115094

유색미 유전자원을 활용한 기능성화장품 개발 최종보고서
2019

농생명산업기술개발사업 R&D Report

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

농생명기술개발사업 제3차년도 최종보고서

발 간 등 록 번 호
11-1543000-002638-01

유색미 유전자원을 활용한 기능성 화장품 개발 최종보고서

2019. 03. 25.

주관연구기관 / 동아대학교
협동연구기관 / 대구한의대학교
협동연구기관 / 튜링겐코리아(주)

농 림 축 산 식 품 부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “유색미 유전자원을 활용한 화장품 개발”(개발기간 : 2015. 12. 18 ~ 2018. 12. 17)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 03. 25.

주관연구기관명 : 동아대학교 산학협력단 (대표자) 이재열 (직인)
협동연구기관명 : 대구한의대학교 산학협력단 (대표자) 이정화 (직인)
참여기관명 : ㈜튜링겐코리아 (대표자) 강연자 (직인)

주관연구책임자 : 김도훈
세부연구책임자 : 양원태
협동연구책임자 : 이진태
참여기관책임자 : 천정윤

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

<table>
<tr><td>과제고유번호</td><td>115094</td><td>해 당 단 계
연 구 기 간</td><td>2015.12.18. ~
2018.12.17</td><td>단 계 구 분</td><td>(1단계)/
(1단계)</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 사 업 명</td><td>단 위 사 업</td><td colspan="4">농식품기술개발사업</td></tr>
<tr><td>사 업 명</td><td colspan="4">농생명산업기술개발사업</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 과 제 명</td><td>대 과 제 명</td><td colspan="4">(해당 없음)</td></tr>
<tr><td>세부 과제명</td><td colspan="4">유색미 유전자원을 활용한 화장품 개발</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 책 임 자</td><td rowspan="2">김도훈</td><td>해당단계
참여연구원
수</td><td>총: 18 명
내부: 17 명
외부: 1 명</td><td>해당단계
연구개발비</td><td>정부: 570,000
천원
민간: 210,000
천원
계: 780,000
천원</td></tr>
<tr><td>총 연구기간
참여연구원
수</td><td>총: 18 명
내부: 17 명
외부: 1 명</td><td>총 연구개발비</td><td>정부: 570,000
천원
민간: 210,000
천원
계: 780,000
천원</td></tr>
<tr><td>연구기관명 및
소 속 부 서 명</td><td colspan="3">동아대학교 산학협력단
대구한의대학교 산학협력단</td><td colspan="2">참여기업명

(주)튜링겐 코리아</td></tr>
<tr><td>국제공동연구</td><td colspan="3">상대국명:</td><td colspan="2">상대국 연구기관명:</td></tr>
<tr><td>위 탁 연 구</td><td colspan="3">연구기관명:</td><td colspan="2">연구책임자:</td></tr>
</table>

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 갈음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반과제 국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 해당하지 않음

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설·장비	기술요약 정보	소프트웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명정보	생물자원	정보	실물
등록·기탁번호	√	√									

국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

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

요약

우리는 국내외에서 수집된 유색미 유전자원 548 계통을 대상으로 생리활성물질 분석, 기능성 지표성분을 이용한 기능성 물질 분석 및 화합물 동정의 실험을 진행하였다. 유색미 유전자원에 대한 분자마커를 활용하여 DNA 검정을 실시하고 주요농업형질을 조사하여 분자생물학적 특성과 기능성 물질을 고려한 우수계통을 선발 및 증식하였다. 또한, 기능성 성분 함량이 높은 계통간 집단 육성을 실시하여 F1잡종세대를 제작하여 증식하였다. 이러한 결과를 바탕으로 협동기관에 소재를 제공하였고, 협동기관에서는 유색미 유전자원의 기능성 소재 효능 검증 및 안전성 및 안정성 평가를 실시하여 그 결과를 참여기업인 ㈜튜링겐코리아에 이관하였다. 튜링겐코리아에서는 소비자의 요구도에 따른 제품 선택, 연령층 및 제품의 사장의 요구에 따른 다양한 제형을 개발하였고, 제형 특이성, 색상, 향취, 제품용기 및 질감에 따른 제형 시안을 도출하고 클렌저, 마스크팩, 오일 및 BB 크림 등 9종의 시제품을 개발 완료하고 판매를 통한 수입을 창출하였다.

보고서 면수

207

<요약문>

연구의 목적 및 내용	○ 유색미(흑미,적색미) 유전자원을 활용한 기능성 화장품 개발 - 미강주름개선, 미백등 8종 화장품 개발 ○ 분자생물학적 기술을 이용한 고 기능성물질 함유 벼 계통 육성 - 유색미 유전자원(흑미 350계통, 적미 150계통)에 대한 SSR 분석 실시 - DNA 마커의 유전자형과 기능성 물질(안토시아닌 등)과의 관계분석 ○ 유색미 유전자원의 생리활성 물질 탐색 - 안토시아닌, 안토시아니딘, 플라보노이드, 페놀성화합물등
연구개발성과	○ 국내외 벼 품종 및 유색미 유전자원에 대한 기능성 물질 분석 - 안토시아닌, 안토시아니딘, 플라보노이드, 페놀성화합물 등의 기능성 물질 분석을 통하여 생리활성 우수 계통 선발 ○ 기능성 화장품 소재용 유색미 계통선발 - 감마오리자놀, 가바, 토코페롤 등 기능성 지표성분 분석을 통한 최적의 우수 계통 선발 ○ 유색미 유전자원의 생리활성 물질 탐색 - 기능성 물질이 함량이 높은 우수 계통을 이용하여 용매별 분획물을 제조하고 기능성 성분 분석 및 화합물 동정 ○ 유색미 유전자원을 활용한 기능성물질 함유 중간모본 육성 - 분자생물학적 기술을 활용한 흑미와 적색미 유전자원 특성 평가 - 분자마커와 기능성 물질과 상관 분석 - 제반형질 및 기능성 물질 함량이 높은 유전자원의 선발 및 고정 ○ 유색미 유전자원에 대한 microsatelite 마커를 활용하여 DNA 검정을 실시하고 주요농업형질을 조사하여 분자생물학적 특성과 기능성 물질을 고려한 유용계통 선발 ○ 기능성 성분 함량이 높은 계통간 잡종 집단 육성 및 증식 - 흑미x적미, 흑미x흑미, 적미x적미, 흑미x백미, 적미x백미 ○ 유색미 유전자원의 기능성 소재 효능 검증 -항산화, 항염증, 항주름, 미백에 관한 in vitro 실험을 통해 유색미 유전자원의 기능성 소재 효능 검증 ○ 유색미 소재의 안전성 평가 - 사람피부 세포에 대한 안전성 평가, 화장품에 적용 가능한 정도에 대한 실험, 사람 피부 세포에 대한 안정성 평가 ○ 유색미 추출물의 세포독성 실험 - 유색미 유래의 추출물을 활용한 세포의 생장 및 증식 조사

	○ 유용 물질의 함량이 높은 벼 품종 및 계통을 활용한 신기능성 화장품 개발 - 소비자의 요구도에 따른 제품 선택 패턴 및 시장조사 - 연령층 및 개발 제품의 시장의 요구에 따른 다양한 제형 개발 - 제형 특이성 및 색상, 향취, 제품 용기 및 질감에 따른 제형 시안 도출 및 개발 - 효모, 유산균 등 미생물을 이용한 여러 가지 발효 기술 적용 - 클렌저, 마스크팩, 오일, 비비크림 등 9종의 시제품개발 완료 및 판매를 통한 수입창출 - 박람회 참석등을 통한 제품 마케팅 및 홍보
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	○ 고기능성 유색미 계통을 이용한 음료, 건강보조제 등 다양한 제품개발의 소재로서의 활용범위 확대 ○ 천연물에서 추출한 물질을 사용하여 소비자들에게 거부감이 없는 제품개발 가능 ○ 인체에 부작용이 없는 효과가 우수한 천연물을 활용한 응용범위 확대 (피부 보습 및 노화방지 화장품, 아토피성 피부염 관련 스킨케어 및 헤어케어 제품 등) ○ 쌀 생산이 적은 국외로 원료를 수출할 수 있는 방안 모색 ○ 유색미 기반 화장품 제형 및 소재 개발을 통한 기업의 기술 수준을 향상하고 이를 바탕으로 다양한 제형 개발의 기초 기반 기술로 활용가능 ○ 유색미 추출물에 대한 연구개발로 과학화에 따른 화장품원료 등재 및 신소재 소유권을 확보함으로서 향후 추가적 제품에 적용이 가능함 ○ 유색미 추출물의 화장품 원료로소 응용가능성, 객관화 검증을 통한 국내 화장품 소재시장의 선도적 역할 수행 ○ 다양한 유색미 추출물의 사업화 가능성 및 기반기술 활용함으로서 기업의 신사업(천연물소재)으로 발전 가능

국문핵심어 (5개 이내)	유색미	기능성 화장품	유전자원 특성평가	천연색소	생리활성물질
영문핵심어 (5개 이내)					

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

〈 목 차 〉

표지

제출문 ····· 1

보고서 요약서 ····· 2

요약문 ····· 4

목차 ····· 6

1장. 연구개발과제의 개요 ····· 7

2장. 국내외 기술개발 현황 ····· 25

3장. 연구수행 내용 및 결과 ····· 26

4장. 목표달성도 및 관련분야 기여도 ····· 186

5장. 연구결과의 활용 계획 ····· 193

6장. 연구개발성과의 보안등급 ····· 195

7장. 연구실 안전조치 이행 실적 ····· 196

8장. 연구개발과제의 대표적 연구실적 ····· 198

9장. 참고 문헌 ····· 199

제 1 장. 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발의 필요성

가. 연구개발대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

1) 배경

우리나라의 식생활은 서구화되고 다양한 먹거리 등에 1인당 쌀소비량은 ('95)106.5kg → ('05)80.7kg → ('13)67.2kg → ('14)65.1kg으로 지속적으로 감소 추세에 있다. 반면에, 간편식의 확대, 웰빙확산, 가공산업 육성 등으로 가공용 쌀 소비는 ('05)192천톤 → ('10)347천톤→ ('13)471천톤 → ('14)457천톤으로 증가추세에 있다. 국내 가공용 쌀시장 규모는 1조8천억(27만톤) 정도 추정되며 전체 쌀시장의 6% 수준에 이르고 있고 전체의 60% 이상이 떡시장이 차지하고 있다. 가공용쌀의 소비를 높이기 위하여 이에 적합한 여러 가지 특수용도(기능성, 다수성, 찰벼, 유색미, 향미, 가공기타)의 벼 품종이 77품종 육성되어 농가에 보급되어 있으며, 특수미 중 노화를 억제시키고 항산화작용이 있는 것으로 알려진 유색미는 13품종(조생흑찰,흑진주,적진주찰,보석흑찰,적진주,홍진주,흑향,흑남,흑설,건강홍미,조은흑미,흑수정)이 개발되어 있으며 재배면적의 경우 ('10)2,401ha → ('11)2,223→ ('12)2,060→ ('13)3,123→ ('14)2,795 전반적으로 증가추세에 있다. 유색미를 활용한 기능성 성분 분석에 대한 세부적으로 보면 '눈큰흑찰', '신토흑미'를 활용한 미백활성, 혈중알콜 경감 기능, 가바 함량 분석 등에 대한 연구를 수행하여 기능성 음료와 화장품 개발에 대한 원료로 유용하게 사용될 수 있음을 제시하고자 한다. 쌀을 이용한 화장품 소재 개발의 경우 화장품 개발에 적합한 벼 품종의 선정없이 기 개발된 제한된 품종에 대한 기능성 분석을 활용하여 제품 개발을 수행하여 화장품 브랜드 한율(태평양화학)은 홍국쌀로 만든 '진액 스킨'을 개발하여 상품화 함('14). 경기도 이천시가 임금님표 이천쌀을 활용한 기능성 화장품 '베로베네 라이스 레시피' 4종을 출시한 보고가 있으며, 국내 기능성 화장품 시장 규모가 05년 6,000억원 규모에서 2013년 2조 5,600억원으로 급격히 증가하고 있으며 국내 화장품 생산금액의 약 32%의 비중을 차지할 정도로 중요성이 증대되고 있다. 생활 수준의 향상, 노령화 사회 가속화로 인해 연평균 20%이상의 성장세가 당분간 지속될 것으로 전망이며 그 개발 원료 물질도 **천연식물성 물질**을 선호하고 있는 것으로 알려져 있고, 국외의 경우도 유럽(이스트만케미칼, 펜타팜 등), 일본에서 쌀에서 유래된 화장품 원료를 이용하여 항노화 효과를 가진 기능성 화장품을 개발하여 출시하고 있으며 향후 시장은 더 커질 것으로 예상되어 진다. **따라서 국내에서 기 육성된 유색미 품종을 포함하여 일본, 중국 등에서 수집된 유색미 유전자원 500점(흑미 350점, 적미 150점)을 활용하여 분자생물학적 특성과 화장품 제조에 필요한 기능성물질과의 관계 분석을 통한 고기능성 물질이 함유된 계통을 육성하고 이를 활용하여 미백, 주름개선에 효과적인 화장품을 개발을 목적으로 한다.**

나. 본 과제의 기술과 관련된 본 연구팀의 선행연구 결과

1) 국내 벼 품종 및 유색미 유전자원을 이용한 기능성 물질 탐색(주관기관)

주관기관인 동아대학교(제 1 세부과제)는 국, 일본, 중국 등지에서 수집한 적미와 흑미를 대상으로 total phenolic compound, free radical scavenging 및 total anthocyanin을 함량 및 일반벼, 적미 및 흑미 추출물을 이용한 피부 미백 및 피부노화 관련 효소활성 측정 실험을 수행 중에 있는 중이다(그림 1, 2).

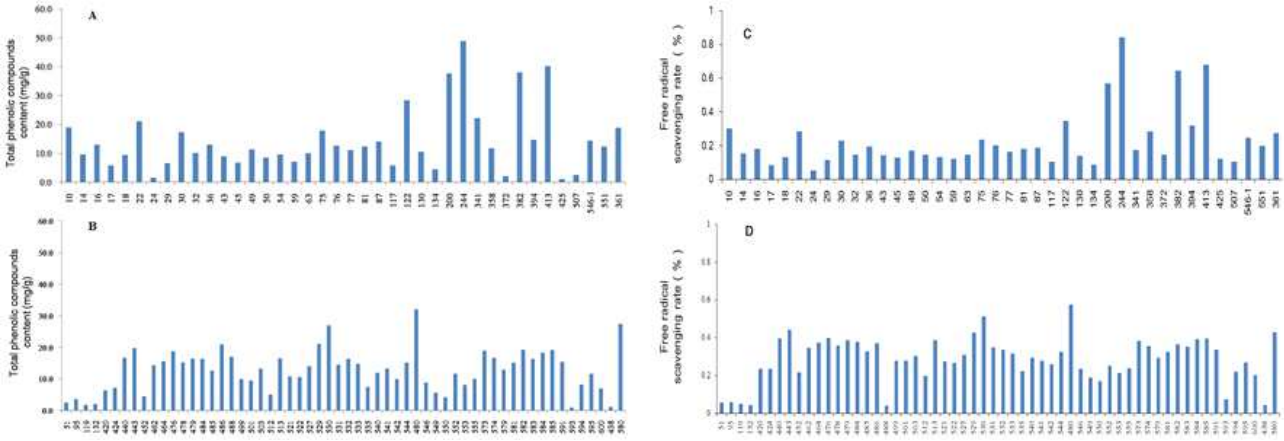


그림 1. Determination of total phenolic compounds content and free radical scavenging rate in black(A, C) and red (B, D) rice.

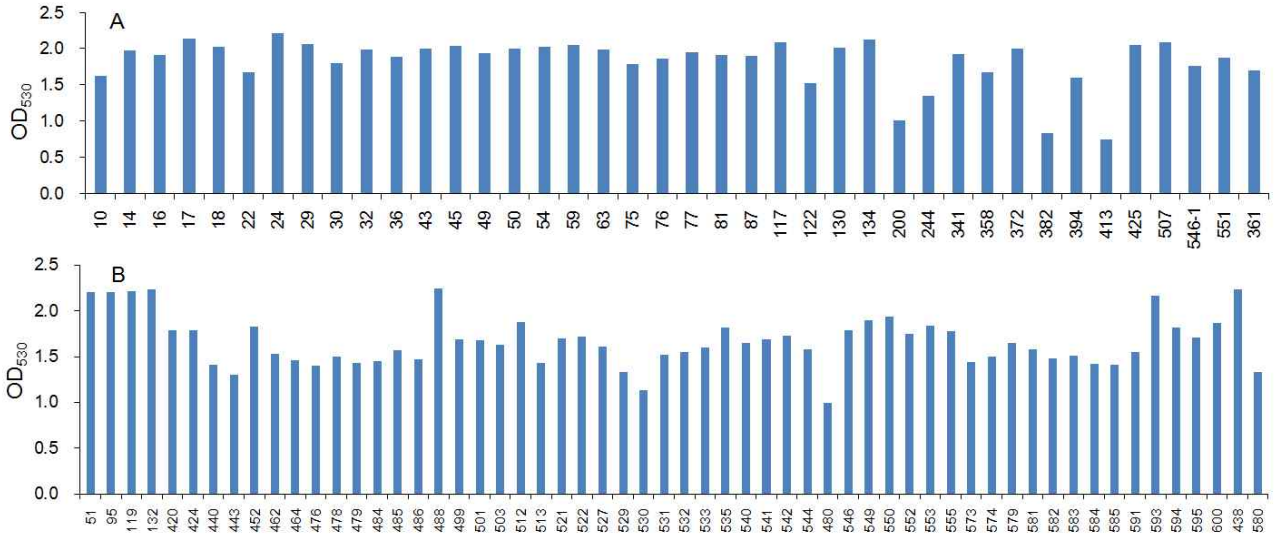


그림 2. Determination of total anthocyanin content black(A) and red (B) rice.

2) 분자생물학적 기술을 활용한 고기능성 함유 벼 계통 육성(주관기관)

주관기관인 동아대학교(제 2 세부과제)는 벼 품종식별 및 유전자원 특성평가에 적합한 microsatellite 마커를 선발하기 위하여 436개의 microsatellite 마커를 활용하여 '주남' 등 11품종에 대하여

품종식별력 높은 50개 마커 선정하였고, 반복재현성이 높은 26개의 microsatellite 마커를 이용하여 325 품종에 대한 유전자 분석체계 구축하였다(그림 3). 유색미 500계통에 대하여 20개 microsatellite 마커를 이용한 분석중에 있는 중이다(그림 4).

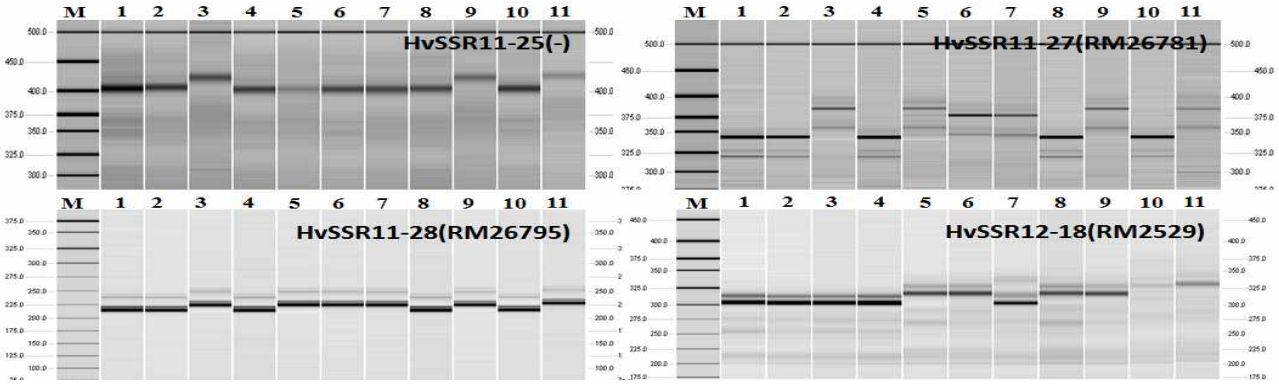


그림 3. Polymorphism of 4 HvSSR markers, HvSSR11-25, 11-27, 11-28, and 12-18. The amplified PCR products were loaded on HAD-GT12^{TM} Genetic Analyzer System, and analyzed using Biocalculator Data Analysis Software. Lane1;Hopum, 2;Hwayeong, 3;Dami, 4;Sindongjin, 5;Odae, 6;Chucheong, 7;Saechucheong, 8;Junam, 9;Ilpum, 10;Ilmi, 11;Gopum

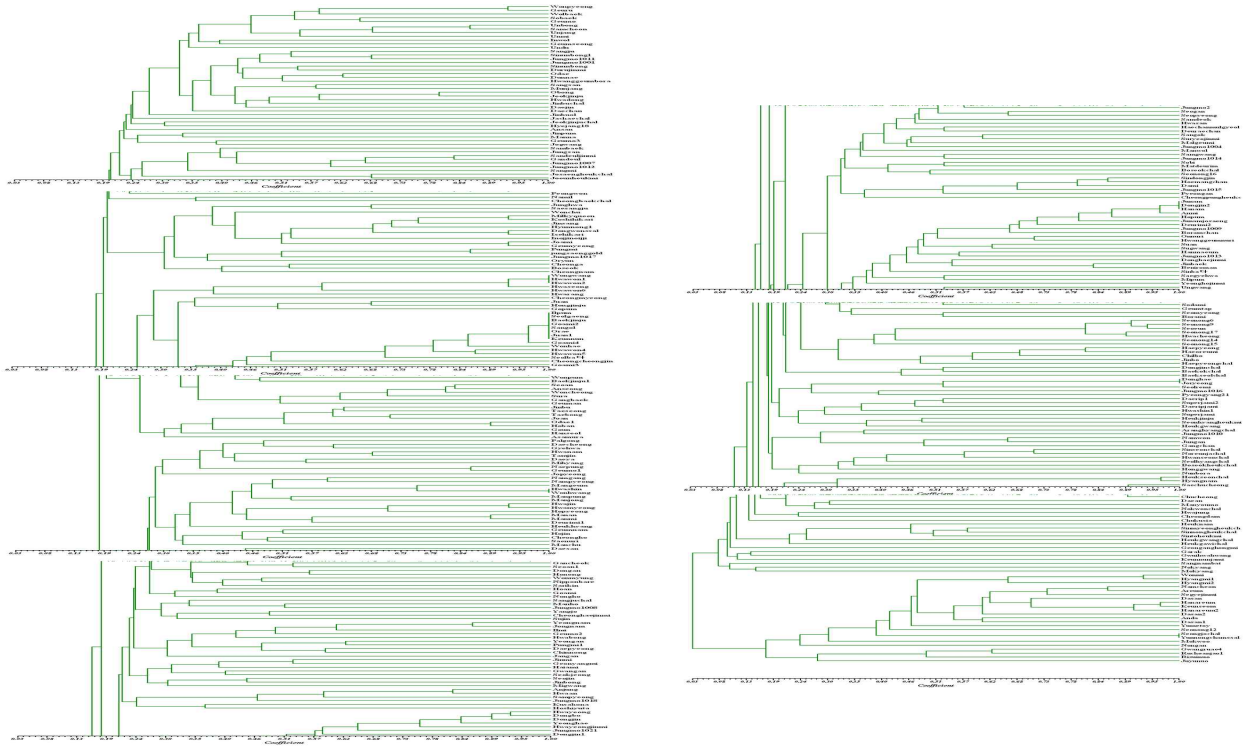


그림 4. Polymorphism of microsatellite marker using 325 corored rice cultiva.

3) 기능성 화장품 개발을 위한 기능성 유색미 소재 개발(협동기관)

협동기관인 대구한의대학교(제 1 협동과제)는 쌀 전분과 다른 천연물을 혼합하여 *in vitro* 활성 실험, 추출물의 피부염증 완화 및 안전성 검증을 진행중에 있으며, 쌀 파우더와 상황 추출물

을 혼합한 항산화, 미백, 주름 관련 실험 진행중에 있다. 쌀 파우더에 함유될 천연물의 에탄올 추출물을 안전성 실험을 위해 Patch test를 실시하고 있으며(표 1), Finn chamber(on Scanpor tape)에 추출물을 묻혀 등의 상부에 수직으로 붙여, 국제 접촉피부염 연구위원회 (International Contact Dermatitis Research Group : ICDRG)의 기준표(표 2)의 의거하여 24시간 후 피부의 반응을 확인 하는 실험중에 있다.

표 1. 쌀 파우더에 함유될 천연물의 항균력을 paper disc법으로 측정

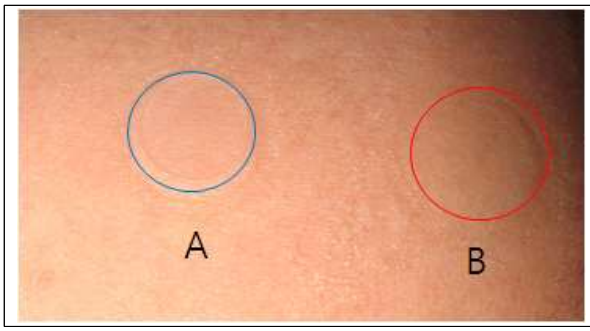
Strains \ Concentration		1%	2%	5%
Escherichia coil KCTC 1039	UA	-	13	13
	UE	-	-	13
	UW	-	-	-
Staphylococcus epidermidis KCTC 1917	UA	14	15	19
	UE	11	15	16
	UW	11	12	14
Staphylococcus aureus KCTC 1621	UA	-	11	16
	UE	-	-	12
	UW	-	-	-
Candida albicans KCTC 7965	UA	-	-	15
	UE	-	-	12
	UW	-	-	-

* UA : 70% acetone extracts of chestnut inner shells. UE : 70% ethanol extracts of chestnut inner shells. UW : water extracts of chestnut inner shells.

표 2. 국제 접촉피부염 연구위원회 (International Contact Dermatitis Research Group : ICDRG)의 기준

Recording	Interpretation	결 과
?	Doubtful reaction : faint macular erythema only	-
+	Weak (nonvesicular) positive reaction : erythema, infiltration, possibly papules	-
++	Strong (vesicular) positive reaction : erythema(홍반), infiltration(침윤), papules(부스럼), vesicles(소 수포)	-
+++	Extreme positive reaction : bullous reaction(수포)	-
-	Negative reaction	20(100%)

쌀 파우더에 함유될 천연물의 피부 안전성을 측정을 임상시험 대상 20명, 24시간 대한 24시간 동안 홍반, 가려움, 부어오름 증상을 관찰하였으나 관련 증상이 나타나지 않았음을 확인하였다.



Human patch test of extracts.

A : Chestnut inner shells extracts
B : Mushroom extracts

4) 유색미를 활용한 기능성 화장품 개발(참여기업)

참여기업인 ㈜튜링겐코리아(제 2 협동과제)는 연구실 내에서 formulation 제형을 대량 공정화에 적용하여 제품생산에 따른 제형 안정성 및 안전성 등을 고려한 최적의 제품 생산중에 있다(그림 5).

상	No.	원료명	상품명	함량
A	1	Stearic Acid		20.00
A	2	Cetyl Alcohol		20.00
A	3	Glyceryl Trioctanoate		Q.S
A	4	Squalane		Q.S
A	5	Glyceryl Stearate/PEG-100 Stearate	Arlacel 165	Q.S
A	6	Polyoxyethylene Sorbitan Monostearate	Tween 60	5.00
A	7	Sorbitan Stearate	Arlacel 60V	2.00
A	8	Methyl Polysiloxane	KF96-100CS	1.00
A	9	Propylene glycol		2.00
A	10	1,3-Butylene glycol		5.00
A	11	Vitamin-E Acetate		1.00
A	12	Glycerin		Q.S
B	13	Purified Water		608.90
B	14	EDTA-2Na		0.40
B	15	Dipotassium Glycyrrhizate	DPG-K2	0.20
C	18	Carboxyvinylpolymer 940 (2%)		60.00
D	19	Purified Water		10.00
D	20	Triethanolamine		4.00
E	21	Hydroxyethylcellulose (1%)		60.00
F	22	Na-Hyaluronate (1%)		10.00
G	23	Extracts		8.00
		합 계		
비 고		1. C 원료를 물에 미리 분산시켜둔다. 2. E 원료는 물 80℃에서 가온 후 분산시켜둔다.		

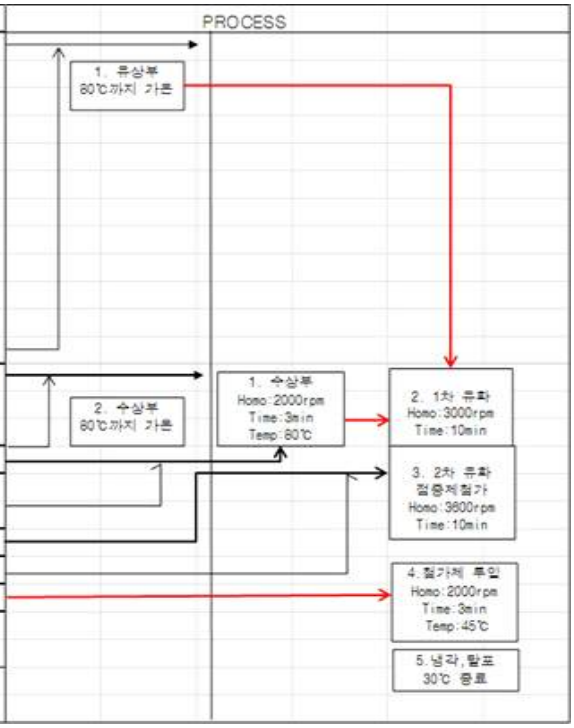


그림 5. 화장품 제조공정 (처방전 예시)

[시제품 개발 과정]

1. 제품 처방개발

- 연구실 내 제형 개발, 다양한 제형에 따른 처방개발
- 추출물과 화장품 원료간의 함량비에 따른 제형시험

2. 제형 안정성 측정

- 기기를 통한 제형의 물성변화 측정 및 관찰

Incubator

Cycle chamber

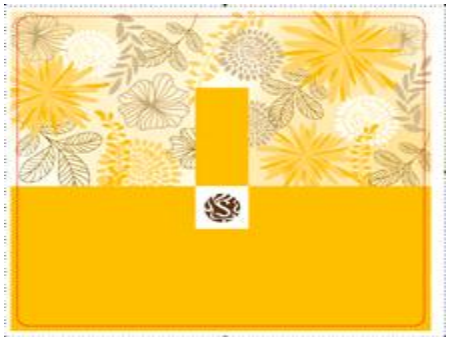
Viscometer

pH meter

Optical microscope

3. 제품 디자인

- 시제품 컨셉에 따른 용기 및 박스 디자인

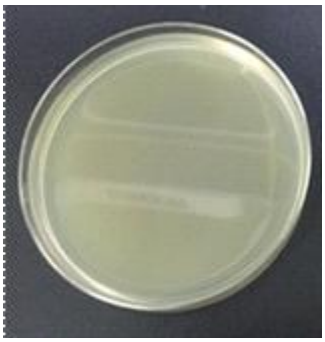


4. 대량 생산

- 시제품 제조, 대형 공정화

5. 품질검사

- 미생물 시험 검사 :병원성균 및 일반세균, 진균에 대한 미생물 시험검사
- pH, Viscosity, 색상, 이물질, 특이취 등 제품 검사



- **시중 판매제품의 전성분**

제품	전성분 표시
B (71g /미국 C사제품)	Zea mays starch(corn starch), manihot utilissima starch(tapioca starch), kaolin clay USD, rice concentrate, pure alternifolia(tea tree) and salvia sclarea(clary sage)
C (200g / 미국 J사 국내시판제품)	Zea mays (corn) starch(99.18%), Tribasic Calcium phosphate, Fragrance
D (70g / 국내 B사제품)	**변성 옥수수전분(86.9%),** 징크옥사이드, 타피오카 전분 (3.0%), 하이드레이티드 실리카, 콩오일, 페퍼민트잎추출물, 트리에톡시 카프릴릴실란, 데하이드로아세틱애시드, 벤질알코올, 향료

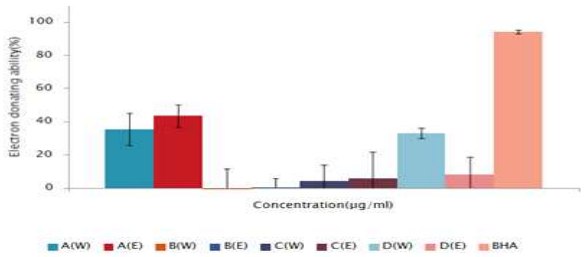


Fig. 1 Electron donating ability of rice powder extracts.

A(W) : water extract of rice powder. A(E) : 70%ethanol extract of rice powder.
B(W) : water extract of B. B(E) : 70%ethanol extract of B.
C(W) : water extract of C. C(E) : 70%ethanol extract of C.
D(W) : water extract of D. D(E) : 70%ethanol extract of D.
BHA : butyl hydroxytoluene

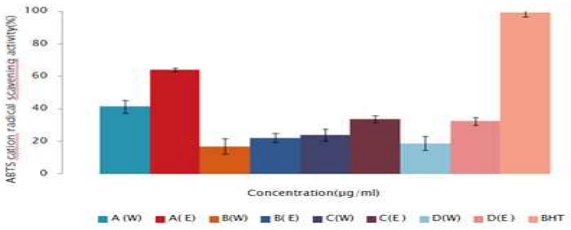


Fig. 2 ABTS cation radical scavening activity of rice powder extracts.

A(W) : water extract of rice powder. A(E) : ethanol extract of rice powder.
B(W) : water extract of B. B(E) : ethanol extract of B.
C(W) : water extract of C. C(E) : ethanol extract of C.
D(W) : water extract of D. D(E) : ethanol extract of D.

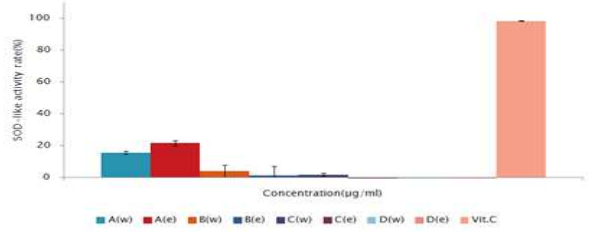


Fig. 3 SOD-like activity of rice powder extracts.

A(W) : water extract of rice powder. A(E) : ethanol extract of rice powder.
B(W) : water extract of B. B(E) : ethanol extract of B.
C(W) : water extract of C. C(E) : ethanol extract of C.
D(W) : water extract of D. D(E) : ethanol extract of D.
Vit.C : ascorbic acid.

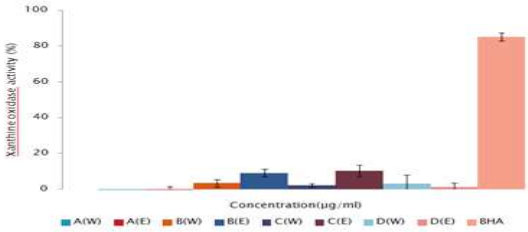


Fig. 4 Xanthine oxidase inhibition of rice powder extracts.

A(W) : water extract of rice powder. A(E) : ethanol extract of rice powder.
B(W) : water extract of B. B(E) : ethanol extract of B.
C(W) : water extract of C. C(E) : ethanol extract of C.
D(W) : water extract of D. D(E) : ethanol extract of D.

제 2 절. 연구개발의 목표 및 내용

가. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

연구개발의 최종 목적은 분자생물학적 기술을 이용한 유색미 고 기능성물질 함유 벼 계통 육성하여 이를 활용한 기능성 화장품을 개발 하고자 한다.

이를 위하여 본 과제에서는 다음의 연구개발 목표를 달성하고자 한다.

○ 유색미(흑미,적색미) 유전자원을 활용한 기능성 화장품 개발
- 미강주름개선, 미백 등 8종 화장품 개발

○ 분자생물학적 기술을 이용한 유색미 고 기능성물질 함유 벼 계통 육성
- 유색미 유전자원(흑미 350계통 적미 150계통)에 대한 SSR 분석 실시
- DNA 마커의 유전자형과 기능성 물질(안토시아닌 등)과의 관계분석

○ 유색미 유전자원의 생리활성 물질 탐색
- 안토시아닌, 안토시아니딘, 플라보노이드, 페놀성화합물 등

나. 과제별(세부·협동) 연구개발의 목표 및 내용

상기의 최종 연구개발 목표를 달성하기 위하여 주관기관인 동아대학교는 유용 유전자 발굴 및 기능 검정, 협동기관인 대구한의대학교는 기능성 화장품 개발을 위한 소재 개발, 그리고 참여기업인 ㈜튜링겐코리아는 주관기관 및 협동기관으로부터 선발된 유색미 유전자원을 활용하여 기능성 화장품을 제품화하는 연구를 수행하고자 한다.

❑ **제 1 세부과제 : 국내 벼 품종 및 유색미 유전자원을 이용한 기능성 물질 탐색**

○ 국내외 유전자원을 이용한 고기능성 유색미 계통 선발
- 국내외에서 수집된 유색미 유전자원 500점을 대상으로 기능성 성분분석
- 총 안토시아닌 함량 분석 결과를 바탕으로 C3G 함량이 높은 유색미 계통 선발
- 총 플라보노이드 함량 분석 결과를 바탕으로 luteolin 함량이 높은 계통 선발
- 총 페놀산 함량 분석 결과를 바탕으로 vanillic acid 함량이 높은 계통 선발
- 프로안토시아니딘 함량 분석 결과를 바탕으로 생리활성 우수 유색미 유전자원 탐색
- 선발된 계통을 대상으로 DPPH 분석법을 이용하여 항산화 활성 검정

○ 기능성 화장품 소재용 유색미 계통 선발
- HPLC 분석과 색도계를 이용하여 유색미 계통의 기능성 지표성분 분석
- 감마오리자놀 고함유 유색미 계통 선발
- 가바 고함유 유색미 계통 선발

- 토코페롤 고함유 유색미 계통 선발
- 선발된 유색미 계통의 DPPH 분석을 이용한 항산화 활성 측정
- 선발된 유색미 계통의 이화학적 성분분석

○ 유색미 유전자원의 생리활성 물질 탐색
- 유색미 용매별 추출 및 용매 극성에 따른 분획물 제조
- 물, 에탄올 등을 이용한 유색미 미강 추출물 제조
- 클로로포름, 에틸아세테이트 등을 이용한 추출물 제조
- 유색미 분획 함유 특수 기능성 성분 분리 및 구조 동정
- 유색미 미강 추출물 함유 주요 활성성분의 분리
- ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR 등을 이용한 분리 화합물의 구조 동정
- HPLC 등을 이용한 유색미 함유 기능성 성분에 대한 정량 분석
- 실리카겔 column을 이용한 유색미 추출 분획의 주요 성분 분획 작성
- GC 및 GC/MS를 이용한 생리활성 성분분석
- Preparative HPLC 등을 이용한 유색미 미강 활성성분의 분리
- 유색미 미강 추출 분획별 항산화 활성 검정

❑ **제 2 세부과제 : 분자생물학적 기술을 활용한 고기능성 함유 벼 계통 육성**

○ 유색미 유전자원에 대한 microsatellite 마커를 활용한 DNA 검정 실시
- 공시유전자원 : 500점(흑미 350계통, 적미 150계통)
- 분석마커 : 다형성이 높으면서 반복재현성이 우수한 20개 활용
- Microsatellite 마커를 활용한 공시 유전자원의 pre-screening 실시

○ 유색미 유전자원에 대한 주요 농업형질 조사
- 종자 특성 : 현미의 종피색, 천립중 등
- 주요농업형질 : 간장, 수장, 천립중, 주당수수, 식물체의 안토시아닌 착색 강도 등

○ 분자마커를 이용한 벼 종피색 관련 유전자원의 탐색
- 농촌진흥청에서 기 개발된 프라이머 및 SSR 마커 활용
- 종피색 및 안토시아닌 발현 관련 분자마커 유전자형과 상관 분석

○ 유색미 유전자원의 분자마커 특성과 주요 농업형질 및 기능성 물질과의 상관 관계 분석
- 컴퓨터 프로그램 활용 군집분석 실시

○ 유색미 유전자원의 계통 선발 및 고정
- 분자생물학적 특성과 주요농업형질 및 기능성 물질을 고려한 유용계통선발
- 계통내 분리가 일어날 경우 약배양에 의한 고정실시

○ 기능성 성분 함량이 높은 계통간 잡종 집단 육성

- 흑미×적미, 흑미×흑미, 적미×적미, 흑미×백미, 적미×백미 등

❑ **제 1 협동과제 : 기능성 화장품 개발을 위한 기능성 유색미 소재 개발**

○ 기능성 소재 효능 검증

- 항산화, 항염증, 항주름, 미백에 관한 *in vitro* 실험을 통해 screening
- 기능성에 따른 유색미 개체 선별에 대한 자료 제공
- 유색미 시료를 세포에 적용시켜 단백질, 유전자 단계에 미치는 영향 평가

○ 기능성에 대한 기준 및 정량적 목표

- 식품의약품안전처에서 고시한 해당 분야 기능성 고시 원료와 효능 비교
- 항산화에 효능이 뛰어난 Ascorbic acid 대비 60% 효능
- 항노화(주름) 기능성 고시원료인 아데노신, 레티놀 등의 효능 대비 60%
- 미백 기능성 고시원료인 나이아신아마이드의 효능 대비 60%

○ 유색미 소재의 안전성 평가

- 유색미 소재의 사람 피부 세포에 대한 안전성 평가
- 유색미 소재를 화장품에 적용 가능한 정도에 대한 실험
- 개발된 유색미 화장품의 사람 피부 세포에 대한 안정성 평가

❑ **제 2 협동과제 : 유색미를 활용한 기능성 화장품 개발**

○ 국내외 제품 개발 현황 및 소비자 제품 선택 패턴 조사

- 피부 타입별 또는 계절에 따른 다양한 제품군에 대한 시장조사
- 유색미를 활용한 제품 개발 시 소비자들에게 어필 할 수 있는 특정 활성성분 조사

○ 제형 개발

- 연령층 및 개발 제품의 시장의 요구에 따른 다양한 제형 개발
- 제형 특이성 및 색상, 향취, 제품 용기 및 질감에 따른 제형 시안 도출
- 추출물 함유 최적 조건에 따른 안정성 시험 및 연구실내 대향 생산 예비 시험 진행

○ 기능성 화장품 제형 개발 연구

- 원료의 제형화 기술개발
- 원료의 특성에 따른 제형 개발
- 제형화 원료의 적용방법 연구
- 유색미 추출물과 유효성분을 이용한 화장품 제형에 대한 안정성 검증
- Liposome, Nano Emulsion(D-phase Emulsion, PIT Emulsion 등), Multiple Emulsion, Pickering Emulsion 등을 이용한 제품의 안정성, 기능성 확보

○ ICID 국제화장품원료집 화장품원료 등재

○ 개발 제품의 제형 안정성 및 피부안전성 측정

- 온도별 경시적 물성변화 안정성 관찰 ; 시제품을 4, 25, 45 ℃에서 각각 3개월 동안 보관하면서 1일차, 3일차, 5일차, 7일차, 14일차, 28일차, 56일차, 84일차까지 온도별 안정성(외관, 향취, 하이드로겔 상변화, 유효성분 액상 pH 및 점도 등)을 평가함.
- 온도순환(Cycle chamber)에 따른 안정성 시험 ; 개발 시제품을 －10, 0, 25, 45, 25, 0, -10 ℃에서 각각 24시간 보관한 후 이를 1 cycle로 하여 5회 반복 시행하여 온도 순환에 따른 안정성을 평가함.
- 광안정성 시험 ; 마스크 제품은 출시 후 직접 또는 간접적으로 태양광과 형광등 빛에 노출되어 변색되는 등 물리·화학적으로 품질의 특성이 변함. 이를 방지하기 위하여 광안정성 실험을 실시하고, 시험 조건은 마스크가 빛에 노출될 수 있는 조건 반영.
- 공인시험기관을 통한 피부 안전성 시험 ; 피부 자극 유무를 평가하기 위해 피부 안전성 실험인 첩포 시험을 실시함. 피부질환이 없는 실험자에 대해 검증을 진행하고, 쉽게 부착될 수 있도록 고안된 finn chamber on scanpor에 개발 시제품을 넣고 팔 안쪽 부위 또는 등 피부에 24시간~120시간 동안피부에 첩포 후 피부상태를 관찰하여, 무자극으로 판정함.

○ 기능성 고시원료 함량분석 ; 미백-나이아신아마이드(2~5%), 주름개선-아데노신(0.04%)

- 분석 방법은 기능성 화장품 기준 및 시험방법 규정(식약처 고시 제2015-15호) 시험방법에 따라 90-% 이상 HPLC 피크유지시간 일치

○ 시제품 내 중금속 측정 ; 크림의 제품에 한 해 수은 검출 한도 시험검사 실시

○ 시제품 내 미생물 및 병원성균 분석 ; 총 호기성생균수는 영·유아용 제품류 및 눈화장용 제품류의 경우 500 CFU/g 이하, 기타 화장품 경우 1,000 CFU/g 이하이고, 대장균(Escherichia Coli), 녹농균(Pseudomonas aeruginosa), 황색포도상구균(Staphylococcus aureus)은 불검출

- 분석 방법은 화장품 안전기준 등에 관한 규정(식약처 고시 제2014-118호) 내 유통화장품 안전관리 시험방법에 따름.

