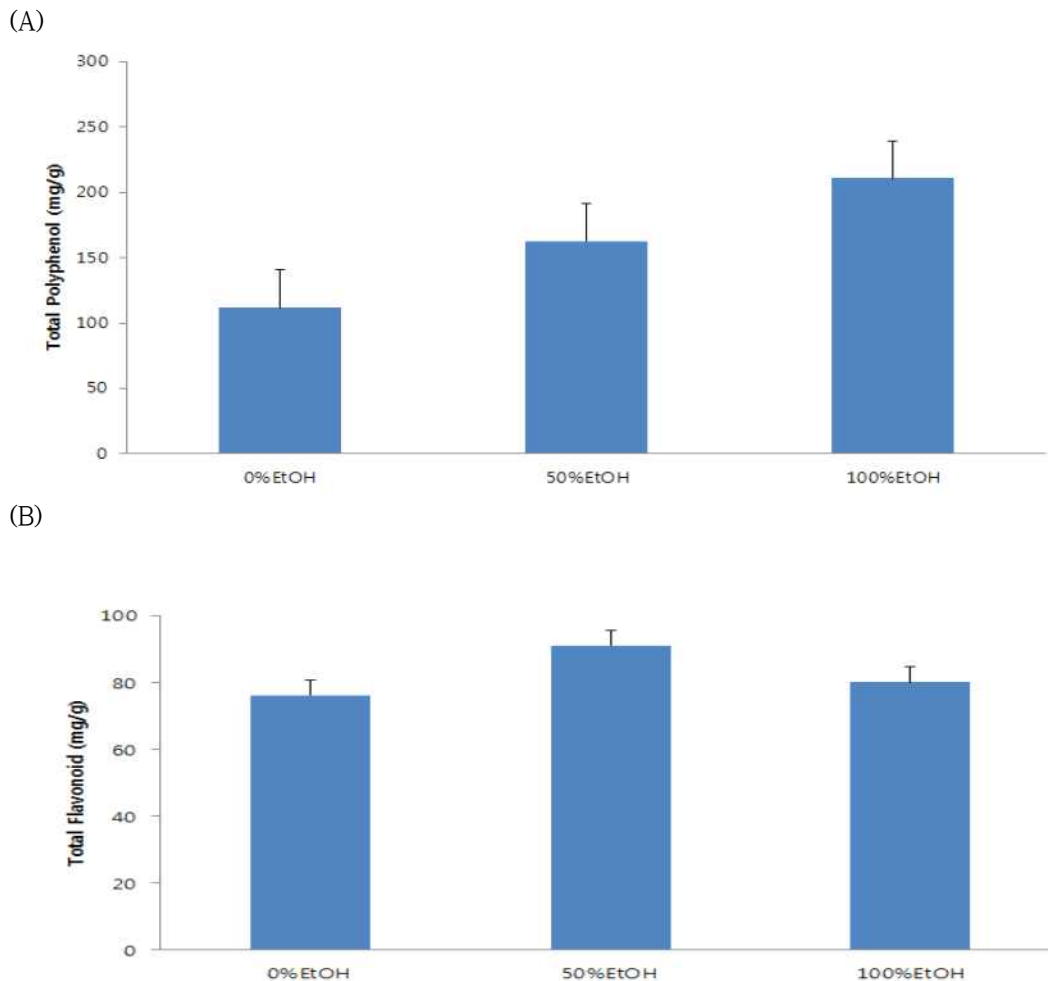


[그림10] Effect of fallen pears extracts on tyrosinase mRNA expression in B16F10 melanoma cells. The cells were incubated with fallen pears extracts for 72h in 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. Total RNA extracted from B16F10 melanoma cells was analyzed by RT-PCR.

#### ⑥ 항산화 측정(폴리페놀, 플라보노이드)

폴리페놀계 물질들은 식물체에 특수한 색깔을 부여하고 산화 환원반응에서 기질로 작용하며, 한 분자 내에 2개 이상의 Phenolic hydroxyl(OH)기를 가진 방향족 화합물을 가리

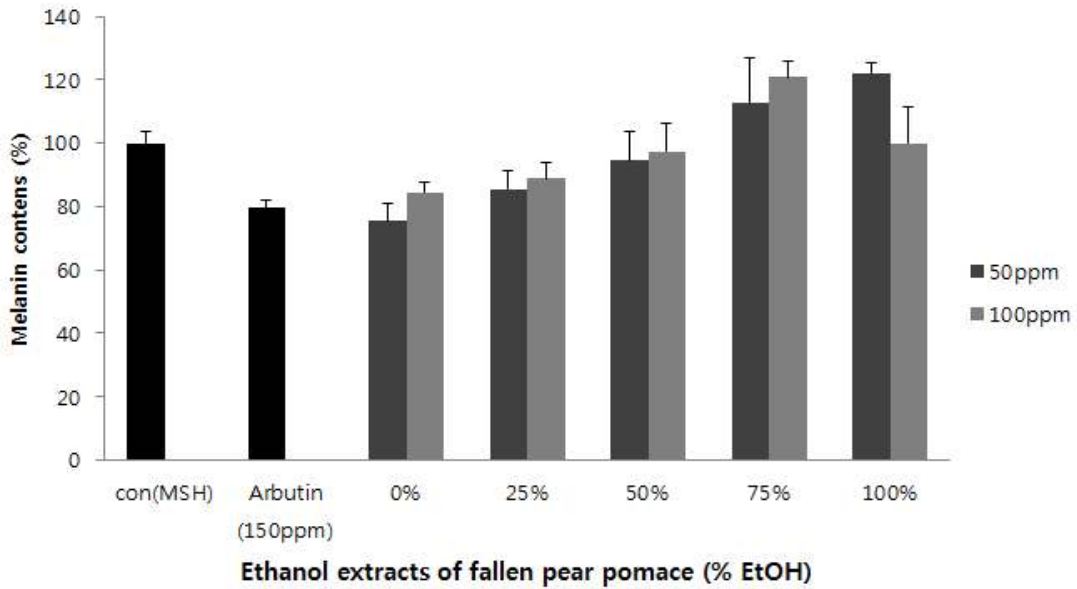
키며 플라보노이드와 탄닌이 주성분으로 충치 예방, 고혈압 억제, 항에이즈, 항산화, 항암 등의 다양한 생리활성을 가진다. 먼저 낙과 추출물에 존재하는 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 각각 Chlorogenic acid와 Quercetin을 기준 물질로 하여 측정하였다. 그 결과, 낙과 추출물중 가장 높은 총 폴리페놀 함량은 100% EtOH에서 211mg/g으로 높은 폴리페놀 함량을 보였고 총 플라보노이드 함량은 50% EtOH 추출물에서 91mg/g으로 나타났다.



[그림11] (A) Content of total polyphenol in fallen pears extracts, (B) Content of total Flavonoid in fallen pears extracts.

#### ⑦ 낙과 추출물의 멜라닌 생성량 측정

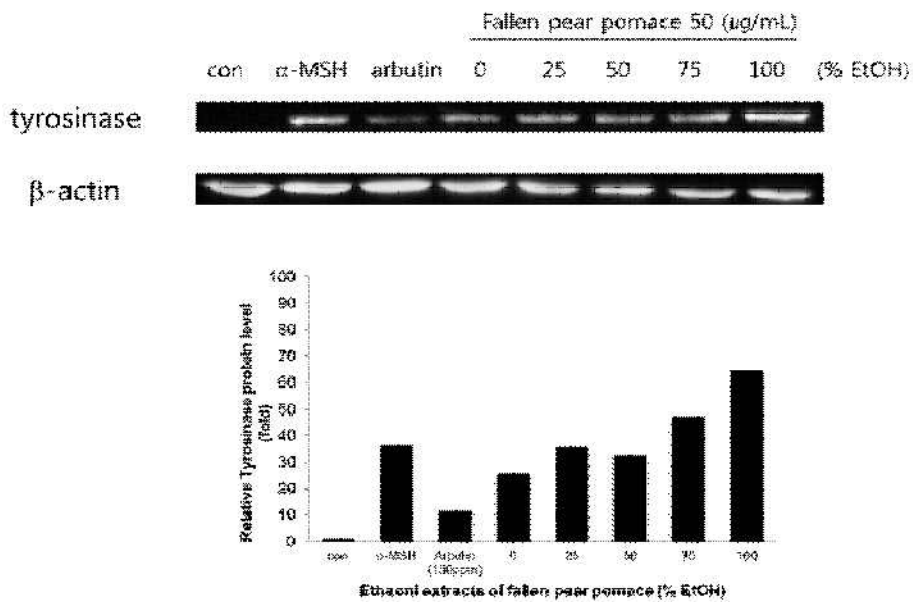
낙과 EtOH 추출물(0, 25, 50, 75, 100% 추출)을 50, 100 $\mu$ g/ml 농도로 처리하여 Melanoma 세포 내 Melanin 생합성 저해활성을 측정하였다. 그 결과 0, 25%에서 양성대조군과 유의하게 저해 활성을 보였다.



[그림12] Inhibition melanin synthesis of ethanol extracts from fallen pears on B16F10 melanoma cells. The cells were incubated with fallen pears extracts for 4day in 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C.

⑧ 세포 내 Tyrosinase 단백질 발현 실험

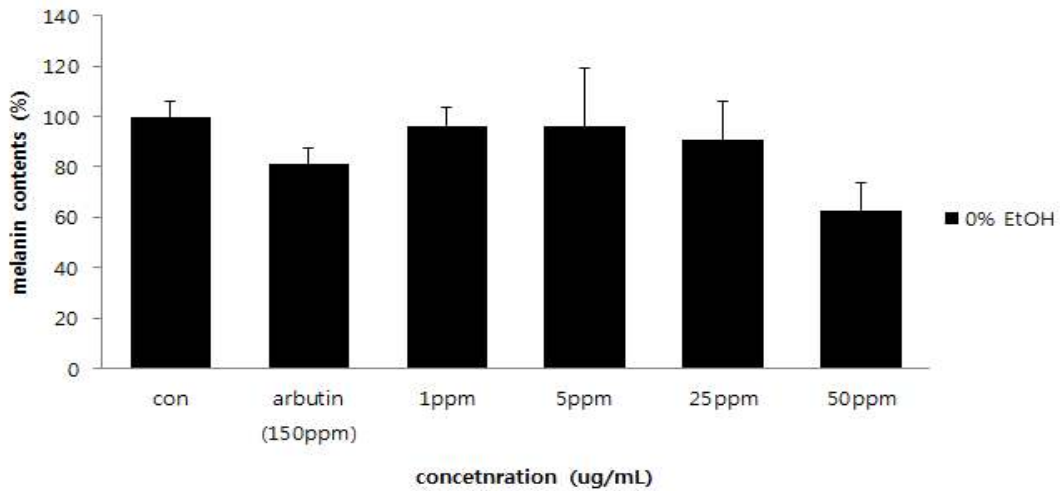
멜라닌 생성에 관련된 단백질 발현과도 연관성이 있는지를 확인하기 위해 Tyrosinase의 항체를 이용한 Western blot으로 관련 단백질의 발현량 변화에 대하여 조사하였다. 낙과 추출액 %별 EtOH 추출물을 각 50µg/ml 농도로 처리한 결과, 0% EtOH 추출이 Tyrosinase 발현을 가장 많이 감소시켰다.



[그림13] Effect of fallen pear pomace ethanol extracts on the expressions of the Tyrosinase proteins in B16F10 cells.

⑨ 낙과 0% EtOH 추출물 농도별 멜라닌 생성량 측정

낙과 EtOH 추출물 중 효과가 가장 좋았던 낙과 0% EtOH 추출물을 농도별로(1, 5, 25, 50  $\mu\text{g/ml}$ ) 처리하여 Melanin 생성 저해 효과를 측정하였다. 그 결과 50 $\mu\text{g/ml}$  농도에서 37.2% 저해 효과를 나타내었다.

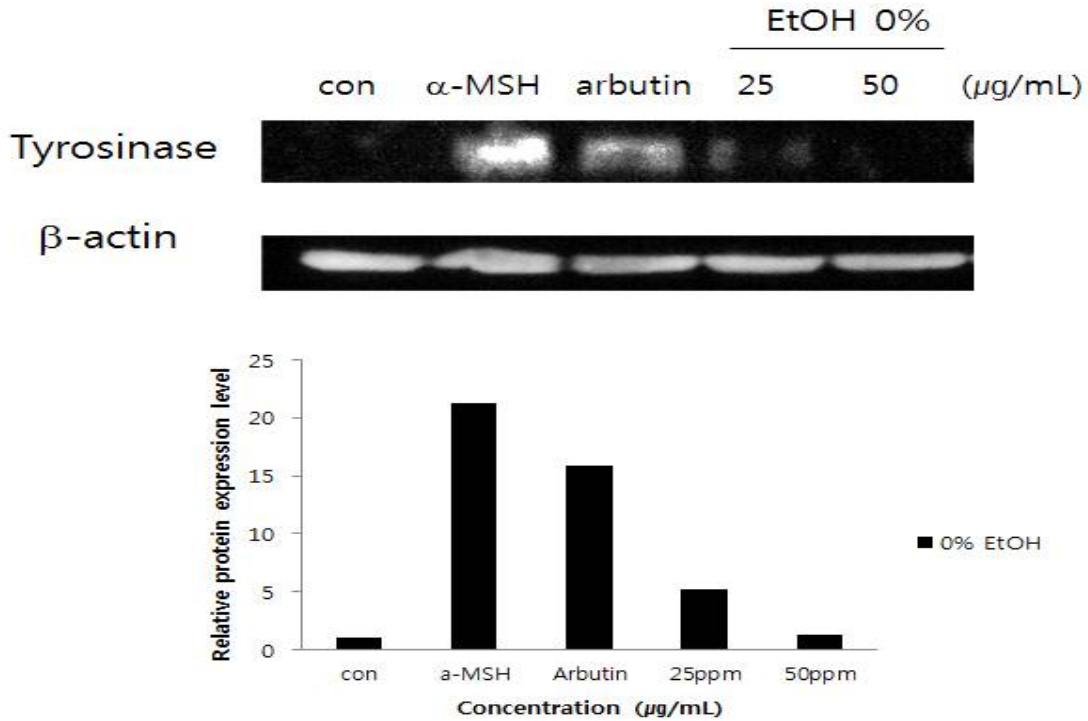


[그림14] Inhibition melanin synthesis of ethanol extracts from fallen pear pomace on B16F10 melanoma cells. The cells were incubated with fallen pears extracts for 4day in 5%  $\text{CO}_2$  incubator at 37 $^\circ\text{C}$ .

⑩ 낙과 배박 0% EtOH 추출물의 Tyrosinase 단백질 발현 저해 효과 측정

낙과 배박 0% EtOH 추출물을 25, 50 $\mu\text{g/ml}$  농도로 Melanoma 세포 내 Tyrosinase 단백질 발현량을 변화를 측정하였다. 그 결과, 낙과 배박 0% EtOH 추출물은  $\alpha$ -MSH에 의해 유도된 Tyrosinase 발현을 농도 의존적으로 억제하였다.





[그림15] Effect of fallen pear pomace ethanol extracts on the expressions of the Tyrosinase proteins in B16F10 cells.

○ 본 연구에서는 3가지 낙과 EtOH 0, 50, 100% 추출물의 미백효과를 연구하였다. 멜라닌 생성 첫 단계인 Tyrosinase 억제활성과 멜라닌 생성 저해효과를 측정한 결과, 낙과 EtOH 추출물의 미백 작용은 Tyrosinase의 활성을 직접적으로 억제하였으며, B16F10 melanoma 세포에서 α-MSH에 의한 Tyrosinase 활성화와 Melanin 생성 억제는 낙과 100% EtOH 추출물을 제외한 0%, 50% 추출물에서만 효과를 보였다. 이러한 미백 효과는 극성물질이 비극성 물질보다 더 강한 미백 효과를 나타냄을 확인하였다. 또한 세포 독성 실험에 있어서도 극성물질에 비해 비극성물질이 세포독성이 높게 나타났다. 결과적으로, 낙과 물 추출물(0% EtOH)이 세포 생존율 98.9±3.5 이상이며, B16F10 Melanoma 세포에서 Melanogenesis에 의한 Tyrosinase 형성 억제에 따른 멜라닌 합성 관련 인자 Tyrosinase, TRP1의 발현을 억제함에 따라 미백 효과가 제일 좋을 수 있었다. 미루어보아 미백제로 개발 시 일부 비극성 성분을 제거한다면 세포 독성 감소와 미백 효과를 증대화시킬 수 있을 것으로 보인다.

다. 낙과 유래 천연 Arbutin의 추출 조건 확립

(1) 실험방법

(가) 용매별 추출 조건 및 방법

동결건조하여 분말화한 시료 70g을 칭량하여, Bottle에 넣은 후 0, 25, 50, 75, 100% EtOH를 각각 20배수 투입하여 실온에서 24시간, 2회 추출하였다. 추출한 추출물은 Whatman No.1 여과지를 사용하여 감압여과하고, 농축하여 10L Freeze dry(PVTFD 10R, Ilshin lab Co. Ltd, Korea)로 동결건조하여 분말화하였다. 이 때, 동결건조 조건은 아래 Table 13.와 같다.

Table 13. Condition of Freeze dry.

Temperature(°C)	-24	-15	0	10	20	30	30
Time(min)	120	180	180	120	120	120	∞

(나) 추출온도별 추출 조건 및 방법

동결건조하여 분말화한 시료 10g을 칭량하여 Bottle에 넣은 후, 추출용매를 각각 시료의 20배수인 100ml씩 투입하여 Autoclave에서 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100°C로 2시간 추출하였다. 추출한 추출물은 Whatman No.1 여과지를 사용하여 감압여과하고, 농축하여 동결건조하여 분말화하였다.

(다) 추출시간별 추출 조건 및 방법

동결건조하여 분말화한 시료 10g을 칭량하여 Bottle에 넣은 후, 추출용매를 각각 시료의 20배수인 100ml씩 투입하여 실온에서 1, 2, 4, 6, 8, 15시간 추출하였다. 추출액은 Whatman No.1 여과지를 사용하여 감압여과하고, 농축하여 동결건조하여 분말화하였다.

(2) 실험결과

(가) 추출 용매 농도에 따른 추출 수율

추출 용매 농도에 따른 추출량과 추출 수율은 아래 Table 6.과 같았다. 수율은 50% EtOH 추출물의 수율이 70%로 가장 높았고, 50% EtOH 추출물을 기준으로 하여 EtOH의 농도가 높아지거나 낮아질수록 추출수율이 낮아지는 것을 볼 수 있었다.

Table 6. Yield of extract by EtOH contents.

	Amount of extract (g)	Yield of extract (%)
0% EtOH	35.5	50.71
25% EtOH	43.0	61.43
50% EtOH	<b>49.0</b>	<b>70.00</b>
75% EtOH	45.0	64.29
100% EtOH	35.0	50.00

(나) 추출시간에 따른 추출 수율

시료의 종류와 추출시간에 따른 추출 수율에서는 아래의 Table 7.과 같이 유의적인 차이를 확인할 수는 없었으나, 대체로 2~8 시간 추출하였을 때 추출수율이 높은 것을 확인할 수 있었다.

Table 14. Yield of extract by extract time.

Time (hr)	Amount of extract (g)				Yield of extract (%)			
	Singo	Wonhwa ng	ChuHwa ng	Hwanggu m	Singo	Wonhwa ng	ChuHwa ng	Hwanggu m
1	3.4	6.4	5.5	6.1	34	64	55	61
2	3.0	3.8	6.1	<b>7.0</b>	30	38	61	70
4	3.5	6.5	5.9	6.4	35	65	59	64
6	3.4	6.5	6.2	6.5	34	65	62	65
8	3.3	<b>7.3</b>	<b>6.3</b>	5.8	33	73	63	58
15	<b>3.7</b>	7.1	5.4	5.7	37	71	54	57

(다) 추출온도에 따른 추출 수율

품종별 추출온도에 따른 추출 수율을 나타낸 표는 Table 8.와 같다. 70℃의 추출 조건에서 대체로 높은 추출수율을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

Table 15. Yield of extract by extract temperature.

Temp (°C)	Amount of extract (g)				Yield of extract (%)			
	Singo	Wonhwa ng	ChuHwa ng	Hwangg um	Singo	Wonhwa ng	ChuHwa ng	Hwangg um
40	4.0	7.4	6.4	6.4	40	74	64	64
50	3.7	7.2	6.4	7.0	37	72	64	70
60	3.6	7.7	5.6	7.0	36	77	56	70
<b>70</b>	<b>3.9</b>	<b>8.1</b>	<b>6.6</b>	<b>7.8</b>	39	81	66	78
80	3.8	7.5	6.3	<b>7.8</b>	38	75	63	78
90	4.0	7.5	6.5	7.1	40	75	65	71
100	3.9	7.5	6.4	7.2	39	75	64	72

(라) 추출용매량에 따른 추출 수율

추출용매량에 따른 낙과(미숙과)의 추출 수율의 경우에는 추출용매량이 증가함에 따른 유의적인 차이는 확인할 수 없었으나, 30배수의 추출용매로 추출하였을 때, 가장 높은 추출 수율을 보였다.

Table 16. Yield of extract by extract solvent level.

Ratio of Solvent	Amount of extract (g)				Yield of extract (%)			
	Singo	Wonhwa ng	ChuHwa ng	Hwangg um	Singo	Wonhwa ng	ChuHwa ng	Hwangg um
1:5	2.2	5.6	4.3	4.5	22	56	43	45
1:10	3.7	7.1	6.0	5.4	37	71	60	54
1:15	3.5	7.9	6.2	6.5	35	79	62	65
1:20	3.0	3.8	6.1	7.0	30	38	61	70
1:25	1.9	7.8	6.7	7.5	19	78	67	75
<b>1:30</b>	<b>4.2</b>	<b>8.2</b>	<b>7.2</b>	<b>7.3</b>	42	82	72	73

이상의 낙과 추출조건에 따른 추출 수율을 확인해 본 결과, 50% EtOH 30배수를 추출용매로 하여 70°C의 온도조건에서 6~8시간 추출하였을 때 가장 많은 추출물을 수득할 수 있을 것으로 사료된다.

■ 피부 청결 개선능 이너뷰티용 소재 추출 조건 및 공정 확립 ■

(1) 실험방법

(가) 피부 청결 개선능 이너뷰티용 소재 추출 조건 확립

① 석세포 추출 조건

낙과의 석세포를 분리하기 위하여 과실 적도 부근의 생체 시료 10g을 취하여 95% CH<sub>3</sub>OH 35ml에 담아 균질기를 이용하여 균질화 한 후, Whatman No.1 여과지를 이용하여 감압여과하여 당 성분을 제거한다. 그 잔사는 다시 1N HCl 25ml를 넣고 30분간 교반기를 이용하여 진탕 후, 다시 감압여과하여 남은 당 성분을 제거한다. 나머지 잔사는 1N NaOH 25ml를 넣고 30분간 교반한 후 여과하여 단백질을 제거하고 그 잔사를 40℃의 항온기에서 건조시킨 후, 석세포 함량을 측정한다.

② 낙과(미숙과) 용매조건별 추출

낙과 및 미숙과 원료를 각각 20배수의 0, 25, 50, 75, 100% EtOH로 16시간 추출하여 Whatman No.1 여과지로 감압여과하여 여과된 추출액을 농축 후, 동결건조하여 분말화 하였다.

③ 석세포의 용매조건별 추출

배 착즙박 유래 석세포에 각각 20배수의 0, 25, 50, 75, 100% EtOH로 16시간 추출하여 Whatman No.1 여과지로 감압여과하여 여과된 추출액을 농축 후, 동결건조하여 분말화 하였다.

④ 추출 수율의 표기

각 추출 조건별 추출물의 추출 수율은 추출 전 시료 건조물의 중량에 대비 각 추출 방법에 의해 생성된 추출 용액을 동결건조하여 분말화 된 건조물의 중량에 대한 백분율로 나타내었다.

$$\text{출수율 \% (w/w)} = \frac{\text{추출액 건조물의 중량}}{\text{원료 건조물의 중량}} \times 100$$

(나) 피부청결 개선능 이너뷰티용 소재 추출 공정 확립

① 배박 수분 정량

배박의 건조 전 수분량을 측정하기 위해 배박 시료 10g을 정밀하게 칭량하여 미리 칭량하여 가열해 놓은 건조 수기에 담아 105℃ 항온건조기에서 3~5시간 건조한 다음, 데시게이터에서 30분간 방냉하여 중량을 측정하였다. 본 실험은 3회 반복하여 실시하였다.

$$\text{분 } (\%) = \frac{A+B-C}{\text{시료}} \times 100$$

A : 시료의 중량

B : 건조 전 수기의 중량

C : 건조 후 시료와 수기의 중량의 합

② 낙과, 미숙과, 배박 유래 석세포 추출 수율 확인

㉠ 낙과, 미숙과를 이용한 석세포 추출 수율

낙과, 미숙과 유래 석세포의 추출 수율을 확인하기 위하여 낙과, 미숙과 동결건조 분말 100g을 칭량하여 용기에 담아 EtOH 3.5L를 투입하여 1시간 가량 교반한 후, Whatman No.1 여과지로 감압여과하여 잔사를 수득한 후, 다시 1N HCl 2.5L를 투입하여 1시간 교반 후, 감압여과하여 잔사를 수득하였다. 수득한 잔사에 1N NaOH를 2.5L 투입하여 1시간 가량 교반하여 이를 감압여과하여 최종잔사를 수득한 후에 최종잔사를 증류수로 수차례 세척하여 이를 다시 감압여과, 건조하여 얻어진 석세포를 칭량하여 석세포의 추출 수율을 확인하였다.

㉡ 배박을 이용한 석세포 추출 수율

배박을 이용한 석세포의 추출 수율을 확인하기 위하여 배박 동결건조 분말 100g을 칭량하여 용기에 담아 EtOH 3.5L를 투입하여 1시간 가량 교반한 후, Whatman No.1 여과지로 감압여과하여 잔사를 수득한 후, 다시 1N HCl 2.5L를 투입하여 1시간 교반 후, 감압여과하여 잔사를 수득하였다. 수득한 잔사에 1N NaOH를 2.5L 투입하여 1시간가량 교반하여 이를 감압여과하여 최종잔사를 수득한 후에 최종잔사를 증류수로 수차례 세척하여 이를 다시 감압여과, 건조하여 얻어진 석세포를 칭량하여 석세포의 추출 수율을 확인하였다.

③ 배박을 이용한 석세포 대량 추출

배박에서 석세포를 추출하기 위해 배박 건조 분말을 칭량하여 용기에 담고 95% EtOH 3.5배수를 용기 내로 투입하여 1시간 가량 교반기를 이용하여 잘 섞어준 후, 부직포를 사용하여 여과작업을 통해 배박 내의 당 성분을 제거하였다. 여과 후, 남은 잔사에 다시 1N HCl 2.5배수를 투입하고 교반기로 1시간 가량 잘 섞어준 다음 부직포로 잔사를 수득하고,

배박 내의 잔여 당 성분을 제거하였다. 다시, 남은 잔사에 1N NaOH 2.5배수를 투입하여 1시간 가량 교반기로 다시 잘 섞어준 다음, 부직포로 잔사를 회수하여 배박 내의 단백질 성분을 제거하고 부직포로 회수한 잔사를 증류수로 1차 세척한 후, 1N HCl로 적정하여 다시 수차례 증류수로 세척하여 여과한 후, 최종 잔사를 40℃ 항온건조기에서 건조하여 분쇄하였다.

Table 17. 석세포의 대량 추출 공정.

		
EtOH를 통한 당성분제거	여과포를 이용한 1차 여과	1차 여과 후, 잔사물에서 1N HCl을 통한 잔여 당성분 제거
		
여과포를 이용한 2차 여과	2차 여과 후, 잔사물에서 1N NaOH를 통한 단백질 성분 제거	여과포를 이용한 3차 여과
		
3차 여과 후, 잔사물에	세척한 잔사물(석세포)을	건조된 석세포를 분쇄하여

잔여성분을 증류수를 통하여  
제거 및 세척

40°C 에서 건조

최종 석세포 분말을 제조

④ 유용성분 분석(Arbutin 함량 분석)

㉠ 품종별 낙과(미숙과) 추출물 제조

1차년도에 낙과(미숙과)를 품종별로 추황(C), 황금(H), 신고(H), 원황(W)으로 나누어 각각 추출 용매량, 추출온도, 추출시간의 추출조건 변화에 따른 Albutin 함량을 분석하였다. 그 결과를 바탕으로 하여 높은 함량을 보인 5, 10, 15배수의 추출용매량, 90 또는 100°C의 추출온도를 추출조건으로 선정하여 해당되는 추출조건으로 추가 추출을 진행하였다.

\*. Description of Samples

Wonhwang (W)	Singo (S)	Chuhwang (C)	Hwanggum (H)
W-① 추출용매량(1:5)	S-① 추출용매량(1:5)	C-① 추출용매량(1:5)	H-① 추출용매량(1:5)
W-② 추출용매량(1:10)	S-② 추출용매량(1:10)	C-② 추출용매량(1:10)	H-② 추출용매량(1:10)
W-③ 추출용매량(1:15)	S-③ 추출용매량(1:15)	C-③ 추출용매량(1:15)	H-③ 추출용매량(1:15)
W-④ 추출온도(90°C)	S-④ 추출온도(90°C)	C-④ 추출온도(90°C)	H-④ 추출온도(90°C)
W-⑤ 추출온도(100°C)	S-⑤ 추출온도(100°C)	C-⑤ 추출온도(100°C)	H-⑤ 추출온도(100°C)

㉡ HPLC를 이용한 유용성분 분석

○ 재료 및 시약

본 실험에서 사용된 Caffeic acid 및 Chlorogenic acid 표준품은 Sigma사(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)의 것을 사용하였다. 실험에 사용된 모든 용매들은 특급으로 Wako (Wako Pure Chemical Industries., Osaka, Japan)로부터 구입하였다. 추출물은 50mg/mL의 최종농도가 되도록 메탄올에 녹였으며 HPLC 분석 전 필터 여과한 여액을 시료로 사용하였으며, 모든 분석은 3회 반복 실험하였다.

○ 표준용액의 조제

검량선 작성을 위해 표준품은 Methanol에 녹여 1mg/ml가 되도록 표준 원액을 제조한 후 단계적으로 희석하여 6.25µg/ml, 12.5µg/ml, 25.0µg/ml, 50.0µg/ml, 100.0µg/ml로 조제하



였다. 표준품의 함량을 구하기 위하여 표준용액의 크로마토그램에서 얻은 피크의 농도별 면적에 대하여 검량선을 작성하였다.

○ HPLC 분석

배박 추출물의 Caffeic acid 및 Chlorogenic acid 분석을 위한 HPLC 분석 조건은 Table 11.에 요약하였다. HPLC 분석에서 칼럼은 Capcellpak-C18(4.6 × 250mm, 5µm, Shiseido Co, Ltd, Tokyo, Japan)를 사용하였고, HPLC 장비는 Pump, Autosampler, Column oven, photodiode array UV/VIS detector (Waters HPLC system, Millford, MA, USA)를 사용하였고, 데이터 수집 및 처리를 위해 Empower software program을 사용하였다. A 용매는 0.2% Acetic acid, B 용매는 Methanol을 사용하였으며 모든 용매는 사용 전 탈기 및 필터로 여과 후 사용하였다. Column의 유속은 0.8ml/min이었으며 분석시간은 0에서 5분까지 이동상 A를 75%로 용리 하였고, 5분에서 10분까지 이동상 B를 50%로 증가시켰다 이후 14분까지 이동상 A를 75%로 내려 초기 용매 조건으로 조정하였다. UV는 330nm 파장에서 측정하였으며, 시료는 10µl를 주입하였다.

Table 18. Analytical conditions of HPLC for analysis of caffeic acid and chlorogenic

Parameters	Conditions		
Column	Capcellpak-C18 (C18, 4.6 X 250mm, 5µm)		
Flow rate	0.8ml/min		
Injection volume	10µl		
UV detection	330nm		
Run time	15min		
	Time (min)	% A <sup>1)</sup>	% B <sup>2)</sup>
	0	75	25
Gradient	5	75	25
	10	50	50
	14	75	25
	15	75	25

1) 0.2% Acetic acid 2) Methanol acid.

○ 시험방법의 검증(Method validation)

배박 추출물의 분석법 확립을 위한 벨리데이션은 ‘의약품등 분석법의 벨리데이션 가이드라인(식품의약품 안전처)’ 를 참고하여 수행되었다.

- 특이성(Specificity)

Caffeic acid 및 Chlorogenic acid 혼합용액과 전 처리한 배박 추출물 분말을 HPLC로 분석하여 크로마토그램상의 Retention time과 Spectrum을 비교하였다.

- 직선성(Linearity)

Caffeic acid 및 Chlorogenic acid 혼합용액 1mg/ml를 조제하여 Methanol로 순차적으로 희석하여 6.25~100  $\mu$ g/ml의 시료를 HPLC로 분석한 후 농도에 대한 면적에 대하여 검량선을 작성하고,  $R^2$ 값을 확인하였다. 최저정량한계(LOQ, Limit of quantitation)는 신호 대 잡음비(Signal to noise, S/N)값이 3.3일 때로, 검출한계(LOD, Limit of detection)는 S/N 비율이 10일 때로 계산하였다.

- 정확성(Accuracy)

정확성은 일내분석(Intra-day)과 일간분석(Inter-day)의 변이성을 측정하였다. 표준용액은 Caffeic acid 및 Chlorogenic acid를 12.5  $\mu$ g/ml, 25  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml로 혼합 조제하여 일내분석(Intraday)과 일간분석(Inter-day)에서 HPLC 분석의 재현성을 확인하였다. 정확성은 조제한 세 농도의 표준품을 3회 반복 측정하여 결과값이 참값에 근접한 정도를 백분율로 나타내었다. Intra-day의 정확성은 하루 동안 표준용액을 1일 3구간에서 분석하였으며 Inter-day의 정확성은 Intra-day의 과정을 3일 동안 반복하여 그 변이성을 측정하였다. 각 시험은 구간마다 3농도 3회 반복하여 HPLC로 분석하였다.

- 정밀성 및 회수율(Precision and recovery)

정밀성은 12.5  $\mu$ g/ml, 25  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml 농도의 표준용액을 각각 6회 반복하여 상대 표준편차를 측정하였다. 상대표준편차(Relative standard deviation, RSD)는 표준편차를 평균으로 나누어 백분율로 계산하였다. 회수율은 3농도 표준용액을 6반복 시험 후 얻은 면적을 표준용액의 면적과 비교하여 회수율을 구하였다.

○ 배박 추출물 내에서의 Caffeic acid 및 Chlorogenic acid 분석

배박 추출물은 50mg/ml이 되도록 전 처리하고 0.45  $\mu$ m Syringe filter로 여과하여 시험용액으로 사용하였다. 각 시료는 3회 반복 분석하였다. 표준용액의 크로마토그램의 피크 면적을 통하여 작성된 검량선에 의해 배박 추출물 시료 중 Caffeic acid 및 Chlorogenic acid의 농도를 산출하였다.

○ 배박에서의 Caffeic acid 및 Chlorogenic acid 추출 조건 확인

배박의 추출방법은 EtOH 농도를 달리한 조건에 따른 추출특성을 분석하였다. 농도에 따른 추출특성 시험은 저온에서 2일 동안 에탄올 농도 0, 25, 50, 75, 100%에서 2회 추출 하였으며, 이 때 얻어진 각 추출물은 농축 및 동결 건조시켜 분말화 하였다. 분말화 된 시료는 전술한 HPLC 방법으로 분석하였다.

(2) 실험결과

(가) 피부청결 개선능 이너뷰티용 소재 추출 조건 확립

○ 낙과, 미숙과 및 배박 유래 석세포의 용매조건별 추출

낙과, 미숙과, 배박 유래 석세포의 EtOH 농도에 따른 추출 수율은 Table 12.와 같았다. 미숙과에 비하여 낙과의 추출 수율에 각 EtOH 농도마다 높은 것을 확인 할 수 있었으며, 석세포의 추출수율은 1.2~9.9%로 낮은 추출 수율을 보였다.

Table 19. 낙과, 미숙과, 배박 유래 석세포의 용매조건별 추출량 및 추출수율

시료명	추출 조건	시료량	추출량	추출수율
F1	미숙과 0% EtOH	300g	86g	29.3%
F2	미숙과 50% EtOH	300g	75g	25.0%
F7	미숙과 100% EtOH	100g	8g	8.0%
F8	미숙과 25% EtOH	100g	24g	24.0%
F9	미숙과 75% EtOH	100g	31g	31.0%
F3	낙과 0% EtOH	2,000g	1,488g	74.4%
F4	낙과 50% EtOH	2,000g	1,207g	60.4%
F10	낙과 100% EtOH	100g	11g	11.0%
F11	낙과 25% EtOH	100g	29g	29.0%
F12	낙과 75% EtOH	100g	33g	33.0%
F5	배박 유래 석세포 0% EtOH	2,700g	267g	9.9%
F6	배박 유래 석세포 50% EtOH	3,500g	182g	5.2%
F13	배박 유래 석세포 100% EtOH	390g	3.5g	1.2%
F14	배박 유래 석세포 25% EtOH	250g	14.5g	5.8%
F15	배박 유래 석세포 75% EtOH	250g	12g	4.8%

(나) 피부 청결 개선능 이너뷰티용 소재 추출 공정 확립

① 배박 수분 정량

배박 원료의 수분 함량을 측정해 본 결과는 아래 Table 13.과 같다. 3회 반복하여 배 착즙박의 수분 함량을 측정한 결과는 약 77.343%로 배박 원료에서는 높은 수분 함량을 보였다.

Table 20. Water content of pear pomace.

	1차	2차	3차
시료량 (A)	10.01g	10.00g	10.00g
건조 전 수기 무게 (B)	12.4043g	12.4926g	12.3798g
건조 전 시료+수기 무게 (A+B)	22.4143g	22.4926g	22.3798g
건조 후 수기 무게 (C)	14.6455g	14.7301g	14.7004g
수분 함량	77.610%	77.625%	76.794%
평균 수분 함량	77.343±0.005%		

② 낙과, 미숙과, 배박 유래 석세포 추출 수율 확인

㉠ 낙과, 미숙과를 이용한 석세포 추출 수율

낙과, 미숙과를 이용한 석세포 추출량 및 수율은 아래 Table 14.와 같았다. 낙과 유래 석세포 추출 수율은 7.78% 였고, 미숙과 유래 석세포 추출 수율은 44.51%로 낙과에 비하여 미숙과의 석세포 추출 수율이 크게 높은 것을 확인할 수 있었다.

Table 21. Extraction yield and weight of stone cells by pears.

		중량 및 수율
낙과	시료량 (g)	2,018
	석세포 추출량 (g)	157
	추출 수율 (%)	7.78
미숙과	시료량 (g)	2,579
	석세포 추출량 (g)	1,148
	추출 수율 (%)	44.51

㉡ 배박을 이용한 석세포 추출 수율

배박 원물을 원료로 하여 석세포를 추출한 결과는 다음과 같았다. 배박의 석세포 추출 수율은 10.0~11.25%의 추출 수율을 보였고, 이로부터 배박을 사용한 석세포 추출 수율은 약 10.58%인 것을 확인할 수 있었다.

Table 22. Extraction yield and weight of stone cells by pear pomace.

	1차	2차	3차
시료량	200g	200g	200g
석세포 추출량	22.5g	20.0g	21.0g
추출 수율	11.25%	10.00%	10.50%
평균 추출 수율	10.58±0.006%		

		회수	분말화
배박 유래 석세포 추출물	1차		
	2차		
	3차		

③ 배박을 이용한 석세포 대량 추출

배박 유래 석세포 대량 추출량 및 수율은 아래 Table 16.과 같았다. 총 3회에 걸쳐서 대량 추출하여 얻어진 추출 수율은 49.50~55.77% 였고, 평균 석세포 추출 수율은 53.07%이

다.

Table 23. Extraction yield and weight of stone cells by pear pomace.

		1차 추출	2차 추출	3차 추출
배박	시료량	10,000g	6,000g	4,124g
	석세포 추출량	4,950g	3,236g	2,300g
	추출 수율	49.50%	53.93%	55.77%
평균 추출 수율		53.07±0.03%		

④ 유용성분 분석(Arbutin 함량 분석)

㉠ 품종별 낙과(미숙과) 추출물 제조

낙과 품종별, 추출조건별 추출량 및 추출 수율 결과는 아래와 Table 17.과 같다. 용매량에 따른 추출 수율은 대체로 원황이 추출 수율이 높았으며, 추출온도에 따른 추출 수율은 90℃ 추출시에는 원황이, 100℃ 추출시에는 신고가 다른 품종에 비하여 상대적으로 추출 수율이 높았다.

Table 24. 품종별 낙과 추출물의 추출량 및 추출 수율

	Wonhwang (W)		Singo (S)		Chuhwang (C)		Hwanggum (H)	
	추출량 (g)	추출수율 (%)	추출량 (g)	추출수율 (%)	추출량 (g)	추출수율 (%)	추출량 (g)	추출수율 (%)
용매량 (1:5)	6.0	60	5.5	55	4.5	45	4.0	40
용매량 (1:10)	6.5	65	6.5	65	6.0	60	5.5	55
용매량 (1:15)	7.0	70	7.0	70	6.5	65	6.5	65
추출온도 (90℃)	32.5	65	17.0	34	28.5	57	15.0	30
추출온도 (100℃)	15.5	31	29.5	59	13.0	26	14.5	29

㉡ HPLC를 이용한 유용성분 분석

- 배 품종별 유용성분 함량

배의 품종별 추출물의 유용성분 함량을 분석한 결과는 아래와 같다. Arbutin의 함량의 경우추황이 1.511~1.806mg/g으로 가장 높은 함량을 보였고, 신고도 1.034~1.306mg/g으로 비교적 높은 Albutin 함량을 보였다. Caffeic acid는 오직 추황 추출물에서만 0.0156~0.0231 mg/g의 함량을 보였고, 다른 품종의 추출물에서는 확인할 수 없었다. 그리고 Chlorogenic acid의 함량은 추황과 신고에서만 확인할 수 있었으며, 추황에서의 Chlorogenic acid 함량은 0.8703~1.6003mg/g, 신고에서는 0.2253 ~ 0.8324mg/g의 함량을 보였다. 이로 보아 추황이 다른 품종에 비하여 유용성분의 함량이 가장 높은 것을 확인 할 수 있었다. 하지만 품종별 배 재배량을 고려하였을 때, 신고의 유용성분 함량이 타 품종에 비해 높은편이라는 부분이 고무적이라고 할 수 있겠다.

Table 25. 배 품종에 따른 유용성분의 함량 분석.

	Arbutin Content (mg/g)	Caffeic acid (mg/g)	Chlorogenic acid (mg/g)
C1	1.806±0.029	0.0156±0.0051	0.8703±0.0084
C2	1.699±0.026	0.0168±0.0054	1.1118±0.0084
C3	1.573±0.003	0.0180±0.0050	1.1897±0.0083
C12	1.511±0.019	0.0220±0.0052	1.6003±0.0084
C13	1.581±0.005	0.0231±0.0052	1.5838±0.0079
H1	0.610±0.001	-	-
H2	0.627±0.002	-	-
H3	0.776±0.001	-	-
H12	0.654±0.002	-	-
H13	0.686±0.002	-	-
S1	1.034±0.019	-	0.4399±0.0086
S2	1.082±0.002	-	0.5106±0.0080
S3	1.301±0.012	-	0.2253±0.0087
S12	1.306±0.006	-	0.8324±0.0081
S13	1.121±0.002	-	0.4814±0.0096
W1	0.485±0.003	-	-
W2	0.445±0.000	-	-
W3	0.449±0.002	-	-
W12	0.615±0.004	-	-

W13

0.623±0.035

-

-

C : Chuhwang, H : Hwanggum, S : Singo, W : Wonhwang

1 : 5배수의 추출용매, 2 : 10배수의 추출용매, 3 : 15배수의 추출용매

12 : 90도의 추출온도, 13 : 100도의 추출온도

## ○ 배 추출조건별 유용성분 함량

배 낙과, 미숙과의 EtOH 농도에 따른 유용성분의 함량을 분석한 결과는 다음과 같았다. Arbutin, Chlorogenic acid의 함량 모두 미숙과 100% EtOH 추출물에서 각각 140.444mg/g, 289.5748mg/g의 높은 함량을 보였고, 대체로 낙과에 비해 미숙과에서 높은 Arbutin 함량을 보였다. 이로부터 낙과에 비해서는 미숙과, 그리고 미숙과의 추출조건 중에서도 100% EtOH 추출물에서 높은 유용성분 함량을 보이는 것을 확인할 수 있었다. Caffeic acid의 경우에는 추출물들에서 함량을 찾을 수 없었고, Chlorogenic acid의 함량의 경우에는 미숙과에서는 0, 50, 100% EtOH 추출물에서 각각 3.7061~289.5748mg/g의 함량을 보였고, 낙과에서는 미숙과와는 대조적으로 25, 75% EtOH 추출물에서만 0.2978~1.4256mg/g의 함량을 보였다.

Table 26. 추출조건에 따른 배 유용성분 함량 분석

	Arbutin Content (mg/g)	Caffeic acid (mg/g)	Chlorogenic acid (mg/g)
F1	27.216±0.789	-	3.7061±0.0096
F2	64.538±0.817	-	4.4862±0.0106
F4	0.776±0.046	-	-
F7	140.444±1.308	-	289.5748±0.1142
F8	48.864±1.870	-	-
F9	70.765±0.575	-	-
F10	2.269±0.382	-	-
F11	-	-	0.2978±0.0092
F12	0.927±0.001	-	1.4256±0.0098



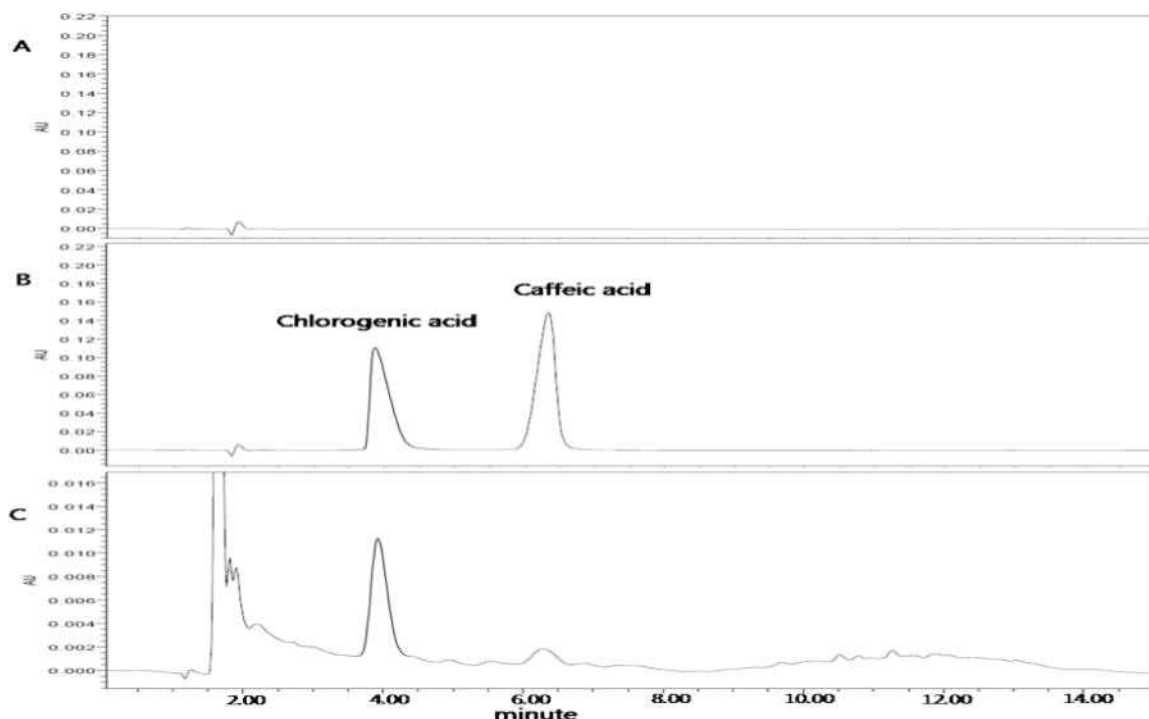
- F1 : 미숙과 0% EtOH 추출물
- F2 : 미숙과 50% EtOH 추출물
- F4 : 낙과 50% EtOH 추출물
- F7 : 미숙과 100% EtOH 추출물
- F8 : 미숙과 25% EtOH 추출물
- F9 : 미숙과 75% EtOH 추출물
- F10 : 낙과 100% EtOH 추출물
- F11 : 낙과 25% EtOH 추출물
- F12 : 낙과 75% EtOH 추출물

○ 배박의 추출조건별 유용성분 함량 분석법 밸리데이션

- 특이성 확인(Specificity)

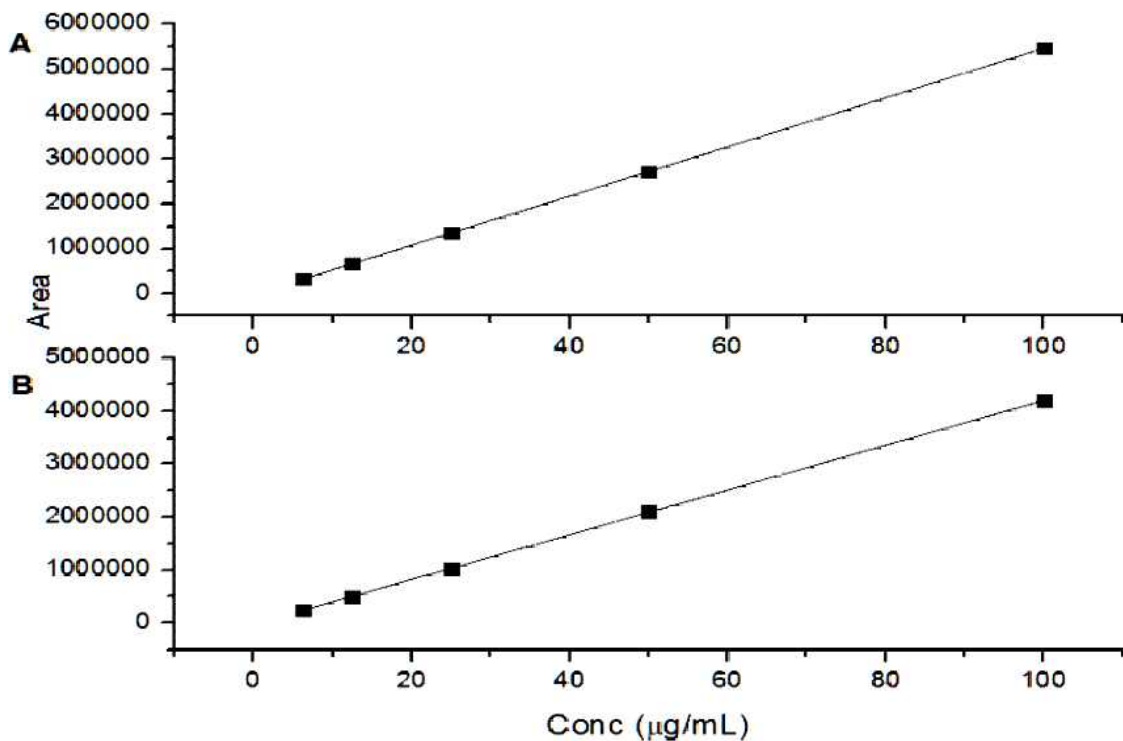
특이성 시험을 통해 표준품들이 다른 물질과의 간섭 없이 성분이 분리되는지 확인하였다. 표준용액과 시료 전처리 방법으로 처리한 배박 추출물의 크로마토그램을 비교하여 표준품 Peak가 분리되는지를 확인한 결과, Figure 13.과 같이 다른 물질과 간섭 없이 성분이 분리되었으며 표준용액의 피크유지시간과 배박 추출물의 피크 유지시간이 일치하였다. 본 분석방법이 부 원료에 영향을 받는지 검토하기 위해 유당, 미결정셀룰로오스가 포함된 시험액을 조제하여 분석한 결과, 본 HPLC 분석법에서는 표준품의 검출에 아무 영향을 미치지 않았다(Data not shown).

[그림16] Chromatogram of (A) blank, (B) caffeic acid and chlorogenic acid standard solution and (C) PPE



- 직선성(Linearity), 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

6.25~100  $\mu\text{g/ml}$ 의 단계적으로 희석한 Caffeic acid, Chlorogenic acid 표준용액을 HPLC로 분석하여 검량선을 작성하였으며 Figure 13.과 같은 검량선을 나타내었다. Caffeic acid 및 Chlorogenic acid의 검량선의 상관계수( $R^2$ )는 0.9999로 높은 직선성을 보였으며, 검출한계는 1.61  $\mu\text{g/ml}$ , 1.14  $\mu\text{g/ml}$ , 정량한계는 4.9  $\mu\text{g/ml}$ , 3.5  $\mu\text{g/ml}$  수준으로 나타났다. 본 연구는 배박 추출물의 표준화를 위해 설정된 지표성분의 분석을 위한 검출한계와 정량한계를 검증한 것으로 충분히 본 연구에서의 활용이 가능할 것으로 사료된다.



[그림17] Calibration curve of (A) caffeic acid and (B) chlorogenic acid standard solution.

- 정확성(Accuracy), 정밀성(Precision) 및 회수율(Recovery)

정확성 결과는 Table 20.과 같이 Caffeic acid 및 Chlorogenic acid의 Intra-day 분석에서는  $96.27 \pm 3.10 \sim 97.97 \pm 2.83\%$ ,  $94.52 \pm 3.04 \sim 97.38 \pm 2.30\%$ 로, Inter-day 분석에서는  $96.05 \pm 1.72 \sim 99.02 \pm 3.06\%$ ,  $95.54 \pm 0.60 \sim 97.02 \pm 2.99\%$ 를 보였다. 정밀성은 세 농도를 각각 6반복 후 RSD값을 분석하였으며, 회수율은 세 농도를 6반복 후 얻은 시료 면적을 검량선에 근거하여 회수되는 시료량을 백분율로 계산하였다. Table 21.과 같이 Caffeic acid 및 Chlorogenic acid 표준품의 회수율은 93.66~106.32%, 97.33~105.68% 이었으며, RSD는 3.16%, 2.84% 이내로 나왔다. 농도별로 12.5  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 93.66%, 97.33%, 25  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 102.41%, 103.61%, 50  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 106.32%, 105.68%의 회수율을 보였다. 지표성분으로써 Caffeic a

cid 및 Chlorogenic acid에 대한 분석방법 벨리데이션에 대한 보고는 Pellati 등(10)의 연구에서 확인할 수 있었다. Pellati 등(10)은 Caffeic acid 및 Chlorogenic acid 분석법에 대한 연구에서 R<sup>2</sup>은 0.9999 이상으로 각각 98.95~102.82, 96.59~103.83%의 회수율을 얻었으며 RSD는 2%, 3%이내로 보고하였다. Pellati 등 이 보고한 검출한계, 정량한계 및 회수율은 본 연구 결과와 유사하였다. 그러나, Retention time의 경우 Chlorogenic acid는 3.01분, Caffeic acid는 4.03분으로 보고하였다. 본 연구에서는 Chlorogenic acid의 Retention time은 4분이었으며, Caffeic acid의 Retention time은 6.5분으로 Pellati 등의 보고보다는 다소 느린 Retention time을 보였다. 본 연구진의 분석에 사용된 배박 추출물의 경우 분석시작 3분 이내에서 다수의 물질이 용출되는 것으로 보아 Caffeic acid 및 Chlorogenic acid 독립적인 분석은 Retention time을 4분 이후로 설정하는 것이 효율적으로 생각되었다.

Table 27. Intra-and inter-day accuracy of caffeic acid and chlorogenic acid.

	Nominal (conc, $\mu$ g/ml)	Caffeic acid				Chlorogenic acid			
		Mean measured concentration ( $\mu$ g/ml)	Accuracy (%)	RSD (%)		Nominal (conc, $\mu$ g/ml)	Mean measured concentration ( $\mu$ g/ml)	Accuracy (%)	RSD (%)
Intra -day	12.5	12.24	97.90	1.86	Intra- day	12.5	12.17	97.38	2.30
	25	24.06	96.27	3.10		25	23.63	94.52	3.04
	50	48.98	97.97	2.83		50	47.87	95.79	2.94
Inter -day	12.5	12.01	96.05	1.72	Inter- day	12.5	11.94	95.54	0.60
	25	24.57	98.29	4.06		25	24.08	96.35	3.77
	50	49.51	99.02	3.06		50	48.51	97.02	2.99

Table 28. Precision of caffeic acid and chlorogenic acid.

Nominal concentration (ug/ml)	Mean measured concentration (ug/ml)	SD	Recovery (%)	RSD (%)
Caffeic acid				
12.5	11.66	3.09	93.66	3.16
25	25.59	0.56	102.41	0.53
50	53.16	0.44	106.32	0.41
Nominal concentration (ug/ml)	Mean measured concentration (ug/ml)	SD	Recovery (%)	RSD (%)
Chlorogenic acid				
12.5	12.16	2.71	97.33	2.84
25	25.90	0.55	103.61	0.54
50	52.84	0.51	105.68	0.49

○ 배박 추출물 내에서의 Caffeic acid 및 Chlorogenic acid의 함량

- 본 시험법의 검증과정을 통하여 Caffeic acid 및 Chlorogenic acid에 대한 상기 HPLC 분석법이 배박 추출물내의 Caffeic acid 및 Chlorogenic acid의 정량에 이용될 수 있는 충분한 감도, 특이성, 직선성, 정확성 및 정밀성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

- 배박을 100% 물로 추출 했을 때 Caffeic acid 및 Chlorogenic acid는 각각 0.18mg/g, 0.17mg/g로써 약 1:1의 비율로 추출이 되었다. 그러나 EtOH 투입비가 높을수록 Chlorogenic acid는 0.5mg/g까지 추출률이 향상했으나, Caffeic acid는 추출률이 감소되었다(Table 22.). 서론에서 기술한 바와 같이 Caffeic acid 및 Chlorogenic acid는 콜레스테롤 흡수 저하 등과 관련이 있어 배박 추출물의 기능성 소재 개발 가능성이 높은 것으로 기대된다. 특히 배박의 용매 추출시 에탄올 투입 비율에 따른 두 성분의 추출 패턴이 달라지는 특성이 있어, 추후 용매 종류, 온도, 추출시간에 따른 Caffeic acid 및 Chlorogenic acid 추출 비율을 도출하고, 생산 공정 적용가능성을 타진한다면 유효성분이 Caffeic acid 및 Chlorogenic acid로 규격화 된 기능성 소재개발에 도움이 될 것으로 사료된다.

Table 29. Content of caffeic acid and chlorogenic acid extracted by different solvent ratio (H2O/Ethanol, V/V). Each values was the mean±SD.

Ethanol (v/v,%)	Caffeic acid (mg/g)	Chlorogenic acid (mg/g)
-----------------	---------------------	-------------------------

0	0.18±0.01	0.17±0.012
25	0.16±0.02	0.36±0.013
50	-	0.37±0.011
75	-	0.49±0.008
100	-	0.50±0.007

다. 피부 청결 및 피부 건강 개선능 이너뷰티 소재의 제형 연구 및 식품학적 가공적성 규명

(1) 실험방법

(가) 석세포 추출 용매의 변화

배박 유래 석세포 추출의 식품학적 가공적성 비교를 위하여 기존의 석세포 추출시 사용되어지는 EtOH를 대신하여 발효주정을 사용하였고, 당과 단백질 제거시약으로 사용되어지는 1N HCl과 1N NaOH를 대신 동량의 다른 산과 염기를 선정하여 석세포를 추출하였다.

- ① 발효주정, 1N HCl, 1N NaOH
- ② 발효주정, 1N 초산, 1N 탄산수소나트륨(중조)
- ③ 발효주정, 1N 무수구연산, 1N 탄산수소나트륨(중조)

(나) 원료의 건조방법에 따른 석세포 추출

배박 동결건조물과 배박 열풍건조물을 각각 석세포 추출 공정에 따라 석세포를 추출하였다.

(다) 피부청결 개선능 이너뷰티용 소재의 제형 연구

- ① 소재 가공적성을 규명하고자 제형화 실험을 통하여 제품 각 유통체인에 따라 다양화 작업을 한다. 건강기능식품의 제형화 실험을 위하여 1차적으로 선별된 소재의 물리, 화학적 특성을 파악한 후 분말, 정제, 과립, 경질, 연질캡셀 적용성을 검토한다.
- ② 검토된 결과로 1차 제형을 결정하고 2차 관능 Test를 통하여 츠어블, 코팅 등의 섭취방법을 결정한다.
- ③ 각종 부 원료를 첨가하여 색감과 질감, 기능성을 향상 시키는 2차 제형화 실험을 실시하여 경도, 붕해도, 마손도, 섭취량, 섭취방법 등을 최종적으로 결정한다.

④ 영양성분 분석 및 미생물학적 분석

추출용매별로 추출한 석세포와 원료의 건조방법에 따라 추출한 석세포의 일반성분을 각각 분석하였다.

㉠ 수분

○ 기구 : 칭량접시, 105℃ 건조기

○ 조작법

- 칭량접시를 미리 가열하여 항량 측정
- 검체를 정밀히 칭량 → 건조기에 넣어 3~5시간 건조
- 데시케이터 중에서 약 30분간 방냉 → 무게 측정
- 다시 칭량접시를 1~2시간 건조하여 항량이 될 때까지 같은 조작을 반복

○ 계산

$$\text{분 \%} = \frac{b-c}{b-a} \times 100$$

a : 칭량접시의 무게 (g)

b : 칭량접시와 검체의 무게(g)

c : 건조 후 항량이 되었을 때의 무게(g)

㉡ 회분

○ 회화용기의 항량

- 깨끗한 도가니를 550℃ 회화로에서 여러 시간 가열.
- 데시게이터에 옮겨 실온으로 식힌 다음 항량을 측정.

○ 회화

- 검체를 도가니에 정밀히 달아 넣는다.
- 가열판에서 예비탄화를 한다.(약 4시간)
- 600℃ 회화로에 넣어 백색~회백색의 회분이 얻어질 때까지 회화시킨다.
- 가열을 그치고 온도가 200℃로 되도록 그대로 식힌다.
- 유리 데시게이터에 옮겨 식힌 후 칭량한다.

○ 계산

$$\text{분 } (\%) = \frac{W - W_0}{S} \times 100$$

$W_0$  : 항량이 된 회화 용기의 무게(g)

$W_1$  : 회화 후의 회화 용기와 회분의 무게(g)

$S$  : 검체의 채취량(g)

㉔ 조지방

○ 수기의 항량

- 수기는 105°C 건조기에서 항량.  
→ 데시케이터에 옮겨 실온으로 식힌 다음 무게를 측정.

○ 시료

- 검체 약 2~10g을 달아 원통 여과지에 넣고 검체 위에 탈지면을 가볍게 충전.
- 105°C의 건조기에서 2시간 정도 건조 → 데시케이터에서 방냉.

○ 시험조작 (속실렛 추출장치 : DET. GRAS N)

- 원통여과지를 속실렛 추출장치에 연결.  
→ 수기에 디에틸에테르 50ml를 넣어 추출을 시작.
- 추출이 끝나면 원통 여과지를 올리고 가운.  
→ 수기 중의 에테르가 전부 추출관에 옮겨지게 한다.
- 밸브를 잠그고 에테르를 완전히 증발.

○ 건조

- 수기의 바깥을 거즈로 깨끗이 닦음.
- 98~100°C의 건조기에 넣어 약 1시간 항량이 될 때까지 건조.  
→ 데시케이터에서 식히고 칭량.

○ 계산

$$\text{조지방 } (\%) = \frac{W_1 - W_0}{S} \times 100$$

$W_0$  : 받는 그릇의 무게(g)

$W_1$  : 조지방을 추출하여 건조시킨 받는 그릇의 무게(g)

$S$  : 검체의 채취량(g)

㉞ 조단백

- 검체의 분해 (분해장치 : BUCHI Digestion Unit K-435)

- 검체를 정밀히 취하여, 킬달플라스크에 넣는다.
- 분해촉진제 2알과 진한 황산 15ml를 넣는다.
- 분해장치에 연결하여 분해 → 방냉

- 증류 및 적정 (증류장치 : BUCHI Kjeldahl Distillation Unit B-324)

- 킬달플라스크에 H<sub>2</sub>O 50ml를 가하고, 32% NaOH 65ml를 넣어 증류.
- 증류되어 나오는 NH<sub>3</sub>를 2% H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 80ml가 들어 있는 수기에 포집.
- 증류액을 0.1N HCl로 pH 4.21가 되는 지점까지 적정.

- 계산방법

$$\text{단백 \%} = \frac{0.0014 \times (b - a) \times F}{\text{검체량}(g)} \times 6.25(\text{질소계수}) \times 100$$

0.0014 : 0.1N HCl 1ml에 상당하는 N량(g)

a : 공시험의 0.1N HCl의 적정 소비량(ml)

b : 본시험의 0.1N HCl의 적정 소비량(ml)

F : 0.1N HCl 표준용액의 역가(1)

㉟ 탄수화물

- 시험방법

검체 100g 중에서 수분, 조단백질, 조지방 및 회분의 양을 감하여 얻은 양으로서 표시하고, 시험결과는 백분율로 표시한다.

- 계산

$$\text{수화물 \%} = 100 - (\text{조단백질} + \text{조지방} + \text{수분} + \text{회분})$$

㊱ 열량

- 시험방법

영양성분의 표시함량을 사용하여 열량을 계산함에 있어 탄수화물은 1g당 4kcal를, 단백질은 1g당 4kcal를, 지방은 1g당 9kcal를 각각 곱한 값의 합으로 산출한다.



○ 계산

$$\text{량 } kcal = (\text{탄수화물} \times 4) + (\text{조단백질} \times 4) + (\text{조지방} \times 9)$$

㉢ 식이섬유 분석

○ 장치

- 유리여과기 : 525°C 하룻밤 회화 → 상온 방냉 → 2% 세척액(액체 계면활성 세정제) 1시간 담금 → 헹굼 → 아세톤 15ml 세척 → 건조 → 규조토 1.0g 가함 → 130°C 향량 → 데시케이터 1시간 방냉 → 칭량
- 진공장치, 진탕 항온수조, 저울, 회화로, 오븐, 데시케이터, pH meter

○ 시약 및 시액

- 78% EtOH 수용액 : 95% EtOH 821ml + H<sub>2</sub>O → 1L 정용
- 내열성 α-아밀라아제 용액 : Sigma Cat. A3306
- 프로테아제 효소용액 : Sigma Cat. P3910, MES/TRIS 완충액으로 희석하여 50mg/ml로 사용 시 조제
- 아밀로글루코시다제 용액 : Sigma Cat. A9913
- MES/TRIS 완충용액 : MES 19.52g(0.05M) + TRIS 12.2g(0.05M) + H<sub>2</sub>O 1.7L → NaOH 가하여 pH 8.2(24°C)로 조절 (※ 20°C에서 pH 8.3, 28°C에서 pH 8.1) → + H<sub>2</sub>O → 2L 정용

○ 시험용액의 조제

- 시료 균질화

- 시료 균질화 → 70°C 진공오븐 하룻밤 건조 → 데시케이터 방냉 → 건식분쇄
- ① 열처리 할 수 없는 시료, 분쇄 전 냉동건조.
- ② 지방이 10% 이상이거나 모를시에 분쇄 전 석유에테르로 탈지(시료 1g당 25ml씩 3번 처리) 지방제거로 인한 무게 손실 기록 → 보정
- ③ 당이 높을 경우 식이섬유 측정 전에 (10ml/g) EtOH로 2~3회 추출 → 상등액 제거 → 40°C 하룻밤 건조
- 마개 있는 병에 담아 데시케이터 보관

- 효소분해

- 600ml 비커에 시료 1g을 달아 검체와 공시험을 2개씩 준비.
- MES/TRIS 완충용액 40ml씩 가함 → 자석 교반 → 내열성 α-아밀라아제용액 50ul 가함.
- 알루미늄박 덮은 후, 95~100°C 수욕에서 15분간 교반(총 35분 충분) → 60°C로 식힘.
- 알루미늄박 제거, 벽이나 바닥에 생긴 겔 형태의 내용물을 시약스푼으로 긁어 용액

속에 분산 → 벽과 시약스폰을 H<sub>2</sub>O 10ml로 Washing.

- 프로테아제 효소용액 100ul을 가함 → 알루미늄박을 덮고, 60°C/30분/교반.
- 알루미늄박 제거, 60°C에서 1M NaOH, HCl을 사용하여 pH 4.0~4.7로 조정.
- 아밀로글루코시다제 용액 300ul을 가함 → 알루미늄박을 덮은 후, 60°C/30분/교반

- 총 식이섬유(TDF) 함량 측정

- 60°C, 95% EtOH 225ml을 각각의 시험용액에 가함. (EtOH과 시험용액의 부피 비율은 4:1)
- 수욕에서 비커를 꺼내어 실온, 1시간 침전.
- 유리여과기에 78% EtOH 15ml를 가함 → 흡인여과 → 효소분해물 여과 → 78% EtOH로 Washing.
- 잔류물을 78% EtOH → 95% EtOH → Acetone 순으로 각각 15ml씩 2회 Washing.
- 105°C에서 유리여과기 하룻밤 건조 → 데이케이터 1시간 방냉 → 칭량.
- 같은 두 개의 시료 중 하나는 단백질 함량 측정 (질소계수 : 6.25)
- 다른 하나는 525°C, 5시간 이상 회화 → 칭량.

○ 함량계산

- 시험 함량 (mg) = 공시험 평균잔사무게(mg) - P - A<sub>B</sub>

P<sub>B</sub> : 공시험 단백질량(mg)

A<sub>B</sub> : 공시험 회분량(mg)

- 식이섬유 함량(%) =  $\frac{(\text{검체의 평균잔사무게}(mg) - P - A - B)}{\text{검체의 평균무게}(mg)} \times 100$

P : 단백질량(mg)

A : 회분량(mg)

B : 공시험값(mg)

◎ 미생물 분석

미생물 검사는 식품공전 일반실험법 미생물시험법에 준하여 측정하였다.

○ 일반세균

채취한 시료의 1ml를 취하고 9ml 멸균 증류수에 접종하여 단계별로 희석하였다. 희석액을 여과지(Whatman No 2, Whatman, Maidstone, UK)로 여과한 후, 여과한 희석액 1ml를 3M Petrifilm™ aerobic count plate(St. Paul, MN, USA)에 접종하고 35~37°C에서 24~48시간 배양하여 생성된 붉은 집락수로 판단하였다.

○ 대장균군

시험 용액 1ml와 각 단계별 희석액 1ml를 제조하여 3M Petrifilm™ E. coli/coliform count plate(St. Paul, MN, USA)에 접종한 후, 35~37°C 에서 24~48시간 배양하여 생성된 푸른 집락 중 주위에 기포를 형성하고 있는 집락수를 희석배수에 따라 계산하여 측정하였다.

○ 효모 및 곰팡이군

채취한 시료의 1ml를 취하고 9ml 멸균 증류수에 접종하여 단계별로 희석하였다. 희석액을 여과지(Whatman No 2, Whatman, Maidstone, UK)로 여과한 후, 여과한 희석액 1ml를 3M Petrifilm™ Yeast and Mold count plate(St. Paul, MN, USA)에 접종하고 20~25°C 에서 24~48시간 배양하여 생성된 집락수로 판단하였다.

(라) 배 품종별 석세포의 단면 측정

품종별 추출한 석세포의 단면 측정은 전남대학교의 분석장비인 Field Emission Scanning Electron Microscope(FE-SEM)을 사용하여 15kV의 가속전압에서 측정하였다.

(마) Western blot 분석

시료를 72시간 처리한 B16F10 melanoma 세포를 RIPA buffer로 용해하고 원심분리하였다. 여기서 얻은 상층액을 10% SDS-PAGE를 이용해 전기영동하고 이를 Nitrocellulose membrane으로 이전시켰다. 이를 5% Skim milk로 블로킹한 후, 1차 항체를 4°C 에서 Overnight으로 반응 시켰다. 이어서 1% Skim milk가 함유된 Tris-buffer에서 2차 항체를 블인 후, ECL solution을 이용하여 발색시켜 확인하였다.

(바) In vitro에서 석세포의 항산화 활성 효과

① 폴리페놀

시료를 5mg/ml로 희석한 후, 48well에 시료 25 $\mu$ l을 넣고 Ciocaltean 50 $\mu$ l 첨가하였다. 3분간 반응 시킨 후, 2% Sodium carbonate 1ml을 혼합하여 효소면역분석기로 750nm에서 측정 하였으며, 표준물질은 Chlorogenic acid 5, 10, 25 $\mu$ g/ml를 사용하였다.

② 플라보노이드

시료를 5mg/ml로 희석한 후, 48well에 시료 25 $\mu$ l을 넣고 Diethylene glycol 500 $\mu$ l과 1N NaOH 50 $\mu$ l를 37°C, 1시간 방치 후, 효소면역분석기로 420nm에서 측정하였다. 표준물질은

Quercetin 10, 25, 50, 100 $\mu$ g/ml를 사용하였다.

### ③ DPPH radical 소거능

Abe등과 Yamachuchi 등의 방법에 따라 DPPH solution(8mg/100ml) 500 $\mu$ l에 시료를 최종 농도가 50, 100, 200, 400 $\mu$ g/ml이 되도록 10 $\mu$ l 처리한 후, 실온에서 30분간 방치하였다. 517nm에서 Microplate spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다.

### ④ ABTS radical 소거능

ABTS + 7mM에 Potassium persulfate 2.45mM을 동량 넣고, 12~16시간 동안 암소에 방치하여 734nm에서 흡광도 값이 0.7이 되도록 17배 희석한 후 ABTS+Solution 500 $\mu$ l에 시료를 최종 농도가 50, 100, 200, 400  $\mu$ g/ml이 되도록 10 $\mu$ l를 처리한 후, Microplate spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다.

## (사) 피부청결 개선능 이너뷰티용 소재의 식품학적 적용성 검토

소재 가공적성을 규명하고자 제형화 실험을 통하여 제품 각 유통체인에 따라 다양화 작업을 한다. 건강기능식품의 제형화 실험을 위하여 1차적으로 선별된 소재의 물리, 화학적 특성을 파악한 후, 분말, 정제, 과립, 경질, 연질캡셀의 적용성을 검토한다.

## (2) 실험결과

### (가) 석세포 추출 용매의 변화

석세포 추출 용매변화에 따른 추출량 및 수율은 아래 Table 30~31과 같았다. 1N HCl과 1N NaOH를 사용한 석세포 추출 수율은 42.75%, 1N 초산과 1N 탄산수소나트륨을 사용한 석세포의 추출 수율은 46.0%, 그리고 1N 무수구연산과 1N 탄산수소나트륨을 사용한 석세포 추출 수율은 48.5%로 무수구연산과 탄산수소나트륨을 사용하여 추출하였을 경우 가장 높은 추출 수율을 보였다.

Table 30. 추출 용매의 변화에 따른 석세포 추출 수율

추출조건		시료량 (g)	석세포 추출량 (g)	추출 수율 (%)
발효주정 1N HCl 1N NaOH	추출물	200	85.5	42.75
발효주정 1N 초산 1N (중조)	추출물	200	92.0	46.00
발효주정 1N 무수구연산 1N 탄산수소나트륨(중조)	추출물	200	97.0	48.50

Table 31. 추출 용매의 변화에 따른 석세포 추출 관련 사진

	석세포 제조 관련 사진	
발효주정 1N HCl 1N NaOH		
발효주정 1N 초산 1N 탄산수소나트륨(중조)		

발효주정  
1N 무수구연산  
1N 탄산수소나트륨(중조)



(나) 원료의 건조방법에 따른 석세포 추출

원료로 사용하는 배박의 건조 조건에 따른 석세포 추출량 및 수율은 열풍건조한 배박을 사용하여 석세포를 추출하였을 때가 53.0%의 추출 수율로 동결건조한 배박을 사용하여 석세포를 추출한 경우에 비해 추출 수율이 높았다.

Table 32. 원료의 건조방법에 따른 석세포 추출 수율

추출조건	시료량	석세포 추출량	추출 수율
배박 열풍건조물	200g	106.0g	53.00%
배박 동결건조물	200g	85.5g	42.75%

(다) 영양성분 분석 및 미생물학적 분석

① 낙과 유래 석세포의 일반성분 분석

낙과를 원료로 하여 제조한 석세포의 영양성분을 분석한 결과는 아래 Table 23.과 같다. 낙과를 원료로 하여 제조한 석세포의 수분은 6.0199, 회분은 13.5952, 조단백 2.2669, 조지방 0.7081, 탄수화물 77.4099의 영양성분 함량을 각각 보였다.

Table 33. 낙과 유래 석세포의 일반성분 분석

항목	배 석세포_1	배 석세포_2	배 석세포_3	평균
수분	5.9998	6.0400	-	6.0199
회분	13.6141	13.5763	-	13.5952
조단백	2.2491	2.2847	-	2.2669
조지방	0.7157	0.6936	0.7151	0.7081
탄수화물	77.4213	77.4054	-	77.4099

② 낙과 유래 석세포의 식이섬유 함량

낙과를 원료로 하여 제조한 석세포의 식이섬유 함량은 아래 Table 24.와 같이 83.07%의 함량을 보였다.

Table 34. 낙과 유래 석세포의 식이섬유 함량 분석

시료명	평균잔사무게 (mg)	단백질량 P(mg)	회분량 A(mg)	평균무게 (mg)	식이섬유 (%)
배 석세포 분말	1018.85	0.11	116.30	1020.50	83.07

③ 배박 유래 석세포의 추출조건별 영양성분

㉠ 배박 유래 석세포의 추출조건에 따른 영양성분 분석 결과는 다음과 같다.

○ S1과 S2의 석세포 추출에 따른 영양성분 분석결과는 수분 S1: 4.06, S2: 4.6 탄수화물 S1: 3.9, S2: 2.5 지방 S1: 0.75, S2: 1.05 단백질 S1:3.03 S2: 4.62 회분 S1: 1.12, S2: 1.6 총식이섬유 S1: 87.2 S2: 85.6 으로 열풍건조인 S2가 비교적으로 높은 열량을 나타내나 유의적으로 차이가 난다고 볼 수 없다.

○ S3과 S4의 석세포 추출에 따른 영양성분 분석결과는 (수분 S1: 5.47, S2: 5.51 탄수화물 S1: 16.2, S2: 14.7 지방 S1: 0.59, S2: 0.51 단백질 S1: 4.55 S2: 4.19 회분 S1: 1.11, S2: 1.08 총식이섬유 S1: 72.1 S2: 74.0)g/100g 으로 초산 대체 추출물인 S3가 비교적으로 높은 열량을 나타내나 유의적으로 차이가 난다고 볼 수 없다.

㉡ 위의 영양성분 결과로 볼 때 열풍과 동결건조의 영양성분은 차이가 없으며 초산과 구연산의 대체에도 차이가 없다. 그러나 S1, S2와 S3, S4를 비교하였을 때 열량에서 확연한 차이를 보인다. S3, S4의 영양성분이 탄수화물함량이 높고 식이섬유의 함량이 낮아 배에 달하는 열량차이를 나타낸다.

Table 35. 배박 건조물의 추출 용매에 따른 석세포 추출물의 영양성분 분석

/100g	수분(g)	탄수화물(g)	지방(g)	단백질(g)	회분(g)	총 식이섬유(g)	열량(kcal)
S1	4.06	3.9	0.72	3.03	1.12	87.2	34.2
S2	4.60	2.5	1.05	4.62	1.60	85.6	38.0
S3	5.47	16.2	0.59	4.55	1.11	72.1	88.2
S4	5.51	14.7	0.51	4.19	1.08	74.0	80.3

S1 : 배박 동결건조물 유래 석세포

S2 : 배박 열풍건조물 유래 석세포

S3 : 배박 동결건조물 유래 1N 초산, 1N 탄산수소나트륨 추출 석세포

S4 : 배박 동결건조물 유래 1N 구연산, 1N 탄산수소나트륨 추출 석세포

### ㉔ 미생물 분석

배박 유래 석세포의 추출조건에 따른 미생물 분석 결과는 아래 Table 26.과 같이 전 시료 모두 대장균군과 효모, 곰팡이 균을 발견되지 않았으나, 일반세균의 경우에는 1N 초산을 사용하여 추출한 석세포의 경우에는  $3.454 \pm 0.041$  log CFU/g으로 다른 추출조건에 비하여 높은 값을 보였으나, 그 외에 다른 추출조건에서는 소량 검출된 것을 확인할 수 있었고, 추출조건에 따른 유의적인 차이는 발견할 수 없었다.

Table 36. 배박 건조물의 추출 용매에 따른 석세포 추출물의 미생물 분석

	Total aerobic counts (log CFU/g)	Yeast & molds (log CFU/g)	Coliforms(log CFU/g)
S1	$2.400 \pm 0.110$	ND	ND
S2	$1.841 \pm 0.088$	ND	ND
S3	$3.454 \pm 0.041$	ND	ND
S4	$2.065 \pm 0.157$	ND	ND

S1 : 석세포 (배박 동결건조물+1N HCl+1N NaOH)

S2 : 석세포 (배박 열풍건조물+1N HCl+1N NaOH)


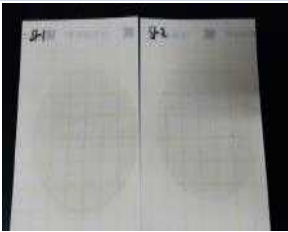
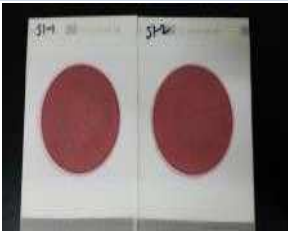
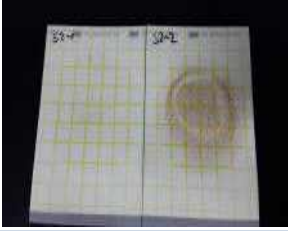








S3 : 석세포 (배박 동결건조물+1N 초산+1N 탄산수소나트륨)

S4 : 석세포 (배박 동결건조물+1N 구연산+1N 탄산수소나트륨)

ND : Not detected

[그림18] 배박 건조물의 추출 용매에 따른 석세포 추출물의 미생물 분석 관련 사진



	Total aerobic counts	Yeast & molds	Coliforms
S1			
S2			
S3			
S4			

S1 : 석세포 (배박 동결건조물+1N HCl+1N NaOH)

S2 : 석세포 (배박 열풍건조물+1N HCl+1N NaOH)

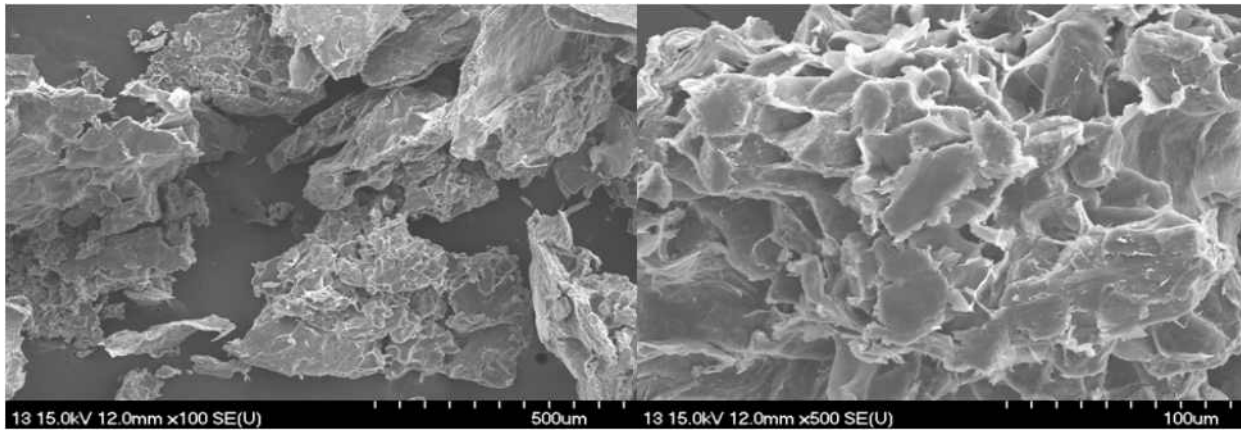
S3 : 석세포 (배박 동결건조물+1N 초산+1N 탄산수소나트륨)

S4 : 석세포 (배박 동결건조물+1N 구연산+1N 탄산수소나트륨)

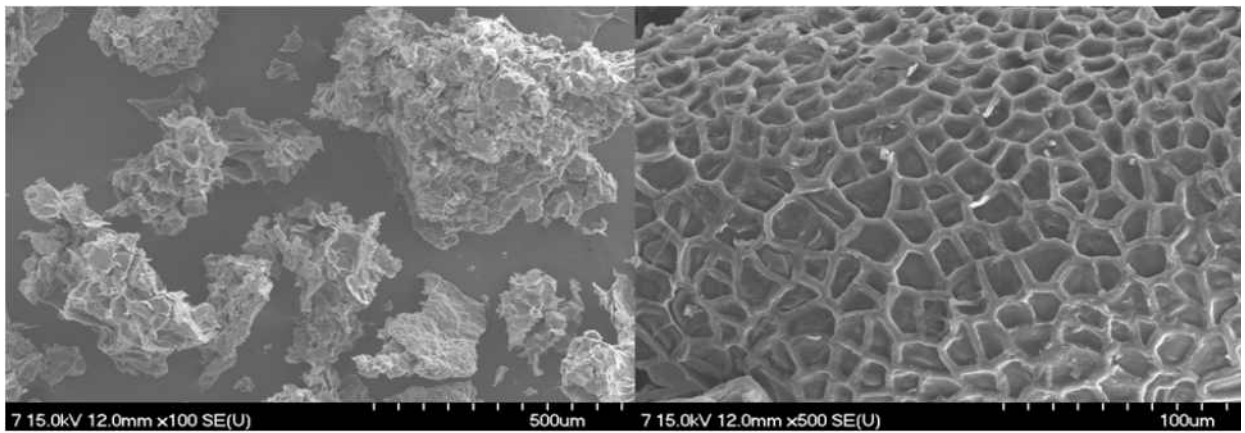
#### (라) 배 품종별 석세포의 단면 측정

낙과(미숙과) 및 배박의 주사현미경을 이용한 석세포의 관찰 결과는 아래 Figure 15.와 같다. 석세포를 100X와 500X 비율로 관찰하였는데, 100X의 경우 전체적으로 구멍난 단단한 돌덩어리 모양을 나타내었고 500X의 경우 별집모양을 나타내었다. 각 품종 모두 석세포 입자가 각각 균일한 크기를 보이지는 않았고, 다른 품종에 비하여 추황의 입자는 표면적이 세밀하고 규칙적임을 알 수 있었다.

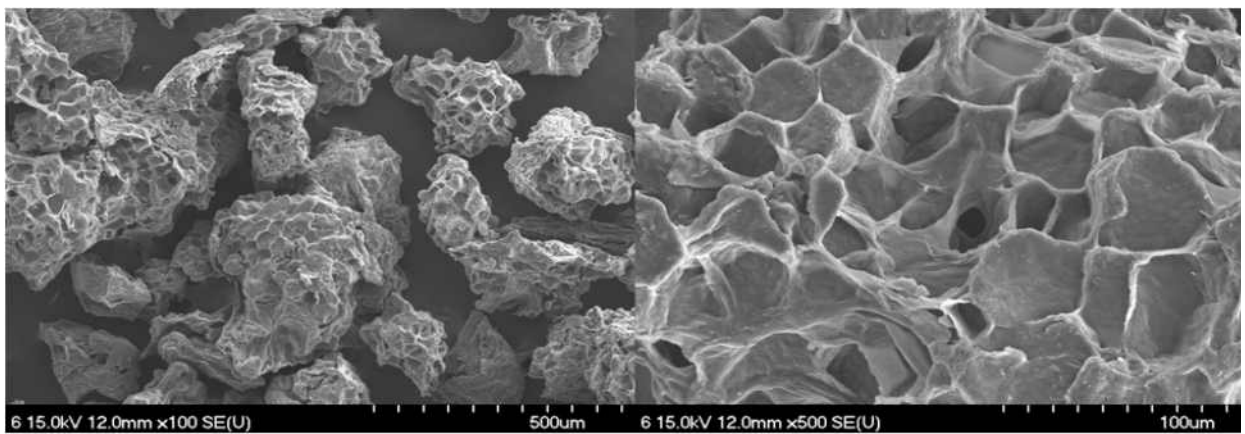
[황금]



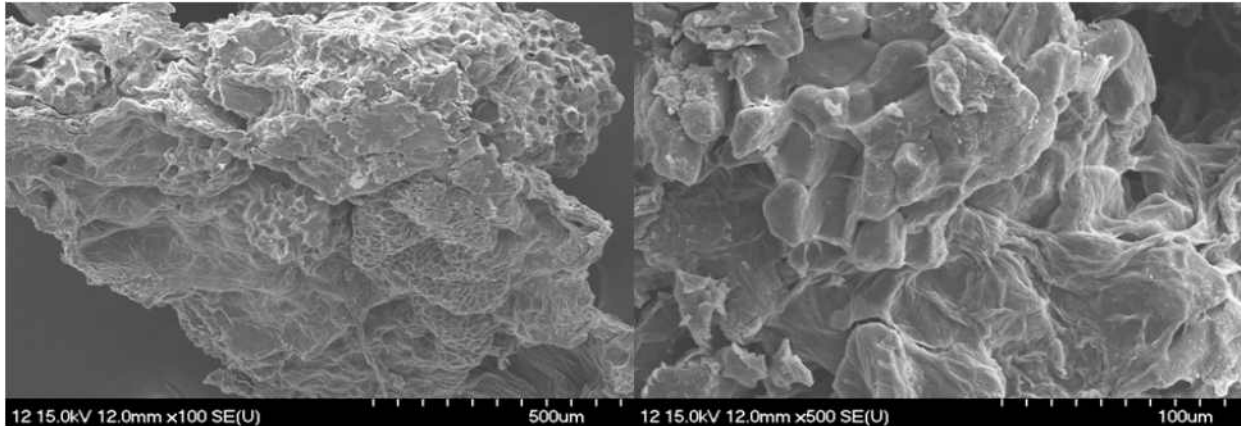
[추황]



[신교]



[배박]

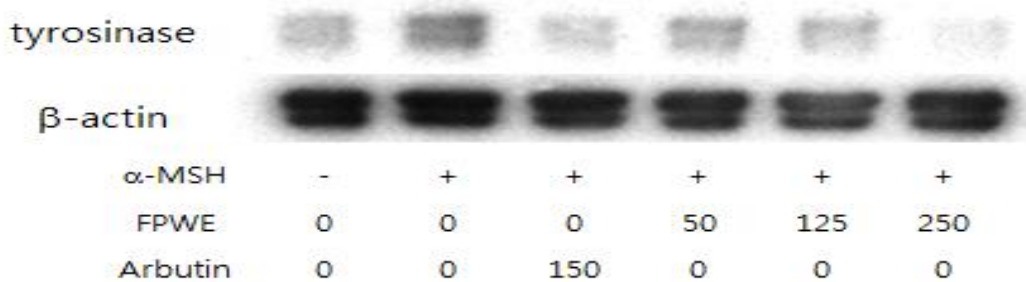


[그림19] Observation of Stone cell from scanning electron microscope.

(마) 멜라닌 합성에 관여하는 Tyrosinase, MiTF의 단백질 발현 효과 확인

① 낙과(미숙과) 물 추출물의 세포내 Tyrosinase 단백질 발현 실험

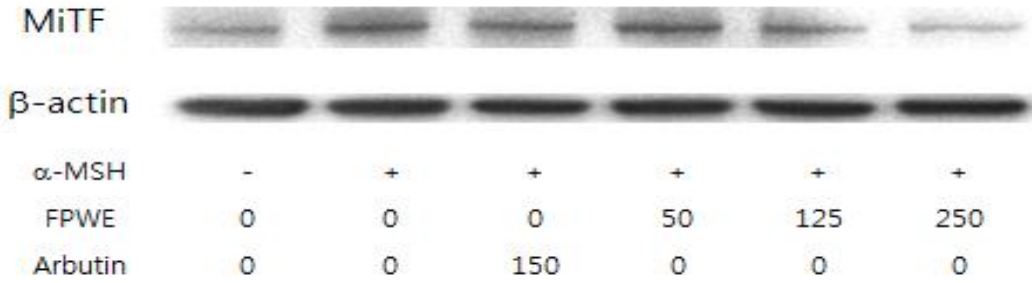
낙과(미숙과) 물 추출물이 Melanin 합성에 관계된 효소인 Tyrosinase에 미치는 영향을 알아보기 위하여 B16F10 mouse melanoma 세포에 농도별로 50, 125, 250 µg/ml 처리 한 후 72시간 후에 Tyrosinase protein 발현을 Western blotting으로 확인하였다. 이때 세포의 House keeping gene으로 β-actin을 이용하였다. 그 결과 α-MSH 처리 후 Tyrosinase의 발현량이 증가하였으며 낙과 물 추출물을 처리했을 때 농도 의존적으로 Tyrosinase 발현이 감소됨을 확인하였다.



[그림20] 낙과(미숙과) 물 추출물의 세포내 Tyrosinase 단백질 발현 실험

② 낙과(미숙과) 물 추출물의 세포내 MiTF의 단백질 발현 효과 확인

낙과(미숙과) 물 추출물에 의한 세포내 Tyrosinase 단백질의 발현의 감소가 전사 조절인자 MiTF 발현 감소로 인한 결과인지 알아보기 위하여 같은 조건하에 MiTF 단백질 발현의 변화를 측정하였다. 그 결과 α-MSH 처리 후 MiTF의 발현량이 증가하였으며 낙과 물추출물을 처리했을 때 농도 의존적으로 MiTF발현이 감소되었다.

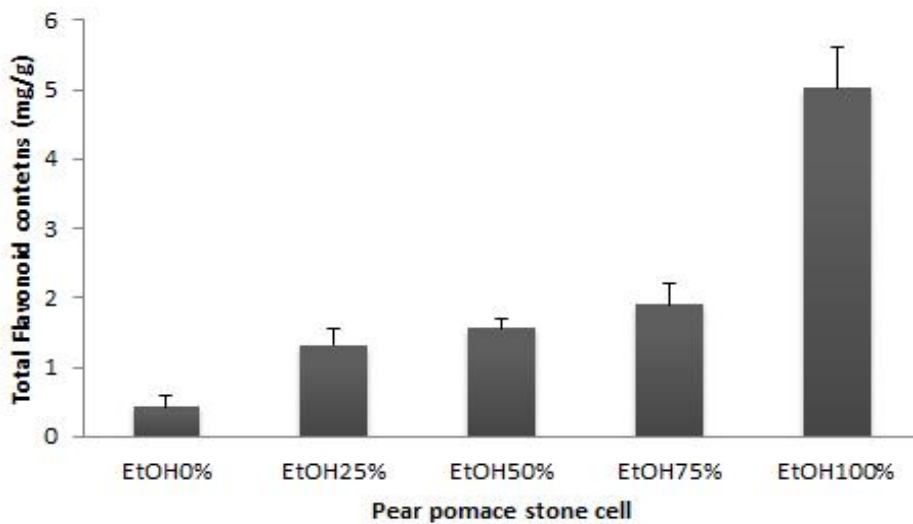


[그림21] 낙과(미숙과) 물 추출물의 세포내 MiTF 단백질 발현 효과 확인.

(바) In vitro에서 석세포의 항산화 활성 효과

① 총 플라보노이드

Total flavonoid는 기능적인 우수성을 제시하는 지표 인자중 하나로 인식되고 있어 석세포 EtOH 함량별 추출의 Flavonoid의 함량 변화를 측정하였으며 그 결과는 아래 Figure 19.와 같다. 석세포의 (0, 25, 50, 75, 100)% EtOH의 추출물은 (0.5, 1, 2, 2, 5mg/g의 결과 값을 나타내었다. 대체적으로 EtOH 함량이 높아질수록 Total flavonoid이 증가 하는 것으로 판단되었다. Flavonoid의 생리활성 작용으로 가장 주목 받는 것 중의 하나는 항산화 작용으로 유리기에 수소원자를 공여하여 생체 내에서 산화 스트레스에 의해서 과잉으로 생성된 활성산소 등의 자유 라디칼의 생성을 억제시킴으로써 항산화 작용을 한다.

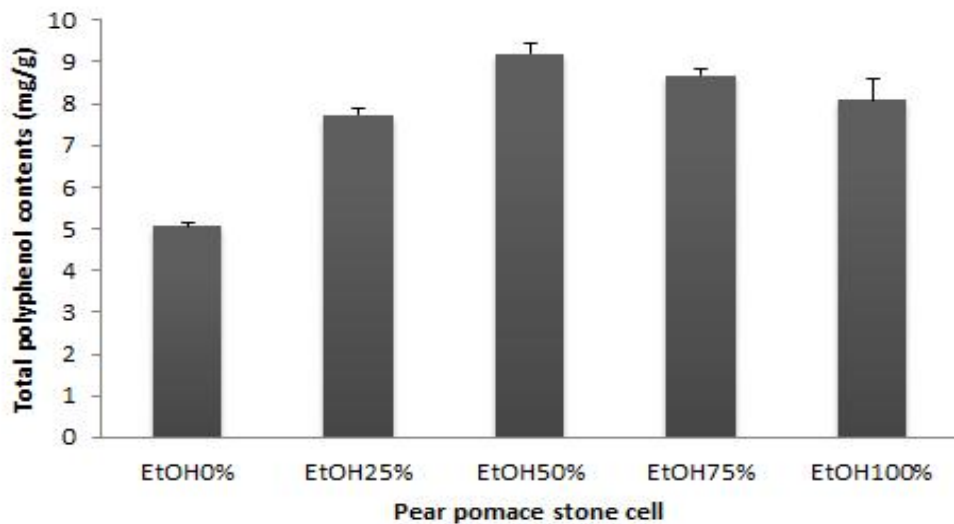


[그림22] Total flavonoid content of various solvent extract from stone cell of pear pomace.

② 폴리페놀

석세포 EtOH 함량별 추출물의 Total polyphenol의 함량 변화를 측정한 결과는 아래 Fig

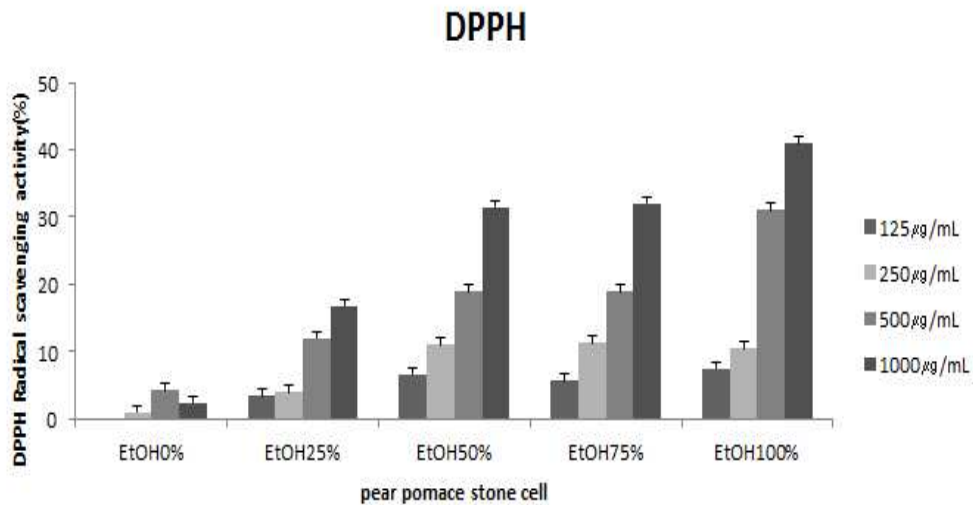
ure 20.과 같다. 석세포의 (0, 25, 25, 75, 100)% EtOH의 추출물은 (5, 7, 9, 8, 8)mg/g 의 결과값을 나타내었다. 대체적으로 에탄올함량이 높아질수록 Total polyphenol이 증가 하는 것으로 판단되었다.



[그림23] Total polyphenol content of various solvent extract from stone cell of pear pomace.

### ③ DPPH redical 소거능

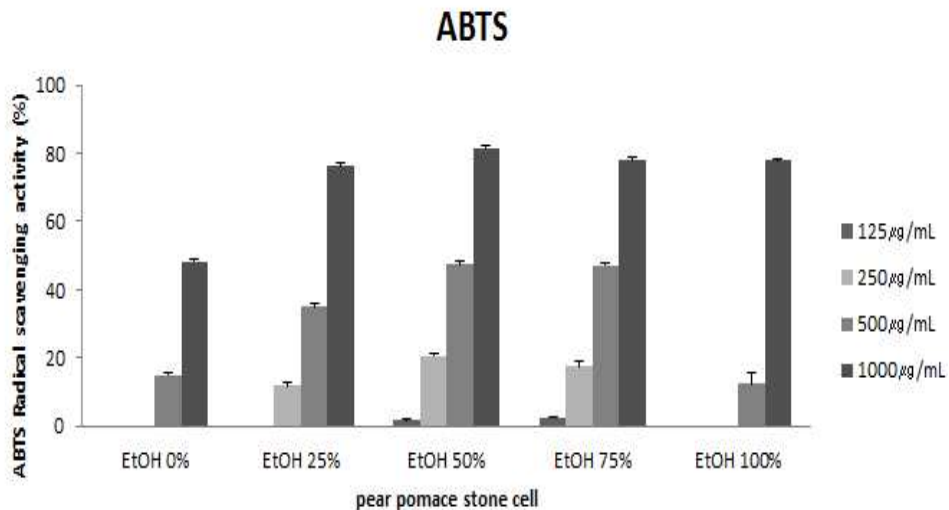
DPPH 소거능을 측정한 결과는 아래 Figure 21.과 같다. EtOH 함량별 추출에 따른 전자 공여 소거능을 측정한 결과, 석세포의 (50, 75, 100)% EtOH의 추출물은 1000  $\mu$ l/ml의 농도에서 (30, 30, 40)%의 소거능을 보였으며 0%와 25%에서는 미비한 결과 값을 나타내었다.



[그림24] DPPH radical scavenging activity of stone cell in pear pomace extracts depending on ethanol concentration.

④ ABTS radical 소거능

ABTS 소거능을 측정한 결과는 아래 Figure 22.와 같다. EtOH 함량별 추출에 따른 전자 공여 소거능을 측정한 결과, 석세포의 (0, 25, 50, 75, 100)% EtOH의 추출물은 1000 µl/ml의 농도에서 (48, 76, 81, 77, 77)%의 소거능을 보였다.



[그림25] ABTS radical scavenging activity of stone cell in pear pomace extracts depending on ethanol concentration.

⑤ 결론

결과적으로 총 폴리페놀과 총 플라보노이드의 함량은 다소 낮으나 항산화 활성을 측정하는 실험인 DPPH 소거능과 ABTS 소거능 결과가 유의적으로 소거능을 보였고 결과로 미루어 볼 때 폴리페놀과 플라보노이드의 외의 다른 생리활성을 지닌 물질이 있는 것으로 사료된다.

## 라. 낙과(미숙과) 및 배박 유래 기능성분의 분석법 확립 및 표준화

### (1) 실험방법

#### (가) 추출용매 비율에 따른 낙과 추출물 내의 Arbutin 함량 분석

각 추출조건에 따라 추출된 시료에 대한 Arbutin 함량 비교는 HPLC 실험법을 통하여 실시하였다. 분석조건은 아래와 같다.

[Condition of analysis for HPLC]

- Column : ODS-80Ts (Tosoh, 4.6mm×250mm)
- Flow rate : 1.0mL/min (p580 pump, DIONEX, Germany)
- Detection : 280nm (UVD-170S UV/VIS detector, DIONX, Germany)
- Mobile phase :

Time (min)	2% AcOH	60% MeOH	100% MeOH
0	100	0	0
45	0	100	0
55	0	0	100

#### (나) 낙과(미숙과) 및 배박 유래 소재의 분석법 표준화

##### ① 낙과(미숙과) 추출물에 존재하는 미백 기능성분(Arbutin) 분석법 표준화

낙과(미숙과) 추출물에 존재하는 유효성분으로써 알부틴(Arbutin)을 선정하였다. 추출물 분석에 앞서 Arbutin의 HPLC 분리 조건을 기존문헌을 토대로 선정하였다. 표준품은 Sigma 사의 제품을 사용하였으며 표준품, 시료 전처리 및 분석조건은 아래와 같다.

##### ㉠ 용매의 준비

각 용매는 0.45um 필터로 여과했다. 매일 분석 실험 전에는 Vacuum pump와 Sonicator

로 탈기작업을 수행하였다.

- A 용매 : MeOH
- B 용매 : 1% Acetic acid 수용액

㉠ 표준품의 준비

Arbutin 표준품은 10mg을 칭량해서 MeOH 100ml에 용해시켜서 100ug/mL 용액을 준비했다. 100ug/mL 용액을 1/2 희석하여 50ug/mL 용액을 준비했고, 50ug/mL 용액을 다시 희석하여 25ug/mL, 12.5ug/mL, 6.25ug/mL 용액을 준비했다. 주입량은 10ul이고, 각 용액은 0.45um 필터로 여과 후에 사용하였다.

㉡ Sample의 준비

C1, C2, C3, C4, C6, C7, C14, C18, S2, S3 용액은 100% MeOH을 녹여 50mg/mL 용액을 만들었다. 나머지 용액은 MeOH:H<sub>2</sub>O=1:1 녹였다. 각 용액을 Vortex mixer로 5분 동안 Mixing 한 후에 녹이고 녹지 않는 용액은 Sonicator로 1시간 동안 초음파 진탕했다. C1~C10 용액은 Centrifugal separator로 1000rpm, 15분 동안 원심분리 한 후, 상층액만 0.45um 필터로 여과 후에 사용하였다.

㉢ 분석 조건

- 장치: HPLC
- 검출기 : 자외부분광광도계(측정과장: 280nm)
- 컬럼 : Zorbax extend-C18 Analytical(4.6X150mm, 5um)
- 이동상
  - A 용매 : MeOH
  - B 용매 : 1% Acetic acid 수용액
- 유속 : 1.0ml/min
- 주입량 : 20ul
- Mobile phase :

Time	A(%)	B(%)
0	5	95
15	5	95
25	100	0
26	5	95
30	5	95



## ② 낙과(미숙과) 추출물에 존재하는 이너뷰티 기능성분(Rutin) 분석법 표준화

낙과(미숙과) 추출물에 존재하는 유효성분으로써 루틴(Rutin)을 선정하였다. 추출물 분석에 앞서 루틴의 HPLC 분리 조건을 기존문헌을 토대로 선정하였다. 표준품은 Sigma사의 제품을 사용하였으며 표준품, 시료 전처리 및 분석조건은 아래와 같다.

### ㉠ 용매의 준비

각 용매는 0.45um 필터로 여과했다. 매일 분석 실험 전에는 vacuum pump와 sonicator로 탈기작업을 수행하였다.

- A 용매 : MeOH
- B 용매 : 0.2% Phosphoric acid 수용액 (pH 2.53)

### ㉡ 표준품의 준비

Rutin 표준품은 10mg을 칭량해서 MeOH 100ml에 용해시켜서 100ug/ml 용액을 준비했다. 100ug/ml 용액을 다시 1/2 희석하여 50ug/ml 용액을 준비하고, 50ug/ml 용액을 25ug/ml, 12.5ug/ml, 6.25ug/ml로 희석하여 준비했다. 주입량은 10ul이다. 각 용액은 0.45um 필터로 여과 후에 사용하였다.

### ㉢ Sample의 준비

C1, C2, C3, C4, C6, C7, C14, C18, S2, S3 용액은 100% MeOH을 녹여 50mg/ml 용액을 만들었다. 나머지 용액은 MeOH:H<sub>2</sub>O=1:1로 녹였다. 각 용액을 Vortex mixer로 5분 동안 Mixing 한 후에 녹이고 녹지 않는 용액은 Sonicator로 1시간 동안 초음파 진탕했다. C1~C10 용액은 Centrifugal separator로 1000rpm, 15분 동안 원심분리한 후, 상층액만 0.45um 필터로 여과 후에 사용하였다.

### ㉣ 분석 조건

- 장치 : HPLC
- 검출기 : 자외부 분광광도계(측정파장 : 360nm)
- 컬럼 : Zorbax extend-C18 Analytical(4.6X150mm, 5um)
- 이동상
  - A 용매 : MeOH
  - B 용매 : 0.2% Phosphoric acid 수용액 (pH 2.53)
- 유속 : 1.0ml/min
- 주입량 : 10ul
- Mobile phase :

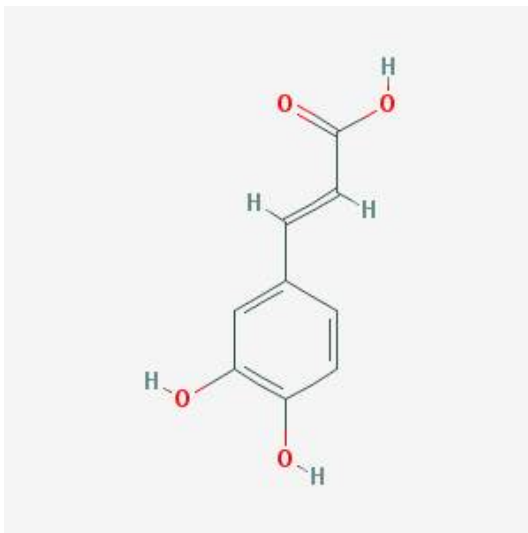
Time	A(%)	B(%)
0	34	66
10	34	66
15	100	0
20	100	0
30	34	66

③ 낙과(미숙과) 추출물에 존재하는 이너뷰티 기능성분(Chlorogenic acid 및 Caffeic acid) 동시 분석법(Method Validation) 확립

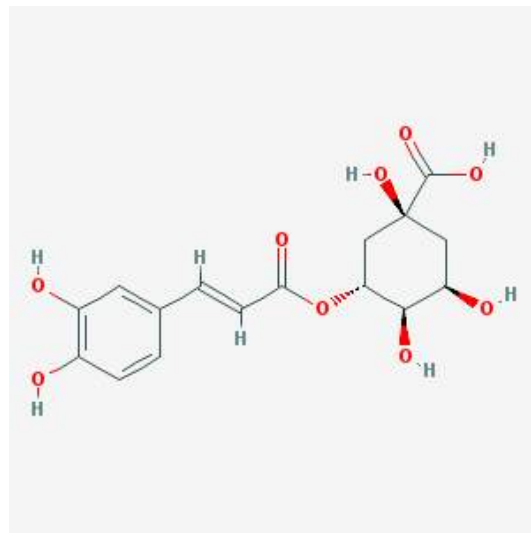
본 연구에서 HPLC 분석 밸리데이션을 실시하는 목적은 소재의 품질관리시험에 이용하는 분석법이 의도한 목적에 적합한 방법임을 증명하는 것으로 HPLC 분석법에 관한 밸리데이션 파라미터를 설정하며, 본 방법에 제시된 밸리데이션이 적용되는 분석법으로 한다.

㉠ 기능성분의 개요

낙과(미숙과) 추출물에 존재하는 이너뷰티 기능성분인 Chlorogenic acid 및 Caffeic acid의 분자구조 및 간략한 개요는 아래와 같다.



Chlorogenic acid



Caffeic acid

- Caffeic acid : Molecular Formula  $C_9H_8O_4$ , Molecular Weight: 180.15742
- Chlorogenic acid : Molecular Formula  $C_{16}H_{18}O_9$ , Molecular Weight: 354.30872

#### ㉠ 직선성(Linearity)

본 연구에 서술한 분석법의 모든 범위에서 직선성을 확인하였다. 표준원액을 희석하여 원료약품의 각 농도에 대해서 직접적으로 직선성을 증명하였다. 시그널을 분석대상물질의 농도 또는 함량에 대한 함수로 작성한 플롯을 시각적으로 검사하여 직선성을 평가하였으며, 직선성이 인정되는 경우에는, 최소 이승법에 의한 회귀 직선의 계산과 같은 통계학적 방법을 이용해 측정 결과를 평가하였다. 따라서, 상관계수(Correlation coefficient), y-절편, 회귀직선의 기울기 및 잔차제곱의 합(Residual sum of square)을 첨부자료에 기재하였다. 직선성을 입증하기 위해서 최소 다섯 개 농도의 검체를 사용하였다.

#### ㉡ 범위(Range)

일반적으로 범위(Range)는 직선성 평가 시 결정되고, 분석법이 적용되는 목적에 따라 달라질 수 있다. 규정하는 범위 내 또는 그 범위의 양단의 농도를 포함한 검체를 이용하여 분석법의 직선성, 정확성 및 정밀성을 확인함으로써 범위의 타당성을 입증할 수 있다. 본 연구에서는 원료약품 또는 제제의 정량시험 범위는 6.25~100ug/ml로 설정하였다.

#### ㉢ 정확성(Accuracy)

정확성은 분석법이 규정하는 범위내에서 입증하였다. 정확성 데이터는 규정된 범위 내의 최소 3농도에 대해서 분석법의 전 조작을 적어도 9회 반복 측정(예를 들면, 3 농도에 대해서 분석법의 전 조작을 각 농도당 3회씩 반복 측정)한 결과로부터 평가하였다. 정확성은 회수율(%)로서 나타내고, 참값과 비교하는 경우에는 평균값과 참값으로 인증된 값과의 차이를 신뢰구간과 함께 기재하였다.

#### ㉣ 정밀성(Precision)

함량시험의 정량시험을 밸리데이션할 때 정밀성 평가가 포함되어야 하므로 본 연구에서는 반복성(병행정밀성, Repeatability)을 아래와 같은 방법으로 평가하였다. 규정된 범위 내의 농도에서 분석법의 전체 조작을 적어도 9 회 반복하여 측정하였다. 본 연구에서는 3 농도에 대해서 분석법의 전 조작을 각 농도 5회씩 반복 측정하였다. 도출된 정밀성 평가 자료는 표준편차, 상대표준편차(변동 계수) 및 표준편차의 신뢰구간을 표기하였다.

#### ㉤ 검출한계(Detection limit)

검출한계는 기지량의 분석대상물질을 함유한 검체를 분석하고 그 분석대상물질을 확실히 검출할 수 있는 최저의 농도를 확인함으로써 결정하는데 본 연구에서는 반응의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하는 방법에 의하여 검출한계를 설정하였다. 검출한계(DL)

를 다음 식에 의해 결정하였다.

$$DL = 3.3 \times \sigma / S$$

여기서  $\sigma$ 는 반응의 표준편차를, S는 검량선의 기울기를 말한다. 기울기 S는 분석대상 물질의 검량선으로부터 산출하였으며, 표준편차  $\sigma$ 에 대해서는 검량선에 근거하여 산출하였다. 검출한계내에 있는 분석대상물질을 포함한 검체를 사용하여 검량선을 작성하였다. 회귀직선에서 잔차의 표준편차(Residual standard deviation) 또는 회귀직선(Regression line)에서 y절편의 표준편차를 표준편차  $\sigma$ 로서 이용하였다.

#### ⊗ 정량한계(Quantitation limit)

정량한계는 기지농도의 분석대상물질을 함유한 검체를 분석하고 그 분석대상물질을 인정될 수 있는 정도의 정확성과 정밀성을 가지고 정량될 수 있는 분석대상물질의 최저농도를 확인함으로써 결정하였으며, 정량한계의 계산은 반응의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하였다.

정량한계(QL)는 다음 식에 의해 결정하였다.

$$QL = 10 \times \sigma / S$$

여기서  $\sigma$ 는 반응의 표준편차를, S는 검량선의 기울기를 말한다.

기울기 S는 분석대상물질의 검량선으로부터 구하였고, 표준편차( $\sigma$ )에 대해서는 정량한계내에 있는 분석대상물질을 포함한 검체를 사용하여 검량선을 작성하였다. 회귀직선에서 잔차의 표준편차(Residual standard deviation) 또는 회귀직선(Regression line)에서 y절편의 표준편차를 표준편차  $\sigma$ 로서 이용하였다.

⊙ 분석은 HPLC를 이용하여 분석하며 분석조건은 다음과 같다.