다. 연차별·세부과제별 연구개발의 목표 및 내용

제 1 세부과제 : 국내 벼 품종 및 유색미 유전자원을 이용한 기능성 물질 탐색

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2015 - 2016	○ 국내외 유전자원을 이용한 고기능성 유색미 계통 선발	○ 유색미 유전자원 : 500점 - 흑미 ; 350점, 적미 ; 150점 ○ 안토시아닌 함량 차이에 따른 계통 선발 ○ 프로안토시아니딘 함량 차이에 따

			른 계통 선발 ○ 플라보노이드 함량 차이에 따른 계통 선발 ○ 페놀성 화합물 함량 차이에 따른 계통 선발 ○ 유색미 추출물에 대한 항산화 활성 검정 ○ 생리활성 우수 유색미 유전자원 탐색
2차년도	2016 - 2017	○ 기능성 화장품 소재용 유색미 계통 선발	○ 안토시아닌 고함유 유색미 계통의 기능성 지표성분 분석 (C3G) ○ 프로안토시아니딘 고함유 유색미 계통의 기능성 지표성분 분석 ○ 플라보노이드 고함유 유색미 계통의 기능성 지표성분 분석 (luteolin) ○ 페놀산 고함유 유색미 계통의 기능성 지표성분 분석 (vanillic acid) ○ 선발된 유색미 계통의 항산화 활성 검정 ○ 선발된 유색미 계통의 가바 및 감마오리자놀 함량 분석
3차년도	2017 - 2018	○ 유색미 유전자원의 생리활성 물질 탐색	○ 유색미 용매별 추출 및 용매 극성에 따른 분획물 제조 ○ 유색미 추출 분획의 주요 성분 분획 작성 ○ 유색미 추출 분획별 항산화 활성 검정 ○ 유색미 생리활성 분획에 대한 물질 분리 ○ 유색미 분획 함유 특수 기능성 성분 분리 및 구조 동정 ○ 선발된 유색미 계통의 이화학적 성분분석 ○ 선발된 유색미 계통의 생리활성 물질 분석(토코페롤, 토코드리에놀)

제 2 세부과제 : 분자생물학적 기술을 활용한 고기능성 함유 벼 계통 육성

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2015 - 2016	○유색미 유전자원에 분자마커 검정	○ 공시 유전자원 : 500점 - 흑미 ; 350점, 적미 ; 250점 ○ 분석방법 : SSR 분석법 활용 - 다형성 정도가 높은 15개 이상 활용 (HvSSR11-28, RM8085, RM72 등) ○ 자동염기서열분석기(ABI3730XL)와 GeneMapper 프로그램을 활용한 분석 실시 ○ PowerMarker 등 컴퓨터프로그램을 활용한 군집 분석
		○ 유색미 유전자원의 주요 농업 형질 조사	○ 조사형질 - 식물체 : 간장, 수장, 주당수수, 식물체 부위 및 영의 안토시아닌 착색 정도 - 종자 : 천립중, 현미종피색, 종자내부의 안토시아닌 착색 정도 ○ 유색미 유전자원의 고정이 높은 계통 **→ 제1협동 과제 제공**
2차년도	2016 - 2017	○ 현미 종피색을 판별하는 프라이머 및 흑미 선별용 프라이머를 이용한 유전자원 선발 효율성 탐색	○ 농촌진흥청에서 개발된 현미 종피색을 판별하는 프라이머 및 흑미 선별용 프라이머를 활용 ○ 종피색 및 안토시아닌 발현 관련 분자마커 유전자형과 상관 분석
		○ 유색미 유전자원의 분자마커 특성과 주요 농업형질 및 기능성 물질과의 상관 관계 분석	○ 컴퓨터 프로그램 활용 군집분석 실시
		○ 유색미 유전자원의 계통 선발 및 고정	○ 분자생물학적 특성과 주요농업형질 및 기능성 물질을 고려한 유용계통선발 **→ 제1협동 과제 제공** ○ 계통내 분리가 일어날 경우 약배양에 의한 고정실시
		○ 기능성 성분 함량이 높은 계통간 잡종 집단 육성	○ 흑미×적미, 흑미×흑미, 적미×적미, 흑미×백미, 적미×백미 등에 대한 F1 양성
3차년도	2017 - 2018	○ 분자마커를 이용한 벼 종피색 관련 유전자원의 선발 효율성 탐색	○ 기 분석된 결과의 반복재현성 검정 및 효율성 비교분석 ○ DNA 검정 및 기능성 물질분석 결과와 상관관계 분석
		○ 유색미 유전자원의 선발 및 종자 증식	○ 분자생물학적 특성과 주요농업형질 및 기능성 물질을 고려한 유용계통선발 **→ 제1협동 과제 제공** ○ 계통내 분리가 일어날 경우 약배양에 의한 고정실시
		○ 기능성 성분 함량이 높은 계통간 잡종 집단 육성	○ 흑미×적미, 흑미×흑미, 적미×적미, 흑미×백미, 적미×백미 등에 대한 F1에 대한 세대진전

제 1 협동과제 : 기능성 화장품 개발을 위한 기능성 유색미 소재 개발

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2015 - 2016	○ 유색미 개체 중 기능성이 뛰어난 개체 선발	○ 항산화 활성평가 - DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능, SOD 유사활성능, H_2O_2 소거능, 환원력 등 실험진행 ○ 미백 활성평가 - Tyrosinase from mushroom 억제 실험 진행 ○ 주름 억제 활성 평가 - Elastase 억제 실험, Collagenase 억제 실험 진행 ○ Gen5 등 컴퓨터프로그램을 활용한 통계적 분석
		○ 선발된 유색미 개체를 사람의 세포에 적용하여 유효성 평가	○ 인간의 피부세포활용 - Human Keratinocyte Cell, Human Normal Fibroblast Cell등을 활용 ○ 물질의 세포독성 평가 - MTT법 이용 ○ 항산화 활성평가 - DCF법을 이용한 세포 형광분석
2차년도	2016 - 2017	○ 선발된 유색미 개체를 사람의 세포에 적용하여 단백질 발현량 측정	○ 인간의 피부세포활용 - Human Keratinocyte Cell, Human Normal Fibroblast Cell등을 활용 ○ 항산화, 항염증, 미백, 주름 관련 단백질 발현 측정 - Western Blot법을 이용한 MMPs, Catalase, iNOS, COX-2 등의 발현량 측정
		○ 유색미가 미치는 분자생물학적 분석	○ 유색미를 적용시켜 유전적 영향 분석 - RT-PCR, RealTime PCR 등을 이용하여 DNA 단계에 유색미가 미치는 영향 분석
3차년도	2017 - 2018	○ 유색미가 미치는 분자생물학적 분석	○ 유색미를 적용시켜 유전적 영향 분석 - RT-PCR, RealTime PCR 등을 이용하여 DNA 단계에 유색미가 미치는 영향 분석

제 2 협동과제 : 유색미를 활용한 기능성 화장품 개발

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2015 - 2016	❍유색미를 활용한 화장품 제형 안정성 연구	❍ 시장 분석 및 판매 타켓설정 (기능별 또는 연령대별) ❍ 제품 기능별 8종 라인업 (폼클렌징, 토너, 에센스, 에멀젼, 아이크림 등) ❍ 유색미의 특정 기능성에 맞는 기능성 화장품 연구 ❍ 다양한 유화법을 이용한 유색미의 기능성 물질 안정화와 피부 침투성을 돕기 위한 제형개발 - Liposome, Nano Emulsion (D-phase Emulsion, PIT Emulsion 등), Multiple Emulsion, Pickering Emulsion 등을 이용하여 개발 ❍ 유색미의 기능성 물질을 제형화하여 시제품 개발
		❍추출물 소재 제형 적용 가능성 분석 (향취, 색상)	❍ 제형 내 최적조건 설정 (추출물 유효농도) ❍ 방부시험을 통한 최적조건의 제형 개발 ❍ 사용감 개선(발림성, 향)
2차년도	2016 - 2017	❍ 화장품 제형 안정성 측정 (물성변화 측정)	❍ pH 안정성 ❍ Viscosity 점도안정성 ❍ 온도별 안정성 측정 (Cycle, 3℃, 25℃, 37℃, 45℃) - 온도 Cycle에 변화를 주어 온도의 변화에 따른 유화의 불안정성 확인 ❍ 광안정성 측정 ❍ 미생물 시험(세균, 진균)
		❍ 제품 시험평가/피부 안전성 시험 (공인인증 DATA 확보)	❍ 공인 시험기관 기능성 평가 (주름, 미백 활성 평가) ❍ 첩포 시험을 통한 피부 안전성 테스트
3차년도	2017 - 2018	❍ 시제품화	❍ M.O.Q 적용 제품공정화 ❍ 온라인을 통한 제품(선)판매 소비자 패턴 분석 ❍ 제품 대량생산 공정화
		❍ 제품 용기 및 박스디자인 ❍ 제품 홍보; 박람회	❍ 기능별 특성에 따른 용기 설정 ❍ 용기 디자인(색상, 폰트디자인 등) ❍ 단상자 디자인

제 3 절. 평가의 착안점 및 기준

년도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 척도
1차년도 (2016년)	○ 국내외 유전자원을 이용한 고기능성 유색미 계통 선발	25%	- 안토시아닌, 프로안토시아니딘, 플라보노이드 및 페놀성 화합물 함량 차이에 따른 계통선발 - 유색미 추출물의 항산화 활성 검정 - 생리활성 우수 유색미 유전자원 탐색
	○ 유색미 유전자원에 분자마커 검정 ○ 유색미 유전자원에 대한 주요 농업형질 조사	25%	- 다형성 정도가 높은 15개 이상 SSR marker을 (HvSSR11-28, RM8085, RM72 등) 활용하여 검정 - 주요 농업형질 조사 항목을 식물체 및 종자별로 형질조사
	○ 유색미 개체 중 기능성이 뛰어난 개체 선발 ○ 선발된 유색미 개체를 사람의 세포에 적용하여 유효성 평가	25%	- 항산화 활성평가 - 미백 활성평가 - 주름 억제 활성 평가 - 통계분석 - 독성평가
	○ 유색미를 활용한 화장품 제형 안정성 연구 ○ 추출물 소재 제형 적용 가능성 분석 (향취, 색상)	25%	- 시장 분석 및 판매 타켓 설정 및 유색미의 특정 기능성에 맞는 기능성 화장품 연구 - 다양한 유화법을 이용한 유색미의 기능성 물질 안정화와 피부 침투성을 돕기 위한 제형 개발 - 제형 내 최적조건 설정 및 방부시험을 통한 최적조건의 제형 개발
2차년도 (2017년)	○ 기능성 화장품 소재용 유색미 계통 선발	25%	- 안토시아닌, 프로안토시아니딘, 플라보노이드, 페놀산 고함유 유색미 계통의 기능성 지표성분 분석 - 선발된 유색미 계통의 항산화 활성, 가바 및 감마오리자놀 함량 분석
	○ 분자마커를 이용한 벼 종피색 관련 유전자원의 탐색 ○ 유색미 유전자원의 분자마커 특성과 주요 농업형질 및 기능성 물질과의 상관 관계 분석 ○ 유색미 유전자원의 계통 선발 및 고정 ○ 기능성 성분 함량이 높은 계통간 잡종 집단 육성	25%	- 농촌진흥청에서 개발된 현미 종피색을 판별하는 프라이머 및 흑미 선별용 프라이머를 활용하여 유전자원 탐색 - 종피색 및 안토시아닌 발현 관련 분자마커 유전자형과 상관 분석 - 분자생물학적 특성과 주요농업형질을 고려한 유용계통 선발 - 흑미×적미, 흑미×흑미, 적미×적미, 흑미×백미, 적미×백미 등에 대한 F1 양성
	○ 선발된 유색미 개체를 사람의 세포에 적용하여 단백질 발현량 측정 ○ 유색미가 미치는 분자생물학적 분석	25%	- 인간의 피부세포활용한 단백질 발현량 측정 - 항산화, 항염증, 미백, 주름 관련 단백질 발현 측정
	○ 화장품 제형 안정성 측정	25%	- pH 안정성, Viscosity 점도안정성, 온도별

	(물성변화 측정) ○ 제품 시험평가/피부 안전성 시험 (공인인증 DATA 확보)		안정성 측정 및 광안정성 측정 - 미생물 시험(세균, 진균) - 공인 시험기관 기능성 평가 (주름, 미백 활성 평가) - 첩포 시험을 통한 피부 안전성 테스트
3차년도 (2018년)	○ 유색미 유전자원의 생리활성 물질 탐색	25%	- 유색미 용매별 추출 및 용매 극성에 따른 분획물 제조 및 주요 성분 분획 작성 - 유색미 추출 분획별 항산화 활성 검정 - 유색미 생리활성 분획에 대한 물질 분리 - 유색미 분획 함유 특수 기능성 성분 분리 및 구조 동정 - 선발된 유색미 계통의 이화학적 성분분석 - 선발된 유색미 계통의 생리활성 물질 분석
	○ 분자마커를 이용한 벼 종피색 관련 유전자원의 선발 효율성 탐색 ○ 유색미 유전자원의 선발 및 종자증식 ○ 기능성 성분 함량이 높은 계통간 잡종 집단 육성	25%	- 반복재현성 검정 및 효율성 비교분석 - 분자생물학적 특성과 주요농업형질 및 기능성 물질을 고려한 유용계통선발 - 흑미×적미, 흑미×흑미, 적미×적미, 흑미×백미, 적미×백미 등에 대한 F1에 대한 세대진전
	○ 유색미가 미치는 분자생물학적 분석	25%	- 유색미를 적용시켜 유전적 영향 분석
	○ 시제품화 ○ 제품 용기 및 박스디자인 ○ 제품 홍보; 박람회	25%	- M.O.Q 적용 제품공정화 - 온라인을 통한 제품(선)판매 소비자 패턴 분석 - 제품 대량생산 공정화 - 기능별 특성에 따른 용기 설정 - 용기 디자인(색상, 폰트디자인 등) - 단상자 디자인

제 2 장. 국내외 기술개발 현황

제 1 절. 국내 생산 및 시장 현황

국내 화장품 원료시장은 ’09년 4000억원 규모를 넘어선 이후 ’13년 약 6,320억원으로 화장품 시장과 동반성장 하고 있는 실정이다. 국내 화장품 수출은 2014년 기준 수입이 14억불, 수출이 19억불로 조사되었으며 중국, 동남아 등지에서 수출량은 점차 증가 추세에 있다. 국내 기능성 화장품 시장 규모는 ’05년 6,000억원 규모에서 2013년 2조 5,600억원으로 급격히 증가하고 있으며 국내 화장품 생산금액의 약 32%의 비중을 차지할 정도로 중요성이 증대되고 있으며, 생활 수준의 향상, 노령화 사회 가속화로 인해 연평균 20%이상의 성장세가 당분간 지속될 것으로 전망이며 그 개발 원료 물질도 **천연식물성 유기농 물질**을 선호하고 있는 것으로 알려져 있다.

제 2 절. 국외 제품생산 및 시장 현황

2013년 세계 화장품 시장규모는 2,495억 달러로 전년 대비 3.9% 증가함. 이러한 경향은 향후에도 지속될 것으로 추정되며 2018년에는 3,089억 달러에 이를 것으로 전망됨. 가장 큰 시장을 형성한 나라는 미국으로 379억 달러로 전체 시장에서 15.2%를 차지하고 그 다음은 중국(243억 달러), 일본(233억 달러) 순으로 나타났다 (Datamonitor Personal Care Market Data, 2014 Oct). 화장품 유형별 시장 규모는 스킨케어가 802억 달러로 전체 시장중 31%를 차지하고 있으며 스킨케어중에서 페이셜 케어 부문이 약 531억 달러로 전체시장의 20.6%를 점유하고 있으며, 유럽과 미국을 중심으로 치유개념이 도입된 고기능성 화장품인 코슈메슈티컬은 1990년대 중반부터 연평균 20%이상 성장하면서 안티에이징, 자외선차단, 미백, 여드름 치료 등 여러 가지 화장품이 개발되어 유통되고 있다.

제 3 장. 연구수행 내용 및 결과

제 1 절. 연구수행 내용 및 방법

년도	연 구 범 위	연구수행방법 (이론적・실험적 접근방법)	구체적인 내용
1차년도 (2016)	국내외 유전자원을 이용한 고기능성 유색미 계통 선발	○유색미 유전자원 548점에 대하여 기능성물질 분석을 실시하여 고기능성 계통을 선발 ○항산화 활성이 우수한 계통을 선발하여 기능성 화장품의 재료식물 제공	○ 유색미 유전자원 : 548점 ○ 안토시아닌, 프로안토시아니딘, 플라보노이드, 페놀성 화합물의 함량 분석 ○ DPPH 분석을 이용한 항산화 활성 검정
	유색미 유전자원에 대한 분자마커 검정	○SSR 마커를 이용하여 유색미 유전자원 548점에 대하여 분자마커 분석을 실시하여 다형성 정도를 조사하고 대립유전자를 근거로 유전자원간 유연관계 분석 실시	○공시 유전자원 : 548점 ○다형성 정도가 높은 16개 이상 활용 ○ 자동염기서열분석기(ABI3730XL)와 GeneMapper 프로그램을 활용한 대립유전자 크기 분석 ○PIC(Anderson et al.1993) 값 산출 ○NTSYSpc2.01b를 활용하여 Jaccard 방법에 의해 유전적 유사 값 산출후 군집분석 실시
	유색미 유전자원의 주요 농업 형질 조사	○ 유색미 유전자원을 주요 농업적 형질 및 종자 특성관련 형질을 조사하여 제반 형질이 우수한 계통을 선발하여 기능성 화장품의 재료식물 제공	○ 조사형질 - 식물체 : 출수기, 간장, 수장, 주당수수, 식물체 부위 및 영의 안토시아닌 착색 정도 - 종자 : 천립중, 현미종피색, 종자내부의 안토시아닌 착색 정도
	유색미 개체 중 기능성이 뛰어난 개체 선발	○ 유색미 유전자원중 기능성이 뛰어난 개체를 선발하기 위하여 유색미 추출물의 항산화능, 미백효과, 주름억제능 분석 실시 ○ 유산균을 이용한 유색미 발효를 통하여 추출물의 제조 및 분석 실시	○ Electron donating ability assay ○ ABTS radical scavenging activity ○ Superoxide dismutase like assay ○ Hydrogen peroxide scavenging assay ○ Reducing power assay ○ Tyrosinase inhibition activity assay ○ Elastase inhibition activitiy assay ○ Collagenase inhibition activity assay ○ 유산균을 이용한 유색미의 발효

			- 유산균의 선정과 배양 및 접종 - 최적화된 추출물 조건의 발효
	선발된 개체를 사람의 세포에 적용하여 유효성 평가	○ 선발된 개체를 사람의 세포에 적용하여 유효성 평가를 하기 위하여 MTT assay, 세포내 ROS 분석 실시	○ MTT assay ○ 세포내 ROS의 DCF-DA에 의한 spectrofluorimetry 분석
	유색미를 활용한 화장품 제형 안정성 연구	○ 시장 분석 및 판매 타켓 설정 ○ 제품 기능별 8종 라인업 ○ 유색미의 특정 기능성에 맞는 기능성 화장품 연구 ○ 다양한 유화법을 이용한 유색미의 기능성 물질 안정화와 피부 침투성을 돕기 위한 제형개발 - Emulsion 등을 이용하여 개발 ○ 유색미의 기능성 물질을 제형화하여 시제품 개발	○ 2016년 기초,색조 트랜드 분석 ○ 제품 4종 선정 ; 토너, 에센스,에멀전, 크림 ○ 기능성화장품 가능성 분석 ○ 저온유화법 이용 제현 안정화 - Toner, Essence, Lotion, Cream formulation - 적정 온도 및 pH 조거누 구명
	○추출물 소재 제형 적용 가능성 분석 (향취, 색상)	○ 제형 내 최적조건 설정 (추출물 유효농도) ○ 방부시험을 통한 최적조건의 제형 개발 ○ 사용감 개선(발림성, 향)	○ 추출물 소재 제형 적용가능성 분석(향취,색상) ; 0.1%, 조생흑찰 ○ 방부시험 ; 미생물 확인 시험 ○ 사용감 개선 ; 흡수성 및 발림, 향취 등
2차년도 (2017)	국내외 유전자원을 이용한 고기능성 유색미 계통 선발	○항산화 활성이 우수한 계통을 선발하여 기능성 화장품의 재료식물 제공 ○유색미 유전자원 548점 중에서 종자 발아가 양호한 517점 중 2016년에 분석 완료한 379점을 제외하고 수집종을 포함한 남은 149점 종자를 이용하여 안토시아닌, 프로안토시아니딘, 플라보노이드, 페놀성 화합물의 함량 분석 ○DPPH 분석을 이용한 항산화 활성 검정	○ 유색미 유전자원 : 528점 흑미 ; 344점, 적미 ; 173점, 수집종 ; 11점 ○ 안토시아닌 고함유 유색미 계통의 안토시아닌 함량 분석 ○ 프로안토시아니딘 함량 차이에 따른 계통 선발 ○ 플라보노이드 함량 차이에 따른 계통 선발 ○ 페놀성 화합물 함량 차이에 따른 계통 선발 ○ 유색미 추출물에 대한 항산화 활성 검정 ○ 생리활성 우수 유색미 유전자원 탐색
	안토시아닌 고함유 유색미 계통의 기능성 지표성분 분석(C3G)	○ 유색미 유전자원 : 38점 흑미 ; 38 적미 ; 22점 수집종 ; 2점 ○안토시아닌 지표성분인 cyanidin-3-0-glucoside chloride (C3G)를 이용한 HPLC 분석	○ 유색미 유전자원 38점의 미강 추출물을 이용하여 HPLC 분석한 결과 대조구인 동진벼 미강 추출물에서는 C3G가 검출되지 않았고, C3G 함량이 60mg/g 보다 높은 유색미 계통 선발 실시
	프로안토시아니딘 고함유 유색미 계통의 기능성 지표성분 분석	○유색미 미강 추출물 38점에 대한 프로안토시아니딘 함량 분석	○ 유색미 유전자원 38점의 미강 추출물을 이용하여 프로안토시아닌 함량을 분석한 결과, 대조구로 이용한 동진벼에서는 0.17mg/g으로 나타났

			으며, 프로안토시아니딘 함량이 대조구 보다 20배 이상 높은 유색미 계통 선발
	플라보노이드 고함유 유색미 계통의 기능성 지표성분 분석(Luteolin)	○플라보노이드의 지표성분 Luteolin-7-0-glucoside를 이용한 HPLC 분석	○ 유색미 유전자원 38점의 미강 추출물을 이용하여 HPLC 분석한 결과 대조구인 동진벼 미강 추출물에서는 Luteolin이 검출되지 않았고, Luteolin이 55mg/g 보다 높은 유색미 계통 선발 실시
	페놀산 고함유 유색미 계통의 기능성 지표성분 분석	○유색미 미강 추출물 62점에 대한 total phenolic compound 함량 분석	○ 유색미 유전자원 62점의 미강 추출물을 이용하여 total phenolic compound 함량을 분석한 결과, 대조구로 이용한 동진벼에서는 3.623mg/g으로 나타났으며, total phenolic compound 함량이 대조구 보다 30배 이상 높은 유색미 계통 선발 실시
	선발된 유색미 계통의 항산화 활성 검정	○유색미 미강 추출물 62점에 대한 DPPH 분석을 이용한 생리활성 우수 유색미 유전자원 선발	○ 유색미 유전자원 62점의 미강 추출물을 이용하여 항산화 활성 검정결과, 대조구로 이용한 동진벼에서는 61.56%으로 나타났으며, 항산화 활성이 85% 보다 높은 활성을 가지는 유색미 계통 선발 실시
	선발된 유색미 계통의 감마오리자놀 함량 분석	○유색미 미강 추출물 62점에 대한 감마오리자놀 함량 분석 ○ 생리활성물질이 우수한 흑미와 적미 계통을 선발하여 GABA 함량 분석	○ 유색미 유전자원 38점의 미강 추출물을 이용하여 프로안토시아닌 함량을 분석한 결과, 대조구로 이용한 동진벼에서는 12.72%으로 나타났으며, 감마오리자놀 함량이 대조구 보다 2배 이상 높은 활성을 가지는 유색미 계통 선발 실시 ○ 생리활성 물질이 다량 함유한 흑미와 적미 계통을 선발하여 가바함량을 분석한 결과, 대조구로 이용한 동진벼에서는 8.07mg/100g으로 나타났으며 흑미의 경우 3배이상 높은 활성을 보였고, 적미의 경우 1.5배 높은 활성을 가지는 것으로 확인됨
	유색미 유전자원에 대한 분자마커 검정	○SSR 마커를 이용하여 유색미 유전자원 548점에 대하여 분자마커 분석을 실시하여 대립유전자를 근거로 유전자원간 군집분석 및 유색미 계통 구조 집단 분석	○공시 유전자원 : 517점 ○다형성 정도가 높은 16개 활용 ○군집 분석 : MEGA7.0 (Tamura et al., 2013) ○Population genetic structure : Structure 2.3.4(Pritchard et al., 2000)

	벼 흑미 및 적미 종피색 선별용 프라이머를 활용한 벼 계통 선발	○농촌진흥청 개발 흑미 및 적미 선별용 프라이머 활용	○ 유용 기능성 성분 함량에 따른 특이적 PCR 증폭산물이 검출되지 않음 ○ 유색미 유전자원의 SSR 마커 검정결과와 형태적 특성을 융복합적으로 활용하여 유색미 계통선발 실시
	유색미 유전자원의 계통선발	○공시 유전자원 -흑미: 344계통 -적미: 173계통 ○주요 농업형질조사 -출수기, 간장, 수장, 천립중 -안토시아닌, 프로안토시아니딘 함량 조사	○동진과 주요 농업형질이 유사하고 분자생물학적 특성이 뚜렷하게 구분되면서 기능성 성분함량이 높은 흑미 41계통, 적미 15계통 선발 및 종자 증식 실시
	기능성 성분 함량이 높은 계통간 잡종집단 육성	○인공교배에 의한 F1 양성 -흑미/백미, 적미/백미	○흑미/백미 잡종집단 ; 4조합 (86/동진, 121/동진, 235/동진, 300/동진) 116립 F1 양성 ○적미/백미 잡종집단 ; 2조합 (485/동진, 491/동진) 124립 F1 양성
	유색미 추출물의 세포 내 항주름 활성 평가	○ MTT assay ○ Western blot ○ RT PCR ○ Enzyme assay	○MTT assay : 세포독성 측정은 Carmichael의 방법에 따라 측정 ○ Western Blot Analysis : 세포를 100mm dish에 1×10^5 cells/ml 농도로 접종하여 Western imaging system기기로 현상 ○ RT-PCR : High Pure RNA Isolation Kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)를 사용하여 발광 강도를 확인하여, Molecular Analyst 소프트웨어가 있는 ATTO 기계를 사용하여 측정 ○ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) : HaCaT cell을 배양한 배지에 분비 된 MMP-1, MMP-2, MMP-9를 Sigma Chemical Co. (St, Louis, MO, USA)로부터 구입 한 민감한 ELISA 검정 키트를 사용하여 정량화
	유색미 추출물의 세포 내 항산화 활성 평가	○ Electron donating ability assay ○ ABTS+ radical scavenging assay ○ MTT assay ○ Western blot	○ Electron donating abilitiy는 Blois[1958]의 방법으로 측정 ○ $ABTS^+$ radical cation decolorization의 측정은 Pellegrin 등의 방법에 의해 측정 ○ MTT assay : 세포독성 측정은 Carmichael의 방법에 따라 측정

			○ Western Blot Analysis : 세포를 100mm dish에 1×10^5 cells/ml 농도로 접종하여 Western imaging system기기로 현상
	유색미에서 분리된 쌀겨 추출물의 항산화능 실험	○ Electron donating ability assay ○ Superoxide dismutase like assay	○ Electron donating abilitiy는 Blois[1958]의 방법으로 측정 ○ SOD 유사활성은 Marklund의 방법에 준하여 측정
	유색미에서 분리된 쌀겨 추출물의 주름 억제능 실험	○ Collagenase inhibition activity assay	○ Collagenase 저해활성은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타냄.
	유색미를 활용한 화장품 제형 안정성 연구	○ 시장 분석 및 판매 타켓 설정 ○ 제품 기능별 8종 라인업 ○ 유색미의 특정 기능성에 맞는 기능성 화장품 연구 ○ 일반 유화법을 이용한 유색미의 기능성 물질 안정화와 피부 침투성을 돕기 위한 제형개발 - Emulsion 등을 이용하여 개발 ○ 유색미의 기능성 물질을 제형화	○ 2017년 기초,색조 트랜드 분석 ○ 제품 4종 선정 ; 폼클렌징, 에센스, 아이크림, 마스크팩- ○ 기능성화장품 가능성 분석 ○ 일반 유화법 - 폼클렌징, 에센스, 아이크림, 마스크팩- - 적정 온도 및 pH , 점도 확인
	추출물 소재 제형 적용 가능성 분석 (향취, 색상)	○ 제형 내 최적조건 설정 (추출물 유효농도) ○ 방부시험을 통한 최적조건의 제형 개발 ○ 용기 적합성. 디자인 시안	○ 유색미 추출물 소재 제형 적용 ; 0.1%, ○ 방부시험 ; 미생물 확인 시험 ○ 용기 적합성 테스트
3차년도 (2018)	유색미 용매별 추출 및 용매 극성에 따른 분획물 제조	○ 유색미 용매별 추출 및 용매 극성에 따른 분획물 제조	○ 안토시아닌 및 안토시아니딘이 높은 흑미와 적미계통을 선발하여 물, hexane, ethlyacetate, butanol 및 chlorform 용매 분획물 제조
	유색미 추출 분획의 주요 성분 분획 작성	○ 유색미 추출 분획의 주요 성분 분획 작성	○ butanol 분획을 이용하여 GC-MS 분석을 통한 주요성분 분획 작성
	유색미 추출 분획별 항산화 활성 검정	○ 유색미 추출 분획별 항산화 활성 검정	○ 유색미 추출 분획별 농도별로 항산화 활성 측정 및 비교분석
	유색미 생리활성 분획에 대한 물질 분리	○ 유색미 생리활성 분획에 대한 물질 분리	○ butanol 분획중 흑미계통에서 다량 함유되어 있는 특정 분획을 분리 정제
	유색미 분획 함유 특수 기능성 성분 분리 및 구조 동정	○ 유색미 분획 함유 특수 기능성 성분 분리 및 구조 동정	○ 특수 기능성 성분으로 예측되는 분획을 분리 정제하여 NRM 분석을 통한 구조 동정 중
	선발된 유색미 계통의 이화학적	○ 선발된 유색미 계통의 이화학적 성분분석	○ 안토시아닌 및 안토시아니딘이 높은 흑미와 적미계통을

	성분분석		이용하여 이화학적 성분 분석 실시
	선발된 유색미 계통의 생리활성 물질 분석	○ 토코페롤 standard를 이용하여 vit.E 정량 분석	○ 토코페롤 standard를 이용하여 유색미 계통의 vit.E 정량 분석 실시
	분자마커를 이용한 벼 종피색 판별 프라이머를 이용한 반복재현성 검정	○ 기 분석한 농촌진흥청 종피색 판별 프라이머를 이용한 반복재현성 검정	○ 기 분석한 결과와 동일하게 농촌진흥청에서 개발된 종피색 판별 프라이머를 이용하여 PCR 분석을 통한 검정 실시
	기능성 물질분석 결과와 상관관계 분석	○ 안토시아닌과 안토시아니딘 함량이 높은 흑미와 적미 계통과 상관관계 분석	○ 안토시아닌과 안토시아니딘 함량이 높은 흑미와 적미 계통 결과를 이용하여 계통간의 상관관계 분석
	분자생물학적 특성과 주요농업형질 및 기능성 물질을 고려한 유용계통 선발	○ 분자생물학적 특성과 주요농업형질 및 기능성 물질을 고려한 우수 계통 선발	○ 안토시아닌, 안토시아니딘 및 항산화활성이 높은 흑미와 적미 계통을 주요농업형질 결과를 고려하여 우수 계통 선발
	기능성 성분 함량이 높은 계통간 집단 육성	○ 흑미×적미, 흑미×흑미, 적미×적미, 흑미×백미, 적미×백미 등에 대한 F1에 대한 세대진전	○ 기능성 성분 함량이 높은 우수 계통간의 교배종의 F1 세대증진 및 증식
	유색미를 적용시켜 유전적 영향 분석	○ 유색미 항염증 분석 ○ 유색미 제형 실험 ○ 리포좀 에센스 안정성 및 안전성 분석 ○ 유색미 생리활성 평가 ○ 미백활성 평가 ○ 유색미 항주름 활성 세포실험	○ MTT assay, No assay, western blot 및 RT-PCR분석을 통한 함영증 분석 ○ 리포좀 제조, 리포좀 에센스 제조 및 리포좀 입자크기 및 분포 분석 ○ 자연광에 대한 JE 및 SRE의 추출물을 이용해 제조된 리포좀의 화학적 및 물리적 변화 관찰 ○ BCOP assay 분석을 이용하여 점막 자극의 평가 ○ EDA, DPPH, ABTS, SOD 및 Hydrogen peroxide assay를 이용한 생리활성 평가 ○ Tyrosinase 및 collagenase 저해율 측정 평가 ○ MTT assay, Cell tyrosinase assay, ROS production rate, MMP-1 저해활성 측정 및 Type-1 procollagen 합성측정
	유색미를 활용한 화장품 제형 안정성 연구	○ 시장 분석 및 판매 타켓설정(기능별 또는 연령대별) ○ 제품 기능별 5종 라인업 (마일드 클렌져, 모이스춰크림,시카젤, SPF50+ PA++++선크림, BB크림- 제형실험 및 용기 적합성 테스트 진행)	○ 2018년 기초·색조 트렌드 분석 ○ 제품 5종 라인업 (마일드 클렌져, 모이스춰크림, 시카젤, SPF50+PA++++선크림, BB크림- 제형실험 및 용기 적합성 테스트 진행)

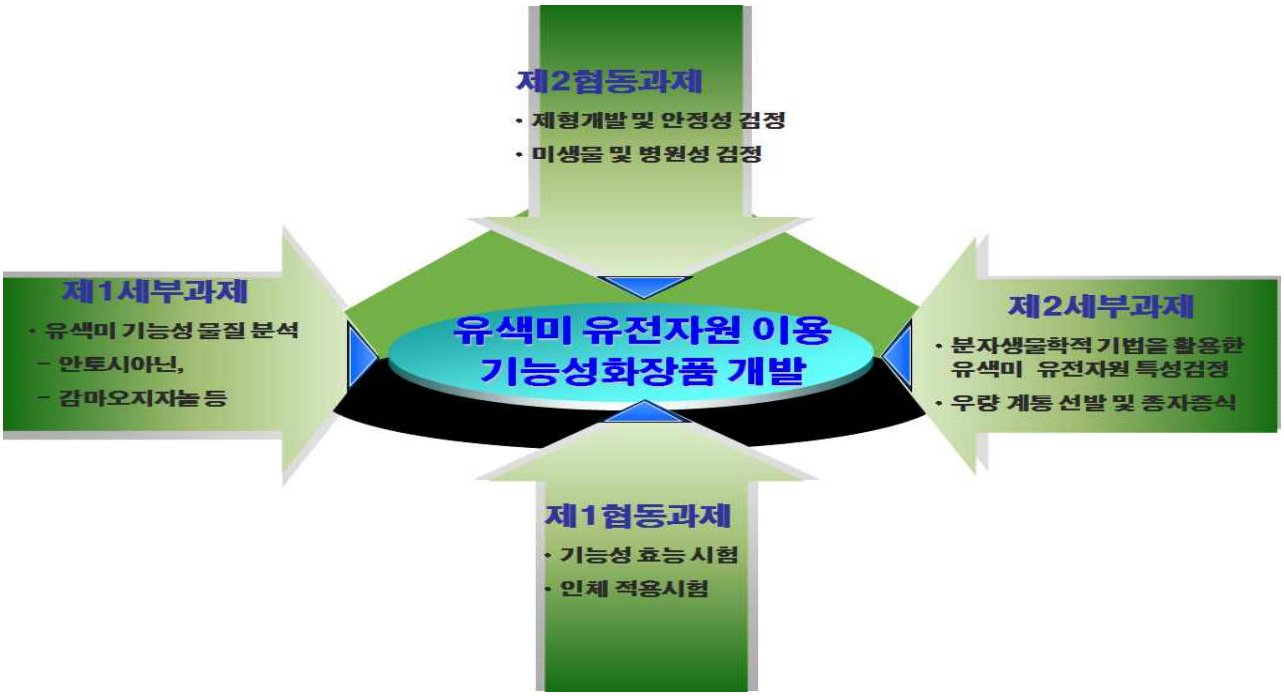
		○ 유색미의 특정 기능성에 맞는 기능성 화장품 연구 ○ 추출물 0.1% 농도를 유지한 유색미의 기능성 물질 안정화와 피부 발림성을 개선한 제형 연구	*** 색조제품 BB 크림 추가 진행** ○ 기능성화장품 - 선크림, BB크림 ○ 제형안정화
	추출물 소재 제형 적용 가능성 분석 (향취, 색상)	○ 제형 내 최적조건 설정 (추출물 유효농도) ○ 방부시험을 통한 최적조건의 제형 개발 ○ 사용감 개선(발림성, 향)	○ 쌀추출물 유효농도; 0.1% ~0.5% ○ 방부시험 Challenge test 전성분 표기상 무방부제 제형 조건 실험 ○ 사용감 개선 : 흡수성 및 발림성, 향취 용기적합성 테스트
	피부 안전성 테스트	○ 공인 시험기관을 통한 피부 첩포 시험 진행	○ 전 제품 미자극으로 피부 안전성확인 됨
	제품 홍보 및 마케팅	○ 해외 박람회/ 전시회 부스참여	○ VANT36.5브랜드 광고 및 유색미추출물 함유 화장품 홍보 ○ 인스타그램, 페이스북 제품 노출

제 2 절. 연구개발 추진 전략

1. 본 과제는 제1, 2세부과제를 담당하는 동아대학교 분자유전공학과 및 생명자원산업학과와 협동연구기관인 대구한의대학교 화장품약리학과와 참여기업인 ㈜튜링겐코리아가 참여하여 과제를 수행하는 것으로 구성되어 있음. 제1세부과제는 벼 유색미 유전자원에 대한 기능성 물질을 분석하고 제2세부과제는 제1세부과제에서 분석한 성분분석 결과와 분자생물학적 기법을 활용하여 주요 농업형질이 우수하면서 기능성물질이 높은 계통을 선발하여 제1협동 과제에 종자 및 식물체를 공급하고 제1,2협동과제는 이를 활용하여 쌀의 기능성물질을 이용하여 화장품을 개발하는 체계로 구성 되어 있다.
2. 제1협동연구 책임자는 화장품클러스터 연합회 회장을 맡고 있기 때문에 화장품 개발과 관련된 다수의 전문가와 정보교류가 가능하고 이와 관련된 연구의 최신동향을 파악할수 있어 연구 목표달성에 큰 어려움이 없을 것으로 사료된다.
3. 주관연구기관은 특수미의 재배 및 품종 개발, 기능성 쌀을 활용한 다양한 시제품 개발에 대한 노하우를 가지고 있는 농촌진흥청 남부작물부 논이용작물과의 관련 연구자들과 세미나 개최 등과 같은 여러 가지 정보 교류 방법을 활용하여 연구성과를 거양시킬 예정이다.

4. 참여기업인 ㈜튜링겐코리아는 쌀파우더를 활용한 특허기술자료 보유 및 피부저자극 베이비 파우더 제품을 개발하였으며 발효공정을 통한 천연색소를 이용한 색조화장품 개발을 통한 기술의 노하우를 보유하고 있으며, 경북지역 내 OEM/ODM 화장품 제조기업으로서 다양한 제품개발 및 온오프라인 매장을 활용하여 소비자와 시장의 화장품 요구사항에 대해 신속한 적용이 가능하므로 신제품/신제형에 대해 매우 빠른 cycle을 보이는 화장품 시장에서 고객의 니즈를 파악하고, 제품에 대한 화장품 개발 기업으로서 역량이 매우 높다.

제 3 절. 연구개발 추진 체계



제 4 절. 연구개발 결과

1. 국내 벼 품종 및 유색미 유전자원을 이용한 기능성 물질 탐색

가. 유색미 유전자원에 대한 기능성 물질 함량 분석

동아대학에서 보유하고 있는 유색미 유전자원 548계통 중 발아가 양호한 517계통과 재배종 11계통을 파종하여 동아대학교 실험포장에서 재배하였고, 528계통의 생리활성 물질 분석을 완료하였다. 추출물의 제조방법은 종자를 파쇄하여 65°C에서 24시간 건조하여 수분을 충분히 제거 하였다. 종자시료 50mg에 1% HCl이 첨가된 80% 메탄올 400ul를 가하여 37°C shaking incubator에서 1시간 처리하여 3회 추출하여 얻어진 추출물을 실험에 사용하였다. 안토시아닌 함량 분석은 530nm에서 흡광도를 측정하여 대조구와 비교하였고, 대조구인 동진벼의 안토시아닌 함량은 0.2mg/g로 나타났다. 유색미 추출물의 안토시아닌 함량의 평균값은 196mg/100g으로 나타나 전반적으로 안토시아닌 함량이 대조구에 비해 유색미에서 높게 나타났고, 특히 198, 206, 214, 206 등의 4계통은 안토시아닌 함량이 500mg/100g 이상의 높은 값을 나타냈다(그림 6).

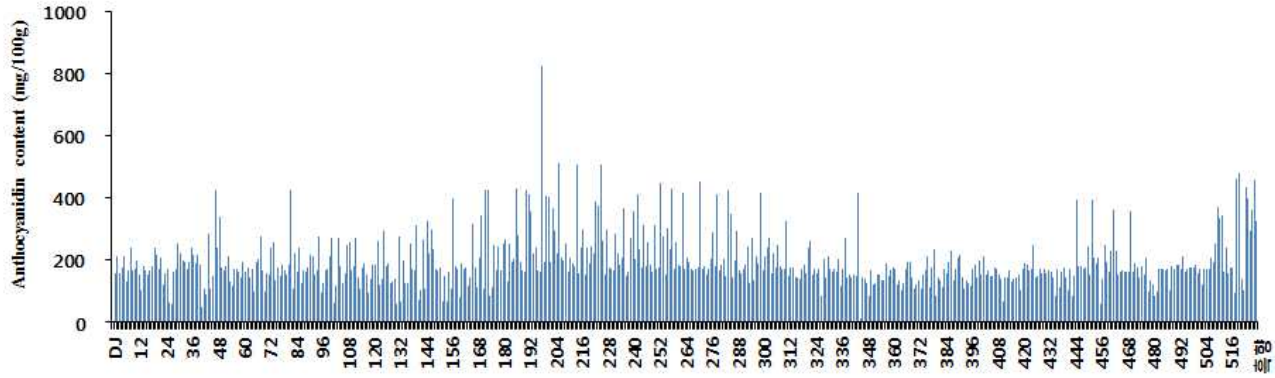


그림 6. 유색미 유전자원의 안토시아닌 함량 분석

플라보노이드 함량 분석은 Davis 방법을 변형하여 측정하였다. 추출물 100ul에 diethylene glycol 1ml과 1N NaOH 10ul을 가하여 37°C에서 1시간 반응 시킨 후 420nm에서 흡광도를 측정하였고, 대조구로 사용한 동진벼 OD값은 6.45로 나타났고, 특히 224, 226, 302, 32, 213 등의 5계통은 플라보노이드 OD값이 88.38 이상의 높은 값을 나타냈다(그림 7).

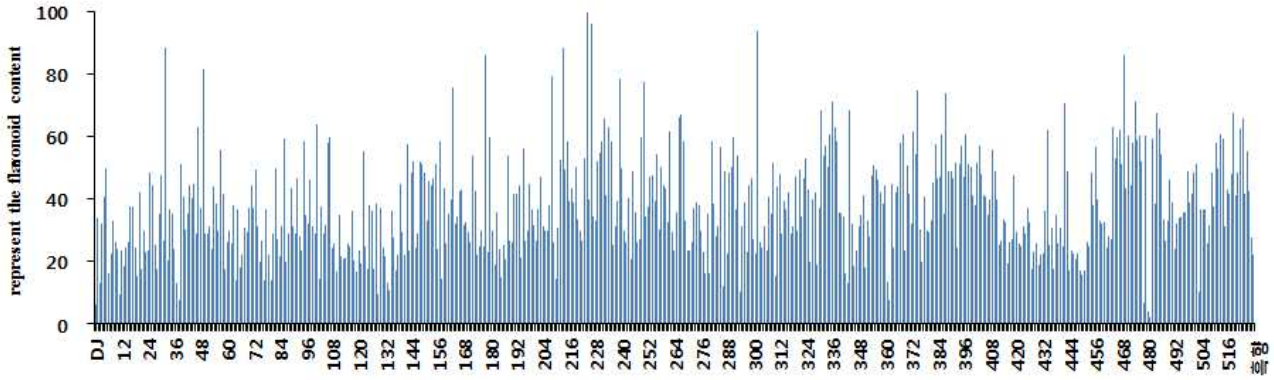


그림 7. 유색미 유전자원의 플라보노이드 함량 분석

페놀성 화합물의 함량 분석은 추출물 10ul에 2% sodium carbonate 용액 200ul을 가한 후 상온에서 5분간 반응시켰다. 물과 1:1 로 희석된 Folin-Ciocalteu 용액 10ul을 가하여 상온에서 30분간 반응시킨 후 750nm에서 흡광도를 측정하였다. Chlorogenic acid (Sigma)용액을 표준물질로 사용하여 standard curve을 작성하여 페놀성 화합물의 함량을 구하였고, 대조구로 사용한 동진벼의 페놀성 화합물의 함량은 3.647mg/g 으로 나타났다. 유색미 추출물의 페놀성 화합물 함량 평균은 14.253mg/g 으로 나타났으며, 특히 186, 198, 330, 420 등 4계통의 페놀성 화합물의 함량은 30mg/g 이상으로 높게 나타났다(그림 8).

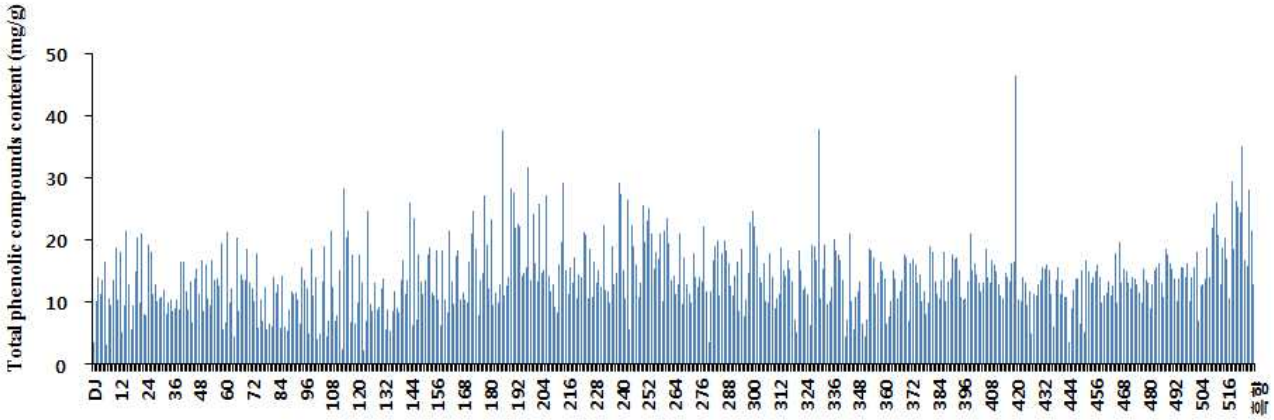


그림 8. 유색미 유전자원의 페놀성 화합물 함량 분석

프로안토시아니딘의 함량 분석은 Vanillin-H_2SO_4 분석방법을 이용하였다. 추출물 40ul에 methanol에 녹인 1% vanillin 용액 100ul와 9M H_2SO_4용액 100ul을 가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 500nm에서 흡광도를 측정하였고, 대조구로 사용한 동진벼의 프로안토시아니딘 함량은 2.84mg/g으로 나타났다. 유색미 추출물의 프로안토시아니딘 함량의 평균값은 284mg/100g로 나타났으며, 특히 402, 442, 478, 487 등 4계통의 프로안토시아니딘의 함량은 380mg/100g 이상으로 높게 나타났다(그림 9).

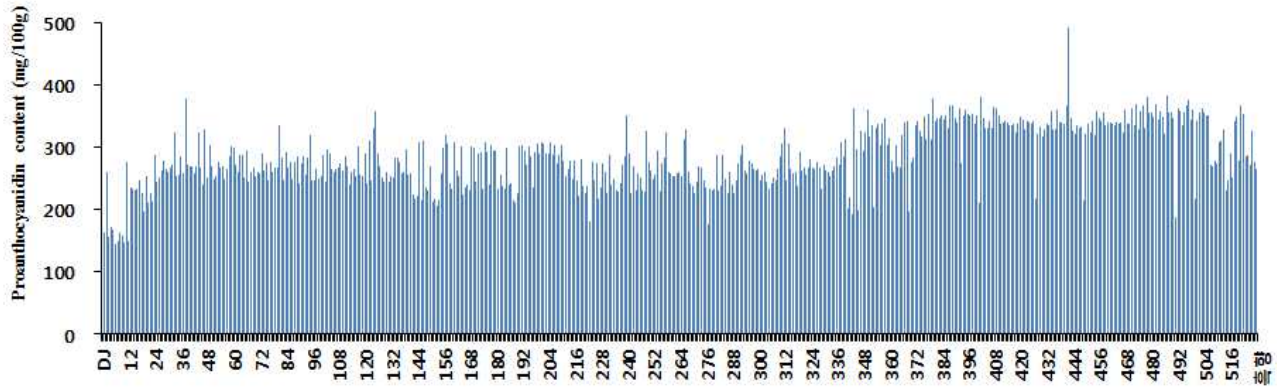


그림 9. 유색미 유전자원의 프로안토시아니딘 함량 분석

생리활성이 우수한 유색미 유전자원을 선발하기 위하여 DPPH분석 방법을 이용하여 항산화 활성을 측정하였다. DPPH (1,1-Dipheyl-2-pricryl hydrazyl) 용액을 methanol에 녹여 0.2mM로 준비하였다. 추출물과 DPPH용액을 1:4의 비율로 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 520nm에서 흡광도를 측정하였고, 대조구로 사용한 동진벼의 항산화활성은 56.26%로 나타났다. 유색미 추출물의 항산화활성은 평균 71.74% 이상으로 높게 나타났다. 특히 254, 283, 464, 466 등 4계통은 90% 이상의 높은 항산화활성을 나타냈다 (그림 10).

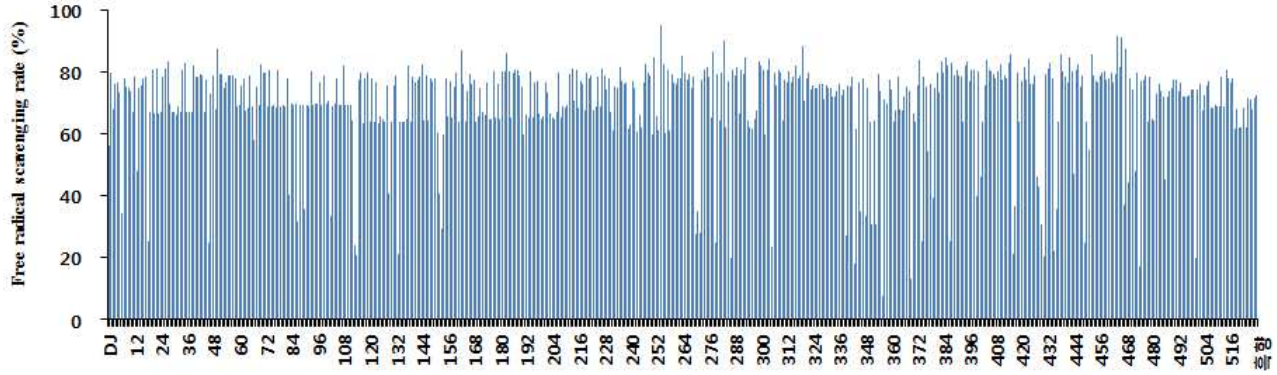


그림 10. 유색미 유전자원의 항산화 활성 측정

나. 안토시아닌 고함유 유색미 계통의 기능성 지표성분 분석

유색미 유전자원의 유효성분 분석 결과를 토대로 동진벼를 대조구로 하여 간장, 수장 및 출수일을 기준으로 기능성물질 함량이 높은 69계통을 실험포장에 전개하였다. 이중 대조구를 포함한 63계통을 대상으로 기능성 지표성분 분석을 실시하였다. 추출물의 제조방법은 현미종자를 실온에서 건조하여 수분을 충분히 제거한 후, 현미기를 이용하여 미강분말을 얻었다. 미강분말 500mg에 1% HCl이 첨가된 80% 메탄올 400ul를 가하여 37°C shaking incubator에서 1시간 처리한 후 상등액을 회수하였고, 이 과정을 3회 반복 추출하여 얻어진 추출물을 실험에 사용하였다. 추출물은 0.45μm syringe filter(RephiLe Bioscience)로 여과하여 시험용액을 준비하였다. 유색미 시험용액의 안토시아닌 성분 분석은 Elite series HPLC(HITACH)로 분석하였다. 분석

column은 Nova-pak C18 column(4.6X250mm, 5uM)을 사용하였고, mobile phase 조건은 acetonitrile : water cotaining 1% formic acid를 93 : 7로 시작하여 60min 까지 35 : 65로 증가시키며 분석하였다. Injection volume은 20ul, flow rate 는 1.0ml/min으로 하여 530nm에서 분석하였다. 안토시아닌 표준시료는 cyanidin-3-0-glucoside chloride(C3G, Chemfaces, wuhan, China)를 사용하였다. 유색미 유전자원의 미강에 함유된 C3G를 HPLC로 분석한 결과 retention time 44.91min에 peak가 검출되었고, 유색미 미강 추출물의 C3G 함량의 평균값은 31mg/g으로 나타나 전반적으로 C3G 함량이 높게 나타났고, 특히 49, 198, 200, 214, 217 및 224의 6계통은 C3G 함량이 60mg/g 이상의 높은 값을 나타냈다(그림 11).

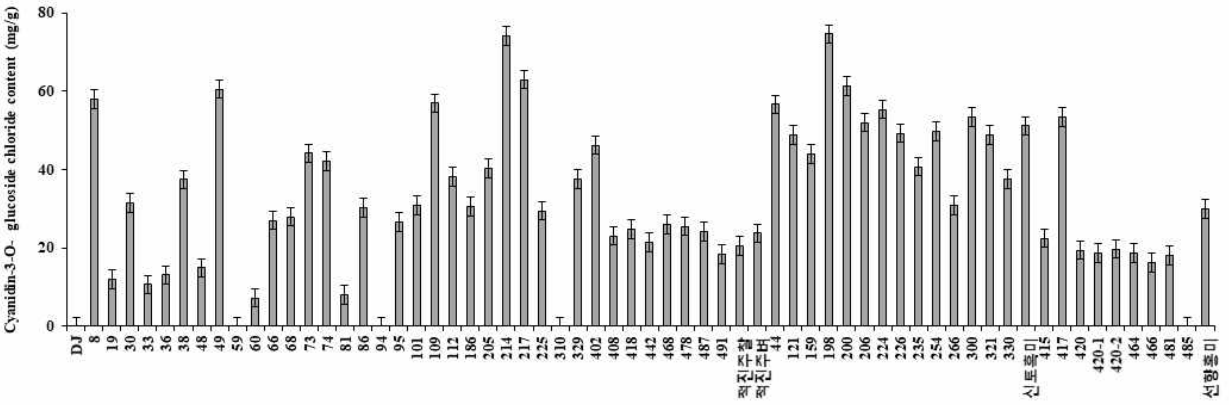


그림 11. 유색미 미강 추출물의 cyanidin-3-0-glucoside chloride 함량 분석

유색미 시험용액의 플라보노이드 성분 분석은 Elite series HPLC(HITACH)로 분석하였다. 분석 column은 Nova-pak C18 column(4.6X250mm, 5uM)을 사용하였고, mobile phase 조건은 acetonitrile : water cotaining 1% formic acid를 90 : 10으로 시작하여 60min 까지 77 : 23으로 증가시키며 분석하였다. Injection volume은 20ul, flow rate 는 1.0ml/min으로 하여 330nm에서 분석하였다. 플라보노이드 표준시료는 Luteolin-7-0-glucoside(Luteolin, Chemfaces, wuhan, China)를 사용하였다. 유색미 유전자원의 미강에 함유된 Luteolin을 HPLC로 분석한 결과 retention time 35.15min에 peak가 검출되었고, 유색미 미강 추출물의 Luteolin 함량의 평균값은 35mg/g으로 나타나 전반적으로 Luteolin 함량이 높게 나타났고, 특히 109, 214, 408, 478 등의 4계통은 Luteolin 함량이 55mg/g 이상의 높은 값을 나타냈다(그림 12).

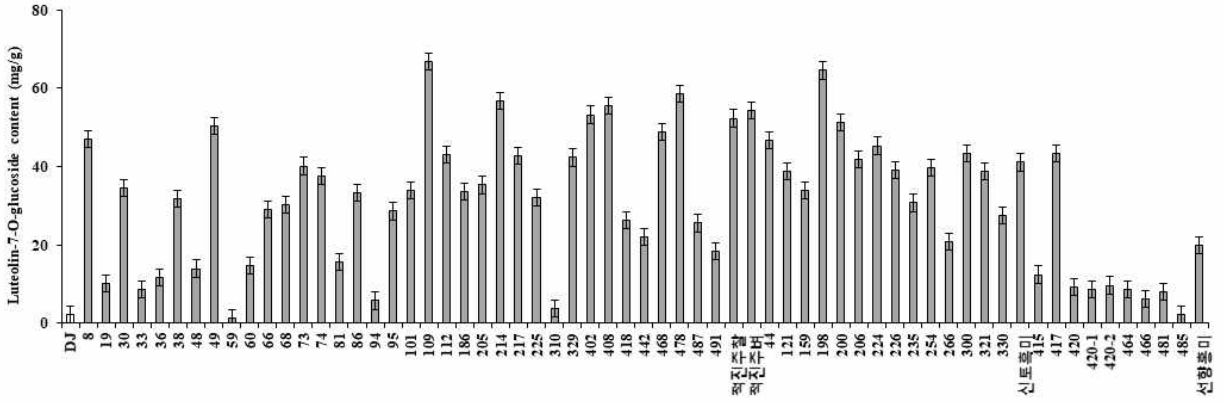


그림 12. 유색미 미강 추출물의 Luteolin 함량 분석

페놀성 화합물의 함량 분석은 추출물 10ul에 2% sodium carbonate 용액 200ul을 가한 후 상온에서 5분간 반응시켰다. 물과 1:1 로 희석된 Folin-Ciocalteu 용액 10ul을 가하여 상온에서 30분간 반응시킨 후 750nm에서 흡광도를 측정하였다. Chlorogenic acid (Sigma)용액을 표준물질로 사용하여 standard curve을 작성하여 페놀성 화합물의 함량을 구하였고, 대조구로 사용한 동진벼의 페놀성 화합물의 함량은 3.623mg/g 으로 나타났다. 유색미 추출물의 페놀성 화합물 함량 평균은 59.807mg/g 으로 나타났으며, 특히 8, 214, 217 등 3계통의 페놀성 화합물의 함량은 95mg/g 이상으로 높게 나타났다(그림 13).