- 장치 : HPLC
- 검출기 : 자외부분광광도계(측정파장 : 330nm)
- 컬럼 : Zorbax extend-C18 Analytical (4.6 x 150mm, 5um)
- 이동상 : A 0.2% Acetic acid  
B Methanol
- Retention time : chlorogenic acid는 4min, caffeic acid는 6min이 되도록 Retention time을 조정할 수 있다.

min	A	B
0	75	25
5	75	25
10	50	50
15	75	25

- 유속 : 1.0ml/min
- 주입량 : 10 $\mu$ l

④ 배박 추출물에 존재하는 이너뷰티 기능성분(Chlorogenic acid 및 Caffeic acid)의 HPLC 분석법 확립 및 함량 분석

㉠ 시험항목

○ 직선성(Linearity)

본 연구에 서술한 분석법의 모든 범위에서 직선성을 확인함. 표준원액을 희석하여 원료약품의 각 농도에 대해서 직접적으로 직선성을 증명함. 시그널을 분석대상물질의 농도 또는 함량에 대한 함수로 작성한 플롯을 시각적으로 검사하여 직선성을 평가하였으며, 직선성이 인정되는 경우에는, 최소 이승법에 의한 회귀 직선의 계산과 같은 통계학적 방법을 이용해 측정 결과를 평가하였다. 따라서, 상관계수(Correlation coefficient), y-절편, 회귀직선의 기울기 및 잔차제곱의 합(Residual sum of square)을 첨부자료에 기재함. 직선성을 입증하기 위해서 최소 다섯 개 농도의 검체를 사용함.

○ 범위(Range)

일반적으로 범위(Range)는 직선성 평가 시 결정되고, 분석법이 적용되는 목적에 따라 달라질 수 있음. 규정하는 범위 내 또는 그 범위의 양단의 농도를 포함한 검체를 이용하여 분석법의 직선성, 정확성 및 정밀성을 확인함으로써 범위의 타당성을 입증할 수 있음. 본 연구에서는 원료약품 또는 제제의 정량시험 범위는 6.25~100ug/ml로 설정함.

○ 정확성(Accuracy)

정확성은 분석법이 규정하는 범위내에서 입증함. 정확성 데이터는 규정된 범위내의 최소 3 농도에 대해서 분석법의 전 조작을 적어도 9회 반복 측정(예를 들면, 3농도에 대해서 분석법의 전 조작을 각 농도당 3회씩 반복 측정)한 결과로부터 평가함. 정확성은 회수율(%)로서 나타내고, 참값과 비교하는 경우에는 평균값과 참값으로 인증된 값과의 차이를 신뢰구간과 함께 기재함.

- 정밀성(Precision)

함량시험의 정량시험을 밸리데이션할 때 정밀성 평가가 포함되어야 하므로 본 연구에서는 반복성(병행정밀성, Repeatability)을 아래와 같은 방법으로 평가함. 규정된 범위내의 농도에서 분석법의 전체 조작을 적어도 9회 반복하여 측정함. 본 연구에서는 3농도에 대해서 분석법의 전 조작을 각 농도 5회씩 반복 측정함. 도출된 정밀성 평가 자료는 표준편차, 상대표준편차(변동 계수) 및 표준편차의 신뢰구간을 표기함.

- 검출한계(Detection limit)

검출한계는 기지량의 분석대상물질을 함유한 검체를 분석하고 그 분석대상물질을 확실히 검출할 수 있는 최저의 농도를 확인함으로써 결정하는데 본 연구에서는 반응의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하는 방법에 의하여 검출한계를 설정함. 검출한계(DL)를 다음 식에 의해 결정함.

$$DL = 3.3 \times \sigma / S$$

여기서  $\sigma$ 는 반응의 표준편차를, S는 검량선의 기울기를 말함. 기울기 S는 분석대상물질의 검량선으로부터 산출하였으며, 표준편차  $\sigma$ 에 대해서는 검량선에 근거하여 산출함. 검출한계내에 있는 분석대상물질을 포함한 검체를 사용하여 검량선을 작성함. 회귀직선에서 잔차의 표준편차(Residual standard deviation) 또는 회귀직선(Regression line)에서 y절편의 표준편차를 표준편차  $\sigma$ 로서 이용함.

- 정량한계(Quantitation limit)

정량한계는 기지농도의 분석대상물질을 함유한 검체를 분석하고 그 분석대상물질을 인정될 수 있는 정도의 정확성과 정밀성을 가지고 정량될 수 있는 분석대상물질의 최저농도를 확인함으로써 결정하였으며, 정량한계의 계산은 반응의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거함.

정량한계(QL)는 다음 식에 의해 결정함.

$$QL = 10 \times \sigma / S$$

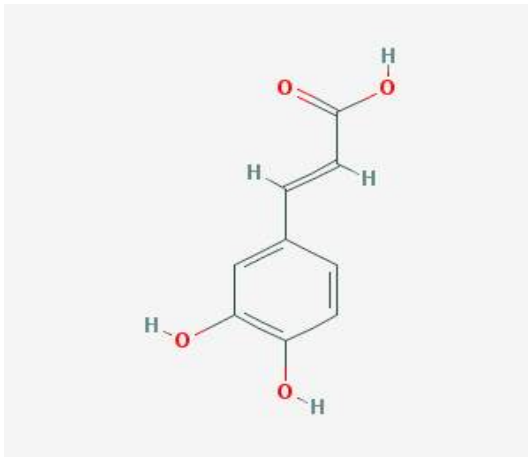
여기서  $\sigma$ 는 반응의 표준편차를, S는 검량선의 기울기를 말함. 기울기 S는 분석대상물질의 검량선으로부터 구하였고, 표준편차( $\sigma$ )에 대해서는 정량한계내에 있는 분석대상물질을 포함한 검체를 사용하여 검량선을 작성함. 회귀직선에서 잔차의 표준편차(Residual standard deviation) 또는 회귀직선(Regression line)에서 y절편의 표준편차를 표준편차  $\sigma$

로서 이용함.

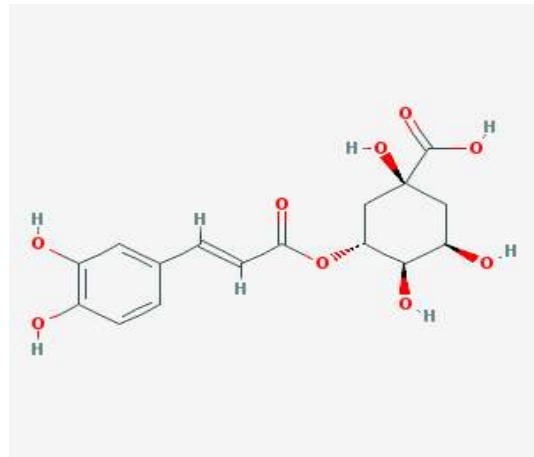
㉔ 시험방법

- 표준품(지표물질) 및 검체

지표물질은 배박 추출물 내 유효 성분 중 하나인 Chlorogenic acid 및 Caffeic acid을 선정함.



[Chlorogenic acid]



[Caffeic acid]

- Caffeic acid : Molecular Formula  $C_9H_8O_4$ , Molecular Weight: 180.15742
- Chlorogenic acid : Molecular Formula  $C_{16}H_{18}O_9$ , Molecular Weight: 354.30872

- 정확성(Accuracy)

- 시료의 준비

Chlorogenic acid 및 Caffeic acid 적량을 메탄올 용액으로 녹여 최종 농도가 Chlorogenic acid 및 Caffeic acid으로써 ①12.5 ②25 ③50ug/ml인 용액을 만들어 준비함. 준비한 ①~③액을 검액으로 하며 멤브레인필터로 여과 후, 각 농도당 3회 실시함.

- 분석

분석은 HPLC를 이용하여 분석하며 분석조건은 다음과 같음.

- 장치 : HPLC
- 검출기 : 자외부분광광도계(측정파장: 330nm)
- 컬럼 : Zorbax extend-C18 Analytical(4.6 x 150mm, 5um)

- 이동상 : A 0.2% acetic acid

B Methanol

- Retention time : Chlorogenic acid는 4min, Caffeic acid는 6min이 되도록 Retention time을 조정할 수 있음.

min	A	B
0	75	25
5	75	25
10	50	50
15	75	25

- 유속 : 1.0ml/min

- 주입량 : 10 $\mu$ l

위의 분석조건으로 분석하며 시험은 각각의 농도당 3회를 측정한 후, 평균 회수율 %, 표준편차, 상대표준편차를 계산함.

○ 정밀성

· 시료의 준비

Chlorogenic acid 및 Caffeic acid 적량을 메탄올 용액으로 녹여 최종 농도가 Chlorogenic acid 및 Caffeic acid으로써 ①12.5 ②25 ③50ug/ml인 용액을 만들어 준비함. 준비한 ①액을 검액으로 하며 멤브레인필터로 여과 후, 6회 반복 실험함.

· 분석

분석은 HPLC를 이용하여 분석하며 분석조건은 다음과 같음.

- 장치 : HPLC

- 검출기 : 자외부분광광도계(측정파장 : 330nm)

- 컬럼 : Zorbax extend-C18 Analytical (4.6 x 150mm, 5 $\mu$ m)

- 이동상 : A 0.2% acetic acid

B Methanol

- Retention time : Chlorogenic acid는 4min, Caffeic acid는 6min이 되도록 Retention time을 조정할 수 있음.



min	A	B
0	75	25
5	75	25
10	50	50
15	75	25

- 유속 : 1.0ml/min
- 주입량 : 10 $\mu$ l

위의 분석조건으로 분석하며 시험은 각각의 농도당 6회를 측정 한 후, 평균 회수율 %, 표준편차, 상대표준편차를 계산함.

○ 직선성 및 Calibration

- 시료의 준비

Chlorogenic acid 및 Caffeic acid 적량을 메탄올 용액으로 녹여 최종 농도가 Chlorogenic acid 및 Caffeic acid으로써 ①6.25 ②12.5 ③25 ④50 ⑤100ug/ml인 용액을 만들어 준비함. 준비한 ①~⑤액을 검액으로 하며 멤브레인필터로 여과 후, 3회 반복 실험함.

- 분석

분석은 HPLC를 이용하여 분석하며 분석조건은 다음과 같음

- 장치 : HPLC
- 검출기 : 자외부분광광도계(측정과장 : 330nm)
- 컬럼 : Zorbax extend-C18 Analytical (4.6 x 150mm, 5 $\mu$ m)
- 이동상 : A 0.2% acetic acid

B Methanol

- Retention time : Chlorogenic acid는 4min, Caffeic acid는 6min이 되도록 Retention time을 조정할 수 있음.

min	A	B
0	75	25
5	75	25
10	50	50
15	75	25

- 유속 : 1.0ml/min
- 주입량 : 10 $\mu$ l

위의 분석조건으로 분석하며 시험은 각각의 농도당 3회를 측정 한 후, 평균 회수율 %, 표준편차, 상대표준편차를 계산함.

- Intra- Inter- day accuracy(일내, 일간 정확성)

분석법의 Intra-(일내), Inter-(일간) 정확성을 조사함

- 시료의 준비

Chlorogenic acid 및 Caffeic acid 메탄올 용액으로 녹여 최종 농도가 Chlorogenic acid 및 Caffeic acid으로써 ①12.5 ②25 ③50ug/ml인 용액을 만들어 준비함. 준비한 ①~③액을 검액으로 하며 멤브레인필터로 여과 후, 일내 정확성은 3농도를 3회 Injection하며 하루 일정시간 간격으로 3회 반복 실험함. 일간 정확성은 3농도를 3회 Injection하며 연속된 3일간 일정간격으로 3회 반복 실험함.

- 분석

분석은 HPLC를 이용하여 분석하며 분석조건은 다음과 같음.

- 장치 : HPLC
- 검출기 : 자외부분광광도계(측정파장 : 330nm)
- 컬럼 : Zorbax extend-C18 Analytical (4.6 x 150mm, 5 $\mu$ m)
- 이동상 : A 0.2% acetic acid

B Methanol

- Retention time : Chlorogenic acid는 4min, Caffeic acid는 6min이 되도록 Retention time을 조정할 수 있음.

min	A	B
0	75	25
5	75	25
10	50	50
15	75	25

- 유속 : 1.0ml/min
- 주입량 : 10 $\mu$ l

위의 분석조건으로 분석하며 시험은 각각의 농도당 3회를 측정 후 평균 회수율 %, 표준편차, 상대표준편차를 계산함.

○ 특이성(Specificity)

배박 추출물 추출 제제가 본 분석법에 영향을 미치지 않는지를 확인하기 위하여, 특이성을 검토하였음. 검체로써, 배박 추출물 추출액에 대표 부형제(유당, 전분)가 포함된 것을 사용하였으며, 표준품과 비교하였음. 시험법은 위의 기술한 내용과 동일함. 배박 추출물 추출제제를 검체로 하여 고속액체그래피 법으로 분석 시, 부형제는 본 분석법에 영향을 미치지 않음을 확인하였음.

㉔ 배박 추출조건에 따른 추출물의 함량 분석

○ 추출용매량에 따른 Caffeic acid 및 Chlorogenic acid 함량

배박 추출물을 물로 추출시 배박과 물의 비율, 추출온도, 추출시간에 따른 caffeic acid 및 chlorogenic acid 함량 변화를 확인하였음. 배박과 물의 비율은 1:5~30의 비율로 조절하여 추출하고 동결건조 후 함량을 확인하였음. 함량시험 방법은 위의 벨리데이션에 기재한 조건과 동일하게 하여 분석하였음.

○ 추출온도에 따른 Caffeic acid 및 Chlorogenic acid 함량

배박 추출물을 물로 추출시 추출온도에 따른 Caffeic acid 및 Chlorogenic acid 함량 변화를 확인하였음. 함량시험 방법은 위의 벨리데이션에 기재한 조건과 동일하게 하여 분석하였음.

○ 추출시간에 따른 Caffeic acid 및 Chlorogenic acid 함량

배박 추출물을 물로 추출시 추출시간에 따른 Caffeic acid 및 Chlorogenic acid 함량 변화를 확인하였음. 함량시험 방법은 위의 벨리데이션에 기재한 조건과 동일하게 하여 분석하였음.

(2) 실험결과

(가) 추출 용매 비율에 따른 낙과 추출물 내의 Arbutin 함량

위 분석 방법을 바탕으로 하여 배박 EtOH 추출물내의 Arbutin 함량을 측정한 결과 Arbutin은 0% EtOH 추출시에 0.69mg/g으로 최고 함량을 보였으며, EtOH 함량이 증가할수

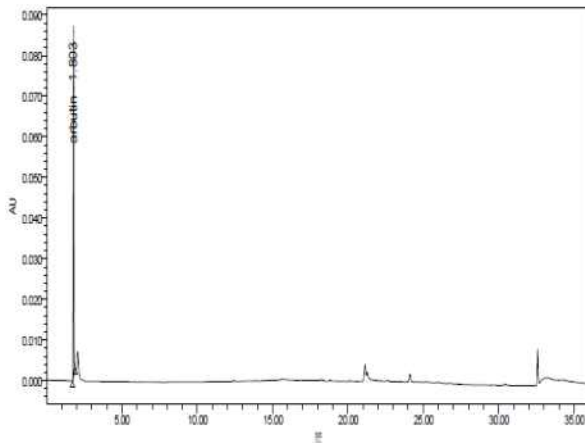
록 함량이 점차 감소하다가 100% EtOH 추출시에 약간 증가하는 하였다. 용매비율에 따른 Arbutin의 함량은 다음과 같다.

추출물내의 Arbutin 함량을 확인해본 결과, 물 추출물의 Arbutin 함량이 가장 높은 것을 볼 수 있었다. 낙과의 EtOH 함량에 따른 추출수율과 추출물의 Arbutin 함량과의 상관관계로 보아 50% EtOH 추출이 추출수율당 Arbutin 함량이 가장 높은 것으로 사료된다.

Table 37. 추출 용매 비율에 따른 낙과 추출물 내에 Arbutin 함량

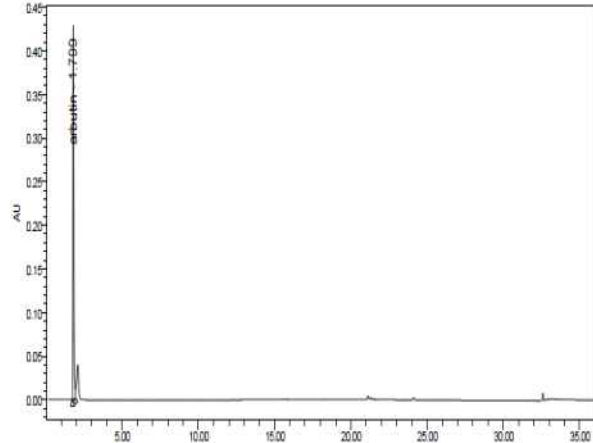
Sample	EtOH (%)	Arbutin (mg/g)
Extract	0	0.690
	25	0.646
	50	0.633
	75	0.623
	100	0.639

(1)

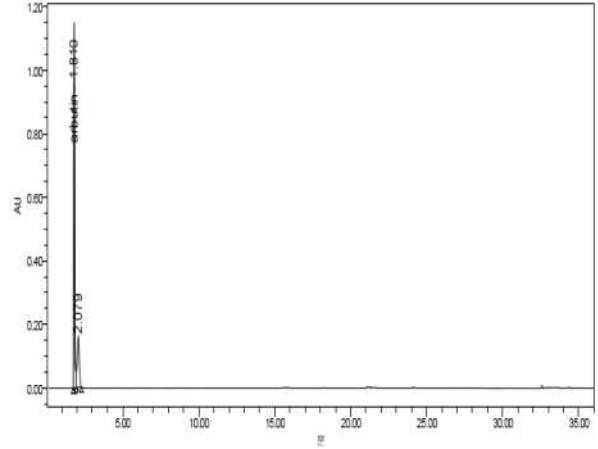
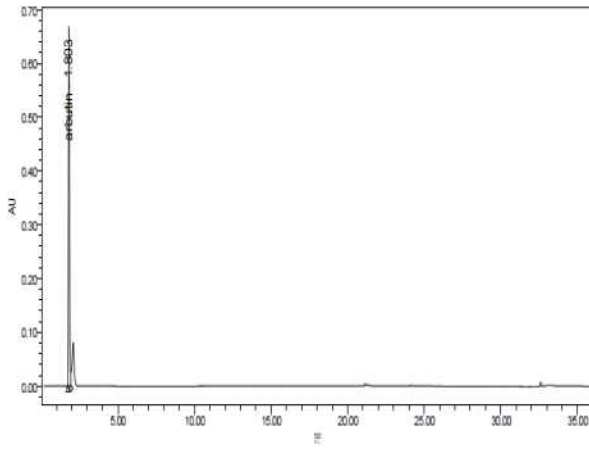


(3)

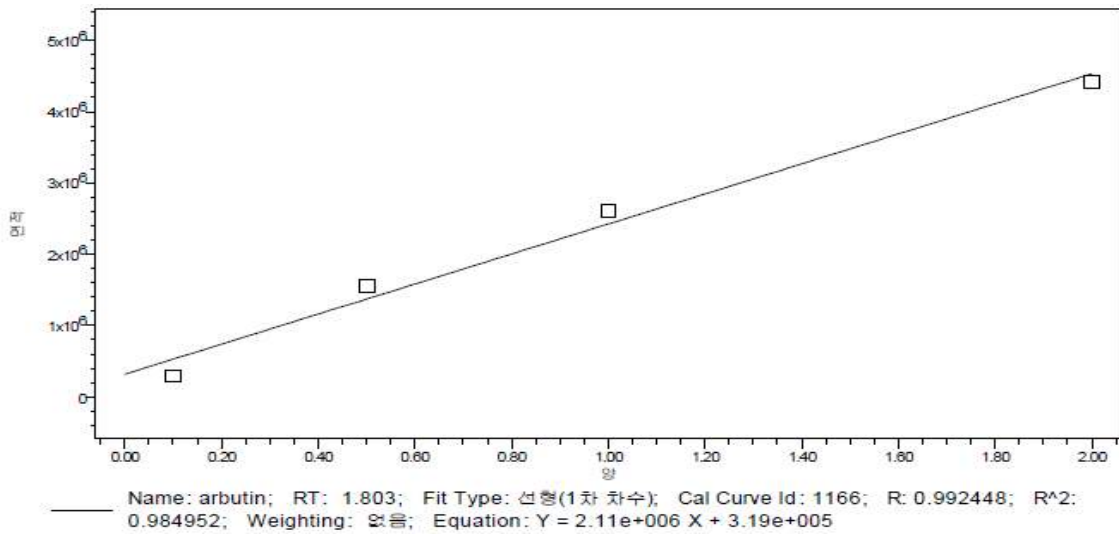
(2)



(4)

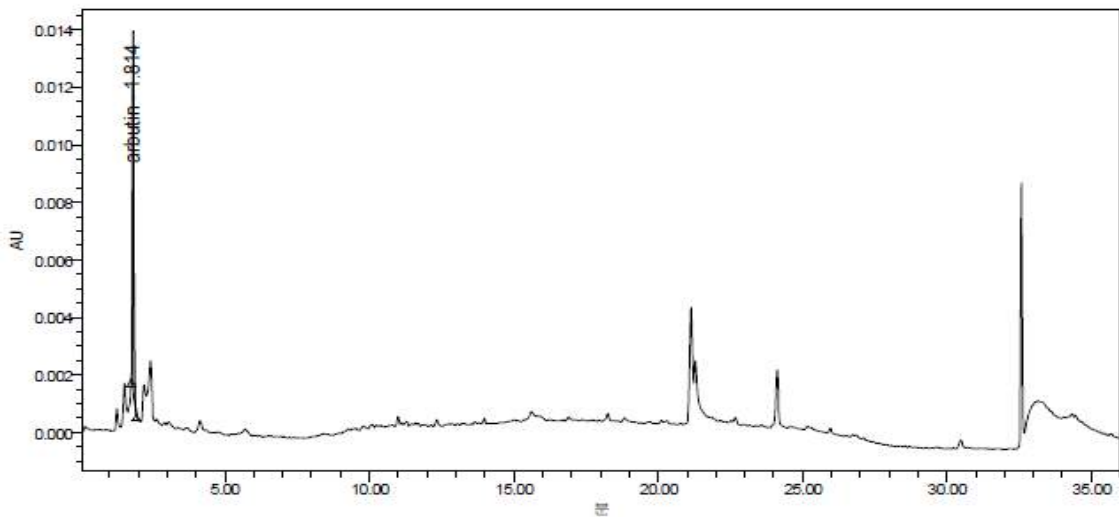


(5)

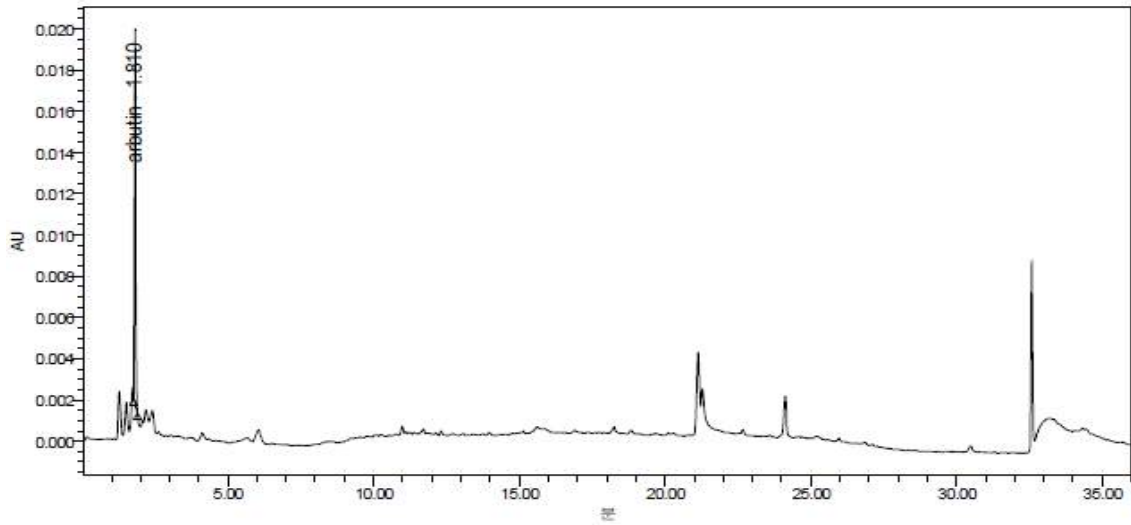


[그림26] Standard and Calibration curve of Arbutin.

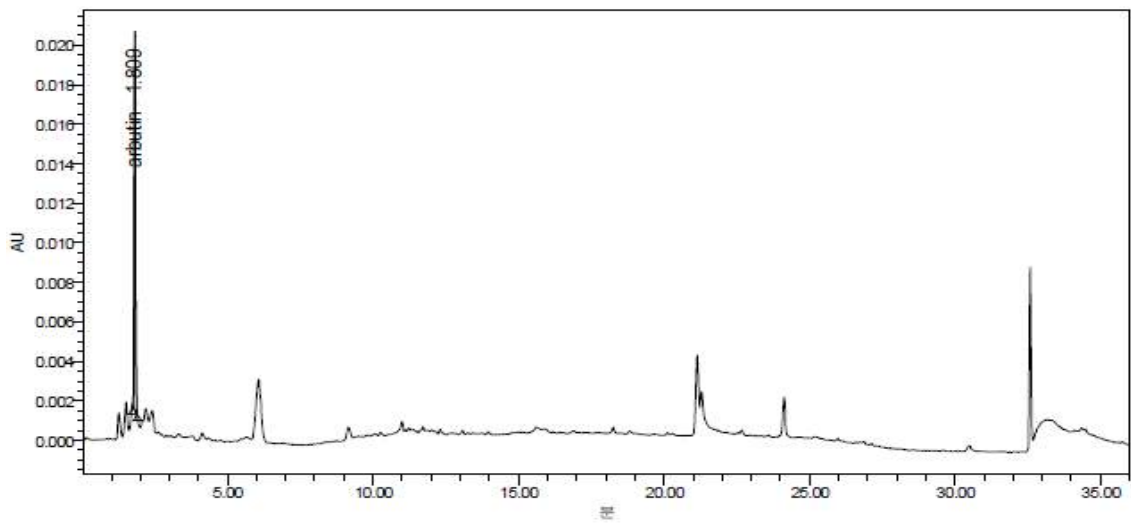
Standard peak; (1) 0.1ug/ul, (2) 0.5ug/ul, (3) 1.0ug/ul, (4) 2.0ug/ul, (5) Calibration curve of Arbutin



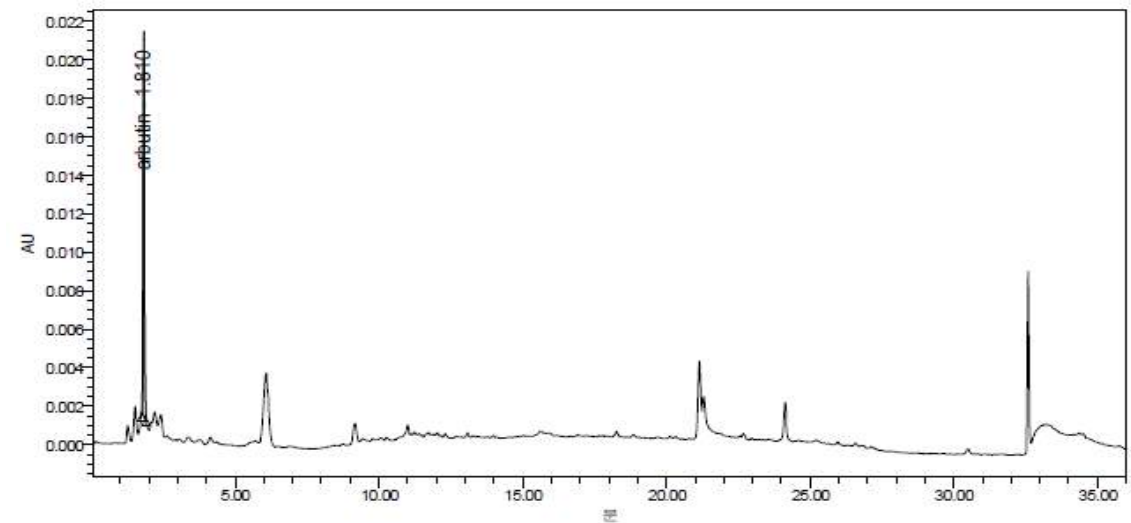
[그림27] 0% EtOH extract: Concentration 20mg/ml.



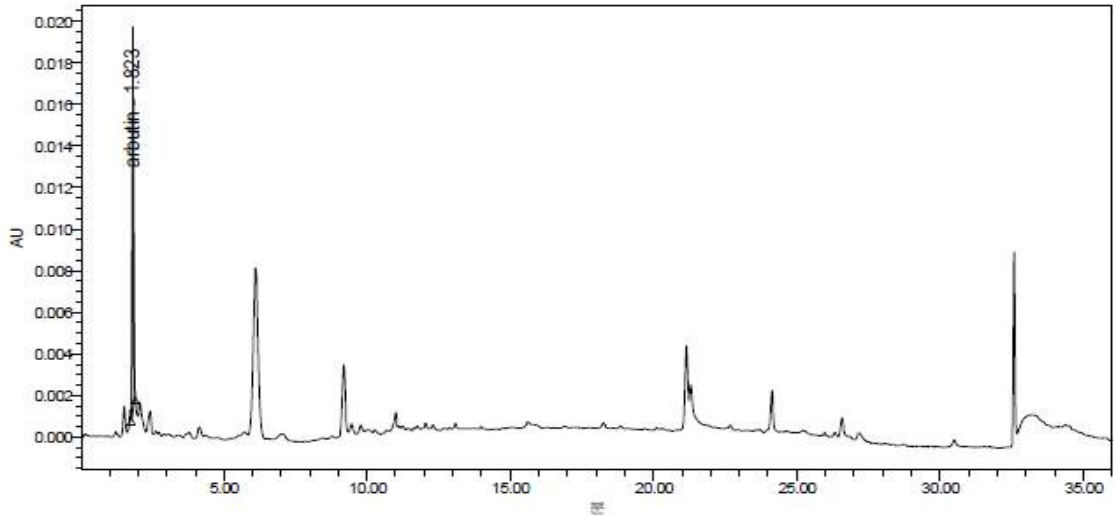
[그림28] 25% EtOH extract: Concentration 20mg/ml.



[그림29] 50% EtOH extract: Concentration 20mg/ml.



[그림30] 75% EtOH extract: Concentration 20mg/ml.



[그림31] 100% EtOH extract: Concentration 20mg/ml.

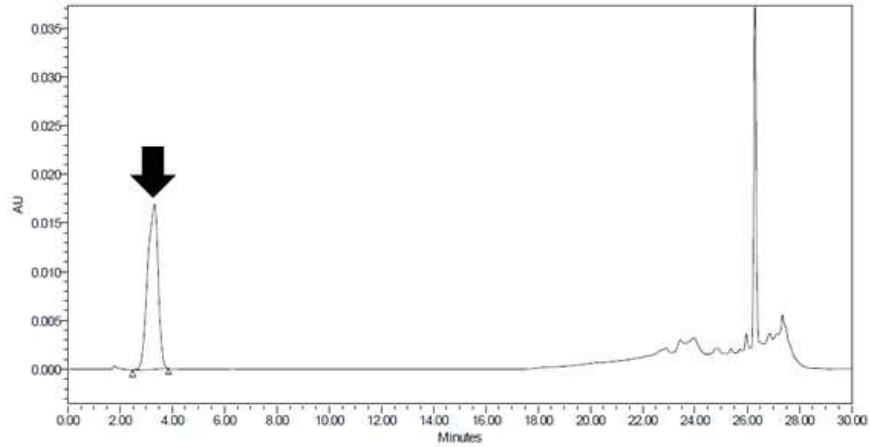
(나) 낙과(미숙과) 유래 소재의 분석법 표준화

① 낙과(미숙과) 추출물에 존재하는 기능성분(Arbutin) 분석법 표준화

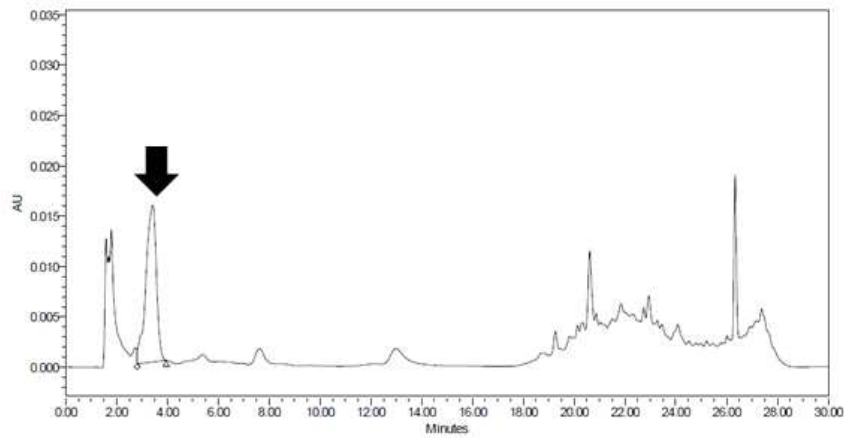
Arbutin 함량 계산을 위해 표준품의 정량 곡선을 0~50ug/ml 범위에서 작성하였으며, Correlation coefficient(R2)값은 0.998이상으로 적합함을 확인하였다.

$$Y=9518.53X-7890.36, \quad Y: \text{피크면적}, X: \text{농도}$$

	농도(ug/mL)	보정농도	분석값				Mean	SD
			1	2	3			
1	3.12500	3.12500	24976	23610	24490	24358.667	692.405	
2	6.25000	6.25000	53561	53089	51790	52813.333	917.117	
3	12.50000	12.50000	112169	110844	109573	110862.000	1298.094	
4	25.00000	25.00000	221417	225373	224009	223599.667	2009.515	
5	50.00000	50.00000	476509	469360	467196	471021.667	4873.792	
Slope			9605.88	9496.34	9453.36	9518.525		
Intercept			-8387.58	-7536.33	-7747.17	(7890.361)		
Correlation coefficient (r2)			0.99893	0.99978	0.99974	1.000		



[그림32] Chromatogram of Arbutin.



[그림33] Arbutin analysis of Pear-pomace Extract.

○ 함량 분석

낙과(미숙과) 추출물들의 함량 분석결과는 아래 Table 28.과 같다. 낙과 추출물에서 각 그룹별로 비교시 신고(S) 품종의 Arbutin 함량이 높은 것으로 확인되었으며, 원황(W) 품종의 추출물이 전체적으로 Arbutin 함량은 낮았다. 신고(S) 품종의 각 추출 조건중에서도 90℃에서 20배수의 추출용매로 4시간 추출 하였을때의 Arbutin 함량이 0.7%로 가장 높았다.



Table 38. 품종별 추출조건에 따른 낙과 추출물의 Arbutin 함량 분석

Sample	Content (%)	Sample	Content (%)	Sample	Content (%)	Sample	Content (%)	Sample	Content (%)
C1	0.125	H1	0.083	S1	0.514	SC1	0.291	W1	0.063
C2	0.114	H2	0.081	S2	0.648	SC2	0.338	W2	0.063
C3	0.118	H3	0.091	S3	0.575	SC3	0.306	W3	0.062
C4	0.127	H4	0.069	S4	0.504	SC4	0.322	W4	0.058
C5	0.189	H5	0.073	S5	0.487	SC5	0.350	W5	0.067
C6	0.118	H6	0.074	S6	0.498	SC6	0.286	W6	0.059
C7	0.110	H7	0.098	S7	0.548	SC7	0.274	W7	0.070
C8	0.200	H8	0.083	S8	0.547	SC8	0.335	W8	0.074
C9	0.178	H9	0.090	S9	0.522	SC9	0.280	W9	0.079
C10	0.185	H10	0.092	S10	0.536	SC10	0.326	W10	0.082
C11	0.246	H11	0.093	S11	0.593	SC11	0.429	W11	0.086
C12	0.221	H12	0.107	S12	0.703	SC12	0.440	W12	0.088
C13	0.258	H13	0.105	S13	0.571	SC13	0.434	W13	0.105
C14	0.206	H14	0.085	S14	0.534	SC14	0.295	W14	0.061
C15	0.293	H16	0.086	S16	0.543	SC16	0.288	W16	0.062
C16	0.205	H17	0.100	S17	0.476	SC17	0.272	W17	0.055
C17	0.215	H18	0.087	S18	0.486	SC18	0.262	W18	0.059
C18	0.205	H19	0.080	S19	0.429	SC19	0.194	W19	0.046

\*.C: 추황, H: 황금, S: 신고, SC: 배 추출박, W: 원황

1~6: 추출용매량 ; 1: 5배수 2: 10배수, 3: 15배수, 4: 20배수, 5: 25배수, 6: 30배수

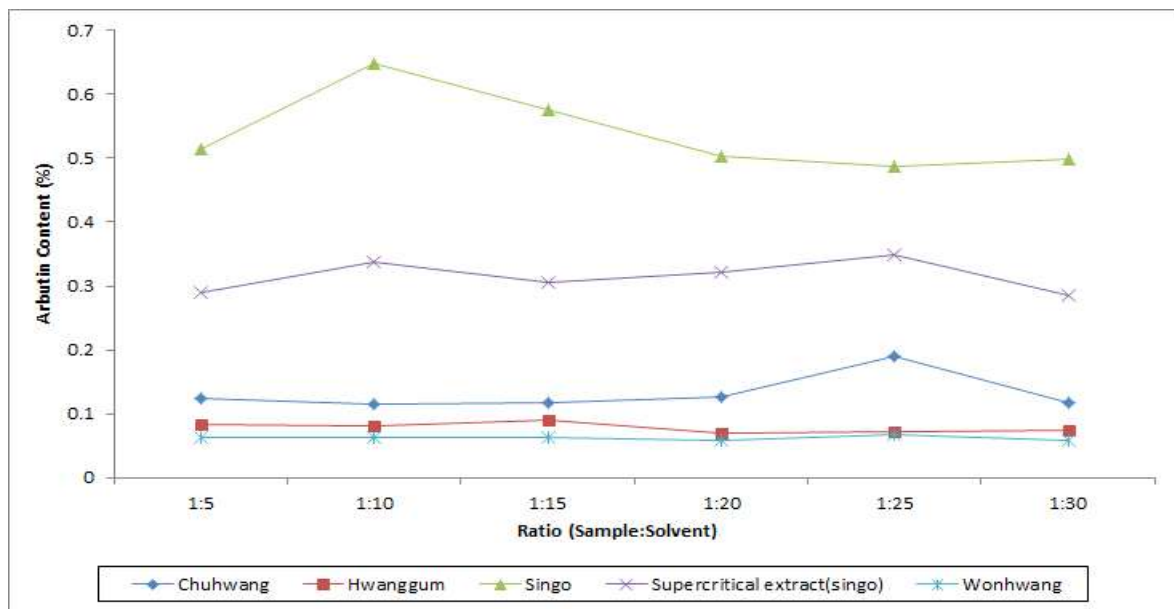
7~13: 추출온도; 7: 40℃, 8: 50℃, 9: 60℃, 10: 70℃, 11: 80℃, 12: 90℃, 13: 100℃

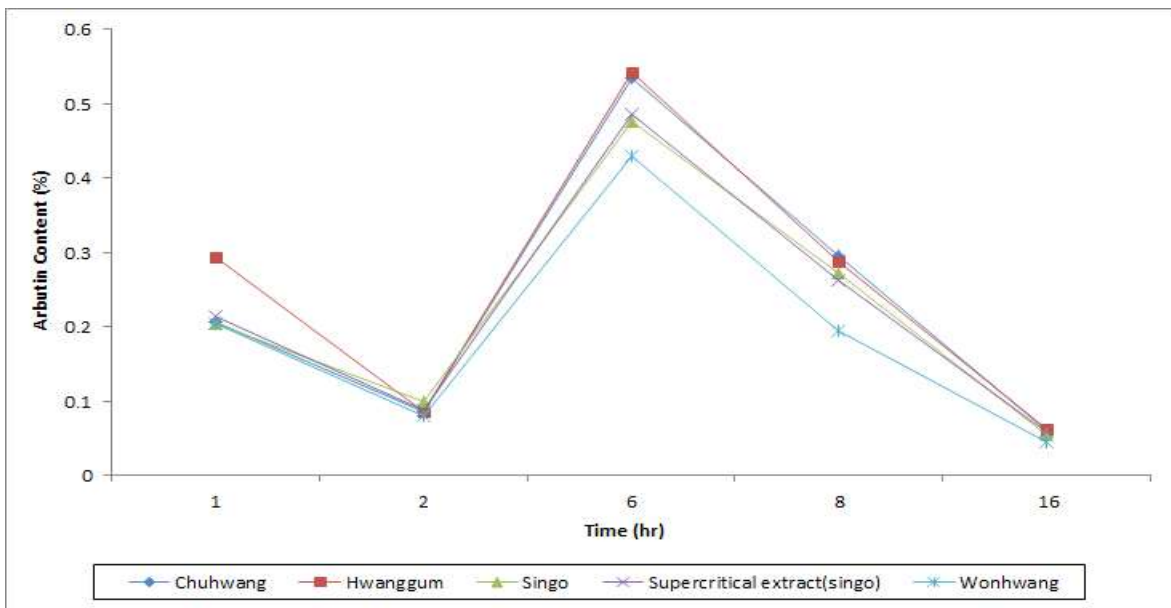
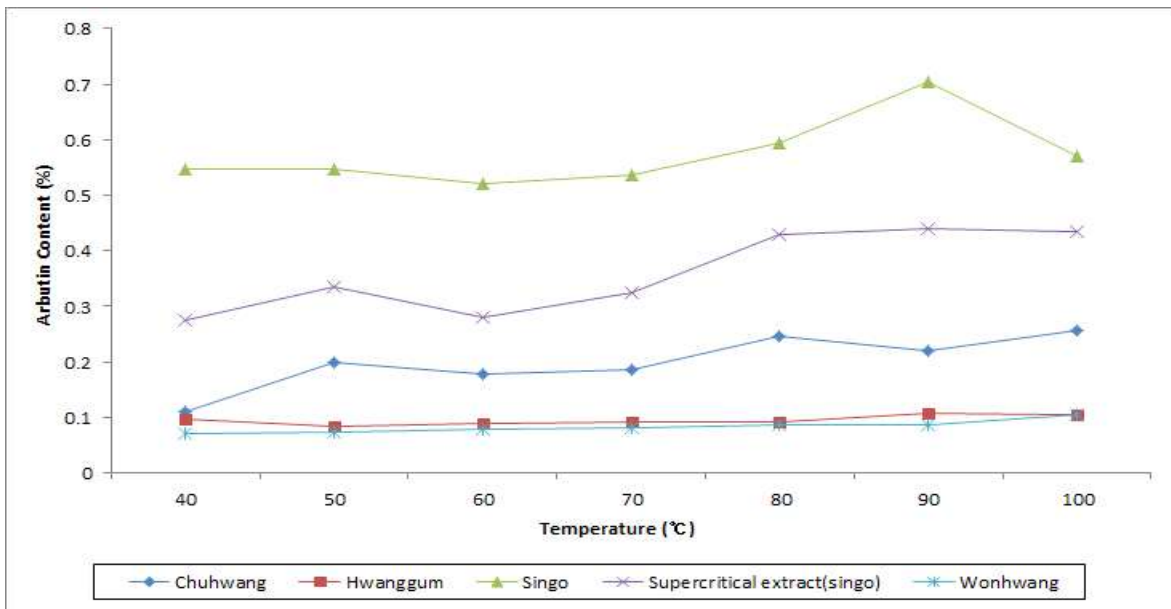
14~18: 추출시간; 14: 1시간, 15: 2시간, 16: 6시간, 17: 8시간, 18: 16시간

\*. Description of Samples.

Wonhwang (W)	Singo (S)	Chuhwang (C)	Pear pomace supercritical extract (SC)	Hwanggum (H)
W-① 추출용매량(1:5)	S-① 추출용매량(1:5)	C-① 추출용매량(1:5)	SC-① 추출용매량(1:5)	H-① 추출용매량(1:5)
W-② 추출용매량(1:10)	S-② 추출용매량(1:10)	C-② 추출용매량(1:10)	SC-② 추출용매량(1:10)	H-② 추출용매량(1:10)
W-③ 추출용매량(1:15)	S-③ 추출용매량(1:15)	C-③ 추출용매량(1:15)	SC-③ 추출용매량(1:15)	H-③ 추출용매량(1:15)
W-④ 추출용매량(1:20)	S-④ 추출용매량(1:20)	C-④ 추출용매량(1:20)	SC-④ 추출용매량(1:20)	H-④ 추출용매량(1:20)
W-⑤ 추출용매량(1:25)	S-⑤ 추출용매량(1:25)	C-⑤ 추출용매량(1:25)	SC-⑤ 추출용매량(1:25)	H-⑤ 추출용매량(1:25)
W-⑥ 추출용매량(1:30)	S-⑥ 추출용매량(1:30)	C-⑥ 추출용매량(1:30)	SC-⑥ 추출용매량(1:30)	H-⑥ 추출용매량(1:30)

W-⑦ 추출온도(40℃)	S-⑦ 추출온도(40℃)	C-⑦ 추출온도(40℃)	SC-⑦ 추출온도(40℃)	H-⑦ 추출온도(40℃)
W-⑧ 추출온도(50℃)	S-⑧ 추출온도(50℃)	C-⑧ 추출온도(50℃)	SC-⑧ 추출온도(50℃)	H-⑧ 추출온도(50℃)
W-⑨ 추출온도(60℃)	S-⑨ 추출온도(60℃)	C-⑨ 추출온도(60℃)	SC-⑨ 추출온도(60℃)	H-⑨ 추출온도(60℃)
W-⑩ 추출온도(70℃)	S-⑩ 추출온도(70℃)	C-⑩ 추출온도(70℃)	SC-⑩ 추출온도(70℃)	H-⑩ 추출온도(70℃)
W-⑪ 추출온도(80℃)	S-⑪ 추출온도(80℃)	C-⑪ 추출온도(80℃)	SC-⑪ 추출온도(80℃)	H-⑪ 추출온도(80℃)
W-⑫ 추출온도(90℃)	S-⑫ 추출온도(90℃)	C-⑫ 추출온도(90℃)	SC-⑫ 추출온도(90℃)	H-⑫ 추출온도(90℃)
W-⑬ 추출온도(100℃)	S-⑬ 추출온도(100℃)	C-⑬ 추출온도(100℃)	SC-⑬ 추출온도(100℃)	H-⑬ 추출온도(100℃)
W-⑭ 추출시간(1시간)	S-⑭ 추출시간(1시간)	C-⑭ 추출시간(1시간)	SC-⑭ 추출시간(1시간)	H-⑭ 추출시간(1시간)
W-⑮ 추출시간(2시간)	S-⑮ 추출시간(2시간)	C-⑮ 추출시간(2시간)	SC-⑮ 추출시간(2시간)	H-⑮ 추출시간(2시간)
W-⑯ 추출시간(6시간)	S-⑯ 추출시간(6시간)	C-⑯ 추출시간(6시간)	SC-⑯ 추출시간(6시간)	H-⑯ 추출시간(6시간)
W-⑰ 추출시간(8시간)	S-⑰ 추출시간(8시간)	C-⑰ 추출시간(8시간)	SC-⑰ 추출시간(8시간)	H-⑰ 추출시간(8시간)
W-⑱ 추출시간(O/N)	S-⑱ 추출시간(O/N)	C-⑱ 추출시간(O/N)	SC-⑱ 추출시간(O/N)	H-⑱ 추출시간(O/N)

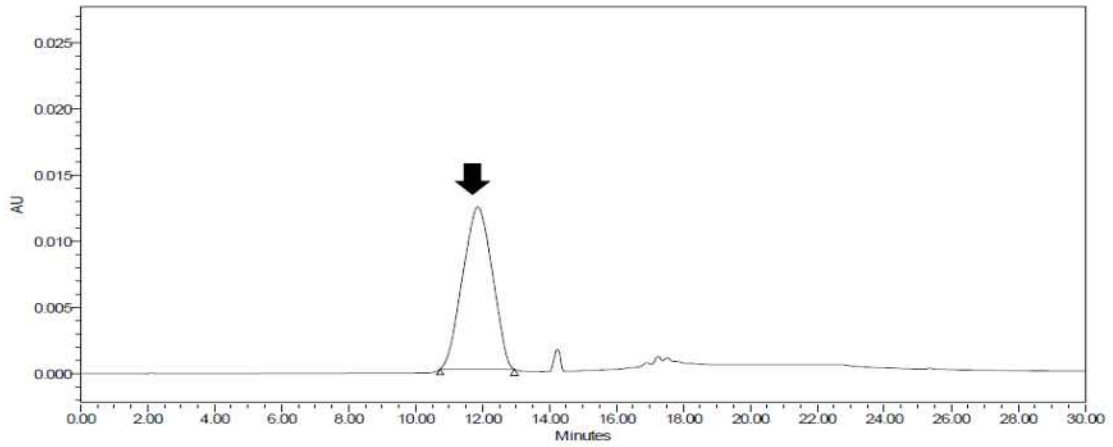




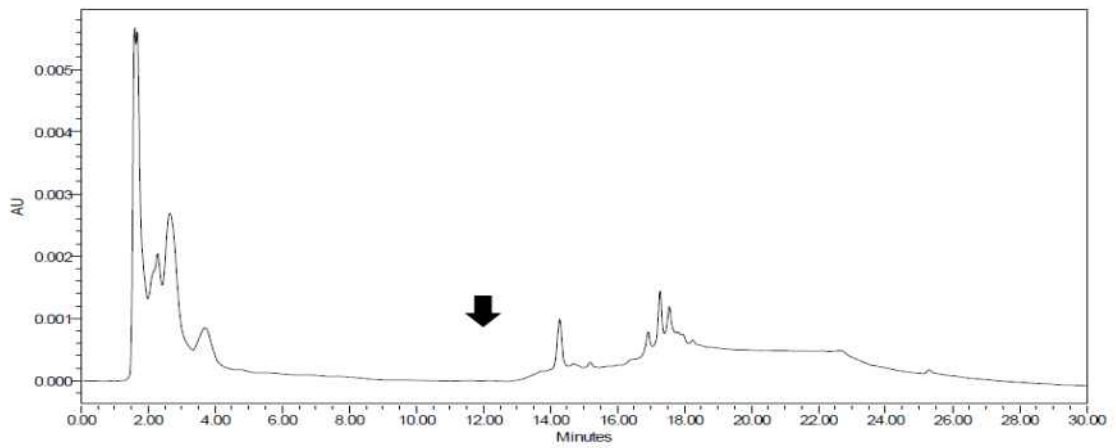
② 낙과(미숙과) 추출물에 존재하는 Rutin 분석법 표준화

㉠ Rutin의 확인

확립한 HPLC 분석법에 의한 Rutin의 크로마토그램은 아래의 Figure와 같다.

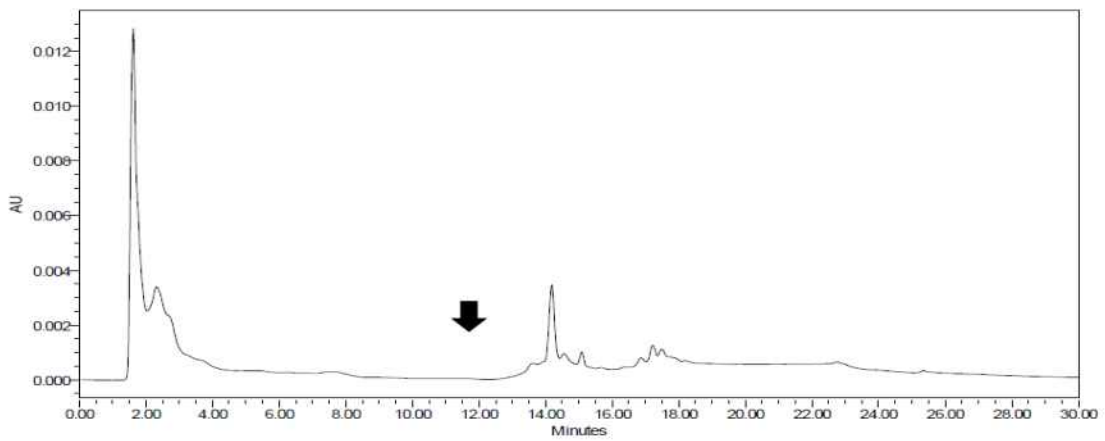


[그림34] Chromatogram of Rutin.



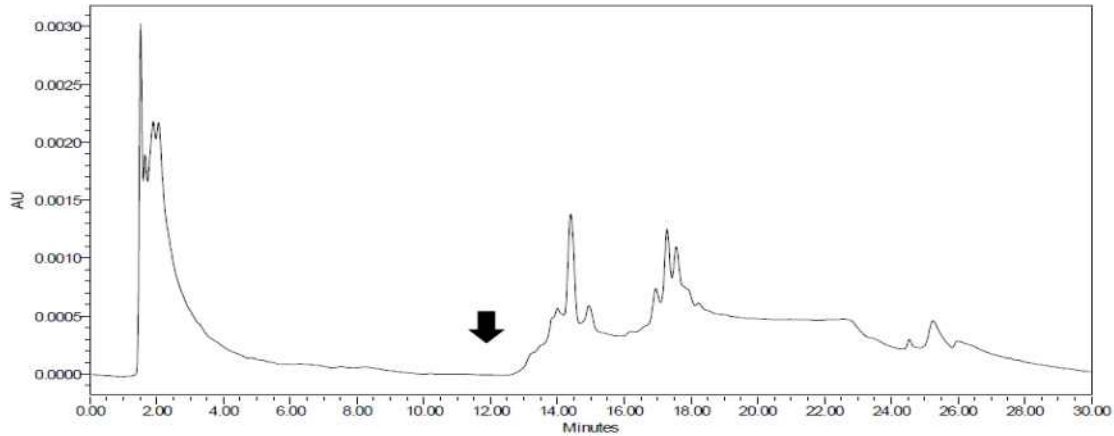
[그림35] Analysis Rutin of Pear-pomace extract(\*C1).

\*C1 : Chuhwang extract



[그림36] Analysis Rutin of Pear-pomace extract(\*S2)(no peak).

\*S2 : Singo extract



[그림37] Analysis Rutin of Pear-pomace extract(\*W3)(no peak).

\*W3 : Wonhwang extract

○ 함량분석

낙과(미숙과) 추출물 내의 Rutin 분석은 C(Chuhwang), S(Singo), W(Wonhwang) group의 Sample을 이용하여 수행되었다. C, S, W조건 of 시료에서는 루틴이 검출되지 않았다.

③ 낙과(미숙과) 추출물에 존재하는 이너뷰티 기능성분(Chlorogenic acid 및 Caffeic acid) 동시분석법(Method Vlidation) 확립

㉠ 정확성(Accuracy)

○ Chlorogenic acid

STD	이론값 (ug/mL)	이론값보정농도 (ug/mL)	Peak Area	참값 (ug/mL)	회수율 (%)	Diffenence (%)
1	12.50	12.50	324464.0	12.2	97.4	0.260
			329919.0	12.4	99.0	0.461
			297806.0	11.2	89.6	0.721
			평균값	11.92	95.35	0.481
			표준편차	0.632	5.059	0.231
2	25.00	25.00	675226.0	25.1	100.3	0.643
			674635.0	25.1	100.3	0.622
			623370.0	23.2	92.7	1.265
			평균값	24.444	97.775	0.843
			표준편차	1.096	4.382	0.365
3	50.00	50.00	1269263.0	46.9	93.9	0.450
			1368621.0	50.6	101.2	0.338
			1377651.0	50.9	101.9	0.060
			평균값	49.497	98.994	0.079
			표준편차	2.213	4.427	0.201

	회수율(%)		Differece(%)	
전체 평균값	97.37		0.536	
전체 표준편차	4.322		0.343	
표본의 크기	9		9	
95% 신뢰구간	94.05	100.69	0.2721	0.7990

○ Caffeic acid

STD	이론값 (ug/mL)	이론값보정농도 (ug/mL)	Peak Area	참값 (ug/mL)	회수율 (%)	Diffence (%)
1	12.50	12.50	640657.0	12.4	99.1	0.328
			647487.0	12.5	100.2	0.466
			585057.0	11.3	90.1	0.795
			평균값	12.06	96.49	0.530
			표준편차	0.692	5.534	0.240

2	25.00	25.00	1295746.0	25.6	102.5	0.684
			1291984.0	25.5	102.2	0.608
			1197966.0	23.6	94.6	1.292
			평균값	24.939	99.758	0.861
			표준편차	1.119	4.477	0.375

3	50.00	50.00	2407622.0	48.1	96.2	0.459
			2589186.0	51.8	103.5	0.344
			2600385.0	52.0	104.0	0.059
			평균값	50.605	101.211	0.081
			표준편차	2.186	4.372	0.206

	회수율(%)		Differece(%)	
전체 평균값	99.15		0.559	
전체 표준편차	4.672		0.350	
표본의 크기	9		9	
95% 신뢰구간	95.56	102.74	0.2906	0.8281

㉞ 정밀성(Precision)

○ Chlorogenic acid

검체		측정값	평균	표준편차	상대표준 편차
농도	측정회수				
12.5	1	342860	324135.7	9218.3192	2.844
	2	318818			

	3	319918			
	4	321276			
	5	320893			
	6	321049			

판정기준  
결과

3% 이하  
적합

검체		측정값	평균	표준편차	상대표준 편차
농도	측정회수				
25	1	689962	697417.7	3802.3858	0.545
	2	700031			
	3	697268			
	4	698109			
	5	699317			
	6	699819			

판정기준  
결과

3% 이하  
적합

검체		측정값	평균	표준편차	상대표준 편차
농도	측정회수				
50	1	1415316	1429407.3	7041.9791	0.493
	2	1431052			
	3	1431018			
	4	1432926			
	5	1431496			
	6	1434636			

판정기준  
결과

3% 이하  
적합

○ Caffeic acid

검체		측정값	평균	표준편차	상대표준 편차
농도	측정회수				
12.5	1	643766	604864.3	19127.315	3.162
	2	594680			
	3	598566			
	4	596250			
	5	599197			
	6	596727			

판정기준  
결과

3% 이하  
적합

검체		측정값	평균	표준편차	상대표준 편차
농도	측정회수				
25	1	1282842	1294756.0	6957.2549	0.537
	2	1298539			
	3	1303560			
	4	1292548			
	5	1294475			

	6	1296572			
판정기준 결과			3% 이하 적합		
검체		측정값	평균	표준편차	상대표준 편차
농도	측정회수				
50	1	2641619	2658869.8	11136.582	0.419
	2	2653389			
	3	2665570			
	4	2655719			
	5	2673642			
	6	2663280			
판정기준 결과			3% 이하 적합		

㉔ 직선성(Linearity)

○ Chlorogenic acid

		Y=27022.22X-7685.92, Y: 피크면적, X: 농도					
	농도(ug/mL)	보정농도	분석값				
			1	2	3	Mean	SD
1	6.25	6.25	170556	168609	156902	165355.667	7385.531
2	12.5	12.5	320953	319120	320249	320107.333	924.675
3	25.0	25.0	652251	699597	697130	682992.667	26651.624
4	50.0	50.0	1327451	1416165	1324824	1356146.667	51993.995
5	100.0	100.0	2701362	2724061	2698021	2707814.667	14168.560

○ Caffeic acid

		Y=49232.2X+26051.58, Y: 피크면적, X: 농도					
	농도(ug/mL)	보정농도	분석값				
			1	2	3	Mean	SD
1	6.25	6.25	327712	327943	309327	321660.667	10681.893
2	12.5	12.5	619322	614467	612921	615570.000	3340.009
3	25.0	25.0	1231089	1321988	1326522	1293199.667	53837.166
4	50.0	50.0	2480628	2665674	2478895	2541732.333	107340.12
5	100.0	100.0	4964129	4961148	4941332	4955536.333	12391.283

㉕ Intra- Inter- day accuracy(일내, 일간 정확성)

Compound		Intraday(n=3)		
Concentration (ug/mL)	Detected (ug/mL, mean ± S.D)	R.S.D. (%)	Recovery (%)	
chlorogenic acid 및 caffeic acid				
12.5	12.17 ± 0.27	2.3	97.38	
	12.24 ± 0.23	1.86	97.90	



25	23.63 ± 0.71	3.0	94.53
	24.06 ± 0.76	3.00	96.27
50	47.87 ± 1.40	2.90	95.75
	48.98 ± 1.40	2.83	97.97
Compound		Interday(n=3)	
Concentration (ug/mL)	Detected (ug/mL, mean ± S.D)	R.S.D. (%)	Recovery (%)
chlorogenic acid 및 caffeic acid			
12.5	11.94 ± 0.21	0.60	95.54
	12.01 ± 0.09	1.72	96.05
25	24.08 ± 0.89	3.70	96.35
	24.57 ± 1.02	4.00	98.29
50	48.51 ± 1.44	2.99	97.02
	49.51 ± 1.53	3.00	99.02

㉔ 특이성(Specificity)

낙과 추출물 추출 제제가 본 분석법에 영향을 미치지 않는지를 확인하기 위하여, 특이성을 검토하였다. 검체로써, 낙과 추출물 추출액에 대표 부형제(유당, 전분)가 포함된 것을 사용하였으며, 표준품과 비교 하였다. 시험법은 위의 기술한 내용과 동일하다. 낙과 추출물 추출 제제를 검체로 하여 고속액체그래피법으로 분석시 부형제는 본 분석법에 영향을 미치지 않음을 확인하였다.

㉕ 낙과 추출물 이너뷰티 기능성분(Chlorogenic acid 및 Caffeic acid) 동시분석법에 의한 함량 측정

○ Chlorogenic acid 및 Caffeic acid을 HPLC를 이용하여 벨리데이션을 수행하였으며 분석법의 타당성을 입증하기 위해 정밀성(Precision), 재현성(Reproducibility), 정확성(Accuracy), 직선성(Linearity), Calibration, 검출한계(Limit of detection), 정량한계(Limit of quatitation), 일내,일간 정확성(Intra, Inter day accuracy)을 수행함. Chlorogenic acid 및 Caffeic acid에 대하여 3가지 다른 농도(12.5, 25, 50ug/ml)에서 정확성을 측정 하였을 때, 시험한 시료의 전체 평균 회수율은 99.27%, 99.15%였으며 표준편차는 0.53%, 0.559%를 보였다.

○ Chlorogenic acid 및 Caffeic acid에 대하여 12.5, 25, 50ug/mL의 시료를 가지고 정밀성을 측정하였을 때, 시험한 시료의 상대표준편차는 Chlorogenic acid는 2.84%, 0.54%, 0.49%, Caffeic acid는 3.16%, 0.53%, 0.41%를 보였다.

○ Chlorogenic acid 및 Caffeic acid으로써 ①6.25, ②12.5, ③25, ④50, ⑤100ug/mL범위의

농도에서 직선성 및 Calibration을 수행하였을 때 직선의 상관계수는 0.9999로써 Calibration에 적합함을 나타내고 있음. 본 분석방법을 통한 LOQ는 3.45ug/ml, 4.9ug/ml LOD는 1.04ug/ml, 1.48ug/ml 이었다.

○ Chlorogenic acid 및 Caffeic acid으로써 12.5, 50, 100ug/mL 범위의 농도에서 일내, 일간 정확성을 타진하였을 때 일내 정확성은 94.52~97.38%, 96.27~97.97%의 회수율을 보였으며 일간 정확성 95.54~97.02%, 96.05~99.02%의 회수율을 보였다.

○ 위의 데이터를 종합하였을 때 Chlorogenic acid 및 Caffeic acid에 대한 위의 HPLC 분석법은 적합함을 알 수 있었다.

PRODUCT	Validation parameters				
	Linearity Regression plot	Accuracy		LOQ (ug/ml)	LOD (ug/ml)
		Mean recovery (%)	RSD (%)		
Chlorogenic acid	y=27022.22X-7685.92	97.37	0.536	3.45	1.03
Caffeic acid	y=49232.2X+26.51.58	99.15	0.559	4.9	1.48

○ 위의 분석법을 이용하여 낙과 추출물에 존재하는 Chlorogenic acid 및 Caffeic acid의 양을 HPLC로 분석함. Chlorogenic acid 및 Caffeic acid의 양은 정량 직선 방정식에 대입하여 계산하였다.

(다) 배박 추출물에 존재하는 이너뷰티 기능성분(Chlorogenic acid 및 Caffeic acid)의 HPLC 분석법 확립 및 함량 분석

① 배박 추출물에 존재하는 이너뷰티 기능성분의 HPLC 분석법 확립

㉠ 정확성

Chlorogenic acid 및 Caffeic acid에 대하여 3가지 다른 농도(12.5, 25, 50ug/ml)에서 정확성을 측정 하였을 때, 시험한 시료의 전체 평균 회수율은 99.27%, 99.15%였으며 표준편차는 0.53%, 0.559%를 보였다.

㉡ 정밀성

Chlorogenic acid 및 Caffeic acid에 대하여 12.5, 25, 50ug/ml의 시료를 가지고 정밀성을 측정하였을 때, 시험한 시료의 상대표준편차는 Chlorogenic acid는 2.84%, 0.54%, 0.49%,

Caffeic acid는 3.16%, 0.53%, 0.41%를 보였다.

㉞ 직선성 및 Calibration

Chlorogenic acid 및 Caffeic acid으로써 ①6.25, ②12.5, ③25, ④50, ⑤100ug/ml 범위의 농도에서 직선성 및 Calibration을 수행하였을 때 직선의 상관계수는 0.9999로써 Calibration에 적합함을 나타내고 있음. 본 분석방법을 통한 LOQ는 3.45ug/ml, 4.9ug/ml, LOD는 1.04ug/ml, 1.48ug/ml 이었다.

㉟ 일내, 일간 정확성

Chlorogenic acid 및 Caffeic acid으로써 12.5, 50, 100ug/ml 범위의 농도에서 일내, 일간 정확성을 타진하였을 때 일내 정확성은 94.52~97.38%, 96.27~97.97%의 회수율을 보였으며 일간 정확성 95.54~97.02%, 96.05~99.02%의 회수율을 보였다.

㊱ 분석법 확립

위의 데이터를 종합하였을 때 Chlorogenic acid 및 Caffeic acid에 대한 위의 HPLC 분석법은 적합함을 알 수 있었다.

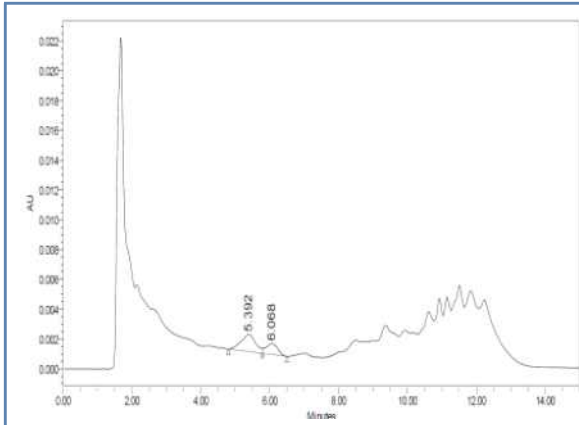
PRODUCT	Validation parameters				
	Linearity Regression plot	Accuracy		LOQ (ug/mL)	LOD (ug/mL)
		Mean recovery (%)	RSD (%)		
Chlorogenic acid	y=27022.22X-7685.92	97.37	0.536	3.45	1.03
Caffeic acid	y=49232.2X+26.51.58	99.15	0.559	4.9	1.48

위의 분석법을 이용하여 배박 추출물에 존재하는 Chlorogenic acid 및 Caffeic acid의 양을 HPLC로 분석함. Chlorogenic acid 및 Caffeic acid의 양은 정량 직선 방정식에 대입하여 계산하였다.

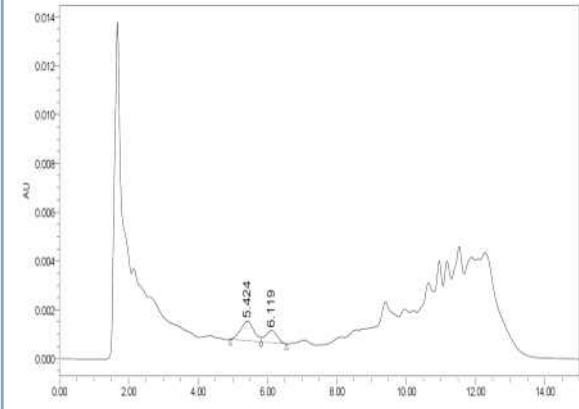
② 추출용매량에 따른 Caffeic acid 및 Chlorogenic acid 함량

아래 데이터에서 보면 배박 추출물은 추출용매(물)의 양에 관계없이 Caffeic acid가 0.016~0.017mg/g의 수율로 추출됨을 알 수 있었으며, Chlorogenic acid는 검출되지 않았다.

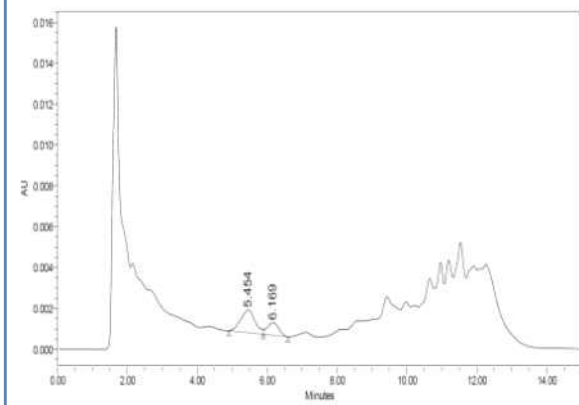
Sample No.	Solvent		pear pomace : solvent (w/v, ration)	Caffeic acid (mg/g)	Chlorogenic acid (mg/g)
	Water (v/v,%)	EtOH (v/v,%)			
S6	100	0	1/5	0.0174	0.0000
S7	100	0	1/10	0.0160	0.0000
S8	100	0	1/15	0.0165	0.0000
S1	100	0	1/20	0.0164	0.0000
S9	100	0	1/25	0.0161	0.0000
S10	100	0	1/30	0.0168	0.0000



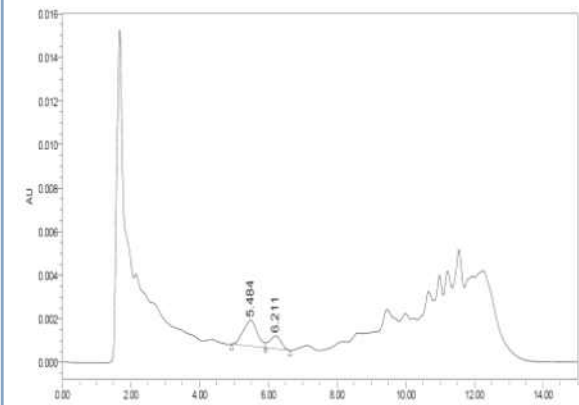
S6 (Sample No 6. 배박:물=1:5)



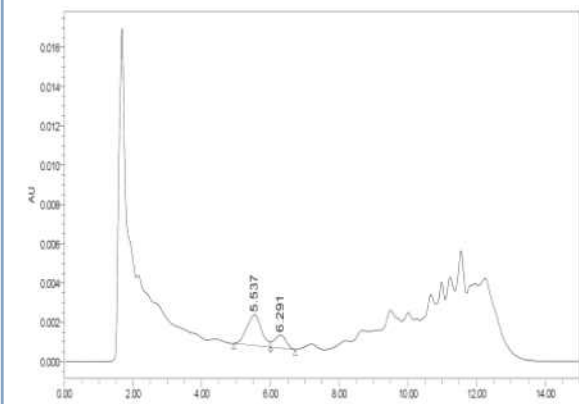
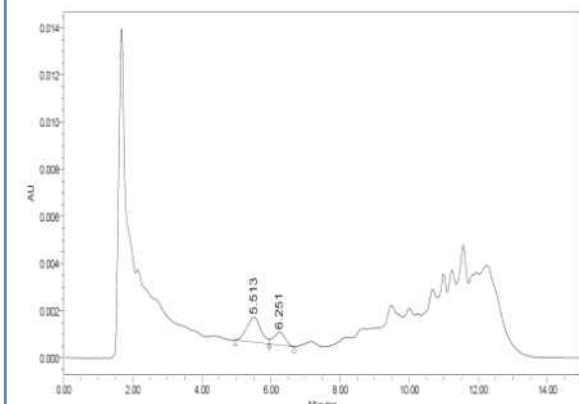
S7 (Sample No 7. 배박:물=1:10)



S8 (Sample No 8. 배박:물=1:15)



S1 (Sample No 1. 배박:물=1:20)



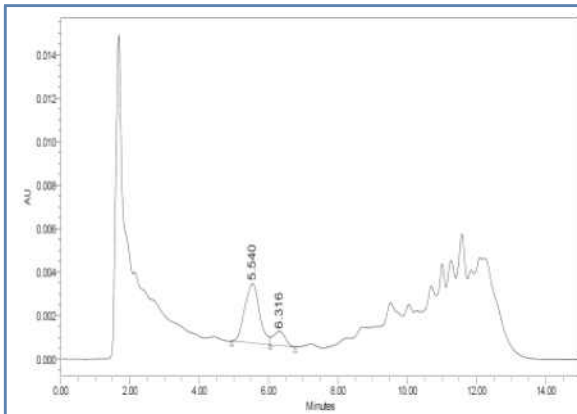
S9 (Sample No 9. 배박:물=1:25)

S10 (Sample No 10. 배박:물=1:30)

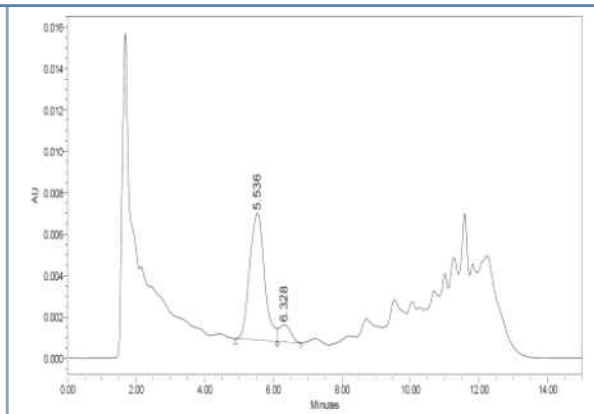
③ 추출온도에 따른 Caffeic acid 및 Chlorogenic acid 함량

위 데이터에서 보면 배박 추출물은 추출온도에 비례하여 증가함을 알 수 있었는데 Caffeic acid가 온도가 증가함에 따라 0.015~0.021mg/g의 수율로 추출됨을 알 수 있었고, Chlorogenic acid는 검출되지 않았다.

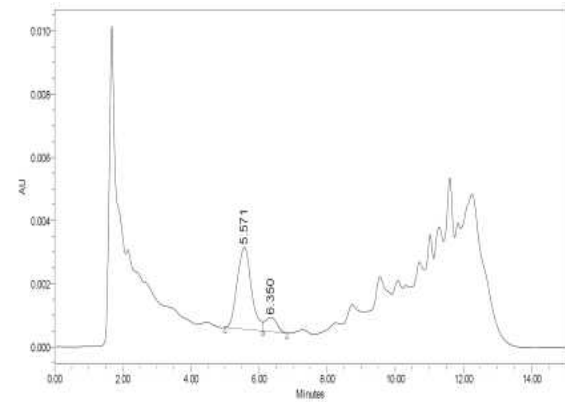
Sample No.	Solvent		pear pomace : solvent (w/v, ration)	Extracting temp(°C)	Extracting time(h)	caffeic acid (mg/g)	Chlorogenic acid (mg/g)
	Water (v/v,%)	EtOH (v/v,%)					
S1	100	0	1/20	RT	12	0.0164	0.0000
S11	100	0	1/20	40	6	0.0169	0.0000
S12	100	0	1/20	50	6	0.0178	0.0000
S13	100	0	1/20	60	6	0.0158	0.0000
S14	100	0	1/20	70	6	0.0175	0.0000
S15	100	0	1/20	80	6	0.0201	0.0000
S16	100	0	1/20	90	6	0.0211	0.0000
S17	100	0	1/20	100	6	0.0195	0.0000



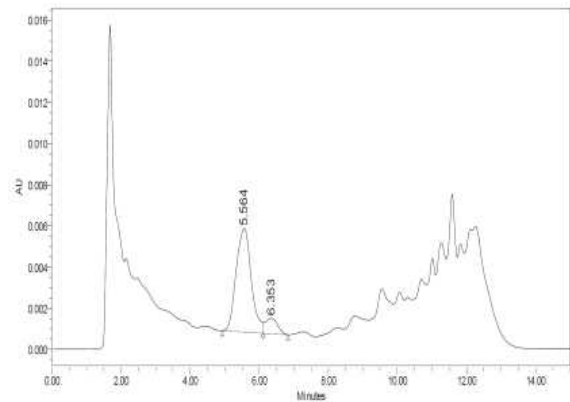
S11 (Sample No 11. 추출온도 40°C)



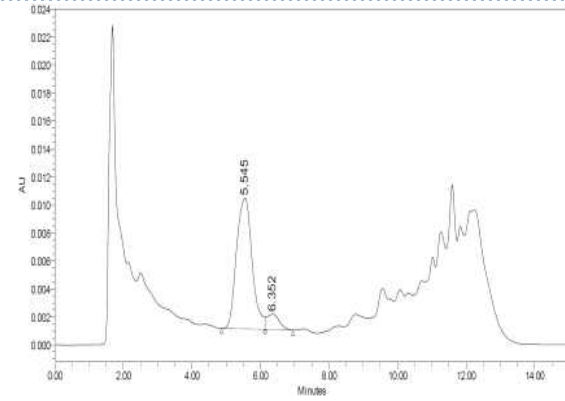
S12 (Sample No 11. 추출온도 50°C )



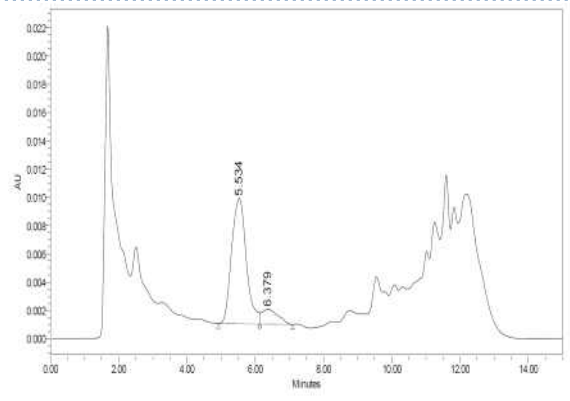
S13 (Sample No 11. 추출온도 60°C)



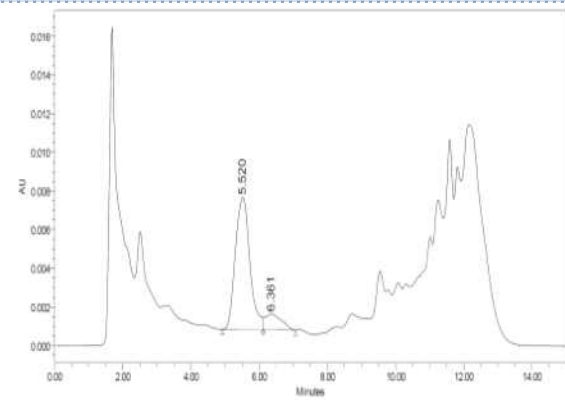
S14 (Sample No 11. 추출온도 70°C)



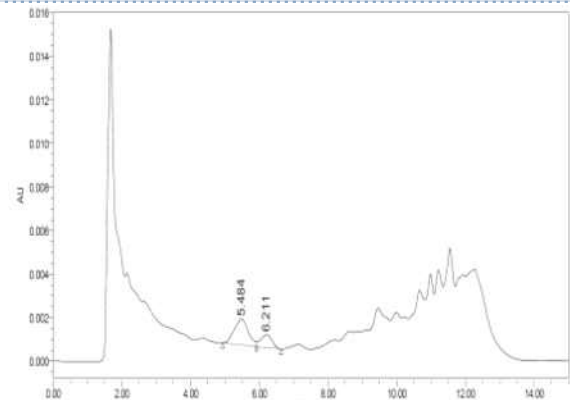
S15 (Sample No 15. 추출온도 80°C)



S16 (Sample No 16. 추출온도 90°C)



S17 (Sample No 17. 추출온도 100°C)



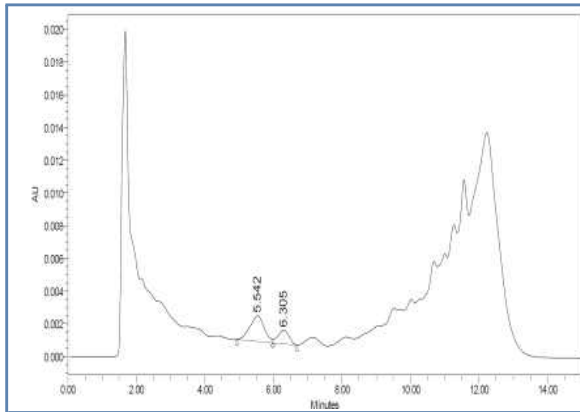
S1 (Sample No 1. RT)

④ 추출시간에 따른 Caffeic acid 및 Chlorogenic acid 함량

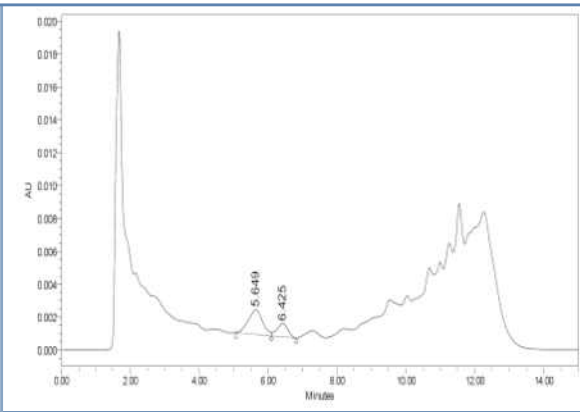
배박 추출물을 물로 추출시 추출시간에 따른 Caffeic acid의 추출수율은 큰 변화가 없었으며, 오히려 추출시간이 증가함에 따라 함량이 소폭 감소하는 경향을 보였다.

Sample No.	Solvent		pear pomace : solvent (w/v, ration)	Extracting temp(°C)	Extracting time(h)	caffeic acid (mg/g)	Chlorogenic acid (mg/g)
	Water (v/v,%)	EtOH (v/v,%)					

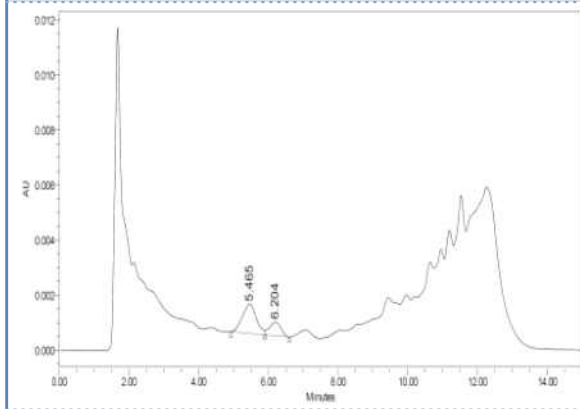
S1	100	0	1/20	RT	12	0.0164	0.0000
S18	100	0	1/20	RT	1	0.0175	0.0000
S19	100	0	1/20	RT	2	0.0174	0.0000
S20	100	0	1/20	RT	4	0.0159	0.0000
S21	100	0	1/20	RT	6	0.0172	0.0000
S22	100	0	1/20	RT	8	0.0160	0.0000
S23	100	0	1/20	RT	12	0.0153	0.0000



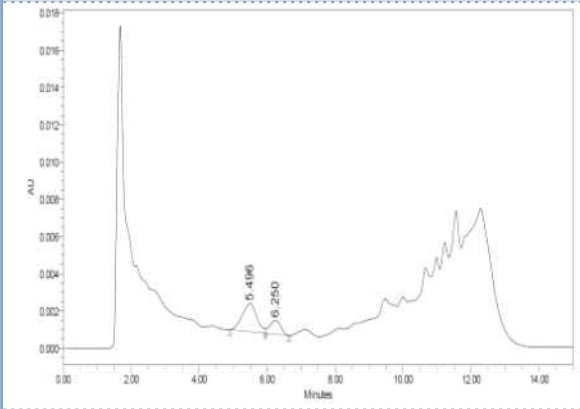
S18 (Sample No 18. Extracting time 1hr)



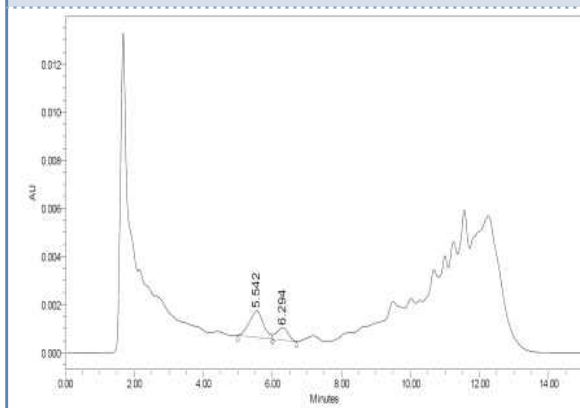
S19 (Sample No 19. Extracting time 2hr)



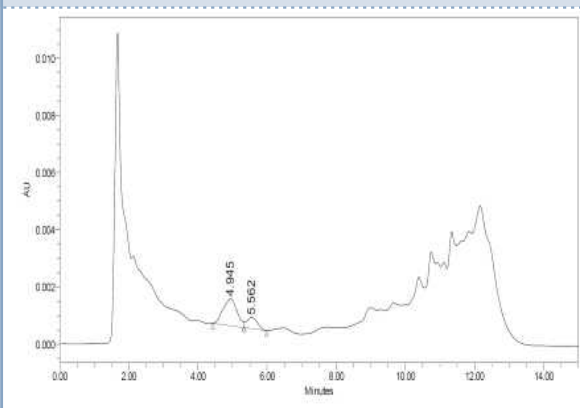
S20 (Sample No 20. Extracting time 4hr)



S21 (Sample No 21. Extracting time 6hr)



S22 (Sample No 22. Extracting time 6hr)



S23 (Sample No 23. Extracting time 12hr)

## ⑤ 결론

배박을 물로 추출 시 물의 양은 Caffeic acid 및 Chlorogenic acid의 추출율과는 관계가 없었으며, 추출온도에 따라서 0.015~0.021mg/g의 수율로 추출됨을 알 수 있었다. 또한 추출시간에 따라 시간이 증가할수록 추출율이 증가하지 않고 Caffeic acid의 경우 오히려 소폭 감소하는 경향을 나타냈다.

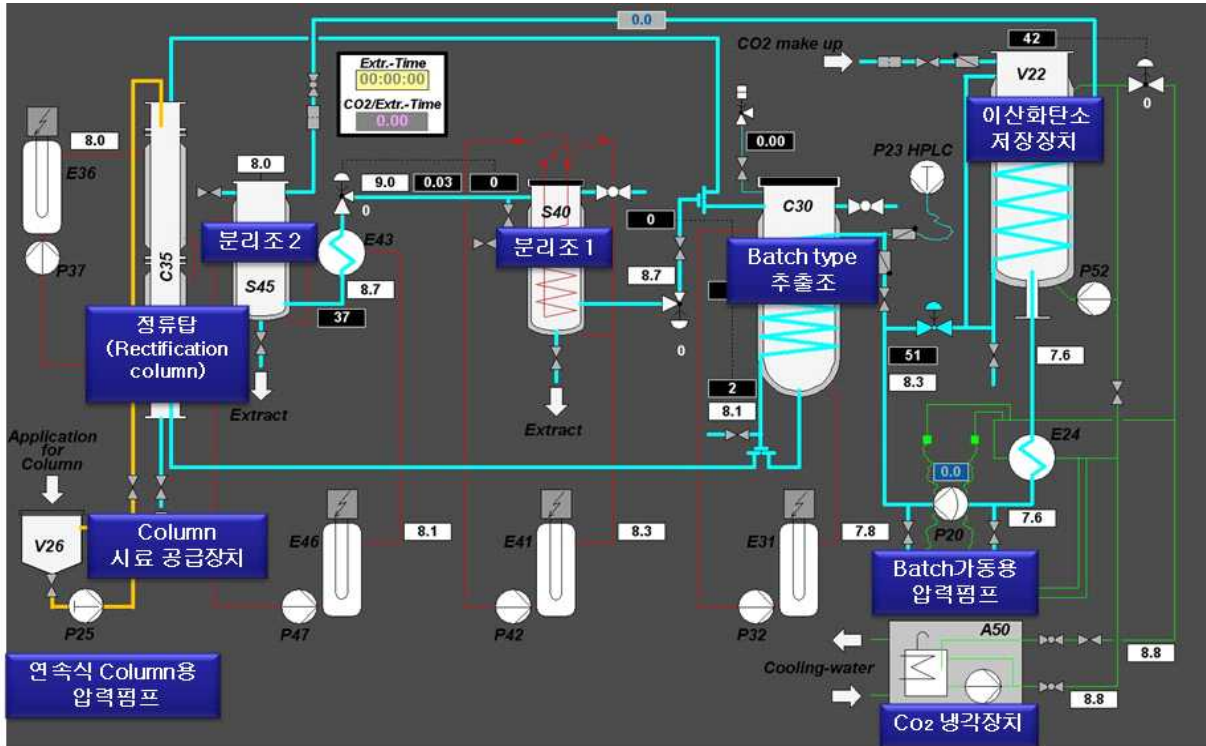
마. 면역 조절 개선능 이너뷰티용 유효성분 전처리(초임계) 녹색기술적용

### (1) 실험방법

#### (가) 낙과 착즙박 초임계 추출

낙과(미숙과)를 착즙하고 남은 착즙박을 동결건조하여 분쇄한 분말을 시료로 사용하였다. 시료 1kg을 초임계 추출기(Natex Co., Australia)의 추출조에 투입한 후에 추출하였고, 초임계 유체로 이산화탄소를 사용하였으며, 분리조에서 모아지는 추출물을 초임계 이산화탄소 추출물로 사용하였고, 보조용매로 발효주정(95%)을 사용하여 분리조에서 모아지는 추출물을 초임계 이산화탄소-EtOH 추출물로 사용하였다. 추출조건은 40℃의 추출온도에서 150, 250, 350bar의 추출압력으로 각각 추출하였다.





[그림38] Supercritical fluid extract (SFE)

(나) 낙과 초임계 추출

분쇄된 낙과 시료를 추출조에 1kg을 넣어 추출기의 온도 50℃에서 추출압력을 150, 250, 350bar의 조건으로 초임계 이산화탄소 추출을 하였다. 보조 용매로 발효주정(99.5%)을 5ml/min 투입하여 2시간 추출 하였으며, 추출 후에 보조 용매를 이용하지 않고 이산화탄소만으로 2시간 추출하여 추출물을 각각 회수한 후, 각각의 추출물은 회수 한 후, 농축하여 동결건조 하였고, 추출박은 따로 회수하여 냉동보관하여 실험에 사용하였다.

(다) 배박 초임계 추출물의 미백 효과 측정

B16F10 세포에  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone( $\alpha$ -MSH)와 배박 초임계 추출물을 함께 처리 하여 3일간 배양하고 세포를 수거하여 Phosphate-buffered saline (PBS)로 2번 세척하였다. 그 후에 10% Dimethylsulfoxide(DMSO, Ameresco, Solon, Ohio, USA)가 함유된 1N NaOH를 적정량 넣고 80℃에서 1시간 반응시킨 후, ELISA reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) 실험결과

(가) 낙과 착즙박 초임계 추출

(가) 낙과 초임계 추출

낙과 분말을 이용하여 각각의 조건별로 추출하여 추출물을 회수한 결과는 아래 Table 30.과 같다. 추출 압력에 따른 추출량은 유의적인 결과를 보이지 않았으며, 추출압력이 높을수록 보조 용매로 사용한 발효주정의 투입량이 소폭 감소하는 것을 확인 할 수 있었다.

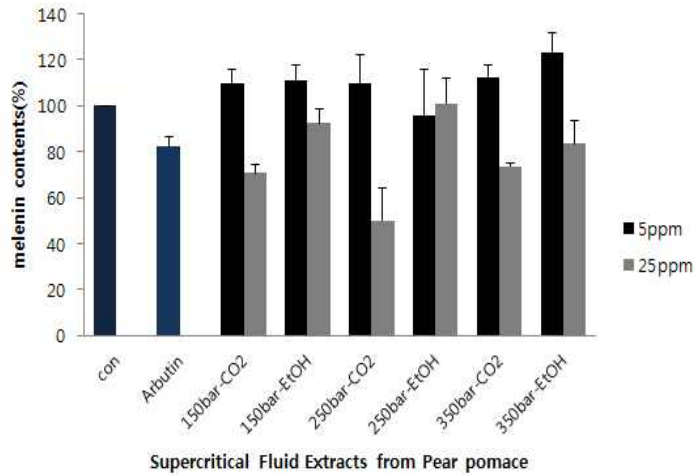
Table 39. 추출조건에 따른 낙과 초임계 추출량

추출조건				추출물 회수량 (g)	비고
시료 투입량 (g)	추출압력 (bar)	추출온도 (°C)	보조용매 여부 (발효주정 99.5%)		
1,000	150	50	5ml/min	246.78	주정 투입량 : 580ml
			-	196.68	-
1,000	250	50	5ml/min	221.77	주정 투입량 : 570ml
			-	208.05	-
1,000	350	50	5ml/min	267.77	주정 투입량 : 560ml
			-	147.60	-

(나) 낙과 배박 초임계 추출물의 미백 효과 측정

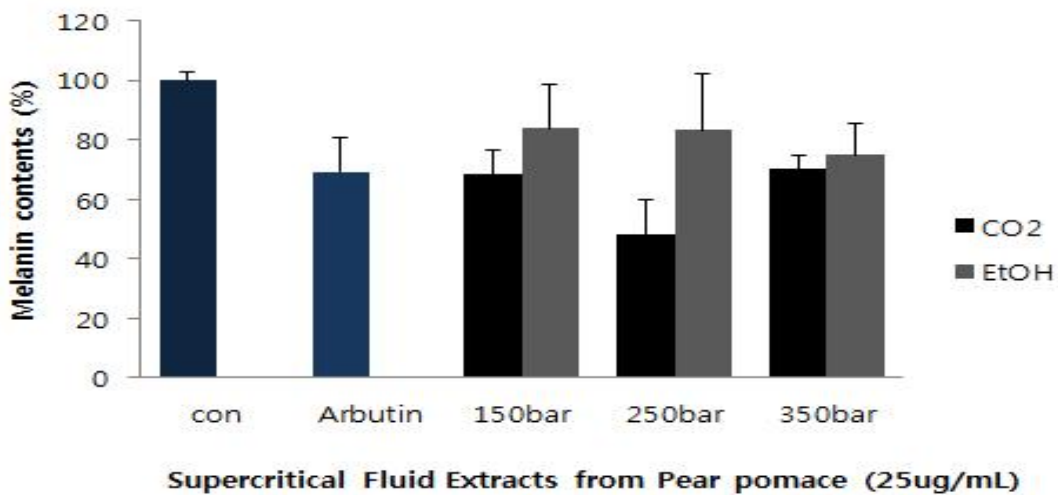
① B16F10 Melanoma 세포에서의 Melanin 생성 측정

낙과 배박 초임계 추출물은 압력조건 150bar, 250bar, 350bar에서의 CO<sub>2</sub>유체 추출물과 보조용매 주정 유체 추출물을 각 5,25µg/ml 농도로 처리하여 Melanoma 세포에서의 Melanin 생합성 저해활성을 측정하였다. 그 결과 25µg/ml 농도에서 저해활성을 나타내었으며, 25µg/ml로 농도를 정하여 반복 실험한 결과로 250bar CO<sub>2</sub>유체 추출물이 52% 저해 효과로 양성대조군 Arbutin 31% 보다 더 우수한 Melanin 생합성 저해 효과를 나타냈다. 전체적으로 주정 유체 추출물에 비하여 CO<sub>2</sub> 유체 추출물이 Melanin 생성 저해 효과가 강한 것으로 나타났다.



5ppm	CO2	EtOH
150bar	109.76±5.86	110.73±7.19
250bar	109.44±12.75	95.60±19.92
350bar	112.45±5.11	122.85±9.03

25ppm	CO2	EtOH
150bar	70.71±3.41	92.38±6.22
250bar	50±14.31	100.97±11.25
350bar	73.61±1.45	83.48±10.26



[그림39] Inhibition melanin synthesis of supercritical fluid extracts from pear pomace on B16F10 melanoma cells. The cells were incubated with pear pomace supercritical fluid extracts for 4day in 5% CO2 incubator at 37°C.

## ■ 낙과(미숙과)유래 이너뷰티소재의 기능성 효능평가 ■

### I. 연구재료 및 방법

#### 1. *in vitro* 기능성 평가

: *in vitro*에서 낙과의 항산화 활성 효과

##### ① DPPH radical assay

- DPPH radical 소거활성은 Park 등의 방법에 따라 측정 하였다. 추출물 500 μl 과 에탄올 500 μl 을 혼합하고 여기에 250 μl 의 0.5 mM 1,1 henyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 용액을 첨

가하여 실온에서 30분 동안 방치 한 후 517 nm에서 흡광도를 측정 하였다. 대조구는 시료 대신 500 µl의 증류수를 이용하였으며, blank 시험은 DPPH와 증류수 대신 750 µl의 에탄올을 사용하였다.

$$\text{Effect\%} = 100 \times [A_{\text{control}} - (A_{\text{compound}} - A_{\text{color}})] / A_{\text{control}}$$

IC<sub>50</sub> represents the sample concentration at which 50% of the DPPH radical was scavenged.

## ② Nitric oxide 소거활성

- Nitric oxide radical (NO)의 소거 활성은 Griess Illosvoy 반응에 의하여 측정 하였다. 낙과 미숙과 추출물 0.5 ml에 10 mM sodium nitroprusside 2 ml와 0.01 M 인산완충용액 (pH 7.4) 0.5 ml를 첨가하여 25°C의 incubator에서 150분 반응 시킨 후 반응물 중 0.5ml를 취하여 0.1 ml의 sulfanilic acid와 혼합한 후 5분간 반응 시키고 여기에 0.1% naphthylethylenediamine dihydro-chloride 1.0 ml를 첨가 하여 실온에서 30분 반응 시킨 후 540 nm에서 측정 하였다.

## ③ Hydroxyl radical 소거활성

- Hydroxyl radical (HO)의 소거활성은 Chung과 Kim의 방법에 따라 ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA)가 포함된 Fenton 반응계( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H} + \text{OH}^-$ )에서 분석 하였다. 즉, 시험관에 10 mM  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10 mM EDTA 및 10mM 2-deoxyribose를 각각 0.2 ml 혼합한 Fenton 반응 혼합물에 시료용액 0.2 ml와 0.1 M 인산완충용액(pH 7.4) 1.0 ml를 넣어 총 1.8 ml로 조제하였다. 여기에 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  2.0 ml를 가하고 37°C의 incubator에서 4시간 반응시킨 다음 2.8% trichloroacetic acid (TCA)용액 1.0 ml와 1.0% thiobarbituric acid (TBA) 용액 1 ml를 가하여 100°C에서 10분간 반응시킨 후 급속히 냉각하고 395×g에서 5분간 원심 분리시킨 후 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 2. 이너 뷰티 케어 소재의 cell-based assay 기능성 평가

: 대식세포를 이용한 항산화 효과 측정

### ① 세포 배양

- 본 실험에서 사용한 마우스 대식 세포 주 Raw 264.7 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, America)으로부터 분양을 받았다. Raw 264.7 세포는 100 Units/mL penicillin, 100 µg/ml streptomycin과 10% newborn calf serum (FCS, GIBCO)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO) 배지의 조건에서 5% CO<sub>2</sub>와 37°C의 세

포 배양기에서 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

② 세포 독성 측정

- 추출물의 RAW 264.7 세포에 대한 독성을 측정하기 위하여 96 well plate에  $1 \times 10^4$  cells/well이 되도록 분주 하였으며 24시간 배양 후에 추출물을 처리 후 24시간을 배양하였다. 그 후 3-(4,5-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 용액을 각 well에 첨가하여 4시간 동안 반응 시켰다. MTT 용액을 제거 하고 DMSO 50  $\mu$ l을 가하여 540 nm에서 ELISA reader를 이용하여 측정하였다.

③ Nitric oxide 생성 저해활성

- LPS에 의해 유도된 Nitric oxide (NO) 생성 저해 활성을 측정하기 위하여 24well plate에  $2 \times 10^5$  cells/well이 되도록 분주하여 12시간 동안 배양하고 추출물을 농도별로 처리 한 후 1시간 동안 배양하였다. 배양 후 LPS (1  $\mu$ g/ml)를 처리하였으며 처리 후 24시간을 더 배양하였다. 배양 후 상층 액 100  $\mu$ l를 취하고 동량의 Griess 시약을 첨가 하고 10분간 실온에서 방치 하였다. 방치가 끝난 후 570 nm에서 ELISA reader를 이용하여 측정하였다. 시료를 넣지 않은 대조군의 흡광도를 100%로 하여 상대적인 활성을 비교 하였다.

3. 이너 뷰티 케어 소재의 in vivo 기능성 평가

: 실험동물을 이용한 항산화 효과 측정

① 실험동물

- 실험동물은 3주령 수컷 (Sprague Dawley)를 구입하여, 사료와 물을 공급하면서 일주일간 적응을 시킨 후 실험에 사용하였다. 물과 사료는 자유롭게 섭취시키며, 실험기간 동안 사육환경은 온도  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도  $55 \pm 5\%$  내외로 유지 시켰으며 명암주기는 12시간 주기로 일정하게 하였다. 실험 군은 Table40과 같이 구성 되었다.

Table 40. Experimental design

Groups	Diet composition	Intubation	Dose (mg/kg b.w)
ND-C	Nomal diet [15% kcal fat (soy bean oil)]	distilled water	
HECD-C	High-fat/cholesterol diet [40% kcal fat (milk fat+1% corn oil) containing 0.21% cholesterol]	distilled water	
FPW		fallen pear water	200
		extract	400
FP-50% EtOH		fallen pear	200
		50% ethanol extract	400
FP-100% EtOH		fallen pear	200
		100% ethanol extract	400
PPW	pear pomace	200	
	water extract	400	

② 혈액 및 간 균질 액 조제

- 실험 식이로 5주간 사육이 끝난 후 채취한 혈액은 4°C, 3,000×g에서 10분간 원심분리 하여 혈청을 얻고, 즉시 -70°C의 냉동고에서 넣어 급속 동결시켜 보관하였다. 간 조직은 적출한 후 간 무게의 10배 양의 Tris-HCl buffer(25 mM, pH 7.4)를 가하여 즉시 polytron homogenizer를 이용하여 분쇄한 후 600×g에서 10분간 원심분리 하여 핵 부분을 제거하고, 다시 12,000×g에서 20분간 원심분리 하여 침전물에 일정량의 Tris-HCl buffer(25 mM, pH 7.4)를 가하고 현탁시켜 미토콘드리아(mitochondria) 분획으로 하고, 상층 액을 다시 105,000×g에서 1시간 동안 초 원심분리 하여 상층 액을 사이토졸(cytosol) 분획으로, 그 침전물에 일정량의 Tris-HCl buffer (25 mM, pH 7.4)를 가하고 현탁시켜 마이크로솜(microsome) 분획으로 하였다. 모든 조건은 4°C에서 수행하였으며 소량으로 나누어 -70°C의 냉동고에 보관하여 항산화 효소 활성과 지질과산화물 측정에 이용하였다.

③ 혈장 총 항산화 능 측정

- 혈장의 total antioxidant status (TAS)는 ELISA kit (RandoxCo., Antrim, UK)를 이용하여 분석 하였다. 분석원리는 ABTS (2,2-azino-di-[3-ethylbinzthiazoline sulphonate])를 peroxidase 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 함께 배양시키면 청록색의 ABTS 양이온기가 생성되며 600 nm에서 흡광도를 측정하였고, 이는 검체 중에 존재하는 항산화물질에 의해 발색이 억제되고 그 정도는 항산화물질 농도에 비례한다.

④ 혈액의 생화학적 분석

- Alanine amino transferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), BUN등을 각각 자동

생화학 분석 장치(Beackman)를 이용하여 측정하였다.

#### ⑤ 간의 항산화 효소 계 활성 측정

- 간의 glutathione peroxidase (GSH-Px) 활성은 Peglia & Valentine(1967)수정 보완된 방법을 이용하여 측정하였다. 효소 활성은 1분 동안 1  $\mu$ M NADPH를 산화시키는 효소의 양을 1 unit로 계산 하였으며, 단백질 값으로 보정하였다. 간의 glutathione sulfur transferase (GST)의 활성도는 Habig et al(1974)의 방법 원리를 이용한 ELISA kit (Sigma, USA)를 이용하여 측정한다. 활성 단위는 1분간 mg protein이 생성한 2,4-dinitrobenzene glutathione의 340 nm에서의 흡광계수로 환산하여 나타낸다. 효소의 specific activity을 산출하기 위한 단백질 농도는 Bradford methods 를 이용하여 측정하였다.

#### ⑥ 간의 지질과산화물 측정

- 간의 지질 과산화물 (thiobarbituric acid reactive substrate, TBARS)는 ELISA kit (Oxitec o., USA) 를 이용하여 thiobarbituric acid (TBA)와 반응하여 생성된 thiobarbituric acid reactive substance (TBARS)양으로 측정하는 Yagi K(1994)의 방법을 이용하여 측정하였다.

#### ⑦ 통계처리

- 모든 실험결과는 최소한 3회 이상 반복하여 평균치  $\pm$  표준오차로 표시하였고, 각 군과의 비교는 ANOVA test 후 Duncan's multiple test를 이용하여 군 간의 유의성을 판정하였다. ( $p < 0.05$ )

## II. 연구결과

### 1. in vitro 기능성 평가

: in vitro에서 낙과의 항산화 활성 효과

#### ① DPPH radical 소거 활성

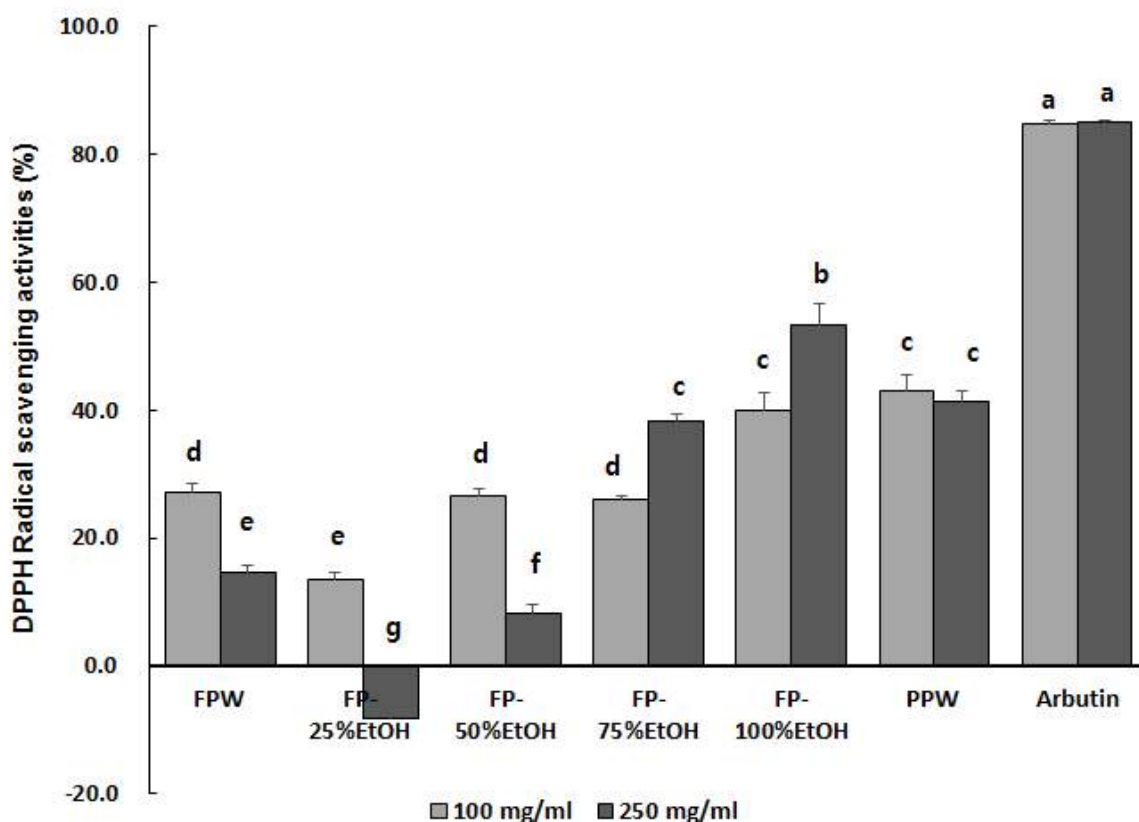
- 유해산소로 알려져 있는 활성 산소 종은 산소라이칼 및 이것으로부터 파생된 여러 가지 산소화합물을 통칭하는 것으로 화학적 성질로 인해 환원된 free radical인 superoxide anion radical( $O_2^-$ ), hydroxyl radical( $\cdot OH$ ) 및 hydrogen peroxide( $H_2O_2$ ) 등이 있다.

- Free radical은 비 공유 전자를 갖고 있기 때문에 불안정하고 반응력이 높아 여러 생체 물질과 쉽게 반응하게 되고, 끊임없이 체내 고분자들을 공격하여 결국에는 세포와 조직에 비가역적인 손상을 초래하거나 돌연변이, 세포 독성 및 발암 등을 유발한다.

- 항산화 물질의 가장 특징적인 기작은 유리기와 반응하는 것으로 free radical 소거 작용

은 활성라디칼에 전자를 공여하여 항산화 효과나 인체에서 노화를 억제하는 척도로 이용되고 있다.

- 천연물이 가지는 자유 라디칼 소거활성을 측정하기 위해 널리 사용되는 대표적 방법은 DPPH system이다.
- 본 연구에서는 낙과 추출물을 조건에 따라(물 추출물, 25% Ethanol, 50% Ethanol, 75% Ethanol, 100% Ethanol 추출물) 분석하고, 배박 물 추출물과 알부틴(arbutin) 성분과 활성을 비교하였다.
- 실험결과, 낙과 100% 에탄올 추출물의 DPPH 소거활성은 농도 의존적으로 증가하였으며, 배박 물 추출물이 낙과 추출물에 비해 더 큰 DPPH 소거활성 효과가 관찰되었다. 또한, 알부틴은 약 90% 정도의 DPPH 소거 활성이 뛰어난 것을 볼 수 있었다. [그림40]



[그림40] Effect of fallen pear and, pear pomace extracts and arbutin on the DPPH radical scavenging activity.

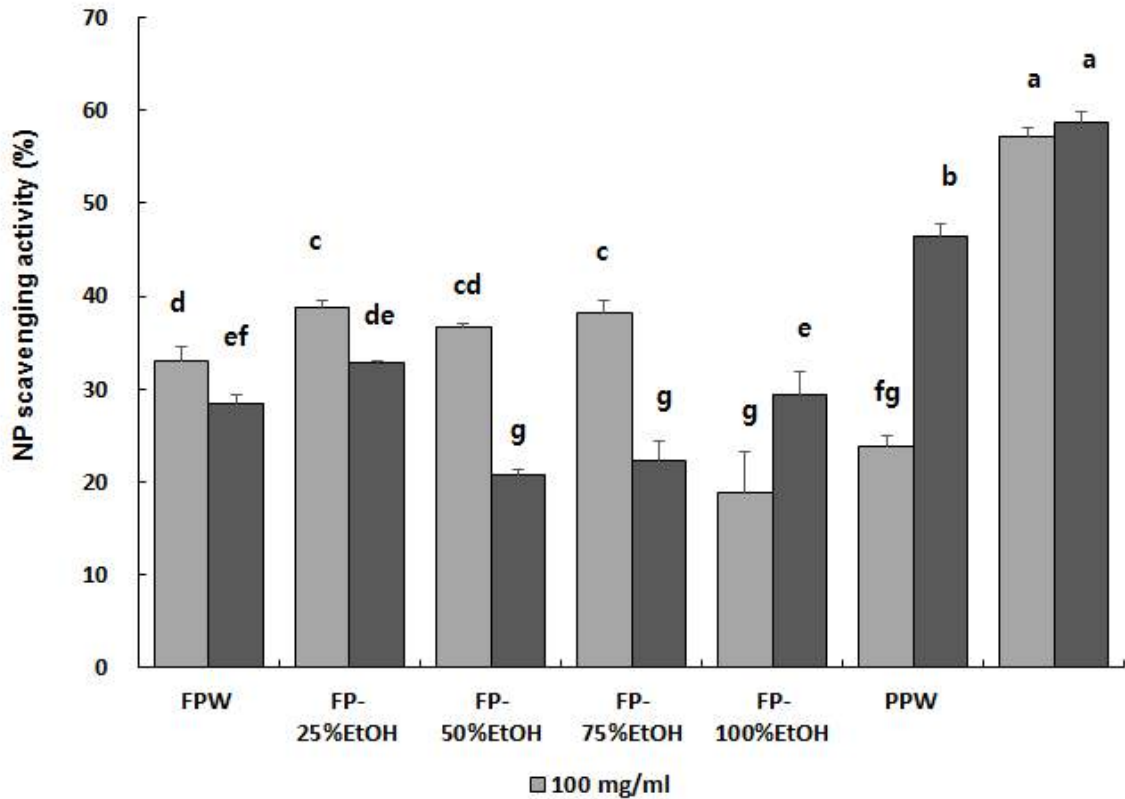
FPW: fallen pear water extract, FP-25% EtOH 100: fallen pear 25% ethanol extract 200 µg/mL , FP-25% EtOH 250: fallen pear 25% ethanol extract 250 µg/mL, FP-50% EtOH 100: fallen pear 50% ethanol extract 200 µg/mL , FP-50% EtOH 250: fallen pear 50% ethanol extract 250 µg/mL, FP-75% EtOH 100: fallen pear 75% ethanol extract 200 µg/mL , FP-75% EtOH 250: fallen pear 75% ethanol extract 250 µg/mL, FP-100% EtOH 100: fallen pear 100% ethanol extract 200 µg/mL , FP-100% EtOH 250: fallen pear 100% ethanol extract 250 µg/mL, PPW: pear pomace water extract 100 µg/mL, PPW 250: pear pomace water extract 250 µg/mL, arbutin 100: arbutin 100 µg/mL, arbutin 250: arbutin 250M µg/mL. Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )



- 이상의 결과는 낙과 100% 에탄올 추출물, 배박 물 추출물이 산화적인 스트레스를 예방할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 알부틴의 함량이 높은 분획(fraction)이 항산화 활성이 높을 것으로 기대되므로 알부틴 함유율이 높은 분획의 분리가 필요한 것으로 사료된다.