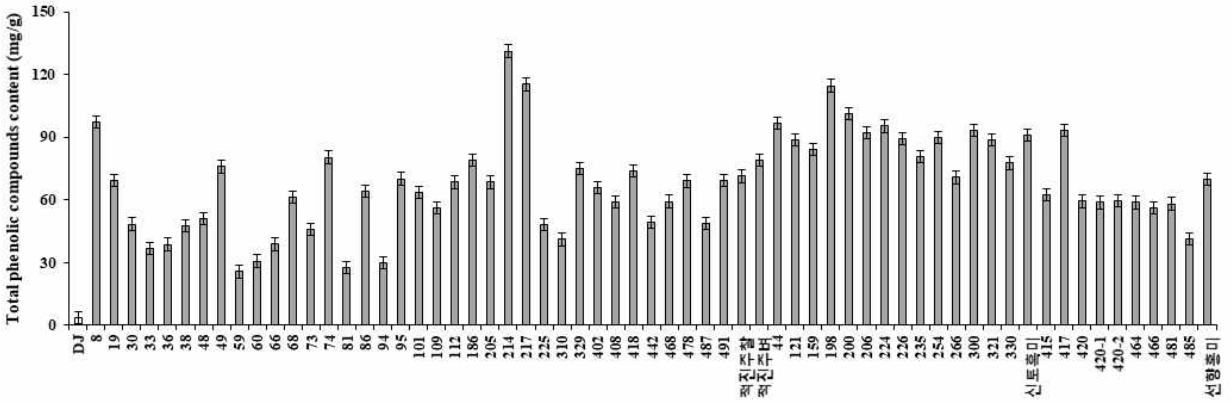


그림 13. 유색미 미강 추출물의 페놀성 화합물 함량 분석

프로안토시아니딘의 함량 분석은 Vanillin-H_2SO_4 분석방법을 이용하였다. 추출물 40ul에 methanol에 녹인 1% vanillin 용액 100ul와 9M H_2SO_4용액 100ul을 가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 500nm에서 흡광도를 측정하였고, 대조구로 사용한 동진벼의 프로안토시아니딘 함량은 0.17mg/g으로 나타났다. 유색미 추출물의 프로안토시아니딘 함량의 평균값은 33.92mg/g로 나타났으며, 특히 420, 442 및 481 3계통의 프로안토시아니딘의 함량은 50mg/g 이상으로 높게 나타났다(그림 14).

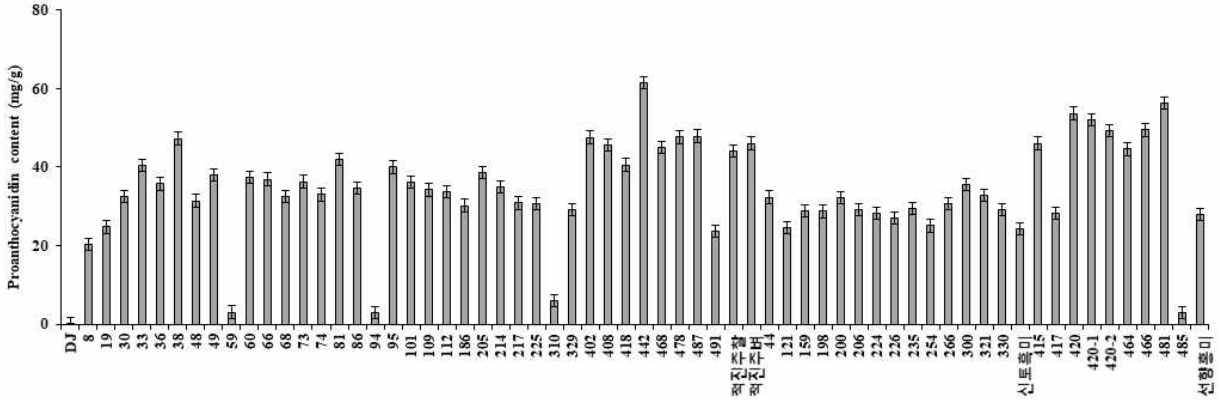


그림 14. 유색미 미강 추출물의 프로안토시아니딘 함량 분석

생리활성이 우수한 유색미 유전자원을 선발하기 위하여 DPPH분석 방법을 이용하여 항산화 활성을 측정하였다. DPPH (1,1-Dipheyl-2-pricryl hydrazyl) 용액을 methanol에 녹여 0.2mM로 준비하였다. 추출물과 DPPH용액을 1:4의 비율로 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 520nm에서 흡광도를 측정하였고, 대조구로 사용한 동진벼의 항산화활성은 61.56%로 나타났다. 유색미 추출물의 항산화활성은 평균 73.69% 이상으로 높게 나타났다. 특히 214, 217, 402, 420, 442, 481 등 6계통은 85% 이상의 높은 항산화활성을 나타냈다 (그림 15).

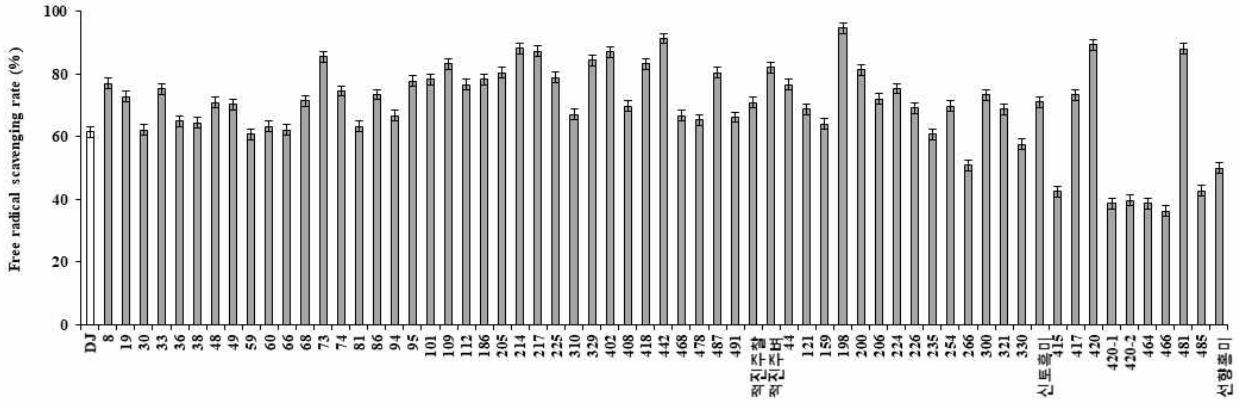


그림 15. 유색미 미강 추출물의 항산화 활성 측정

감마오리자놀 고함유 유색미 유전자원을 선발하기 위하여 미강 100mg에 chloroform 1000ul을 가한 후 상온에서 5분간 반응시킨 후 318nm에서 흡광도를 측정하였고, 이때 오리자놀의 흡광계수는 318로하여 계산하였다. 대조구로 사용한 동진벼의 감마오리자놀 함량은 12.72%로 나타났다. 유색미 미강 추출물의 감마오리자놀 함량은 평균 19.93% 이상으로 높게 나타났다. 특히 8, 49, 214, 217, 408 등 5계통은 27% 이상의 높은 감마오리자놀 함량을 나타냈다 (그림 16).

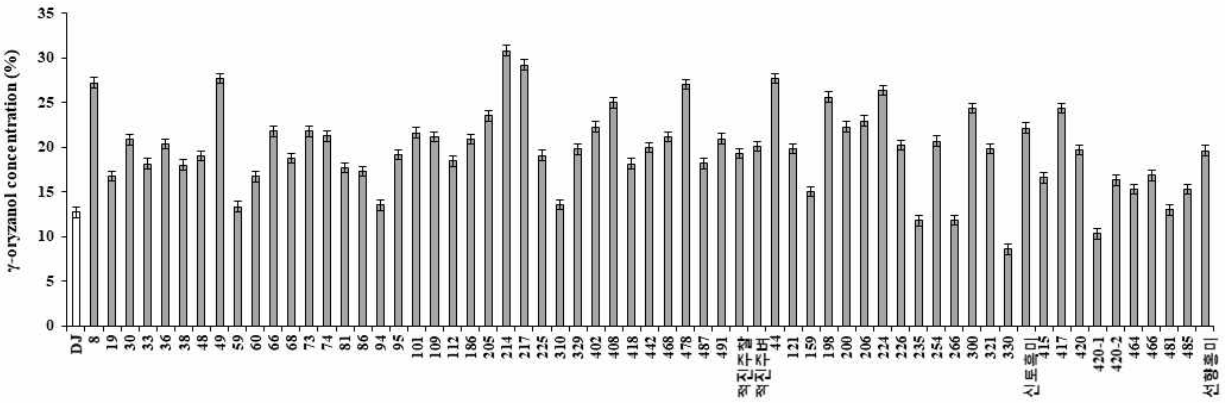


그림 16. 유색미 미강 추출물의 감마오리자놀 함량 측정

가바 고함유 유색미 유전자원을 선발하기 위하여 현미 500g을 농업실용화재단에 의뢰하여 가바함량을 측정하였다. 대조구로 사용한 동진벼의 가바 함량은 8.07 mg/100g로 나타났다. 생리활성 물질이 높은 8, 214, 217 흑미계통의 가바 함량은 각각 24.81 mg/100g, 34.71 mg/100g, 34.12 mg/100g 으로 대조구에 비해 3~4배 높게 나타났다. 420, 446, 481 적미계통의 가바 함량은 각각 12.36 mg/100g, 24.28 mg/100g, 15.22 mg/100g으로 1.5~3배 높은 가바 함량을 나타냈다 (그림 17).

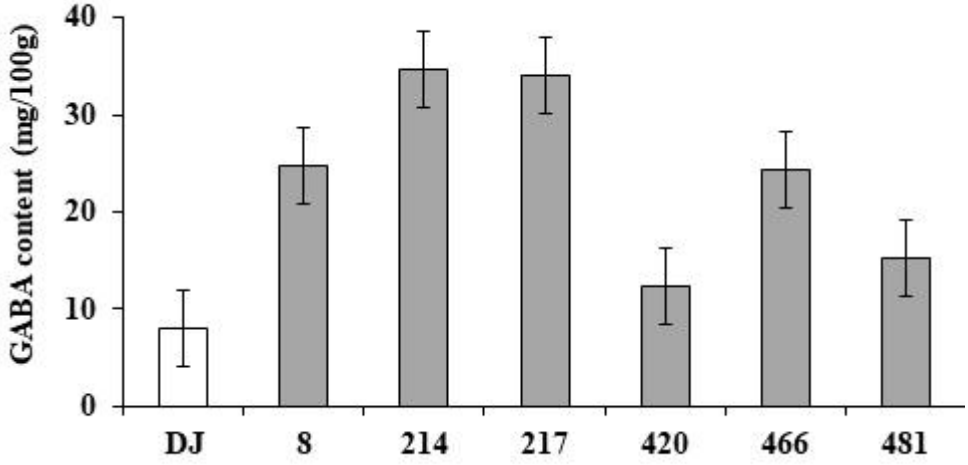


그림 17. 생리활성 물질 함량이 높은 흑미 및 적미 계통의 가바(GABA) 함량 측정

다. 유색미 유전자원의 생리활성 물질 탐색

생리활성 물질 함량이 높은 흑미 214 계통과 적미 466 계통과 대조구로 동진벼를 이용하여 유효 성분을 추출하였다. 추출용매는 70% ethanol을 사용하였으며, 환류추출법을 이용하여 추출하였다. 구체적인 실험방법은 흑미와 적미 계통 미강 분말 50g에 70% ethanol 500mL을 가한다음 40℃에서 24시간 동안 배양하여 3회 추출하였고, 여과지(Whatman no.2)로 여과하여, 여과액을 감압농축하여 건조하였다. 흑미, 적미 및 동진벼의 미강으로부터 각각 14.12g,

6.56g 및 6.54g의 추출물을 회수하였다. Ethanol 추출물을 H_2O에 10mg/ml의 농도로 용해시킨 후, 추출하는 용매의 낮은 극성도 순에 따른 분획물은 농축시킨 추출물을 물에 희석시킨 후 hexane, chlorform, ehtylacetate, butanol 및 물 순으로 3회 반복하여 추출하고(그림 18, 19), 여과지로 여과한 후, 여과액을 감압농축하여 회수하였다(표 3).

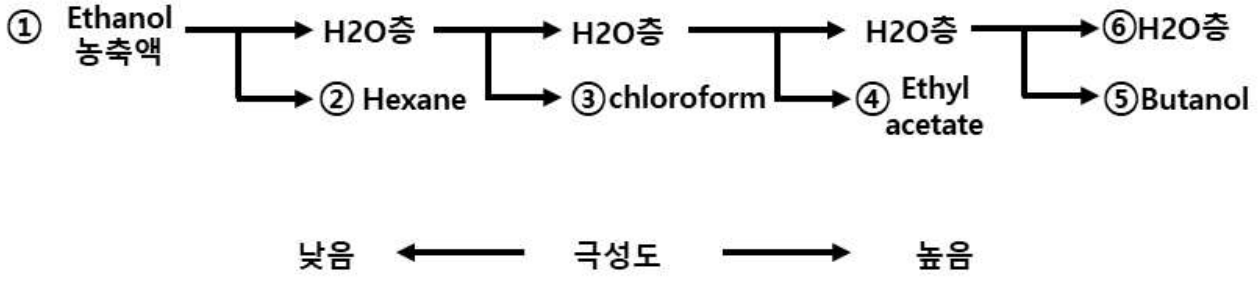


그림 18. 흑미 및 적미 계통의 분획물 추출 모식도

그림 19. 흑미 및 적미 계통의 분획물 추출 과정

표 3. 유기용매 분획별 추출물 회수량

품종	회수율 (%)				
	Hexane	Chloroform	Ethylacetate	Butanol	H_2O
동진벼	0.41	0.41	0.76	0.87	8.57
흑미(214계통)	1.12	3.35	2.73	2.05	5.16
적미(466계통)	2.27	0.12	0.11	0.82	2.35

흑미, 적미 및 동진벼 미강 추출물의 항산화 활성을 확인하기 위하여, 70% 에탄올 추출물을 제조한 후 hexane, chlorform, ehtylacetate, butanol 및 물 분획으로 순차적인 유기용매 분획을 실시하고 분획별 기능성 성분 검증 및 항산화 활성 분석을 실시하였다. DPPH 시약을 0.2mM의 농도로 준비하여 분획별로 10mg/ml의 농도로 희석하여 stock을 준비하였다. 준비된 stock을 사용하여 분획별로 2, 4, 6, 8 및 10mg/ml로 시료를 준비하고 시료와 DPPH용액을 1:4(시료 200㎕, DPPH 800㎕) 비율로 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 spectrophotometer를 이용하여 520nm에서 흡광도를 측정하였다. 흑미와 적미계통의 각 분획별

추출물 항산화 효과를 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과, 2mg/ml 농도부터 항산화활성을 나타내었다. 이는 대조구로 사용한 Vit C(ascorbic acid) 0.1mg/ml의 농도의 항산화 활성과 비슷하거나 약간 높은 수준을 보였으며, 동진벼에 비해서 흑미와 적미 계통의 Ethylacetate, buthanol, H_2O분획에서 항산화 활성이 대체적으로 높은 것을 확인하였다(그림 20).

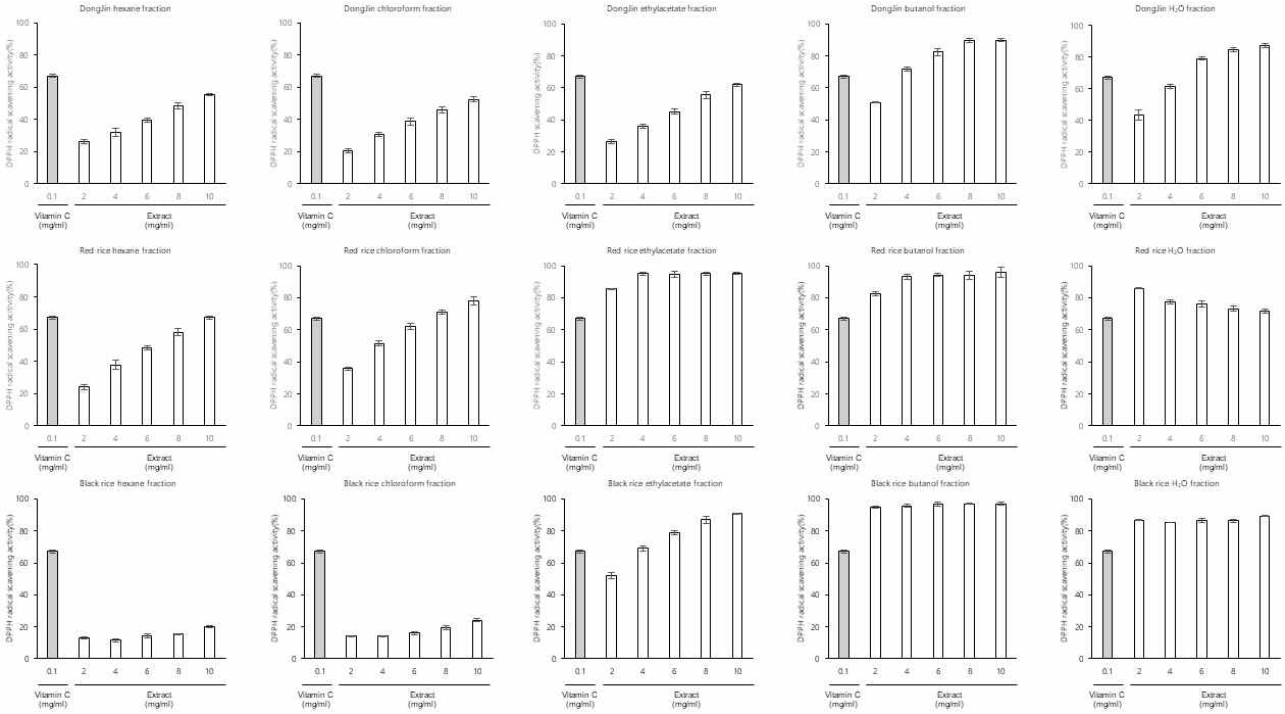


그림 20. 흑미 및 적미 계통의 추출 분획별 항산화 활성 측정

흑미, 적미 및 동진벼 미강 추출물의 용매 분획별 페놀화합물 함량을 측정하여 살펴본 결과, 적미, 흑미 및 대조구인 동진벼의 페놀화합물 함량은 분획 추출물 모두 Butanol > Ethylacetate > H_2O > Chloroform > Hexane 순으로 나타났으며 흑미 계통이 적미와 동진벼에 비해 높은 함량을 나타내었고, 각 분획별로 뚜렷하게 차이가 나는 것을 확인하였다(표 4).

표 4. 유기용매 분획별 페놀화합물 함량

	페놀화합물 (mg/50g)				
품종	Hexane	Chloroform	Ethylacetate	Butanol	H_2O
동진벼	9.52 ± 0.43	12.32 ± 0.54	24.87 ± 0.39	34.56 ± 0.66	19.31 ± 1.02
흑미(214계통)	31.92 ± 0.38	78.58 ± 0.32	169.31 ± 2.75	218.26 ± 3.48	150.37 ± 3.51
적미(466계통)	24.96 ± 0.51	43.16 ± 0.61	148.49 ± 1.89	173.02 ± 4.12	139.52 ± 4.31

화장품 원료로 활용 가능한지 확인하기 위하여 흑미, 적미 및 동진벼 미강 추출물의 용매 분획별 elastase 활성 저해능을 확인하였다. Hexane과 chlorform 분획에서는 대조구인 vit. c에 비하여 저해활성이 낮게 나타났으나, ethylacetae, butanol 및 H_2O 분획에서는 농도가 증가

함에 따라 비례적으로 저해활성이 증가하였으며, 특히 흑미의 butanol과 H_2O 분획에서 6mg/ml 이상의 농도에서는 대조구에 비해 elastase 활성 저해능이 높게 나타나는 것을 확인하였다(그림 21).

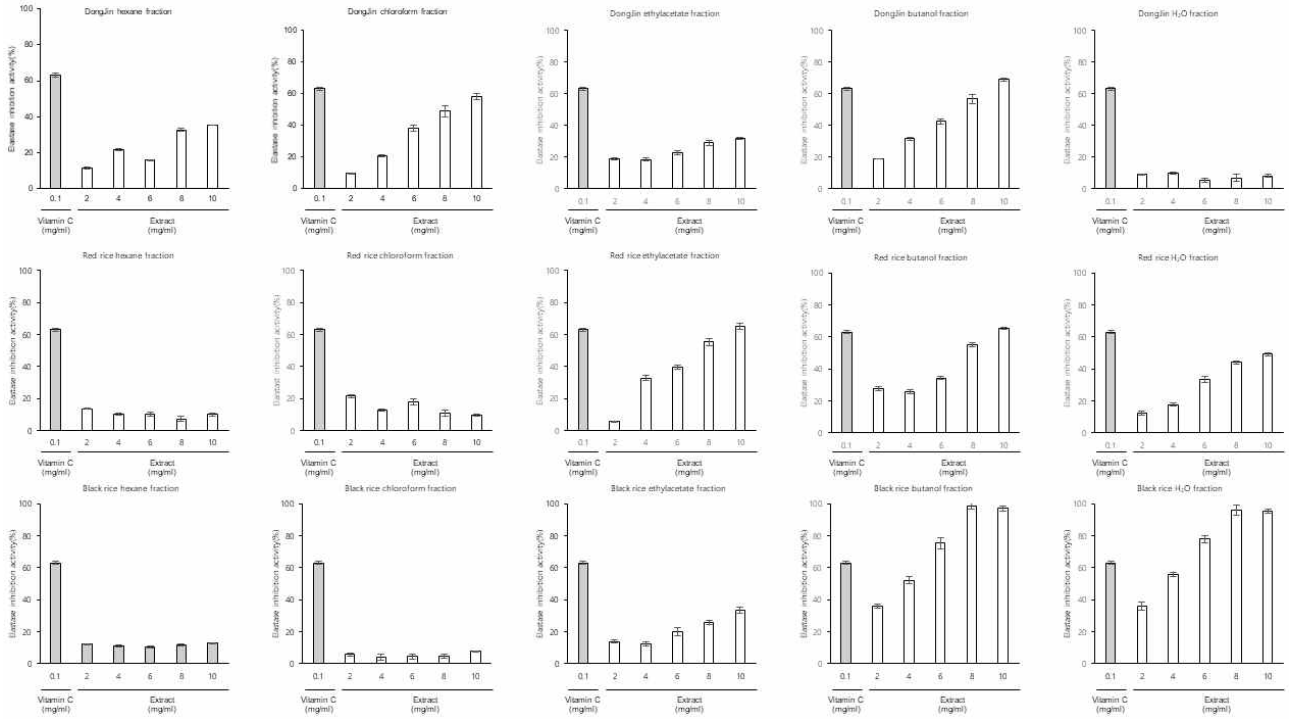
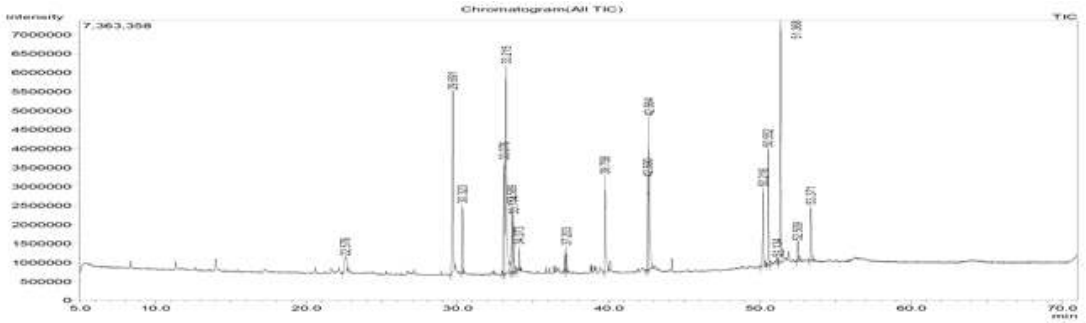
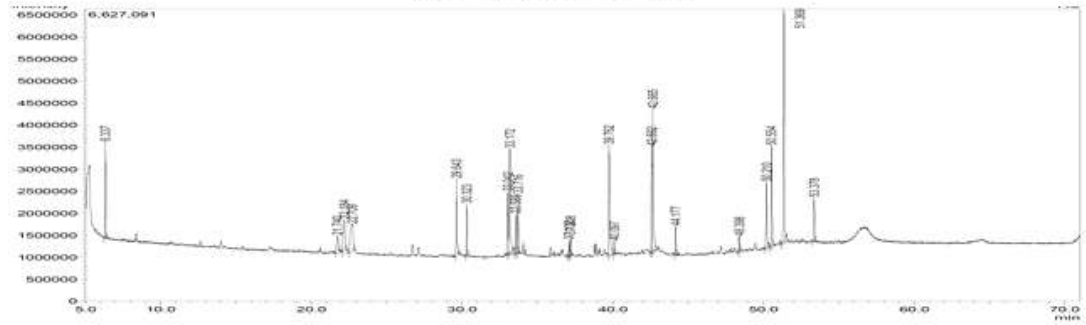


그림 21. 흑미 및 적미 계통의 추출 분획별 elastase 저해활성 측정

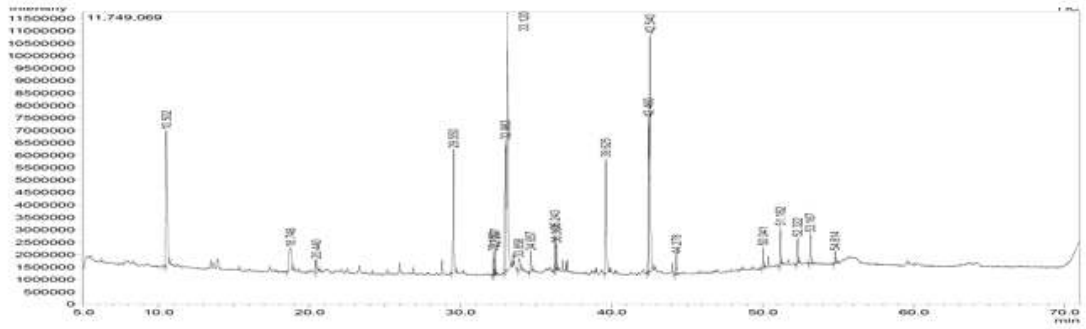
흑미, 적미 및 동진벼의 미강 butanol 분획추출물은 항산화활성과 elastase 저해활성이 다른 분획추출물의 비해 높게 나타났기 때문에 butanol 분획추출물의 성분 변이를 확인하기 위해서 GC-MS를 통하여 성분을 확인하였다. DB-5Ultra(30*0.250.25)컬럼을 이용하여 오븐온도 70℃에서 1분 머문 후 320℃까지 5℃/분씩 속도로 승온한 다음 20분 머물도록 설정하여 총 분석시간 71분까지, injection temperature 280℃, interface temperature 320℃로 설정하였고, mass range 25-600, split ratio는 시료에 따라 10 또는 splitless로 분석을 진행하였다. 흑미와 적미 butanol 분획추출물 중 benzoic acid, 3.4-dihydroxy- 성분이 높게 함유되어 있었는데 이 성분은 protocatechuic acid(PCA)로 불리는 물질로 항산화활성에 중요한 물질이다. 또한 상대적으로 많은 지방산 유도체들이 발견되었으며(그림 22), 분획층의 성분을 표 5에 나타내었다.



동진벼 butanol GC-MS



적미 butanol GC-MS



흑미 butanol GC-MS

그림 22. 동진벼, 흑미 및 적미 butanol 분획 추출물의 GC-MS

표 5. GC-MS 분석을 이용한 성분 분석

		동진벼	흑미(214계통)	적미(466계통)
phenolic compound	5-Cholestene-3-ol, 24-methyl	4.84	1.45	4.52
	Stigmasta-5,22-dien-3-ol,(3.beta., 22E)-(CAS)	7.19		6.94
	1,2-benzenediol (Pyrocatechol)		9.08	
	Benzoic acid, 3, 4-dihydroxy -		9.11	
	beta-sitosterol	14.83	2.63	15.96
	9,19-Cycloergost-24(28)-en-3-ol, 4,14-dimethyl- acetate,(3.beta)	4.67	3.88	3
Fatty acid and fatty acid derivatives	hexadecanoic acid	11.08	8.33	5.24
	Hexadecanoic aicd, ethyl ester	4.23	1	3.52
	9-Octadecynoic acid	6.97	1.57	4.28
	Docos-13-enoic acid	12.82	17.26	7.19
	9-Octadecenoic acid	4.22	1.42	2.7
	(E)-9-Octadeceenoic acid ethyl ester	3.53		4.05
	HJexadecanoic acid, 2,3-dihydroxypropyl ester (CAS)	5.95	7.71	7.51
	9,12-Octadecadienoyul chloride, (Z,Z)-	5.69	10.34	7.22
	9-Octadecenoic acid(Z)-, 2,3-dihydroxypropyl ester (CAS)	9.40	15.92	9.76
	2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaene		1.34	
	bis (2'-Ethylhexyl)sebacic acid			1.96
Total		95.42	91.04	83.85

흑미 butanol 분획추출물에서 대조구와 적미에 비해 상대적으로 함량이 높은 undetected 화합물이 존재하여 기존에 알려지지 않은 특수 기능성 성분으로 예측하고 분리 정제 실험을 진행하였다. 추정되는 분자량은 305로 mass spectrum에서 가장 큰 분자량을 나타내는 peak를 선정하였다(그림 23).

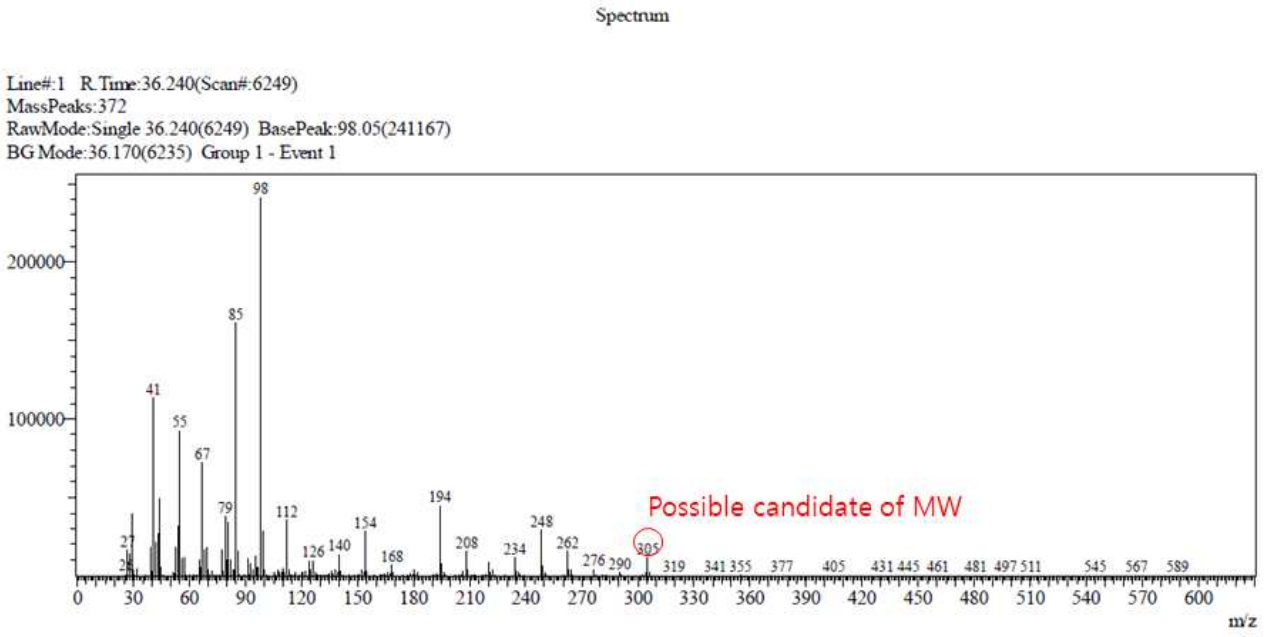
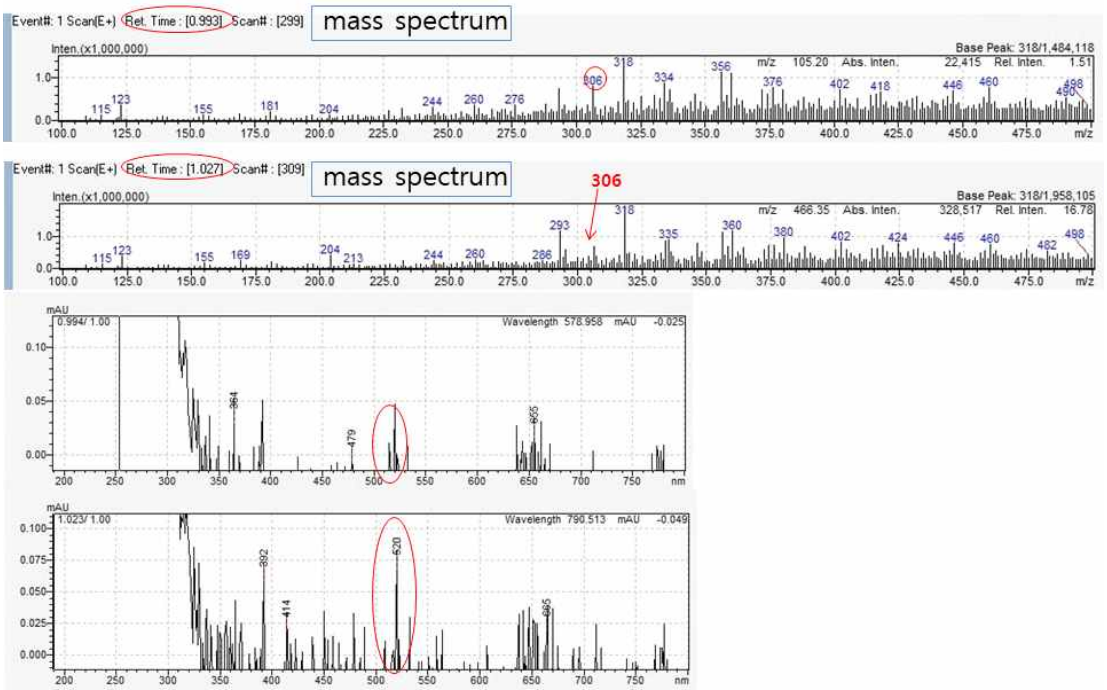


그림 23. 흑미 butanol 분획 추출물의 MS 분석

10가지의 컬럼(AD-H, OD-H, AS-H, OJ-H, IC, (R,R)WHEL-01, (R,R)WHEL-02, Primesep SB, AZ-H 및 OX-H)을 이용하여 SFC MS기기의 PDA detector로 254nm에서 chromatogram을 얻었다. 이중 Primesep SB 컬럼을 이용하여 RT=0.993~1.027에서 분자량=306, 520-528nm 파장을 흡수하는 chromatogram을 얻어 순수 분리하여 진공상태로 vacuum을 건 후 잔류된 유기용매나 물 등을 다 제거 시키고 CD3OD(Sigma Chemical Co.)로 녹였다. NMR tube에 넣고 300 Hz NMR spectrometer(Bruker, Karlsruhe, Germany)로 ^{1}H NMR (300 MHz)분석 하였다. 보다 정확한 구조는 다양한 2D NMR spectrums(DEPT, COSY: H-H, H-C, NOESY, HMQC 등) 분석으로 확인 진행계획이며, lipid 계열의 화합물로 확인되었다 (그림 24).



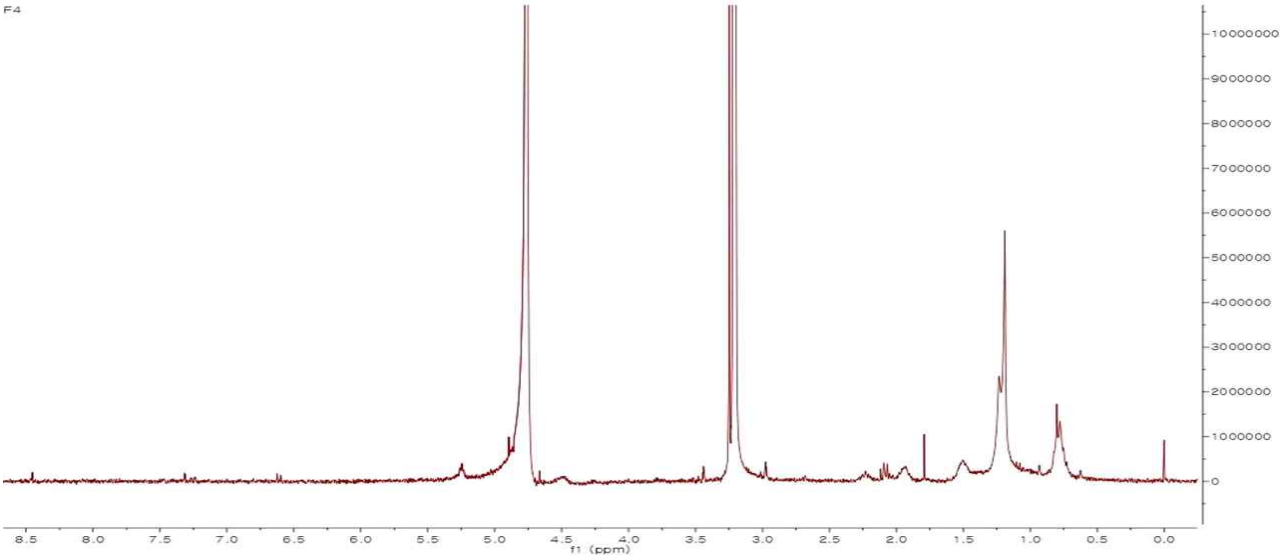


그림 24. 흑미 butanol 분획 추출물의 SFC MS chromatogram 및 NMR 분석

생리활성 물질 함량이 높은 흑미와 적미 계통들에 대하여 토코페롤 함량을 측정하였다. 토코페롤 함량은 미강추출물 0.5ml에 ethanol 0.5ml을 가하여 10분간 vortex한 후, n-hexane 2.5ml을 가하고 1분간 vortex하였다. 원심분리를 5분간 3000rpm으로 분리한후 상층액을 새 tuve에 옮긴뒤 농축하여 iospropanol 1ml을 가하여 녹인 후, 토코페롤 standard(sigma)를 이용하여 비교 분석하였다. 대조구로 사용한 동진벼의 토코페롤 함량은 0.58 ug/ml로 나타났다. 생리활성 물질이 높은 8, 214, 217 흑미계통의 토코페롤 함량은 각각 1.53ug/ml, 2.53ug/ml, 2.44ug/ml으로 대조구에 비해 3~5배 높게 나타났다. 420, 466, 481 적미계통의 토코페롤 함량은 각각 1.87ug/ml, 2.25ug/ml, 1.72ug/ml으로 3~4배 높은 토코페롤 함량을 나타냈다(그림 25).

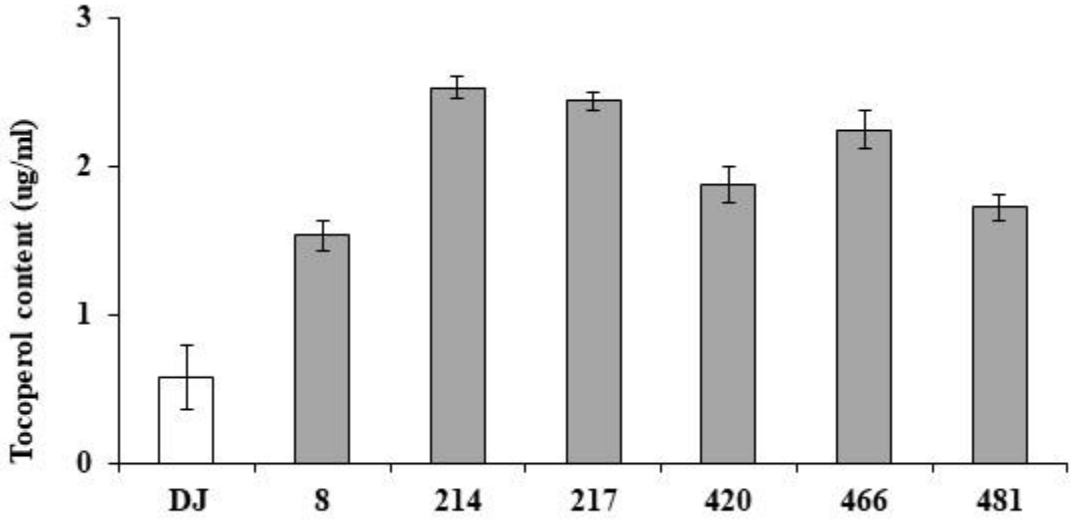


그림 25. 유색미 추출물의 토코페롤 함량 분석

선발된 흑미 214계통과 적미 466계통 500g에 대해 이화학적 성분분석을 실시하여 얻어진 결과를 표 6에 나타내었다. 흑미 214계통이 모든 조사항목에서 대조구인 동진벼와 적미 계통의 비해 높게 나타나는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 토대로 흑미 214계통을 육종 및 화장품 원료소재로서의 가치가 높을 것으로 판단된다.

표 6. 동진벼, 흑미 및 적미의 이화학적 성분분석

		동진벼	흑미(214계통)	적미(466계통)
정조무게(g)		304	331	246
현미무게(g)		241	263	192
정현율(%)		79.27	79.45	78.08
아밀로스 함량(mg/L)		17.36	7.49	7.13
질소함량		1.1	1.37	1.09
수분		12.86	12.32	11.21
단백질(%)		6.49	8.15	6.60
무기성분 (mg/kg)	K	1165.2	1517.6	1306.2
	Ca	1144.4	2652	2766
	Mg	579.8	626.8	627.2
	Na	626.8	760.2	529.8
	Fe	1497	2108	1728.8
	Mn	34.4	33.2	27
알칼리붕괴도		5	5	6
점경도	경도	4.17	7.74	2.51
	점도	0.29	0.43	0.36
	모양	0.07	0.16	0.20

2. 분자생물학적 기술을 활용한 고기능성 함유 벼 계통 육성

가. 유색미 유전자원에 대한 분자마커 검정

유색미 유전자원에 대한 다형성이 높은 SSR 마커를 선발하기 위하여, 벼 게놈 데이터베이스(http://www.gramene.org/)에서 보고된 300개의 마커와 호품, 화영, 다미, 신동진, 오대, 추청, 새추청, 주남, 일품, 일미, 고품 품종과의 PCR 분석하였을 때 대립유전자의 특성이 뚜렷하고 반복재현성이 우수한 10개의 마커(RM8085, HvSSR02-86, RM18821, RM12834, RM20754, RM260673, RM15641, RM26730, RM19731, RM24946)를 선발하였다(그림 26)

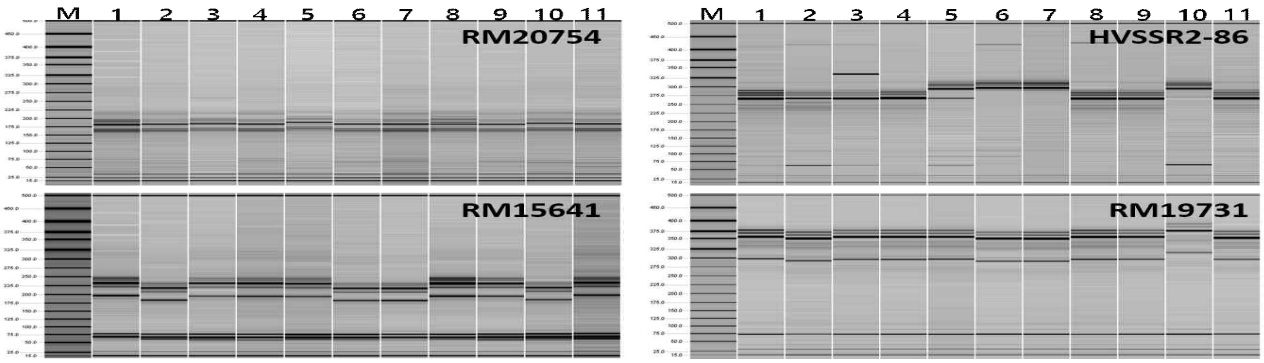


그림 26. 유색미 유전자원에 적합한 SSR 마커 선발

1.호품, 2.화영, 3.다미, 4.신동진, 5.오대, 6.추청, 7.새추청, 8.주남, 9.일품, 10.일미, 11.고품

유색미 유전자원의 유전적 다형성 정도를 조사하기 위하여, 본 과제에서 선발된 10개의 SSR 마커와 농촌진흥청에서 벼 품종 식별에 활용하고 있는 6개의 SSR 마커의 정방향에 형광물질(FAM, VIC, NED, PET)을 표지하여 있는 유전자원 548점과 PCR을 수행하였다. SSR 마커에 따라 검출된 대립유전자의 수는 15-47개로 다양하게 나타났으며 총 409개의 대립유전자가 분석되었다. SSR 마커의 유전적 다형성 정도를 나타내는 지수인 평균 PIC 값은 0.913으로 아주 높게 나타나 본 과제에서 활용된 분자마커는 유색미 유전자원의 유전적 근연관계 분석에 적합하리라 판단되었다(그림27, 표 7).

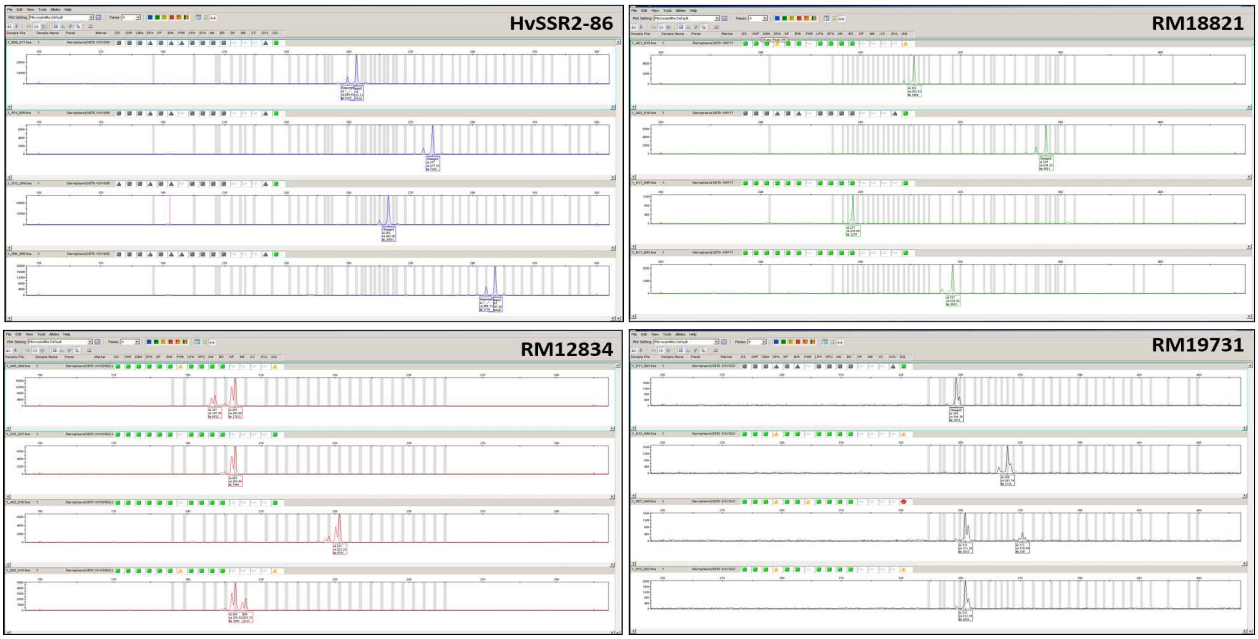


그림 27. SSR 마커를 이용한 유색미 유전자원의 대립유전자의 양상

표 7. 벼 유색미 DNA profile D/B 구축에 활용된 분자마커의 대립유전자 수 및 PIC 값

No.	SSR marker명	반복염기 서열	염색체 상 위치	Annealing temp.(℃)	대립유전자의 크기(bp)	대립 유전자 수	PIC 값
1	KRF24	-	-	55	213-238	22	0.902
2	RM8085	ag	1	55	105-144	20	0.915
3	RM72	(tat)5c(att)15	8	55	151-207	20	0.916
4	KRF16	-	-	55	160-253	27	0.963
5	HvSSR02-86	aac	2	55	187-328	47	0.970
6	RM18821	tct	5	55	150-205	17	0.876
7	RM12834	aga	2	55	186-260	25	0.862
8	RM20754	aat	6	55	151-219	22	0.955
9	RM26063	ct	11	55	225-283	27	0.952
10	RM333	(tat)19(ctt)19	10	55	156-312	35	0.964
11	RM15641	aat	3	55	163-247	31	0.894
12	RM26730	ctt	11	55	98-157	11	0.781
13	RM19731	tta	6	55	339-429	31	0.964
14	KRF15	-	-	55	126-175	18	0.878
15	KRF17	-	-	55	243-405	41	0.956
16	RM24946	atg	10	55	317-369	15	0.855
총계						409.00	14.604
평균						25.56	0.913

❍ 유색미 유전자원 548점에 대한 SSR 마커의 대립유전자를 이용하여 군집분석에 의한 계통도

를 작성한 바(그림 28), 공시된 유전자원 전체 유사도 지수는 0.04-1.00로 나타났다. SSR 마커의 유전자형에 의해 식별이 되지 않은 유전자원은 형태적 특상조사를 종합화한 다음 동일성 여부를 검토할 예정이다. 그리고 계통도를 근거로 하여 주요 농업형질과 연관성, 수집 유전자원 출처여부 및 기능성 물질과의 연관성 여부를 분석할 예정이다

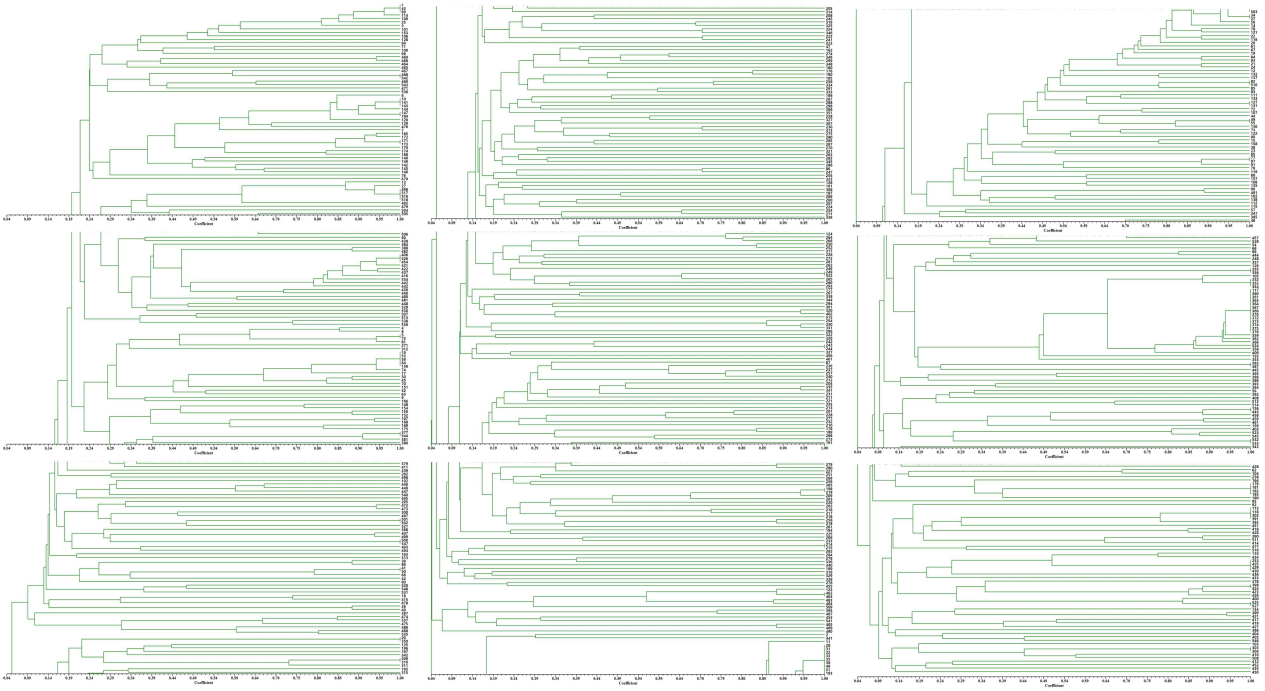


그림 28. SSR 마커를 이용하여 작성된 벼 유색미 유전자원의 계통도

나. 유색미 유전자원의 주요 농업 형질 조사

유색미 유전자원 548점 중에서 종자 발아가 양호한 517점을 2016년 4.16-4.29에 걸쳐 파종하고 1개월간 육묘한 다음 유전자원당 30주를 이앙하였다. 2016년 10월 10일 현재 출수기, 간장, 수장에 대해 조사가 완료되었으며, 유전자원당 500g이상의 종자를 채종하여 건조 중에 있으며 천립중, 현미종피색 등을 2016년 동계에 조사할 예정이다(그림 29). 한편, 유전자원에 대해 종자 채종이 완료되면 제1세부과제 및 제1협동과제에 기능성 물질 분석재료로 제공하여 화장품 원료로서의 적합성 검정 분석을 의뢰하였다.