## ② Nitric oxide radical 소거 활성

- Nitric oxide (NO)는 혈액응고 및 혈압조절 기능, 암세포에 대한 면역 능 등이 있지만, 과량이 존재하게 되면 인체에 유해한 영향을 미치게 되어 세포손상뿐만 아니라 염증반응을 비롯한 뇌막염, 알츠하이머병과 파킨슨병 같은 퇴행성 질환에 중요한 요인으로 작용한다. 뿐만 아니라 NO는 superoxide 음이온과 쉽게 반응하여 매우 반응성이 높고 독성이 강한 산화제인 peroxynitrite (ONOO-)를 생성하게 된다.
- 본 연구에서는 낙과 추출물과 배박 물 추출물, 알부틴 성분의 NO 소거활성을 비교한 결과, 배박 물 추출물과 알부틴 성분에서 NO 소거활성이 뛰어난 것을 확인 하였다. 특히 알부틴 성분의 NO 소거 활성이 가장 높음을 알 수 있었다.
- 낙과 추출물의 경우 배박 물 추출물과 알부틴(arbutin) 성분 보다는 NO 소거능이 다소 낮았지만 40%에 가까운 소거활성을 보였다. [그림41]



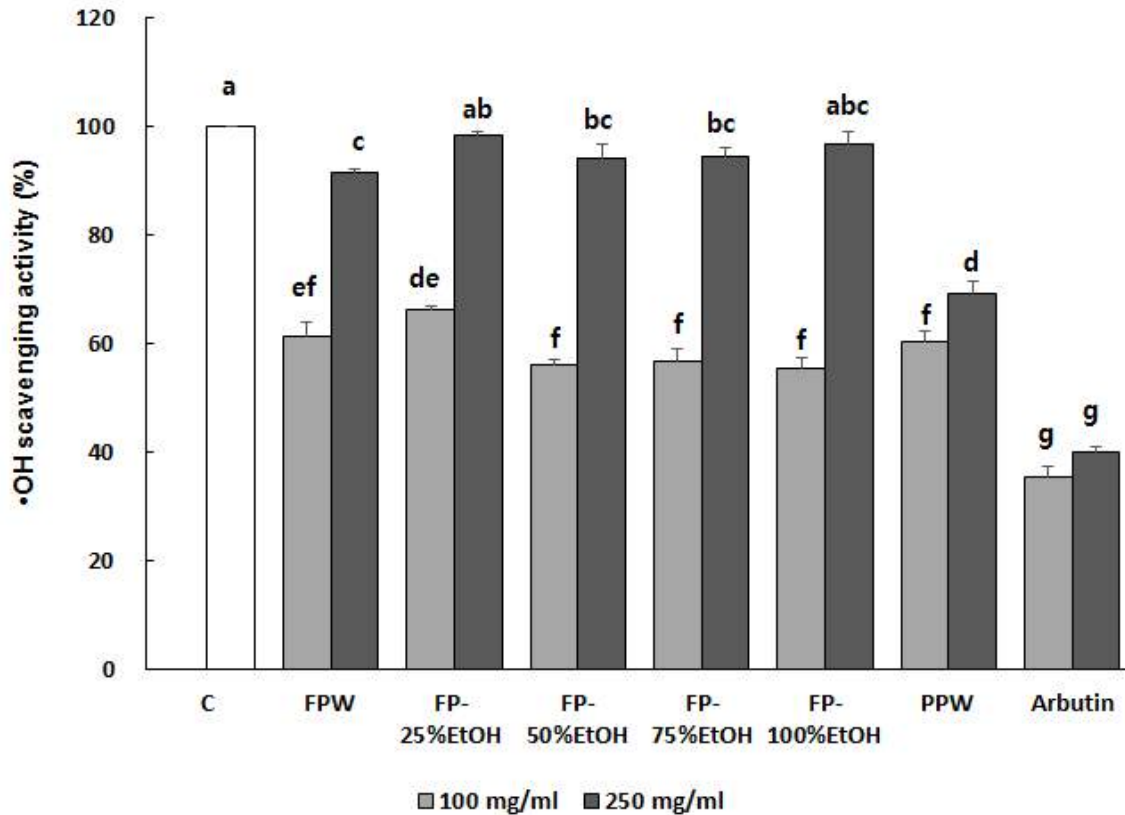
[그림41] Effect of fallen pear and, pear pomace extracts and arbutin on the nitric oxide radical scavenging activity.

FPW: fallen pear water extract, FP-25% EtOH 100: fallen pear 25% ethanol extract 200  $\mu\text{g/mL}$ , FP-25% EtOH 250: fallen pear 25% ethanol extract 250  $\mu\text{g/mL}$ , FP-50% EtOH 100: fallen pear 50% ethanol extract 200  $\mu\text{g/mL}$ , FP-50% EtOH 250: fallen pear 50% ethanol extract 250  $\mu\text{g/mL}$ , FP-75% EtOH 100: fallen pear 75% ethanol extract 200  $\mu\text{g/mL}$ , FP-75% EtOH 250: fallen pear 75% ethanol extract 250  $\mu\text{g/mL}$ , FP-100% EtOH 100: fallen pear 100% ethanol extract 200  $\mu\text{g/mL}$ , FP-100% EtOH 250: fallen pear 100% ethanol extract 250  $\mu\text{g/mL}$ , PPW: pear pomace water extract 100  $\mu\text{g/mL}$ , PPW 250: pear pomace water extract 250  $\mu\text{g/mL}$ , arbutin 100: arbutin 100  $\mu\text{g/mL}$ , arbutin 250: arbutin 250M  $\mu\text{g/mL}$ . Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

### ③ Hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ) 소거활성

- Hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ )의 활성산소 중 반응성이 매우 강하여 생체 산화에 주된 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 특히  $\cdot\text{OH}$ 은 DNA의 purine과 pyrimidine염기를 무차별적으로 공격하여 다양하게 변형시킬 뿐 아니라 deoxyribose 부분을 공격하여 DNA사슬의 절단을 일으킨다. 암, 동맥경화증, 자가 변역 질환, 관절염, 폐질환, 당뇨병, 심근경색증, 뇌 및 신경 질환 등의 발생과 진행결과에 자유 라디칼(free radical)이 관여 하고 있다는 증거들이 많이 보고되고 있다.
- 실험결과, 낙과 물 추출물과 에탄올 추출물의 ( $\cdot\text{OH}$ )소거 활성은 농도 의존적으로 증가하였으나 대조군(C)에 비해 활성이 낮았다. 또한, 낙과 추출물이 배박 물 추출물과 알부틴에 비해 더 큰 ( $\cdot\text{OH}$ )소거 활성 효과가 관찰되었다 [그림42]

- 배박 물 추출물과 알부틴의 경우 DPPH 소거 활성과 NO의 소거 활성은 높았지만 (·OH) 소거 활성이 다소 낮았다.



[그림42] Effect of fallen pear and, pear pomace extracts and arbutin on the hydroxyl radical scavenging activity.

FPW: fallen pear water extract, FP-25% EtOH 100: fallen pear 25% ethanol extract 200 µg/mL, FP-25% EtOH 250: fallen pear 25% ethanol extract 250 µg/mL, FP-50% EtOH 100: fallen pear 50% ethanol extract 200 µg/mL, FP-50% EtOH 250: fallen pear 50% ethanol extract 250 µg/mL, FP-75% EtOH 100: fallen pear 75% ethanol extract 200 µg/mL, FP-75% EtOH 250: fallen pear 75% ethanol extract 250 µg/mL, FP-100% EtOH 100: fallen pear 100% ethanol extract 200 µg/mL, FP-100% EtOH 250: fallen pear 100% ethanol extract 250 µg/mL, PPW: pear pomace water extract 100 µg/mL, PPW 250: pear pomace water extract 250 µg/mL, arbutin 100: arbutin 100 µg/mL, arbutin 250: arbutin 250 µg/mL. Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

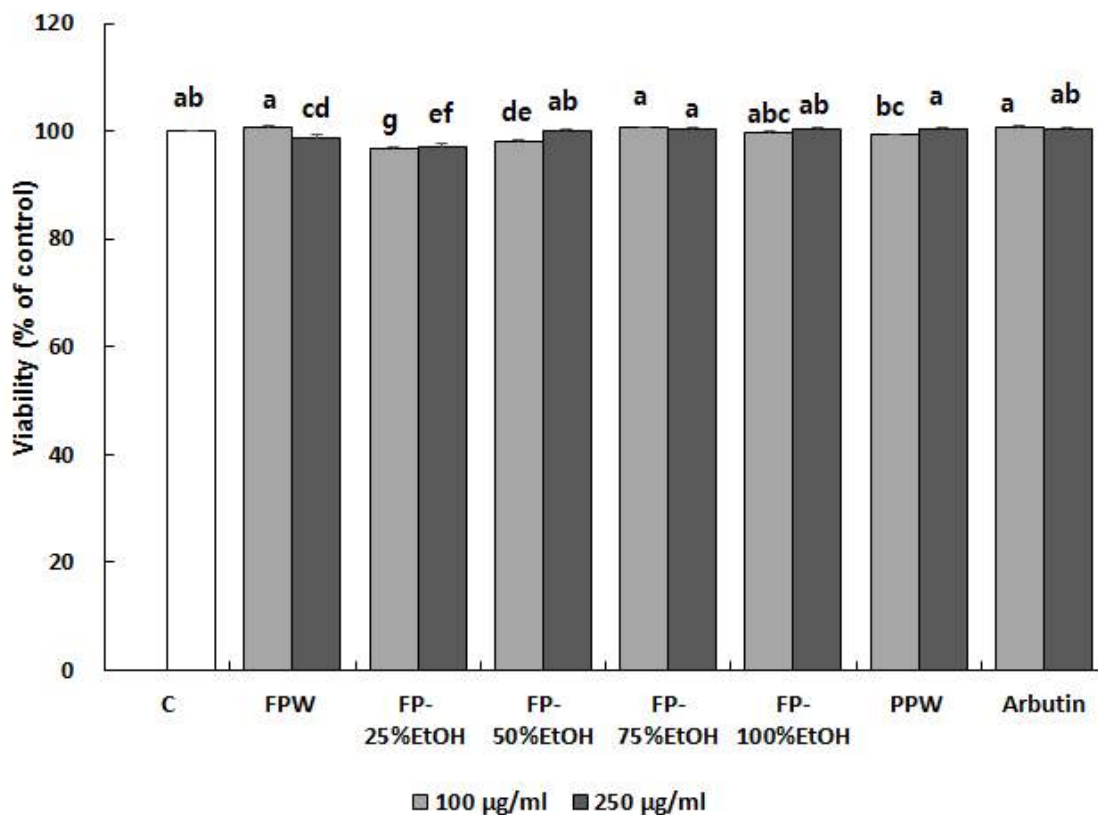
## 2. 이너뷰티케어 소재의 cell-based assay 기능성 평가

: 대식세포를 이용한 항산화 효과 측정

### ① MTT를 이용한 세포독성 측정

- RAW 264.7 대식세포에 대한 낙과 추출물의 독성을 측정하기 위하여 낙과 추출물을 농도별로 처리하여 MTT assay 방법으로 세포 생존율을 측정하였다. 세포 MTT 반응에서 80% 이상의 생존율을 보이는 경우 세포독성이 없는 것으로 판단하였다.

- 실험결과, 100~250  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 100%에 가까운 세포생존율을 보여 낙과, 배박 추출물과 알부틴 성분이 독성을 나타내지 않음을 확인하였다. [그림43]



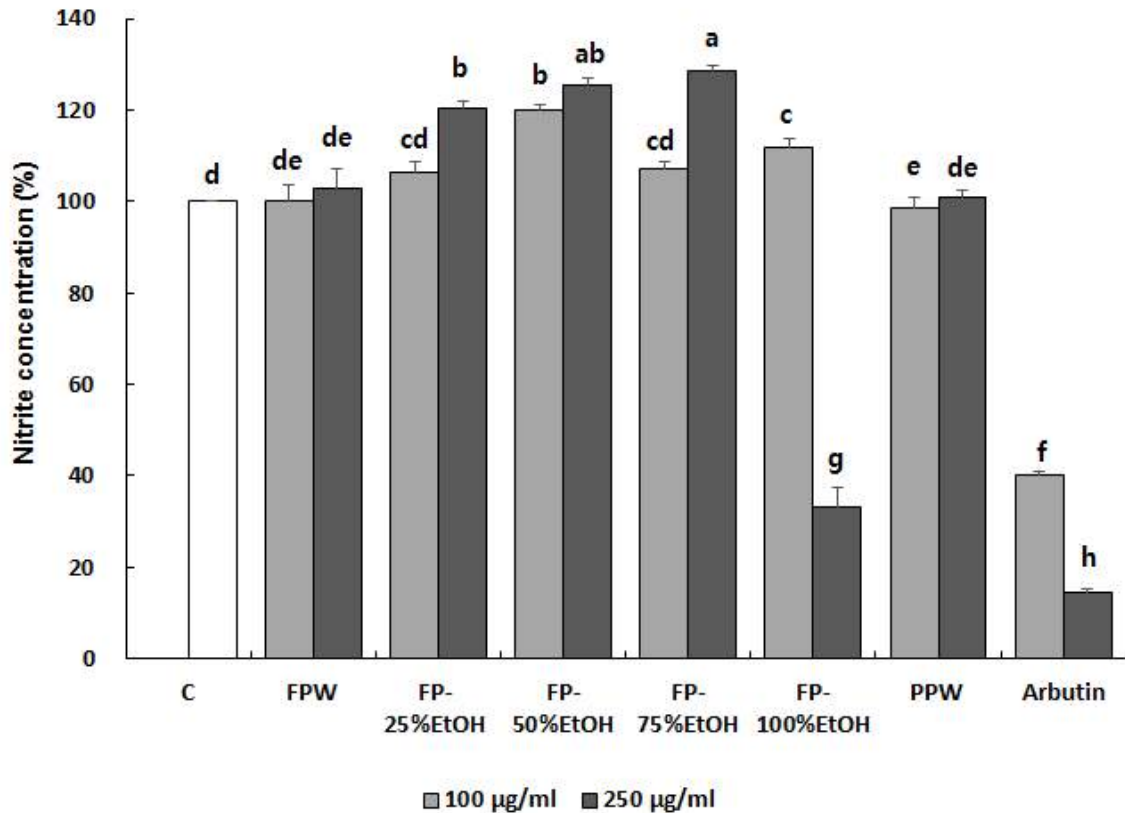
[그림43] Cell cytotoxicity of fallen pear, pear pomace extracts, and arbutin on RAW 264.7 cells.

Cell viability was assessed by the MTT assay in RAW 264.7 macrophages pretreated with fallen pear and pear pomace extracts and arbutin for 24 h. FPW: fallen pear water extract, FP-25% EtOH 100: fallen pear 25% ethanol extract 200  $\mu\text{g/mL}$ , FP-25% EtOH 250: fallen pear 25% ethanol extract 250  $\mu\text{g/mL}$ , FP-50% EtOH 100: fallen pear 50% ethanol extract 200  $\mu\text{g/mL}$ , FP-50% EtOH 250: fallen pear 50% ethanol extract 250  $\mu\text{g/mL}$ , FP-75% EtOH 100: fallen pear 75% ethanol extract 200  $\mu\text{g/mL}$ , FP-75% EtOH 250: fallen pear 75% ethanol extract 250  $\mu\text{g/mL}$ , FP-100% EtOH 100: fallen pear 100% ethanol extract 200  $\mu\text{g/mL}$ , FP-100% EtOH 250: fallen pear 100% ethanol extract 250  $\mu\text{g/mL}$ , PPW: pear pomace water extract 100  $\mu\text{g/mL}$ , PPW 250: pear pomace water extract 250  $\mu\text{g/mL}$ , arbutin 100: arbutin 100  $\mu\text{g/mL}$ , arbutin 250: arbutin 250M  $\mu\text{g/mL}$ . Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

## ② Nitric oxide 소거 능

- 정상적으로 발현되는 NO는 생체 내에서 혈압 조절, 신호전달 등 다양한 작용을 한다. 이물질이 침입하였을 때에는 NO를 이용하여 박테리아나 바이러스 등을 막아 생체 방어 기전에 중요한 조절자로서 역할을 하지만 lipopolysaccharide (LPS)와 같은 자극에 의해 활성화될 경우 과도한 NO가 생성된다. 이는 유전자 변이 신경관 손상 등을 유발한다.
- 따라서 낙과, 배박, 알부틴 성분이 LPS에 의해서 유도된 NO의 제거에 미치는 영향을 관찰하기 위해 NO 소거활성을 측정하였다.

- 실험결과, 낙과 100% 에탄올 추출물 250  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 NO 소거활성이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였고, 알부틴 성분도 농도 의존적으로 감소하였다.
- 그러나 낙과 물 추출물과 25%~75% 에탄올 추출물에서는 NO의 생성이 증가 하는 것을 볼 수 있었으며, 배박 물 추출물은 NO의 생성이 감소되었지만 유의적인 차이를 보이지 않았다. [그림44]



[그림44] Effects of fallen pear, pear pomace extracts, and arbutin on nitrite in RAW 264.7 macrophage stimulated with LPS.

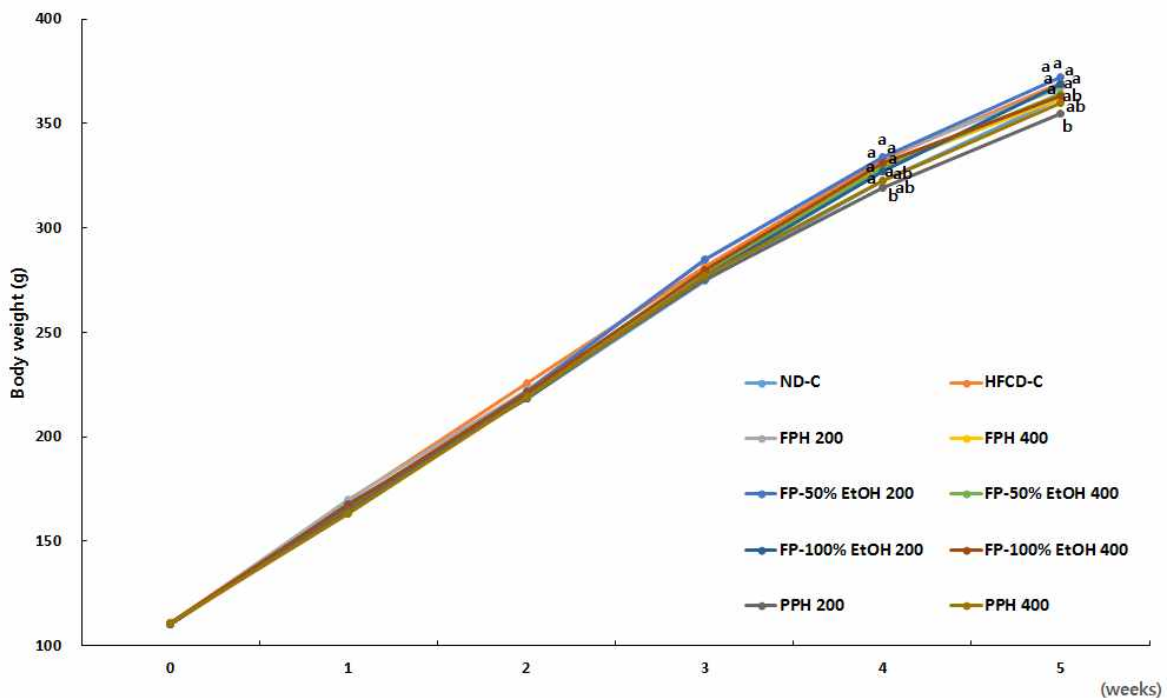
Cells were pre-treated for 12 h with indicated concentrations of fallen pear and pear pomace extracts and arbutin stimulated 24h with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ). FPW: fallen pear water extract, FP-25% EtOH 100: fallen pear 25% ethanol extract 200  $\mu\text{g/ml}$ , FP-25% EtOH 250: fallen pear 25% ethanol extract 250  $\mu\text{g/ml}$ , FP-50% EtOH 100: fallen pear 50% ethanol extract 200  $\mu\text{g/ml}$ , FP-50% EtOH 250: fallen pear 50% ethanol extract 250  $\mu\text{g/ml}$ , FP-75% EtOH 100: fallen pear 75% ethanol extract 200  $\mu\text{g/ml}$ , FP-75% EtOH 250: fallen pear 75% ethanol extract 250  $\mu\text{g/ml}$ , FP-100% EtOH 100: fallen pear 100% ethanol extract 200  $\mu\text{g/ml}$ , FP-100% EtOH 250: fallen pear 100% ethanol extract 250  $\mu\text{g/ml}$ , PPW: pear pomace water extract 100  $\mu\text{g/ml}$ , PPW 250: pear pomace water extract 250  $\mu\text{g/ml}$ , arbutin 100: arbutin 100  $\mu\text{g/ml}$ , arbutin 250: arbutin 250M  $\mu\text{g/ml}$ . Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

### 3. 이너 뷰티 케어 소재의 in vivo 기능성 평가

: 실험동물을 이용한 항산화 효과 측정

#### ① 실험동물의 체중변화, 식이효율 및 간 중량

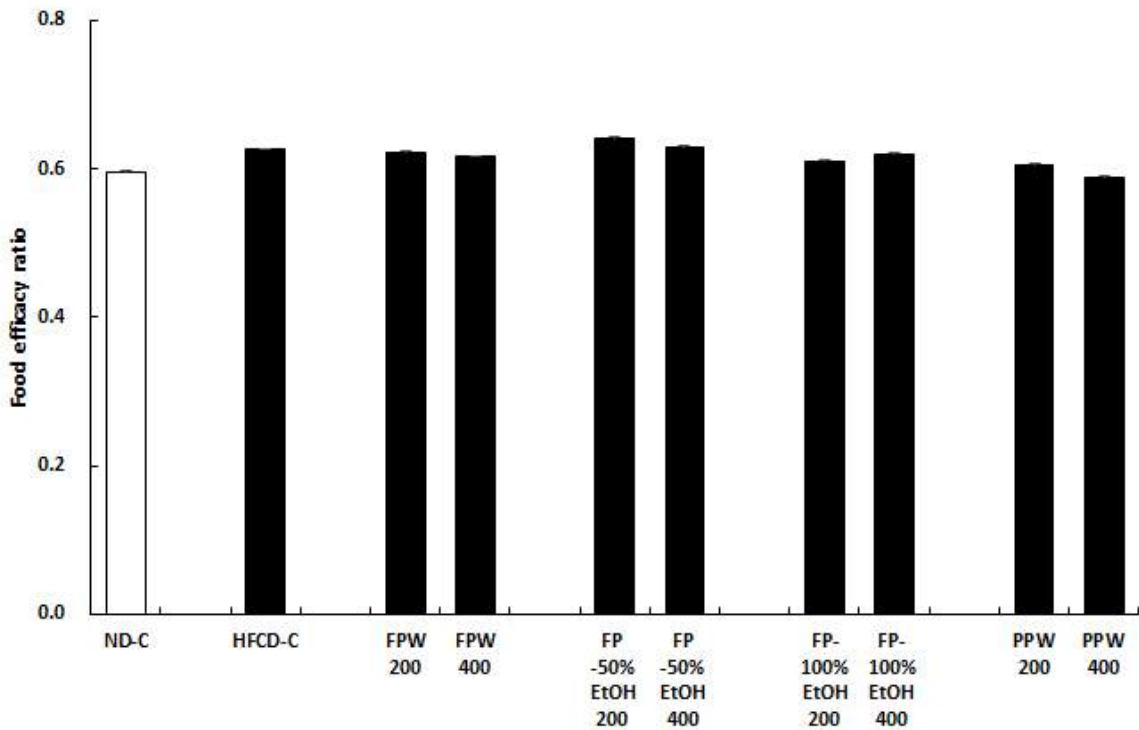
- 활성 산소종이 과다하게 생성되거나 항산화 시스템의 기능이 저하되는 상황에서 세포는 이로 인해 산화적 스트레스(oxidative stress)를 일으킨다. 특히, 고 콜레스테롤 상태에서 산화적 스트레스를 촉진하여 항산화 효소의 양과 활성은 충분하지 않고 생체 내 자유라디칼의 제거제인 항산화 방어 계에 불균형을 가져오게 되어 심혈관계 질환을 유발하는데 중요한 병인으로 작용한다고 보고되었다.
- 체중은 고지방/고콜레스테롤 대조군에 비해 배박 물 추출물 처리군이 4주부터 유의적으로 감소하였으나, 농도 의존적이진 않았으며, 고지방/고콜레스테롤 대조군과 낙과 추출물 처리군 간의 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. [그림45]



[그림45] Effect of fallen pear and pear pomace extracts on body weight.

ND-C: normal diet + distilled water, HFCD-C: high-fat cholesterol diet + distilled water, FPH 200: high-fat cholesterol diet + fallen pear water extract 200 mg/kg body weight, FPH 400: high-fat cholesterol diet + fallen pear water extract 400 mg/kg body weight, FP-50% EtOH 200: high-fat cholesterol diet + fallen pear 50% ethanol extract 200 mg/kg body weight, FP-50% EtOH 400: high-fat cholesterol diet + fallen pear 50% ethanol extract 400 mg/kg body weight, FP-100% EtOH 200: high-fat cholesterol diet + fallen pear 50% ethanol extract 200 mg/kg body weight, FP-100% EtOH 400: high-fat cholesterol diet + fallen pear 50% ethanol extract 400 mg/kg body weight, PPH 200: high-fat cholesterol diet + pear pomace water extract 200 mg/kg body weight, PPH 400: high-fat cholesterol diet + pear pomace water extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

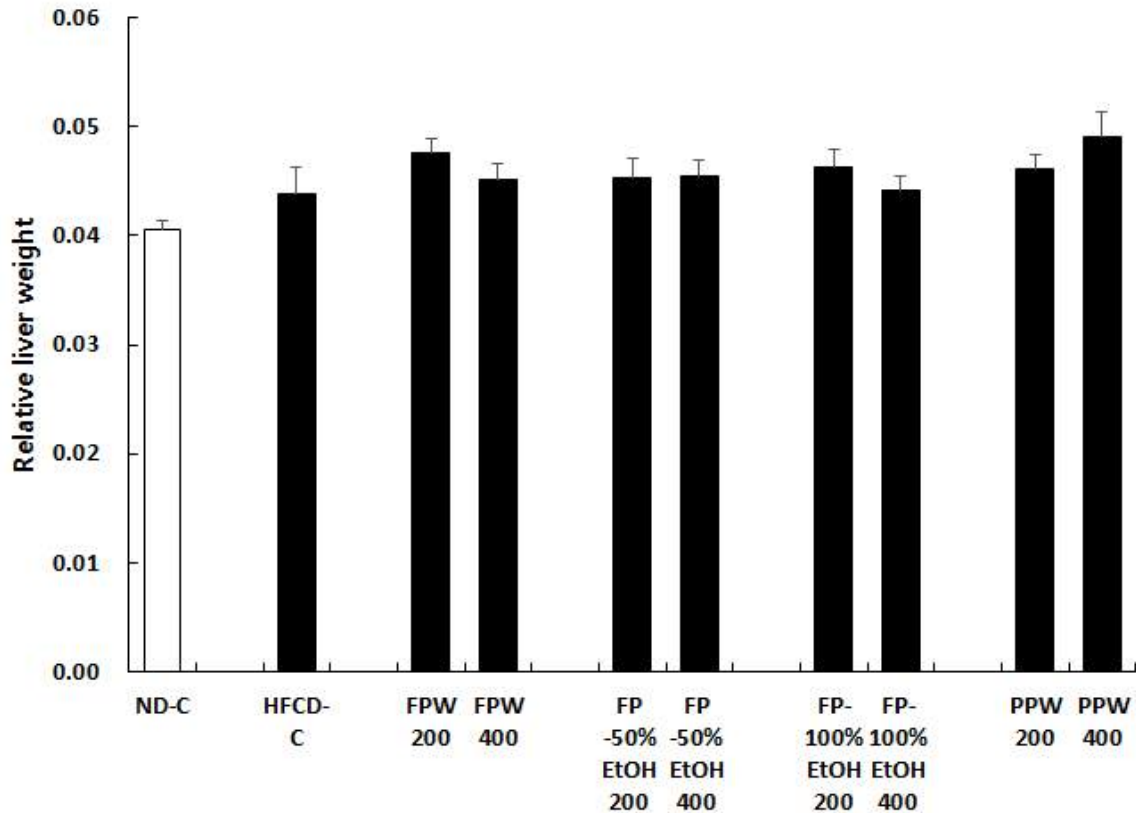
- 식이효율은 모든 군에서 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. [그림46]



[그림46] Effect of fallen pear and pear pomace extracts on food efficiency ratio.

ND-C: normal diet + distilled water, HFCD-C: high-fat cholesterol diet + distilled water, FPW 200: high-fat cholesterol diet + fallen pear water extract 200 mg/kg body weight, FPW 400: high-fat cholesterol diet + fallen pear water extract 400 mg/kg body weight, FP-50% EtOH 200: high-fat cholesterol diet + fallen pear 50% ethanol extract 200 mg/kg body weight, FP-50% EtOH 400: high-fat cholesterol diet + fallen pear 50% ethanol extract 400 mg/kg body weight, FP-100% EtOH 200: high-fat cholesterol diet + fallen pear 50% ethanol extract 200 mg/kg body weight, FP-100% EtOH 400: high-fat cholesterol diet + fallen pear 50% ethanol extract 400 mg/kg body weight, PPW 200: high-fat cholesterol diet + pear pomace water extract 200 mg/kg body weight, PPW 400: high-fat cholesterol diet + pear pomace water extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

- 간은 담즙을 분비하여 소화를 도와주고 체내의 독소나 독성물질을 해독시키며, 단백질, 탄수화물, 지방의 신진대사를 담당하는 장기로서 간장이 손상을 입게 되면 소화, 해독 대사기능에 장애를 초래하게 된다. 고지방/콜레스테롤첨가식을 투여한 흰쥐에서는 간에 중성지방 및 콜레스테롤 등이 축적되어 간 중량의 증가를 초래한다. 또한, 과량의 콜레스테롤이 간으로 유입될 경우 지질 수용체와 결합하여 lipoprotein 의 형태로 배출 되지 못하면 간에 축적되어 지방간을 유발시킬 수 있다고 하였다.
- 따라서, 낙과, 배박, 알부틴 성분이 간무게/몸무게를 측정한 결과, 모든 군에서 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. [그림47]



[그림47] Effect of fallen pear and pear pomace extracts on liver weight.

ND-C: normal diet + distilled water, HFCD-C: high-fat cholesterol diet + distilled water, FPW 200: high-fat cholesterol diet + fallen pear water extract 200 mg/kg body weight, FPW 400: high-fat cholesterol diet + fallen pear water extract 400 mg/kg body weight, FP-50% EtOH 200: high-fat cholesterol diet + fallen pear 50% ethanol extract 200 mg/kg body weight, FP-50% EtOH 400: high-fat cholesterol diet + fallen pear 50% ethanol extract 400 mg/kg body weight, FP-100% EtOH 200: high-fat cholesterol diet + fallen pear 50% ethanol extract 200 mg/kg body weight, FP-100% EtOH 400: high-fat cholesterol diet + fallen pear 50% ethanol extract 400 mg/kg body weight, PPW 200: high-fat cholesterol diet + pear pomace water extract 200 mg/kg body weight, PPW 400: high-fat cholesterol diet + pear pomace water extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

## ② 혈액 내 ALT, AST 활성

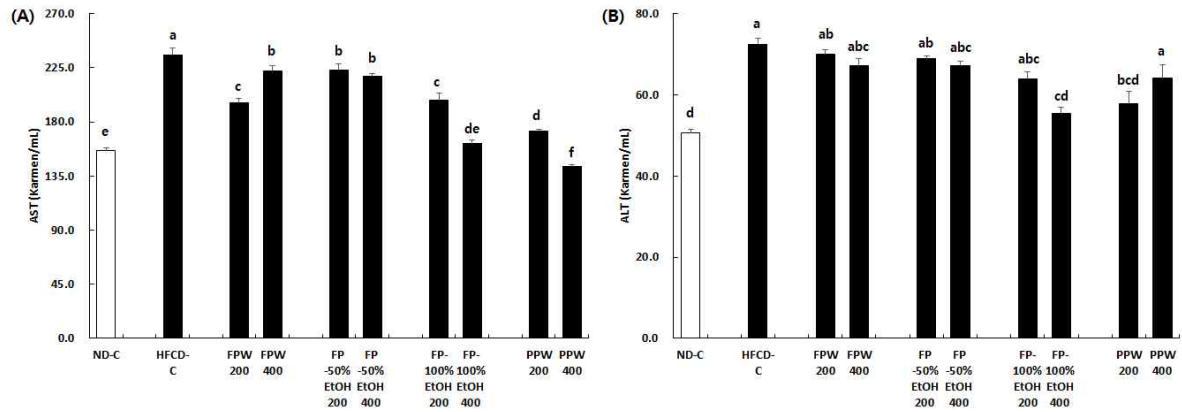
- AST 및 ALT는 아미노산(amino acid)과  $\alpha$ -케토산(keto acid)과의 사이에 아미노기(amino group) 전이반응을 촉매 하는 효소로서 체내에 널리 분포되어 있다. 이들은 간 손상의 지표로 널리 사용되는 효소로서 그 유출 과정은 세포내의 에너지 공급이 감소된 결과에 의해 세포내의  $K^+$ 이온이 세포외로 유출되면  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  및 수분이 세포내로 유입이 된다. 그 결과 세포는 팽창되고, 세포막이 늘어나게 되어 세포질에 존재하는 AST와 ALT가 유출된다. 그러므로 혈청 중 AST와 ALT 등의 증가는 간독성으로 인한 간세포의 괴사와 간조직의 파괴가 진행됨을 의미하므로 이들 효소의 혈중 유리정도를 측정하여 간독성 연구에 이용하고 있다.

- 실험결과, 고지방/고콜레스테롤 대조군의 AST는 정상식이 대조군에 비해 유의적으로 증



가하였고, 배박 물 추출물과 낙과 100% 에탄올 추출물 투여로 인해 농도 의존적으로 감소하였다. [그림48]

- 또한, 낙과 물 추출물과 50% 에탄올 추출물 처리군도 감소하는 것을 관찰할 수 있다.



[그림48] Effect of fallen pear and pear pomace extracts on the serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities in rats.

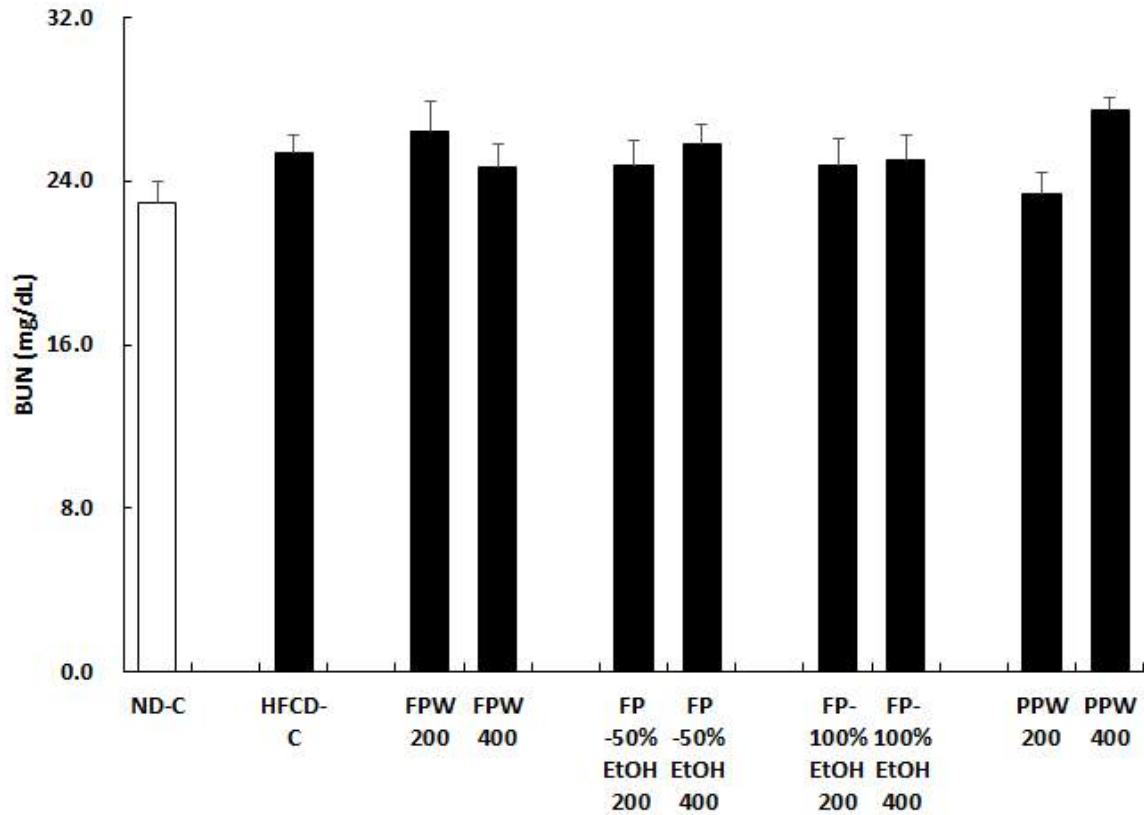
ND-C: normal diet + distilled water, HFCD-C: high-fat cholesterol diet + distilled water, FPW 200: high-fat cholesterol diet + fallen pear water extract 200 mg/kg body weight, FPW 400: high-fat cholesterol diet + fallen pear water extract 400 mg/kg body weight, FP-50% EtOH 200: high-fat cholesterol diet + fallen pear 50% ethanol extract 200 mg/kg body weight, FP-50% EtOH 400: high-fat cholesterol diet + fallen pear 50% ethanol extract 400 mg/kg body weight, FP-100% EtOH 200: high-fat cholesterol diet + fallen pear 50% ethanol extract 200 mg/kg body weight, FP-100% EtOH 400: high-fat cholesterol diet + fallen pear 50% ethanol extract 400 mg/kg body weight, PPW 200: high-fat cholesterol diet + pear pomace water extract 200 mg/kg body weight, PPW 400: high-fat cholesterol diet + pear pomace water extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

- 이는 고지방/고콜레스테롤 첨가에 의해 초래된 간 손상을 배박 물 추출물과 낙과 에탄올 추출물이 유의적으로 억제하였음을 의미한다.

### ③ 혈중 요소 질소 (BUN, blood urea nitrogen)

- 식품으로 섭취한 단백질이나 조직의 단백질은 아미노산으로 분해되어 간으로 운반되고 이 아미노산 으로부터 유래된 질소들은 요소회로를 경유하여 요소가 된다. 암모니아로부터 합성된 요소는 혈중에 운반되어 신장에서 배설된다. 만약 신장의 기능이 저하되어 요소가 배설 되지 못하면 혈중의 요소 농도는 높아지게 된다.

- 따라서, 낙과, 배박, 알부틴 성분이 혈중 요소 질소에 미치는 영향을 측정한 결과, 모든 군에서 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. [그림49]

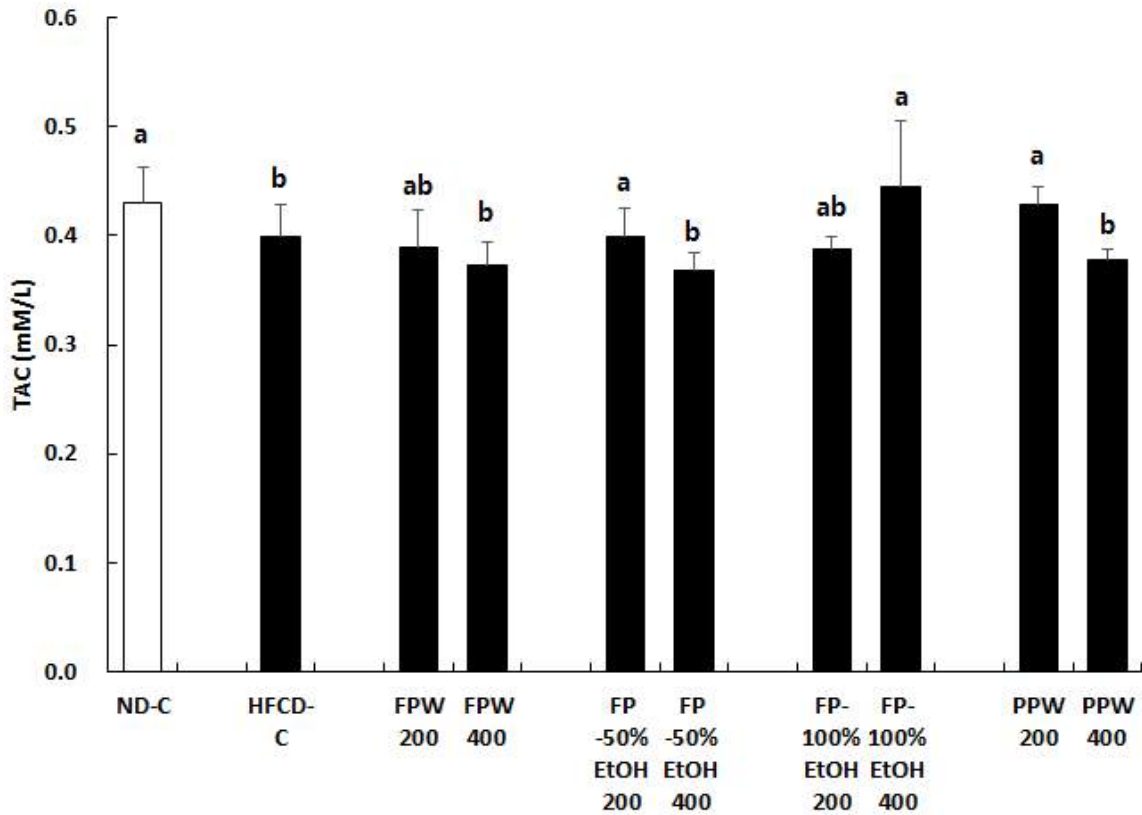


[그림49] Effect of fallen pear and pear pomace extracts on the serum blood urea nitrogen in rats.

ND-C: normal diet + distilled water, HFCD-C: high-fat cholesterol diet + distilled water, FPW 200: high-fat cholesterol diet + fallen pear water extract 200 mg/kg body weight, FPW 400: high-fat cholesterol diet + fallen pear water extract 400 mg/kg body weight, FP-50% EtOH 200: high-fat cholesterol diet + fallen pear 50% ethanol extract 200 mg/kg body weight, FP-50% EtOH 400: high-fat cholesterol diet + fallen pear 50% ethanol extract 400 mg/kg body weight, FP-100% EtOH 200: high-fat cholesterol diet + fallen pear 50% ethanol extract 200 mg/kg body weight, FP-100% EtOH 400: high-fat cholesterol diet + fallen pear 50% ethanol extract 400 mg/kg body weight, PPW 200: high-fat cholesterol diet + pear pomace water extract 200 mg/kg body weight, PPW 400: high-fat cholesterol diet + pear pomace water extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

#### ④ 혈장 총 항산화 능

- 혈장 총 항산화 능은 정상식이 대조군에 비해 고지방/콜레스테롤 첨가식이 대조군이 유의적으로 증가하였고, 배박 물 추출물 200 mg/kg 투여에 의해 유의적으로 증가하였다. 또한 낙과 100% 에탄올 추출물 40 mg/kg 처리군도 유의적으로 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. [그림50]



[그림50] Effect of fallen pear and pear pomace extracts on the total antioxidant capacity. ND-C: normal diet + distilled water, HFCD-C: high-fat cholesterol diet + distilled water, FPW 200: high-fat cholesterol diet + fallen pear water extract 200 mg/kg body weight, FPW 400: high-fat cholesterol diet + fallen pear water extract 400 mg/kg body weight, FP-50% EtOH 200: high-fat cholesterol diet + fallen pear 50% ethanol extract 200 mg/kg body weight, FP-50% EtOH 400: high-fat cholesterol diet + fallen pear 50% ethanol extract 400 mg/kg body weight, FP-100% EtOH 200: high-fat cholesterol diet + fallen pear 50% ethanol extract 200 mg/kg body weight, FP-100% EtOH 400: high-fat cholesterol diet + fallen pear 50% ethanol extract 400 mg/kg body weight, PPW 200: high-fat cholesterol diet + pear pomace water extract 200 mg/kg body weight, PPW 400: high-fat cholesterol diet + pear pomace water extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

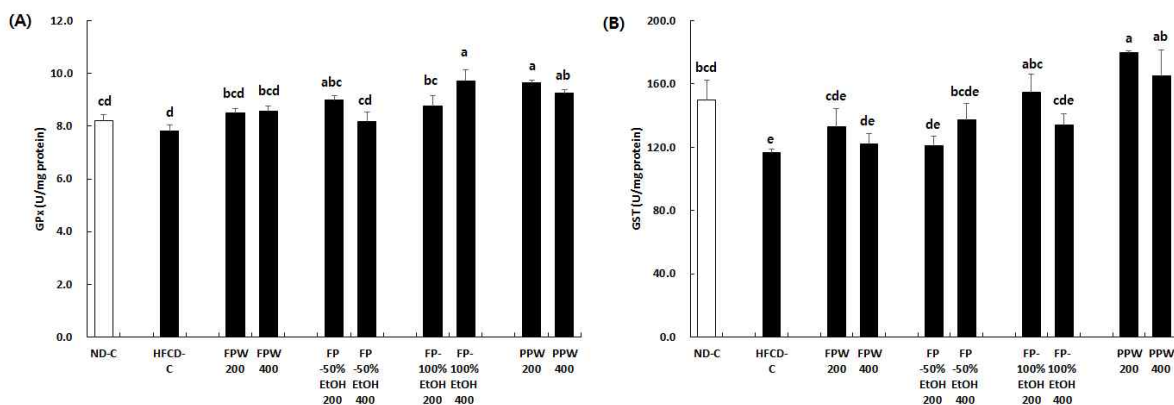
- 배박 물 추출물과 낙과 100% 에탄올 추출물이 항산화 능을 가져 고지방/콜레스테롤 첨가식에 의해 발생된 산화적 스트레스를 억제할 수 있음을 의미한다.

#### ⑤ 간의 항산화 효소계 활성화

- 사람과 동물에는 산화적 손상을 예방하거나 복구하는 체계를 가지고 있으며 그 종류로는 superoxide dismutase (SOD), 환원형 glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) 등이 있다.
- GPx는 일종의 peroxidase로 NADP+를 전자수용체로 하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 제거하면서 환원형 glutathione (GSH)을 산화형 glutathione (GSSG)으로 전환시키는 효소로 알려져 있다.
- GST는 변이성 물질, 발암성 물질, 독성물질 등의 대사산물, 그리고 내인성 독소들 중에

서 친 전자 성 물질 등에 환원 형 glutathione을 포함시켜 glutathione thioester (R-S-G)를 형성하는 반응을 촉매 하는 효소이다.

- 본 연구에서는 낙과, 배박, 알부틴 성분이 간의 항산화 효소계 활성을 증가시킬 수 있는지 조사하였다.
- 실험결과, 고지방/콜레스테롤 대조군의 GST 활성이 정상식이 대조군에 비해 감소하였으며, GPx 활성은 유의적으로 감소하였다. 그러나 배박 물 추출물 투여로 인해 농도 의존적으로 증가하였다. [그림51]
- 또한, 낙과 100% 에탄올 추출물 처리군도 유의적으로 증가하는 것을 관찰 할 수 있었고, 낙과 물 추출물과 낙과 50% 에탄올 추출물 처리군에서도 증가하였지만 낙과 100% 에탄올 추출물 처리군의 활성 보다는 낮았다.



[그림51] Effect of fallen pear and pear pomace extracts on the liver GST (A) and GPx (B) activities in rats.

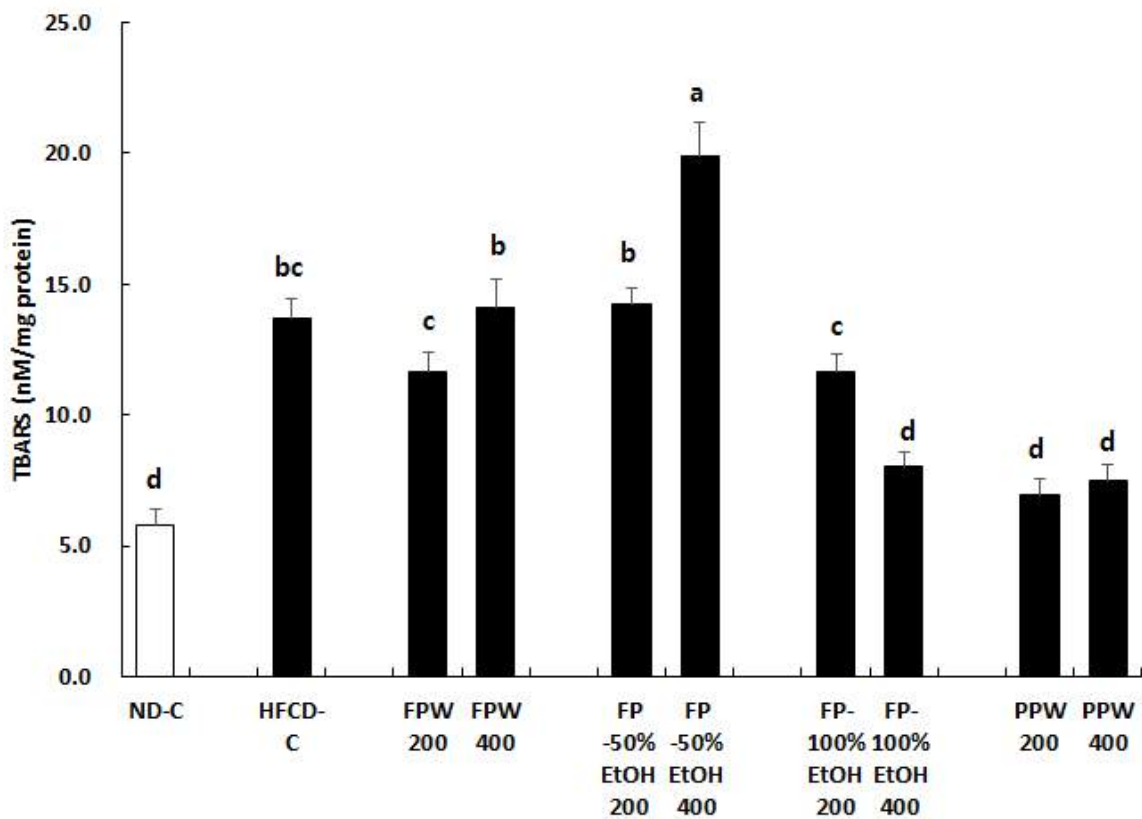
ND-C: normal diet + distilled water, HFCD-C: high-fat cholesterol diet + distilled water, FPW 200: high-fat cholesterol diet + fallen pear water extract 200 mg/kg body weight, FPW 400: high-fat cholesterol diet + fallen pear water extract 400 mg/kg body weight, FP-50% EtOH 200: high-fat cholesterol diet + fallen pear 50% ethanol extract 200 mg/kg body weight, FP-50% EtOH 400: high-fat cholesterol diet + fallen pear 50% ethanol extract 400 mg/kg body weight, FP-100% EtOH 200: high-fat cholesterol diet + fallen pear 50% ethanol extract 200 mg/kg body weight, FP-100% EtOH 400: high-fat cholesterol diet + fallen pear 50% ethanol extract 400 mg/kg body weight, PPW 200: high-fat cholesterol diet + pear pomace water extract 200 mg/kg body weight, PPW 400: high-fat cholesterol diet + pear pomace water extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

### ⑥ 간의 지질 과산화물

- 지질 과산화 반응은 여러 가지 독성 화합물이나 약물 또는 질병에 의한 병태 생리학적 현상이나 조직의 손상 정도를 나타내는 가장 중요한 기전으로 인정되고 있는데, 이는 조직 내 세포의 산화적 스트레스의 증가와 생체 내 항산화 방어력의 감소로 야기된다.
- 지질 과산화 반응은 생체 조직 막의 다가불포화지방산 유리기에 의해 산화적 분해를 일으키는 것으로, 지표로 TBARS 수준을 사용하며 이의 증가는 산화적 스트레스의 증가를 나타낸다.
- 결과적으로 생체막의 기능저하, 유동성 감소, 항상성 유지 장애 등을 초래하여 암과 같

은 만성적 성인병을 발생시키는 주요 원인이 되고 있으며 특히 세포의 노화와 관련성이 있다고 보고된다.

- 실험결과, 고지방/콜레스테롤 대조군의 지질 과산화물 농도가 정상식이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였고, 배박 물 추출물과 낙과 100% 에탄올 추출물 투여로 인해 유의적으로 감소였다. 즉, 배박 물 추출물과 낙과 100% 에탄올 추출물이 간 조직의 지질과산화물 생성 억제 효과가 있는 것으로 사료된다.
- 낙과 물 추출물과 낙과 50% 에탄올 추출물 처리군에서도 감소하는 것을 관찰 할 수 있었으나 농도 의존적이진 않았다. [그림52]



[그림52] Effect of fallen pear and pear pomace extracts on the liver TBARS in rats.

ND-C: normal diet + distilled water, HFCD-C: high-fat cholesterol diet + distilled water, FPW 200: high-fat cholesterol diet + fallen pear water extract 200 mg/kg body weight, FPW 400: high-fat cholesterol diet + fallen pear water extract 400 mg/kg body weight, FP-50% EtOH 200: high-fat cholesterol diet + fallen pear 50% ethanol extract 200 mg/kg body weight, FP-50% EtOH 400: high-fat cholesterol diet + fallen pear 50% ethanol extract 400 mg/kg body weight, FP-100% EtOH 200: high-fat cholesterol diet + fallen pear 50% ethanol extract 200 mg/kg body weight, FP-100% EtOH 400: high-fat cholesterol diet + fallen pear 50% ethanol extract 400 mg/kg body weight, PPW 200: high-fat cholesterol diet + pear pomace water extract 200 mg/kg body weight, PPW 400: high-fat cholesterol diet + pear pomace water extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

- 이상의 연구 결과를 종합해 보면 낙과 100% 에탄올 추출물은 *in vitro* 및 *in vivo* 실험에

서 NO 소거능, DPPH radical 소거능이 뛰어나며, glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione S-transferase (GST) 활성을 증가시킴으로써 간의 지질 과산화물의 생성억제를 통해 조직의 산화적 손상을 억제 할 수 있을 것이라 사료된다. 따라서 낙과 100% 에탄올 추출물이 고지방/콜레스테롤 첨가식을 통한 산화적 스트레스를 상쇄할 수 있는 효과가 있음을 연구를 통해 규명하였다.

- 낙과 100% 에탄올 추출물과 비교하여 배박 물 추출물 또한 DPPH radical 소거능과 glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione S-transferase (GST) 활성의 증가로 인한 간의 지질 과산화물의 생성억제를 규명 하였으며, 따라서 배박 물 추출물도 산화적 스트레스를 줄일 수 있을 것으로 사료된다.

## ■ 낙과(미숙과)유래 이너뷰티소재의 기능성 효능평가 ■

### I. 연구재료 및 방법

#### 1. 이너뷰티케어(지질대사개선) 소재의 cell-based assay 기능성 평가

##### ① 세포 배양

- 전구지방세포 3T3-L1 세포주는 American Type Culture Collection(ATCC, 미국)으로부터 분양을 받았다. 전구지방세포 3T3-L1 세포는 100 Units/mL penicillin, 100 µg/ml streptomycin과 10% newborn calf serum (FCS, GIBCO)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO) 배지의 조건에서 5% CO<sub>2</sub>와 37°C의 세포 배양기에서 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

##### ② 3T3-L1 지방 전구세포의 세포 독성 측정

- 전구지방세포 증식능은 96-well plate에 세포를 배양하면서 추출물을 첨가[5월 수확 낙과 물 추출물(FPWM), 5월 수확 낙과 50% 에탄올 추출물(FPEM), 8월 수확 낙과 물 추출물(FPWA), 8월 수확 낙과 50% 에탄올 추출물(FPEA) 각각 100, 250 µg/ml 농도] 24시간 후 각각 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay를 이용하여 전구지방세포 증식능을 측정하였다.

##### ③ 지방생성 억제효과

- 6 well plate 배양된 세포에 분화유도와 함께 추출물을 첨가한 후 지방 생성량은 Oil Red O 염색법을 이용하여 추출물의 지방 생성 억제효과를 평가하였다. 분화유도가 끝난 세포는 PBS로 washing 하여 10% formalin으로 실온에서 30분간 고정시킨 후에 4% Oil Red O 용액으로 30분간 염색하여 현미경으로 지방의 염색정도를 평가하여 효능을 평가하였다.

#### ④ Western blotting analysis

- 분화된 3T3-L1 지방세포를 PBS 용액으로 2회 세척한 후 lysis buffer를 넣고 4°C에서 10분간 용해시킨 후에 13,000 rpm 4°C에서 20분간 원심분리하여 상층액만 회수해 단백질 양을 정량하였다. Lysate 30 µg 을 취하여 SDS loading buffer에 혼합하여 95°C에서 10분간 가열시킨 후 10% SDS polyacrylamide gel에 100-150V로 전기영동 한 다음 nitrocellulose membrane에 전이 시킨다. 5%무지분유가 첨가된 TBS-T용액으로 3회(각각 7분씩) 세척한 후 일차항체로 2시간 동안 반응시키고 다시 TBS-T용액으로 3회 세척한다. 그 다음 peroxidase가 포함된 이차항체(goat anti mouse 1 : 2000, anti rabbit 1 : 2000)로 1시간 동안 반응시키고 chemiluminescent substrate 용액을 사용하여 목적 단백질을 확인하였다.

#### ⑤ 통계처리

- 모든 실험결과는 최소한 3회 이상 반복하여 평균치 ± 표준오차로 표시하였고, 각 군과의 비교는 ANOVA test 후 Duncan's multiple test를 이용하여 군 간의 유의성을 판정하였다. (p<0.05)

### 2. 이너뷰티케어(지질대사개선) 소재의 in vivo 기능성 평가

#### ① 동물사육

- 중앙 실험동물에서 5주령 수컷의 C57BL/6J를 공급받아 실험에 사용하였다. 식이는 AIN-93G를 기본으로 60% kcal fat이 들어간 식이를 pellet 형태로 공급하고, 대조군(control)과 추출물을 먹인 실험군으로 나누어 사육하였다. 추출물 투여량은 6주 동안 매일 경구투여하며 식이와 물은 매일 신선한 것으로 공급한다.

#### ② 식이효율 및 체중억제효과

- 동물을 사육하는 동안 매주 체중을 측정하고 먹이 섭취량을 측정하였다. 먹이 섭취량은 전날 공급분에서 남은 양을 빼는 방법으로 계산하였다.

#### ③ 체지방 저하효과

- 복부 총지방량은 실험이 종료된 후, 실험동물의 복부를 절개하여 부고환 주위의 지방과 후복부의 지방을 모두 절제하여 무게를 측정하였다.

#### ④ 혈중지질 억제효과

- 동물을 희생시킨 후 실험동물의 복부 대동맥으로부터 혈액을 분리한 다음에 원심분리기

를 이용하여 혈청을 분리한다. 혈청중의 총콜레스테롤과 중성지방은 영동제약의 kit를 이용하여 측정하였다.

⑤ 혈당 및 인슐린 측정

- 혈당은 동물을 희생시킨 후 채혈하여 혈당계로 측정하였다. 인슐린 저항성을 평가하기 위하여 HOMA-IR를 구하여 평가하였다.

⑥ 통계처리

- 모든 실험결과는 최소한 3회 이상 반복하여 평균치  $\pm$  표준오차로 표시하였고, 각 군과의 비교는 ANOVA test 후 Duncan's multiple test를 이용하여 군 간의 유의성을 판정하였다. ( $p < 0.05$ )

3. 이너뷰티케어(장기능개선) 소재의 in vivo 기능성 평가

① 식이효율 및 체중억제효과

- 중앙 실험동물에서 7주령 수컷의 SD rat를 공급받아 실험에 사용한다. 실험동물을 3일간 적응시키고, 4일째부터 변비를 유발하기 위하여 loperamide (sigma, USA)를 사료 3 g 당 1 mg 함유하여 공급하였다. 실험군을 정상대조군, 변비대조군, 변비+석세포 추출물 5% 식이군, 변비+석세포 10% 식이군으로 나누고 대조군은 정상식이, 변비유발군은 loperamide 함유식이, 석세포군은 정상식이에  $\alpha$ -cellulose (5%) 대신 석세포를 각각 5, 10% 첨가하여 8일간 공급하였다.

② 대장조직 채취 및 장내변의 수(number of feces pellets) 관찰

- Loperamide-induced constipation method에 의해 유도된 변비에 미치는 영향을 알아보기 위하여 loperamide 투여 8일째 되는 날에 실험동물을 희생시켜 맹장에서 직장까지의 전 부위를 취하여 10% formaldehyde (phosphate buffered saline, pH 7.4)로 즉시 고정하고 고정된 흰쥐의 대장관 내에 있는 변의 개수를 관찰한다.

③ 대장관 내 점액질 측정

- 고정된 조직은 paraffin으로 embedding하여 5 $\mu$ m 두께로 section한 후 alcian blue (pH 2.5)로 염색하여 100배 또는 200배 광학 현미경으로 관찰하였다.

④ 통계처리

- 모든 실험결과는 최소한 3회 이상 반복하여 평균치  $\pm$  표준오차로 표시하였고, 각 군과의 비교는 ANOVA test 후 Duncan's multiple test를 이용하여 군 간의 유의성을 판정하였



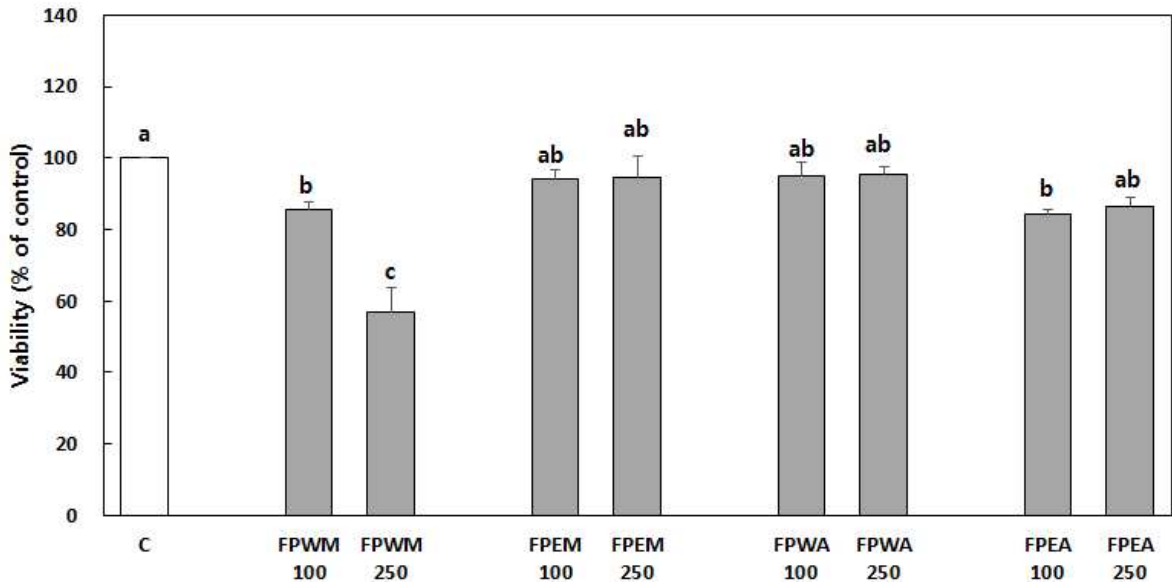
다. ( $p < 0.05$ )

## II. 연구결과

### 1. 이너뷰티케어(지질대사개선) 소재의 cell-based assay 기능성 평가

#### ① 세포 독성 측정

- 3T3-L1 전구지방세포에 낙과 추출물들의 세포독성을 측정하기 위해 5월 및 8월 수확 낙과의 물 및 에탄올 추출물 100, 250  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 MTT assay 실험을 진행하였다.
- MTT assay는 탈수소 효소작용에 의해 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색의 formazan으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법으로 세포의 증식과 성장을 알아보는 대표적인 실험방법 중 하나로 살아있는 세포 수에 비례해서 흡광도가 증가한다.
- 본 실험에서 세포독성은 5월 수확 낙과 에탄올 추출물(FPEM), 8월 수확 낙과 물 추출물(FPWA), 8월 수확 낙과 에탄올 추출물(FPEA) 군에서는 전체적으로 생존율의 변화가 거의 나타나지 않은 반면에 5월 수확 낙과 물 추출물(FPWM) 군에서는 농도 의존적으로 감소하였다. [그림53]

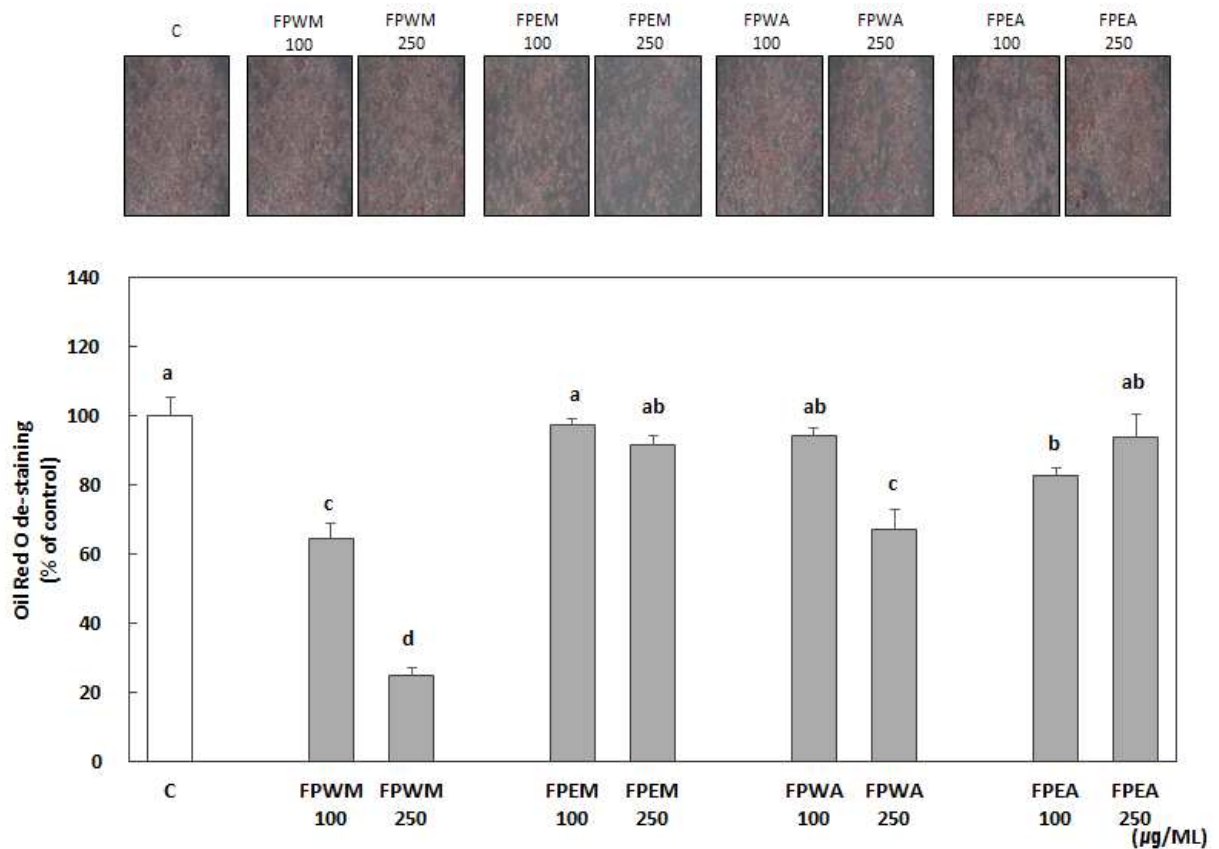


[그림53] Effect of fallen pear extracts on the proliferation of 3T3-L1 preadipocyte.

3T3-L1 cells were differentiated with hormonal cocktail for eight days in absence or presence of fallen pear extracts. C: PBS, FPWM100: water extract with fallen pear collected in May 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , FPWM: water extract with fallen pear collected in May 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , FPEM100: 50% EtOH extract with fallen pear collected in May 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , FPEM: 50% EtOH extract with fallen pear collected in May 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , FPWA100: water extract with fallen pear collected in August 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , FPWA: water extract with fallen pear collected in August 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , FPEA100: 50% EtOH extract with fallen pear collected in August 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , FPEA: 50% EtOH extract with fallen pear collected in August 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

## ② 지방 합성 억제 효과 측정

- 지방세포 속에 저장된 중성지방은 지질방울(lipid droplet)의 형태로 존재하며, 지방분해 효소인 지단백질지질분해효소(lipoprotein lipase)의 작용에 의해 유리지방산과 글리세롤(glycerol)로 분해되어 혈중으로 방출되고, 여러 조직에서 에너지원으로 이용되거나 간이나 지방조직에서 다시 중성지방이 되어 저장된다.
- 분화된 지방세포(adipocytes)에서 낙과추출물에 의한 지방세포 분화 억제효과를 확인하기 위하여 중성지방만을 붉은색으로 염색하는 Oil Red O 염색법을 통해 3T3-L1 지방세포 내 생성된 중성지방의 양을 측정한다.
- 실험결과, 지방 합성 억제 효과는 5월 수확 낙과 물 추출물군이 5월 수확 낙과 에탄올 추출물군에 비해 유의적으로 감소하였고, 8월 수확 낙과 물 추출물군이 8월 수확 낙과 에탄올 추출물군에 비해 지방합성 억제효과가 감소하였다. [그림54]
- 결과적으로 낙과 추출물은 50% 에탄올 추출물보다 물 추출물이 더 효과적으로 지방합성 억제 효과가 나타났다.
- 또한, 전체 추출물 중 5월 수확 낙과 물 추출물군이 지방 합성 억제 효과가 가장 뛰어났으나, 이는 세포독성 결과로 인해 감소한 것으로 생각된다.



[그림54] Effect of fallen pear extracts on 3T3-L1 adipocyte differentiation.

3T3-L1 cells were differentiated with hormonal cocktail for eight days in absence or presence of fallen pear extracts. C: PBS, FPWM100: water extract with fallen pear collected in May 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , FPWM: water extract with fallen pear collected in May 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , FPEM100: 50% EtOH extract with fallen pear collected in May 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , FPEM: 50% EtOH extract with fallen pear collected in May 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , FPWA100: water extract with fallen pear collected in August 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , FPWA: water extract with fallen pear collected in August 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , FPEA100: 50% EtOH extract with fallen pear collected in August 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , FPEA: 50% EtOH extract with fallen pear collected in August 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

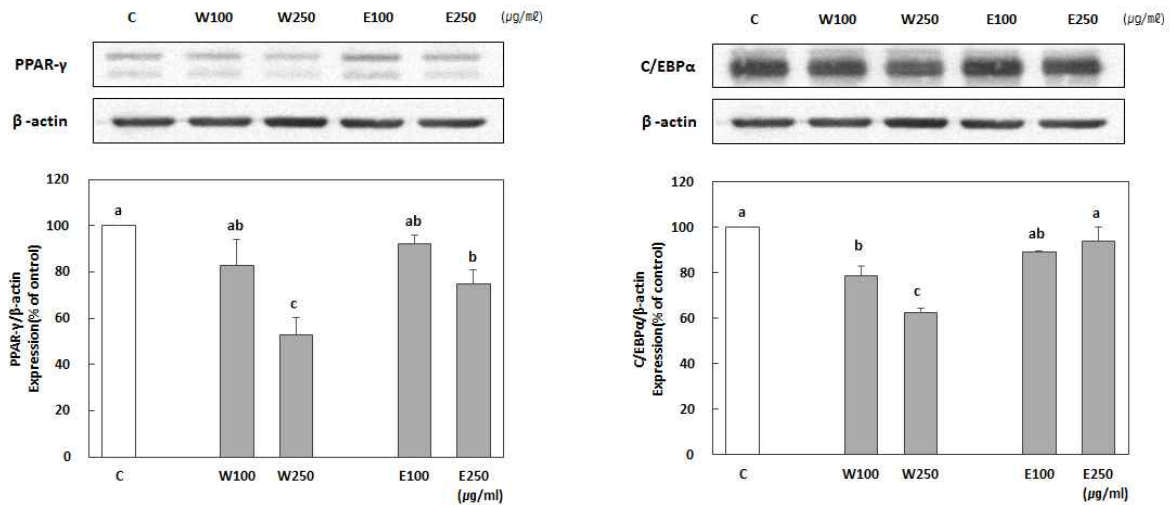
- 따라서, 지방합성·분해 관련 단백질 발현 효과는 8월 낙과 추출물로 실험을 진행하였다.

### ③ 지방 합성 관련 단백질 발현 측정

- 전구지방세포가 지방세포로 분화하는 과정에는 형태적 변화뿐 아니라 다양한 아디포사이토카인(adipocytokine)의 분비 및 전사인자(transcription factor)와 지질합성에 관여한 단백질(adipogenic protein)의 발현이 수반된다. 지방세포에 나타나는 특이적인 전사인자로서 C/EBP  $\beta$ 는 분화 초기에 PPAR  $\gamma$  및 C/EBP  $\alpha$ 는 분화 후기에 발현되어 지방세포 특이성(adipose-specific) 유전자 발현을 활성화함으로써 분화를 촉진시켜 분화과정을 완성하는데 관여한다.
- 분화된 세포는 백색 지방세포에서 나타나는 중성지방의 축적 등과 같은 형태적 특징과

더불어 fatty acid synthase (FAS), lipoprotein lipase (LPL), sterol response element binding protein (SREBP) 및 adipocyte-specific lipid binding protein (aP2) 등과 지방세포 특이적인 유전자의 발현이 유발되는 생화학적 특징을 가진다. 따라서 효과적인 비만억제 및 비만과 관련된 대사성 질환의 치료를 위해서는 지방세포 특이적인 분비물질의 조절과 더불어 지방세포 분화과정에 관여하는 전사인자들의 활성을 억제하는 것이 중요하다.

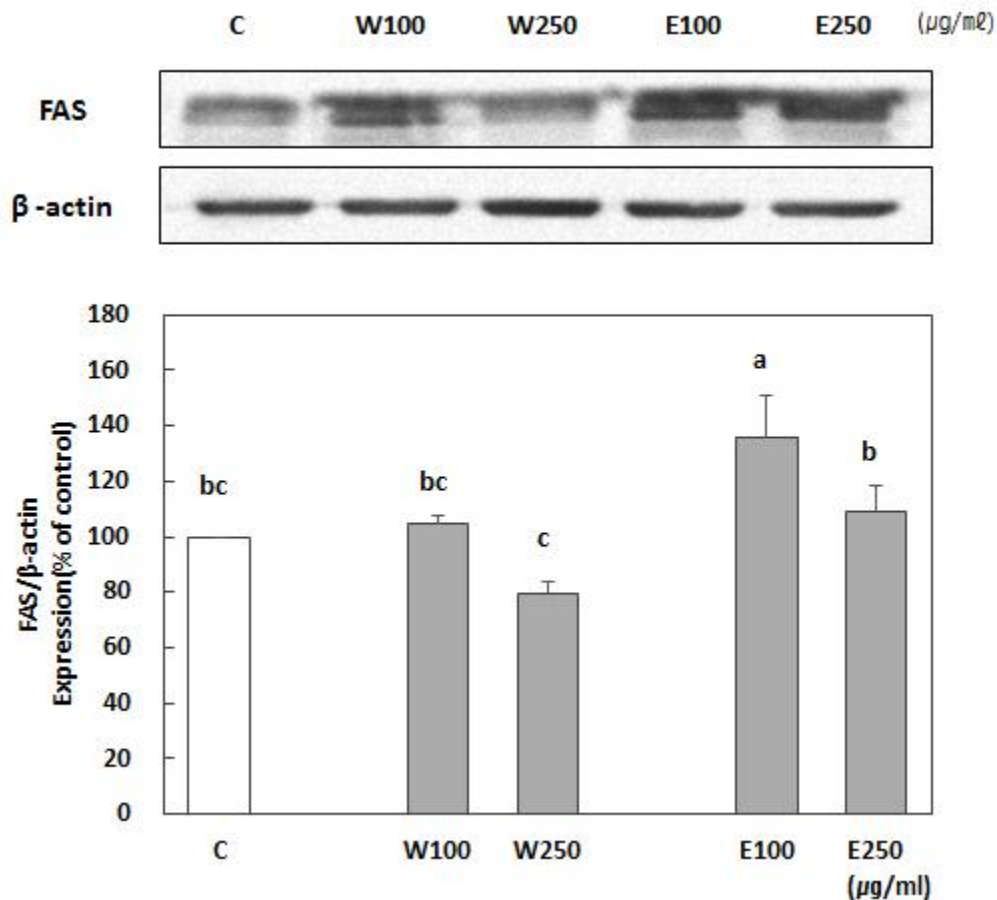
- 지방합성 (lipogenesis)는 지방전구세포 (preadipocyte)가 증식 및 분화되는 과정을 거쳐 성숙한 지방세포 (adipocyte)로 되는 과정을 의미하고, 이 과정에서 지질 축적, 호르몬에 대한 민감성 변화가 초래되며, 지방합성 및 지방분해 (lipolysis)에 관여하는 일련의 유전자 발현이 변화된다.
- C/EBP family와 PPAR  $\gamma$  는 호르몬에 의해 지방합성이 유도되는 과정에서 작용하는 전사인자이고, Nuclear receptor superfamily에 속하는 PPAR  $\gamma$  는 지방합성을 총괄적으로 조절하는 역할을 하며 지방세포로 분화된 상태를 유지하는데 필수적인 인자이다. 또한 C/EBP  $\beta$  는 PPAR  $\gamma$  발현을 촉진시켜 지방전구세포의 초기 분화과정에서 중요한 역할을 하는 한편, C/EBP  $\alpha$  는 PPAR  $\gamma$  와의 강한 상승 작용을 통해 지방전구세포의 말기 분화 과정을 촉진한다.
- 본 연구에서 PPAR-r와 C/EBP  $\alpha$  를 측정된 결과, 낙과 추출물의 지방 합성 억제 효과가 대조군에 비해 감소하였고 특히, 물 추출물의 C/EBP  $\alpha$  발현은 농도 의존적으로 감소하였다. 또한, 물 추출물이 에탄올 추출물에 비해 더 큰 단백질 발현 억제 효과가 관찰되었다. [그림55]



[그림55] Effect of fallen pear extracts on PPAR- $\gamma$  and C/EBP- $\alpha$  expression in 3T3-L1 adipocyte.

3T3-L1 cells were differentiated with hormonal cocktail for eight days in absence or presence of fallen pear extracts. Cell lysates were prepared and subjected to Western blotting to detect FAS. C: PBS, W100: fallen pear water extract 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , W250: fallen pear water extract 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , E100: fallen pear 50% EtOH extract 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , E250: fallen pear 50% EtOH extract 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

- 또한 이들 전사인자들의 하위 인자로 지방합성에 관여하는 fatty acid synthase (FAS)의 발현을 측정한 결과, 낙과 물 추출물이 에탄올 추출물에 비해 FAS 발현 억제 효과가 관찰되었다. [그림56]



[그림56] Effect of fallen pear extracts on FAS expression in 3T3-L1 adipocyte.

3T3-L1 cells were differentiated with hormonal cocktail for eight days in absence or presence of fallen pear extracts. Cell lysates were prepared and subjected to Western blotting to detect FAS. C: PBS, W100: fallen pear water extract 100μg/ml, W250: fallen pear water extract 250μg/ml, E100: fallen pear 50% EtOH extract 100μg/ml E250: fallen pear 50% EtOH extract 250μg/ml. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

- 세포실험에서 다양한 낙과 추출물로 지방생성 억제 효과 및 전사인자 발현 효과에 대하여 알아본 결과, 8월 낙과 물 추출물이 에탄올 추출물에 비하여 더 큰 억제효과가 관찰되었다.

- 따라서, 동물실험은 8월 낙과 물 추출물을 이용해서 실험을 진행하였다.

## 2. 이너뷰티케어(지질대사개선) 소재의 in vivo 기능성 평가

: 고지방식이로 유도한 비만 동물 모델에서의 체지방 감소 효과

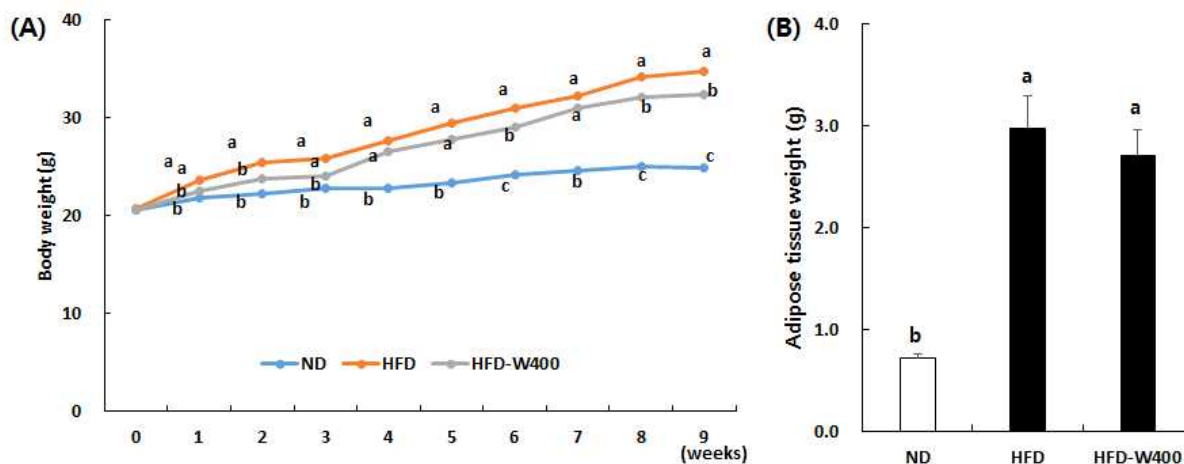
### ① 체중 및 체지방량 측정

- 실험동물을 9주간 사육하면서 매주 체중을 측정한 결과, 고지방식이 대조군의 체중이 기본식이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다.

- 낙과 물 추출물 처리군의 체중은 고지방식이 대조군이 비해 감소하였으며 특히, 실험 8주

부터는 고지방식이 투여로 인해 증가된 체중을 낙과 물 추출물이 유의적으로 감소하였다.

- 실험 종료 후 복부를 절개하여 총지방량의 무게를 측정된 결과, 고지방식이 대조군의 총지방량은 기본식이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며, 낙과 물 추출물 투여로 인해 감소하는 것을 관찰 할 수 있다. [그림57]

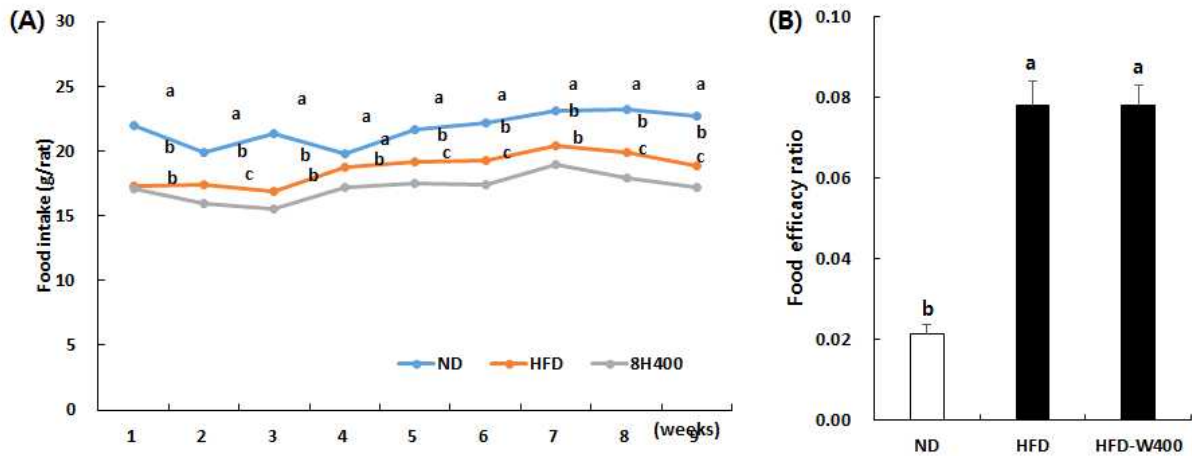


[그림57] Effect of fallen pear extracts on body weight(A) and adipose tissue weight(B).

ND-C : Normal diet (7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet (60% Kcal fat) + distilled water, HFD-W400: High fat diet (60% Kcal fat) + fallen pear water extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

## ② 식이섭취 및 식이섭취량

- 식이효율은 전 실험기간 동안의 식이섭취량을 같은 기간의 체중증가량으로 나눈 값으로, 실험물질의 투여가 식이섭취를 감소시킴으로서 체중 감소 효과를 나타내는지 보여주는 실험이다.
- 기본식이 대조군의 식이효율은 고지방식이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으나, 이는 체중증가량으로 인한 결과로 사료된다.
- 낙과 물 추출물의 식이섭취량은 고지방식이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으나, 식이효율의 유의적인 차이는 관찰되지 않았으므로, 식이섭취를 감소시킴으로서 체중 감소 효과가 나타났다고 볼 수 없다. [그림58]



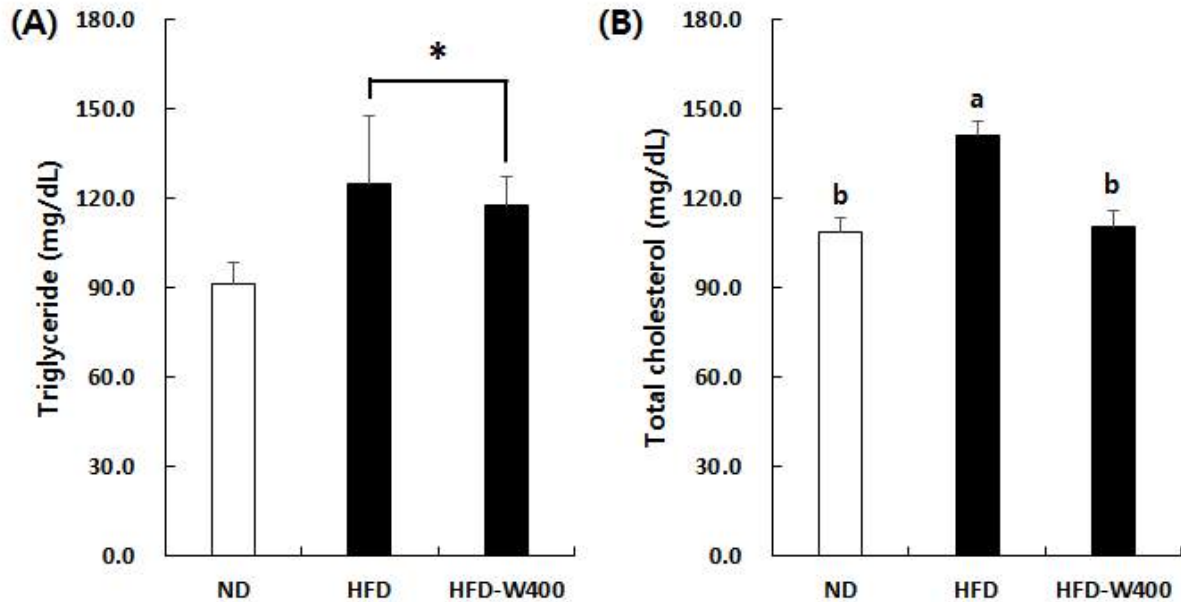
[그림58] Effect of fallen pear extracts on food intake(A) and food efficacy ratio(B).

ND-C : Normal diet (7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet (60% Kcal fat) + distilled water, HFD-W400: High fat diet (60% Kcal fat) + fallen pear water extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

### ③ 지질 수준 변화 측정

- 중성지방(Triglyceride)은 생체 내에서 에너지 저장형태로 존재하지만 만성퇴행성질환 (chronic degenerative disease) 발병 원인물질의 하나로 알려져 있다. 즉, 중성지방은 정상적으로 체내에 존재할 경우에는 문제가 되지 않지만 과량으로 축적되면 만성퇴행성질환을 비롯한 각종 질병에 걸리기 쉬워진다.
- 콜레스테롤(cholesterol)은 주로 간에서 생성되며, 혈중 콜레스테롤의 증가는 비만, 동맥경화 및 고혈압 등의 심혈관계 질환과 당뇨병, 지방대사 장애 등을 일으킨다.
- 실험결과, 낙과 물 추출물의 중성지방은 고지방식이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였고, 기본식이 대조군 간의 유의적인 차이는 관찰되지 않았다.
- 이는 고지방식을 섭취하더라도 낙과 물 추출물을 같이 섭취하면 기본식을 섭취한 것과 비슷한 수준으로 중성지방을 낮출 수 있음을 의미한다. [그림59 A]
- 또한, 낙과 물 추출물의 콜레스테롤은 고지방식이 대조군에 비해 감소하는 것을 관찰 할 수 있으나 [그림59 B] 고지방 식이 대조군과 t-test를 통해 비교한 결과 고지방식이 섭취 시 낙과 추출물의 섭취가 혈중 콜레스테롤을 감소시킴을 확인하였다.





[그림59] Effect of fallen pear extracts on triglyceride (A) and total cholesterol (B).

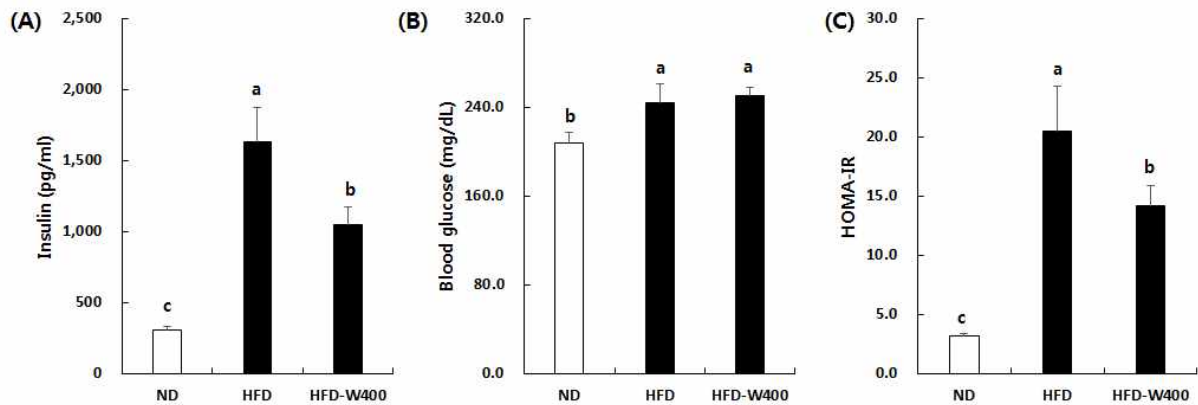
ND-C : Normal diet (7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet (60% Kcal fat) + distilled water, HFD-W400: High fat diet (60% Kcal fat) + fallen pear water extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ). Significant value was calculated by compared with HFD group by t-test ( $*p < 0.05$ )

#### ④ 인슐린 저항성 측정

- 인슐린은 혈당이 높아지면 이를 낮추기 위해 췌장의  $\beta$ -세포에서 분비되는 호르몬으로 인슐린 저항성이란 인슐린의 체내 작용이 떨어진 상태를 의미한다.
- 인슐린 저항성은 외형상 건강한 성인에게서 제2형 당뇨병뿐 아니라 비알코올성 지방간, 심혈관계 질환 등 각종 성인병의 원인이 될 수 있다.
- 또한 지질이상과 인슐린 저항성은 밀접한 관련이 있어 인슐린 저항성이 증가할 때 혈중 중성지방이 상승하고 HDL-콜레스테롤이 감소하며 혈관내피세포의 기능이상 및 죽상경화증 위험도의 증가 등이 초래될 수 있다.
- 인슐린 저항은 제 2형 당뇨병의 발병과정 동안 혈당치가 정상적인 포도당 내성 범주에 있을 때도 발생할 수 있으며 제 2형 당뇨병에서 인슐린 분비의 증가가 더 이상 인슐린 저항을 보상하지 못하면 고혈당이 유발되므로 증가된 인슐린 수준만으로 당뇨병을 설명하기에 충분치 않으며 반드시 혈당을 함께 고려하여 설명하여야 한다.
- HOMA 모델은 공복 인슐린과 혈당으로부터 인슐린 민감도와  $\beta$ -세포의 기능을 평가하는데 사용된다.
- 따라서 낙과 물 추출물이 고지방식으로 유도한 비만 동물모델에서 인슐린 저항성에 미치는 영향을 관찰하기 위해 혈당, 인슐린, HOMA-IR을 측정하였다.
- 실험결과, 고지방식이 대조군의 혈당이 기본식이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으나, 고지방식이 대조군과 낙과 물 추출물 처리군 간의 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. [그

림60 A]

- 또한, 고지방식이 대조군의 인슐린은 기본 식이 대조군이 비해 유의적으로 증가하였고, 낙과 물 추출물 투여로 인해 유의적으로 감소하였다. [그림60 B] 이에 따라 낙과 물 추출물 처리군의 인슐린 저항성은 고지방식이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다. [그림60 C]



[그림60] Effect of fallen pear extracts on blood glucose (A), insulin (B), and HOMA-IR (C).

ND-C : Normal diet (7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet (60% Kcal fat) + distilled water, HFD-W400: High fat diet (60% Kcal fat) + fallen pear water extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

### 3. 이너뷰티케어(장기능개선) 소재의 *in vivo* 기능성 평가

#### ① 변비 유발 동물 모델 확립

- 실험동물 식이에 변비유발물질인 loperamide를 0.03% 수준으로 첨가하여 변비상태를 유발하였다.
- 실험식이는 AIN-93G 식이에 식이섬유원으로 정상대조군과 변비유발 대조군은 5% 셀룰로오스, 변비유발+석세포 군은 각각 석세포 5, 10%를 첨가하였으며 실험식이의 조성은 [그림61]와 같다.

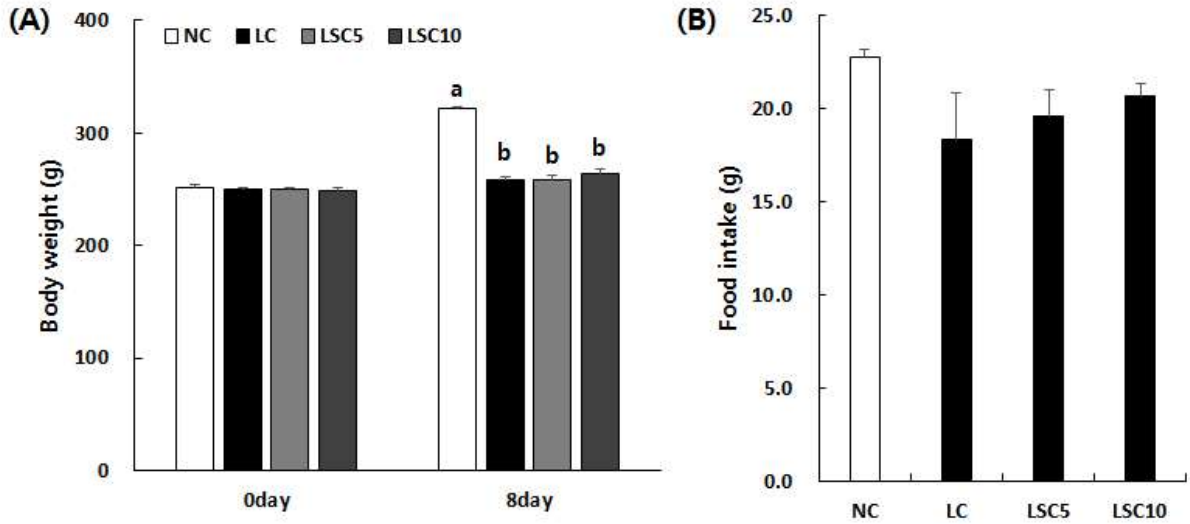
	(g/kg of diet)			
	NC	LC	LSC 5%	LSC 10%
casein	200	200	200	200
corn starch	397.5	397.5	397.5	347.5
Dextrose	132	132	132	132
sucrose	100	100	100	100
soybean oil	70	70	70	70
mineral mix	35	35	35	35
vitamin mix	10	10	10	10
L-cystein	3	3	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5
T-BHQ	0.014	0.014	0.014	0.014
cellulose	50	50	0	0
Stone cell	0	0	50	100
Loperamide	0	0.3	0.3	0.3



[그림61] Composition of experimental diet.

## ② 체중 및 식이섭취량

- Loperamide는 배변 기간의 증가, 대장 연동 운동의 저하와 더불어 일정기간 연속적으로 투여하면 대장 관 내 점액질의 두께가 얇아져서 대장 내용물의 이동에 지장을 초래하여 변비를 유발하고 그 증상이 사람에게서 일어나는 변비와 유사하다고 보고되었다.
- 또한, Loperamide를 투여로 인해 복부팽만, 식욕저하 등의 증상이 발견되며, 이로 인해 실험동물의 식이섭취량이 감소하는 경향을 보고한 바 있다.
- 실험결과, 변비 유발군들의 체중이 정상대조군에 비해 낮은 이유도 식이섭취량의 감소에 따른 체중증가 억제의 결과로 보여진다. [그림62]

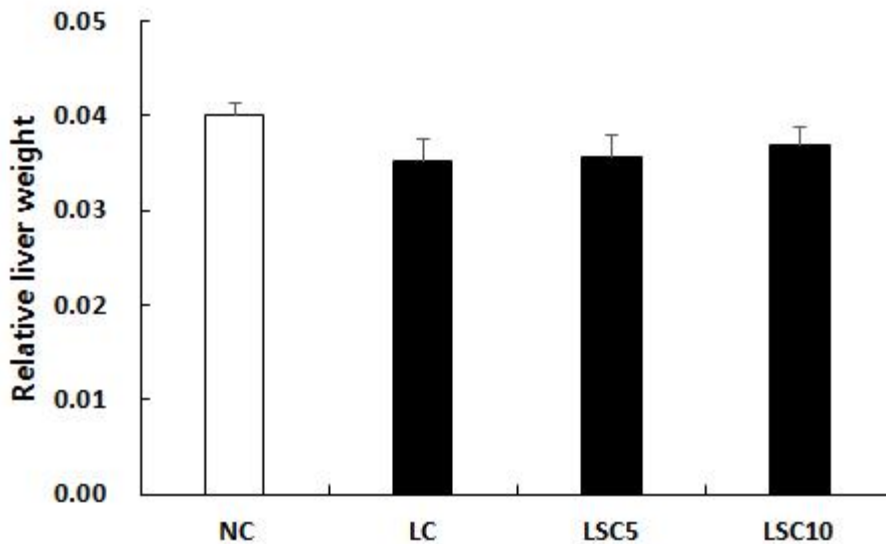


[그림62] Effect of stone cell extracts on the weight(A) and food intake(B) of loperamide-induced constipation rats.

NC: Normal diet, LC: Loperamide diet, LSC5: Loperamide + stone cell 5% diet, LSC10: Loperamide + stone cell 10% diet. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

③ 간 무게/몸무게

- 정상대조군에 비하여 변비대조군들의 간무게/몸무게는 유의적인 차이가 나타나지 않아, 석세포 10% 군에서도 간에 대한 독성이 없는 것으로 판단된다. [그림63]

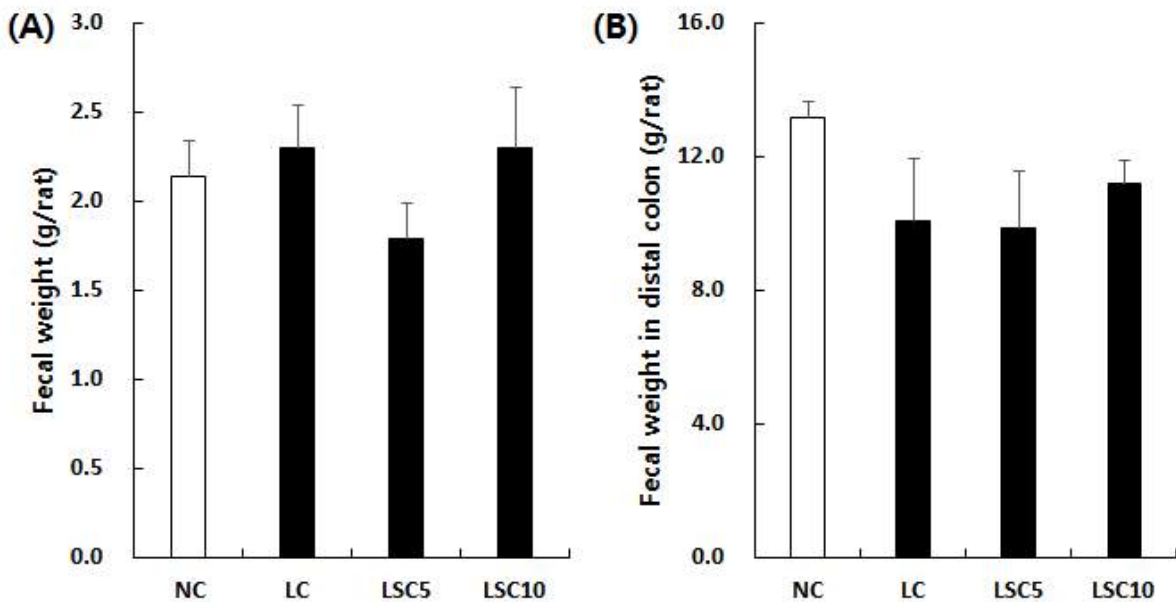


[그림63] Effect of stone cell extracts on the liver weight/ body weight of loperamide-induced constipation rats.

NC: Normal diet, LC: Loperamide diet, LSC5: Loperamide + stone cell 5% diet, LSC10: Loperamide + stone cell 10% diet. Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

④ 대변의 개수

- 배변량은 크게 세 가지에 의해 좌우되는데 첫째는 대장점막을 통해 수분 흡수 시간과 결합력, 둘째는 섬유질의 결합정도, 마지막으로 대장 내 세균의 양에 따라 좌우됨. 식이섬유소를 섭취할 경우 수분 흡수시간은 감소하나 결합력은 증가하며 장내 유익세균의 이용률이 증가되어 배변량을 증가시켜 전분의 가수분해를 감소시켜주는 것으로 보고되었다.
- 일반적으로 펙틴 등의 수용성 식이섬유소는 발효성이 커서 섬유질이 대장에서 장내세균들에 의해 분해되므로 배변량 증가 효과는 적다고 알려져 있고, 셀룰로오스와 같은 불용성 식이섬유소는 용적증가 효과가 크기 때문에 배설물의 보수성을 향상시켜 변의 용적 및 무게를 증가시키고 변량 및 횟수를 증가시킴으로서 정상작용을 돕는 것으로 알려져 있다.
- 결과적으로, 불용성 식이섬유소 증가에 따른 수분 보유력, 장 내용물의 부피 증가, 점성의 부여로 변량이 현저히 많아진다.
- 따라서 석세포 추출물이 변비 유발 동물의 대변량에 미치는 영향을 측정한 결과, 실험기간동안의 변량은 변비대조군에 비하여 석세포 투여군에서 증가하는 경향을 나타냈으며, 장내 변량은 변비대조군에 비하여 석세포 10% 투여군에서 증가하는 것을 관찰 할 수 있었다. [그림64]

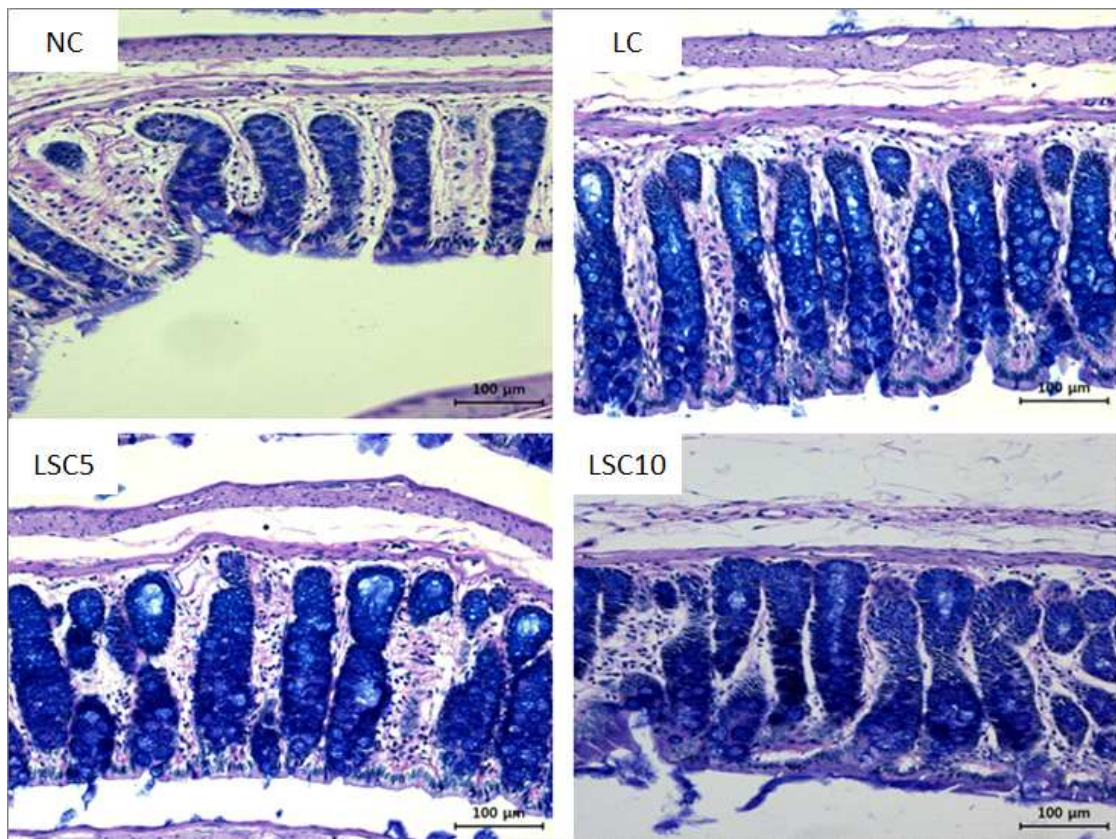


[그림64] Effect of stone cell extracts on the fecal weight for 8day (A) and fecal weight in distal colon (B) of loperamide-induced constipation rats.

NC: Normal diet, LC: Loperamide diet, LSC5: Loperamide + stone cell 5% diet, LSC10: Loperamide + stone cell 10% diet. Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

⑤ 대장관 내 점액질 측정

- 변비 증상이 있을 경우에는 장 점막층 기능이 감소되며, loperamide를 장기간 투여하면 대장의 점액질을 손상시켜 두께가 얇아지고 결과적으로 대장 내용물의 이동에 지장을 초래하게 된다.
- 실험동물의 대장조직을 파라핀 절편으로 만들어 alcian blue로 염색하여 이미지 분석 현미경으로 관찰한 결과, 정상대조군에 비하여 변비유발군에서 crypt cell 내의 염색되는 점액이 감소하는 것이 관찰되었으나 석세포 투여군은 변비대조군과 비슷한 정도의 점액분비량이 증가한 것을 관찰 할 수 있었다. [그림65]



[그림65] Alcian Blue(AB) staining showed presence of acidic mucins in colonic glands in a segment with fecal transit. The number of goblet cells and acidic mucins are mildly increased in 5% SC treated group and 10% SC treated group (AB-x200).

NC: Normal diet, LC: Loperamide diet, LSC5: Loperamide + stone cell 5% diet, LSC10: Loperamide + stone cell 10% diet.

- 장기능 개선 실험에서 loperamide의 투여방법에 따른 변비유발 방법이 여러 가지 존재하며, 이에 따른 변비 정도의 차이가 존재함. 본 실험에서 사용한 변비유발 방법은 급성변비를 유발하는 방법으로, 추출물 투여로 인한 빠른 변화를 관찰하기 어려운 점이 있다. 또한 지속적인식이섬유소 섭취가 변비 개선에 더 큰 영향을 미치므로 만성 변비에 더

효과적일 것으로 사료된다.

## ■ 제 2 협동과제 : 낙과(미숙과)유래 이너뷰티소재의 기능성 효능평가 ■

### I. 연구재료 및 방법

#### 1. 이너뷰티케어(면역조절능관련 성분) 소재의 cell-based assay 기능성 평가

##### ① 세포 배양

- Raw 264.7 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, America)으로부터 분양을 받았다. Raw 264.7 세포는 100 Units/mL penicillin, 100 µg/ml streptomycin과 10% newborn calf serum (FCS, GIBCO)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO) 배지의 조건에서 5% CO<sub>2</sub>와 37°C의 세포 배양기에서 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

##### ② Western blotting analysis

- Raw 264.7 세포에 LPS (1 µg/mL)와 함께 추출물을 첨가한 후 24시간 배양하였다. 배양 후 세포를 PBS 용액으로 2회 세척한 후 lysis buffer를 넣고 4°C에서 10분간 용해시킨 후 13,000rpm 4°C에서 20분간 원심분리하여 상층액만 회수해 단백질 양을 정량하였다. Lysate 30 µg을 취하여 SDS loading buffer에 혼합하여 95°C에서 10분간 가열시킨 후 10% SDS polyacrylamide gel에 100-150V로 전기영동 한 다음 nitrocellulose membrane에 전이시킨다. 5%무지분유가 첨가된 TBS-T용액으로 3회(각각 7분씩) 세척한 후 일차항체로 2시간 동안 반응시키고 다시 TBS-T용액으로 3회 세척한다. 그 다음 peroxidase가 포함된 이차항체(goat anti mouse 1 : 2000, anti rabbit 1 : 2000)로 1시간 동안 반응시키고 chemiluminescent substrate 용액을 사용하여 목적 단백질을 확인하였다.

##### ③ 통계처리

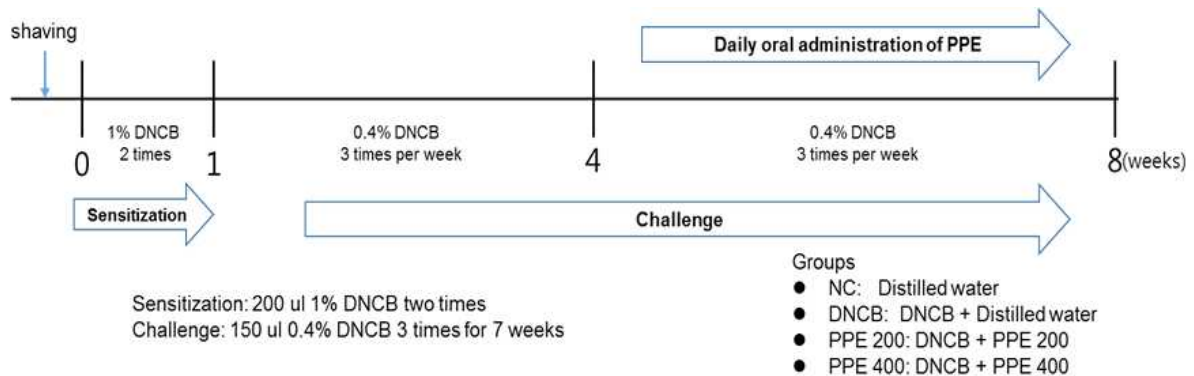
- 모든 실험결과는 최소한 3회 이상 반복하여 평균치 ± 표준오차로 표시하였고, 각 군과의 비교는 ANOVA test 후 Duncan's multiple test를 이용하여 군 간의 유의성을 판정하였다. (p<0.05)

#### 2. 이너뷰티케어(면역조절능관련 성분) 소재의 in vivo 기능성 평가

##### ① 아토피 피부염 유도 및 추출물투여

- 주령의 Nc/Nga 생쥐를 오리엔트바이오에서 공급받아 실험에 사용하였다. 실험동물은 등

부위를 깨끗하게 제모하고, 피부의 미세 상처가 치유되도록 방치한다. 제모 2일째 1% DNCB용액(아세트:올리브 오일=3:1) 200  $\mu$ l를 등 부위에 도포하여 1차 감작 시키고 2일 후 재도포하여 2차 감작시켰다. 2차 감작 4일 후, 0.4% DNCB 150  $\mu$ l를 이용하여 3차 감작을 시작하였으며, 3주간 주 3회씩 감작하여 총 4주간 아토피 피부염을 유발하였다. 4주간의 감작으로 아토피 피부염이 유발된 이후 총 28일간 추출물을 투여하였으며, 투여기간 동안 주 3회의 항원감작을 유지하였다.



[그림66] Schematic diagram of the experiment protocol in mice.

- 실험군은 아토피 비유발 대조군(Normal control), 아토피 유발 대조군(DNCB-control), 아토피 유발 동물에 추출물을 먹인 실험군(저, 고농도)으로 나누어 사육하였고, 추출물 투여량 200 mg/kg, 400 mg/kg 배박 에탄올 추출물을 증류수에 현탁시켜 경구투여하였다. 식이는 AIN-93G 식이를 pellet 형태로 공급하였다.

## ② 식이효율 및 체중 측정

- 동물을 사육하는 동안 매주 체중을 측정하고 먹이 섭취량을 측정하였다. 먹이 섭취량은 전날 공급분에서 남은 양을 빼는 방법으로 계산하였다.

## ③ 가려움증 판정 시험

- 실험동물의 가려움증 판정 시험을 위해 0.4% DNCB 150  $\mu$ l를 도포한 후 20분 동안 긁는 모습을 관찰하였다. 실험동물은 개체 별로 격리하여 관찰하였으며 각 마우스가 몇 번을 긁는지 횟수를 세었다. 2초 이상 길게 이어지는 연속동작은 n초간 지속된 경우 n 회로 세었고, 2초 내의 짧은 동작은 각각 1회로 세었다.

## ④ 혈청 내 면역글로블린 농도 측정

- 가려움증 판정 관찰 실험 종료 후 경추탈골을 통해 실험동물을 희생시켰다. 심장 천자법



을 이용하여 채혈한 다음 3000 rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 실험에 이용할 때까지 -70℃에 냉동 보관하였다. 혈청 내 IgE 측정은 ELISA kit를 사용하였다.

#### ⑤ 관능평가

- 추출물 처리 후 3주 때 아토피 피부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가법으로 관능평가를 실시하였다. 평가 항목은 홍반(Erythema), 가려움과 건조피부(Pruritus & Dry Skin), 부종과 혈종(Edema & excoriation), 짓무름(Erosion), 태선화(Lichenification)로 나누고, 각각의 항목은 없음(0), 약함(1), 중증도(2), 심함(3)으로 채점하였다.

#### ⑥ 등 피부조직 채취 및 염색

- 등의 피부를 데어내어 10% 포르말린에 24시간 고정하였다. 그 조직을 파라핀으로 포매하였고, 5 μm 두께로 block을 만들었다. 그 조직부분은 염증을 일으키는 epidermis, deris, keratinocytes, neutrophils/eosinophil, 그 외 다른 세포와 부종을 식별하는 H&E 염색과 비만세포를 염색하는 toluidine blue 연색으로 비만세포의 침윤을 광학현미경으로 관찰하였다.

#### ⑦ 통계처리

- 모든 실험결과는 최소한 3회 이상 반복하여 평균치 ± 표준오차로 표시하였고, 각 군과의 비교는 ANOVA test 후 Duncan's multiple test를 이용하여 군 간의 유의성을 판정하였다. (p<0.05)

## II. 연구결과

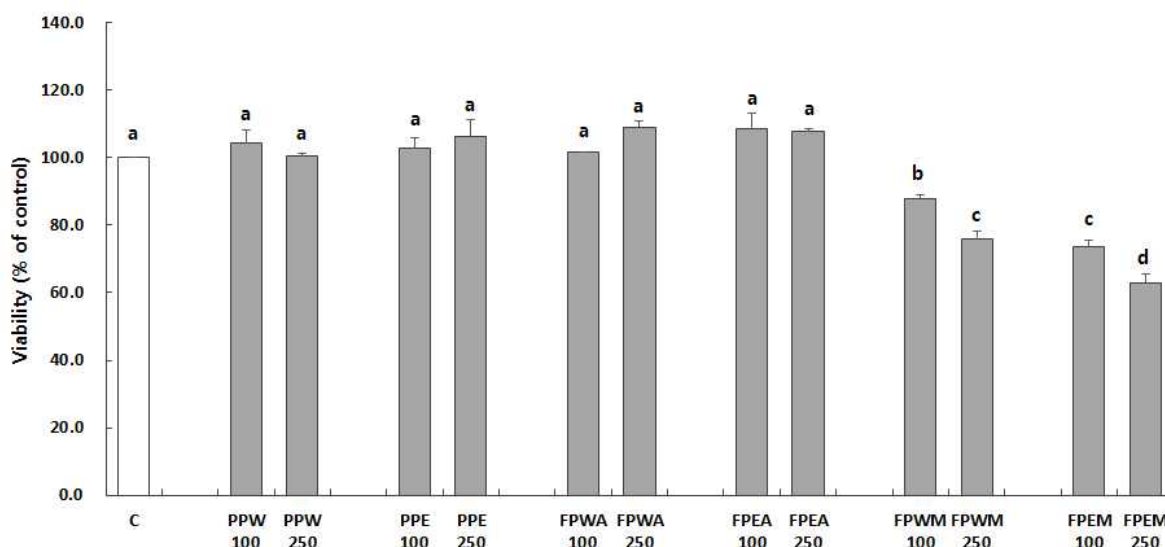
### 1. 이너뷰티케어(면역조절능관련 성분) 소재의 cell-based assay 기능성 평가

- 체내의 염증 반응은 외부로부터 침입한 병원성 물질이나 조직의 손상에 대한 방어작용으로 나타나는데, 이는 정상적인 조직의 구조과 기능을 회복하기 위해 필수적으로 일어나는 반응이다.
- 정상적인 염증반응은 시간이 지남에 따라 염증촉진성 매개체(pro-inflammatory mediators)의 생성은 감소되고, 항염증성 매개체(anti-inflammatory mediators)는 증가됨으로써 스스로 염증반응이 제한되는 조절과정을 가지고 있다.
- 그러나 이러한 염증반응 조절과정에 이상이 생기거나 최초 염증반응 유발원인이 완전히 제거되지 못하였을 경우 염증 촉진성 매개체들은 지속적으로 과잉 생성되게 되고, 이 경우 만성적인 염증상태가 유지됨으로써 조직 손상을 유발하는데 작용을 할 수 있다.