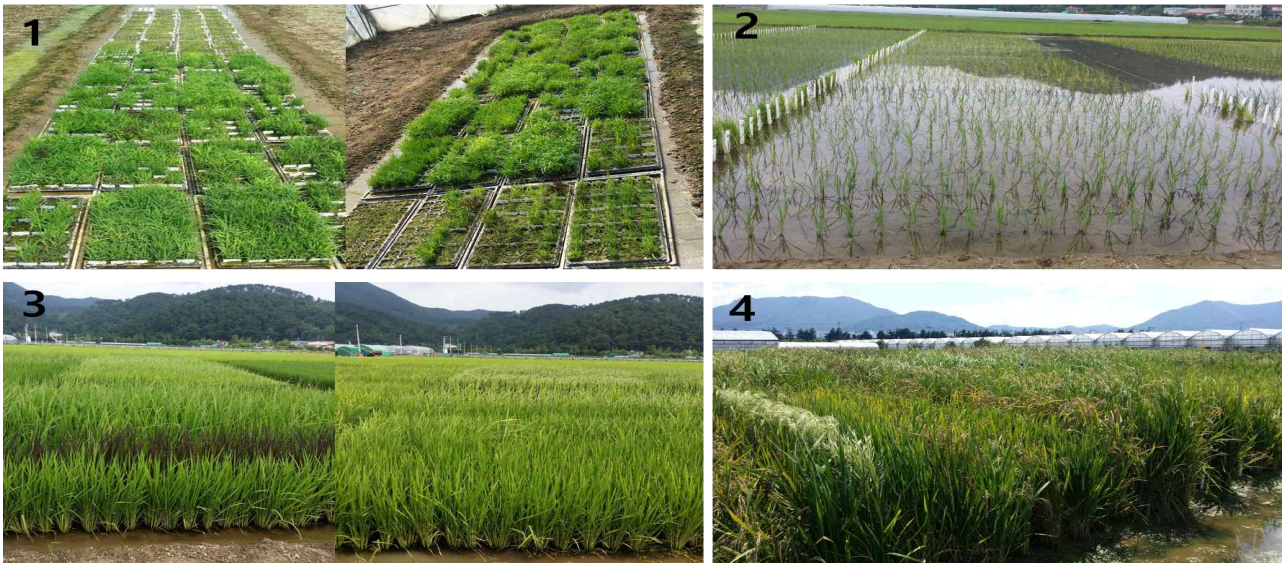


그림 29. 벼 유색미 유전자원의 생육양상 (1.파종 후 15일 생육, 2.이앙 후 10일, 3.출수기, 4.유숙기)

다. 유색미 유전자원에 대한 분자마커 검정

연구 1차년도에 다형성 정도가 높은 16개의 SSR 마커를 이용하여 517개 유색미 유전자원에 대하여 MEGA7.0 컴퓨터 프로그램을 이용하여 UPGMA 분석에 의한 계통도를 작성한 바 (그림 32), SSR 마커의 유전자형에 의해 흑미와 적미가 뚜렷하게 구분되지 않고 대그룹내에 흑미와 적미가 유전자원이 혼재하는 양상을 나타내었다(그림 30).

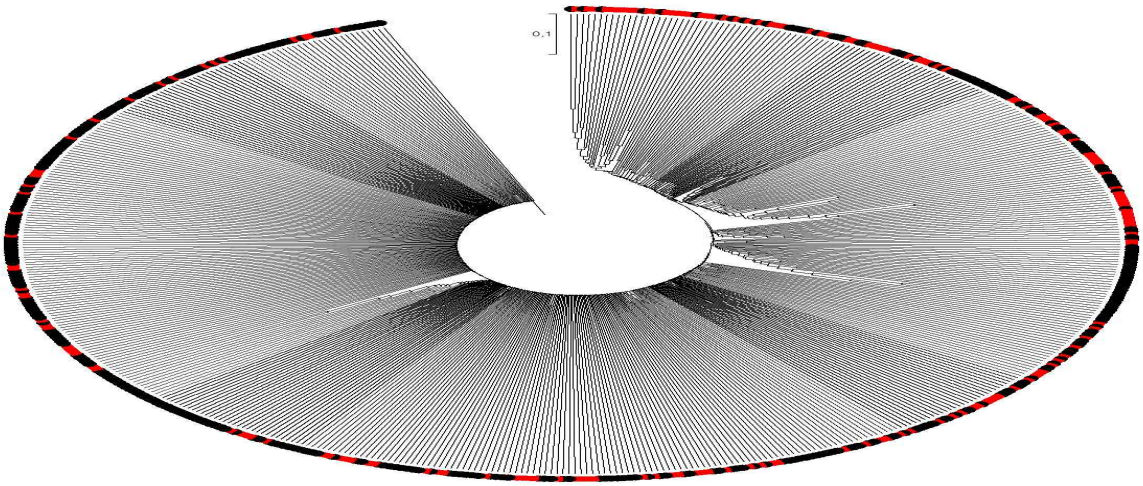


그림 30. SSR 마커를 이용한 유색미 517점에 대한 계통도(검은색;흑미, 빨강색;적미)

유색미 유전자원 517점을 Structure 2.3.4 컴퓨터 프로그램을 이용하여 유전자원 집단을 구조 분석한 바 최대 ΔK 값은 K=7로 구분되었고, 모든 유전자원은 7개의 대그룹으로 구분되었고 대그룹내에 다양한 유전자형을 가진 유전자원들이 소그룹으로 혼재하는 양상을 나타내었다 (그림 31, 32).

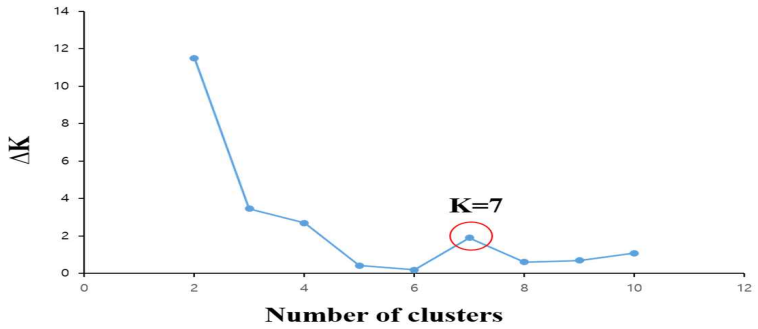


그림 31. 유색미 유전자원의 구조집단 분석을 위한 K값

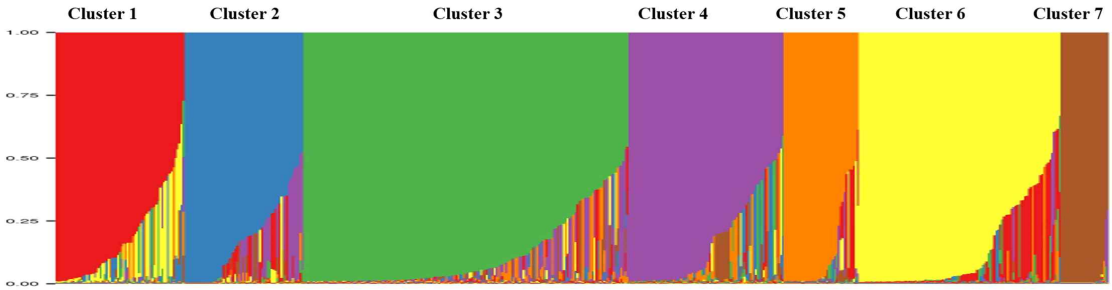


그림 32. 유색미 유전자원의 계통의 집단구조 양상

라. 벼 흑미 및 적미 종피색 선별용 프라이머를 활용한 벼 계통 선발

농촌진흥청에서 개발한 흑미 종피색을 판별하기 위한 프라이머 세트의 정보를 활용하여 유색미 유전자원에 대한 활용가능성을 탐색한 바(그림 33) 유색미의 유전자형에 따라 특이적인 밴드(흑미; 215bp, 백미; 450bp)가 검출되지 않았다.

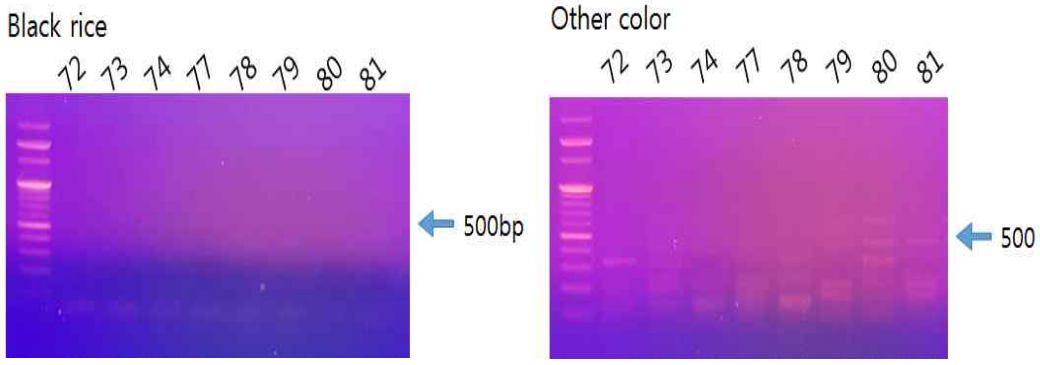


그림 33. 흑미 선별용 프라이머를 이용한 PCR 수행 결과.

적미 종피색을 판별하기 위한 프라이머의 경우도 PCR 수행결과 적미는 229bp, 백미는 215bp의 산물이 나타내어 적미를 정확하게 확인할 수 있는 것으로 나타났다(그림 34).

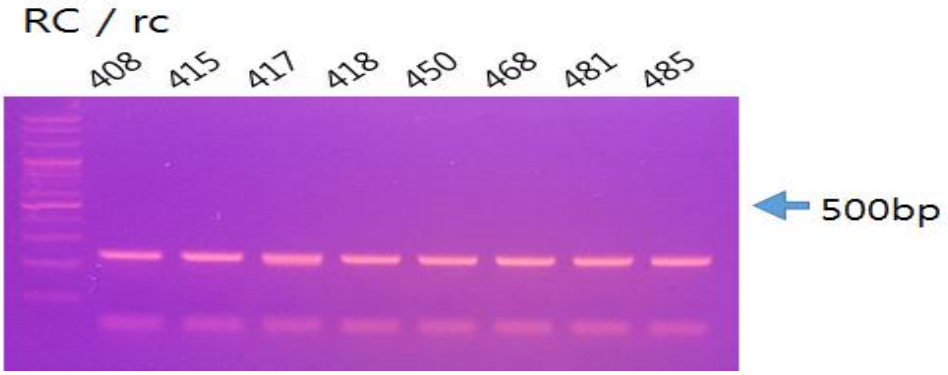


그림 34. 적미 선별용 프라이머를 이용한 PCR 수행 결과.

마. 유색미 유전자원의 계통 선발

흑미 344계통과 적미 173계통의 출수기, 간장, 수장, 천립중 등을 조사한 바(표 8), 적미 유전자원이 흑미 유전자원보다 출수기도 빠르고 간장이 크며, 수장은 다소 짧으며 천립중이 무거운 것으로 나타났다. 흑미 및 적미 유전자원들은 출수기 등 간장, 수장, 천립중 등의 형질에서 다양한 변이폭을 보이면서 안토시아닌과 프로안토시아니딘 성분을 많이 함유하고 있는 것으로 나타났다.

표 8. 유색미 유전자원의 주요 농업적 형질 특성

구분	출수기 (일)	간장 (cm)	수장 (cm)	천립중 (g)	안토시아닌 (mg/g)	프로안토시아니딘 (mg/g)
흑미	111±12.6	100.1±25.7	29.5±9.9	23.6±4.2	2.06±90.5	-
적미	102±11.9	104.2±18.5	27.3±10.4	21.7±3.1	-	3.28±39.8

※평균±표준편차

흑미 및 적미 유전자원들 중 안토시아닌이나 프로안토시아니딘 함량이 높고 주요 농업형질이 동진과 유사하면서 분자생물학적 특성이 다른 유전자원과 뚜렷하게 구별되는 흑미 41계통과 적미 15계통을 선발하였다. 2017년 현재 제반 형질이 우수한 흑미 및 적미 계통에 대하여 주요 농업형질을 재조사하여 종자를 채종중에 있으며 이들 계통의 종자를 제1,2협동 연구자에게 화장품 재료로 제공할 예정이다(표 9, 10).

표 9. 동진과 주요 농업 형질이 유사하면서 안토시아닌 함량이 높은 흑미 계통

계통명	출수기 (일)	간장 (cm)	수장 (cm)	천립중 (g)	안토시아닌 함량 (mg/g)
8	110	85.2±0.9	23.4±2.8	22.2±0.5	2.2
19	110	67.0±2.0	34.8±2.4	24.1±0.8	2.4
30	112	70.3±3.2	26.6±4.6	31.0±0.2	2.5
33	110	55.0±3.5	26.5±2.6	27.2±0.5	1.9
36	109	60.1±6.9	22.1±8.0	29.4±0.5	2.4
38	102	70.3±9.9	27.2±12.4	21.9±0.1	1.9
43	104	87.5±3.2	18.3±0.9	21.8±0.8	0.9

44	105	67.0±6.1	20.0±1.4	25.7±1.1	2.8
48	110	59.2±2.9	21.1±4.1	24.9±0.5	2.3
49	110	70.1±5.2	35.1±1.6	22.8±1.0	3.3
59	98	64.5±9.4	22.2±4.1	25.4±0.9	1.4
60	104	76.7±0.8	21.4±9.3	26.4±0.6	1.9
66	110	75.9±3.8	20.6±2.9	25.8±0.6	1.9
68	110	75.1±3.5	15.3±3.2	21.6±0.5	2.7
73	110	64.2±4.3	41.1±0.8	27.4±0.6	2.3
74	106	54.2±4.0	35.0±4.6	21.8±1.0	2.5
81	106	79.2±8.9	23.2±9.8	20.2±0.7	1.8
86	112	76.4±3.8	25.4±2.8	26.6±0.5	2.3
94	98	75.9±3.3	21.6±5.4	25.2±0.6	1.6
95	106	68.6±2.4	20.9±6.0	19.7±0.6	2.7
101	94	70.8±1.2	35.5±4.4	22.9±1.3	2.7
109	110	86.5±4.3	14.2±1.2	20.8±0.2	2.5
112	93	76.3±1.2	36.3±1.6	17.5±0.1	2.7
121	106	105.1±2.4	38.0±4.5	25.3±0.2	1.8
159	130	135.0±3.5	21.1±8.9	21.1±0.2	1.7
186	110	63.3±1.8	28.4±5.6	21.2±0.4	4.3
198	130	98.4±1.8	41.2±2.4	21.3±0.3	8.2
200	112	101.2±4.4	40.4±3.6	22.4±0.2	4.0
205	110	66.5±0.4	28.8±3.6	21.8±0.2	2.2
206	130	84.6±3.7	39.8±4.1	23.5±0.2	5.1
214	123	105.4±4.3	44.6±3.5	22.6±0.6	5.0
217	102	70.8±0.9	26.1±2.4	22.1±0.5	2.9
224	130	122.6±2.0	29.3±2.9	30.5±0.3	3.7
225	104	116.4±8.8	22.2±5.8	22.8±0.6	5.0
226	130	124.3±0.8	35.8±5.7	22.4±0.6	2.6
235	130	128.5±3.2	38.9±6.0	22.6±0.1	2.0
254	110	110.6±0	38.7±2.3	22.0±0.1	2.7
266	130	127.0±2.1	51.2±6.5	14.1±0.2	1.9
300	130	114.4±4.9	30.6±4.7	19.4±0.7	1.6
310	94	78.8±2.0	24.4±3.7	26.6±0.3	1.7
321	91	75.9±2.4	41.9±6.2	16.9±0.5	2.3
329	100	79.4±13.2	21.8±3.7	22.7±0.7	1.4
신토흑미	100	48.6±2.6	20.4±5.3	25.8±0.2	4.8
흑진주	100	69.2±8.9	16.5±1.2	24.5±0.1	4.5
동진벼	106	78.3±2.5	23.7±1.3	23.1±0.3	0.2

※평균±표준편차

표 10. 동진과 주요 농업 형질이 유사하면서 프로안토시아니딘 함량이 높은 계통

계통명	출수기 (일)	간장 (cm)	수장 (cm)	천립중 (g)	프로안토시아니딘 함량(mg/g)
402	106	55.1±7.5	24.1±8.8	21.1±0.1	3.8
408	100	80.0±2.4	27.2±8.6	18.5±0.4	3.6

415	93	62.5±2.0	25.3±9.7	20.3±0.1	3.6
417	102	77.2±3.2	37.3±9.6	21.0±0.2	3.3
418	99	79.1±2.9	32.1±5.6	20.1±0.1	3.2
420	69	92.0±7.1	23.0±5.7	19.5±0.3	3.4
450	98	68.2±6.7	26.5±3.5	23.0±0.5	3.2
464	93	120.3±6.9	30.9±3.0	20.9±0.7	3.4
466	98	120.6±1.6	29.6±1.2	19.3±0.2	3.3
468	101	87.9±10.3	9.8±5.0	21.5±0.2	3.6
478	92	126.8±2.4	17.4±3.8	20.8±0.4	3.8
481	109	88.8±8.6	19.5±1.4	22.5±0.4	3.4
485	100	52.5±6.6	29.6±2.4	19.1±0.2	3.4
487	90	104.3±6.5	43.8±10.9	25.0±0.1	3.8
491	109	88.5±3.8	29.5±4.1	22.2±0.1	1.8
적진주찰	120	60.1±3.7	21.2±1.6	21.3±0.1	3.6
적진주	114	62.2±1.6	26.1±2.9	23.6±0.1	3.5
선향홍미	114	62.2±3.0	22.0±2.8	23.5±0.2	3.4
동진	106	78.3±2.5	23.7±1.3	23.1±0.3	0.5

※평균±표준편차

바. 기능성 성분함량이 높은 계통간 잡종 집단 육성

안토시아닌 및 프로안토시아니딘 함량과 관련된 유전자의 위치를 확인하기 위하여 안토시아닌 함량이 높은 86, 99, 121, 235, 300번 계통과 프로안토시아니딘 함량이 높은 485, 491번을 동진과 인공교배하여 86/동진 99립, 121/동진 3립, 235/동진 4립, 300/동진 10립, 485/동진 78립, 491/동진 46립의 F1 종자를 확보하였다(그림 35). 향후 F1 종자를 세대진전하여 기능성 물질 및 종피색과 관련된 유전자의 위치를 구체적으로 확인하는데 이용할 예정이다.

그림 35. 선발된 유색미 계통 인공교배

사. 분자마커를 이용한 벼 종피색 관련 유전자원의 선발효율성 탐색

농촌진흥청에서 개발한 흑미 종피색을 판별하기 위한 프라이머 세트의 반복재현성 검정 및 효율성 비교분석을 위하여 PCR검정을 통해 분석한 결과(그림 36), 유색미의 유전자형에 따라 특이적인 밴드(흑미; 215bp, 백미; 450bp)가 검출되지 않았다.

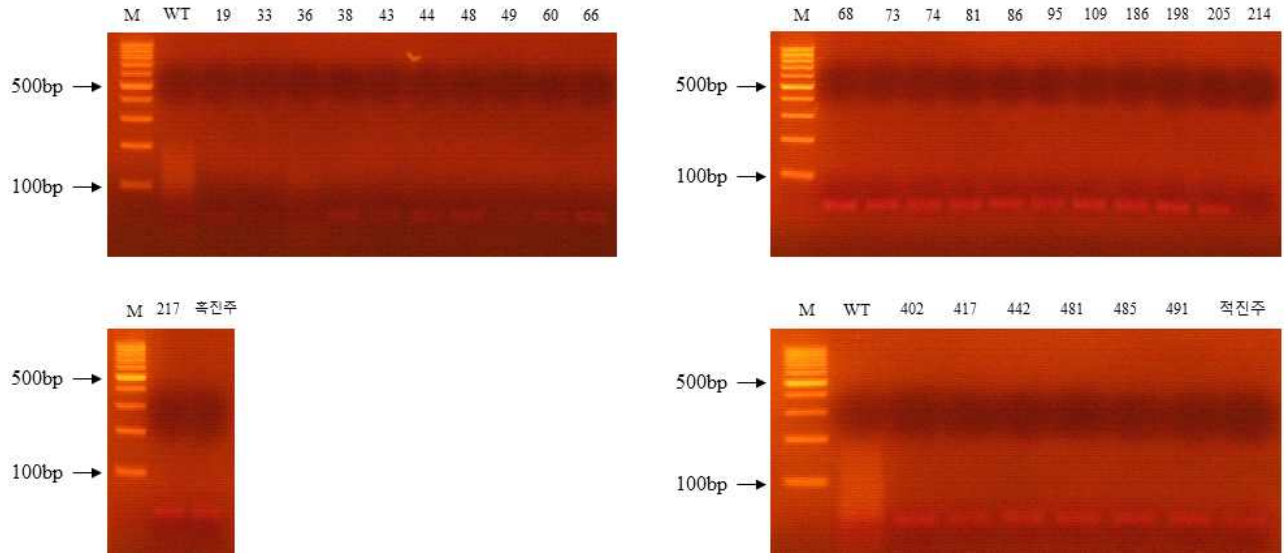


그림 36. 흑미 선별용 프라이머를 이용한 PCR 반복 재현성 검정.

적미 종피색을 판별하기 위한 프라이머를 사용한 반복 재현성 검정 결과 적미는 229bp, 백미는 215bp의 산물이 나타내어 적미를 정확하게 확인할 수 있는 것으로 나타났다(그림 37). 그러나 흑미의 안토시아닌이나 적미의 프로안토시아니딘의 함량을 분자마커의 특성으로 확인하는데 한계성이 있는 것으로 나타나 이를 구체적으로 확인하기 위한 깊이 있는 분자유전학적 연구가 있어야 될 것으로 사료된다.

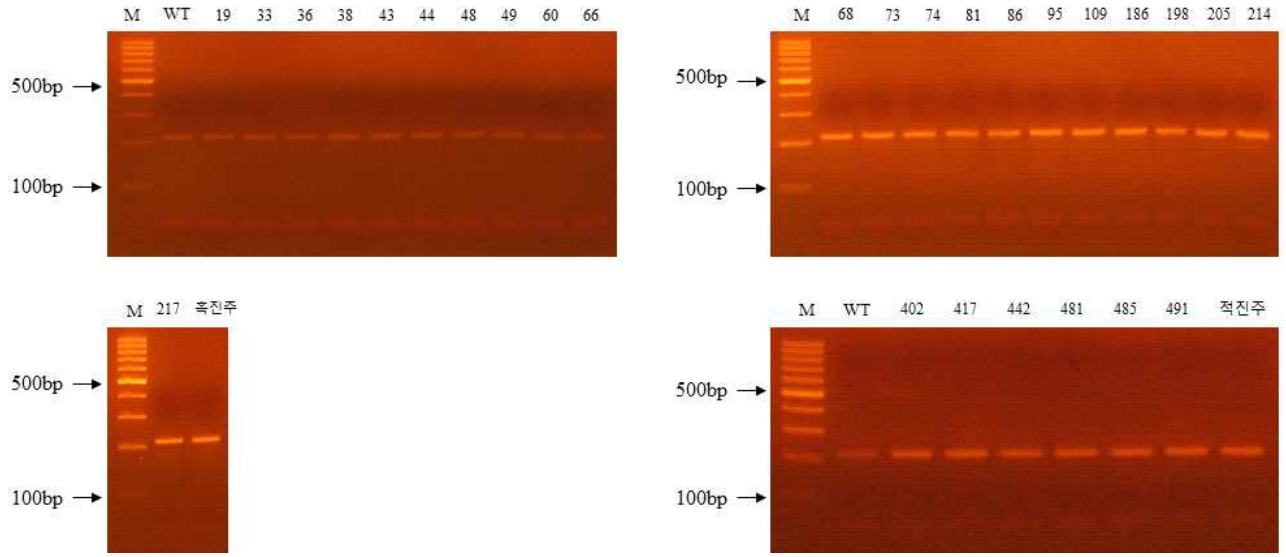


그림 37. RC/rc 프라이머를 이용한 PCR 반복 재현성 검정.

유색미 중에서 적색미와 갈색미를 구분하기 위하여 go1, go2, stop1 및 stop2 프라이머를 사용하여 반복 재현성 검정 결과, Rd/rd 대립형질로 구성된 DFR(dihydroflavonol-4-reductase) 유

전자는 대립형질에 나타나는 두 개의 SNP에 의해서 적색미와 갈색미로 구분 지어 준다. 적색미는 DFR 유전자의 첫 번째 SNP부위에서 정지 코돈이 발생하지 않고, go1과 go2 프라이머에 의해서 증폭된다. 반면에 stop1과 stop2 프라이머에 의해서는 증폭되지 않는다. 본 연구에서 사용된 유색미인 흑미와 적미 모두 go1과 go2 프라이머에 의해서 증폭이 반복적으로 잘 되는 것을 확인하였으며(그림 38, 39), sopt1과 stop2에 의해서 반복적으로 증폭이 되지 않는 것으로 확인되었다(그림 40, 41). 이러한 결과를 바탕으로 볼 때, 적색미와 갈색미를 구분 지을 수 있는 go1, go2, stop1 및 stop2 프라이머는 다른 유색미에도 적용하여 활용가능 할 것으로 여겨진다.

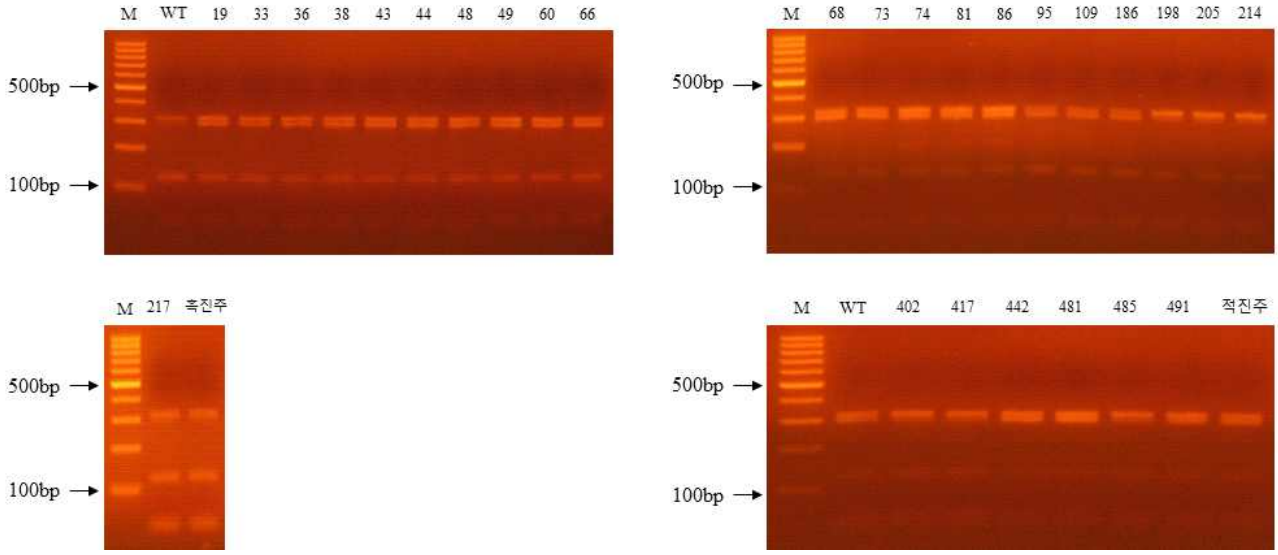


그림 38. 적색미와 갈색미 선별 프라이머(go1)를 이용한 PCR 반복 재현성 검정.

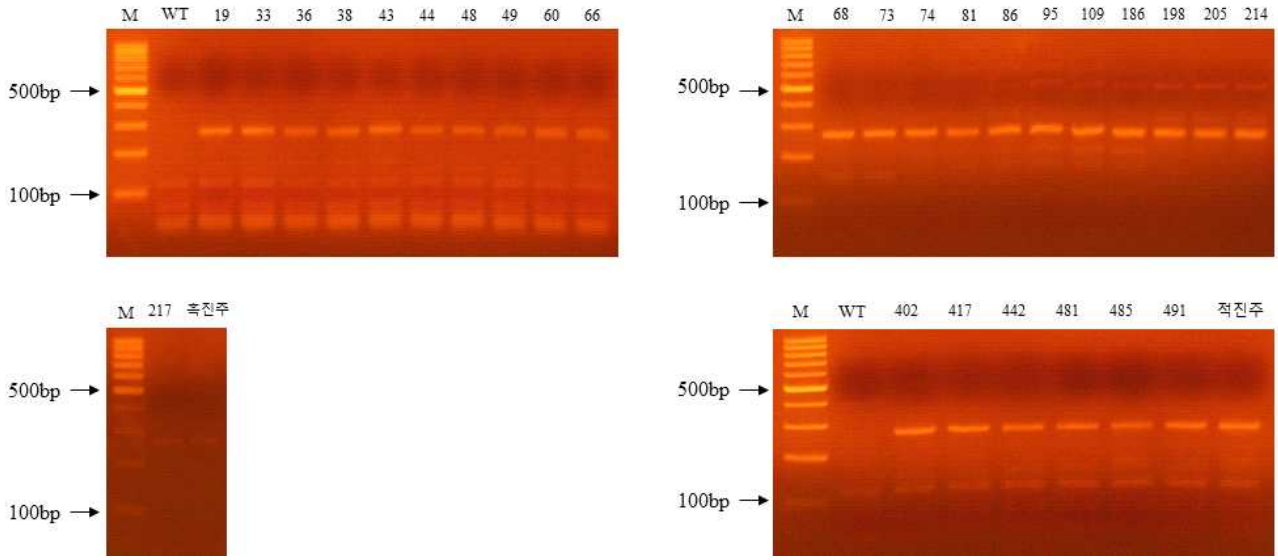


그림 39. 적색미와 갈색미 선별 프라이머(go2)를 이용한 PCR 반복 재현성 검정.

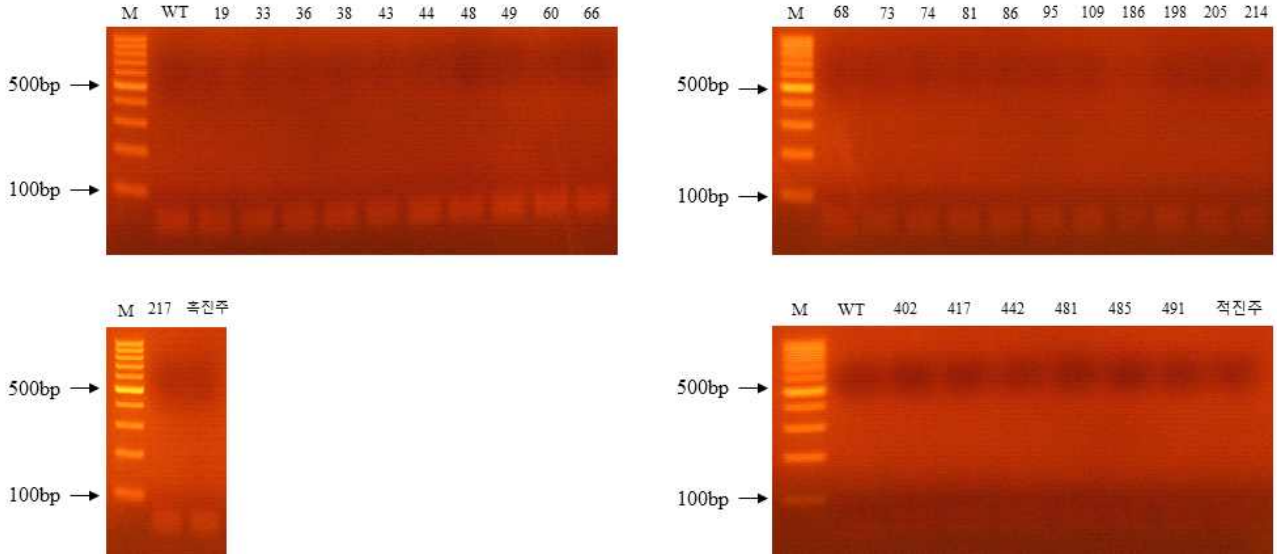


그림 40. 적색미와 갈색미 선별 프라이머(stop1)를 이용한 PCR 반복 재현성 검정.

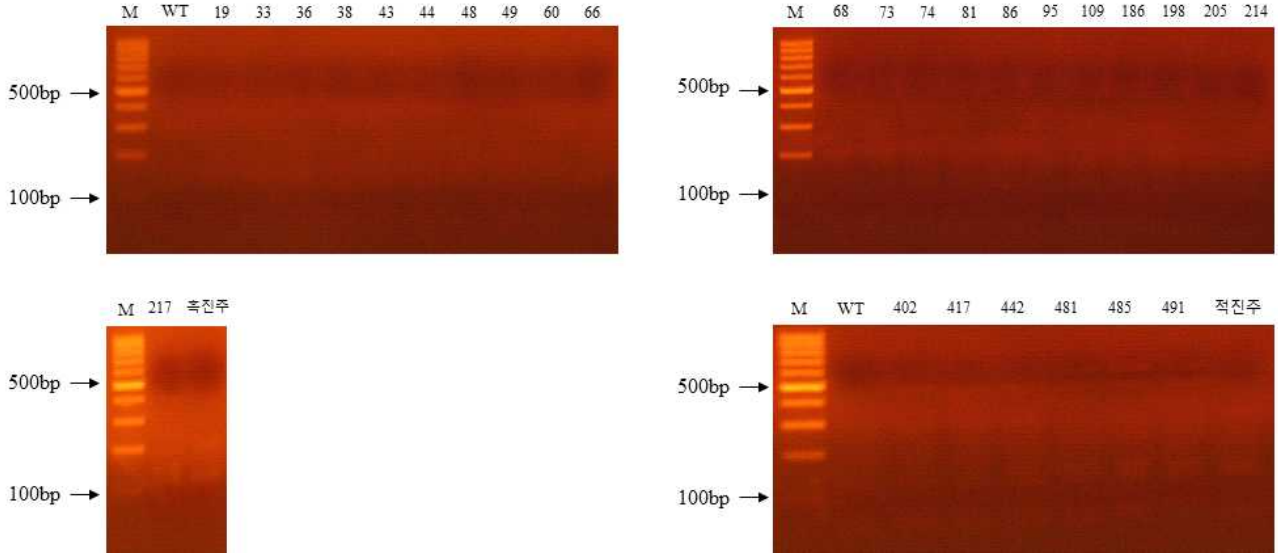


그림 41. 적색미와 갈색미 선별 프라이머(stop2)를 이용한 PCR 반복 재현성 검정.

본 연구에서 microsatellite 마커의 genotype에 의해 작성된 dendrogram을 분석해 보면 벼 품종의 생태형이 비슷하거나, 생장 환경 그리고 품종의 육성에 이용된 교배 모본의 계보가 유사한 품종들이 동일한 그룹 내에 위치하는 것으로 확인 되었다. UPGMA 분석을 통한 dendrogram을 작성했을 때 Ⅰ그룹에는 인도네시아, 말레이시아, 필리핀, 태국과 같은 동남아시아 지역에서 재배되는 유전자원들이 포함되었고 Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ그룹에는 일본, 중국, 한국의 동아시아 지역에서 재배되는 유전자원들이 포함되었다. 이러한 결과는 다른 연구자들이 연구한 결과와 마찬가지로 품종들이 만들어진 모본과 부본에 따라서 구분 되거나, 품종들이 재배되는 지역의 환경 또는 벼의 분류 형태에 따라서 나뉘어 졌고 (표 11), 1세부의

분자생물학적 특성과 기능성 성분 함량이 높은 우수계통을 선발하여 증식하였다(표12). 따라서 새로운 환경에서 자랄 수 있는 품종을 육성하고자 할 때 본 연구 결과를 활용하여 모본과 부본을 선택한다면 조금 더 효율적인 육종 결과가 나타날 것으로 예측된다.

표 11. 분자마커를 활용한 유색미 품종들의 germplams 분석

No.	Source of seed	Country code	Country	Cluster
001	Jilin collection #7(Black Aromatic Waxy 1)	CHN	China	Ⅰ
002	Jilin collection #6(Black Aromatic3)	KOR	Korea	Ⅲ
003	Jilin collection #5(Black Aromatic 2)	CHN	China	Ⅰ
004	Jilin collection #4(Black Aromatic 1)	CHN	China	Ⅰ
005	Jilin collection #8(Black Aromatic Waxy 2)	CHN	China	Ⅰ
006	Heimi F-8	CHN	China	Ⅰ
007	Mixed in Guongzuonmi #12	CHN	China	Ⅰ
008	Jilin collection #3(Heimi 3)	CHN	China	Ⅰ
009	Jilin collection #2(Heimi 2)	CHN	China	Ⅰ
010	Nanjing Xiang dao	CHN	China	Ⅰ
011	Mixed in Guongzuonmi #13	CHN	China	Ⅲ
012	ChoongBuk Collection	KOR	Korea	Ⅲ
013	Mixed in Guongzuonmi #8	CHN	China	Ⅰ
014	JBR # 12	IDN	Indonesia	Ⅲ
015	Beijing collection #47	CHN	China	Ⅲ
016	Beijing collection #9	CHN	China	Ⅰ
017	Guongzuonmi(Miyazaki Univ.)	CHN	China	Ⅰ
018	Hei Mi	CHN	China	Ⅰ
019	Beijing collection #8	CHN	China	Ⅲ
020	Mixed in Jindo Collection #18	KOR	China	Ⅰ
021	Beijing collection #15	CHN	China	Ⅲ
022	Beijing collection #16	CHN	China	Ⅲ
023	Beijing collection #18	CHN	China	Ⅲ
024	Beijing collection #6	CHN	China	Ⅲ
025	Jindo Collection(상해향혈나?)	KOR	China	Ⅰ
026	Jahyangdo	CHN	China	Ⅰ
027	Cambodia Coll.(Ta Khmau Market)	KHM	Cambodia	Ⅰ
028	Hei Bao	CHN	China	Ⅲ
029	Beijing collection #38	CHN	China	Ⅲ
030	Guongzuonmi Separated 1	CHN	China	Ⅰ
031	Jilin Heimi	CHN	China	Ⅲ
032	Beijing collection #14	CHN	China	Ⅲ
033	Abhyeulna	CHN	China	Ⅲ
034	Goheung Collection	KOR	Korea	Ⅲ
035	Waitou Murasaki Daikoku	JPN	Japan	Ⅲ
036	Beijing collection #13	CHN	China	Ⅲ

037	Cambodia Coll.(Takov Village)	KHM	Cambodia	Ⅲ
038	Mixed in Jindo Collection #23	KOR	Korea	Ⅲ
039	Shanghai Collection #15	CHN	China	Ⅰ
040	Jahyangna	CHN	China	Ⅰ
041	Beijing collection #48	CHN	China	Ⅰ
042	Beijing collection #12	CHN	China	Ⅰ
043	Zaliang	CHN	China	Ⅰ
044	Mixed in Jindo Collection #1	KOR	Korea	Ⅲ
045	Beijing collection #3	CHN	China	Ⅰ
046	JBR # 7	IDN	Indonesia	Ⅲ
047	Shanghai Collection #12	CHN	China	Ⅰ
048	Beijing collection #7	CHN	China	Ⅲ
049	Beijing collection #17	CHN	China	Ⅲ
050	Mixed in Jindo Collection #11	KOR	Korea	Ⅰ
051	JBR # 4	IDN	Indonesia	Ⅲ
052	Hoijinheukmi	KOR	Korea	Ⅰ
053	Mixed in Jindo Collection #19	KOR	Korea	Ⅰ
054	Shanghai Collection #16	CHN	China	Ⅲ
055	Mixed in Jindo Collection #17	KOR	Korea	Ⅲ
056	JBR # 3	IDN	Indonesia	Ⅲ
057	Yeon Nong Heug #1	KOR	Korea	Ⅲ
058	Guongzuonmi(Kyushu Univ.)	CHN	China	Ⅰ
059	Beijing collection #42	CHN	China	Ⅲ
060	Beijing collection #37	CHN	China	Ⅰ
061	Beijing collection #44	CHN	China	Ⅲ
062	Heuk woo jom #1	KOR	Korea	Ⅲ
063	Shanghai Collection #19	CHN	China	Ⅰ
064	Hei Zuon Mi	CHN	China	Ⅰ
065	Beijing collection #5	CHN	China	Ⅲ
066	Beijing collection #21	CHN	China	Ⅰ
067	Beijing collection #22	CHN	China	Ⅲ
068	JUKU	JPN	Japan	Ⅲ
069	Shanghai Collection #17	CHN	China	Ⅰ
070	Shanghai Collection #6	CHN	China	Ⅰ
071	Mixed in Jindo Collection #21	KOR	Korea	Ⅰ
072	Beijing collection #26	CHN	China	Ⅲ
073	Beijing collection #39	CHN	China	Ⅲ
074	Hong Xue Nuo	CHN	China	Ⅰ
075	Beijing collection #1	CHN	China	Ⅰ
076	Hong Xue Nuo	CHN	China	Ⅰ
077	Mixed in Jindo Collection #15	KOR	Korea	Ⅲ
078	Beijing collection #11	CHN	China	Ⅲ

079	Beijing collection #29	CHN	China	Ⅲ
080	Mixed in Jindo Collection #2	KOR	Korea	Ⅰ
081	Mixed in Jindo Collection #16	KOR	Korea	Ⅰ
082	Beijing collection #43	CHN	China	Ⅲ
083	JBR # 9	IDN	Indonesia	Ⅲ
084	Beijing collection #31	CHN	China	Ⅲ
085	Beijing collection #41	CHN	China	Ⅲ
086	Beijing collection #20	CHN	China	Ⅰ
087	Lutao Heimi	CHN	China	Ⅰ
088	Mixed in Jindo Collection #7	KOR	Korea	Ⅲ
089	Cambodia Coll.(Wet Phnom Village)	KHM	Cambodia	Ⅰ
090	Beijing collection #2	CHN	China	Ⅲ
091	Mixed in Jindo Collection #12	KOR	Korea	Ⅲ
092	Beijing collection #19	CHN	China	Ⅳ
093	Beijing collection #30	CHN	China	Ⅲ
094	Mixed in Jindo Collection #22	KOR	Korea	Ⅰ
095	Jajin	CHN	China	Ⅲ
096	Mixed in Jindo Collection #20	KOR	Korea	Ⅰ
097	Mixed in Jindo Collection #13	KOR	Korea	Ⅲ
098	Touhuku 149	JPN	Japan	Ⅲ
099	Mixed in Jindo Collection #10	KOR	Korea	Ⅲ
100	Shanghai Collection #7	CHN	China	Ⅰ
101	Shanghai Collection #18	CHN	China	Ⅰ
102	Beijing collection #27	CHN	China	Ⅲ
103	Beijing collection #4	CHN	China	Ⅳ
104	Shanghai Collection #10	CHN	China	Ⅲ
105	Unknown variety from China #1	CHN	China	Ⅲ
106	Shanghai Collection #3	CHN	China	Ⅰ
107	Beijing collection #35	CHN	China	Ⅲ
108	Beijing collection #32	CHN	China	Ⅲ
109	Shanghai Collection #13	CHN	China	Ⅰ
110	Shanghai Collection #8	CHN	China	Ⅳ
111	JBR # 1	IDN	Indonesia	Ⅲ
112	Beijing collection #40	CHN	China	Ⅲ
113	JBR # 2	IDN	Indonesia	Ⅳ
114	Shanghai Collection #14	CHN	China	Ⅰ
115	JBR # 8	IDN	Indonesia	Ⅲ
116	Beijing collection #25	CHN	China	Ⅲ
117	Murasaki Ine	JPN	Japan	Ⅲ
118	Mixed in Jindo Collection #14	KOR	Korea	Ⅳ
119	Mixed in Jindo Collection #9	KOR	Korea	Ⅲ
120	Shanghai Collection #1	CHN	China	Ⅰ

121	Beijing collection #10	CHN	China	Ⅲ
122	Beijing collection #28	CHN	China	Ⅲ
123	JBR # 6	IDN	Indonesia	Ⅱ
124	Shanghai Collection #5	CHN	China	Ⅰ
125	Beijing collection #34	CHN	China	Ⅰ
126	Meragome	CHN	China	Ⅰ
127	Beijing collection #23	CHN	China	Ⅲ
128	Shanghai Collection #9	CHN	China	Ⅰ
129	Mixed in Jindo Collection #6	KOR	China	Ⅲ
130	Beijing collection #24	CHN	China	Ⅲ
131	JBR # 11	IDN	Indonesia	Ⅲ
132	Shanghai Collection #2	CHN	China	Ⅲ
133	Mixed in Jindo Collection #5	KOR	Korea	Ⅲ
134	Beijing collection #36	CHN	China	Ⅳ
135	Mixed in Jindo Collection #8	KOR	Korea	Ⅲ
136	JBR # 5	CHN	China	Ⅰ
137	Ryung Jin #1	CHN	China	Ⅲ
138	Beijing collection #49	CHN	China	Ⅲ
139	Mixed in Guongzuonmi #2	CHN	China	Ⅰ
140	Mixed in Guongzuonmi #3	CHN	China	Ⅰ
141	Mixed in Guongzuonmi #5	CHN	China	Ⅰ
142	Mixed in Guongzuonmi #10	CHN	China	Ⅰ
143	Guongzuonmi Separated 2	CHN	China	Ⅰ
144	Guongzuonmi Separated 3	CHN	China	Ⅰ
145	Kagosima Collection	CHN	China	Ⅰ
146	Mixed in Guongzuonmi #4	CHN	China	Ⅰ
147	Mixed in Guongzuonmi #9	CHN	China	Ⅰ
148	Mixed in Guongzuonmi #7	CHN	China	Ⅰ
149	Mixed in Guongzuonmi #1	CHN	China	Ⅰ
150	Mixed in Jindo Collection #4	KOR	China	Ⅰ
151	Mixed in Jindo Collection #3	KOR	China	Ⅰ
152	Meisanheiku	CHN	China	Ⅰ
153	Shanghai Collection #11	CHN	China	Ⅰ
154	Mixed in Jindo Collection #24	KOR	Korea	Ⅰ
155	Jilin collection #2(Heimi 1)	CHN	China	Ⅲ
156	Jilin collection #10(Heimi 1)	CHN	China	Ⅲ
157	Jilin collection #11(Heimi 1)	CHN	China	Ⅲ
158	Jilin collection #12(Heimi 1)	CHN	China	Ⅲ
159	Jilin collection #13(Heimi 1)	CHN	China	Ⅲ
160	MALAGKIT PIRURUTONG	PHL	Philippines	Ⅰ
161	NANTON 84	TWN	Taiwan	Ⅰ
162	LUA CHUA CHAN	TWN	Taiwan	Ⅰ

163	KHAO KAM	TWN	Taiwan	Ⅰ
164	KAM DO	IDN	Indonesia	Ⅲ
165	HILL PADI	MYS	Malaysia	Ⅰ
166	PADI SELASAH	IDN	Indonesia	Ⅰ
167	MITAK	IDN	Indonesia	Ⅰ
168	CHAKHAO	IDN	Indonesia	Ⅰ
169	PADI ITAM	MYS	Malaysia	Ⅰ
170	PADI ADONG DUMARAT	MYS	Malaysia	Ⅰ
171	PADI ARONG 1	MYS	Malaysia	Ⅰ
172	KETAN IRENG	IDN	Indonesia	Ⅰ
173	KU59	THA	Tailand	Ⅰ
174	KU72-3	THA	Tailand	Ⅰ
175	GIANTI	IDN	Indonesia	Ⅰ
176	K. BULU SOPONJONO	IDN	Indonesia	Ⅰ
177	KETAN BLAWU	IDN	Indonesia	Ⅰ
178	KETAN DJINTEN	IDN	Indonesia	Ⅰ
179	KETAN HIDEUNG	IDN	Indonesia	Ⅲ
180	NEP THAN	VNM	Vietnam	Ⅲ
181	NEP CAM	VNM	Vietnam	Ⅲ
182	PIRURUTONG	PHL	Philippines	Ⅲ
183	JANAWNA	THA	Tailand	Ⅲ
184	KHAO' NIAW DAM	THA	Tailand	Ⅰ
185	NIAW RAI 1	THA	Tailand	Ⅰ
186	AEN METAN	IDN	Indonesia	Ⅰ
187	DALAM HITAM	IDN	Indonesia	Ⅰ
188	KEAREN HITAM	IDN	Indonesia	Ⅰ
189	KETAN ARAM	IDN	Indonesia	Ⅰ
190	KETAN DJINTEN	IDN	Indonesia	Ⅰ
191	KETAN HITAM	IDN	Indonesia	Ⅰ
192	KETAN HITAM	IDN	Indonesia	Ⅰ
193	KETAN IRENG	IDN	Indonesia	Ⅲ
194	KETAN ITAM	IDN	Indonesia	Ⅰ
195	KETAN ITEM BIASA	IDN	Indonesia	Ⅰ
196	KETAN KUWULE	IDN	Indonesia	Ⅰ
197	KETAN MARI KANGEN	IDN	Indonesia	Ⅰ
198	KETAN MURENG	IDN	Indonesia	Ⅰ
199	LEKE MEE	IDN	Indonesia	Ⅰ
200	PADI HITAM	MYS	Malaysia	Ⅰ
201	PADI IRENG	MYS	Malaysia	Ⅰ
202	PARE HIDEUNG	IDN	Indonesia	Ⅰ
203	RUSIP	IDN	Indonesia	Ⅰ
204	LAWANG(GLUT.)	IDN	Indonesia	Ⅰ

205	MAITAMITAM(GLUT)	PHL	Philippines	I
206	LELENG KADARO	PHL	Philippines	I
207	PADI SIARANG	MYS	Malaysia	I
208	PULU BALONG	IDN	Indonesia	I
209	PULU BALONG	IDN	Indonesia	I
210	PULUT HITAM	IDN	Indonesia	I
211	PULUT HITAM	IDN	Indonesia	I
212	SIPULUT BABADJA	IDN	Indonesia	I
213	SIPULUT HITAM	IDN	Indonesia	I
214	SIPULUT HITAM PENDEK	IDN	Indonesia	I
215	PADI HITAM	MYS	Malaysia	I
216	ARC 11700	IDN	Indonesia	I
217	DAMNOEUB KHMAO	KHM	Cambodia	I
218	KETAN HITAM	IDN	Indonesia	I
219	KETAN ITEM-TEGAL ARUM	IDN	Indonesia	I
220	LEUKAT ADANG	IDN	Indonesia	I
221	PULUT HITAM	IDN	Indonesia	I
222	PULUT HITAM	IDN	Indonesia	I
223	JANGGUT BUGIS HITAM	IDN	Indonesia	I
224	PADI HITAM MELAYU	MYS	Malaysia	I
225	SIPULUT HITAM	IDN	Indonesia	I
226	ANE BONAK	IDN	Indonesia	I
227	KETAN HITAM-JALA BUTUN	IDN	Indonesia	I
228	KLAN HAM	IDN	Indonesia	I
229	LEKATAN HITAM	IDN	Indonesia	I
230	MERAH GUJU	IDN	Indonesia	I
231	SIHITAM	IDN	Indonesia	I
232	ASE PULU BOLONG	IDN	Indonesia	I
233	BIU 1	IDN	Indonesia	I
234	PULUT BOLONG	IDN	Indonesia	I
235	WULUMATA	IDN	Indonesia	I
236	KETAN HITAM	IDN	Indonesia	I
237	TININTA	PHL	Philippines	I
238	PAEBIU NGGORUMI-RUMI	IDN	Indonesia	Ⅲ
239	PAEBIU SITORO	IDN	Indonesia	I
240	PAEDAI NDOWATU 2	IDN	Indonesia	I
241	PARE DOLO	IDN	Indonesia	I
242	PULU LOTONG	IDN	Indonesia	I
243	PULU LOTONG	IDN	Indonesia	I
244	PULUT JIN	IDN	Indonesia	I
245	PULUT LELENG	IDN	Indonesia	I
246	PULUT LELENG MALLOYO	IDN	Indonesia	I