- 동맥경화, 염증성 관절염 및 암, 그리고 노화 및 알츠하이머병을 포함하는 퇴행성 신경질환과 같은 질환들의 발병에 이러한 만성적인 염증반응이 관련되어 있는 것으로 알려져 있다.

① 세포 독성 측정

- RAW 264.7 대식세포에 대한 낙과와 배박 추출물의 독성을 측정하기 위하여 농도별로 처리하여 MTT assay 방법으로 세포 생존율을 측정하였다. 세포 MTT 반응에서 80% 이상의 생존율을 보이는 경우 세포독성이 없는 것으로 판단하였다.
- 본 실험에서 세포독성은 배박 물 추출물(PPW), 배박 에탄올 추출물(PPE), 8월 수확 낙과 물 추출물(FPWA), 8월 수확 낙과 에탄올 추출물(FPEA) 군에서는 전체적으로 생존율의 변화가 거의 나타나지 않은 반면에 5월 수확 낙과 물 추출물(FPWM)과 5월 수확 낙과 에탄올 추출물(FPEM) 군에서는 농도 의존적으로 감소하였다. [그림67]



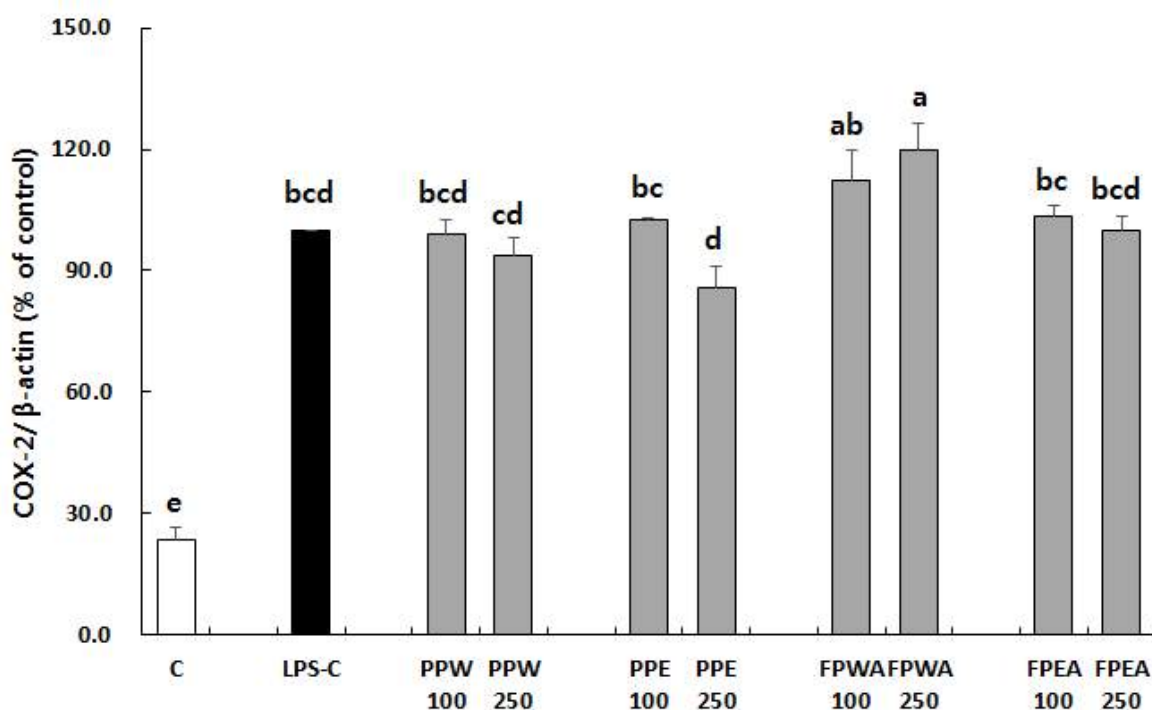
[그림67] Effect of pear pomace ethanol extract on body weight (A) and body weight gain (B) in a developmental AD model.

NC: acetone: olive oil=3:1 + distilled water, DNCB-C: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + distilled water, PPE 200: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + pear pomace ethanol extract 200 mg/kg body weight, PPE 400: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + pear pomace ethanol extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

② 염증반응 관련 단백질 발현 측정

- 체내의 면역반응에 관여하는 세포 중 하나인 대식세포(macrophages)는 염증 반응에 중요한 역할을 하고 있다. 대식세포는 interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )와 같은 염증촉진성 cytokines, 그리고 세균 세포막성분인 lipopolysacchrides (LPS) 등의 자극에 노출됨으로써 활성화된다.

- 활성화된 대식세포는 염증 촉진성 cytokine 이외에 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 및 cyclooxygenase-2 (COX-2) 와 같은 효소의 발현을 통해 nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E2 (PGE2)와 같은 다양한 염증매개체들을 생성하게 된다.
- 따라서 배박 및 낙과 추출물이 LPS로 유도된 염증반응을 억제 하는지 관찰하기 위해 COX-2 발현을 측정하였다.
- 실험결과, LPS-대조군의 COX-2 발현은 정상 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며, 배박 에탄올 추출물 투여로 인해 감소하는 것을 관찰 할 수 있었다. [그림68]
- 또한, 배박 물 추출물 투여군과 8월 수확 낙과 에탄올 추출물 처리군도 감소하는 것을 관찰 할 수 있었으나, 배박 추출물이 낙과 추출물에 비해 더 큰 단백질 발현 감소 효과가 관찰되었다. [그림68]

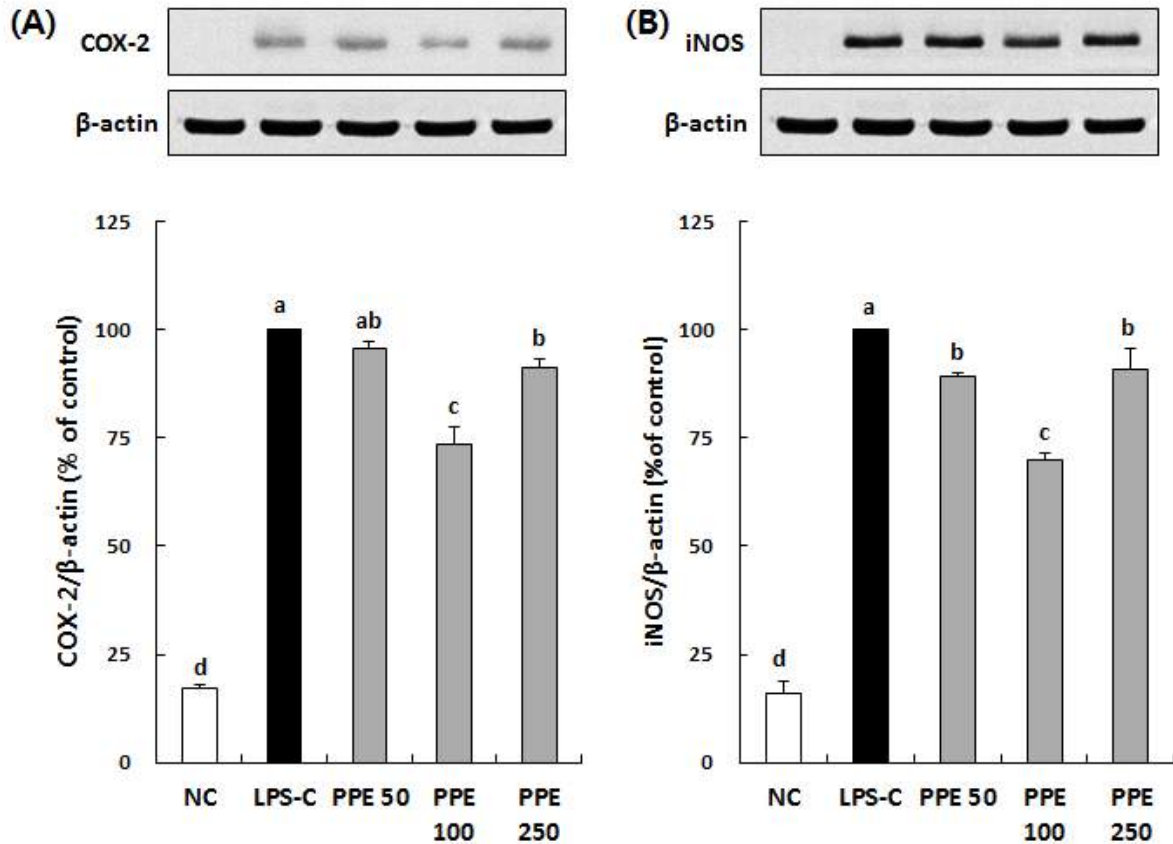


[그림68] Effect of pear pomace ethanol extract on body weight (A) and body weight gain (B) in a developmental AD model.

NC: acetone: olive oil=3:1 + distilled water, DNCB-C: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + distilled water, PPE 200: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + pear pomace ethanol extract 200 mg/kg body weight, PPE 400: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + pear pomace ethanol extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

- 따라서 배박 에탄올 추출물을 농도별 처리하여 염증 반응 관련 단백질 발현을 측정하였다.
- 실험결과, LPS-대조군의 iNOS와 COX-2 발현은 정상 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며, 배박 에탄올 추출물 투여로 인해 감소하는 것을 관찰 할 수 있었다. [그림69]
- 특히 배박 에탄올 추출물 100 µg/ml 처리군 가장 낮은 단백질 발현 감소 효과를 관찰 할

수 있었다.



[그림69] Effect of pear pomace ethanol extract on body weight (A) and body weight gain (B) in a developmental AD model.

NC: acetone: olive oil=3:1 + distilled water, DNCB-C: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + distilled water, PPE 200: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + pear pomace ethanol extract 200 mg/kg body weight, PPE 400: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + pear pomace ethanol extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

- 세포실험에서 다양한 배박 및 낙과 추출물로 염증반응 관련 단백질 발현 효과에 대하여 알아본 결과, 배박 에탄올 추출물이 낙과 추출물에 비하여 더 큰 억제효과가 관찰되었다.
- 따라서, 동물실험은 배박 에탄올 추출물을 이용해서 실험을 진행하였다.

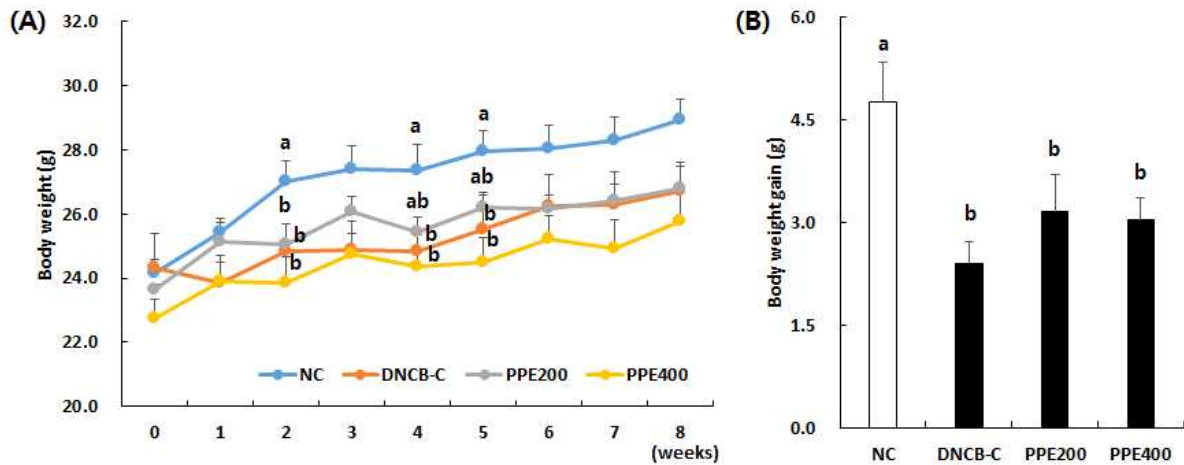
## 2. 이너뷰티케어(면역조절능관련 성분) 소재의 *in vivo* 기능성 평가

- 아토피 피부염(Atopic dermatitis, AD)은 가려움증을 동반하는 만성 재발성 습진질환으로 알레르기 비염, 기관지 천식으로 이어지는 이른바 아토피 행진의 시작이 될 수 있는 질환이다. 현재까지 정확한 원인과 발병기전이 밝혀져 있지는 않으나 유전적인 소인, 환경적 요인, 심리적 요인, 면역학적 요인 및 피부장벽기능 이상이 중요한 원인 및 기전으로 제시되고 있다.

- NC/Nga 마우스는 자발적으로 아토피성 피부염이 발생하는 동물모델로 1997년 Matsuda 등에 의해 보고 되었으며, 보통의 환경(conventional circumstance)에서 사육하며 특별한 항원 접촉 없이도 아토피 피부염과 유사한 피부 병변이 발생하며 혈청 IgE의 생성이 증가됨이 발견되었다.
- 피부는 외부환경과 체내의 경계를 이루면서 수많은 항원에 접촉할 기회를 갖는다. 아토피성 피부염이 발병하면 피부의 과민반응과 소양증에 대한 역치의 감소로 인해서 피부를 긁게 되고, 긁는 자극과 염증반응은 피부의 각질 세포에서 사이토카인을 분비시켜 염증반응을 심화시키고, 각질층의 변형을 유도하며 면역세포를 활성화시킨다.
- 이러한 과정에 나타나는 피부소양감, 피부 변형(홍반, 건조피부, 부종과 혈종, 짓무름, 태선화) 정도와 혈청 중 IgE 함량 등을 근거로 배박 에탄올 추출물의 아토피성 피부염 개선 효과를 평가하였다.
- 현재 임상에서 아토피성 피부염에 주로 사용되는 약물은 항히스타민제, 국소 스테로이드 제제, 면역 억제제 등이 있다. 항히스타민제만으로는 아토피성 피부염의 가려움증에 한계가 있으며, 국소 스테로이드 제제는 피부 위축 등의 부작용이 발생할 수 있다. 또한, 면역 억제제는 간독성, 신독성, 전해질 이상 등의 전신적 부작용이 보고되는 등 안전성 문제가 심각하여 최근에는 치료제로서 활용 가능한 천연소재에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다.
- 이에 본 연구에서는 아토피 동물모델에 배박 에탄올 추출물을 경구투여하여 효능 평가를 위해 관능 검사와 scratchinh behavior를 측정하였으며 혈청 내 IgE 농도와 피부 및 귀의 조직 병변을 관찰하였다.

① 체중 및 체중증가량

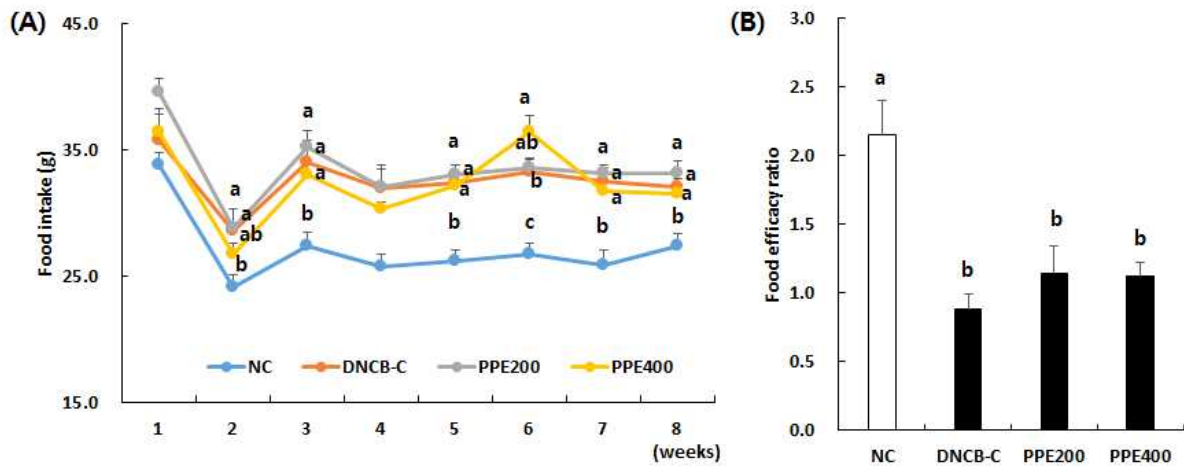
- 실험 시작 시 실험동물의 체중은 평균  $23.70 \pm 0.56$  g으로 각 군 간에 차이가 없었으며 사육기간이 지남에 따라 군 간에 약간의 차이가 관찰되었으며, 정상대조군에 비해 DNCB-대조군이 감소하는 것을 관찰 할 수 있다.
- 체중증가량은 정상 대조군에 비해 DNCB-대조군이 유의적으로 증가하였고, DNCB-대조군과 배박 에탄올 추출물 처리군 간의 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. [그림70]



[그림70] Effect of pear pomace ethanol extract on body weight (A) and body weight gain (B) in a developmental AD model.

NC: acetone: olive oil=3:1 + distilled water, DNCB-C: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + distilled water, PPE 200: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + pear pomace ethanol extract 200 mg/kg body weight, PPE 400: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + pear pomace ethanol extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

- 식이섭취량은 실험군 간의 약간의 증감의 차이는 보였고, 식이효율은 DNCB-대조군에 비해 정상대조군이 유의적으로 감소하였으나, DNCB-대조군과 배박 에탄올 추출물 처리군 간의 유의적인 차이는 관찰되지 않았다.

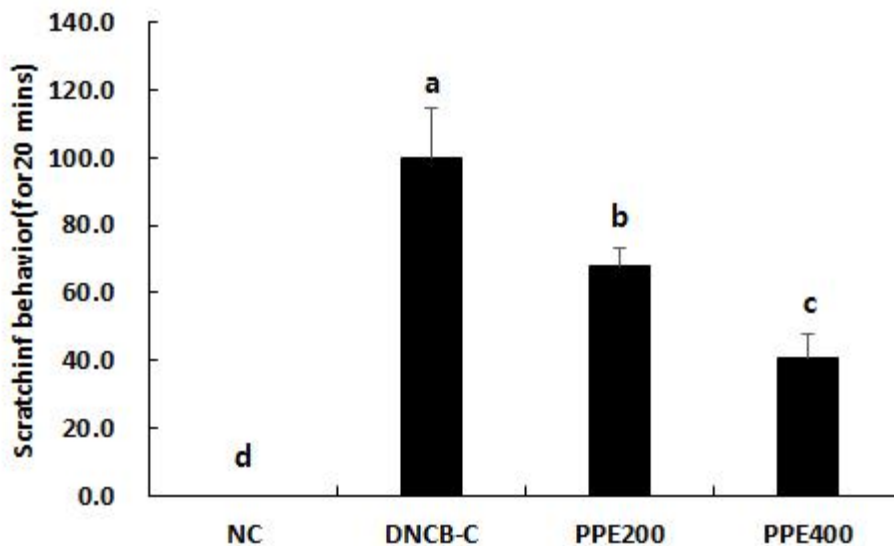


[그림71] Effect of pear pomace ethanol extract on food intake (A) and food efficacy ratio (B) in a developmental AD model.

NC: acetone: olive oil=3:1 + distilled water, DNCB-C: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + distilled water, PPE 200: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + pear pomace ethanol extract 200 mg/kg body weight, PPE 400: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + pear pomace ethanol extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

② 가려움증 판정 시험

- 소양증은 아토피성 피부염의 주요 증상들 중 하나이며, 반복적으로 병변을 긁게하여 찰상과 태선화 등의 2차적인 병변을 유발시킨다. 또한, 가려움증으로 인한 긁는 행위는 피부 장벽을 손상시킬 뿐만 아니라 심할 경우 환자의 삶의 질에 극심한 영향을 준다고 알려져 있다.
- 가려움증과 환자의 우울증이 상관관계가 있음이 밝혀졌으며, 아토피성 피부염 환자들 중 다수가 소양증으로 인하여 일상생활을 하는데 성가시고(78.9%), 걱정스럽고(72.2%), 화가 난다고(70.7%) 느끼는 것으로 보고되었다.
- 따라서 소양증의 완화가 아토피성 피부염의 치료에 큰 비중을 차지하게 되므로, 본 연구에서는 배박 에탄올 추출물이 가려움증이 완화되어 긁는 횟수를 감소시킬 수 있는지 조사하였다.
- DNCB를 도포하여 자극한 후 20분간 긁는 횟수를 관찰한 결과, DNCB-대조군의 긁는 횟수는 정상 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며, 배박 에탄올 추출물 투여로 인해 농도 의존적으로 감소하였다. [그림72]



[그림72] Effect of pear pomace ethanol extract on scratching behavior in a developmental AD model.

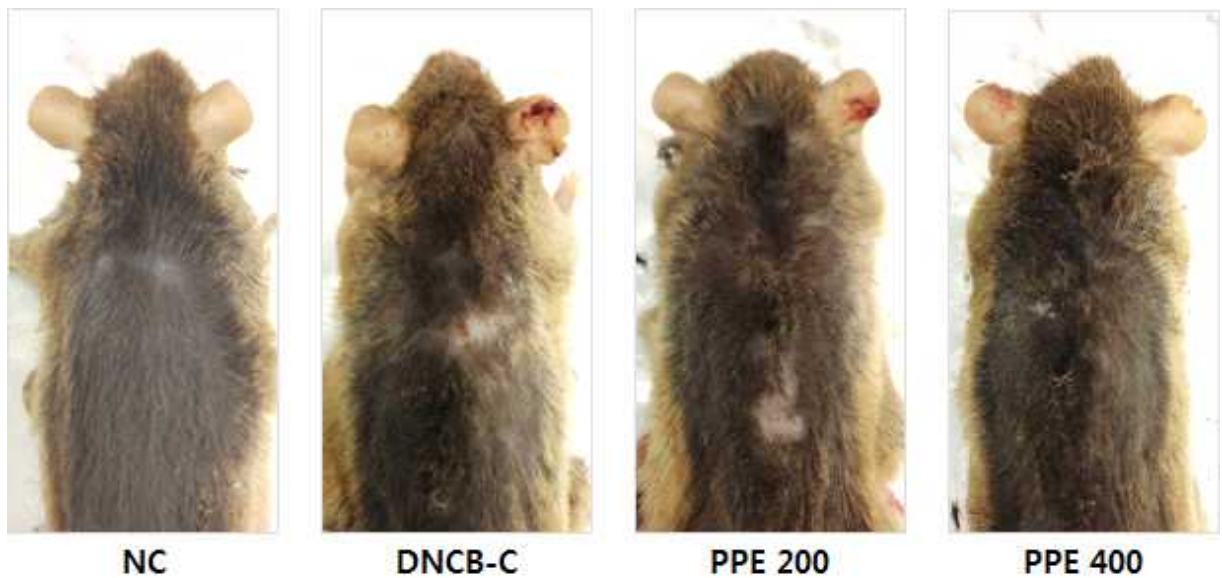
NC: acetone: olive oil=3:1 + distilled water, DNCB-C: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + distilled water, PPE 200: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + pear pomace ethanol extract 200 mg/kg body weight, PPE 400: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + pear pomace ethanol extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

### ③ 관능평가 시험

- 아토피성 피부염이 발병하면 과민 반응인해 피부를 긁거나 문지르게 되고 이는 흥반이나

태선, 짓무름, 가려움증 등을 동반한 염증반응을 심화시키고, 피부 장벽의 기능을 손상시켜서 여러 항원들과 자극물들의 피부내로의 침투를 용이하게 만들며, 심한 소양증을 유발시켜 염증반응이 가중되는 순환이 발생하게 된다.

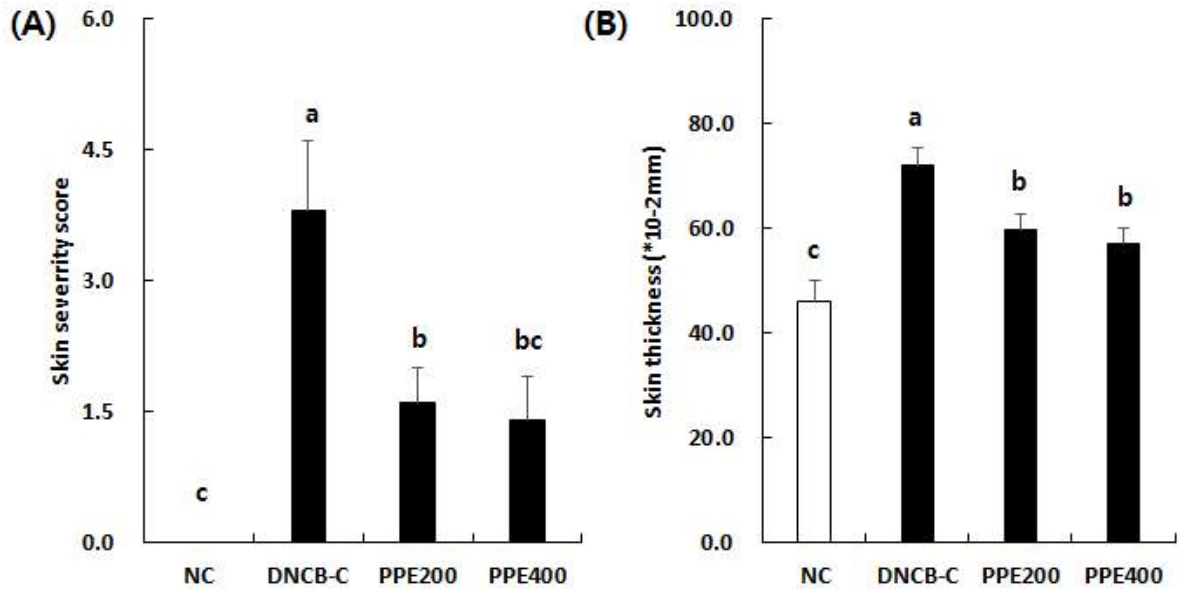
- 따라서, 배박 에탄올 추출물이 DNCB에 의해서 유도된 아토피 피부염의 여러 증상들을 점수화하여 종합, 관찰하는 관능검사를 측정하였다.
- 실험결과, DNCB-대조군의 관능평가 점수는 정상 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며, 배박 에탄올 추출물 투여로 인해 감소하였다. 특히 배박 에탄올 추출물 400 mg/kg 투여군의 관능평가 점수는 정상 대조군과 비교하여도 유의적인 차이가 없었다. [그림73 A, B]



[그림73] Effect of pear pomace ethanol extract on clinical skin feature in a developmental AD model.

NC: acetone: olive oil=3:1 + distilled water, DNCB-C: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + distilled water, PPE 200: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + pear pomace ethanol extract 200 mg/kg body weight, PPE 400: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + pear pomace ethanol extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )



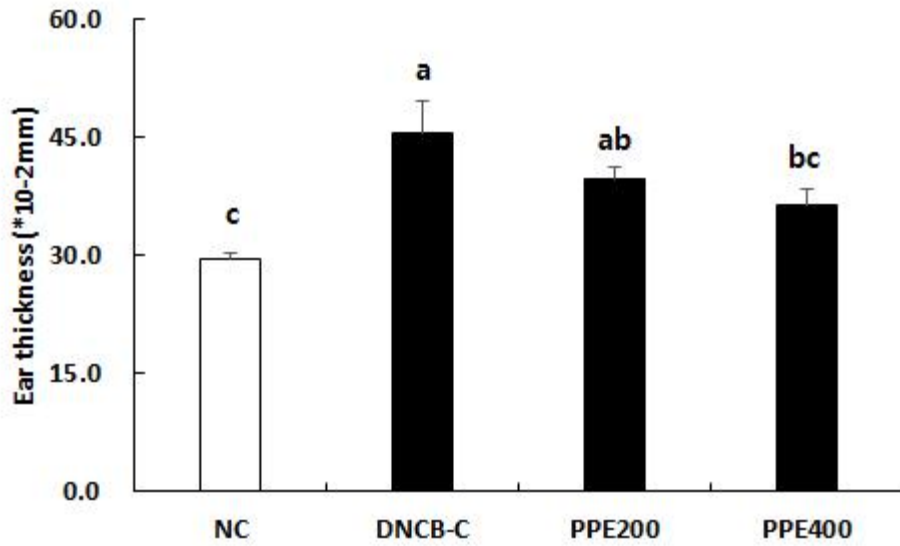


[그림74] Effect of pear pomace ethanol extract on skin severity score (A) and skin thickness (B) in a developmental AD model.

NC: acetone: olive oil=3:1 + distilled water, DNCB-C: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + distilled water, PPE 200: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + pear pomace ethanol extract 200 mg/kg body weight, PPE 400: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + pear pomace ethanol extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

#### ④ 귀 두께 변화 측정

- DNCB에 의한 감각 반응은 알레르겐에 의해 알레르기 및 염증 반응을 유발시켜 귀에서 swelling이 일어나 귀의 무게 및 두께를 증가시킨다고 보고되어 있다.
- 따라서, 배박 에탄올 추출물이 DNCB에 의해서 유도된 아토피 피부염이 발생한 마우스의 귀 두께에 미치는 영향을 관찰하기 위해 실험 종료 후 귀 두께를 측정하였다.
- 실험결과, DNCB-대조군의 귀 두께는 정상 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며, 배박 에탄올 추출물 투여로 인해 감소하였다. 특히 배박 에탄올 추출물 400 mg/kg 투여군의 귀 두께는 DNCB-대조군에 비해 유의적으로 감소하였다. [그림75]

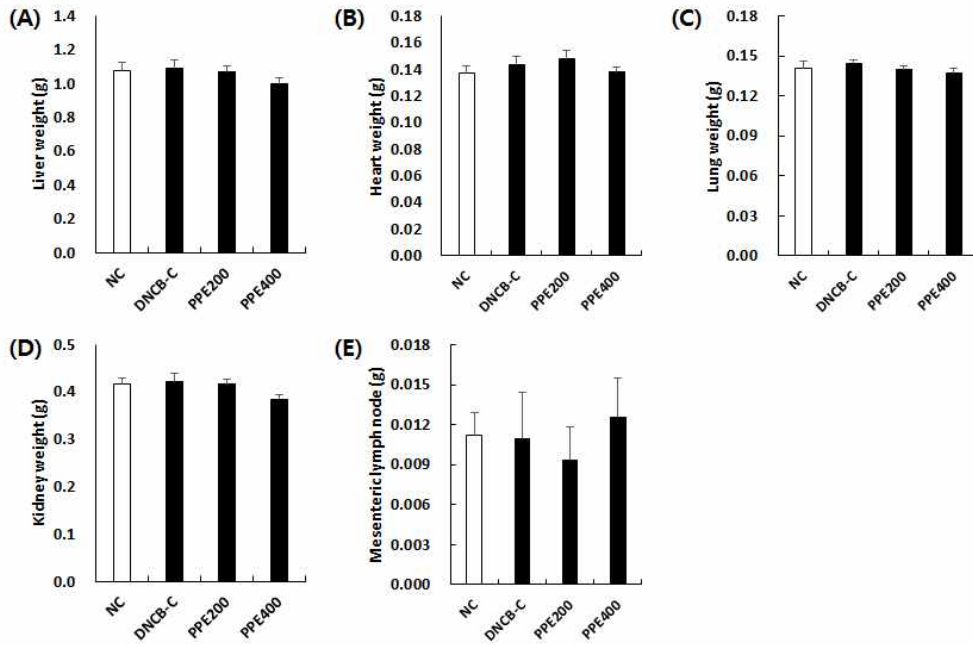


[그림75] Effect of pear pomace ethanol extract on ear thickness in a developmental AD model.

NC: acetone: olive oil=3:1 + distilled water, DNCB-C: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + distilled water, PPE 200: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + pear pomace ethanol extract 200 mg/kg body weight, PPE 400: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + pear pomace ethanol extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

⑤ 장기무게 변화

- 실험 종료 후 간, 심장, 폐, 신장, 림프절의 무게를 측정한 결과, 실험군 간의 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. [그림76]

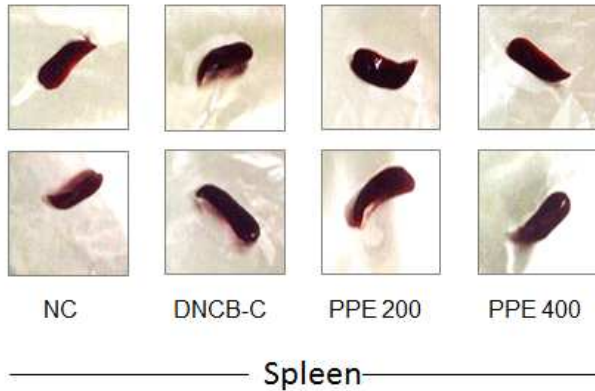


[그림76] Effect of pear pomace ethanol extract on liver (A), heart (B), lung (C), kidney (D), and mesenteric lymph node (E) in a developmental AD model.

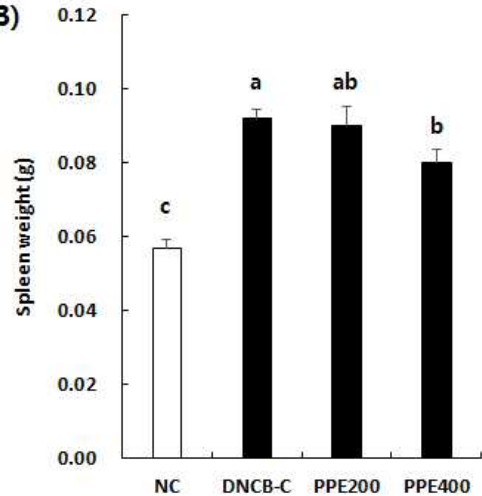
NC: acetone: olive oil=3:1 + distilled water, DNCB-C: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + distilled water, PPE 200: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + pear pomace ethanol extract 200 mg/kg body weight, PPE 400: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + pear pomace ethanol extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

- 아토피 피부염의 반응은 면역기관 내 다양한 반응을 유도하며, 이러한 반응은 일차적으로 면역기관의 무게에 영향을 줄 수 있다. 특히 비장(spleen)은 1차와 2차 림프기관의 특성을 모두 나타내며, 적혈구를 여과하는 적비수(red pulp)와 체액성 면역과 세포성 면역 활성을 나타내는 백비수(white pulp)로 구성되어 있으며, 면역반응에서 또 다른 중요한 기관이다.
- 또한, 비장은 B 세포 발생의 최종단계가 진행되는 곳이며, 동시에 혈액에서 유래된 항원에 반응하는 특화된 기관으로서 기능을 갖는다.
- 본 연구에서는 배박 에탄올 추출물이 DNCB에 의해서 유도된 아토피 피부염이 발생한 마우스의 면역장기에 미치는 영향을 관찰하기 위해 비장(spleen)의 무게를 측정하였다.
- 실험결과, DNCB-대조군의 비장 무게는 정상 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며, 배박 에탄올 추출물 투여로 인해 감소하였다. 특히 배박 에탄올 추출물 400 mg/kg 투여군의 비장무게는 DNCB-대조군에 비해 유의적으로 감소하였다. [그림77]

(A)



(B)

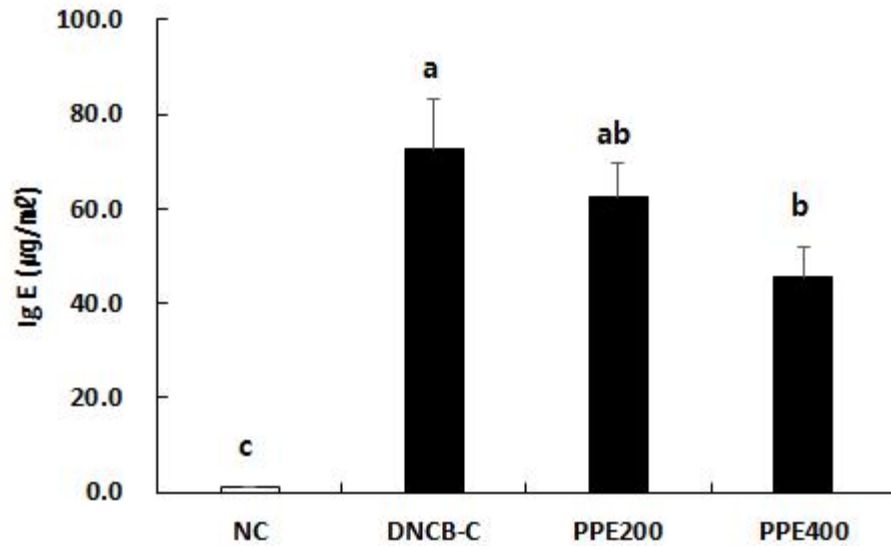


[그림77] Effect of pear pomace ethanol extract on spleen in a developmental AD model.

NC: acetone: olive oil=3:1 + distilled water, DNCB-C: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + distilled water, PPE 200: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + pear pomace ethanol extract 200 mg/kg body weight, PPE 400: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + pear pomace ethanol extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ( $p<0.05$ )

⑥ 혈청 내 IgE 농도

- 피부 알레르기 반응은 면역 글로블린이 항원과 반응하여 방출하는 화학전달물질이나 T 림프구에 의한 각종 화합물에 의해 혈관의 확장, 모세혈관의 투과성 항진, 점액의 증가 및 점막의 부종과 염증들을 유발시킨다. 특히 아토피성 피부염은 TH2 세포가 관련되어 있으며 IgE이 증가와 연관되어 있다.
- 아토피성 피부염이 유발된 마우스에서 배박 에탄올 추출물을 4주간 처치한 결과, DNCB-대조군의 IgE 농도는 정상 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며, 배박 에탄올 추출물 투여로 인해 감소하였다. 특히 배박 에탄올 추출물 400 mg/kg 투여군의 IgE 농도는 DNCB-대조군에 비해 유의적으로 감소하였다. [그림78]



[그림78] Effect of pear pomace ethanol extract on serum IgE level in a developmental AD model.

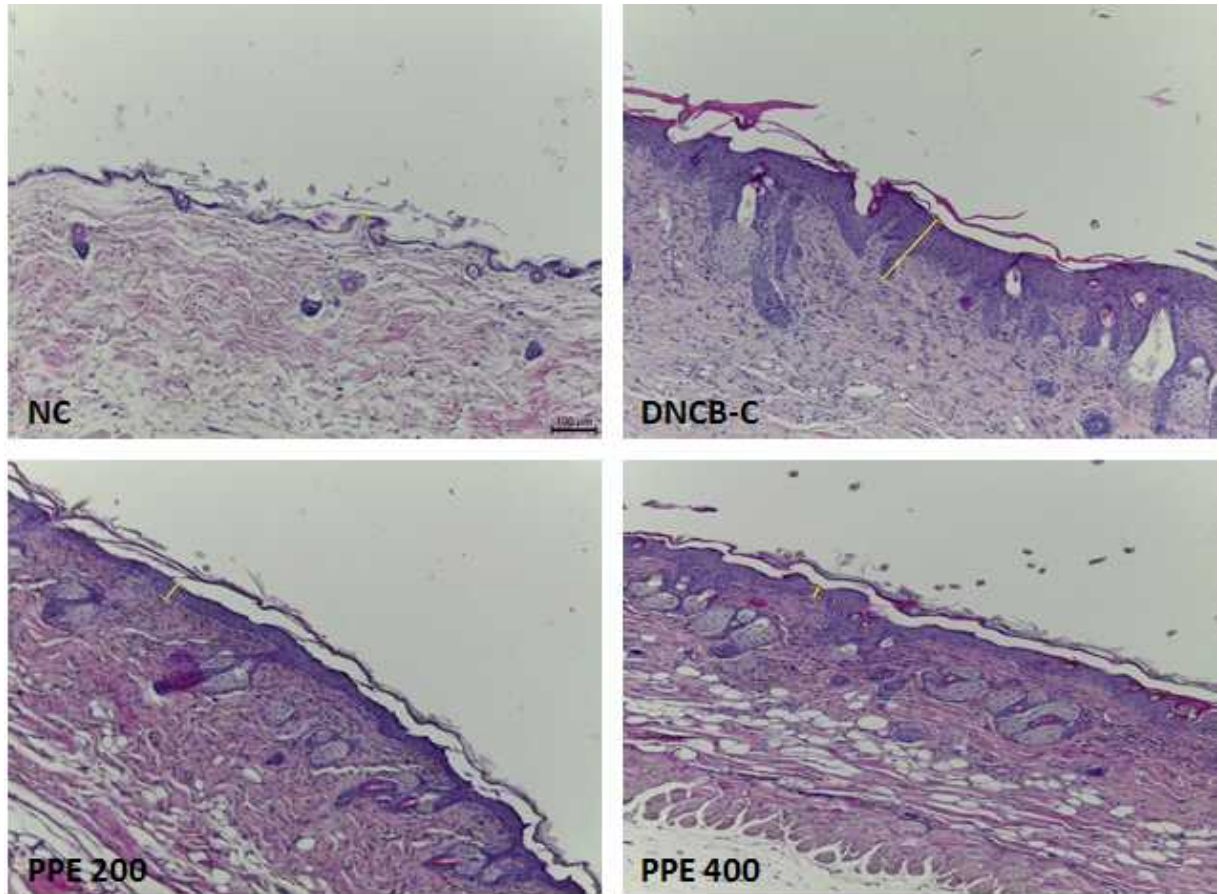
NC: acetone: olive oil=3:1 + distilled water, DNCB-C: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + distilled water, PPE 200: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + pear pomace ethanol extract 200 mg/kg body weight, PPE 400: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + pear pomace ethanol extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

### ⑦ 조직 병리학적 변화

-아토피성 피부염은 주로 유소아기에 발병이 시작하는 만성 재발성 피부 질환으로 연령에 따라 임상 양상과 병변의 분포차이를 나타내는데 유아에서는 두부와 신전부의 습진 양상을 보이고, 삼출이나 가피 형태의 급성 습진성 양상을 나타내며 소아기로 넘어가면서 전주와(antecubital area)와 슬와(popliteal area) 같은 굴측부의 병변이 뚜렷해지면서 건조증의 형태로 나타나는 경우가 많고, 사춘기와 성인에서는 간찰부위(intertriginous area), 목, 목 양측의 태선화, 안면과 수부(head area)습진 등의 소견을 보이고 양진과 태선화가 관찰된다.

- 본 연구에서는 아토피성 피부염이 유발된 등 부위의 증상을 관찰하기 위해 H&E 염색을 시행하였다.

- 실험결과, DNCB-대조군의 상피 피부는 정상 대조군에 비해 증가하였으며, 배박 에탄올 추출물 투여로 인해 감소하는 것을 관찰하였다. [그림79]

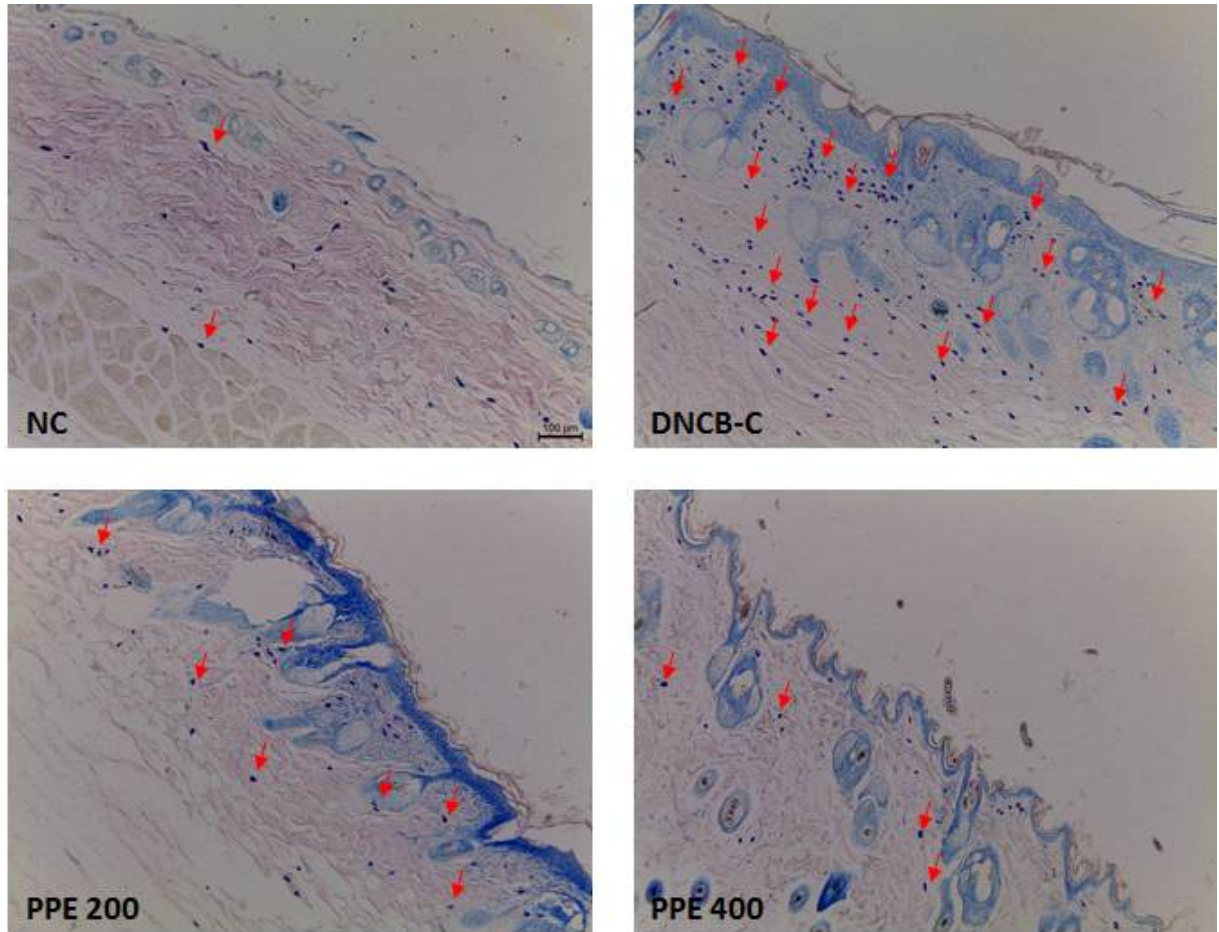


[그림79] Histopathological features of skins treated with pear pomace ethanol extract in a developmental AD model.

Skin were removed and fixed with 10% formaldehyde solution. Thin sections were cut and stained with hematoxylin and eosin.

NC: acetone: olive oil=3:1 + distilled water, DNCB-C: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + distilled water, PPE 200: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + pear pomace ethanol extract 200 mg/kg body weight, PPE 400: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + pear pomace ethanol extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

- 또한, 염증반응으로 인한 비만세포(Mast cell)의 침윤을 관찰하기 위하여 toluidine blue 염색을 시행한 후 염색된 비만세포의 침윤 상태를 관찰하였다.
- 실험결과, DNCB-대조군의 침윤된 비만세포 수는 정상 대조군에 비해 증가하였으며, 배박 에탄올 추출물 투여로 인해 감소하는 것을 관찰하였다. [그림80]



[그림80] Histopathological features of skins treated with pear pomace ethanol extract in a developmental AD model.

Mast cells findings by toluidine blue staining of skin sections. Red arrows mark the stained mast cells. NC: acetone: olive oil=3:1 + distilled water, DNCB-C: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + distilled water, PPE 200: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + pear pomace ethanol extract 200 mg/kg body weight, PPE 400: DNCB (acetone: olive oil=3:1) + pear pomace ethanol extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

## ■ 낙과(미숙과) 유래 스킨케어 제품화 ■

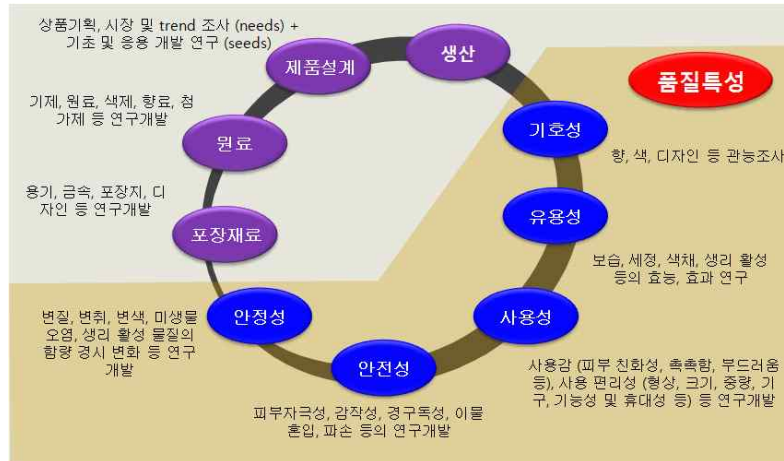
### I. 연구재료 및 방법

#### 1. 낙과(미숙과) 유래 스킨케어 시제품 생산

##### (1) 제형 첨가량 결정

- 각 효력 시험과 관련된 *in-vitro* assay 연구 결과를 기초로 하여 제형 속에 함유될 소재의 최종 첨가량을 결정.

(2) 화장품 제형은 화장품의 품질 특성인 기호도와 유효성, 안정성, 안전성 등을 소비자 패턴을 통하여 최종적으로 결정한다.



## 2. 시제품 안정성 시험

### (1) 장기보존시험

- 제품의 유통조건을 고려하여 온도  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ /상대습도  $60 \pm 5\%$ 에서 3개월 이상 시험하며, 시험개시 때와 첫 1년간은 3개월 마다, 그 후 2년까지는 6개월 마다, 2년 이후부터 1년에 1회 시험한다.

### (2) 가속시험

- 온도  $40 \pm 2^\circ\text{C}$ /상대습도  $75 \pm 5\%$ 로 1개월 이상 안정한 것을 적합한 것으로 판단하며, 시험개시 때를 포함하여 최소 3번을 측정한다.

### (3) 가혹시험

- 온도순환( $-15 \sim 45^\circ\text{C}$ ), 냉동-해동의 12시간 주기 가혹 조건에서 1개월 이상 안정한 것을 적합한 것으로 판단하며, 품질관리상 중요한 항목 및 분해산물의 생성유무를 확인한다.

### (4) 개봉 후 안정성시험

- 제품의 유통조건을 고려하여 온도  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ /상대습도  $60 \pm 5\%$ 에서 3개월 이상 시험하며, 시험개시 때와 첫 1년간은 3개월 마다, 그 후 2년까지는 6개월 마다, 2년 이후부터 1년에 1회 시험한다.

### (5) 시험항목

- 적절한 보관, 운반, 사용 조건에서化粧품의 물리·화학적 안정성, 미생물학적 안정성, 용기 적합성을 보증할 수 있도록 설정해야 하며, 균등성, 향취 및 색상, 사용감, 액상, 유화형, 내온성 시험을 수행하고, 물리/화학적 시험 (성상, 향, 사용감, 점도, 질량변화, 분리도, 유화상태, 경도 및 pH 등 제형의 물리/화학적 성질)을 평가한다.



### 3. 안전성 시험

#### (1) 미생물 시험

- 식약청의 미생물한도 기준 및 시험방법 가이드라인에 따라 각종 미생물에 대한 오염을 확인한다.

#### (2) Challenge test

- USP XXIV method인 Applied the microbial challenge test와 CTFA Method M-3 및 M-4를 응용하여 병원성미생물과 현장 검출균을 대상으로 방부력 시험을 수행하여 최상의 보존제 조합을 도출해 낸다.

#### (3) Patch test

- 피검자들을 대상으로 Haye's Test Chamber를 이용하여 상박의 피부 첩포 시험 (patch test)을 실시한다. 단, 건선 (psoriasis), 습진 (eczema), 기타 피부 알러지 (allergy) 등의 경향이 있거나 임신, 수유모 또는 피임제, 항히스타민제 등을 복용하는 사람은 본 시험에서 제외한다. 시험부위를 알콜로 닦아낸 뒤 건조시키고 화장품 약 15 µg씩 chamber에 적하시킨 뒤, 시험 부위인 상박 부위에 얹어 고정하여 첩포하고, 24시간 경과 후에 첩포를 제거하여 국제접촉피부염연구회의 판정 기준에 따라 피부 자극 유발의 유/무를 확인한다.

### 4. 개발化粧品の 규격/표준화

▼ 개발 화장품의 규격 예시

항 목	기 준	시 험 법	비 고	
1. 색상	○○색의 크림, 로션, 맑은 액, 또는 점조성 액 등	표준품과 비교	전제품을 대상으로 시험	
2. 향취	특이취가 있음. (표준품과 관능적 동일)	표준품과 비교	전제품을 대상으로 시험	
3. 내용량	표기량에 대하여 100 % 이상	식약청고시 제2007-45호	전제품을 대상으로 시험	
4. 물리 화학적 특성	pH	3 ~ 9	식약청고시 제2007-45호 액상, 눈화장용, 크림, 립 스틱류에 대하여 시험. (크린싱 및 세이빙크림 제외)	
	점도	표준품의 점도 ± 10%	자가시험법 (Brookfield 점도계 사용)	점조성 액, 로션 성상의 제품에 대하여 시험
	경도	표준품의 경도 ± 10%	자가시험법 (Rheo meter 사용)	크림 성상의 제품에 대하여 시험
	납	20 ppm 이하	식약청고시 제2007-45호	메이크업용, 눈화장용, 샴푸, 린스 및 헤어스프레이에 대하여 시험.
	비소	샴푸, 린스 5 ppm 이하 기타제품 10 ppm 이하	식약청고시 제2007-45호	메이크업용, 눈화장용, 샴푸, 린스 및 헤어스프레이에 대하여 시험.
	수은	1 ppm 이하	식약청고시 제2007-45호	기초화장품용 제품류중 크림류에 대하여 시험
	메탄올	0.2 v/v % 이하	식약청고시 제2007-45호	에탄올이 4 % 초과 함유된 제품에 대하여 시험
	주성분	주성분 표시함량의 90 % 이상	식약청고시 제2007-45호	기능성화장품에 대하여 시험
5. 일반세균 및 특정세균	일반세균 100 cfu/g 이하 특정세균 불검출	대한약전 일반시험법	전제품을 대상으로 시험	
6. 안정도	5, 40, 50 °C 3일간 안정	자가시험법	전제품을 대상으로 시험	
7. 포장 및 표시사항	작업 표준 및 제품의 표시 사항에 따르고, 인쇄상태, 표기사항, 부자재 외관 등은 표준품과 비교하여 대등하여야 한다.	표준품과 비교	전제품을 대상으로 시험	

II. 연구결과

1. 낙과(미숙과) 함유 화장품 개발

(1) 디자인 개발



(2) 제형 개발 (마스크 시트)

No.	INGREDIENTS		CAS NO.	Contents (%)	Remark
	English	Korean			
1	Water	정제수	7732-18-5		
2	Butylene Glycol	부틸렌글라이콜	107-88-0		
3	Rosa Damascena Flower Oil	다마스크장미꽃오일	-		
4	Rehmannia Chinensis Root Extract	지황추출물	-		
5	Glycine Max (Soybean) Seed Extract	콩추출물	68513-95-1		
6	Angelica Gigas Root Extract	당귀추출물	-		
7	Paeonia Albiflora Root Extract	작약추출물	84929-40-8		
8	Atractylodes Japonica	백출추출물	-		

	Rhizome Extract				
9	Poria Cocos Extract	복령추출물	-		
10	Bupleurum Chinensis Root Extract	시호추출물	89958-12-3		
11	Xanthium Strumarium Fruit Extract	창이자추출물	-		
12	Ophiopogon Japonicus Root Extract	맥문동추출물	-		
13	Glycyrrhiza Glabra (Licorice) Root Extract	감초추출물	84775-66-6		
14	Cyperus Rotundus Root Extract	향부자추출물	85085-54-7		
15	Gardenia Florida Fruit Extract	치자추출물	92457-01-7		
16	Chrysanthemum Morifolium Flower Extract	국화꽃추출물	-		
17	Mentha Arvensis Leaf Extract	박하잎추출물	90063-97-1		
18	Velvet Extract	녹용추출물	-		
19	Phaseolus Radiatus Seed Extract	녹두추출물	-		
20	Punica Granatum Fruit Extract	석류추출물	84961-57-9		
21	Camellia Sinensis Leaf Extract	녹차추출물	84650-60-2		
22	Glycerin	글리세린	56-81-5		
23	Hamamelis Virginiana (Witch Hazel) Water	위치하젤수	-		
24	Methyl Gluceth-20	메칠글루세스-20	68239-42-9		
25	Pichia anomala extract	피키아 아노말라추출물	-		
26	Paeonia Suffruticosa Bark Extract	모란껍질추출물	-		
27	Uncaria sinensis Extract	조구등추출물	-		
28	Aronia Melanocarpa Fruit Extract	아로니아열매추출물	-		
29	Dryopteris Crassirhizoma Extract	관중추출물	-		

30	Rehmannia Chinensis Root Extract	지황추출물	-		
31	Cimicifuga Racemosa Root Extract	승마추출물	84776-26-1		
32	Cnidium Officinale Root Extract	천궁추출물	-		
33	Angelica Acutiloba Root Extract	일당귀추출물	164288-49-7		
34	Allantoin	알란토인	97-59-6		
35	Hydrolyzed Oplopanax Elatus Root Extract	하이드롤라이즈드자인삼추출물	-		
36	Corthellus Shiitake (Mushroom) Extract	표고버섯추출물	-		
37	Dextran	덱스트란	9004-54-0		
38	Caprooyl tetrapeptide-3	카프로오일테트라펩타이드-3	-		
39	Ceramide 3	세라마이드3	100403-19-8		
40	Brassica Campestris (rapeseed) sterols	서양유채스테롤	-		
41	PEG-5 Rapeseed sterol	피이지-5레이프씨드스테롤	-		
42	Cholesterol	콜레스테롤	57-88-5		
43	Beta-Sitosterol	베타-시토스테롤	83-46-5		
44	Choleth-24	콜레스-24	27321-96-6		
45	Ceteth-24	세테스-24	9004-95-9		
46	Hydrogenated Lecithin	하이드로제네이티드레시틴	92128-87-5		
47	Cetyl Phosphate	세틸포스페이트	3539-43-3		
48	BHT	비에이치티	128-37-0		
49	Caprylic/capric Triglyceride	카프릴릭/카프릭트리글리세라이드	85409-09-2		
50	Polyglutamic Acid	폴리글루탐릭애씨드	25513-46-6		
51	Saccharide Isomerate	사카라이드아이소머레이트	-		
52	Creatine	크레아틴	57-00-1		
53	Sodium Hyaluronate	소듐하이알루로네이트	9067-32-7		
54	Macadamia Ternifolia Seed Oil	마카다미아씨오일	128497-20-1		
55	Carthamus Tinctorius	잇꽃씨추출물	-		

	(Safflower) Seed Extract			
56	Fallen pear Extract	0%, 50%낙과추출물	-	0.1-1%
57	Ethylhexylglycerin	에칠헥실글리세린	70445-33-9	
58	Propylene Glycol	프로필렌글라이콜	57-55-6	
59	DEA-Cetyl Phosphate	디이에이-세틸포스페이 트	61693-41-2	
60	Tocopheryl Acetate	토코페릴아세테이트	58-95-7	
61	Retinyl Palmitate	레티닐팔미테이트	79-81-2	
62	Niacinamide	나이아신아마이드	98-92-0	
63	AteloCollagen	아텔로콜라겐	0.00	
64	Disodium EDTA	디소듐이디티에이	139-33-3	
65	XanthanGum	잔탄검	11138-66-2	
66	Carbomer	카보머	73298-57-4	
67	Triethanolamine	트리에탄올아민	102-71-6	
68	Phenoxyethanol	페녹시에탄올	122-99-6	
69	Methylparaben	메칠파라벤	99-76-3	

(3) 안정도 시험

- 개발된 화장품 내용물과 0%, 50% 주정 낙과추출물을 대상으로 식약청의 “화장품 안정성 시험 가이드라인”에 따라 0 °C, 25 °C, 35 °C, 45 °C, cycle의 항온기 가혹 조건에 보관하면서 경시변화를 관찰하는 가혹시험, 40 °C 항온기 조건에서 보관하면서 경시변화를 관찰하는 가속시험, 그리고 장기보존 시험을 현재 진행 중이다.
- 2014년 5월에 가혹시험과 가속시험에 대한 연구 결과는 종료 예정이며, 장기보존시험은 2차년도 사업기간까지 지속적으로 경시변화에 대한 안정도 시험을 진행할 예정이다.

(4) 개발 화장품의 규격/표준화

- 제품명 : 휴미르

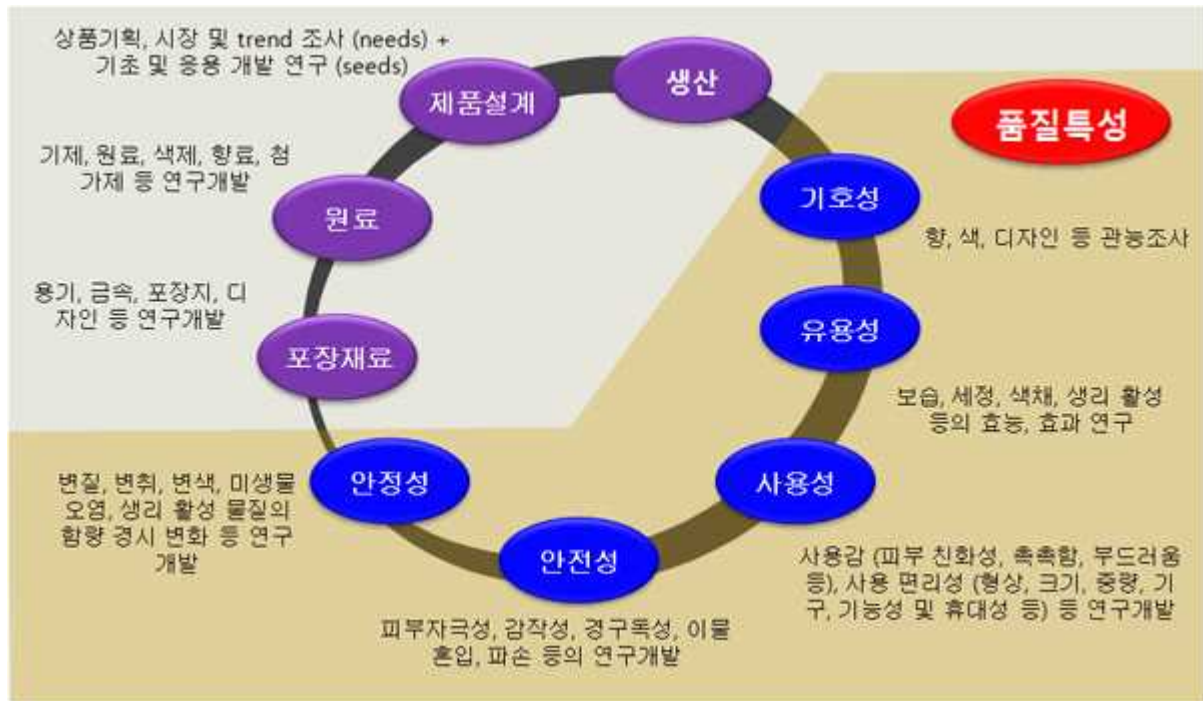
항 목	기 준	시 험 법	비 고
1. 색상	열은 황색의 액	표준품과 비교	
2. 향취	특이취가 있음. (표준품과 관능적 동일)	표준품과 비교	
3. 내용량	표기량에 대하여 100 % 이상	식약청고시 제2007-45호	
4. 물리 화학 적 특성	pH	6 ± 1	식약청고시 제2007-45호
	점도	해당사항 없음	자가시험법 (Brookfield 점도계 사용)
	경도	해당사항 없음	자가시험법

		(Rheo meter 사용)	
	납	20 ppm 이하	식약청고시 제2007-45호
	비소	10 ppm 이하	식약청고시 제2007-45호
	수은	1 ppm 이하	식약청고시 제2007-45호
	메탄올	해당사항 없음	식약청고시 제2007-45호
	주성분	주성분 표시함량의 90 % 이상	식약청고시 제2007-45호
5. 일반세균 및 특정세균	일반세균 100 cfu/g 이하 특정세균 불검출		대한약전 일반시험법
6. 안정도	5, 40, 50 °C 3일간 안정		자가시험법
7. 포장 및 표시사항	작업 표준 및 제품의 표시사항에 따르고, 인쇄상태, 표기사항, 부자재 외관 등은 표준품과 비교하여 대응하여야 한다.		표준품과 비교

■ 배 나과 유래 석세포의 피부청결개선관련 제형화 연구 ■

1. 연구방법

- 1) 제형 첨가량 결정 : 각 효력 시험과 관련된 *in-vitro* assay 연구 결과를 기초로 하여 제형 속에 함유될 소재의 최종 첨가량을 결정한다.
- 2) 화장품 제형은 화장품의 품질 특성인 기호도와 유효성, 안정성, 안전성 등을 소비자 패널을 통하여 최종적으로 결정한다.



### 3) 안정성 시험

#### (1) 시험항목

- 장기보존시험 : 제품의 유통조건을 고려하여 온도  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ /상대습도  $60\pm 5\%$ 에서 3개월 이상 시험하며, 시험개시 때와 첫 1년간은 3개월 마다, 그 후 2년까지는 6개월 마다, 2년 이후부터 1년에 1회 시험한다.
- 가속시험 : 온도  $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ /상대습도  $75\pm 5\%$ 로 1개월 이상 안정한 것을 적합한 것으로 판단하며, 시험개시 때를 포함하여 최소 3번을 측정한다.
- 가혹시험 : 온도순환( $-15\sim 45^{\circ}\text{C}$ ), 냉동-해동의 12시간 주기 가혹 조건에서 1개월 이상 안정한 것을 적합한 것으로 판단하며, 품질관리상 중요한 항목 및 분해산물의 생성유무를 확인한다.
- 개봉 후 안정성시험 : 제품의 유통조건을 고려하여 온도  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ /상대습도  $60\pm 5\%$ 에서 3개월 이상 시험하며, 시험개시 때와 첫 1년간은 3개월 마다, 그 후 2년까지는 6개월 마다, 2년 이후부터 1년에 1회 시험한다.
- 시험항목 : 적절한 보관, 운반, 사용 조건에서 화장품의 물리·화학적 안정성, 미생물학적 안정성, 용기 적합성을 보증할 수 있도록 설정해야 하며, 균등성, 향취 및 색상, 사용감, 액상, 유화형, 내온성 시험을 수행하고, 물리/화학적 시험 (성상, 향, 사용감, 점도, 질량변화, 분리도, 유화상태, 경도 및 pH 등 제형의 물리/화학적 성질)을 평가한다.

#### (2) 시험방법

- 본 기술 개발 과제에서는 화장품 제형의 안정성 시험 및 제품 표준화를 위하여 사용한 기기 및 시험 방법은 식약청의 고시 기준에 적합한 시험 방법으로 수행하였다.
- 내용량 시험은 용량으로 표시된 제품의 경우 내용물이 들어있는 용기에 뷰렛으로부터 물을 적가하여 용기를 가득 채웠을 때의 소비량을 정확하게 측정한 다음 용기의 내용물을 완전히 제거하고 물 또는 기타 적당한 유기용매로 용기의 내부를 깨끗이 씻어 말린 다음 뷰렛으로부터 물을 첨가하여 용기를 가득 채워 소비량을 정확히 측정하고 전후의 용량차를 내용량으로 하였다. 다만, 150mL이상의 제품에 대하여는 메스실린더를 써서 측정했다. 또한 질량으로 표시된 제품의 경우 내용물이 들어있는 용기의 외면을 깨끗이 닦고 무게를 정밀하게 단 다음 내용물을 완전히 제거하고 물 또는 적당한 유기용매로 용기의 내부를 깨끗이 씻어 말린 다음 용기만의 무게를 정밀히 달아 전후의 무게차를 내용량으로 결정하였다.
- 개발 화장품의 pH는 검체 약 2 g 또는 2 mL를 취하여 100 mL 비이커에 넣고 물 30 mL를 넣어 수욕상에서 가온하여 지방분을 녹이고 흔들어 섞은 다음 냉장고에서 지방분을 응결시켜 여과했다. 이때 지방층과 물층이 분리되지 않을 때는 그대로 사용하였다. 여액을 가지고 “식약청 고시 제2009-158호 pH시험법”에 따라 시험하며, 이 때 사용한 pH meter는 pH측정법에 따라 Orion 4-Star pH meter (Thermo Orion)로 측정하였으며, 다만 성상에 따라 투명한 액상인 경우에는 그대로 측정하였다.
- 점도는 검체 약 100 g 또는 100 mL를 비이커에 넣고 Brookfield 점도계 (DV-II+ Pro, USA)로 측정하여 제품표준화에 사용하였으며, 제품 안정도 시험에도 동일한 기기를 사용



하여 제형 초기 제조 점도와 안정도 시험에 따른 상대 점도의 변화를 관찰하였다.

- 관능시험의 일종인 상분리 등 성상 변화 관찰은 장기 보존 또는 가혹, 가속 조건에서 보관 경시에 따른 제형의 변화를 육안으로 관찰하였다. 특히, 제형의 상분리, 침전 및 석출 등에 대하여 관찰하였다.
- 납, 비소 수은 등의 중금속 및 유해 금속 함량은 “식약청고시 제2009-158호” 중금속 해당 시험법에 따라 수행하였으며, 식약청에 등록된 화장품 품질관리공인시험기관인 한국건설환경시험연구원에 의뢰하여 수행하였다.

#### 4) 안전성 시험

- 미생물 시험 : 식약청의 미생물한도 기준 및 시험방법 가이드라인에 따라 각종 미생물에 대한 오염을 확인한다.
- Challenge test : USP XXIV method인 Applied the microbial challenge test와 CTFA Method M-3 및 M-4를 응용하여 병원성미생물과 현장 검출균을 대상으로 방부력 시험을 수행하여 최상의 보존제 조합을 도출해 낸다.
- Patch test : 피검자들을 대상으로 Haye's Test Chamber를 이용하여 상박의 피부 첩포 시험 (patch test)을 실시한다. 단, 건선 (psoriasis), 습진 (eczema), 기타 피부 알러지 (allergy) 등의 경향이 있거나 임신, 수유모 또는 피임제, 항히스타민제 등을 복용하는 사람은 본 시험에서 제외한다. 시험부위를 알콜로 닦아낸 뒤 건조시키고 화장품 약 15 ug 씩 chamber에 적하시킨 뒤, 시험 부위인 상박 부위에 얹어 고정하여 첩포하고, 24시간 경과 후에 첩포를 제거하여 국제접촉피부염연구회의 판정 기준에 따라 피부 자극 유발의 유/무를 확인한다.

#### 5) 개발化粧품의 규격/표준화

Table 1. 개발化粧품의 규격 예시

항 목	기 준	시 험 법	비 고	
1. 성상	○○색의 크림, 로션, 맑은 액, 또는 점조성 액 등	표준품과 비교	전제품을 대상으로 시험	
2. 향취	특이취가 있음. (표준품과 관능적 동일)	표준품과 비교	전제품을 대상으로 시험	
3. 내용량	표기량에 대하여 100 % 이상	식약청고시 제2007-45호	전제품을 대상으로 시험	
4. 물리 화학 적 특성	pH	3 ~ 9	식약청고시 제2007-45호 액상, 눈화장용, 크림, 립 스틱류에 대하여 시험.(크린싱 및 셰이빙크림 제외)	
	점도	표준품의 점도 ± 10%	자가시험법 (Brookfield 점도계 사용)	점조성 액, 로션 성상의 제품에 대하여 시험
	경도	표준품의 경도 ± 10%	자가시험법 (Rheo meter 사용)	크림 성상의 제품에 대하여 시험
	납	20 ppm 이하	식약청고시 제2007-45호	메이크업용, 눈화장용, 샴푸, 린스 및 헤어스프레이에 대하여 시험.
	비소	샴푸, 린스 5 ppm 이하 기타제품 10 ppm 이하	식약청고시 제2007-45호	메이크업용, 눈화장용, 샴푸, 린스 및 헤어스프레이에 대하여 시험.
	수은	1 ppm 이하	식약청고시 제2007-45호	기초화장품용 제품류중 크림류에 대하여 시험
	메탄올	0.2 v/v % 이하	식약청고시 제2007-45호	에탄올이 4 % 초과 함유된 제품에 대하여 시험
	주성분	주성분 표시함량의 90 % 이상	식약청고시 제2007-45호	기능성화장품에 대하여 시험
5. 일반세균 및 특정세균	일반세균 100 cfu/g 이하 특정세균 불검출	대한약전 일반시험법	전제품을 대상으로 시험	
6. 안정도	5, 40, 50 °C 3일간 안정	자가시험법	전제품을 대상으로 시험	
7. 포장 및 표시사항	작업 표준 및 제품의 표시사항에 따르고, 인쇄상태, 표기사항, 부자재 외관 등은 표준품과 비교하여 대등하여야 한다.	표준품과 비교	전제품을 대상으로 시험	

#### 6) 양산 공정 확립

- 화장품 완제품 1품목 이상을 용기/포장 디자인 개발을 진행한다.
- 화장품 시제품을 품목당 5,000개씩 시제품으로 제작하여 양산 공정을 확립하고 제품표준 및 양산 공정을 확립한다.
- 이러한 제품 표준화 및 규격화를 통하여 양산 단계의 진입을 도모한다.

#### 2. 연구결과

##### 1) 낙과(미숙과) 함유 화장품 개발

##### (1) 디자인 개발

- 디자인 개발 진행 중. 9월 초 시제품 생산 예정

(2) 제형 개발 (석세포 함유 클렌징 제품)

- 클렌징 파우더

No.	INGREDIENTS		CAS NO.	Contents (%)	Remark
	English	Korean			
1	Carica Papaya Fruit/Maltodextrin	파파야열매	-		
2	Dipotassium Glycyrrhizate	디포타슘글리시리제이트	68797-35-3		
3	Betaine	베타인	107-43-7		
4		석세포	-		
5	Methylparaben	메칠파라벤	99-76-3		
6	Hydrolyzed pea protein	하이드롤라이즈드완두콩단백질	73049-73-7		
7	Lecithin	레시틴	8002-43-5		
8	Water	정제수	7732-18-5		
9	Olea europaea (Olive) fruit oil	올리브오일	8001-25-0		
10	Squalane	스쿠알란	111-01-3		
11	Phytosterols	피토스테롤	-		
12	Ceramide 3	세라마이드3	-		
13	Butyrospermum parkii (Shea butter)	쉐어버터	68920-03-6		
14	Fragrance	향료	-		
15	Corn Starch	변성옥수수전분	-		
16	Sodium Lauroyl Aspartate	소듐라우로일아스파테이트			
17	Sodium Cocoyl Isethionate	소듐코코일이세치오네이트	58969-27-0		
18	Sodium Lauryl Sulfate	소듐라우릴설페이트	151-21-3		
19	Titanium Dioxide	티타늄디옥사이드	13463-67-7		
20	Sodium Palmitate	소듐팔미테이트	408-35-5		

- 클렌징 폼

No.	INGREDIENTS		CAS NO.	Contents (%)	Remark
	English	Korean			
1	Water	정제수	7732-18-5		
2		석세포	-		
3	Propylene glycol	프로필렌글라이콜	57-55-6		
4	Glycerin	글리세린	56-81-5		
5	Disodium EDTA	디소듐이디티에이	139-33-3		
6	Allantoin	알란토인	97-59-6		
7	PEG-400	피이지-400	25322-68-3		
8	Polyquaternium-7	폴리쿼터늄-7	26590-05-6		
9	PEG-150 monostearate	피이지-150 모노스테아레이트	-		
10	PEG -150 distearate	피이지-150 디스테아레이트	9005-08-7		
11	Lauric acid	라우릭애씨드	143-07-7		
12	Myristic acid	미리스틱애씨드	544-63-8		
13	Stearic acid	스테아릭래씨드	57-11-4		
14	Polysorbate 80	폴리소르베이트80	9005-65-6		
15	Sodium lauroyl glutamate	소듐라우로일글루타메이트	98984-78-2		
16	Methylparaben	메칠파라벤	99-76-3		
17	Potassium hydroxide	포타슘하이드록사이드	1310-58-3		
18	Phenoxyethanol	페녹시에탄올	122-99-6		

(3) 안정도 시험

- 개발된 화장품 내용물과 낙과 추출물을 대상으로 식약청의 “화장품 안정성시험 가이드라인”에 따라 0℃, 25℃, 35℃, 45℃, cycle의 항온기 가혹 조건에 보관하면서 경시변화를 관찰하는 가혹시험, 40℃ 항온기 조건에서 보관하면서 경시변화를 관찰하는 가속시험, 그리고 장기보존 시험을 현재 진행 중이다.
- 2015년 8월에 가혹시험과 가속시험에 대한 연구 결과는 종료 예정이며, 장기보존시험은 3차년도 사업기간까지 지속적으로 경시변화에 대한 안정도 시험을 진행할 예정이다.

(4) 개발 화장품의 규격/표준화

- 제품명 : 휴미르

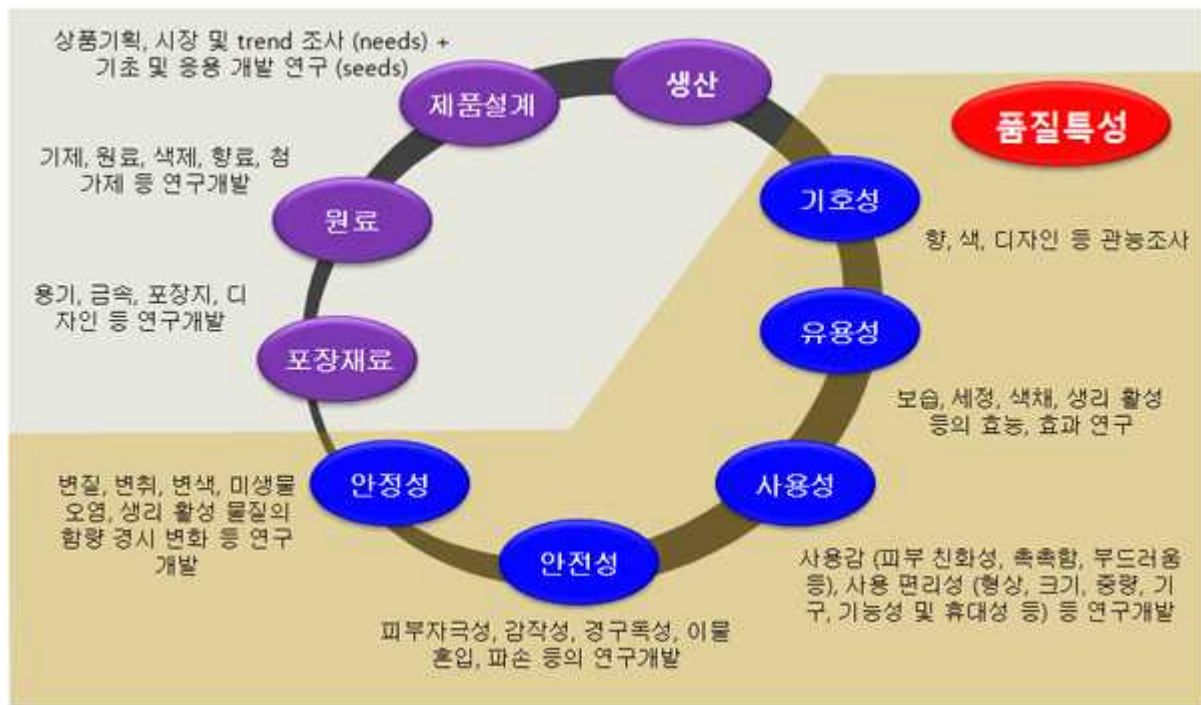
항 목	기 준	시 험 법	비 고
-----	-----	-------	-----

1. 성상	진행중	표준품과 비교	
2. 향취	특이취가 있음. (표준품과 관능적 동일)	표준품과 비교	
3. 내용량	표기량에 대하여 100 % 이상	식약청고시 제2007-45호	
4. 물리 화학 적 특성	pH	6 ± 1	식약청고시 제2007-45호
	점도	해당사항 없음	자가시험법 (Brookfield 점도계 사용)
	경도	해당사항 없음	자가시험법 (Rheo meter 사용)
	납	20 ppm 이하	식약청고시 제2007-45호
	비소	10 ppm 이하	식약청고시 제2007-45호
	수은	1 ppm 이하	식약청고시 제2007-45호
	메탄올	해당사항 없음	식약청고시 제2007-45호
	주성분	주성분 표시함량의 90 % 이상	식약청고시 제2007-45호
5. 일반세균 및 특정세균	일반세균 100 cfu/g 이하 특정세균 불검출	대한약전 일반시험법	
6. 안정도	5, 40, 50 °C 3일간 안정	자가시험법	
7. 포장 및 표시사항	작업 표준 및 제품의 표시사항에 따르고, 인쇄상태, 표기사항, 부자재 외관 등은 표준품과 비교하여 대응하여야 한다.	표준품과 비교	

■ 피부건강 보습조절능에 관한 소비자 트렌드 조사 및 마케팅 전략확립 ■

1. 연구방법

- 1) 제형 첨가량 결정 : 각 효력 시험과 관련된 *in-vitro* assay 연구 결과를 기초로 하여 제형 속에 함유될 소재의 최종 첨가량을 결정한다.
- 2) 화장품 제형은 화장품의 품질 특성인 기호도와 유효성, 안정성, 안전성 등을 소비자 패 널을 통하여 최종적으로 결정한다.



### 3) 안정성 시험

#### (1) 시험항목

- 장기보존시험 : 제품의 유통조건을 고려하여 온도  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ /상대습도  $60\pm 5\%$ 에서 3개월 이상 시험하며, 시험개시 때와 첫 1년간은 3개월 마다, 그 후 2년까지는 6개월 마다, 2년 이후부터 1년에 1회 시험한다.
- 가속시험 : 온도  $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ /상대습도  $75\pm 5\%$ 로 1개월 이상 안정한 것을 적합한 것으로 판단하며, 시험개시 때를 포함하여 최소 3번을 측정한다.
- 가혹시험 : 온도순환( $-15\sim 45^{\circ}\text{C}$ ), 냉동-해동의 12시간 주기 가혹 조건에서 1개월 이상 안정한 것을 적합한 것으로 판단하며, 품질관리상 중요한 항목 및 분해산물의 생성유무를 확인한다.
- 개봉 후 안정성시험 : 제품의 유통조건을 고려하여 온도  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ /상대습도  $60\pm 5\%$ 에서 3개월 이상 시험하며, 시험개시 때와 첫 1년간은 3개월 마다, 그 후 2년까지는 6개월 마다, 2년 이후부터 1년에 1회 시험한다.
- 시험항목 : 적절한 보관, 운반, 사용 조건에서 화장품의 물리·화학적 안정성, 미생물학적 안정성, 용기 적합성을 보증할 수 있도록 설정해야 하며, 균등성, 향취 및 색상, 사용감, 액상, 유화형, 내온성 시험을 수행하고, 물리/화학적 시험 (성상, 향, 사용감, 점도, 질량변화, 분리도, 유화상태, 경도 및 pH 등 제형의 물리/화학적 성질)을 평가한다.

#### (2) 시험방법

- 본 기술 개발 과제에서는 화장품 제형의 안정성 시험 및 제품 표준화를 위하여 사용한 기기 및 시험 방법은 식약청의 고시 기준에 적합한 시험 방법으로 수행하였다.

- 내용량 시험은 용량으로 표시된 제품의 경우 내용물이 들어있는 용기에 뷰렛으로부터 물을 적가하여 용기를 가득 채웠을 때의 소비량을 정확하게 측정한 다음 용기의 내용물을 완전히 제거하고 물 또는 기타 적당한 유기용매로 용기의 내부를 깨끗이 씻어 말린 다음 뷰렛으로부터 물을 첨가하여 용기를 가득 채워 소비량을 정확히 측정하고 전후의 용량차를 내용량으로 하였다. 다만, 150mL이상의 제품에 대하여는 메스실린더를 써서 측정했다. 또한 질량으로 표시된 제품의 경우 내용물이 들어있는 용기의 외면을 깨끗이 닦고 무게를 정밀하게 단 다음 내용물을 완전히 제거하고 물 또는 적당한 유기용매로 용기의 내부를 깨끗이 씻어 말린 다음 용기만의 무게를 정밀히 달아 전후의 무게차를 내용량으로 결정하였다.
- 개발 화장품의 pH는 검체 약 2 g 또는 2 mL를 취하여 100 mL 비이커에 넣고 물 30 mL를 넣어 수욕상에서 가온하여 지방분을 녹이고 흔들어 섞은 다음 냉장고에서 지방분을 응결시켜 여과했다. 이때 지방층과 물층이 분리되지 않을 때는 그대로 사용하였다. 여액을 가지고 “식약청 고시 제2009-158호 pH시험법”에 따라 시험하며, 이 때 사용한 pH meter는 pH측정법에 따라 Orion 4-Star pH meter (Thermo Orion)로 측정하였으며, 다만 성상에 따라 투명한 액상인 경우에는 그대로 측정하였다.
- 점도는 검체 약 100 g 또는 100 mL를 비이커에 넣고 Brookfield 점도계 (DV-II+ Pro, USA)로 측정하여 제품표준화에 사용하였으며, 제품 안정도 시험에도 동일한 기기를 사용하여 제형 초기 제조 점도와 안정도 시험에 따른 상대 점도의 변화를 관찰하였다.
- 관능시험의 일종인 상분리 등 성상 변화 관찰은 장기 보존 또는 가혹, 가속 조건에서 보관 경시에 따른 제형의 변화를 육안으로 관찰하였다. 특히, 제형의 상분리, 침전 및 석출 등에 대하여 관찰하였다.
- 납, 비소 수은 등의 중금속 및 유해 금속 함량은 “식약청고시 제2009-158호” 중금속 해당 시험법에 따라 수행하였으며, 식약청에 등록된 화장품 품질관리공인시험기관인 한국건설환경시험연구원에 의뢰하여 수행하였다.

#### 4) 안전성 시험

- 미생물 시험 : 식약청의 미생물한도 기준 및 시험방법 가이드라인에 따라 각종 미생물에 대한 오염을 확인한다.
- Challenge test : USP XXIV method인 Applied the microbial challenge test와 CTFA Method M-3 및 M-4를 응용하여 병원성미생물과 현장 검출균을 대상으로 방부력 시험을 수행하여 최상의 보존제 조합을 도출해 낸다.
- Patch test : 피검자들을 대상으로 Haye's Test Chamber를 이용하여 상박의 피부 첩포 시험 (patch test)을 실시한다. 단, 건선 (psoriasis), 습진 (eczema), 기타 피부 알러지 (allergy) 등의 경험이 있거나 임신, 수유모 또는 피임제, 항히스타민제 등을 복용하는 사람은 본 시험에서 제외한다. 시험부위를 알콜로 닦아낸 뒤 건조시키고 화장품 약 15 ug 씩 chamber에 적하시킨 뒤, 시험 부위인 상박 부위에 얹어 고정하여 첩포하고, 24시간 경과 후에 첩포를 제거하여 국제접촉피부염연구회의 판정 기준에 따라 피부 자극 유발의 유/무를 확인한다.

5) 개발 화장품의 규격/표준화

Table 1. 개발 화장품의 규격 예시

항 목	기 준	시 험 법	비 고	
1. 색상	○○색의 크림, 로션, 맑은 액, 또는 점조성 액 등	표준품과 비교	전제품을 대상으로 시험	
2. 향취	특이취가 있음. (표준품과 관능적 동일)	표준품과 비교	전제품을 대상으로 시험	
3. 내용량	표기량에 대하여 100 % 이상	식약청고시 제2007-45호	전제품을 대상으로 시험	
4. 물리 화학적 특성	pH	3 ~ 9	식약청고시 제2007-45호 액상, 눈화장용, 크림, 립 스틱류에 대하여 시험.(크린싱 및 세이빙크림 제외)	
	점도	표준품의 점도 ± 10%	자가시험법 (Brookfield 점도계 사용)	점조성 액, 로션 성상의 제품에 대하여 시험
	경도	표준품의 경도 ± 10%	자가시험법 (Rheo meter 사용)	크림 성상의 제품에 대하여 시험
	납	20 ppm 이하	식약청고시 제2007-45호	메이크업용, 눈화장용, 샴푸, 린스 및 헤어스프레이에 대하여 시험.
	비소	샴푸, 린스 5 ppm 이하 기타제품 10 ppm 이하	식약청고시 제2007-45호	메이크업용, 눈화장용, 샴푸, 린스 및 헤어스프레이에 대하여 시험.
	수은	1 ppm 이하	식약청고시 제2007-45호	기초화장품용 제품류중 크림류에 대하여 시험
	메탄올	0.2 v/v % 이하	식약청고시 제2007-45호	에탄올이 4 % 초과 함유된 제품에 대하여 시험
	주성분	주성분 표시합량의 90 % 이상	식약청고시 제2007-45호	기능성화장품에 대하여 시험
5. 일반세균 및 특정세균	일반세균 100 cfu/g 이하 특정세균 불검출	대한약전 일반시험법	전제품을 대상으로 시험	
6. 안정도	5, 40, 50 °C 3일간 안정	자가시험법	전제품을 대상으로 시험	
7. 포장 및 표시사항	작업 표준 및 제품의 표시사항에 따르고, 인쇄상태, 표기사항, 부자재 외관 등은 표준품과 비교하여 대등하여야 한다.	표준품과 비교	전제품을 대상으로 시험	

6) 양산 공정 확립

- 화장품 완제품 1품목 이상을 용기/포장 디자인 개발을 진행한다.
- 화장품 시제품을 품목당 5,000개씩 시제품으로 제작하여 양산 공정을 확립하고 제품표준 및 양산 공정을 확립한다.
- 이러한 제품 표준화 및 규격화를 통하여 양산 단계의 진입을 도모한다.

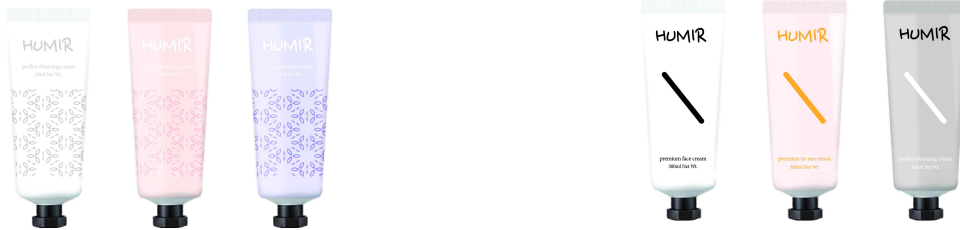
2. 연구결과



1) 낙과(미숙과) 함유 화장품 개발

(1) 디자인 개발

- 휴미르 보습 크림 및 휴미르 선크림 (SPF42 / PA+++)



(2) 제형 개발

- 휴미르 보습 크림

No.	KCID	ICID	Content	Function	Remark
1		Water	To. 100	Solvent	
2	사이클로펜타실록산	Cyclopentasiloxane	8.2500	Skin-Conditioning Agent	
3	글리세린	Glycerin	5.0500	Humectant	
4	사이클로헥사실록산	Cyclohexasiloxane	3.5000	Skin-Conditioning Agent	
5	호오스팻	Horse Fat	3.1200	Skin-Conditioning Agent	
6	1,2-헥산디올	1,2-Hexanediol	2.2030	Skin-Conditioning Agent	
7	나이아신아마이드	Niacinamide	2.0000	Skin-Conditioning Agent	
8	부틸렌글라이콜	Butylene Glycol	1.5100	Humectant	
9	소듐아크릴레이트/아크릴로일다이메틸타트레이트/다이메틸아크릴아마이드크로스폴리머	SodiumAcrylate/Acryloyldimethyltaurate/Dimethylacrylamide Crosspolymer	1.1100	Viscosity Increasing Agent	
10	이소헥사데칸	Isohexadecane	0.7500	Skin-Conditioning Agent	
11	폴리실리콘-11	Polysilicone-11	0.2500	Skin-Conditioning Agent	
12	토코페릴아세테이트	Tocopheryl Acetate	0.2000	Anti-oxidant	
13	폴리소르베이트60	Polysorbate 60	0.1500	Emulsifier	
14	식물성스쿠알란	Phytosqualane	0.1000	Skin-Conditioning Agent	
15	알란토인	Allantoin	0.1000	Skin-Conditioning Agent	
16	소르비탄이소스테아레이트	Sorbitan Isostearate	0.0600	Emulsifier	
17	아데노신	Adenosine	0.0400	Skin-Conditioning Agent	
18	삼나무잎추출물	Cryptomeria Japonica Leaf Extract	0.0250	Skin-Conditioning Agent	
19	박하잎추출물	Mentha Arvensis Leaf Extract	0.0250	Skin-Conditioning Agent	
20	유채추출물	Brassica Napus Extract	0.0250	Skin-Conditioning Agent	
21	편백나무잎추출물	Chamaecyparis Obtusa Leaf Extract	0.0250	Skin-Conditioning Agent	
22	녹나무잎추출물	Cinnamomum Camphora	0.0248	Skin-Conditioning Agent	

		(Camphor) Leaf Extract			
23		Chrysanthemum Zawadskii Extract	0.0248	Skin-Conditioning Agent	
24	제주조릿대추출물	Sasa Quelpaertensis Extract	0.0248	Skin-Conditioning Agent	
25	순비기나무열매추출물	Vitex Trifolia Fruit Extract	0.0248	Skin-Conditioning Agent	
26	스테아레스-20	Steareth-20	0.0150	Emulsifier	
27	폴리글루타믹에씨드	Polyglutamic acid	0.0125	Skin-Conditioning Agent	
28	플라센타단백질	Placental protein	0.0100	Skin-Conditioning Agent	
29	세테스-10	Ceteth-10	0.0050	Emulsifier	
30	글리세릴스테아레이트	Glyceryl Stearate	0.0050	Emulsifier	
31	배추출물	Pyrus Pyrifolia (Pear) Fruit Extract	0.1000	Skin-Conditioning Agent	
32	갈조추출물 (바다포도추출물)	Algae extract	0.0005	Skin-Conditioning Agent	
33	페녹시에탄올	Phenoxyethanol	0.3300	Preservatives	
34	향료	Fragrance	0.3000	Fragrance	
35	벤질알코올	Benzyl Alcohol	0.0010	Preservatives	
36	청색1호	CI 42090	0.000020	Colorant	
	Total		100.00		

- 휴미르 선크림 (SPF42 / PA+++)

No.	KCID	ICID	Content	Function	Remark
1	정제수	Water	To. 100	Solvents	
2	에칠헥실메톡시신나메이트	Ethylhexyl Methoxycinnamate	7.50000	Sunscreen Agents	
3	디프로필렌글라이콜	Dipropylene Glycol	6.00000	Solvents	
4	징크옥사이드 (CI 77947)	Zinc Oxide (CI 77947)	4.00000	Sunscreen Agents	
5	부틸렌글라이콜	Butylene Glycol	4.00000	Skin-Conditioning Agents	
6	세테아릴알코올	Cetearyl Alcohol	4.00000	Surfactants	
7	이소아밀p-메톡시신나메이트	Isoamyl p-Methoxycinnamate	3.00000	Light Stabilizer	
8	에칠헥실살리실레이트	Ethylhexyl Salicylate	3.00000	Sunscreen Agents	
9	C12-15알킬벤조에이트	C12-15 Alkyl Benzoate	3.00000	Skin-Conditioning Agents	
10	사이클로메치콘	Cyclomethicone	2.48000	Skin-Conditioning Agents	
11	사이클로펜타실록산	Cyclopentasiloxane	2.25000	Skin-Conditioning Agents	
12	사이클로헥사실록산	Cyclohexasiloxane	2.25000	Skin-Conditioning Agents	
13	디카프릴카보네이트	Dicaprylyl Carbonate	2.00000	Skin-Conditioning Agents	
14	비스-에칠헥실옥시페놀메톡시세닐트리아진	Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine	2.00000	Ultraviolet Light Absorbers	
15	티타늄디옥사이드 (CI 77891)	Titanium Dioxide (CI 77891)	1.60000	Colorants Sunscreen Agents	
16	1,2-헥산디올	1,2-Hexanediol	0.60000	Solvents	
17	부틸메톡시디벤조일메탄	Butyl Methoxydibenzoylmethane	0.50000	Sunscreen Agents	
18	소르비탄스테아레이트	Sorbitan Stearate	0.50000	Surfactants	
19	폴리소르베이트60	Polysorbate 60	0.50000	Surfactants	
20	라우릴피이지-9폴리디메칠실록시에틸디메치콘	Lauryl PEG-9 Polydimethylsiloxyethyl Dimethicone	0.49600	Skin-Conditioning Agents	
21	폴리아크릴레이트-13	Polyacrylate-13	0.40000	Film Formers	
22	이눌린라우릴카바메이트	Inulin Lauryl Carbamate	0.30000	Surfactants	

23		Silica	0.25792	Absorbents	
24	폴리이소부텐	Polyisobutene	0.20000	Viscosity Increasing Agents	
25	향료	Parfum	0.20000	Fragrance	
26	트리에톡시카프릴릴실란	Triethoxycaprylylsilane	0.12390	Binders	
27	잔탄검	Xanthan Gum	0.80000	Viscosity Increasing Agents	
28	배추출물	Pyrus Pyrifolia (Pear) Fruit Extract	0.1000	Skin-Conditioning Agent	
29	팔각회향추출물	Illicium Verum (Anise) Fruit Extract	0.08000	Skin-Conditioning Agents	
30	디소듐이디티에이	Disodium EDTA	0.04000	Chelating Agents	
31	폴리소르베이트20	Polysorbate 20	0.04000	Surfactants	
32	디메치콘	Dimethicone	0.03968	Skin-Conditioning Agents	
33	황금추출물	Scutellaria Baicalensis Root Extract	0.02000	Skin-Conditioning Agents	
34	박하잎추출물	Mentha Arvensis Leaf Extract	0.00025	Not Reported	
35	유채추출물	Brassica Napus Extract	0.00025	Skin-Conditioning Agents	
36	향칠나무추출물	Dendropanax Morbifera Extract	0.00025	Skin-Conditioning Agent	
37	마치현추출물	Portulaca Oleracea Extract	0.00010	Skin-Conditioning Agents	
38	바이오사카라이드검-1	Biosaccharide Gum-1	0.00010	Skin-Conditioning Agents	
39	베타-글루칸	Beta-Glucan	0.00010	Skin-Conditioning Agents	
40	소듐하이알루로네이트	Sodium Hyaluronate	0.00010	Skin-Conditioning Agents	
41	페녹시에탄올	Phenoxyethanol	0.25000	Preservatives	

(3) 개발 화장품의 규격/표준화 (제품 표준서 및 규격서)

- 휴미르 보습 크림 및 선크림



Colorpink R&D Inc. (Incorporated)  
 1115, Faculty Wing, KAIST Munji Campus, 499 Munji-ro, Yuseong-gu,  
 Daejeon, 305-702, Korea  
 Tel: +82 42 267 2010 Fax: +82 42 225 7283

**SPECIFICATION**

Product Name : 슈미르 보습크림

Test	Specifications	Method
성상	과립	광능검시
색상	하늘색 분주형	광능검시
향기	특이치 없음	광능검시
pH	5.50 - 7.50	식약처 고시 최종품 안전기준 등에 관한 규정
비중	0.980 - 1.020	25°C
질도	18,000-38,000	25°C, 40°C/20-pH, 15s

Approved by : 이 세 용



Colorpink R&D Incorporation  
 1115, Faculty Wing, KAIST Munji Campus, 499 Munji-ro, Yuseong-gu,  
 Daejeon, 305-702, Korea  
 Tel: +82 42 267 2010 Fax: +82 42 225 7283

**SPECIFICATION**

Product Name : 슈미르 선크림

Test	Specifications	Method
성상	크림	관능검사
색상	백색	관능검사
취	특이취 없음	관능검사
pH	6.00 - 8.00	식약처 고시 최종품 안전기준 등에 관한 규정
비중	0.980 - 1.040	25°C
병원성 미생균	총검출	
일반미생균	< 100 cfu/g or ml	
모듬 및 표시	표준유효력 미등한 것	

Approved by : 이 세 용

**제 2 절 연구개발 성과**

**1. 논문게재 성과**

번호	논문명	소속기관명	역할	Impact Factor	논문게재일	사사여부(단독사사 또는 중복사사)	SCI여부
1	건강기능식품 기능성 원료로써 나주 배박 추출물의 지표성분	전남식품산업연구센터	교신저자	0		단독사사	비SCI
2	B16 Melanoma 세포에서 낙과 물 추출물의 멜라닌 생성 저해 효과	전남식품산업연구센터	교신저자	0		단독사사	비SCI
3	Pear pomace water extract reduced adiposity <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> by activation of AMPK-dependent pathway	목포대학교	교신저자	3.759		단독사사	SCI
4	Pear pomace ethanol extract improves insulin resistance through enhancement of insulin signaling pathway without lipid accumulation	목포대학교	교신저자	1.416		단독사사	SCI
5	Pear pomace water extract suppresses hepatic lipid peroxidation and protects against liver damage in rats fed high fat/cholesterol diet	목포대학교	교신저자	0		단독사사	비SCI

2. 특허 성과

번호	특허명	출원(등록)일자	출원(등록)인	출원(등록)국	출원(등록)번호
1	배, 석세포 및 딸기를 이용한 음료의 제조방법	2015. 09. 18.	좋은영농조합법인	대한민국	10-2015-0132617
2	배 음료의 제조방법	2015. 09. 18.	좋은영농조합법인	대한민국	10-2015-0132116
3	나주이가 상표	2015. 12. 15.	좋은영농조합법인	대한민국	40-2015-0092872
4					
5					

### 3. 학술발표 성과

번호	발표제목	발표자	학술회의명	발표일자	통권/호/페이지	국내/외
1	Inhibitory effect of pear ethanol extracts on tyrosinase activity and melanogenesis in B16F10 cells	방미애 외 6명	한국식품과학회	2014. 08. 25.	P11-221	국내
2	Inhibitory effects on melanin production in B16F10 melanoma cells of fallen pear ethanol extracts	방미애 외 5명	한국식품과학회	2014. 08. 25.	P11-230	국내
3	Analytical method validation of antioxidative compound in extract of pear pomace and extraction conditions	조은정 외 3명	한국식품과학회	2015. 06. 03.	P01-120	국내
4	Nutritive components and dietary fiber content of stone cell resources extracted from pear pomace	정보람 외 3명	한국식품영양과학회	2015. 08. 25.	P02-128	국내
5	antioxidant activity of various solvent extract from stone cell of pear pomace	신보연 외 3명	한국식품영양과학회	2015. 08. 25.	P09-322	국내
6	Antioxidative Activities of the Fallen Pear Ethanol Extracts	김현아	한국식품영양과학회	2014. 08. 25.		국내
7	Arbutin Extracts Antioxidant Activity and Inhibits Nitric Oxide Production	김현아	한국식품영양과학회	2014. 08. 25.		국내
8	Antioxidant activity and hepatoprotective effects of Pear pomace in hepatic damage induced rats	김현아	한국식품영양과학회	2014. 08. 25.		국내
9	Effect of Water Extract from Pear Pomace on Antioxidative Defense System and Oxidative Stress in Rats fed High-Fat · High-Cholesterol Diet	김현아	한국식품영양과학회	2014.10.28		국내
10	Pear pomace water extract reduces fat accumulation in high fat diet induced obese mice via activation of AMPK signaling	김현아	한국식품영양과학회	2015.06.05		국내
11	Fallen pear extracts Inhibit Lipid Accumulation in 3T3-L1 Adipocytes	김현아	한국식품영양과학회	2015.06.05		국내
12	Anti-obesity Effect of Fallen Pear Water Extract in 3T3-L1 Cells and High Fat Diet-Induced Obese Mice	- 295 - 김현아	한국식품영양과학회	2016.08.26		국내

번호	발표제목	발표자	학술회의명	발표일자	통권/호/페이지	국내/외
13	AMPK-dependent modulation of adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes by pear pomace water extract	김현아	한국식품영양과학회	2016.08.17		국내
14	Pear pomace ethanol extract alleviates 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice	김현아	한국식품영양과학회	2016.10.21		국내
15	Characterizing the Effects of Pear Pomace Ethanol Extract on Insulin Signaling Pathway in 3T3-L1 cells and C57BL/6 mice	김현아	한국식품영양과학회	2016.11.1		국내

#### 4. 인력양성 성과

번호	인력양성인명	인력양성연도	성과발생연도	인력양성내용	계열	성별
1	박다연	2014	2014	성분분석	의약보건학 계열	남
2	김정은	2014	2014	성분분석	의약보건학 계열	여
3	서지혜	2014	2014	효능평가	농림수산학 계열	여

### 제 3 절 연구결과에 따른 성과

#### 1. 기술적 성과

- 항비만, 면역 기능 증진 천연 소재 및 제품 개발로 성인병 등 질병을 효율적으로 예방하고 관리하여 국민 건강 증진에 기여.
- 천연 식물 자원의 고부가가치화를 통한 농업인의 수익증대와 수출을 통한 지역경제 활성화.
- 천연자원을 이용한 기능성 식품개발 완료시 유통시설 연계를 통한 신뢰구축 및 산지유통 기능이 강화 될 것임.



## 2. 경제적 성과

- 비만억제 및 면역 기능 증진 천연 식물 소재 및 제품의 개발로 식용식물 소재화 산업의 활성화에 기여.
- 농산물의 고부가가치화를 통한 농업인의 수익증대 및 지역경제 활성화.
- 천연 식물소재를 이용한 기능 증진 소재 및 제품 개발은 국민의 건강증진에 기여함과 동시에 건강부담비용의 절감 효과.
- 지속적인 식물소재의 수요에 따른 농업인의 소득창출 및 고부가가치 산업으로 육성가능.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야 기여도

													D-06						
4-1. 목표달성도																			
세부연구목표 (연구계획서상의 목표)			비중 (%)		달성도 (%)		자체평가												
제품화			40		216.7		아주우수												
특허출원, 등록			20		83.3		우수												
논문			10		20		보통												
기술실시			20		100		아주우수												
학술대회			10		166.7		아주우수												
합계			100점				전체적으로 우수												
목표	재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용· 홍보		기 타 (타 연구 활용 등)
												논문		학술 발표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
	SCI	비 SCI	SCI	비 SCI															
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		SCI	비 SCI	학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
최종 목표	3	3	-	1	-	6	-	-	-	-	2	3	9	-	-	-	4	-	
연구 기간 내 달성 실적	3	2	-	1	-	13	70, 829 ,94 6원	-	2	1	1	0	1	15	7	3	1	7	1
달성율 (%)	100	66. 7	-	100	-	216 .7	-	-	-	-	0	33. 3	166 .7	-	-	-	175	-	
4-2. 관련분야 기여도																			
○ 지역경제에서 거의 폐기되었던 낙과를 활용하여 고부가가치의 제품을 개발하였다. 이에 따른 지역경제활성화와 낙과의 적극적인 소비가 가능해졌다.																			

## 제 5 장 연구결과의 활용계획

D-07

- 결과물로 나온 제품들은 꾸준한 판로개척과 기존의 판로를 이용한 매출을 기대할 수 있으며, 특허나 기술실시를 통한 부가적인 매출도 기대할 수 있다. 또한 논문들은 향후 관련된 과제에서의 충분한 활용가치가 있을 것으로 예상되며, 석세포 추출 방법에 대한 기술은 기술이전을 하여 자체 제품화를 통한 이익 창출이 가능 할 것으로 기대된다.

## 제 6 장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

		D-08
해당사항 없음.		

## 제 7 장 연구개발결과의 보안등급

	D-09
해당사항 없음.	

## 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

					D-10			
구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호
해당사항없음.								

# 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행 실적

D-11

1. 좋은영농조합법인

◎ 위생시설 및 실험실 안전점검 실시

- 1일 1회 육안으로 검사 실시
- 비치되어있는 점검표상의 것들을 일제히 점검하여 기록한다.
- 위생시설 및 실험실 안전점검 담당자가 직접 작성하며 이상이 있는 부분은 반드시 보완 하도록 한다.

2. (재)전남생물산업진흥원 식품산업연구센터

가. 연구실 안전점검 계획

(1) 일상점검

연구실 안전담당자(정: 센터장, 부: 선임연구원)의 책임하에 연구활동 종사자는 연구활동을 시작하기 전에 연구개발 활동에 사용되는 기계기구 및약품, 병원체 등의 보관상태 및 보호 장비의 관리실태, 전기·소방 관련 시설의 관리실태 등을 육안으로 점검하여 안전점검표 양식에 의거 일일 작성 보관한다.

(2) 정기안전점검

연구실 안전환경관리자(기업기획팀/안전소방담당자)는 연구실 전반의 위험성에 대하여 일정 요건을 갖춘 전문기관으로 하여금 세부적인 점검을 1년에 1회 이상 실시한다.

(3) 정기안전점검

연구실 안전환경관리자는 폭발사고, 화재사고 등 연구활동 종사자의 안전에 치명적인 위험을 야기할 가능성이 있을 것으로 예상되는 경우와 안전성확보 등을 위하여 필요하다고 인정되는 경우, 일정 요건을 갖춘 전문기관으로 하여금 정밀안전진단을 2년에 1회 실시한다.

나. 연구실 안전예방조치 계획

(1) 연구실 정밀안전진단 및 정기점검 결과에 따른 연구실 환경개선공사

(2) 비상 세안기 설치

(3) 밀폐형 환기 시약장 및 인화물질보관함 설치

(4) 안전교육 우수학과 연구실 안전용품 지급

(5) 각종 안전표지판 설치

(6) 실험실 공기질 측정 및 환기설비

다. 연구실 안전교육 계획

(1) 관련근거 : 연구실 안전환경 조성에 관한 법률 제18조(교육·훈련 등)

(2) 교육대상 : 연구활동종사자(연구원전원)

(3) 교육방법 : 오프라인 안전교육(자체집합교육)

(4) 교육시간 : 6개월 6시간(온라인 1강좌=1시간 인정)

(5) 교육과목 : 연구실 일반안전사항, 전기, 소방, 화학약품 및 가스 안전관리 이수

(6) 기타사항 : 상시 연구활동 종사자는 교육이수 후 참석명부 작성날일 후 보관

라. 연구실 안전교육 계획

① 가입업체 : 산업재해보상보험(산재보험)

② 가입대상 : 연구활동종사자(연구원전원)

③ 보험특약

- 상해사망 : 1인당 1억원
- 상해, 후유장애 : 1인당 1억원 한도로 장애등급별 정액 보상
- 부상 : 1인당 1천만원 한도로 상해등급별 정액 및 실손 보상

마. 건강검진

① 관련근거



연구실 안전환경조성에 관한 법률 제18조제4항에 따라 「산업안전보건법 시행령」 제29조에 따른유해물질 및 같은 법 시행규칙 별표 12의2에 따른 유해인자를 취급하는 연구활동 종사자에 대하여 일반건강검진과 특수건강검진을 실시하여야 한다.

② 검진대상

상시 연구활동종사자 중 관련유해물질 취급자

## 제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번 호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기 타	소속 기관명	역할	논문게재지 / 특허등록국 가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	D-12	
								사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	특허	배, 석세포 및 딸기를 이용한 음료의 제조방법	좋은영 농조합 법인	-	대한민국	-	2015.09.18.	단독사사	-
2	특허	배 음료의 제조방법	좋은영 농조합 법인	-	대한민국	-	2015.09.18.	단독사사	-
3	상표	나주이가	좋은영 농 조합법 인	-	대한민국	-	2016.10.06.	단독사사	-

# 제 11 장 기타사항

	D-13
해당사항 없음.	

## 제 12 장 참고문헌

D-14

1. 이동석, 이상규, 양차범. 한국산 주요 과실류의 화학성분에 관한 연구, 한국식품과학회지 4(2): 134(1972)
2. 박세원, 장한익, 홍경희, 김기열. 배의 크기에 따른 품질 평가. 한국원예학회 13(2): 422(1995)
3. Barbera G., Garimi F., Inglese P. and Panno M. Physical morphological and chemical changes during fruit development and ripening in three cultivars of prickly pear. *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller, *Journal of Horticultural Science*, 67(3):307(1992)

<별첨작성 양식>

[별첨 2]

### 자체평가의견서

1. 과제현황

			코드번호	D-15	
	과제번호		313019-3		
사업구분	생명산업기술개발사업				
연구분야			과제구분	단위	
사업명	생명산업기술개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	낙과(미숙과)를 이용한 고부가가치 뷰티케어 제품개발		과제유형	(개발)	
연구기관	좋은영농조합법인		연구책임자	이기선	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2013.09.25~20 14.09.24	200,000	50,000	250,000
	2차년도	2014.09.25~20 15.09.24	200,000	50,000	250,000
	3차년도	2015.09.25~20 16.09.24	200,000	50,000	250,000
	계	2013.09.25~20 16.09.24	600,000	150,000	750,000
참여기업	(재)전남생물산업진흥원 식품산업연구센터, 목포대학교 산학협력단				
상대국	-	상대국연구기관	-		

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2016년 11월 24일

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
좋은영농조합법인	대표이사	이기선

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약



## I. 연구개발실적

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

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

연구개발결과로 나온 성과물들은 그 우수성과 창의성에 있어서 아주 우수하다고 판단된다. 특히 관련된 특허출원이나 기술실시로 인한 제품의 매출발생을 비롯해서 대부분 폐기되는 낙과를 이용한 것이기 때문에 지역사회의 고부가가치를 창출한 결과로 봐도 무방할 듯 하다.

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

특허를 이용한 제품의 개발에 따른 매출 발생, 기술에 관련된 논문, 기술실시로 인해서 다양한 방면으로의 활용이 가능 할 것으로 보여지며, 화장품에 관련된 제품의 개발로 인한 소비자들의 인식변화에 따른 잠재적 매출증대가 기대된다.

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

특허에 관련된 성과물들은 곧 제품으로 연결되는 것이여서 여러 가지 제품화에 기여했고, 석세포나 배막은 기존의 활용과는 또 다른 방면으로의 제품개발로 이어졌다. 이 후에도 관련된 논문과 기술들을 활용한 다양한 제품의 개발이 기대된다.

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

주관기관을 비롯한 모든 참여기관의 참여 연구원들은 새로운 제품의 개발과 새로운 기술의 발굴을 위해 각자의 시간을 투자하여 각자 맡은 위치에서 최선을 다해 주었다. 그에 따른 성과물들이 다양하게 나온면이 그결과라고 볼 수 있다. 또한 중간중간에 예상한 것과는 다른 결과들이 나올때에도 포기하지않고 끝까지 꾸준하게 노력하여 좋은 성과물을 얻게 된 것이다.

### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

현재 진행되거나 아직 게재가 되지 않은 논문들이 있어서 대기중에 있으며 지금까지 나온 논문, 학술발표대회의 성과물들은 최종보고서에 그 내용이 자세히 서술되어 있다. 특허는 최종 2건이 출원이 되었으며 등록까지는 시일이 더 걸릴 것으로 보인다.

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
제품화	40	216.7	아주우수
특허출원, 등록	20	83.3	우수
논문	10	20	보통
기술실시	20	100	아주우수
학술대회	10	166.7	아주우수
합계	100점		전체적으로 우수

## III. 종합의견

### 1. 대한 종합의견

처음 과제 기획시에 세웠던 성과 목표에 비해 달성율은 떨어지나 성과물들로 나온 결과물들이 우수하다고 판단되며 무엇보다도 지역사회에 고부가가치창출이 이루어져서 소기의 목표는 달성되었다고 판단된다.

### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

과제의 성과지표에 따른 정성적, 정량적 평가도 이루어지지만 무엇보다도 참여한 연구원들의 노력과 협력이 없었다면 결과물들이 나오지 않았을 것입니다. 과제 평가시에 양적인 것보다는 질적인 부분들과 노력들도 감안해 주시기 바랍니다.

### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

결과물로 나온 제품들은 꾸준한 판로개척과 기존의 판로를 이용한 매출을 기대할 수 있으며, 특히나 기술실시를 통한 부가적인 매출도 기대할 수 있습니다. 또한 논문들은 향후 신규과제가 있다면 충분한 활용가치가 있을 것으로 예상됩니다.

#### IV. 보안성 검토

--

*보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.*

##### 1. 의견

--

##### 2. 연구기관 자체의 검토결과

--



### 주 의

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