247	SANTUBI	IDN	Indonesia	I
248	TINGGA LOKO	IDN	Indonesia	III
249	PULU BOLONG	IDN	Indonesia	I
250	BLE NG TCHANG TE	THA	Tailand	I
251	JA NO NAQ	THA	Tailand	I
252	KAO SIYENG	THA	Tailand	I
253	NIAW GAN-YAH	THA	Tailand	IV
254	BALI	IDN	Indonesia	I
255	CHELOM	PAK	Indonesia	I
256	CHELUM	PAK	Pakistan	I
257	UNNAMED	CHN	China	I
258	HITAM-BIRA MIT	IDN	Indonesia	I
259	KOTU	IDN	Indonesia	I
260	PULUT JIGA	IDN	Indonesia	I
261	BALAKYAR	THA	Tailand	I
262	NGACHEIK	THA	Tailand	I
263	NGACHEIK	THA	Tailand	I
264	NGACHEIK	THA	Tailand	I
265	TAUNG PYONE	MMR	Myanmar	I
266	TAUNGYO NGACHEIK	MMR	Myanmar	I
267	TONKIN	VNM	Vietnam	I
268	YWETPONE	IDN	Indonesia	I
269	HITAM BUBAT	IDN	Indonesia	I
270	KACIAK TARAM	IDN	Indonesia	I
271	SIPULUIK ARANG	IDN	Indonesia	I
272	BULU HITAM	IDN	Indonesia	I
273	KETAN IREN BERDESAN	IDN	Indonesia	I
274	ARC 15014	IDN	Indonesia	I
275	ARC 15172	IDN	Indonesia	I
276	ARC 15222	IDN	Indonesia	I
277	BALLATINAO(DIKET)	PHL	Philippines	I
278	TININTA(MALAGKIT)	PHL	Philippines	I
279	TAPOL(RED)	PHL	Philippines	I
280	KHAO TSIANG	THA	Tailand	I
281	GAM LIANG	THA	Tailand	I
282	GLAM	THA	Tailand	I
283	KHAO GAM	THA	Tailand	I
284	AEB368 RIP P TYPE ADT	MMR	Myanmar	I
285	CHAKHAO	MMR	Myanmar	I
286	CHAKHAOHUIKAP	MMR	Myanmar	I
287	MARAGADAN	PHL	Philippines	I
288	MARAGADAW	PHL	Philippines	I

289	PALAGADAN	IDN	Indonesia	I
290	PALAGADAN	IDN	Indonesia	I
291	SARINGKIT	PHL	Philippines	I
292	TAPUL	PHL	Philippines	I
293	REKET BIDENG	IDN	Indonesia	I
294	NEAW-DUM	IDN	Indonesia	I
295	SUR-SANUR	IDN	Indonesia	I
296	BASTMATI	IDN	Indonesia	I
297	KHAO KUN MY LAY	THA	Tailand	I
298	LE	CHN	China	I
299	MYAYA NGA CHEIK	IDN	Indonesia	I
300	NGA CHEIK KYI	IDN	Indonesia	I
301	SHWE SABAR	MYS	Malaysia	I
302	TAPHAT CHEIK KAUKHNYIN	KHM	Cambodia	IV
303	TAUNG PAW NGA CHEIK	MMR	Myanmar	IV
304	ADONG(H)	PHL	Philippines	IV
305	HITAM PULUT(H)	IDN	Indonesia	I
306	NGA CHEIK PYU	IDN	Indonesia	I
307	E-GLAM	THA	Tailand	I
308	HAWM GAHB BANG	THA	Tailand	I
309	NIAW DAM MA GLEUA	THA	Tailand	I
310	NIAW DAM PLEUAK DAM	THA	Tailand	I
311	POTURU	MYS	Malaysia	I
312	PULUT TINDAL	IDN	Indonesia	I
313	PUTAN SUNDIG	BTN	Bhutan	I
314	TADONG PULUT	MYS	Malaysia	I
315	TADONG PULUT	MYS	Malaysia	I
316	RINDUYUH H	MYS	Malaysia	I
317	PULUT HITAM MELAKA	IDN	Indonesia	I
318	LEKATAN HITAM	IDN	Indonesia	I
319	NEP CAM	VNM	Vietnam	I
320	BIAW GUM GOO	THA	Tailand	I
321	NIAW DAM HAHNG	CHN	China	IV
322	NIAW DAM PLEUAK KHAO	THA	Tailand	I
323	NIAW DAM PUANG	THA	Tailand	I
324	NIAW PLEUAK DAM	THA	Tailand	I
325	PAN NAM TOW	THA	Tailand	I
326	PI MA LA GAW	THA	Tailand	I
327	KAPUGUT	PHL	Philippines	I
328	ADONG	PHL	Philippines	I
329	TADONG	MYS	Malaysia	I
330	KAM	BTN	Bhutan	I

331	INABACA	PHL	Philippines	Ⅰ
332	NEANG YUORN	KHM	Cambodia	Ⅲ
333	MALAGKIT	PHL	Philippines	Ⅰ
334	SABIRARA MARAGKAT	PHL	Philippines	Ⅰ
335	KETAN HITAM 2	IDN	Indonesia	Ⅰ
336	KETAN IRENG 1	IDN	Indonesia	Ⅰ
337	MAUMERE 8	IDN	Indonesia	Ⅰ
338	PARE LOTONG 1	IDN	Indonesia	Ⅰ
339	PARE PULU LOTONG	IDN	Indonesia	Ⅰ
340	PARE PULU LOTONG 1	IDN	Indonesia	Ⅰ
341	ASE PUNU LEKLENG 1	IDN	Indonesia	Ⅰ
342	TADONG	MYS	Malaysia	Ⅰ
343	KAPUGUT	PHL	Philippines	Ⅲ
344	PADI PULUT HARANG	MYS	Malaysia	Ⅰ
345	ADONG	PHL	Philippines	Ⅰ
346	PULUT LAPAUNG	MYS	Malaysia	Ⅰ
347	TADONG	MYS	Malaysia	Ⅲ
348	MALIWARA	PHL	Philippines	Ⅰ
349	PULOT TA METEN	PHL	Philippines	Ⅰ
350	INABACA	PHL	Philippines	Ⅰ
351	MALAGKIT	PHL	Philippines	Ⅰ
352	우한 1	CHN	China	Ⅲ
353	우한 4	CHN	China	Ⅲ
354	백두산 1	CHN	China	Ⅳ
355	일본	JPN	Japan	Ⅲ
356	860036	JPN	Japan	Ⅲ
357	860062	JPN	Japan	Ⅲ
358	JUKU3	JPN	Japan	Ⅲ
359	JUKU4	JPN	Japan	Ⅲ
360	JUKU5	JPN	Japan	Ⅲ
361	JUKU6	JPN	Japan	Ⅲ
362	JUKU7	JPN	Japan	Ⅲ
363	JUKU8	JPN	Japan	Ⅲ
364	JUKU9	JPN	Japan	Ⅲ
365	Gagoshima1	JPN	Japan	Ⅲ
366	Gagoshima5	JPN	Japan	Ⅲ
367	Gagoshima8	JPN	Japan	Ⅲ
368	MALAGKIT 1	PHL	Philippines	Ⅰ
369	Gagoshima10	JPN	Japan	Ⅲ
370	Gagoshima13	JPN	Japan	Ⅲ

371	MALAGKIT 2	PHL	Philippines	Ⅰ
372	Gagoshima14	JPN	Japan	Ⅲ
373	Gagoshima16	JPN	Japan	Ⅲ
374	Gagoshima17	JPN	Japan	Ⅲ
375	Gagoshima18	JPN	Japan	Ⅲ
376	Gagoshima20	JPN	Japan	Ⅲ
377	Chokoto 14	JPN	Japan	Ⅰ
378	Ginkaragsare	KOR	Korea	Ⅳ
379	Hwalohung	KOR	Korea	Ⅰ
380	Jagwangdo	KOR	Korea	Ⅰ
381	PI 160766	CHN	China	Ⅰ
382	Tsital	KOR	Korea	Ⅳ
383	Ssalbyeo 1	KOR	Korea	Ⅲ
384	Ssalbyeo 2	KOR	Korea	Ⅰ
385	Ssalbyeo 3	KOR	Korea	Ⅲ
386	Ssalbyeo 4	KOR	Korea	Ⅳ
387	Ssalbyeo 5	KOR	Korea	Ⅲ
388	Ssalbyeo 6	KOR	Korea	Ⅰ
389	Ssalbyeo 7	KOR	Korea	Ⅲ
390	Ssalbyeo 8	KOR	Korea	Ⅳ
391	Ssalbyeo 9	KOR	Korea	Ⅳ
392	Ssalbyeo 10	KOR	Korea	Ⅲ
393	Ssalbyeo 11	KOR	Korea	Ⅲ
394	Ssalbyeo 12	KOR	Korea	Ⅲ
395	Ssalbyeo 14	KOR	Korea	Ⅱ
396	Ssalbyeo 15	KOR	Korea	Ⅲ
397	Ssalbyeo 16	KOR	Korea	Ⅰ
398	Ssalbyeo 17	KOR	Korea	Ⅳ
399	Ssalbyeo 18	KOR	Korea	Ⅳ
400	Ssalbyeo 19	KOR	Korea	Ⅳ
401	Ssalbyeo 20	KOR	Korea	Ⅰ
402	Ssalbyeo 21	KOR	Korea	Ⅰ
403	Ssalbyeo 22	KOR	Korea	Ⅲ
404	Ssalbyeo 23	KOR	Korea	Ⅳ
405	Ssalbyeo 24	KOR	Korea	Ⅳ
406	Ssalbyeo 25	KOR	Korea	Ⅰ
407	Ssalbyeo 26	KOR	Korea	Ⅰ
408	Ssalbyeo 27	KOR	Korea	Ⅲ
409	Ssalbyeo 28	KOR	Korea	Ⅲ
410	Ssalbyeo 29	KOR	Korea	Ⅳ
411	Ssalbyeo 31	KOR	Korea	Ⅰ
412	Ssalbyeo 33	KOR	Korea	Ⅳ

413	Ssalbyeo 34	KOR	Korea	Ⅰ
414	Ssalbyeo 35	KOR	Korea	Ⅳ
415	Ssalbyeo 36	KOR	Korea	Ⅰ
416	Ssalbyeo 37	KOR	Korea	Ⅳ
417	Ssalbyeo 38	KOR	Korea	Ⅳ
418	Ssalbyeo 39	KOR	Korea	Ⅳ
419	Ssalbyeo 40	KOR	Korea	Ⅳ
420	Ssalbyeo 41	KOR	Korea	Ⅳ
421	Ssalbyeo 41	KOR	Korea	Ⅳ
422	Ssalbyeo 43	KOR	Korea	Ⅰ
423	Ssalbyeo 45	KOR	Korea	Ⅳ
424	Ssalbyeo 46	KOR	Korea	Ⅳ
425	Ssalbyeo 47	KOR	Korea	Ⅳ
426	Ssalbyeo 48	KOR	Korea	Ⅳ
427	Ssalbyeo 49	KOR	Korea	Ⅳ
428	Ssalbyeo 51	KOR	Korea	Ⅲ
429	Ssalbyeo 52	KOR	Korea	Ⅳ
430	Ssalbyeo 53	KOR	Korea	Ⅳ
431	Ssalbyeo 54	KOR	Korea	Ⅰ
432	Ssalbyeo 55	KOR	Korea	Ⅰ
433	Ssalbyeo 56	KOR	Korea	Ⅳ
434	Ssalbyeo 57	KOR	Korea	Ⅳ
435	Ssalbyeo 58	KOR	Korea	Ⅳ
436	Ssalbyeo 59	KOR	Korea	Ⅳ
437	Ssalbyeo 61	KOR	Korea	Ⅰ
438	Ssalbyeo 62	KOR	Korea	Ⅰ
439	Ssalbyeo 63	KOR	Korea	Ⅰ
440	Ssalbyeo 64	KOR	Korea	Ⅰ
441	Ssalbyeo 65	KOR	Korea	Ⅲ
442	Murasaki-ine	JPN	Japan	Ⅳ
443	Murasaki-ine	JPN	Japan	Ⅲ
444	Tzushima-aka	JPN	Japan	Ⅲ
445	Nagasaki	JPN	Japan	Ⅲ
446	Nagasaki	JPN	Japan	Ⅰ
447	Nagasaki	JPN	Japan	Ⅰ
448	Miyazaki	JPN	Japan	Ⅰ
449	Miyazaki	JPN	Japan	Ⅰ
450	Miyazaki	JPN	Japan	Ⅳ
451	Miyazaki	JPN	Japan	Ⅳ
452	Miyazaki	JPN	Japan	Ⅳ
453	Miyazaki	JPN	Japan	Ⅱ
454	Miyazaki	JPN	Japan	Ⅰ

455	Miyazaki	JPN	Japan	Ⅰ
456	Miyazaki	JPN	Japan	Ⅰ
457	Miyazaki	JPN	Japan	Ⅲ
458	Miyazaki	JPN	Japan	Ⅲ
459	Gagoshima	JPN	Japan	Ⅲ
460	Gagoshima	JPN	Japan	Ⅰ
461	Gagoshima	JPN	Japan	Ⅲ
462	Gagoshima	JPN	Japan	Ⅱ
463	Ukinamisyusi	JPN	Japan	Ⅱ
464	Houmanjinzamai	JPN	Japan	Ⅰ
465	Houmanjinzamai	JPN	Japan	Ⅰ
466	Tobousi	JPN	Japan	Ⅰ
467	Douhousi	JPN	Japan	Ⅰ
468	Shiromuro	JPN	Japan	Ⅰ
469	Amamiya	JPN	Japan	Ⅰ
470	Shinoii	JPN	Japan	Ⅰ
471	Shinoii	JPN	Japan	Ⅰ
472	Nakatzu	JPN	Japan	Ⅰ
473	Karashita	JPN	Japan	Ⅰ
474	Karashita	JPN	Japan	Ⅰ
475	Karashita	JPN	Japan	Ⅰ
476	Chouyang	CHN	China	Ⅰ
477	Chouyang	CHN	China	Ⅳ
478	Reisui	JPN	Japan	Ⅰ
479	Akaho	JPN	Japan	Ⅰ
480	Xiaozhandabaimangshuidao	CHN	China	Ⅰ
481	Shengfangmi	CHN	China	Ⅰ
482	Nagohoaka	CHN	China	Ⅰ
483	Okinawazairai	JPN	Japan	Ⅱ
484	Biwakomochi	JPN	Japan	Ⅱ
485	Biwakomochi	JPN	Japan	Ⅱ
486	Hongxuenuo	CHN	China	Ⅰ
487	Akamai B	JPN	Japan	Ⅱ
488	Murasaki sankakuto	JPN	Japan	Ⅰ
489	Murasakiwase	JPN	Japan	Ⅱ
490	Murasaki ban	JPN	Japan	Ⅱ
491	Murasakiban chu	JPN	Japan	Ⅲ
492	Akaimo	JPN	Japan	Ⅰ
493	Tokushima akamai	JPN	Japan	Ⅰ
494	Clustered panicle	JPN	Japan	Ⅰ
495	Tsushima aka	JPN	Japan	Ⅰ
496	Zhongshu sanbailigengdao	CHN	China	Ⅰ

497	Seenatty	LKA	Sri Lanka	Ⅰ
498	Seenatty	LKA	Sri Lanka	Ⅰ
499	Zaoshu lanhou xiandao	CHN	China	Ⅰ
500	Zaoshu pingyangbai xiandao	CHN	China	Ⅰ
501	Zhongshu hongzuiyu gengdao	CHN	China	Ⅰ
502	Zhongshu hongke gengdao	CHN	China	Ⅰ
503	Zhongshu mangke gengdao	JPN	Japan	Ⅲ
504	Wanshu dahongzao gengdao	CHN	China	Ⅰ
505	Ronghedao	CHN	China	Ⅰ
506	Ronghedao1	CHN	China	Ⅰ
507	Carolina	PAK	Pakistan	Ⅰ
508	Chouyang1	CHN	China	Ⅳ
509	East African white	JPN	Japan	Ⅱ
510	Shirori	JPN	Japan	Ⅲ
511	Chouyang2	CHN	China	Ⅳ
512	Hatadani	JPN	Japan	Ⅲ
513	Basmati	IDN	Indonesia	Ⅰ
514	Bawiash murali	JPN	Japan	Ⅲ
515	Black seenatty	LKA	Sri Lanka	Ⅰ
516	Black seenatty	LKA	Sri Lanka	Ⅰ
517	Ronghedao2	CHN	China	Ⅰ
518	Zhongshu hongzuiyu gengdao	CHN	China	Ⅰ
519	Ssalbyeo 60	KOR	Korea	Ⅳ
520	Akamai 65	JPN	Japan	Ⅰ
521	Akamai 66	JPN	Japan	Ⅰ
522	Akamai 67	JPN	Japan	Ⅰ
523	Shirori	JPN	Japan	Ⅲ
524	Shirori	JPN	Japan	Ⅲ
525	Ssalbyeo 61	KOR	Korea	Ⅳ
526	Akamai 68	JPN	Japan	Ⅰ
527	Ssalbyeo 62	KOR	Korea	Ⅳ
528	Shirori	JPN	Japan	Ⅲ
529	Akamai 69	JPN	Japan	Ⅰ
530	Akamai 70	JPN	Japan	Ⅰ
531	Akamai 71	JPN	Japan	Ⅰ
532	Akamai 72	JPN	Japan	Ⅲ
533	R5-Mixed A	JPN	Japan	Ⅲ
534	R5-Mixed B	CHN	China	Ⅳ
535	R5-Mixed C	CHN	Japan	Ⅰ
536	R82-Mixed	JPN	Japan	Ⅰ
537	R98-Mixed	JPN	Japan	Ⅰ
538	R120-Mixed, Awned	JPN	Japan	Ⅰ

539	R123-Mixed, Colored	LKA	Sri Lanka	Ⅰ
540	R139-Mixed	JPN	Japan	Ⅰ
541	R148-Mixed A	JPN	Japan	Ⅱ
542	R148-Mixed B	JPN	Japan	Ⅰ
543	R89-Mixed B	JPN	Japan	Ⅰ
544	R150-Mixed	JPN	Japan	Ⅰ
545	R29-Mixed	KOR	Korea	Ⅲ
546	R34-Mixed	KOR	Korea	Ⅳ
547	R101-Mixed	CHN	China	Ⅰ
548	R164-Mixed	JPN	Japan	Ⅰ

표 12. 기능성물질과 주요농업형질을 고려한 유용계통 선발

계통	안토시아닌 (mg/g)	프로안토시아니딘 (mg/g)	종피색	출수소요일수 (일)	간장(cm)		수장(cm)		천립중(g)		
					평균	표준편차	평균	표준편차	평균	표준편차	분산
동진	0.00	0.18	백미	106	76.7	9.7	21.4	1.2	23.1	0.3	0.2
8	57.92	20.29	흑미	110	94.7	2.1	25.0	1.0	23.2	0.8	0.6
19	11.99	24.75	흑미	110	70.2	2.0	32.8	2.3	26.2	1.1	1.2
30	31.40	32.50	흑미	112	70.0	8.7	27.7	9.1	31.2	0.8	0.6
33	10.63	40.48	흑미	110	66.3	3.2	24.0	3.5	27.2	0.4	0.2
36	13.06	35.75	흑미	109	53.3	5.5	29.3	2.1	27.8	1.0	0.9
38	37.47	47.24	흑미	102	84.0	6.1	24.7	8.5	21.6	1.0	1.0
48	14.92	31.43	흑미	110	62.3	1.5	24.0	8.7	29.2	0.4	0.1
49	60.55	37.91	흑미	110	68.0	12.5	30.7	6.7	21.7	0.7	0.6
59	0.00	3.10	흑미	98	73.3	1.5	27.7	3.2	26.8	0.8	0.7
60	7.15	37.31	흑미	104	78.3	8.4	34.0	8.7	28.8	0.4	0.2
66	27.01	36.88	흑미	110	73.0	9.5	21.0	7.2	27.2	0.3	0.1
68	27.93	32.50	흑미	110	80.3	6.5	20.7	6.1	21.2	0.8	0.7
73	44.13	36.26	흑미	110	71.3	5.7	35.7	8.6	28.5	0.6	0.3
74	42.11	32.97	흑미	106	69.0	8.2	31.0	1.0	25.5	0.2	0.0
81	8.00	41.88	흑미	106	83.0	1.7	24.3	3.2	23.5	0.3	0.1
86	30.27	34.66	흑미	112	76.7	8.5	23.3	3.2	28.5	1.3	1.7
94	0.00	2.95	흑미	98	78.3	4.7	24.0	3.6	31.7	1.0	1.0
95	26.62	39.99	흑미	106	73.0	8.2	26.0	13.9	23.0	1.6	2.4
101	30.88	36.14	흑미	94	84.7	7.6	16.3	8.4	22.3	0.5	0.3
109	56.94	34.19	흑미	110	79.3	13.4	17.3	2.3	22.0	0.7	0.5
112	38.10	33.69	흑미	93	72.0	2.0	28.0	1.0	20.3	0.7	0.5

186	30.50	30.18	흑미	110	61.3	3.1	24.7	4.2	28.4	0.3	0.1
205	40.28	38.57	흑미	110	59.0	2.0	21.7	2.1	29.9	0.8	0.7
214	74.05	34.89	흑미	123	110.7	2.5	41.0	11.5	25.5	0.5	0.2
217	62.93	30.88	흑미	102	80.3	8.1	29.0	4.6	24.2	0.5	0.3
225	29.39	30.77	흑미	104	120.3	3.2	25.0	2.0	24.4	0.5	0.3
329	37.51	29.11	흑미	100	82.7	11.7	49.0	11.5	24.8	0.3	0.1
402	46.23	47.55	적미	106	87.3	5.5	62.3	0.6	27.4	0.4	0.1
408	23.01	45.70	적미	100	101.7	11.2	20.0	5.0	21.9	0.5	0.2
418	24.76	40.54	적미	99	117.7	7.1	23.3	1.5	21.8	0.3	0.1
442	21.45	61.45	적미	102	99.3	4.0	36.7	3.5	21.7	0.0	0.0
468	25.97	45.02	적미	101	116.3	1.5	23.3	0.6	23.3	0.2	0.0
478	25.43	47.59	적미	92	146.3	4.5	22.3	1.5	21.7	0.3	0.1
487	24.17	47.84	적미	90	120.0	2.0	23.0	1.0	25.3	0.7	0.5
491	18.42	23.64	적미	109	81.7	2.1	20.3	0.6	26.0	0.5	0.2
적진주벼	23.74	46.03	적미	114	66.7	4.7	23.0	1.0	26.6	0.2	0.0
적진주찰	20.43	44.14	적미	120	70.7	1.5	25.7	1.2	24.5	0.3	0.1

안토시아닌 및 프로안토시아니딘 함량이 높은 계통간의 인공교배를 통해 얻어진 F1 교배종 종자를 세대진전하여 기능성 물질 및 종피색과 관련된 유전자의 위치를 구체적으로 확인하는데 이용할 예정이다.

그림 42. F1 교배종의 세대진전

3. 기능성 화장품 개발을 위한 기능성 유색미 소재 개발

가. 연구방법

(1) 항산화 활성평가

Electron donating ability assay : Electron donating abilities는 Blois[1958]의 방법으로 다음과 같이 측정. 각 시료용액 100㎕에 0.2mM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl 50㎕ 넣고 교반한 후 30분간 방치한 다음 517㎚에서 흡광도를 측정하였다.

ABTS radical scavenging activity : ABTS radical cation decolorization의 측정은 Pellegrin 등의 방법에 의해 측정. 즉, 7 mM ABTS 5mL와 140mM K2S2O8 88㎕를 ethanol과 약 1:88 비율로 섞어 734nm에서 대조구의 흡광도 값이 0.7±0.002가 되도록 조절한 ABTS solution을 사용. 시료용액 50uL와 ABTS solution 1mL를 혼합하여 30초간 진탕한 후 2.5분간 반응시키고 734nm에서 흡광도를 측정하여 라디칼 소거활성을 계산하였다.

Superoxide dismutase like assay : SOD 유사활성은 Marklund의 방법에 준하여 측정. 각 시료용액 0.2 mL에 Tris-HCl 완충용액 (50mM tris + 10mM EDTA, pH 8.5) 2.6mL와 7.2mM pyrogallol 0.2mL 가하여 25℃에서 10분간 반응시킨 후 1M HCl 0.1mL를 가하여 반응을 정지시키고 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양을 420 nm에서 측정하였음. SOD 유사활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타냈다.

Hydrogen peroxide scavenging assay : Hydrogen peroxide 소거능 실험은 Jayaprakasha 등의 방법에 준하여 측정하였으며, 각 시료용액 0.5ml에 40mM hydrogen peroxide를 가하여 37℃에서 10분간 반응시킨 후 230nm에서 측정하였다.

Reducing power : Reducing power는 Sample 0.1ml와 0.2M Phosphate Buffer 0.4ml, 1% Potassium Ferricyanide 0.5ml를 반응시킨 후, 50℃에서 20분간 반응시킨 후 10% TCA 0.5ml를 가하여 반응을 정지시킨 후 centrifugation 12,000rpm에서 10분간 반응을 하여 supernatant 0.5ml와 distilled water 0.5ml, 0.1% Ferric chloride 0.1ml를 넣고 흡광도 750nm에서 측정하였다.

(2) 미백 활성평가

Tyrosinase inhibition activity assay : Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등의 방법에 따라 측정한다. 반응구는 0.175M sodium phosphate buffer(pH 6.8) 0.5mL에 10mM L-DOPA를 녹인 기질액 0.2mL 및 시료용액 0.1mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase(110U/mL) 0.2mL을 첨가하여 25℃에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475nm에서 측정한다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타냈다.

(3) 주름 억제 활성 평가

Elastase inhibition activitiy assay : Elastase 저해활성 측정은 다음과 같이 측정한다. 추출물을 일정 농도가 되도록 조제하여 0.5 mL씩 시험관에 취하고, 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 porcine pancreas elastase (2.5 U/mL)용액 0.5mL을 가한 후 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 기질 N-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide (0.5 mg/mL)을 첨가하여 20분간 반응시켜 기질로부터 생성되는 p-nitroanilide의 생성량을 405 nm에서 측정한다. Elastase 저해 활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타냈다.

Collagenase inhibition activity assay : Collagenase 저해활성 측정은 다음과 같이 측정한다. 즉 반응구는 0.1 M tris-HCl buffer (pH 7.5)에 4 mM CaCl2를 첨가하여, 4-phenylazobenzyloxycarbonyl

-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (0.3 mg/mL)를 녹인 기질액 0.25 mL 및 시료용액 0.1 mL의 혼합액에 collagenase (0.2 mg/mL) 0.15mL를 첨가하여 실온에서 20분간 정치한 후 6% citric acid 0.5 mL을 넣어 반응을 정지 시킨 후, ethyl acetate 1.5 mL을 첨가하여 320 nm에서 흡광도를 측정한다. Collagenase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타냈다.

(4) 물질의 세포독성 평가

MTT assay : 세포독성 측정은 Carmichael의 방법에 따라 측정. 각 세포주를 96well plate에 $5X10^4$ cells/well이 되게 0.18mL 분주하고, 시료를 농도 별로 조제하여 0.02mL 첨가한 후 37℃, 5% CO2 incubator에서 24시간 배양. 여기에 5mg/mL 농도로 제조한 MTT 용액 0.02mL를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 0.15mL를 가하여 실온에서 30분간 반응 시킨 뒤 ELISA reader로 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

(5) 세포내 항산화 활성평가.

세포내 ROS의 DCF-DA에 의한 spectrofluorimetry 분석 : 세포 독성으로 작용하는 ROS의 축적에 의한 세포 손산을 가져오는 과산화물을 측정하기 위하여 2',7'-dichlorofluoresce-in diacetate(DCF-DA, sigma) 형광염료를 이용하였다(Cabiscol et al 2000). 근접 빛이 차단된 96 well dish에 1×104 cells을 각각 seeding한 후, 각 IDE 처리군 별로 24시간 후, Hank's balanced salt solution(HBSS)로 세포를 세척한 후, deaeration 시킨 800 nM의 DCF-DA를 첨가하여 잘 혼합한 후, 20분간 37℃의 배양기에서 정치하여 반응시켰다. 반응 종료 직후, HBSS와 PBS로 수세하고, Infinite™F200 Pro multiwell plate reader (TECAN, Swiss)를 이용하여 485 nm와 535 nm에서 spectrofluorimetry 분석으로 축적된 ROS에 결합된 형광 DCF-DA를 측정하여 대조군에 대한 상대적인 수치로 나타내었다.

(6) 유산균을 이용한 유색미의 발효

유산균의 선정 : 유산균은 유산을 발효하여 식품의 부패를 방지하고 bacteriocin과 같은 항균물질을 분비하여 식중독균을 억제하고 사람의 장내 pH를 낮추어 장내 부패세균의 증식을 억제하는 등 인체에 기능성을 부여하는 미생물이다. 본 연구에서는 노화방지, 항주름, 미백에 효과가 있는 유색미 추출액에 유산발효 시키기 위해 분리한 여러 유산균들 중에서 MRS 한천배지에서 생육이 좋은 Lactobacillus amylophilus, L. bifermeritans, L. bulga를 선정하여 각각의 균주를 MRS에 접종하여 배양하면서 균의 생육정도를 검토하였다. 우선, 선정한 유산균을 MRS와 1% 유색미 추출액 비율을 0:10부터 5:5까지 다르게 하여 접종하여 실험을 진행하였다.

배양과 접종: 유색미 추출물의 젖산 발효에 *Lactobacillus casei*를 이용하였다. 배양은 액체배지(Sucrose 22.0 g/L, Glucose 5.0g/L, Soypeptone 11.0 g/L, Yeast extract 5.0 g/L, CH_3COONa 2.0 g/L, K_2HPO_4 0.2 g/L, $MgCl_2$ 0.02 g/L)를 이용하였고 2주간 배양하였다.

최적화된 추출물 조건의 발효 : 유색미 추출물은 10X 액체 배지(Sucrose 22.0 g/L, Glucose 5.0g/L, Soypeptone 11.0 g/L, Yeast extract 5.0 g/L, CH_3COONa 2.0 g/L, K_2HPO_4 0.2 g/L, $MgCl_2$ 0.02 g/L)와 혼합하고 멸균 후 pH 6.00으로 조정하였다. 발효는 0, 1, 3, 6일 후 총량 $2.0 \times 10_5$, $1.0 \times 10_6$, $2.0 \times 10_6$ cfu/ml을 기본으로 균 접종하였다.

나. 연구결과

(1) 항산화 관련 실험

① DPPH(2,2-Diphenyl-1-picrythydrazyl) assay

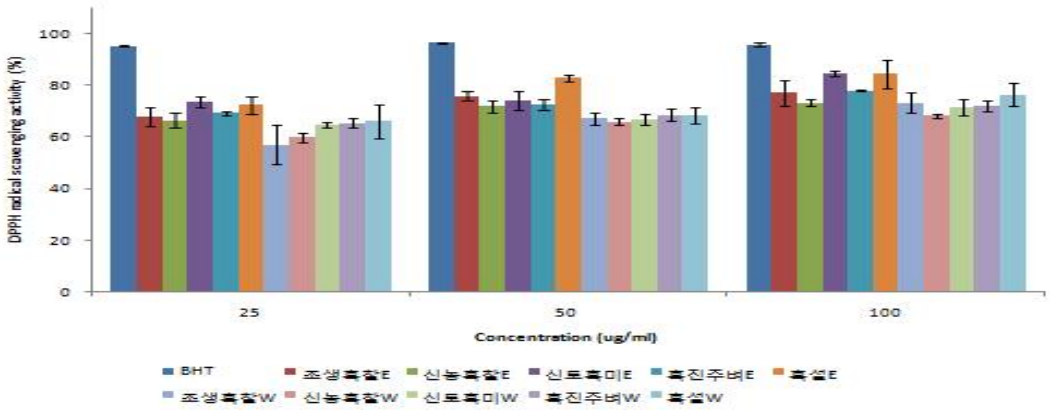


그림 43. 유색미 5종 열수, 에탄올 추출물의 DPPH radical 소거능

② ABTS+ radical scavenging assay

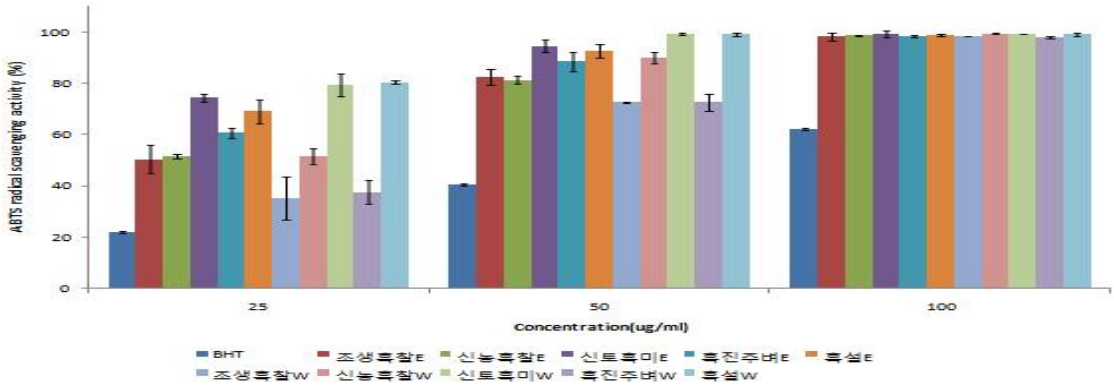


그림 44. 유색미 5종 열수, 에탄올 추출물의 ABTS radical 소거능

③ Superoxide Dismutase like activity assay

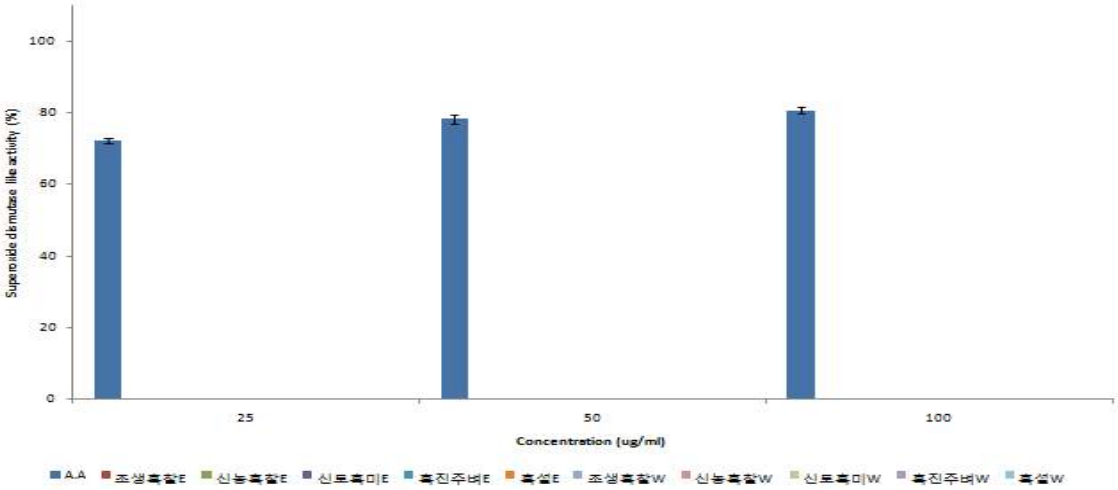


그림 45. 유색미 5종 열수, 에탄올 추출물의 SOD 유사활성능

④ Hydrogen peroxide scavenging activity assay

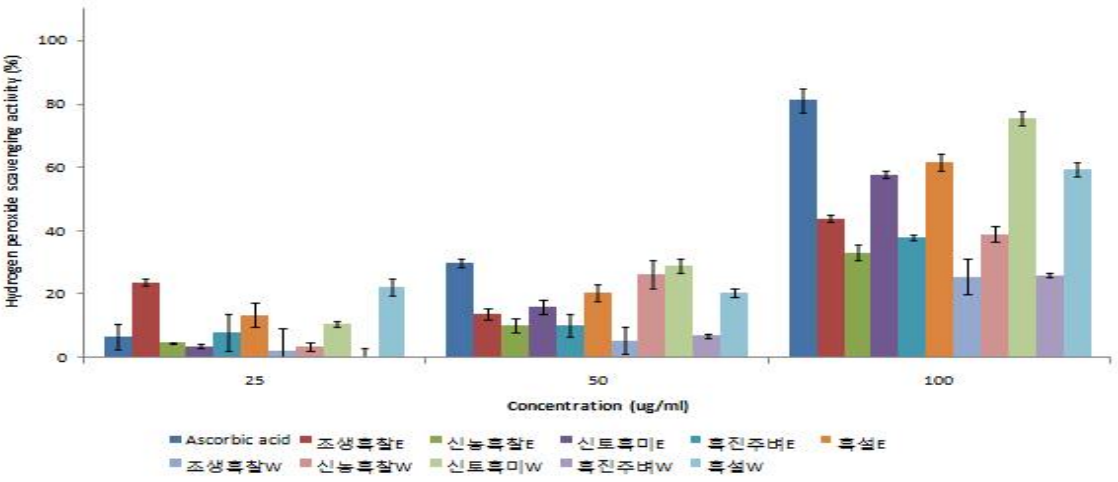


그림 46. 유색미 5종 열수, 에탄올 추출물의 H_2O_2 소거능

⑤ Reducing power assay

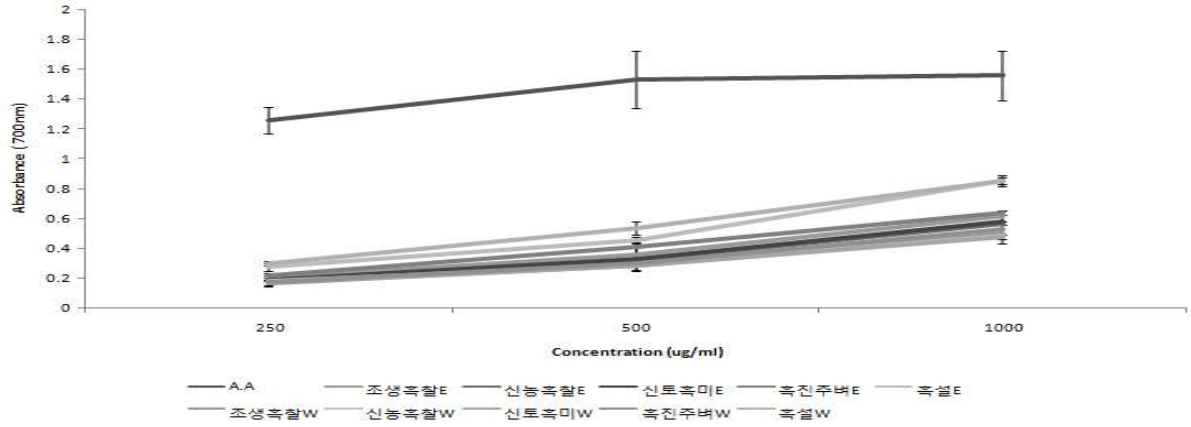


그림 47. 유색미 5종 열수, 에탄올 추출물의 산화철에 대한 환원력

(2) 미백관련 실험

① 실험Tyrosinase Inhibition activity assay

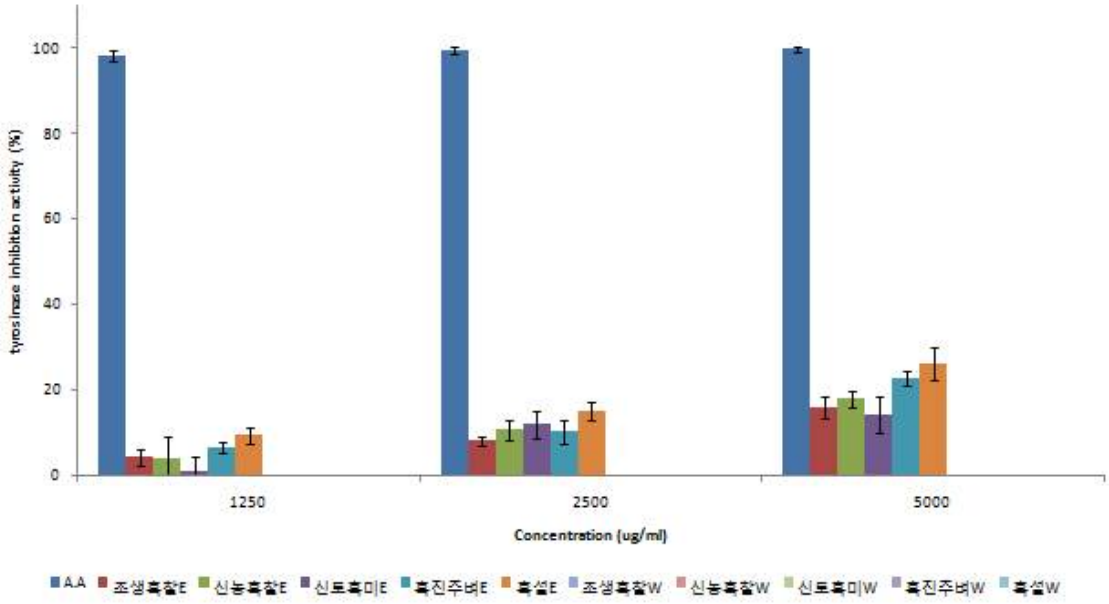


그림 48. 유색미 5종 열수, 에탄올 추출물의 Tyrosinase 저해능

(3) 주름 관련 실험

① Elastase inhibition activity assay

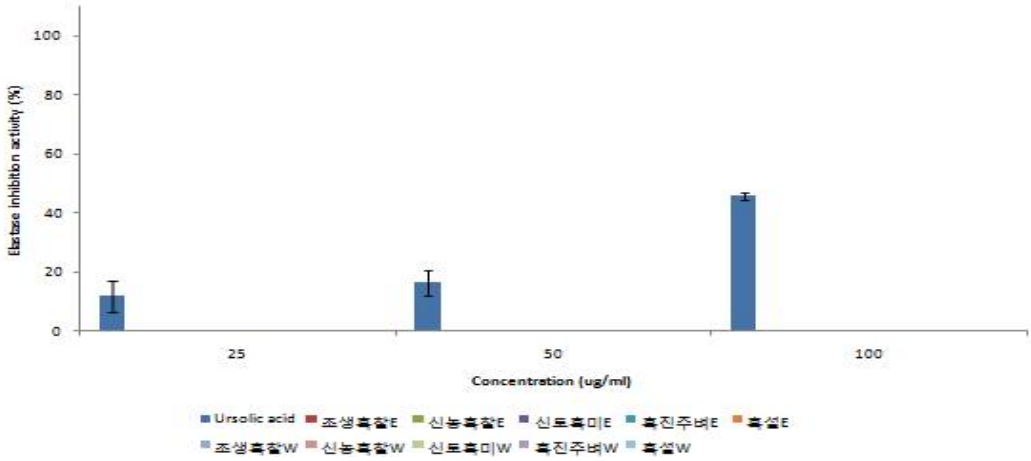


그림 49. 유색미 5종 열수, 에탄올 추출물의 Elastase 억제능

② Collagenase inhibition activity assay

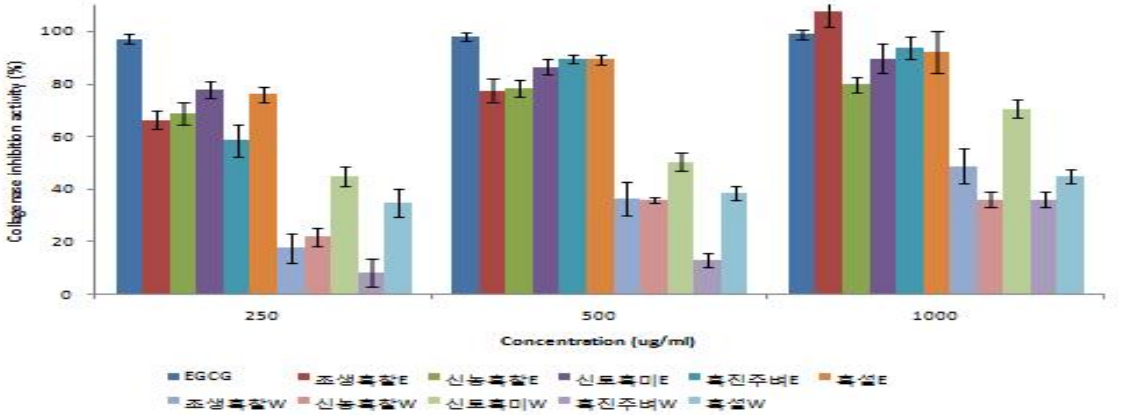


그림 50. 유색미 5종 열수, 에탄올 추출물의 Collagenase 억제능

(4) HaCaT 세포에 대한 세포 생존률 실험

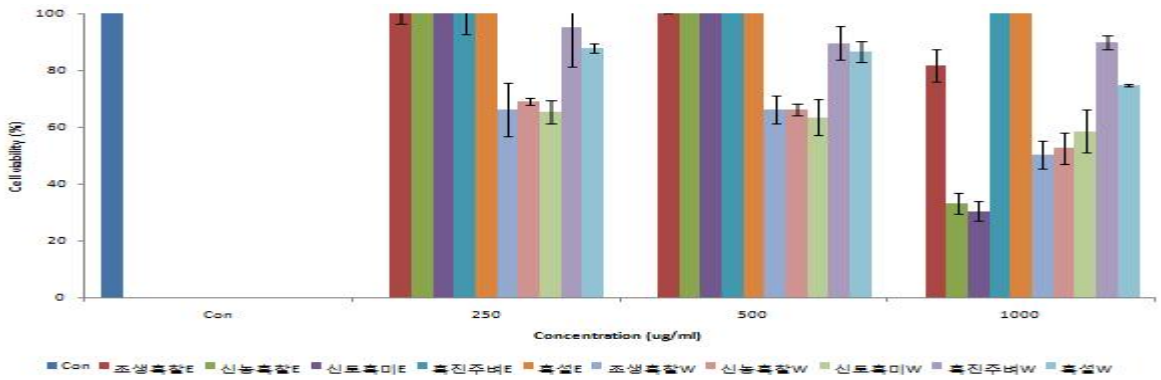


그림 51. 유색미 5종 열수, 에탄올 추출물을 HaCaT 세포에 세포 생존률에 미치는 영향

(5) HaCaT 세포내 ROS의 DCF-DA에 의한 Spectrofluorimetry 분석

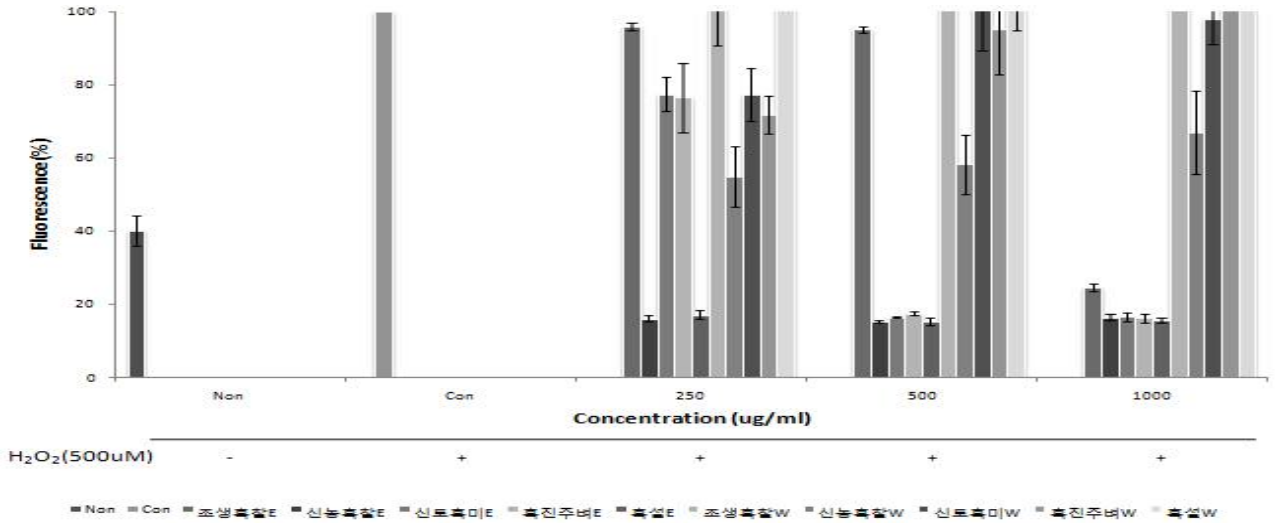


그림 52. 유색미 5종 열수, 에탄올 추출물의 HaCaT세포에서 발생한 ROS 발현량에 대한 형광 분석

선별된 유색미 5종을 열수 추출과 에탄올 추출 2가지 방법을 이용하여 추출을 진행하였으며 항산화, 미백, 항주름 관련 생리활성실험들을 진행하여 screening하였다. 실험에 사용된 10가지 sample들은 대부분 낮은 농도에서 높은 DPPH radical 소거능을 보였으며, 특히 신토흑미E 추출물은 100ppm에서 84.7%로 양성대조군인 BHA가 100ppm에서 95.9%의 소거능을 보인 것과 sample들 중 가장 높은 효과를 보였다(그림 43). ABTS radical scavenging assay에서 25-100ppm의 농도에서 양성 대조군인 BHT 보다 모두 높은 ABTS radical 소거능을 보였다(그림 44). Superoxide Dismutase 유사활성 실험에서는 25-100ppm에서 SOD 유사 활성을 나타내지 않았다(그림 45). Hydrogen peroxide scavenging activity assay에서 sample들 중 100ppm의 농도에서 신토흑미W는 75.6%, 양성대조군인 Ascorbic acid는 81.3%로 실험군들 중 신토흑미W가 가장 양성대조군과 유사한 결과를 보였다(그림 46). Reducing power assay에서 양성 대조군에 비해 실험군들은 산화철에 대하여 높은 환원력을 나타내지 않았으며 실험군들 중 흑설E, 흑설W 추출물이 각각 0.27, 0.29의 흡광도로 비교적 높은 환원력을 나타냈었다(그림 47). 미백관련 실험 중 하나인 Tyrosinase 억제능 실험에서 25-100ppm에서는 활성을 보이지 않아 1250-5000ppm으로 농도를 높여 실험을 진행하였고 그 결과 흑설E이 5000ppm에서 26.2%의 Tyrosinase 억제능을 보였다. (그림 48) 주름관련 실험 중 하나인 Elastase 저해능 실험에서 25-100ppm의 농도에서는 실험군들이 활성을 나타내지 않았다(그림 49). Collagenase 억제능 실험결과 대부분 에탄올 추출물들이 억제활성효과가 높았으며 추출물들 중 250ppm 신토흑미E가 77.8%로 가장 높았으며 농도가 높아질수록 조생흑찰E가 높은 억제능을 보였다(그림 50). 세포독성을 알아보고 앞으로 진행될 세포실험에서의 영향을 관찰하기 위하여 MTT 실험을 사람각질세포인 HaCaT세포를 이용하여 유색미 시료의 세포생존률 실험을 진행한 결과 흑진주벼E, 흑설E 추출물은 1000ppm의 농도에서 세포 생존률을 저해시키지 않았으며 조생흑찰 W, 신농흑찰W, 신토흑미W는 250ppm-1000ppm의 농도에서 80%이하의 세포생존률을 보였다(그림 51). HaCaT 세포에 DCF-DA를 적용시킨후 H_2O_2를 이용하여 ROS를 발현시켜 유색미가 ROS 발현에 대한 영향을 실험한

결과 에탄올 추출물들은 대부분 농도 의존적으로 높은 활성산소종 발현 억제를 보였는데 그 중 신농흑찰E, 흑설E가 250ppm에서 각각 83.7%, 82.8%의 억제효과를 나타내었다. 열수추출물들은 대부분 효과를 나타내지 않았으며 신농흑찰W만이 다소의 효능을 나타내었다(그림 52).

다. 선발된 유색미 개체를 사람의 세포에 적용하여 유효성 평가

(1) 항주름 평가

① MTT assay : 세포독성 측정은 Carmichael의 방법에 따라 측정하였다. HaCaT cell을 96well plate에 5×10^4 cells/ml이 되게 200㎕ 분주하고, serum free 후 배지 180㎕에 시료를 농도 별로 조제하여 20㎕ 첨가한 후 37℃, 5% CO2 incubator에서 24시간 배양한다. 그 후 5mg/mL 농도로 제조한 MTT 용액을 20㎕ 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO+EtOH(1:1) 용액을 200㎕를 가하여 실온에서 차광하여 30분간 반응 시킨 뒤 ELISA reader로 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

② Western Blot Analysis : 세포를 100mm dish에 1×10^5 cells/ml 농도로 접종하여 각각의 시료를 50, 75, 100 ㎍/mL로 처리한 후 24h 배양 후 세포를 회수하였다. 각각의 세포에 RIPA buffer를 첨가하여 4°C, 14000rpm, 15min 동안 원심분리하여 상등액을 모았다. 단백질 정량은 BSA assay로 정량하였고, 각 시료를 12% polyacrylamide gel에서 전기영동하였다. Nitrocellulose membrane로 전사한 후 전사된 NC membrane을 5% skim milk blocking buffer(0.1% Tween 20 in Tris-buggered saline)에서 blocking 하였고, β-Actin, p-p38, p-ERK 1/2, p-JNK 항체를 1:1000으로 희석하여 O/N으로 반응시킨 후 2차 항체를 1:1000으로 희석하여 4시간 반응한 다음 ELC 용액을 1:1로 섞어 NC membrane을 발광시킨 후 Western imaging system기기로 현상하였다.

③ RT-PCR : High Pure RNA Isolation Kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)를 사용하여 각 세포로부터 total RNA를 분리하고 A260/280의 비율로 순도를 확인하였다. cDNA 합성은 total RNA (2 ㎍/㎕)를 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Molecular Biochemicals)를 사용하였고 cDNA는 −20℃에서 보관하였다. 얻어진 cDNA를 primer로 증폭 시키고, 증폭 된 DNA(60s 95℃, 60s 60℃, 60s 72℃, 40 cycle로 증폭)는 1.2% Agarose gel로 전기영동 한 후 gel을 ethidium bromide로 염색하여 DNA band의 발광 강도를 확인하였다. 발광 강도는 Molecular Analyst 소프트웨어가 있는 ATTO 기계를 사용하여 측정하였다.

④ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) : HaCaT cell을 배양한 배지에 분비 된 MMP-1, MMP-2, MMP-9를 Sigma Chemical Co. (St, Louis, MO, USA)로부터 구입 한 민감한 ELISA 검정 키트를 사용하여 정량화 하였다.

(2) 항산화 평가

① Electron donating ability assay : Electron donating abilitiy는 Blois[1958]의 방법으로 다음과 같이 측정하였다. 농도별 각 시료용액 100㎕에 0.2mM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl 50㎕ 넣고 30분간 차광하여 반응한 후 517㎚에서 흡광도를 측정하였다.

② $ABTS^+$ radical scavenging activity : $ABTS^+$ radical cation decolorization의 측정은 Pellegrin 등의 방법에 의해 측정하였다. 즉, 7 .4mM 2.2-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonicacid) 10mL과 2.6mM Potassium persulfate 10ml을 1:1 비율로 섞어 734nm에서 대조군의 흡광도 값이

0.706±0.001가 되도록 조절한 ABTS solution을 사용하였다. 시료용액 100㎕와 ABTS solution 100㎕를 혼합하여 1분간 반응한 후 734nm에서 흡광도를 측정하여 라디칼 소거활성을 계산하였다.

③ MTT assay : 세포독성 측정은 Carmichael의 방법에 따라 측정하였다. HaCaT cell을 96well plate에 5×10^4 cells/ml이 되게 200㎕ 분주하고, serum free 후 배지 180㎕에 시료를 농도별로 조제하여 20㎕ 첨가한 후 37℃, 5% CO2 incubator에서 24시간 배양한다. 그 후 5mg/mL 농도로 제조한 MTT 용액을 20㎕ 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO+EtOH(1:1) 용액을 200㎕를 가하여 실온에서 차광하여 30분간 반응 시킨 뒤 ELISA reader로 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

④ Western Blot Analysis : 세포를 100mm dish에 1×10^5 cells/ml 농도로 접종하여 각각의 시료를 50, 75, 100 ㎍/mL로 처리한 후 24h 배양 후 세포를 회수하였다. 각각의 세포에 RIPA buffer를 첨가하여 4°C, 14000rpm, 15min 동안 원심분리하여 상등액을 모았다. 단백질 정량은 BSA assay로 정량하였고, 각 시료를 12% polyacrylamide gel에서 전기영동하였다. Nitrocellulose membrane로 전사한 후 전사된 NC membrane을 5% skim milk blocking buffer(0.1% Tween 20 in Tris-buggered saline)에서 blocking 하였고, β-Actin, p-p38, p-ERK 1/2, p-JNK 항체를 1:1000으로 희석하여 O/N으로 반응시킨 후 2차 항체를 1:1000으로 희석하여 4시간 반응한 다음 ELC 용액을 1:1로 섞어 NC membrane을 발광시킨 후 Western imaging system기기로 현상하였다.

라. 유색미(쌀겨) 개체 중 기능성이 뛰어난 추가 개체 선발

(1) 항산화 활성평가

① Electron donating ability assay : Electron donating abilities는 Blois[1958]의 방법으로 다음과 같이 측정. 각 시료용액 100㎕에 0.2mM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl 50㎕ 넣고 교반한 후 30분간 방치한 다음 517㎚에서 흡광도를 측정하였다.

② ABTS radical scavenging activity : ABTS radical cation decolorization의 측정은 Pellegrin 등의 방법에 의해 측정. 즉, 7 mM ABTS 5mL와 140mM K2S2O8 88㎕를 ethanol과 약 1:88 비율로 섞어 734nm에서 대조구의 흡광도 값이 0.7±0.002가 되도록 조절한 ABTS solution을 사용. 시료용액 50uL와 ABTS solution 1mL를 혼합하여 30초간 진탕한 후 2.5분간 반응시키고 734nm에서 흡광도를 측정하여 라디칼 소거활성을 계산하였다.

③ Superoxide dismutase like assay : SOD 유사활성은 Marklund의 방법에 준하여 측정. 각 시료용액 0.2 mL에 Tris-HCl 완충용액 (50mM tris + 10mM EDTA, pH 8.5) 2.6mL와 7.2mM pyrogallol 0.2mL 가하여 25℃에서 10분간 반응시킨 후 1M HCl 0.1mL를 가하여 반응을 정지시키고 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양을 420 nm에서 측정하였음. SOD 유사활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

④ Hydrogen peroxide scavenging assay : Hydrogen peroxide 소거능 실험은 Jayaprakasha 등의 방법에 준하여 측정하였으며, 각 시료용액 0.5ml에 40mM hydrogen peroxide를 가하여 37℃에서 10분간 반응시킨 후 230nm에서 측정하였다.

(2) 미백 활성평가

① Tyrosinase inhibition activity assay : Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등의 방법에 따라 측정한다. 반응구는 0.175M sodium phosphate buffer(pH 6.8) 0.5mL에 10mM L-DOPA를 녹인 기질액 0.2mL 및 시료용액 0.1mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase(110U/mL) 0.2mL을 첨가하여 25℃에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475nm에서 측정한다. Tyrosinase 저해

활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

(3) 주름 억제 활성 평가

① Elastase inhibition activitiy assay : Elastase 저해활성 측정은 다음과 같이 측정한다. 추출물을 일정 농도가 되도록 조제하여 0.5 mL씩 시험관에 취하고, 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 porcine pancreas elastase (2.5U/mL)용액 0.5mL을 가한 후 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 기질 N-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide (0.5mg/mL)을 첨가하여 20분간 반응시켜 기질로부터 생성되는 p-nitroanilide의 생성량을 405 nm에서 측정한다. Elastase 저해 활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

② Collagenase inhibition activity assay : Collagenase 저해활성 측정은 다음과 같이 측정한다. 즉 반응구는 0.1M tris-HCl buffer (pH 7.5)에 4mM CaCl2를 첨가하여, 4-phenylazobenzyloxycarbonyl -Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (0.3 mg/mL)를 녹인 기질액 0.25 mL 및 시료용액 0.1 mL의 혼합액에 collagenase (0.2 mg/mL) 0.15mL를 첨가하여 실온에서 20분간 정치한 후 6% citric acid 0.5 mL을 넣어 반응을 정지 시킨 후, ethyl acetate 1.5 mL을 첨가하여 320 nm에서 흡광도를 측정한다. Collagenase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

마. 유색미 유전자원의 유효성 평가

(1) 흑설의 항주름 활성 평가

① MTT assay

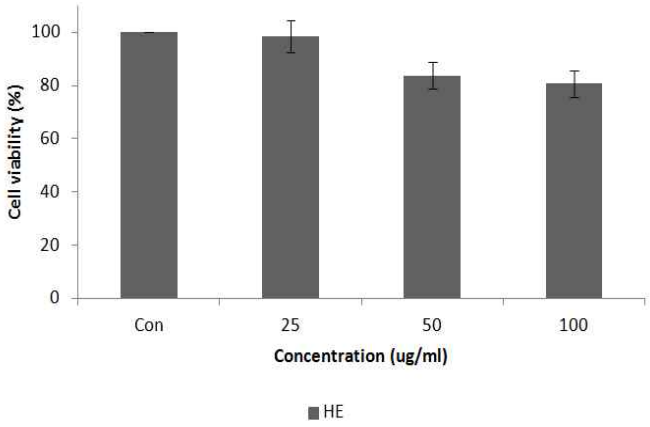


그림 53. Cell viability of colored rice extract on HaCaT cells

Con : Non treated colored rice extract, HE : 70% ethanol extracts of Heugseol, Result are means ± S.D. of triplicate data.

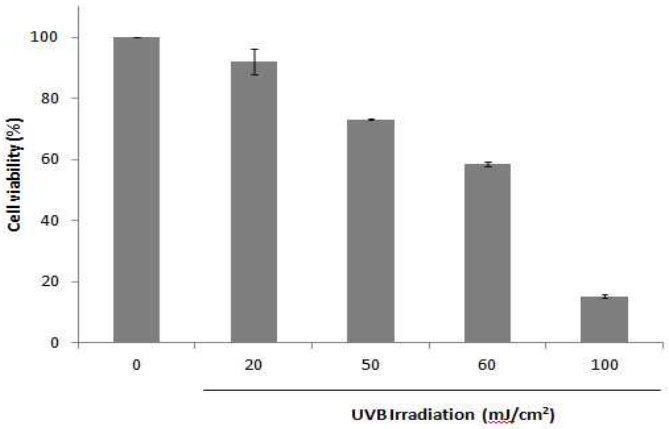


그림 54. Cell viability of colored rice extract on induced-UVB HaCaT cells. Result are means ± S.D. of triplicate data.

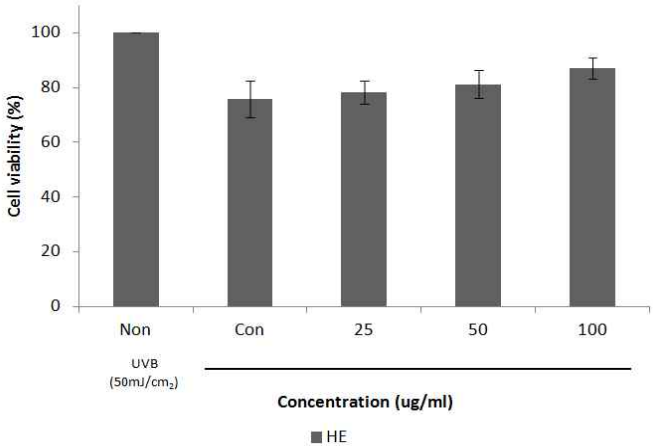


그림 55. Cell viability of colored rice extract on induced-UVB HaCaT cells

Non : Non treated UVB, Con : Irradiated UVB(50mJ/cm^2), HE : 70% ethanol extracts of Heugseol, Result are means ± S.D. of triplicate data.

② Western Blot Analysis

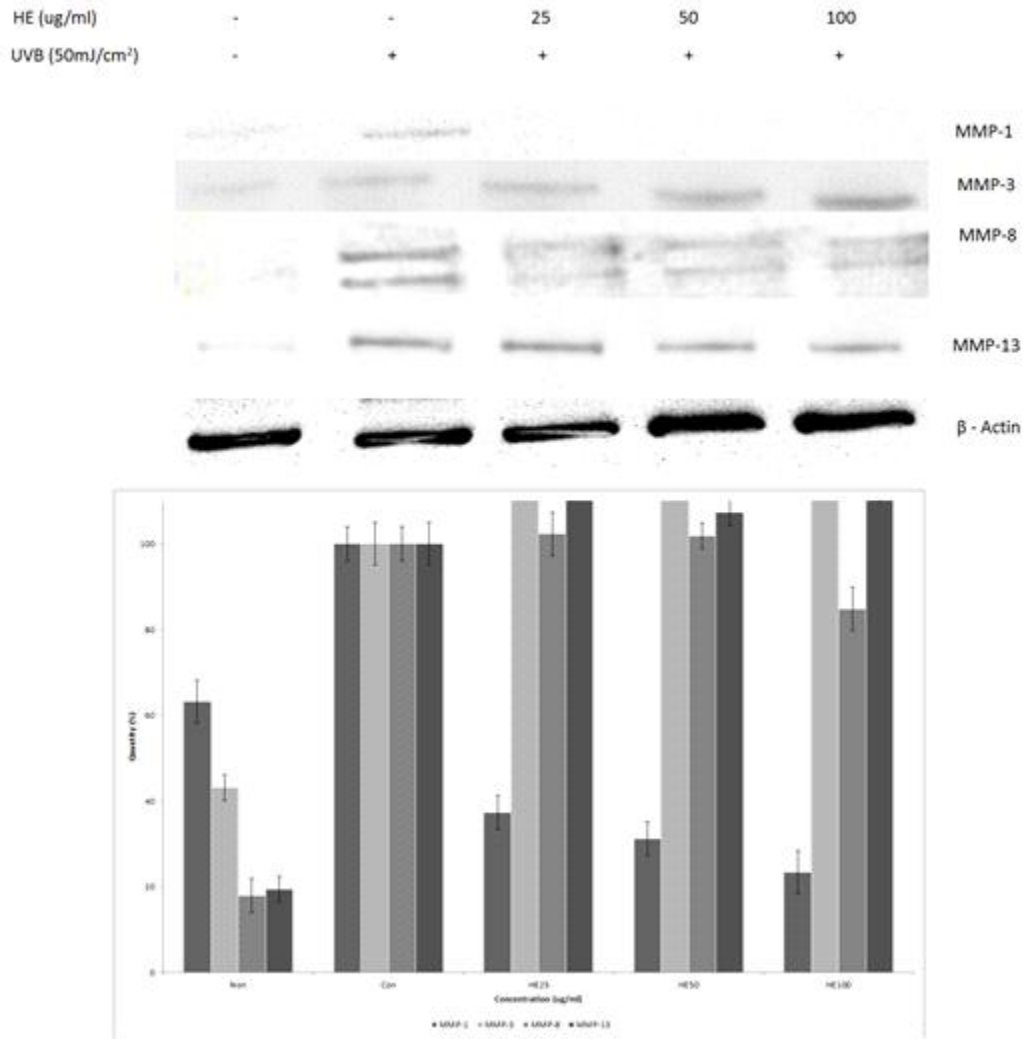


그림 56. Effects of HE on MMPs protein expression in UVB-induced HaCaT cells
Non : Non treated UVB, Con : Treated UVB(50mJ/cm^2), HE25 : Treated UVB (50mJ/cm^2)+ 70% ethanol extracts of Heugseol (25ug/ml), HE50 : Treated UVB (50mJ/cm^2)+ 70% ethanol extracts of Heugseol (50ug/ml), HE100 : Treated UVB (50mJ/cm^2)+ 70% ethanol extracts of Heugseol (100ug/ml). Result are means ± S.D. of triplicate data.

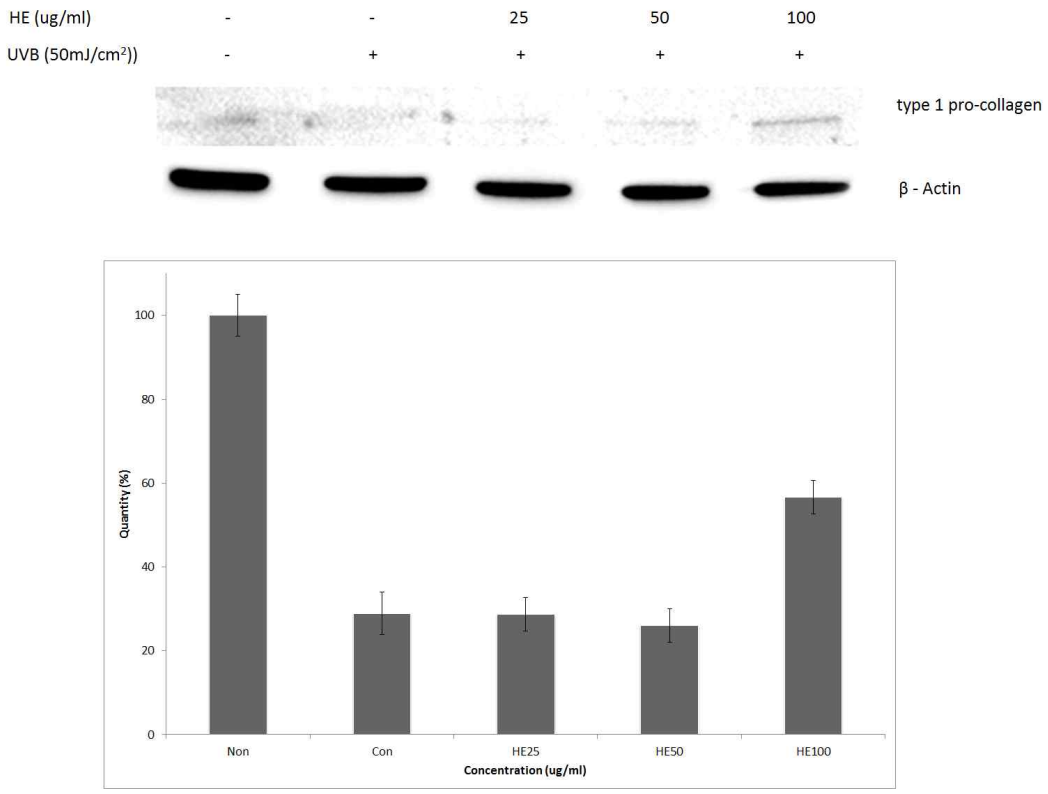


그림 57. Effects of HE on the type 1 pro-collagen protein expression in UVB-induced HaCaT cells Non : Non treated UVB, Con : Treated UVB(50mJ/cm^2), HE25 : Treated UVB (50mJ/cm^2)+ 70% ethanol extracts of Heugseol (25ug/ml), HE50 : Treated UVB (50mJ/cm^2)+ 70% ethanol extracts of Heugseol (50ug/ml), HE100 : Treated UVB (50mJ/cm^2)+ 70% ethanol extracts of Heugseol (100ug/ml). Result are means ± S.D. of triplicate data.

③ Reverse transcription(RT)-PCR

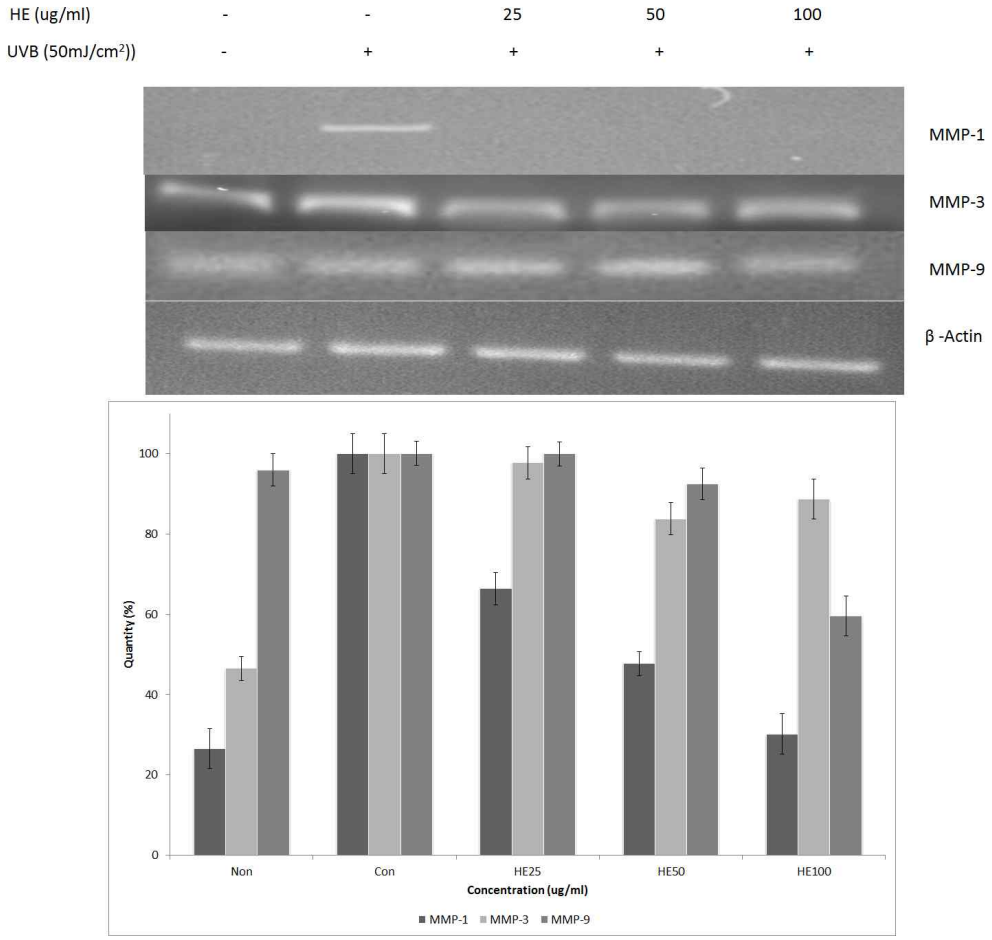


그림 58. Effects of 70% Ethanol extract of Heugseol on MMPs mRNA expression in UVB-induced HaCaT cells

Non : Non treated UVB, Con : Treated UVB(50mJ/cm^2), HE25 : Treated UVB (50mJ/cm^2)+ 70% ethanol extracts of Heugseol (25ug/ml), HE50 : Treated UVB (50mJ/cm^2)+ 70% ethanol extracts of Heugseol (50ug/ml), HE100 : Treated UVB (50mJ/cm^2)+ 70% ethanol extracts of Heugseol (100ug/ml). Result are means ± S.D. of triplicate data.

④ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

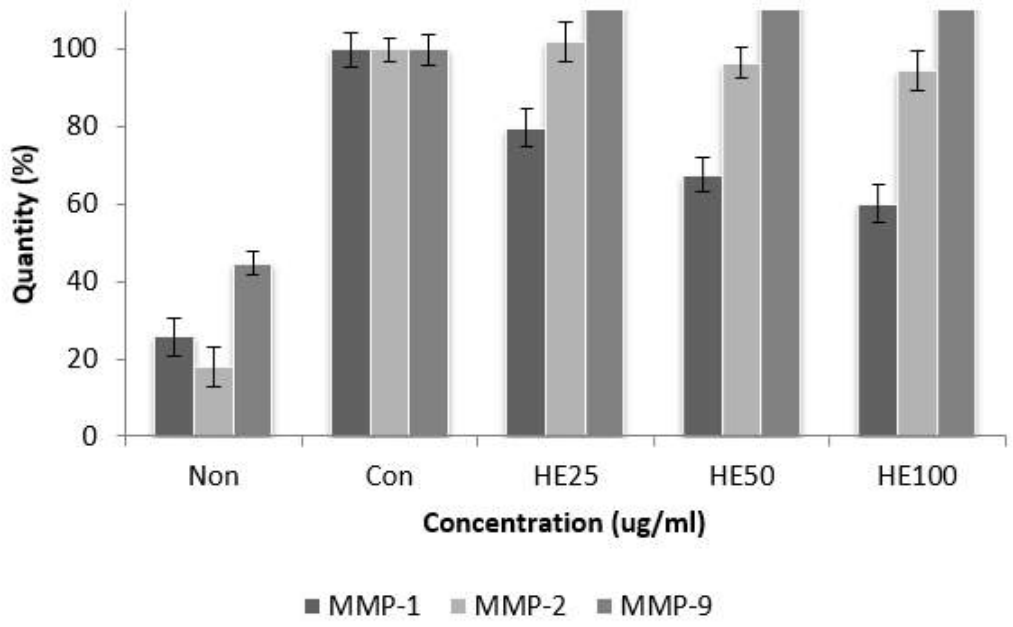


그림 59. Effects of 70% Ethanol extract of Heugseol on MMPs in UVB-induced HaCaT cells. Enzymatic activity of human MMP-1, MMP-2 and MMP-9 were analyzed by ELISA.
Non : Non treated UVB, Con : Treated UVB(50mJ/cm^2), HE25 : Treated UVB (50mJ/cm^2)+ 70% ethanol extracts of Heugseol (25ug/ml), HE50 : Treated UVB (50mJ/cm^2)+ 70% ethanol extracts of Heugseol (50ug/ml), HE100 : Treated UVB (50mJ/cm^2)+ 70% ethanol extracts of Heugseol (100ug/ml). Result are means ± S.D. of triplicate data.

선별된 유색미 에탄올 추출물 5종의 항산화, 미백, 항주름 관련 생리활성실험들을 진행하여 screening한 결과, 흑설의 효능이 가장 뛰어난 것으로 확인 되었고 이를 바탕으로 흑설 에탄올 추출물(HE)을 사람의 세포에 적용하여 유효성 평가를 실행하였다. 세포는 각질형성 세포 HaCaT cell을 사용했다. MTT assay를 통해 흑설 에탄올 추출물은 25~100ug/ml 사이에서 세포 사멸에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였고 UVB조사량에 따른 HaCaT 세포생존율을 확인하기 위해 0, 20, 50, 60, 100mJ/cm2 에 각각 노출시킨 결과 50mJ/cm^{2}에서 UVB를 조사하지 않은 0mJ/cm^{2}과 비교하여 50mJ/cm^2 에서 73.0% 생존하는 것으로 나타났다. 또한 UVB를 조사한 HaCaT 세포는 흑설에 의해 25~100ug/ml 구간에서 농도의존적으로 세포 생존율이 증가하는 것으로 나타남에 따라 흑설의 최종 농도를 25~100ug/ml로 결정하였다. Western bolt 분석법으로 MMP-1과 -13의 발현이 25~100ug/ml 사이에서 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였고 type Ⅰ pro-collagen이 100 ㎍/mL의 농도에서 발현이 증가하는 것을 확인하였으며 RT-PCR에서 MMP-1, -3, -9 mRNA의 발현을 측정한 결과 100ug/ml 처리 군에서 각각 69.8 %, 11.4 % 및 40.4 % 억제되었고 MMP-1, -9는 25~100ug/ml에서 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다. Enzyme assay결과 MMP-1과 -2는 25~100ug/ml사이에서 농도 의존적으로 발현이 감소하는 것으로 나타났다.

(2) 신토흑미, 조생흑찰의 항주름 활성 평가

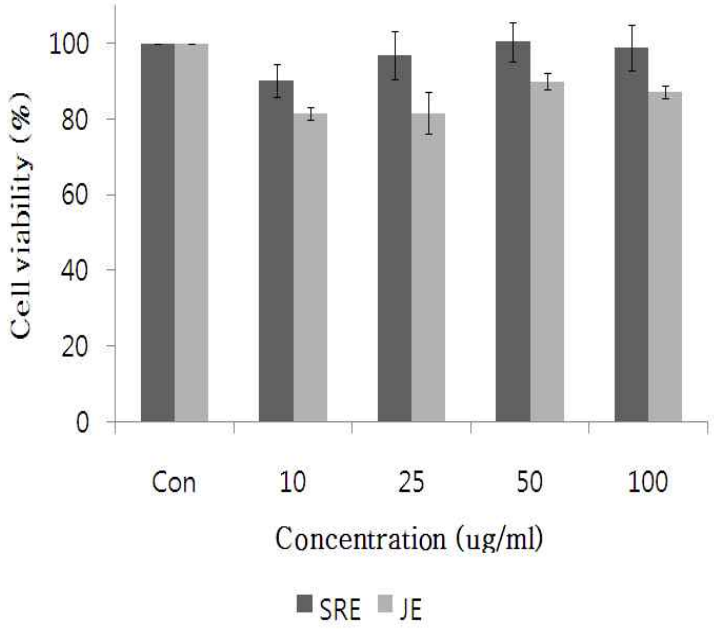


그림 60. Cell viability of colored rice extract on HaCaT cells. The viability was analyzed by MTT assay.

Con : Non treated colored rice extract, SRE : 70% ethanol extracts of Shintoheug rice, JE : 70% ethanol extracts of Josaengheugchal, Results are expressed as means ± S.D. of triplicate data.

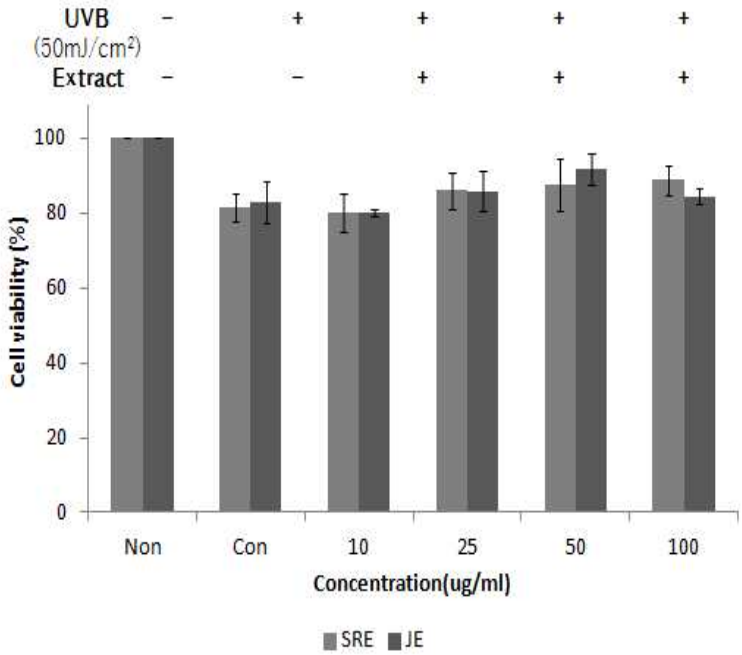


그림 61. Effect of of colored rice extract treatment before irradiation on the viability of UVB-irradiated (50mJ/cm^2) HaCaT cells. The viability was analyzed by MTT assay.

Non : Non treated UVB, Con : Treated UVB(50mJ/cm^2), SRE : 70% ethanol extracts of Shintoheug rice, JE : 70% ethanol extracts of Josaengheugchal, Results are expressed as means ±

S.D. of triplicate data.

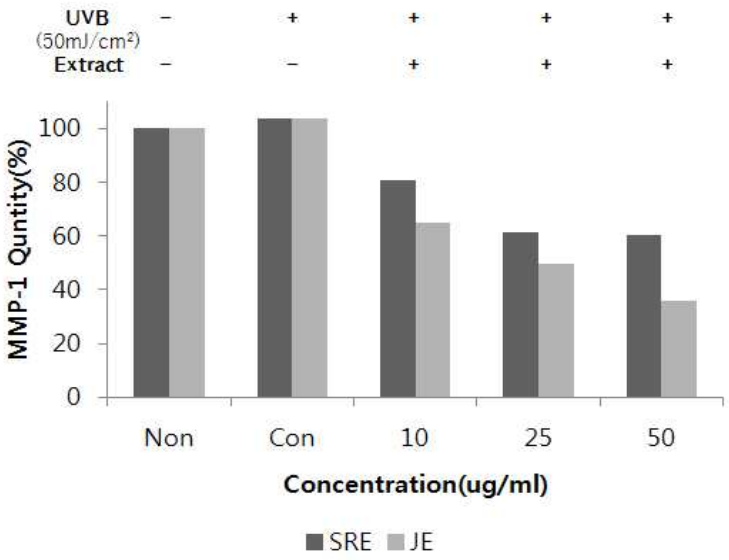


그림 62. Effects of colored rice extract (10, 25, 50ug/ml) on MMP-1 in UVB-induced (50mJ/cm^2) HaCaT cells. Enzymatic activity of human MMP-1 was analyzed by ELISA.
Non : Non treated UVB (Control), Con : Treated UVB(50mJ/cm^2), SRE : 70% ethanol extracts of Shintoheug rice, JE : 70% ethanol extracts of Josaengheugchal.

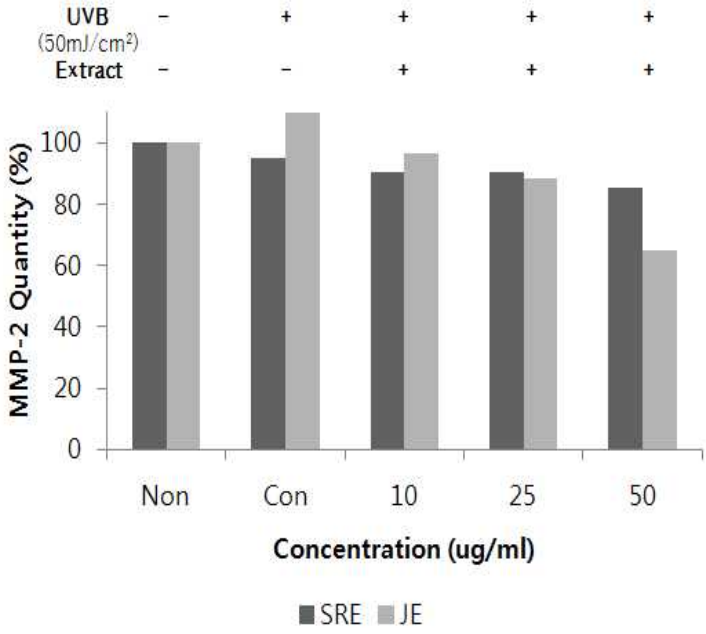


그림 63. Effects of colored rice extract (10, 25, 50ug/ml) MMP-2 in UVB-induced HaCaT cells. Enzymatic activity of human MMP-2 was analyzed by ELISA.
Non : Non treated UVB (Control), Con : Treated UVB(50mJ/cm^2), SRE : 70% ethanol extracts of

Shintoheug rice, JE : 70% ethanol extracts of Josaengheugchal.

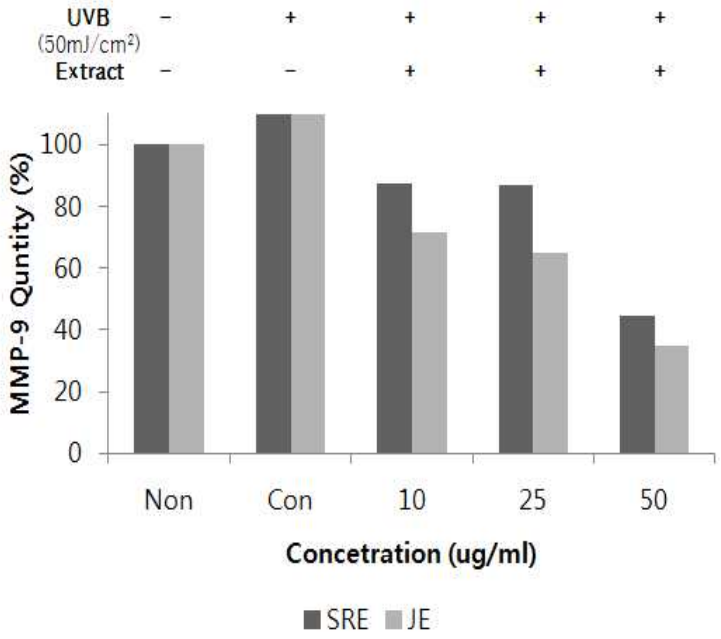


그림 64. Effects of colored rice extract (10, 25, 50ug/ml) MMP-9 in UVB-induced HaCaT cells. Enzymatic activity of human MMP-9 was analyzed by ELISA.
Non : Non treated UVB (Control), Con : Treated UVB(50mJ/cm^2), SRE : 70% ethanol extracts of Shintoheug rice, JE : 70% ethanol extracts of Josaengheugchal.

선별된 유색미 에탄올 추출물 5종의 항산화, 항주름 관련 생리활성실험들을 진행하여 screening한 결과, 흑설 다음으로 활성이 뛰어난 신토흑미와 조생흑찰을 추가적으로 선별하여 사람 세포 내 항주름 활성 평가를 진행하였다. 실험을 위한 세포 독성 평가는 MTT assay에 의해 확인되었으며 신토흑미와 조생흑찰은 모두 10~50ug/ml 사이에서 80% 이상의 생존율을 보였으므로 세포 사멸에 영향을 끼치지 않는 것으로 나타났다. 또한 UVB(50mJ/cm^2)에 노출된 HaCaT 세포의 신토흑미와 조생흑찰에 의한 보호 효과를 알아보기 위한 세포 생존율 실험에서는 두 시료 모두 10~50ug/ml 사이에서 세포생존율이 80%이상으로 세포 보호 효과가 뛰어난 것으로 나타남에 따라 최종 농도를 10~50ug/ml로 결정하였다. UVB 자극에 의한 시료의 matrix metalloproteinases(MMPs)의 발현 억제는 ELISA kit실험에 의해 MMP-1, -2, -9 모두 10~50ug/ml 사이에서 농도 의존적으로 감소하는 것으로 확인되었고 MMP-1과 -9의 발현량은 신토흑미와 비교하여 조생흑찰의 억제능이 10% 이상 뛰어난 것으로 나타났으며, MMP-2는 신토흑미와 조생흑찰의에 의한 단백질 억제가 유의하게 나타났다.

(3) 흑설의 항산화 활성 평가

① MTT assay

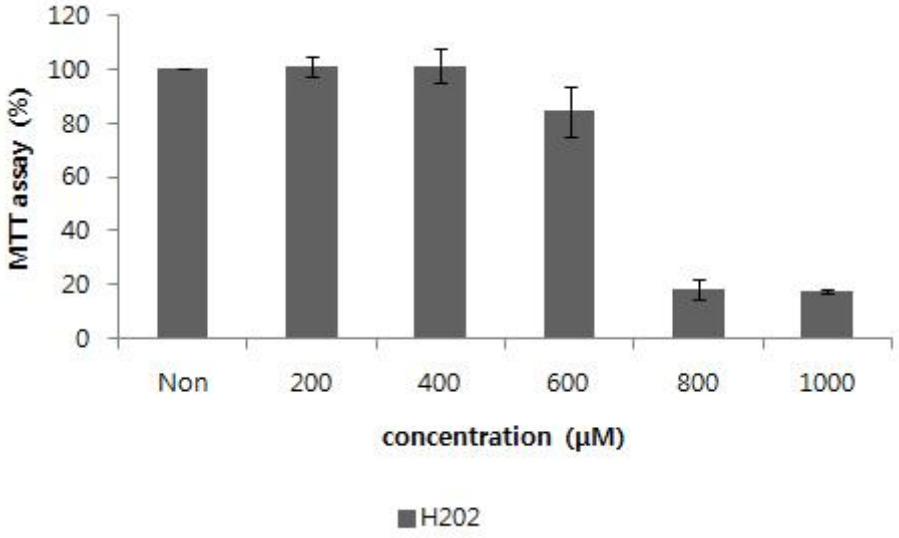


그림 65. The cell viability of H2O2 in HaCaT Cell.

Non : non H2O2 induced group, Results are expressed as means ± S.D. of triplicate data.

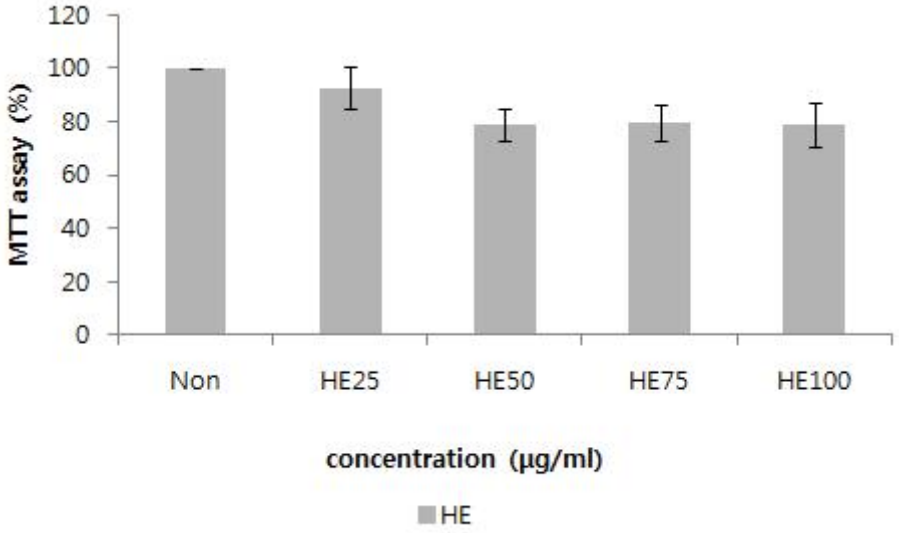


그림 66. The cell viability of HE in HaCaT Cell.

Non : non H2O2 induced group, HE : 70% ethanol extracts of Heugseol, Results are expressed as means ± S.D. of triplicate data.

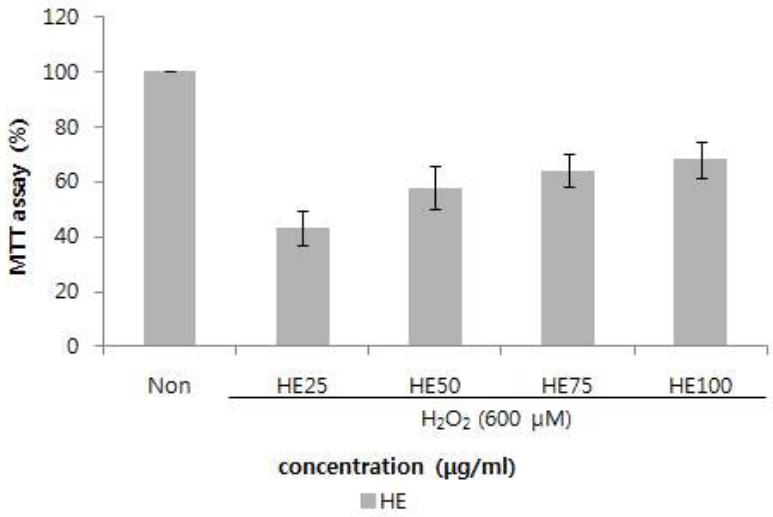
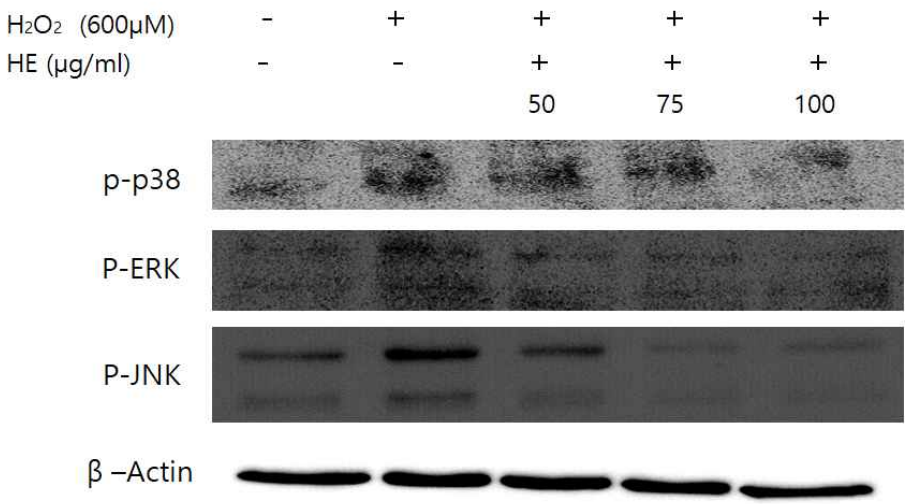


그림 67. Effects of HE on H_2O_2-induced oxidative toxicity in HaCaT cells.
Non : non H_2O_2 induced group, HE : 70% ethanol extracts of Heugseol, Results are expressed as means ± S.D. of triplicate data.

② Western Blot Analysis



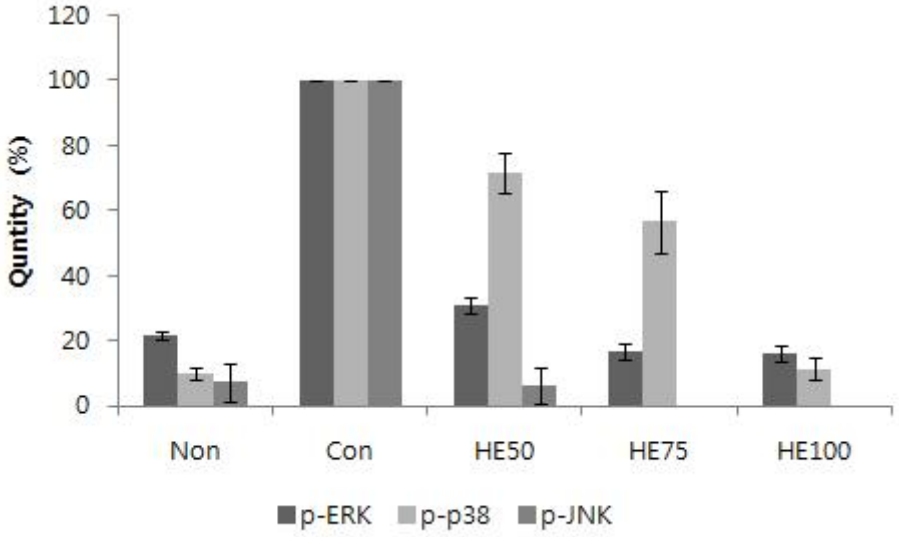


그림 68. Effects of HE induced MAPKs pathways in HaCaT cells.
Non : non H_2O_2 induced group, Con : H_2O_2 induced group, HE : 70% ethanol extracts of Heugseol, Results are expressed as means ± S.D. of triplicate data.

선별된 유색미 에탄올 추출물 5종의 항산화, 항주름 관련 생리활성실험들을 진행하여 screening한 결과, 항산화능 또한 뛰어난 것으로 나타난 흑설 에탄올 추출물을 HaCaT 세포에 적용하여 항산화 활성 평가 실험을 진행하였고, 결과는 다음과 같다.

HaCaT cell에서 농도별로 H_2O_2를 처리하여 세포생존율을 측정하였고, 그 이후 흑설 에탄올 추출물의 세포독성과 H_2O_2로 유발한 세포 독성으로부터 흑설 에탄올 추출물의 HaCaT cell 보호 효과에 관한 MTT assay를 수행하였다. 그 결과 H_2O_2로 유발한 세포 독성은 600 μM부터 1 mM 까지 세포 생존율이 감소하였으며, 600 μM의 농도에서 84%의 생존율을 보여 향후 이 농도로 실험을 진행하였다. 또한 흑설 에탄올 추출물의 세포 독성은 25~100 μg/ml 사이에서 농도 의존적으로 세포 생존 능력을 감소시켰으나 100 μg/ml의 농도에서 흑설 에탄올 추출물은 78%의 세포생존율을 보였다. 그리고 흑설 에탄올 추출물의 H_2O_2로 유발한 세포 독성으로부터 HaCaT cell 보호 효과에 관한 세포생존율 측정 결과는 흑설 에탄올 추출물의 농도가 증가할수록 세포생존율이 증가하여 그 보호효과가 확인되었고, 특히 100 μg/ml 농도에서 흑설 에탄올 추출물은 67%의 생존율을 보였다. 흑설 에탄올 추출물은 HaCaT 세포에서 mitogen-activated protein kinase(MAPK) 경로를 유도했다. Western blot을 통해 흑설 에탄올 추출물이 50~100 ug/ml 사이에서 농도 의존적으로 p-ERK, p-JNK 및 p-p38 단백질의 발현 수준을 감소시켰음을 확인하였다.

바. 유색미(쌀겨) 개체 중 기능성이 뛰어난 추가 개체 선발

(1) 항산화 관련 실험

① DPPH(2,2-Diphenyl-1-picrythydrazyl) assay

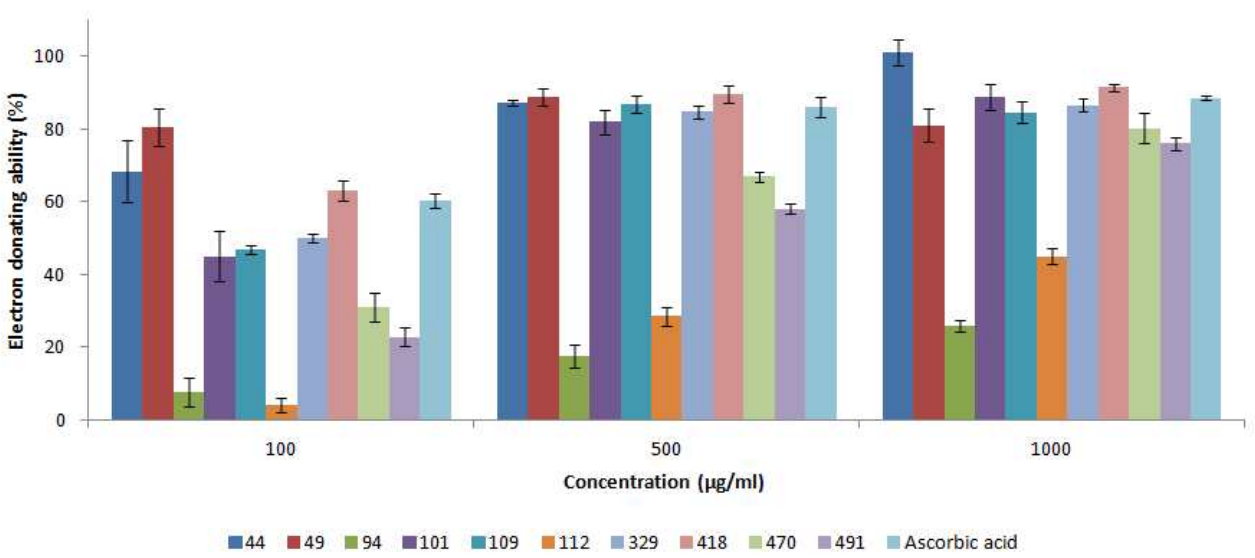


그림 69. DPPH radical scavenging ability of 10 kinds of 70% ethanol extracts of colored rice. Result are means ± S.D. of triplicate data.

② Superoxide Dismutase like activity assay

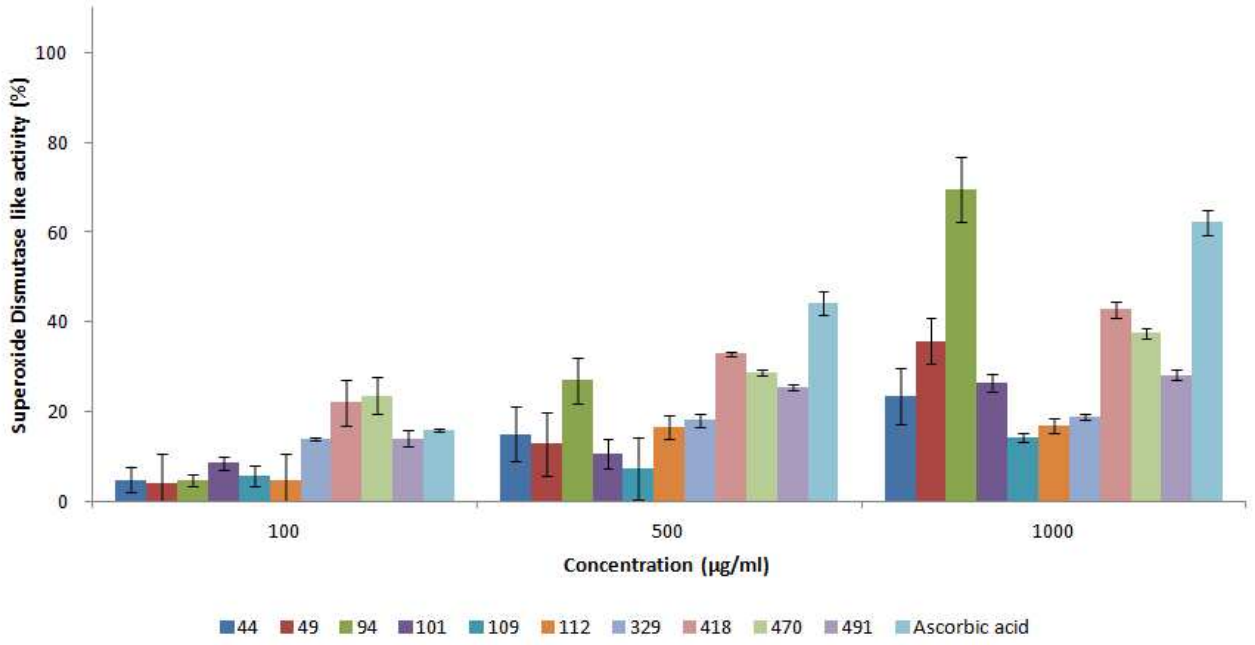


그림 70. Superoxide dismutase like activity of 10 kinds of 70% ethanol extracts of colored rice. Result are means ± S.D. of triplicate data.

(2) 주름 관련 실험

① Collagenase inhibition activity assay

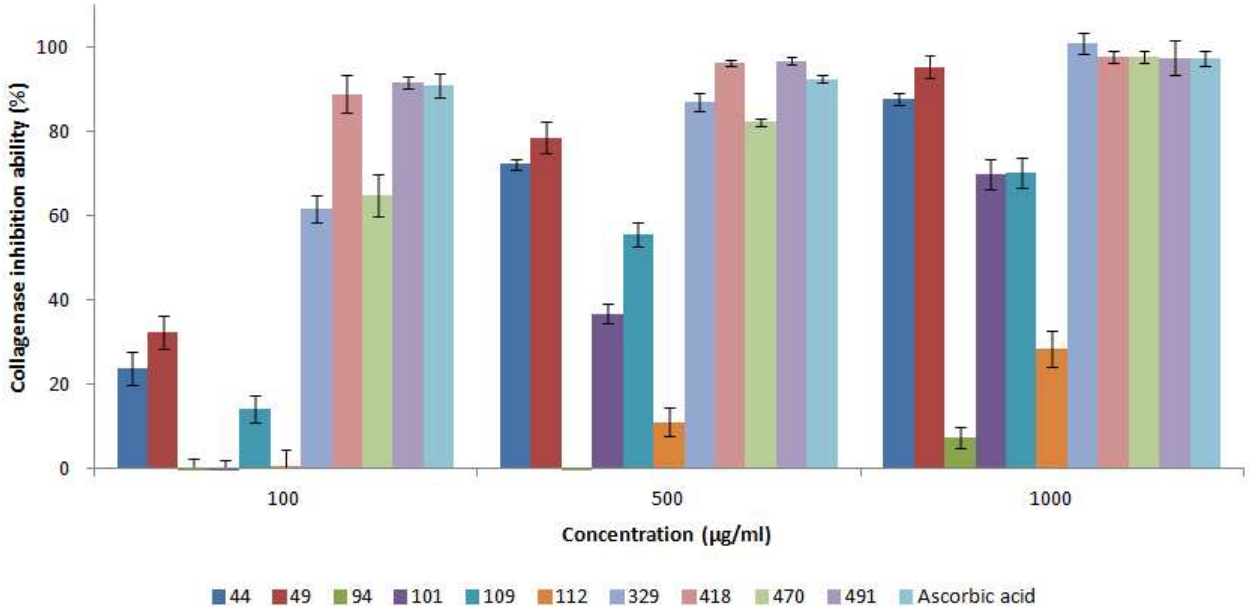


그림 71. Collagenase inhibition activity of 10 kinds of 70% ethanol extracts of colored rice. Result are means ± S.D. of triplicate data.

유색미 쌀 겨 추출물 중 기능성이 뛰어난 개체를 추가적으로 선발하기 위한 항산화, 항주름, 미백 관련 생리활성실험들을 진행하여 screening 하였다. 실험에 사용된 유색미 10종은 에탄올 추출법으로 추출하였고 70% 에탄올을 사용하였다. 항산화 관련 실험에서 DPPH 라디칼 소거능 측정 결과, 가장 낮은 농도인 100ug/ml에서 양성대조군 Ascorbic acid의 활성이 60.2%인 것과 비교하여 44번과 49번 유색미가 각각 68.2%, 80.5%로 더 높은 활성을 나타내었다. SOD 유사활성능 실험에서는 1000ug/ml의 농도에서 94번 유색미가 양성대조군인 Ascorbic acid와 비교하여 유사한 정도의 활성을 나타내었다. 항주름 관련 실험에서는 Collagenase 억제능을 통해 확인하였고 그 결과 418번, 49번 유색미가 가장 낮은 농도인 100ug/ml에서 양성대조군인 Ascorbic acid와 유사한 정도의 활성을 나타내어 항주름 활성이 뛰어난 것으로 확인되었다.

사. 유색미 항염증 실험

(1) MTT assay : 세포독성 측정은 Carnichael의 방법에 따라 측정하였다. HaCaT cell을 96well plate에 $2x10^4$ cell/ml이 되게 2000ul 분주하고, serum free 후 배지 180ul에 시료를 농도 별로 조제하여 20ul 첨가한 후 37℃, 5% CO2 incubator에서 24시간 배양한다. 그 후 5mg/ml 농도로 제조한 MTT 용액을 20ul 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSA+EtOH (1:1) 용액을 200ul를 가하여 실온에서 차광하여 30분간 반응 시킨 뒤 ELISA reader로 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) NO assay : RAW 264.7 세포에서 생성되는 NO의 양은 Green 등의 방법에 따라 측정하였다. 세포를 6-well plate 에 1×10^5 cells/ml가 되게 seeding한 후 24시간 동안 배양하여 confluence가 80%일 때 PBS로 2번 세척한 다음, 무혈청 배지를 사용하여 24시간 동안 배양한 후 시료를 농도별로 처리하고 나서 4시간 후에 lipopolysaccharide(LPS, Sigma-Aldrich Co.) 1 μg/mL를 대조군 (Nor)을 뺀 모든 well에 넣어서 4시간 동안 자극시킨 다음 상층액 100 μl와 griess reagent

100 μl를 1:1로 10 min 동안 반응시킨 후 NO의 생성량은 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) Western blot : Inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 cyclooxygenase(COX-2)의 발현을 보기 위하여 RAW 264.7 세포를 96-well culture plate에 1×10^6 cells/ml 로 cell seeding 후 24시간 동안 배양하여 세포를 안정화시켰다. 배지를 제거한 후 시료를 농도별로 처리하고 30분간 반응시킨 다음 LPS를 1 μg/mL 농도로 처리하고 24h 동안 배양한 후 상등액을 제거하고 PBS로 2번 세척하였다. Cell을 harvest 하여 Radio-immuno-precipitation assay(RIPA) lysis buffer 200 μL에 세포를 용출시켜 단백질을 수확·원심분리하여 얻은 상층액은 Bradford assay로 정량하고 SDS-PAGE에서 전기영동하여 분리하였다. Gel을 3시간 동안 polyvinylidenedifluoride(PVDF) membrane (Sigma-Aldrich Co.)에 옮긴 후 4℃에서 4시간 동안 5% skim milk로 blocking 하였다. Primary antibody를 1 : 1,000으로 희석하여 4℃에서 overnight하고 나서 TBST로 30분간 교반하여 세척하는 과정을 3회 반복하였다. 각각의 HRP-conjugated secondary antibidy를 희석하여 상온에서 1시간동안 처리하고 다시 TBST로 10분간 교반하여 세척하는 과정을 3회 반복한 후 ECL용액을 가하여 Western imaging system 기기를 이용하여 밴드 확인 및 정량하였다.

(4) RT-PCR : RNA는 High Pure RNA Isolation Kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)를 이용하였고 제조회사의 방법에 준하여 total RNA를 추출하였으며, 1 μg/mL의 농도로 정량하고 추출된 total RNA는 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(Roche)를 이용하여 역전사를 진행시켜, cDNA를 합성시켰다. iNOS, COX-2의 mRNA 발현을 알아보기 위하여 Fast start Essential DNA Green Master kit(Roche)를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. 이 분석에서 internal control은 GAPDH(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)를 사용하였으며 primers의 sequence는 Table 1과 같다. PCR의 증폭 조건은 다음과 같다. iNOS는 95℃에서 60초간 30cycle을 증폭시킨 후 60℃에서 60초간, 72℃에서 65초간 실행시켰다. COX-2는 94℃에서 60초간 30cycle을 증폭시킨 후 60℃에서 60초간, 72℃에서 65초간 실행시켰다. RT-PCR 증폭으로 생산된 DNA는 0.5 μg/mL 의 ethidium bromide가 포함된 1.5% metaphor agarose gel에 전기영동하여 cooled CCD camera system EZ-Capture Ⅱ와 CA analyzer ver. 3.00 software(ATTO)를 이용하여 mRNA의 발현 정도를 확인하였다.

표 13. sequence of the primers used for PCR

Gene	Forward	Reverse
MMP-1	5’-ATTCTACTGATATCGGGGCTTTGA-3’	5-ATGTCCTTGGGGTATCCGTGTAG-3’
MMP-3	5’-TTGTTCTTTGATGCAGTCAGC-3’	5’-GATTTGCGCCAAAAGTGC-3’
iNOS	5’-ATTCGCAACATCAGGTCGGCCAT-3’	5’-GCTGTGTGTCACAGAACTCTCGA
COX-2	5’-GGAGAGACTATCAAGATACT-3’	5’-ATGGTCAGTAGACTTTTACA-3’
G A P D H	5’-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3’	5’-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3’
β-actin	5’-CTGGCACCCAGCACAATGAAG-3’	5’-ACCGACTGCTGTCACCTTCA-3’

아. 유색미 항균 실험 결과

(1) 생육 저해환 (Clear zone) 측정

항균력 및 항진균효과 측정은 paper disc법을 이용하여 측정하였다. 즉, 평판배지에 배양된 각 균주를 1백금이량 취해서 액체배지 10mL에서 18~24시간 배양하여 활성화 시킨 후 다시 액체배지 10mL에 균액을 0.1mL 접종하여 3~6시간 본배양한 후, 10^6 CFU/ml 의 농도로 균일하게 도말하여 멸균된 filter paper disc를 고체 평판배지에 올려놓은 다음 20㎕/disc가 되도록 시료를 농도별로 흡수시켜, 균주에 따라 37℃에서 18~24시간 배양하여 dIsc주위의 clear zone (mm)의 직경을 측정하였다.

자. 유색미 제형 실험

(1) 리포좀 제조

lamellar liquid cystal의 제조에 사용된 성분은 Table 14을 보면 알 수 있다. 리포좀을 제조 순서는 도식화 하여 그림 72에 나타내었다.

Table 14. Ingredients used to lamellar liquid crystal

INCI Name
Water
Glycerin
Caprylic/ capric triglyceride
Polysorbate 60
Tween 60
Steareth-2
Steareth-21
PEG-30 Dipolyhydroxystearate
Cetyl Alchohol
Srearic acid
Isohexadecane
Hydorxyacetophenone/ Dipropylene/ Ethylhexylglycerin
Tocopheryl Acetate
Sodium Hyaluronate
1,2-Hexanediol

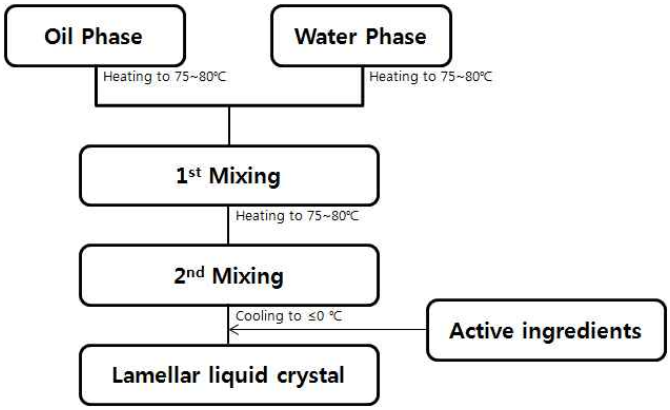


그림 72. preparation of the essence containing liposome

(2) 리포좀 에센스 제조

리포좀 에센스 구성 성분은 Table.3 에 나타내었다. 리포좀 제조 순서를 도식화하여 Fig.2에 나타내었다. 제조에 사용된 물은 모두 D.I water를 사용하였으며 Glycerin, carbopol941 과 arginine 45℃에서 D.I water에 용해시켰다(Phase A). tween20과 향을 글리세린에 45℃에서 용해시켰다(Phase B). Phase B 와 Phase C 을 Phase A에 첨가한 후 아지믹서를 사용하여 (2,000rpm 10min) 교반하였다. 마지막으로, lamellar liquid crystal를 첨가한 후 homo-mixer를 사용하여 (3,000rpm, 5min) 교반하였다.

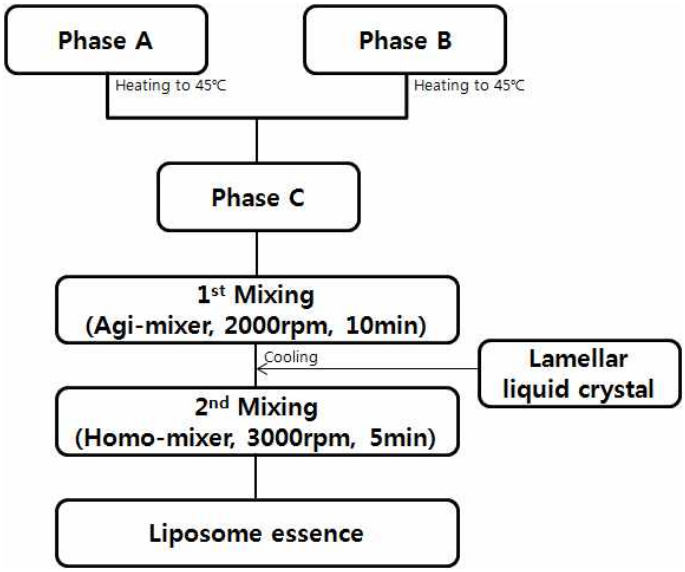


그림 73. Preparation of the esseme containing liposome.

표 15. Ingredients used to liposome essence.

INCI Name
Water
Glycerin
Carbopol 941
Arginine
Tween 20
1,2-Hexanewdiol
loposomal liquid extract

(3) 리포좀 입자크기 및 분포

리포솜 에센스의 입자 크기 및 분포는 광자 상관 분광법 (N5, Beckman Coulter, USA)에 의해 측정되었다. 측정하기 전에 각 시료 0.1mL를 D.I Water 9.9mL로 희석하고 균일하게 분산시켰다. 평균 직경과 크기 분포는 광 산란으로부터의 광자 상관관계를 이용하여 계산되었다.

차. 유색미 리포좀 에센스 안정성 및 안전성 실험

(1) 안정성실험

온도 (0 ℃, 25 ℃, 45 ℃), 냉·해동 순환 (0 ~ 45 ℃, one cycle every 24h) 및 자연광에 대한 JE 및 SRE의 추출물을 이용한 제조 된 리포좀의 화학적 및 물리적 변화가 관찰되었다.

(2) 안전성실험

Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Assay 는 각막 혼탁과 눈의 침투 분석을 이용한 안 점막 자극의 평가이다. OECD 가이드 라인 437에 따르면, D.I Water은 양성 대조군 (PC) 에탄올 및 음성 대조군 (NC)에 사용되었다 (표 16).

표 16. Experimental group categorization of ocular mucous membrane irritation experiment using Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay

Groups	Test compound
Negative Control (NC)	D.W.
Positive Control (PC)	Ethanol
Substance 1	JE (100μg/ml)
Substance 2	SRE (100μg/ml)

박리된 각막을 4 ℃의 HBSS 용액으로 헹구고 챔버에 장착한다. phenol red를 함유하지 않은 멤브레인을 양쪽 챔버에 채우고 각막의 초기 불 투명도를 측정하기 위해 32 ℃ 인큐베이터에서 1 시간 동안 배양하였다. 탁도는 opacitometer를 사용하여 측정하였다. 불투명도가 7 이상인 각막은 사용되지 않았다.

홀더의 상부 챔버에 있는 MEM 배지를 제거하고 750 μL의 시험 물질을 10 분간 각막에 적용한다. 샘플을 처리 한 후, 페놀 레드를 함유하는 MEM 배지로 3 회 이상 세척하고, 마지막으로 phenol red를 함유하지 않는 MEM 배지를 채우고 2 시간 동안 배양하였다.

불투명도는 다음과 같이 계산되었다.

$$\text{Opacity} = [(Lux_{control} / Lux_{sample}) - 0.09894] / 0.0251$$

2 시간 동안 배양한 후 1mL의 fluorescein sodium을 각막에 도포하고 32 ℃ 인큐베이터에서 90 분간 배양한다. 배양 완료 후, MEM 배지를 하부 챔버로 부터 완전히 제거하고, 상부 챔버 내의 용액 300 μL를 96 well plate에 첨가 하였다. 마지막으로, 490nm에서 ELISA 판독기로 흡광도를 측정하였다. 투과율 계산식은 다음과 같다.

$$\text{Permeability} = A_{sample} - A_{control}$$

IVIS는 다음 공식을 사용하여 계산되었다. 과민성 점수는 표 5와 같이 OECD 가이드 라인 437에 분류되어있다.

$$\text{IVIS} = \text{Opacity average} + (15 \times \text{Permeability average})$$

표 17. Irritant scores and classification used in BCOP assay

IVIS	UN GHS*
≤ 3	Not classified
> 3, ≤ 55	No prediction can be made
> 55	Category 1

*UN GHS: United Nations Globally Harmonized System.

카. 유색미 생리활성

(1) Electron donating ability assay :

추출물의 DPPH radical scavenging activity (Electron donating abilities, EDA)는 다음과 같이 측정하였다. 각 시료용액 100 ㎕에 0.2 mM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 50 ㎕를 넣고 교반한 후 차광하여 30분간 방치한 다음 517 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능 효과는 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

(2) ABTS radical scavenging activity :

$ABTS^+$ radical cation scavenging activity 실험은 $ABTS^+$ radical cation은 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate ($K_2S_2O_8$)을 1:1로 혼합하여 암실에서 실온으로 24시간 동안 반응하였다. 사용 전에 $ABTS^+$ 용액을 에탄올에 희석하여 734 nm에서 흡광도값이 0.706±0.001이 되게 하여 사용하였다. 라디칼 소거활성 효과는 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

(3) Superoxide dismutase like assay :

SOD 유사활성은 Marklund의 방법에 준하여 측정하였다. 각 시료용액 0.2 ml에 Tris-HCl 완충 (50mM tris+10mM EDTA, pH 8.5) 2600 ㎕와 7.2mM pyrogallol 200 ㎕ 가하여 37℃에서 10분간 반응시킨 1M HCl 100 ㎕ 를 가하여 반응을 정지시키고 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양을 420nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

(4) Hydrogen peroxide scavenging assay :

Hydrogen peroxide 소거능 실험은 Jayaprakasha 등의 방법에 준하여 측정하였으며, 각 시료용액 0.5mL에 40mM hydrogen peroxide 0.5mL를 가하여 37℃에서 10분간 반응시킨 후 230nm에서 측정하였다. Hydrogen peroxide 소거능 실험결과는 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

(5) Tyrosinase inhibition activity assay :

Tyrosinase inhibition activity assay : Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등의 방법에 따라 측정한다. 반응구는 67mM sodium phosphate buffer(pH 6.8) 80㎕에 10mM L-DOPA를 녹인 기질액 40㎕ 및 시료용액 40㎕의 혼합액에 mushroom tyrosinase(125U/mL) 40㎕을 첨가하여 37℃에서 30분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 420nm에서 측정한다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

(6) Elastase inhibition activitiy assay :

Elastase 저해활성 측정은 다음과 같이 측정한다. 추출물을 일정 농도가 되도록 조제하여 100㎕씩 시험관에 취하고, 40mM tris-HCl buffer를 50㎕와 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 elastase (0.6U/mL)용액 50㎕을 가한 후 37℃에서 30분간 반응시킨다. 그 후 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 기질 N-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide (1mg/mL)을 첨가하여 20분간 반응시켜 기질로부터 생성되는 p-nitroanilide의 생성량을 405 nm에서 측정한다. Elastase 저해 활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

(7) Collagenase inhibition activity assay :

Collagenase 저해활성 측정은 다음과 같이 측정한다. 즉 반응구는 0.1M tris-HCl buffer (pH 7.5)에 4mM CaCl2를 첨가하여, 4-phenylazobenzyloxycarbonyl -Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (0.3 mg/mL)를 녹인 기질액 250㎕ 및 시료용액 0.1 mL의 혼합액에 collagenase (0.2 mg/mL) 150㎕를 첨가하여 실온에서 20분간 정치한 후 6% citric acid 500㎕을 넣어 반응을 정지 시킨 후, ethyl acetate 1.5

mL을 첨가하여 원심분리(3000 rpm, 10min)하여 상층액만 320 nm에서 흡광도를 측정한다. Collagenase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

타. 유색미 항주름 활성 세포실험

(1) MTT assay

: MTT assay : 세포독성 측정은 Carmichael의 방법에 따라 측정하였다. HaCaT cell을 96well plate에 2×10^4 cells/ml이 되게 2000 μL 분주하고, serum free 후 배지 180 μl에 시료를 농도 별로 조제하여 20 μL 첨가한 후 37℃, 5% CO2 incubator에서 24시간 배양한다. 그 후 5mg/mL 농도로 제조한 MTT 용액을 20 μL 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO+EtOH(1:1) 용액을 200 μL를 가하여 실온에서 차광하여 30분간 반응 시킨 뒤 ELISA reader로 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) Cell tyrosinase assay

Tyrsosinase 저해활성 측정은 버섯유래의 tyrosinase와 HEM 세포 유래의 tyrosinase 저해활성을 측정하였다. 먼저 버섯 유래의 tyrosnase 저해능은 0.175M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 500 μL에 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 200 μL 및 시료용액 100 μL의 혼합액에 mushroom tyrosinase (110 U/mL) 200 μL를 첨가하여 25°C에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475 nm에서 측정하였으며, HEM에서 유래된 tyrosinase 저해활성은 1×10^5개 세포에 lysis buffer (67 mM sodium phosphate buffer, 1% triton X-100, 0.1mM phenylmethyl sulfonyfluoride) 100 μL를 첨가한 후 얼음에 방치한 후 초음파 분쇄하였다. 1시간 후 13,200 rpm에서 20분간 원심분리 하여 얻어진 상등액을 효소용액으로 사용하여 67 mM phosphate buffer, pH 6.8에 녹인 8.0 mM의 L-DOPA 180 μL를 기질로, 세포 상등액 20 μL을 첨가하여 37°C에서 60분간 반응한 후, 생성된 DOPA chrome의 양을 490 nm에서 측정하였다.

(3) ROS productions rate

: CCD-986sk 세포를 배양한 후 96 well plate에 2×10^5cell/well로 접종하고 24 시간 안정화 하였다. 동일 배지로 교체한 후 20 mJ/cm^{2}의 UVB로 자극 한 뒤, 유색미를 12, 25, 50 μg/mL의 농도로 희석하여 처리한 후 48시간 배양하였다. 그 후 제조사의 매뉴얼(Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)에 따라 ROS Glo H_2O_2assay를 수행하였다.

(4) MMP-1 저해활성 측정

: 96 well plate에 각 well당 1×10^5cells/well세포가 되 도록 심어준 후 24 시간을 안정화 하였다. 이 후, 배양된 배지를 제거하고 PBS을 첨가한 다음 자외선을 조사하고 이때 MMP-1의 활성을 높이기 위하 여 TNF-α를 10 ng/mL의 농도로 첨가하고 시료를 농도 별로 처리한 후 48시간을 배양하였다. 세포의 배양액을 수거하여 실험에 사용하였으며MMP-1 biotrack activity assay kit (Amer sham Bioscience, USA)을 이용하여 측정하였다.

(5) Type-I Procollagen 합성측정

: CCD-986sk세포에 리기다를 농도별로 처리했을 때 pro-collagen type I의 합성양을 심어준 후 24시간을 안정화 하였다. 이후, 배양된 배지를 제거하고 유색미 추출물을 농도별로 처리한 후 48시간을 배양하였다. 각 well로부터 상등액을 회수하여 procollagen Type-I C-Peptide EIA kit (Takara-Bio Inc.) 의 각 well에 첨가한 후, 제조사의 방법에 따라 procollagen type I의 총 양을 측정 하였다.

파. 유색미가 미치는 분자생물학적 분석

(1) MTT assay

Yellow tetrazolium salt MTT는 담황색 기질로서 살아있는 세포의 미토콘드리아 내의 reductase에 의해 환원되어 formazan을 생성하는데, 죽어있는 세포에서는 형성되지 않고 살아있는 세포의 수가 ㅁ낳을수록 formazan 의 생성도 많아지고 세포의 성장을 측정할 수 있다. 선별된 유색미 2종 조생픅찰 에탄올 추출물(JE)과 신토흑미 에탄올 추출물(SRE)의 mouse 유래 macrophage cell인 RAW 264.7 세포에서의 생존율을 확인하기 위하여 MTT assay를 실시하였으며, 그 결과는 FIg. 3에 나타내었다. RAW 264.7 세포에 대하여 JE와 SRE 모두 50㎍/ml 이하의 농도에서 각각 90%와 98% 이상의 세포 생존율을 나타내었다. 이러한 결과를 바탕으로 세포의 NO 소거능 실험은 추출물 자체의 세포독성으로 인한 지시세포 사멸의 가능성을 배제할 수 있도록 50㎍/ml의 농도까지 처치하였다.

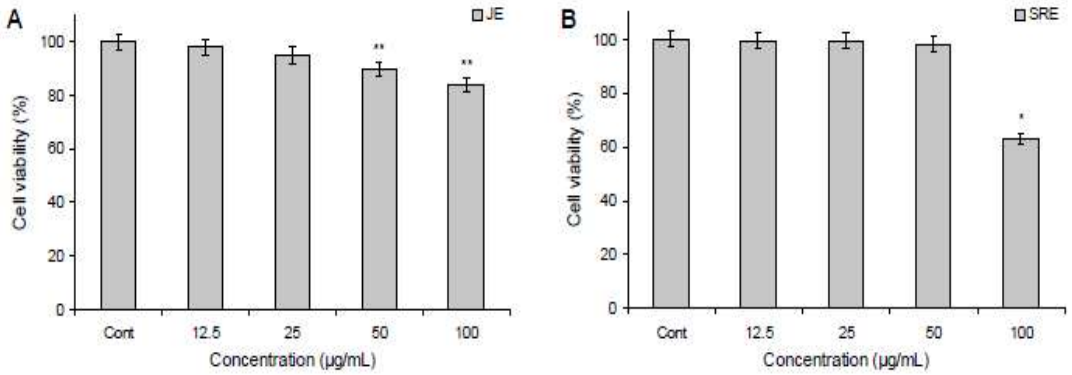


그림 74. Cell viability assay on macrophage RAW 264.7 cells of colored rice extracts. The cells were treated for 24h with the indicated concentrations of colored rice extracts. Cont : not treated any extracts. (A) JE : 70% ethaniil extract of Josaengheugchal, (B) SRE : 70% ethanol extract of Shintoheug rice. Results ars mean ±SD of triplicate data.

(2) NO assay

LPS의 자극에 의해 발현되는 iNOS는 많은 양의 NO를 생성하게 되며, 이에 의한 세포 독성은 염증반응, 세포의 돌연변이 및 종양 발생 등에도 관여하므로 염증반응과 관련된 조직 손상에 NO와 iNOS의 발현이 증가함이 보고되어 있다. 우리는 RAW 264.7 세포에 세균 유래의 LPS를 처리하여 자극하였을 때 유색미 에탄올 추출물의 첨가로 NO의 생성을 저해하는지 알아보고자 하였으며, 그 결과는 Fig. 4에 나타내었다. LPS 단독 처리구 (Cont) 기준으로 LPS와 함께 JE와 SRE를 처리하였을 때 두 추출물 모두 농도 의존적으로 NO의 생성량이 유의성 있게 감소하였으며, JE SRE는 50㎍/ml의 농도에서 51%와 44%의 NO 저해 효과를 보였다.

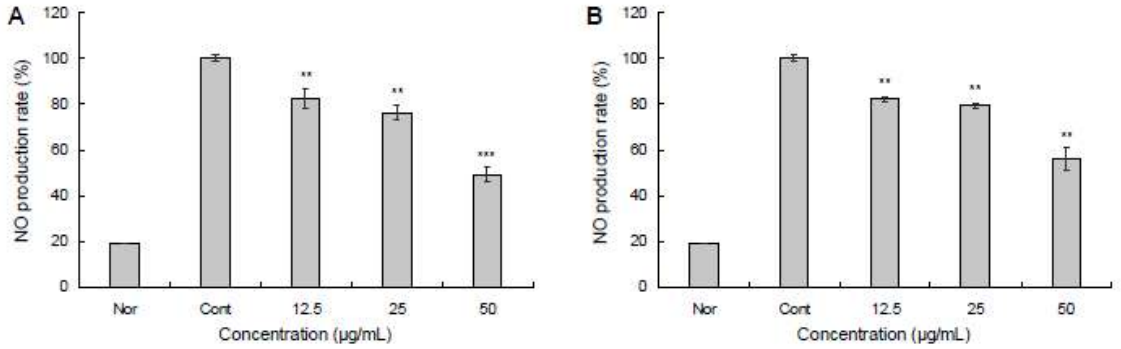


그림 75. Nitric oxide(NO) inhibition assay on macrophage RAW 264.7 cells of colored rice extracts. The cells were treated for 24h with the indicated concentrations of colored rice extracts. Nor : not treated any extract and LPS, Cont : not treated any extracts. (A) JE : 70% ethaniil extract of Josaengheugchal, (B) SRE : 70% ethanol extract of Shintoheug rice. Results ars mean ±SD of triplicate data.

(3) Western blot

본 실험에서는 mouse 유래의 macrophage cell인 RAW 264.7 에 LPS를 1 μg/mL 농도로 처치한 후 유색미 에탄올 추출물을 농도별로 주입했을 때의 iNOS와 COX-2 발현의 억제 정도를 western blot을 통해 확인하였으며, 결과는 Fig.5 과 같이 나타났다. 염증 발현 인자인 iNOS와 COX-2의 단백질 발현은 농도 의존적으로 억제되었음을 알 수 있었고, 특히 50 μg/mL의 농도에서 iNOS와 COX-2가 JE의 경우 71%, 69%의 억제효과를 나타내었으며, SRE는 52%, 75%가 각각 억제되었다. 아직 우리나라에서 생산되는 유색미의 iNOS와 COX-2에 대한 발현억제 연구는 보고된 바가 없어 향후 연구의 중요한 기준이 될 수 있을 것으로 기대된다.

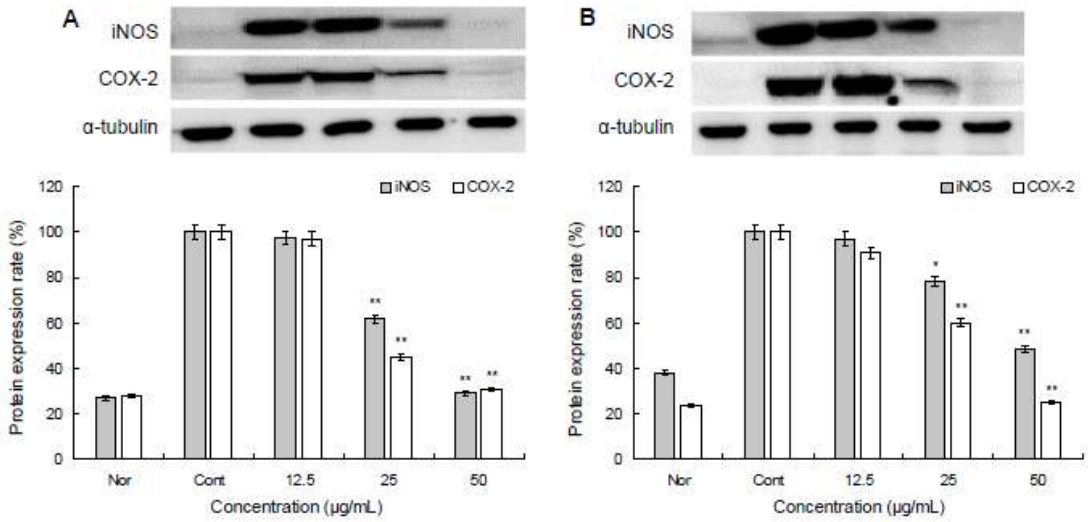


그림 76. iNOS and COX-2 protein expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells of colored rice extracts. The cells were treated for 24h with the indicated concentration of colored rice extracts. The resulted were analysed by western blot. Nor : not treated any extract and LPS, Cont : not treated any extracts. (A) JE : 70% ethaniil extract of Josaengheugchal, (B) SRE : 70% ethanol extract of Shintoheug rice. Results ars mean ±SD of triplicate data.

(4) RT-PCR

염증 반응이 일어나면 염증매개물질인 NO, PGE_2, 염증성 cytokine 등이 분비된다. 그 중 염증 반응의 지표물질인 NO는 L-arginine에서 NOS에 의해 합성되며, NOS의 종류 가운데 iNOS에 의한 NO 형성은 병리학적으로 중요한 역할을 한다. 다른 염증인자 중 하나인 COX는 COX-1과 COX-2가 존재하며 이는 다양한 세포에서 다른 경향을 나타낸다. 이 중 COX-2는 염증반응 부위에서 발현이 된다,

우리는 유색미 에탄올 추출물의 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현억제를 확인하기 위한 RT-PCR을 실시하였으며, 이때 세포의 여러 조건에서도 그 발현 정도의 차이가 거의 없는 house keeping gene인 GAPDH를 positive control로 사용하였다. 그 결과는 Fig 6 와 같이 JE는 20 μg/mL의 농도에서 iNOS와 COX-2의 mRNA가 각각 71%, 69%의 발현을 억제시켰으며, SRE는 같은 농도에서 각각 55%, 54%의 발현을 억제시켰다. 또한 두 추출물 모두 농도 의존적인 억제 효능을 나타내었다.

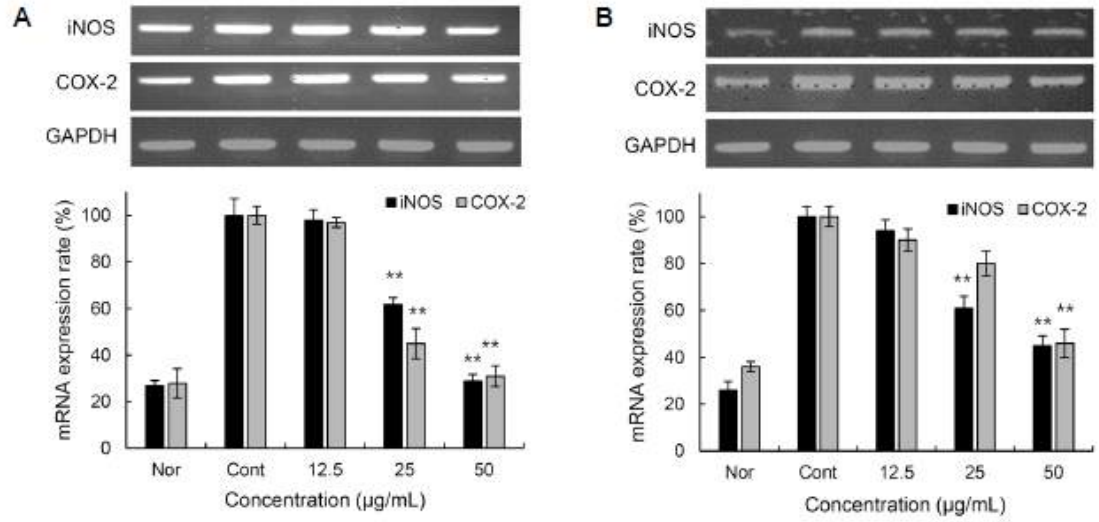
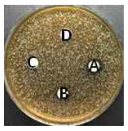
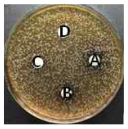
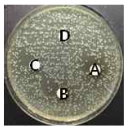
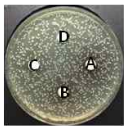
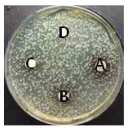
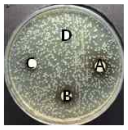


그림 77. iNOS and COX-2 mRNA suppression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells of colored rice extracts. The cells were treated for 24h with the indicated concentrations of colored rice extracts. The results were analyzed by RT-PCR. Nor : not treated any extract and LPS, Cont : not treated any extracts. (A) JE : 70% ethaniil extract of Josaengheugchal, (B) SRE : 70% ethanol extract of Shintoheug rice. Results ars mean ±SD of triplicate data.

(5) 생육 저해환 (Clear zone) 측정

이 실험은 disk diffusion법을 이용하여 그람 양성균에 대한 JE와 SRE의 향균효과를 확인하였으며 그 결과는 Table.6 에 나타내었다. 결과적으로 *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* 및 *Propionibacterium acnes*에 항균 활성을 나타내지 않았다.

			Concentration (mg/disc)		
	Propionibacterium acnes		50(A)	30(B)	10(C)
Clear zone (mm)	JE		a	a	a
Clear zone (mm)	SRE		a	a	a
	Staphylococcus pidermidis		50(A)	30(B)	10(C)
Clear zone (mm)	JE		a	a	a
Clear zone (mm)	SRE		a	a	a
	Staphylococcus aureus		50(A)	30(B)	10(C)
Clear zone (mm)	JE		a	a	a
Clear zone (mm)	SRE		a	a	a

D : control a : no inhibition

그림 78. Antimicrobial activity of JE and SRE in several microorganisms.

JE : 70% ethanol extract of Josaenghegchal, SRE : 70% ethanol extract of Shintoheug rice, Control : Deionized Water

(6) 리포좀 입자크기 및 분포

리포솜 제제의 입자 크기 분포는 그의 물리적 및 화학적 성질을 이해하는데 중요 할 수 있다. 그림 79 및 표 18은 리포솜 에센스의 평균 입경을 나타낸다.

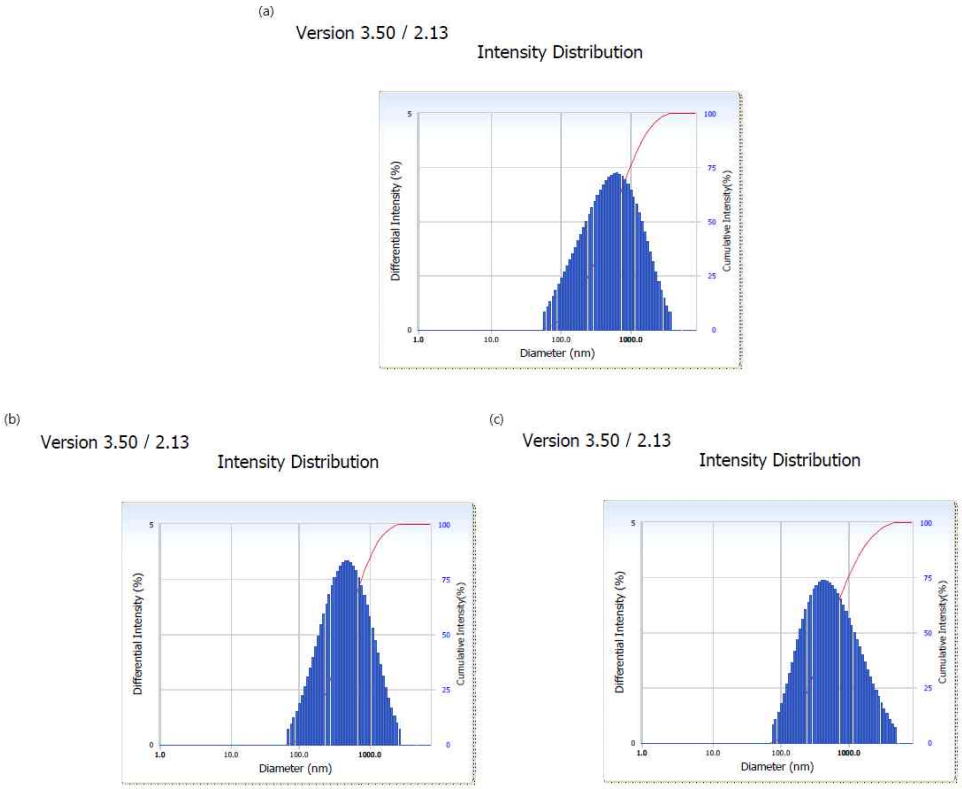


그림 79. Particle size analysis of liposmoe essence containing extracts of colored rice

(a) : Particle size of liposome essence not containing colored rice (NCR), (b) Particle size of liposome essence containing 70% ethanol extract of Josaenhegchal(JE), (c1) Particle size of liposome essence containing 70% ethanol extract of Shintoheug rice(SRE)

표 18. Particle size analysis of liposome essence containing extracts of colored rice

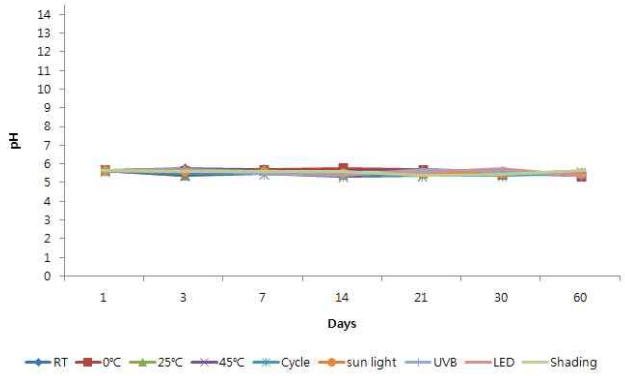
Cumants Rest			(a)	(b)	(c)
Diameter	(d)	(nm) :	410.7	391.7	430.3
Polydispersity Index	(P.I.)	(cm^2/sec) :	0.328	0.303	0.311
Diffusion Const.	(D)	:	1.198e-008	1.256e-008	1.143e-008
Residual		(O.K) :	1.548e-003	3.642-003	1684e-003

(a) : Particle size of liposome essence not containing colored rice (control), (b) Particle size of liposome essence containing 70% ethanol extract of Josaenhegchal(JE), (c1) Particle size of liposome essence containing 70% ethanol extract of Shintoheug rice(SRE)

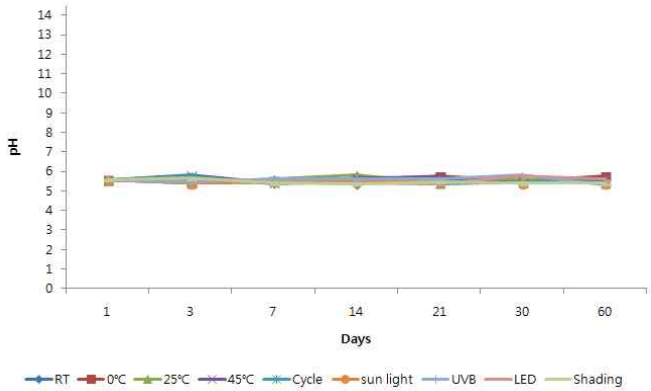
(7) 리포좀 에센스 안정성 및 안전성 실험

pH 측정은 정상 피부의 pH 범위는 5.0 ~ 5.5이다. 피부가 알칼리성 반응을 보인다면 저항이 낮고 세균 번식으로 인해 많은 피부 질환이 발생할 수 있다. 이러한 이유로 중성 또는 약산성 화장품을 피부에 사용하는 것이 좋다. 그림 80은 제조 된 리포솜을 60 일 동안 측정 한 결과를 나타내었다.

(a)



(b)



(c)

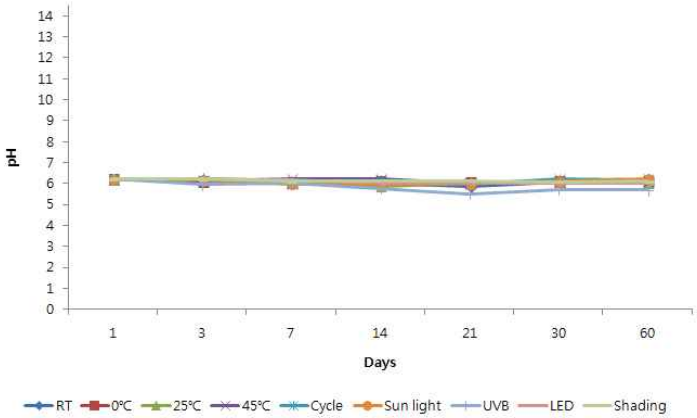
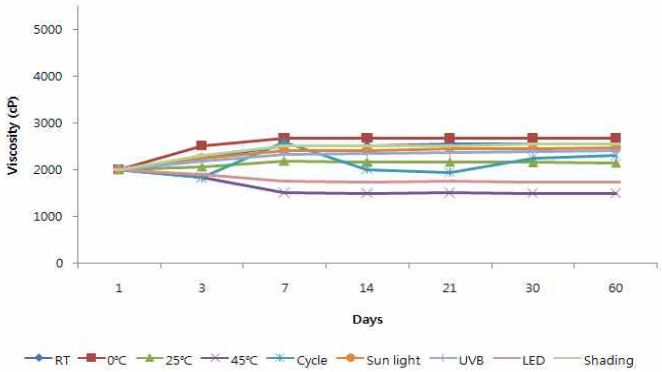


그림 80. pH change of JE, SRE and NCR

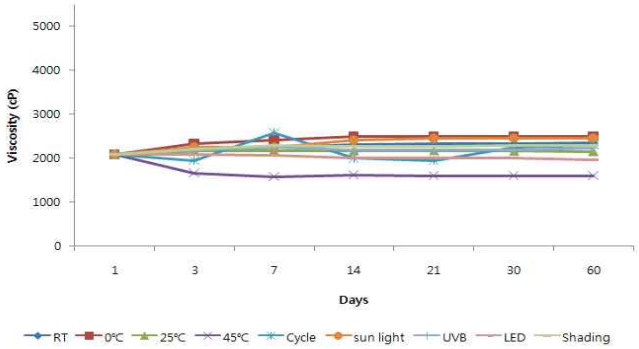
(a) : Containing no colored rice(NCR), (b) Containing 70% ethanol extract of Josaenghegchal(JE), (c) Containing 70% ethanol extract of Shintoheug rice(SRE).

점도 측정은 화장품의 외부 환경 요인에 의한 화학 변화, 변색, stenches 및 미생물 오염이 없어야한다. 제품의 안전성은 화장품 개발의 중요한 부분이기 때문에 일광에 노출되어 화장품의 온도 변화를 평가하는 것이 중요하다. 그 중 하나 인 점도는 태양의 광선 또는 그 주변 온도에 의해 물리적, 화학적으로 품질의 특성을 변경할 수 있는 가능성을 가지고 있다. 따라서 우리는 점도를 사용하여 안정성 테스트를 수행하여 이러한 요소를 파악했다. 그림 81은 60 일 동안 SRE, JE 및 NCR 제조의 측정 결과를 나타낸다.

(a)



(b)



(c)

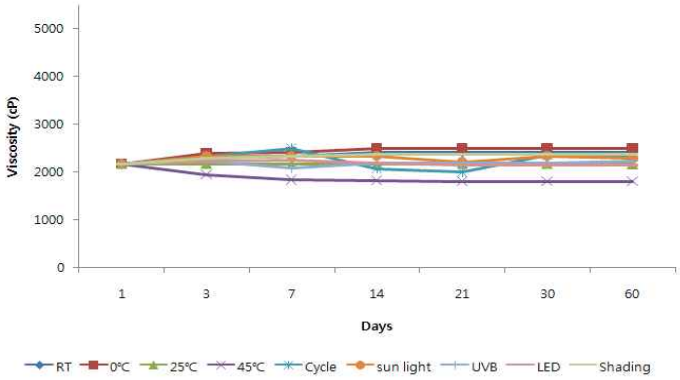


그림 81. Viscosity change of JE, SRE and NCR

(a) : Containing no colored rice(NCR), (b) Containing 70% ethanol extract of Josaenghegchal(JE), (c) Containing 70% ethanol extract of Shintoheug rice(SRE).

온도 측정 (0, 25, 45℃) 결과에 대해서는 표 19에 나타내었다. 저온 (0 ℃), 상온 (25 ℃), 고온 (45 ℃), 60 일간의 다양한 조건에서의 리포솜의 안정성을 나타냈다. 그 결과, 다양한 온도 조건에서의 육안 관찰은 변색 상 분리 현상을 나타내지 않았다.

표 19. Results of stability test of the nano liposome containing JE and SRE in constant temperature (0, 25, 45℃) conditions

(a)

NCR / Days	Temp. 0℃	25℃	45℃
1	O	O	O
3	O	O	O
7	O	O	O
14	O	O	O
21	O	O	O
30	O	O	O
60	O	O	O

(b)

JE / Days	Temp. 0℃	25℃	45℃
1	O	O	O
3	O	O	O
7	O	O	O
14	O	O	O
21	O	O	O
30	O	O	O
60	O	O	O

(c)

SRE / Days	Temp. 0℃	25℃	45℃
1	O	O	O
3	O	O	O
7	O	O	O
14	O	O	O
21	O	O	O
30	O	O	O
60	O	O	O

O :Stable, X: Unstable

(a) : Containing no colored rice(NCR), (b) Containing 70% ethanol extract of Josaenghegchal(JE), (c) Containing 70% ethanol extract of Shintoheug rice(SRE).

냉·해동 순환에 결과에 대해서는 표 20에 나타내었다. 10 cycle 동안 cycle chamber 조건에서의 안정성 테스트 결과를 보여줍니다. Cycle chamber (0 ℃, 25 ℃, 45 ℃)에 의한 리포솜의 물성 변화 없이 안정적이었다.

표 20.Resutlts of stability test of cosmetics in cycle chamber condition.

Clcle / Sample	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
NCR	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
JE	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
SRE	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O

O : Stable, X: Unstable

(a) : Containing no colored rice(NCR), (b) Containing 70% ethanol extract of Josaenghegchal(JE), (c) Containing 70% ethanol extract of Shintoheug rice(SRE).

광 안정성 측정 결과는 표 21에 나타내었다. 60 일 동안 리포솜의 자연 채광 테스트를 나타냈다. 자연광 테스트의 결과, 그것은 모두 안정되었습니다.

표 21. Results of stability test of cosmetics in photo (Natural light).

(a)

Con. / Day	Natural light
1	O
3	O
7	O
14	O
21	O
30	O
60	O

O : Stable, X: Unstable

(b)

JE / Day	Natural light
1	O
3	O
7	O
14	O
21	O
30	O
60	O

O : Stable, X: Unstable

(c)

SRE / Day	Natural light
1	O
3	O
7	O
14	O
21	O
30	O
60	O

O : Stable, X: Unstable

(a) : Containing no colored rice(NCR), (b) Containing 70% ethanol extract of Josaenghegchal(JE), (c) Containing 70% ethanol extract of Shintoheug rice(SRE).

BCP assay와 각막 침투 분석을 이용한 JE와 SRE의 점막 자극 평가 결과는 그림 82에서 JE와 SRE가 점막에 자극을 주지 않는다는 것을 보여준다. IVIS 값은 OECD 테스트 가이드 라인 437에 따라 자극을 분류하는 기준으로 계산되었습니다. 양성 대조군과 비교하여, IVIS 값은 JE와 SRE 둘 다 측정 하였다.

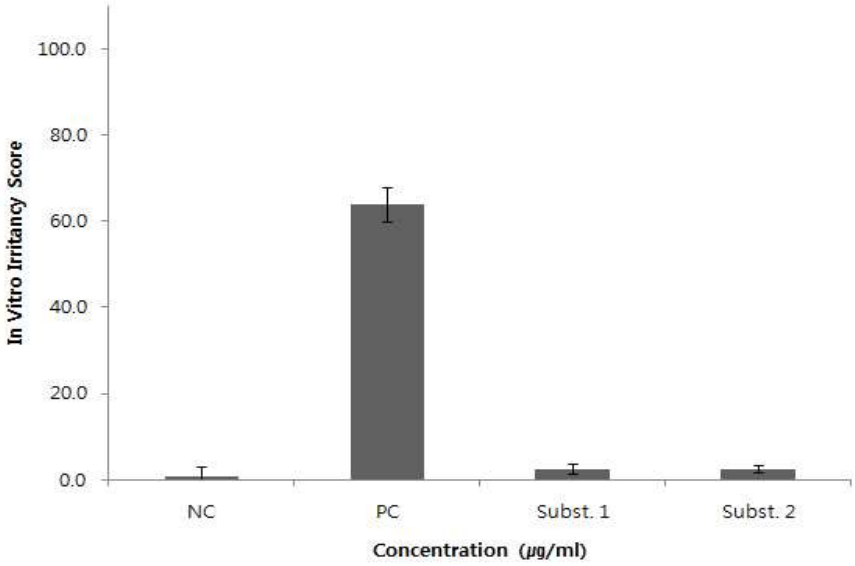


그림 82. The calculated IVIS values of colored rice to BCOP assay.

NC : Deionized Water, PC : Ethanol, Subst. 1 : 70% ethanol extract of Josaenghegchal(100 μg/mL), Subst. 2 : 70% ethanol extract of Shintoheug rice(100 μg/mL). Result are means ± S.D. of triplicate data

(8) Electron donating ability assay :

DPPH 라디칼 소거능 측정 평가에서 유색미 10가지 시료 모두 1000 μg/mL 농도에서 DPPH 라디칼 소거능이 60%이상으로 나타났다. 그 중에도 329, 478, 491은 80%이상의 라디칼을 소거하였으므로 항산화능이 보다 더 우수함을 확인하였다.

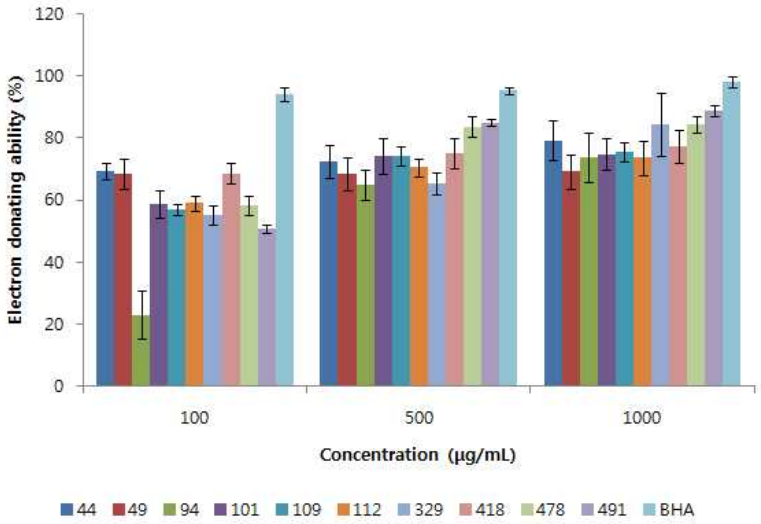


그림 83. Electron donating activity(%) of dependent on concentration from extracts of colored rice extracts BHA : Butylated hydroxyanisole. The data represent the mean± SD of three separate experiments.

(9) ABTS radical scavenging activity :

시료 100μg/mL 농도에서 유색미 94를 제외한 다른 유색미들은 라디컬 소거능이 80%이상의 효과를 나타내었다. 그러나 500, 1000μg/mL 농도에서는 유색미 10가지 시료 모두 ABTS+라디칼 소거능이 대조군인 BHT와 유사하여 항산화능이 우수함을 확인하였다.

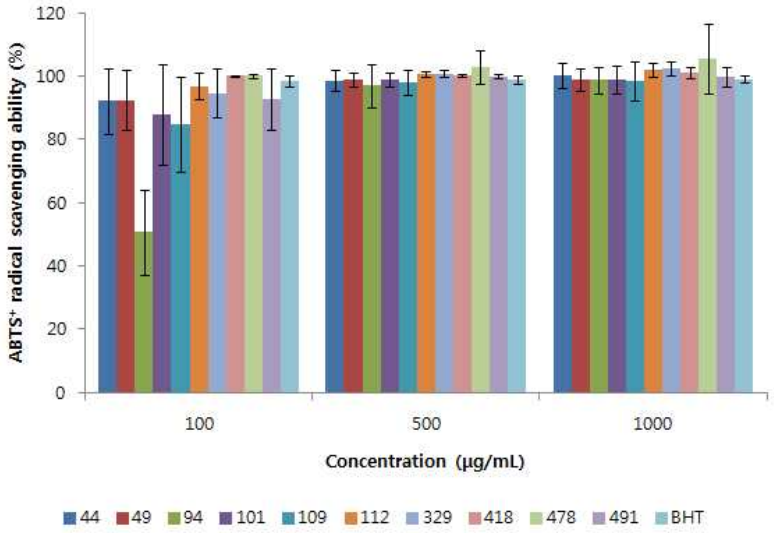


그림 84. $ABTS^{+}$ cation radical scavenging activity(%) of dependent on concentration from extracts of colored rice extractsl. BHT : Butylated hydroxytoluene. The data represent the mean± SD of three separate experiments.

(10) Superoxide dismutase like assay :

SOD 유사활성 측정결과 유색미 10가지 시료의 전 농도에서 SOD 유사활성 저해능은 낮은 것으로 나타났다.

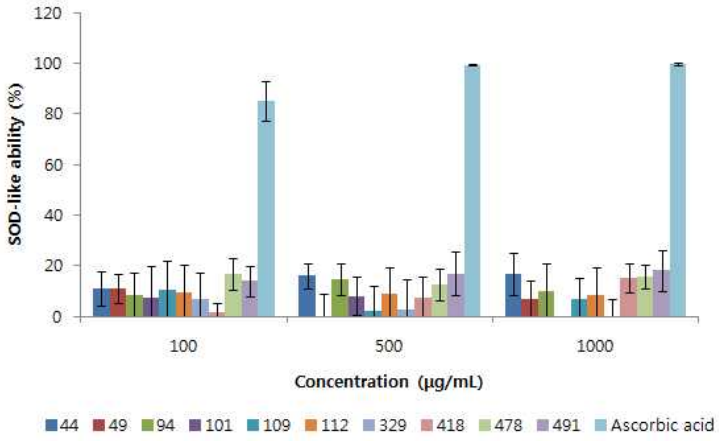


그림 85. Superoxide dismutase like activity(%) of dependent on concentration from extracts of colored rice extracts

(11) Hydrogen peroxide scavenging assay :

hydrogen peroxide 소거능을 측정한 결과 유색미 10가지 시료 모두 100, 500, 1000μg/mL에서 모두 hydrogen peroxide 소거능이 대조군인 Ascorbic acid와 유사하여 항산화능이 우수함을 확인하였다.

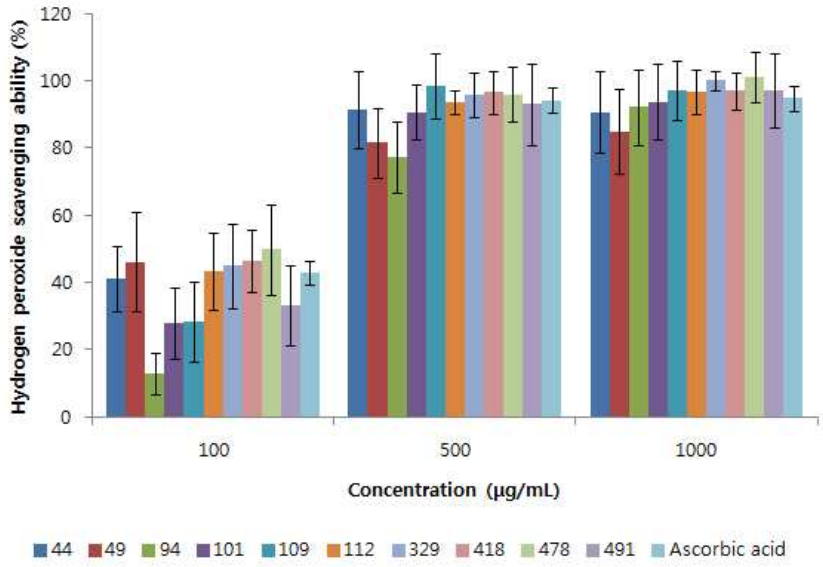


그림 86. Hydrogen peroxide scavenging activity(%) of dependent on concentration from extracts of colored rice extracts

(12) Tyrosinase inhibition activity assay

유색미 시료들이 농도 100μg/mL에서는 대조군인 Ascorbic acid와 비교 하였을 때 큰 차이가 많이 나지 않았지만, 최고농도인 1000μg/mL 농도에서 최대 약 40%정도 tyrosinase 억제활성이 나타났다, tyrosinase억제 활성이 낮으므로 미백활성에는 효과가 낮음을 알 수 있다.

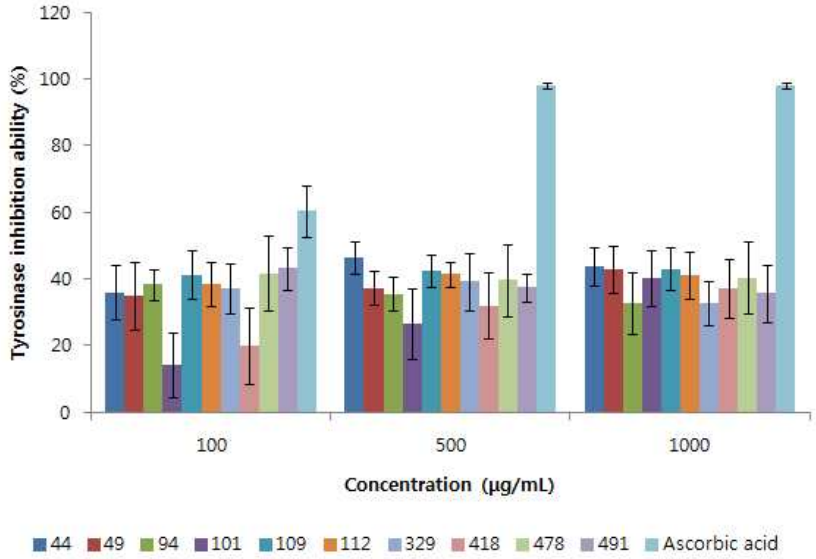


그림 87. Tyrosinase inhibition activity(%) of dependent on concentration from extracts of colored rice extracts

(13) Elastase inhibition activitiy assay

101번 유색미를 제외한 다른 유색미들은 elastase 억제활성이 최대 20%이므로 주름 억제 활성에는 효과가 없음을 알 수 있다.

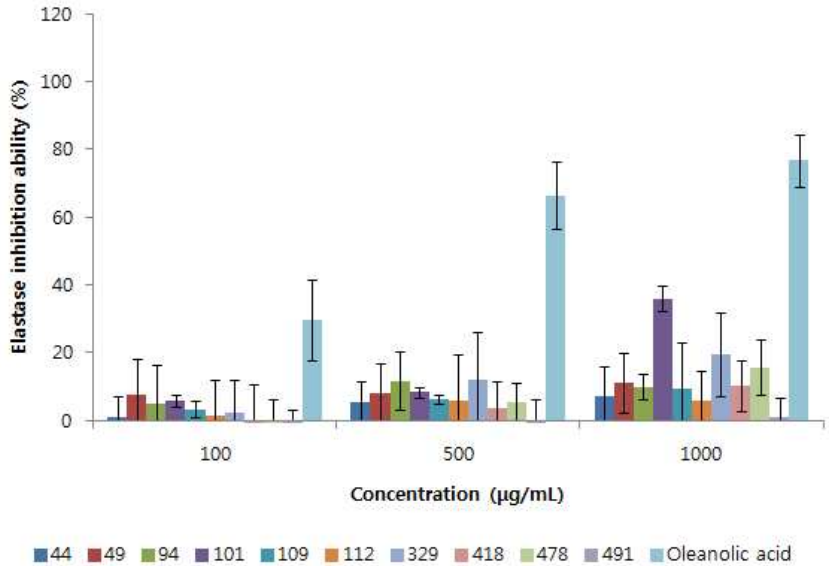


그림 88. Elastase inhibition activity(%) of dependent on concentration from extracts of colored rice extracts

(14) Collagenase inhibition activity assay

농도 100 , 500, 1000 μg/ml에서 농도의존적으로 활성이 증가함을 알 수 있었고, 10가지 유색미 중 44, 49, 418, 478 유색미가 높은 Collagenase 저해활성을 보였다.

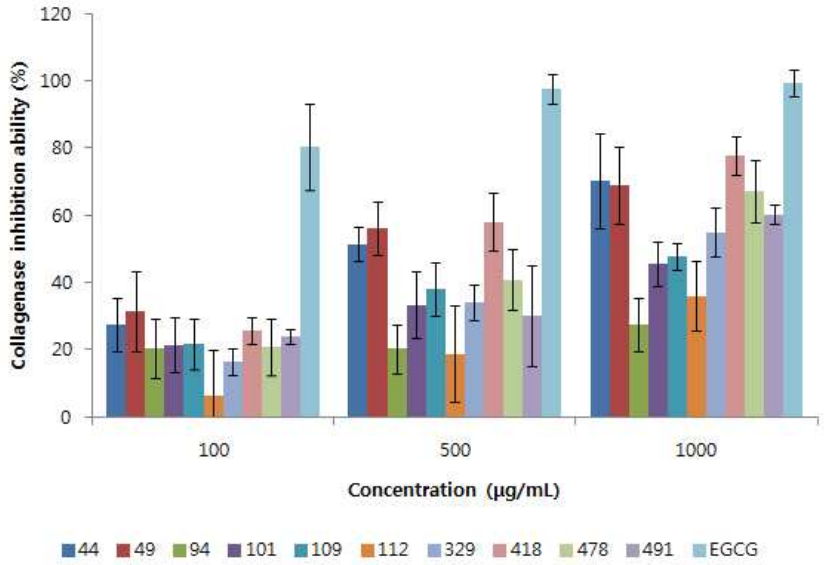


그림 89. Collagenase inhibition activity(%) of dependent on concentration from extracts of colored rice extracts

(15) MTT assay

선별된 유색미 2종 418과 419의 mouse 유래 macrophage cell인 RAW 264.7 세포에서의 생존율을 확인하기 위하여 MTT assay를 실시하였으며, 그 결과는 FIg. 18에 나타내었다. RAW 264.7 세포에 대하여 418과 419 모두 25 μg/ml 이하의 농도에서 각각 80% 이상의 세포 생존율을 나타내었다.

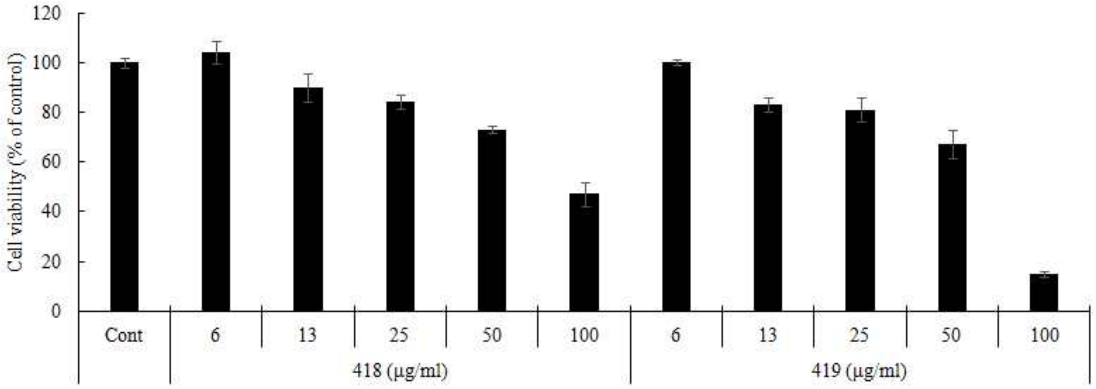


그림 90. Cell viability assay on macrophage RAW 264.7 cells of colored rice extracts. The cells were treated for 24h with the indicated concentrations of colored rice extracts. Cont : not treated any extracts.

(16) Cell tyrosinase activity 측정

선별된 유색미 418 과 419는 샘플의 농도의존적으로 cell tyrosinase 활성이 억제됨을 알 수 있다. 하지만 유색미 418의 25㎍/ml의 농도에서 약 80%정도임을 보아 cell tyrosinase 억제 활성이 낮음을 알 수 있다.

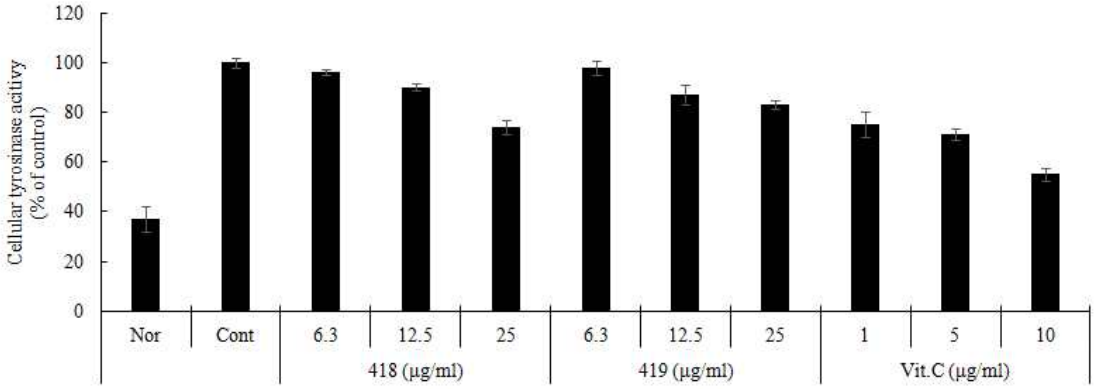


그림 91. Cell tyrosinase activity(%) of dependent on concentration from extracts of colored rice extracts

(17) ROS production rate

활성산소종은 매우 산화력이 강력하기 때문에 인체 내에서 제거되지 못하면 세포 손상을 일으킬 뿐만 아니라, 세포 내의 주요 염증 유발인자를 활성화시킴으로써 염증을 초래한다. Fig 20을 보면 Control에 비해 유색미 샘플을 처치한 것이 ROS 생성을 억제함을 알 수 있다. 유색미 418과 419 모두 농도의존적으로 ROS 생성량이 감소한다.

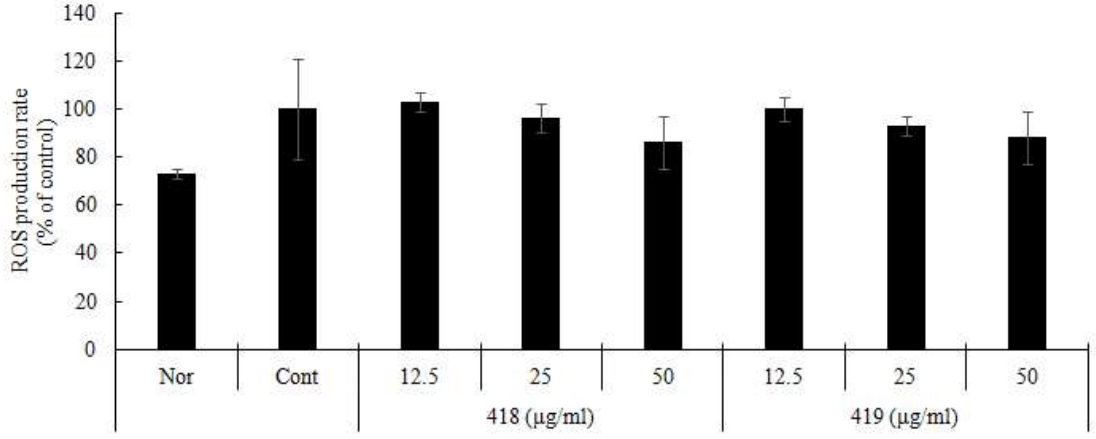


그림 92. ROS production rate(%) of dependent on concentration from extracts of colored rice extracts

(18) MMP-1 저해활성 측정

MMP는 ECM과 기저막을 구성하는 주요단백질들을 가수분해하여 피부탄력저하 및 주름형성을 유발하여 피부 처짐의 주요원인으로 작용한다. MMP-1은 진피층으로 분비되어 type Ⅰ collagen 기능저하의 주요원인이 된다. Control에 비해 유색미 샘풍을 처치한 것에서MMP-1발현은 감소되었다. 또한 농도의존적으로 MMP-1의 발현이 억제되었으며 418에 비해 419유색미가 MMP-1저해활성이 뛰어남을 알 수 있다.

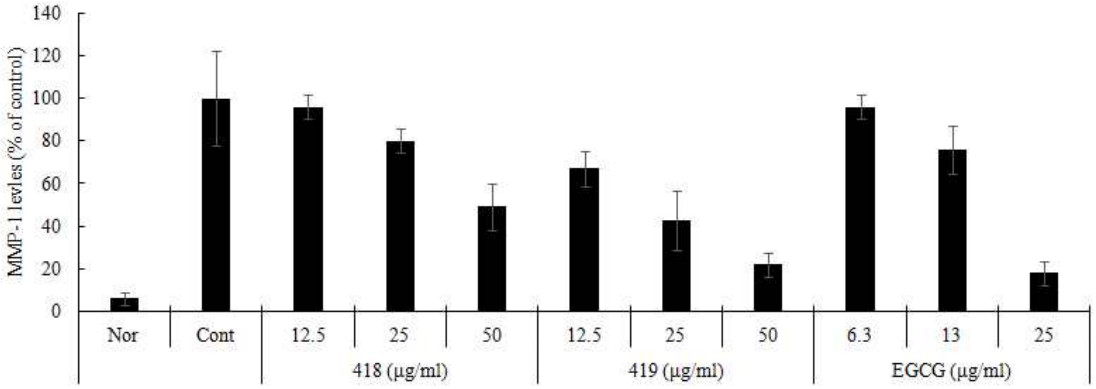


그림 93. MMP-1 level inhibition activity(%) of dependent on concentration from extracts of colored rice extracts

(19) Pro-collagen 합성측정

콜라겐의 전구물질인 pro-collagen 발현은 유색미의 샘플이 처치하였을 때 Control에 비교했을 때 발현이 증가된다. 유색미의 농도가 진할수록 농도의존적으로 pro-collagen의 발현은 증가하지만 대체적으로 pro-collagen의 합성활성은 낮음을 알 수 있다.

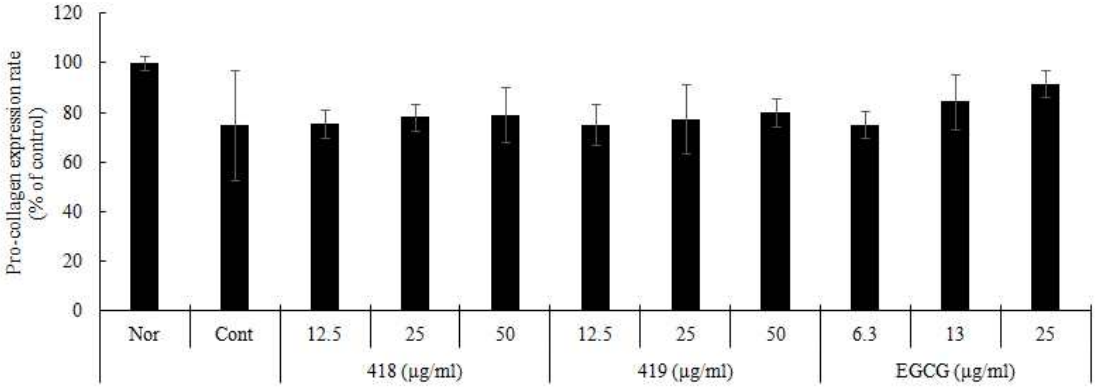
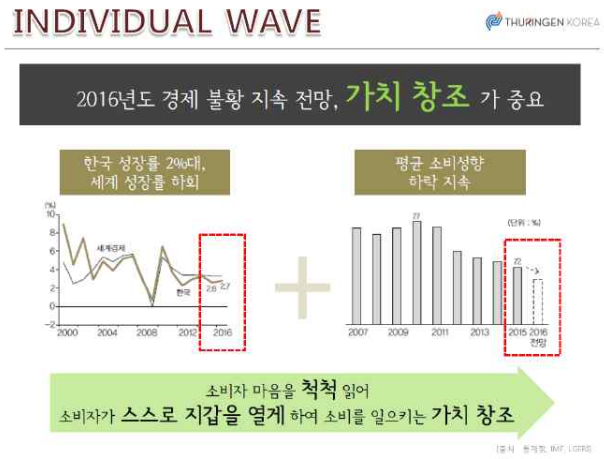


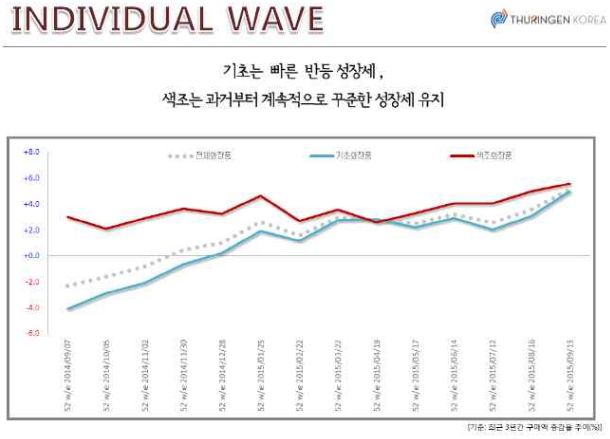
그림 94. Pro-collagen expression rate (%) of dependent on concentration from extracts of colored rice extracts

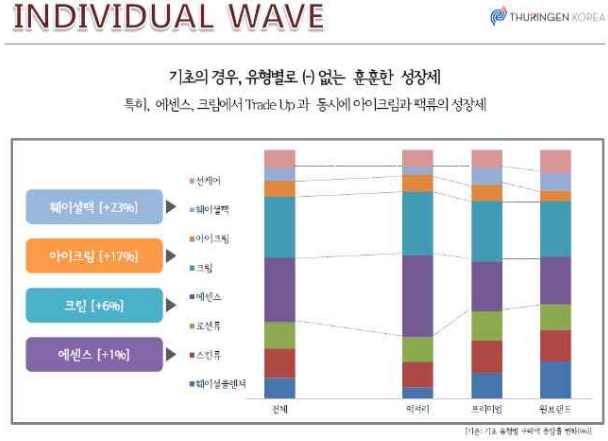
4. 유색미를 활용한 기능성 화장품 개발

가. 유색미를 활용한 화장품 제형 안정성 연구

(1) 2016년 기초·색조 트렌드 분석을 통한 유색미 제품개발 기획안(왼→오)







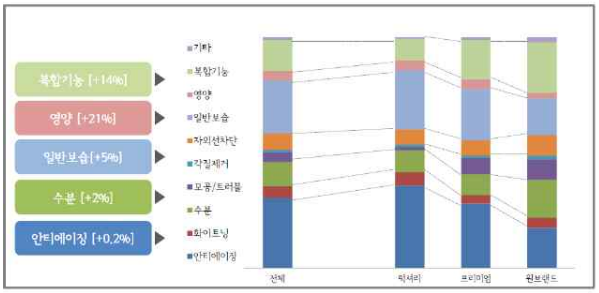
INDIVIDUAL WAVE

THURINGEN KOREA

기초의 경우, 영양과 복합기능성 성장이 주목

특히 복합기능성의 경우, 매스채널에서 강세

크림과 에센스 모두 안티에이징과 복합기능에 확대 및 주목



INDIVIDUAL WAVE

THURINGEN KOREA

오일, 함께 해서 올 겨울도 잘 견딘다 전해라~

INDIVIDUAL WAVE

THURINGEN KOREA

나 다시 돌아왔다. 이번엔 촉촉하면서도 진하게~

INDIVIDUAL WAVE

THURINGEN KOREA

MEGA TREND

INDIVIDUAL WAVE (INDIVIDUAL EXTRAORDINARY)

PRODUCT TREND

THE OLD IS NEW BLACK	THE SHIELD	SURPRIZE ME
오래된 것들은 다 OLD하다? 변화에 변화를 거듭하며 진화하고 오랫동안 회자되고 사랑 받는 제품들	고민 많은 하루하루 잠 못 드는 밤!!!! 지친 피부에 숨을 불어 넣어줄 오버나이트 제품들	불안하고 힘든 현재의 나에게 신선한 재미와 즐거움을 주고 색다른 흥미를 불러 일으키는 제품들
Endless Love Oil Oil Re-Former	Night, night	too much? TOO FUN! So Brilliant

INDIVIDUAL WAVE

THURINGEN KOREA

쌀쌀한 바람과 함께 찾아오는 건조함

가을, 겨울 피부 고민 해결

I Love Oil

INDIVIDUAL WAVE

THURINGEN KOREA

오일의 진화!

다양한 형태로 변화

다양한 컬러로 변화

BLACK OIL

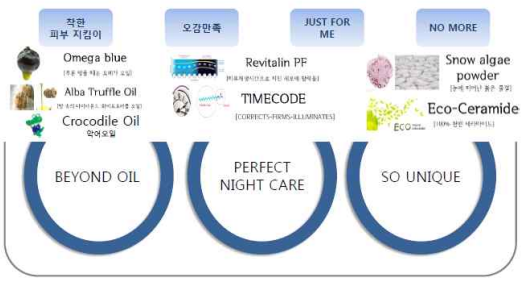
INDIVIDUAL WAVE

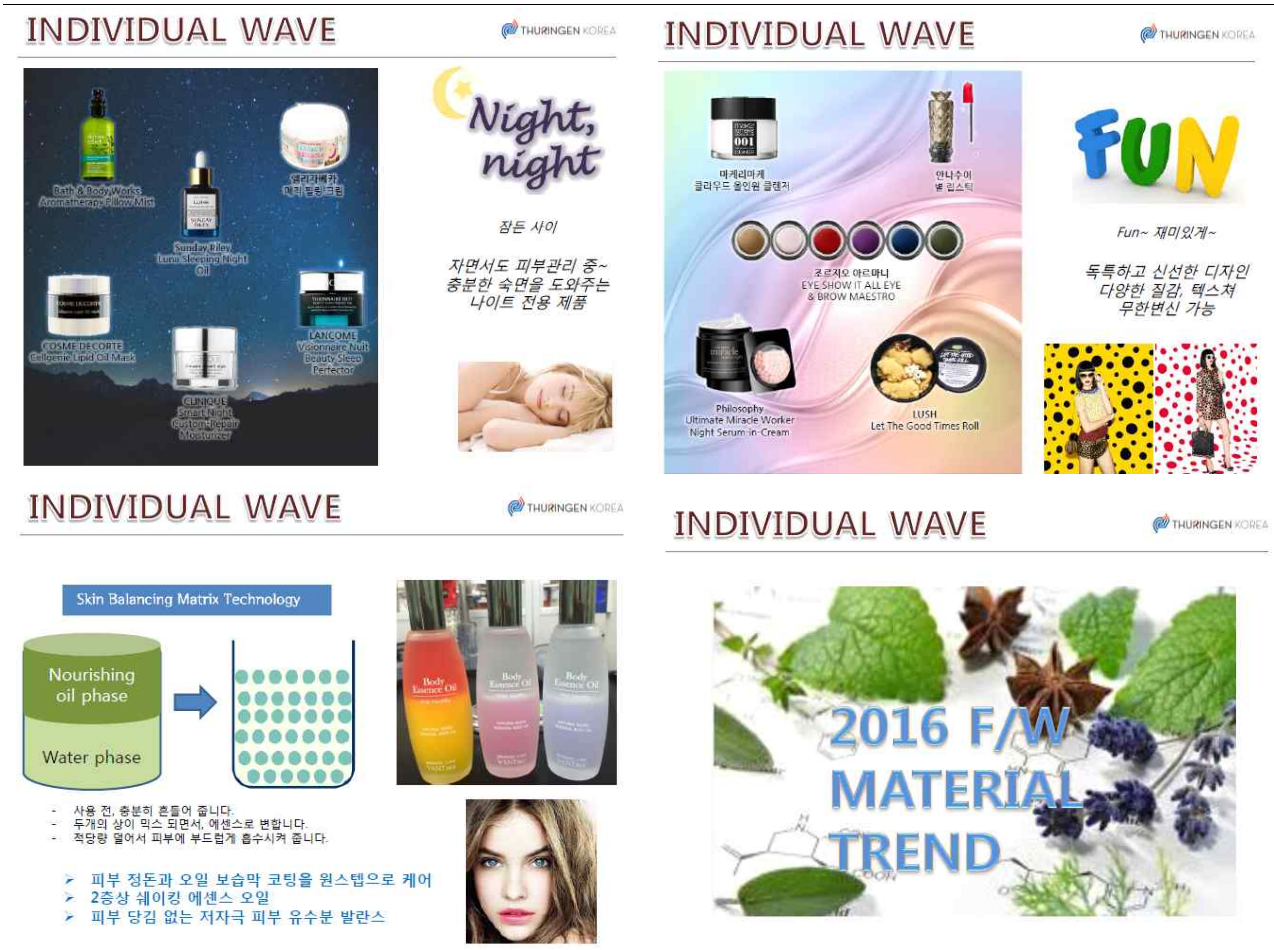
THURINGEN KOREA

SKIN CARE PROPOSAL

INDIVIDUAL WAVE

THURINGEN KOREA





(2) 제품 4종 선정 : 토너, 에센스(세럼), 에멀젼(로션), 크림

소비자 제품군 구입패턴 및 단품 구입에 따른 분석에 따라 단품으로 판매 가능 및 셋트 구성으로 가장 적합한 구성안 선정

INCI Name	Contents %(W/W)							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Water	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100
Butylene Glycol	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Glycerin	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Niacinamide	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
1,2-Hexanediol	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
Aloe Barbadensis Leaf Powder	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Trehalose	0.50	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Argania Spinosa Kernel Oil	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Sodium Hyaluronate	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Xanthan Gum	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Selaginella Tamariscina Extract	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Trifolium Pratense (Clover) Flower Extract	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Punica Granatum Fruit Extract	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Malpighia Emarginata (Acerola) Fruit Extract	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Rosa Damascena Callus Culture Extract	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Tocopheryl Acetate	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Arginine	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Butyloctyl Salicylate	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
PEG-40 Hydrogenated Castor Oil	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
Lavandula Angustifolia (Lavender) Oil	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S

Q.S. (Quantum sufficiat : Proper quantity)

우선 기초 라인 4종 선정함 : 추후 단품으로 구입가능한 고가의 아이크림과 중저가의 폼클렌징, 미스트 제품군 라인업, 중고가의 마스크팩 라인업 예정

마스크팩의 경우 패치의 구성안(부직포, 하이드로겔, 바이오셀룰롤오스 등)에 따라 매우 다양한 제품이 있으므로, 현재 과포화 상태인 마스크팩 시장에서 흐름을 보고, 틈새시장을 노리는 것도 좋음. 뽑아쓰는 타입의 마스크팩 또는 잘라쓰는 마스트팩 등 기존의 제품과 다른 특색 있는 제품을 만들면 재미있고, 특이한 제품을 만들 수 있음.

<판매추이가 가장 높은 기본 4종 SET 구성>

(3) 기능성화장품 가능성 분석 (미백, 주름개선 기능성제품)

식약처 화장품 고시원료인 미백: 나이아신아마이드 2% 함유, 주름: 아데노신(0,04%) 함유

기본 4종 SET 구성에서는 2중성 또는 미백기능성 제품군으로의 출시가 가능 좋을 듯함. 씻어내는 제품군에서는 기능성 필요 없음.

아이크림은 주름기능성 필수이며, 마스크팩은 2중 기능성 보다는 항산화 등의 유색미의 특징을 부각 시키는 것이 좋을 듯함.

(4) 제형 안정화 : 저온 유화법 적용

- 가용화 타입인 토너의 pH 5.79~5.81의 범위로 매우 안정함.
- 점도측정의 의미는 없으므로, 유화타입인 에센스, 로션, 크림타입의 Viscosity 측정
- 토너는 시간에 따른 Color의 변화 관찰 : 천연색소이므로 색 안정성이 필요함
- 연구실에서 제조 후 30일 이내 색 변화 관찰됨.

→ Toner Formulation

: 가용화 타입으로 투명한 토너 제형 적용

: 무향토너

: 유색미 0.1% 농도로 자연스러운 붉은 색을 나타냄,

: 토너의 pH에 따라서 색상의 변화가 있었으나, pH 5.79~5.81가 가장 안정하였음.

INCI Name	Contents %(W/W)							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Water	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100
Anthemis Nobilis Flower Extract	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS
Morus Alba Bark Extract	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS
Glycyrrhiza Glabra (Licorice) Root Extract	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS
Butylene Glycol	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS
Niacinamide	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Hamamelis Virginiana (Witch Hazel) Leaf Extract	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS
Glycerin	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS
Alcohol	QS	QS	QS	QS	QS	QS	2.0	3.0
RICE Extract	QS	QS	QS	QS	QS	1.0	0.1	0.5
Tocopheryl Acetate	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS
Collagen	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS
Sodium Hyaluronate	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS
Allantoin	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS
1,2-Hexanediol	QS	QS	QS	QS	QS	2.0	1.5	1.5
PEG-60 Hydrogenated Castor Oil	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS
Fragrance	QS	QS	QS	QS	QS	QS	0.0	0.01

→ Essence Formulation

: 저온 유화타입으로 불투명한 에센스 제형 적용

: 무향에센스

: 유색미 1,0% 농도로 자연스러운 핑크색을 나타냄,

: O/W 타입으로 수용성의 유색미 추출물도 가능함.

: 추출물의 안정성을 위해 45도에서 후첨함.

INCI Name	Contents %(W/W)							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Water	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100
Butylene Glycol	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Glycerin	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Niacinamide	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
1,2-Hexanediol	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
Aloe Barbadensis Leaf Powder	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Trehalose	0.50	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Argania Spinosa Kernel Oil	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Sodium Hyaluronate	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Xanthan Gum	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
RICE Extract	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	1.0	3.0	1.0
Trifolium Pratense (Clover) Flower Extract	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Punica Granatum Fruit Extract	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Malpighia Emarginata (Acerola) Fruit Extract	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Rosa Damascena Callus Culture Extract	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Tocopheryl Acetate	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Arginine	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Butyloctyl Salicylate	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
PEG-40 Hydrogenated Castor Oil	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
Lavandula Angustifolia (Lavender) Oil	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S

Q.S. (Quantum sufficient : Proper quantity)

→ Lotion Formulation

: 저온 유화타입으로 유백색 타입의 로션 제형 적용

: 무향로션

: 유색미 1,0% 농도로 자연스러운 연핑크색을 나타냄,

: O/W 타입으로 수용성의 유색미 추출물도 가능함.

: 추출물의 안정성을 위해 45도에서 후첨함.

INCI Name	Contents %(W/W)							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Water	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100
Glycine Soja (Soybean) Germ Extract	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Aloe Barbadensis leaf Extract	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Glycerin	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Anthemis Nobilis Flower Extract	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Glycyrrhiza Glabra (Licorice) Root Extract	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Butylene Glycol	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Propylene Glycol	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Hamamelis Virginiana (Witch Hazel) Leaf Extract	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Alcohol	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Collagen	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Adenosine	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
RICE Extract	Q.S	Q.S	Q.S	5.0	0.1	3.0	1.5	1.0
Tocopheryl Acetate	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Allantoin	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Panthenol	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Xanthan Gum	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Sodium Hyaluronate	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Phenoxyethanol	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Fragrance	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	0.005	0.001	0.0

→ Cream Formulation

: 저온 유화타입으로 유백색 타입의 크림 제형 적용

: 무향크림

: 유색미 1,0% 농도로 자연스러운 연핑크색을 나타냄(에센스와 로션의 중간색상)

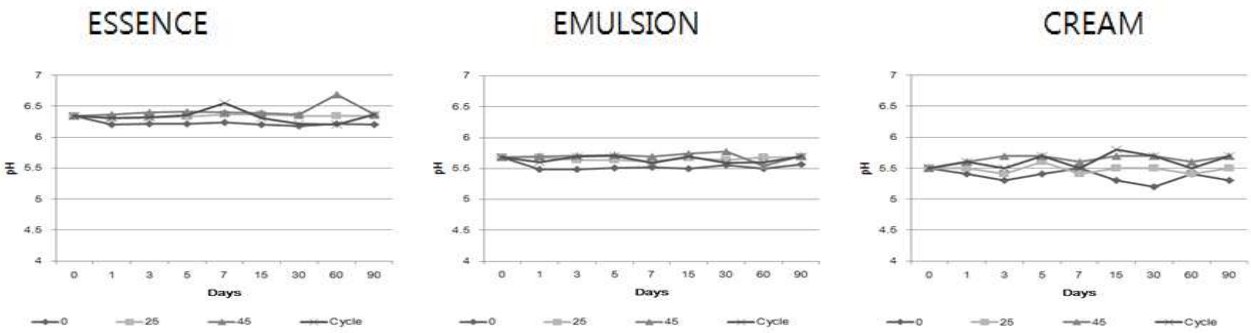
: 왁스와 점증제의 함량 변화로 점도의 변화를 줌

: O/W 타입으로 수용성의 유색미 추출물도 가능하며, 내상의 증가로 가을 겨울철 사용 시 보습감이 우수함.

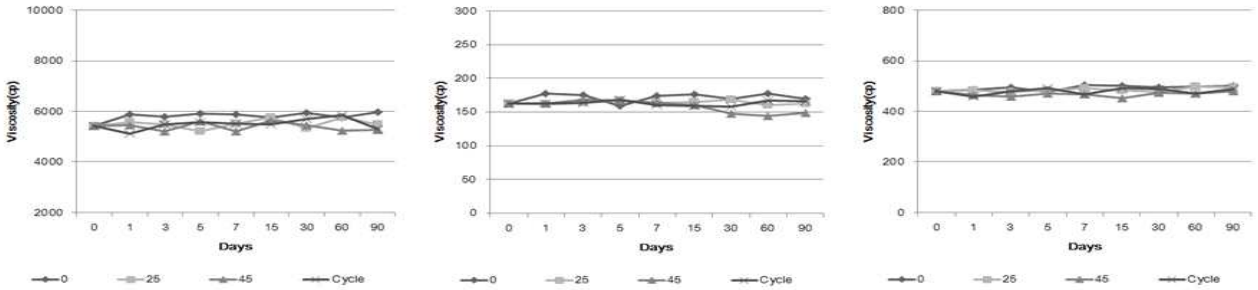
: 추출물의 안정성을 위해 45도에서 후첨함.

INCI Name	Contents %(W/W)							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Water	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100
Anthemis Nobilis Flower Extract	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS
Morus Alba Bark Extract	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS
Glycyrrhiza Glabra (Licorice) Root Extract	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS
Butylene Glycol	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS
Niacinamide	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Hamamelis Virginiana (Witch Hazel) Leaf Extract	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS
Glycerin	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS
Alcohol	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS
RICE Extract	QS	QS	QS	QS	QS	QS	1.0	QS
Tocopheryl Acetate	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS
Collagen	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS
Sodium Hyaluronate	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS
Allantoin	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS
Panthenol	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS
Xanthan Gum	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS
1,2-Hexanediol	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS
Caprylyl Glycol	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS
Phenoxyethanol	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS
Lavandula Angustifolia (Lavender) Oil	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS
Phenyl Trimethicone	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS
PPG-26-Buteth-26	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS
PEG-40 Hydrogenated Castor Oil	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS	QS
Fragrance	QS	QS	QS	QS	QS	QS	0.0	0.01

- pH



- Viscosity(점도)



→ Essence 제형의 온도별 보관에 따른 90일 동안의 pH 변화 측정 6.35~6.37의 범위로 매우 안정적임. Emulsion의 경우 또한 pH 5.5~5.7의 범위로 매우 안정함. Cream은 고온에서의 물성의 변화가 있었으나, 일시적이었으며 점증제와 왁스의 함량, 내상의 증가로 제형안정성을 다시 확인하였음. pH 5.4~ 5.67로 안정함.

→ Essence 제형의 온도별 보관에 따른 90일 동안의 viscosity 변화 측정 브룩필드 점도계 (63S, 53%)를 이용하여 측정하였으며, 5900cps 범위로 매우 안정적임. Emulsion의 경우 또한 viscosity(65S, 51%) 변화가 매우 안정함. Cream은 고온에서의 물성의 변화가 있었으나, viscosity(65S, 49%) 일시적이었으며 점증제와 왁스의 함량, 내상의 증가로 제형 안정화 함.

- 온도별 제형 안정성 TEST : 분리, 변취 없었으나, 토너에서 30일 이후부터 색상이 흐려지는 현상이 발생됨. 특히 빛에 노출될 경우 가속화 되는 경우가 관찰됨(7일 이내)
  이는 모든 천연색소가 가지는 문제점으로 색안정성이 필요함.

Day	Sample	Toner	ESSENCE	Emulsion	Cream
0℃	1	O	O	O	O
	3	O	O	O	O
	5	O	O	O	O
	7	O	O	O	O
	15	O	O	O	O
	30	O	O	O	O
	60	O	O	O	O
	90	O	O	O	O
25℃	1	O	O	O	O
	3	O	O	O	O
	5	O	O	O	O
	7	O	O	O	O
	15	O	O	O	O
	30	O	O	O	O
	60	O	O	O	O
	90	O	O	O	O

O: Stable X : Unstable

Day	Sample	Toner	ESSENCE	Emulsion	Cream
Cycle	1	O	O	O	O
	3	O	O	O	O
	5	O	O	O	O
	7	O	O	O	O
	15	O	O	O	O
	30	O	O	O	O
	60	O	O	O	O
	90	O	O	O	O
45℃	1	O	O	O	O
	3	O	O	O	O
	5	O	O	O	O
	7	O	O	O	O
	15	O	O	O	O
	30	O	O	O	O
	60	O	O	O	O
	90	O	O	O	O

O: Stable X : Unstable

나. 추출물 소재 제형 적용 가능성 분석 (향취, 색상)

(1) 쌀추출물 유효농도 0.1% : 조생흑찰

항산화 활성도가 높은 조생흑찰(EtOH)추출물을 DW(55%), 1,3-BG(40%), Rice Ext.(5%) Stock solution을 조제하여, DW로 희석하여 Color 비교함

- pH 5.9~6.2로 안정함
- 방부조건 안정함
- 1% 농도 결정 (토너 최종 농도 0.1%, 에센스, 로션, 크림 유화제형은 1.0% 적용함)
- 향취는 거의 없음. 특이취 없음.

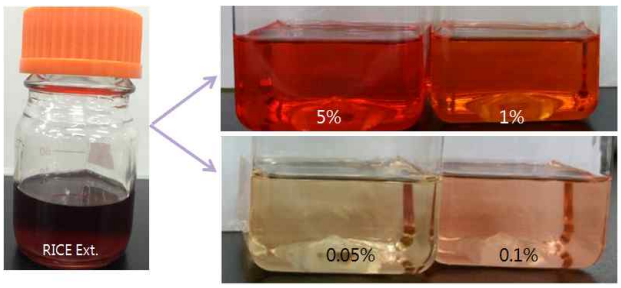


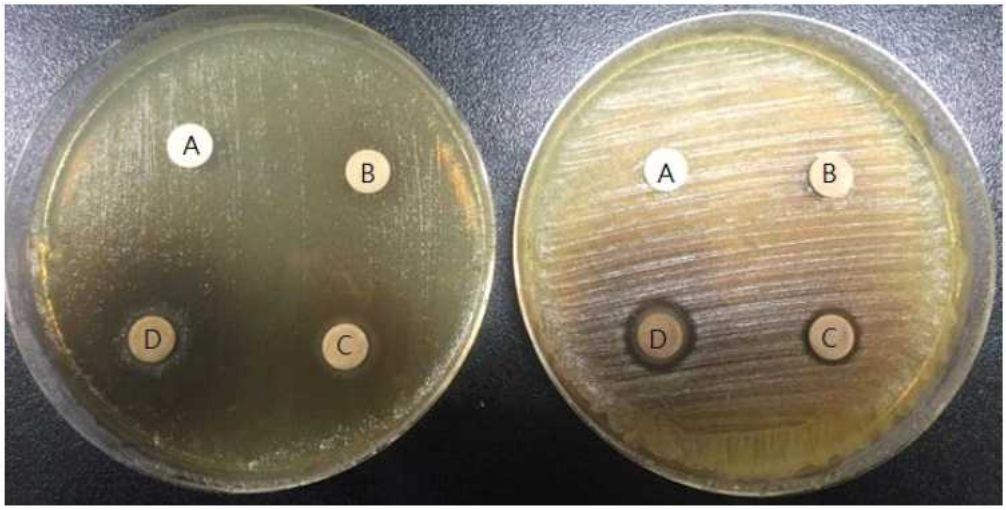
그림 95. 토너 0.1%

그림 96. 에센스, 로션, 크림 1,0%

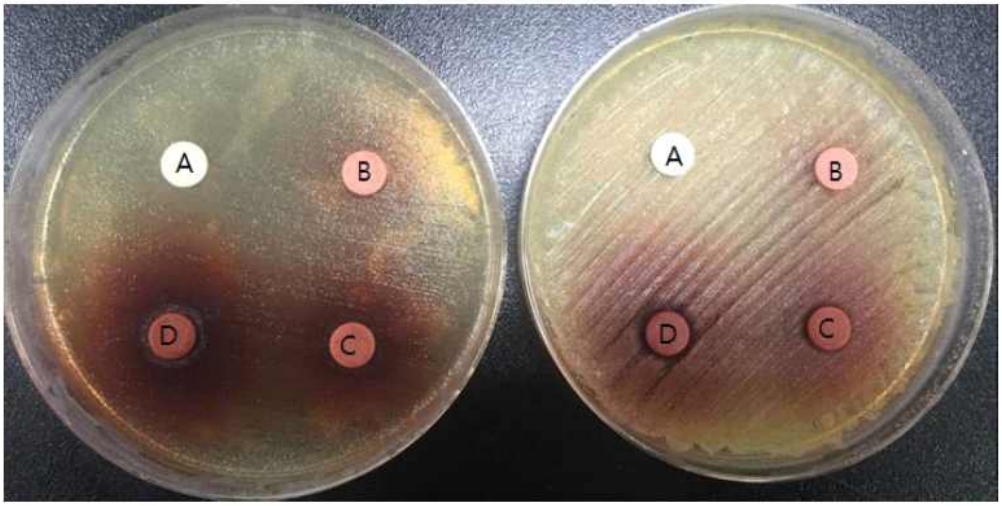
(2) 방부시험 Challenge test : 전성분 표기상 무방부제 제품을 위해서

- 미생물 확인시험(추출물 세균, 진균 test) ; 조생흑찰 Water 추출물

-



Escherichia coli (KTCC No. 2571) *Staphylococcus aureus* (KTCC No. 3881)



Escherichia coli (KTCC No. 2571) *Staphylococcus aureus* (KTCC No. 3881)

A : D.W **B : 10mg/ml** **C : 50mg/ml** **D : 100mg/ml**

* 시료전처리 : D.W 에 soluble 한 후 -> 0.25um필터 * Loading : 50ul

그림 97. 조생흑찰 Ethanol 추출물

조생흑찰의 미생물 항균 TEST 시험결과 열수, 에탄올 모두 50mg/ml, 100mg/ml의 농도에서 항균력을 나타내고 있음.

화장품 적용 시 유화제품에는 1% 최적농도, 가용화 타입의 에탄올 함량 2~3%일 경우 0.1% 선정함.

1,2-hexandiol 함량 1.5% 추가 하여 , 무방부제 system 적용 -> 천연화장품으로 개발

(3) 사용감 개선 : 흡수성 및 발림성, 향취

- 사용감 평가 조사에 따라 진행함 ;
  (보습감, 발림성, 광택, 흡수력 등 다양한 범위에서 2~3일 동안 20~30대 여성 15명 사용함)
- 흡수력을 높이기 위해 점증제의 함량을 줄이거나, Gum 함량을 0,01% 높임
- 발림성 및 광택감을 위해 보습제의 함량을 2% 높임
- 합성향료 배제, 무향컨셉 추세임. 인공향 배제
- EWG 원료 4등급 이내 원료 사용

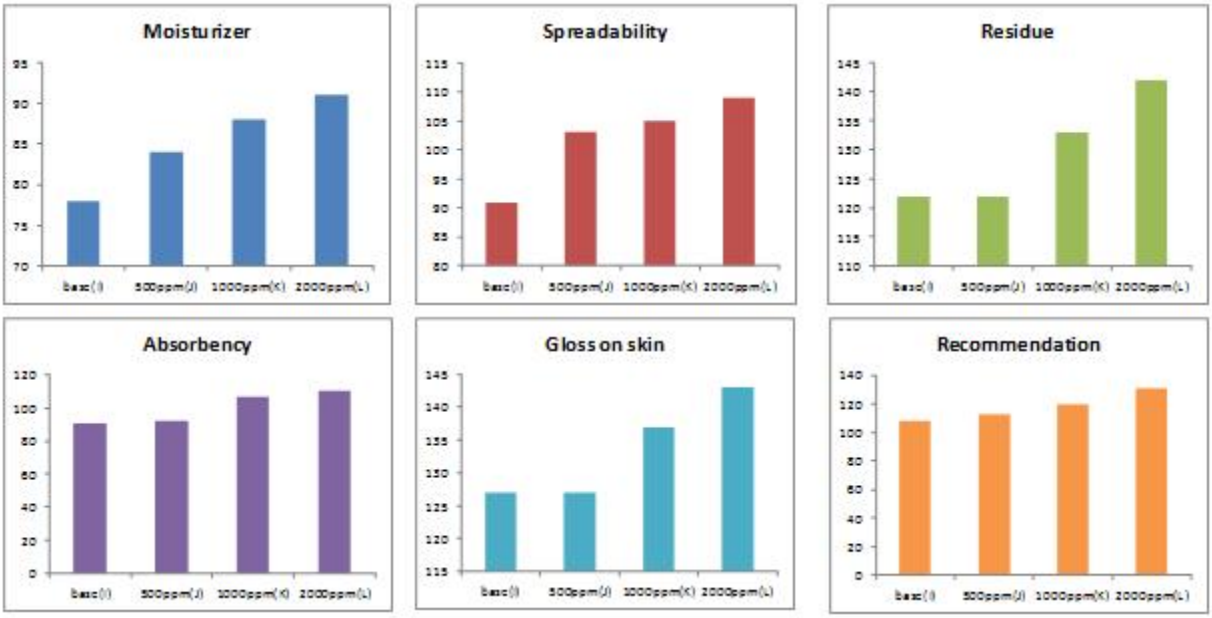
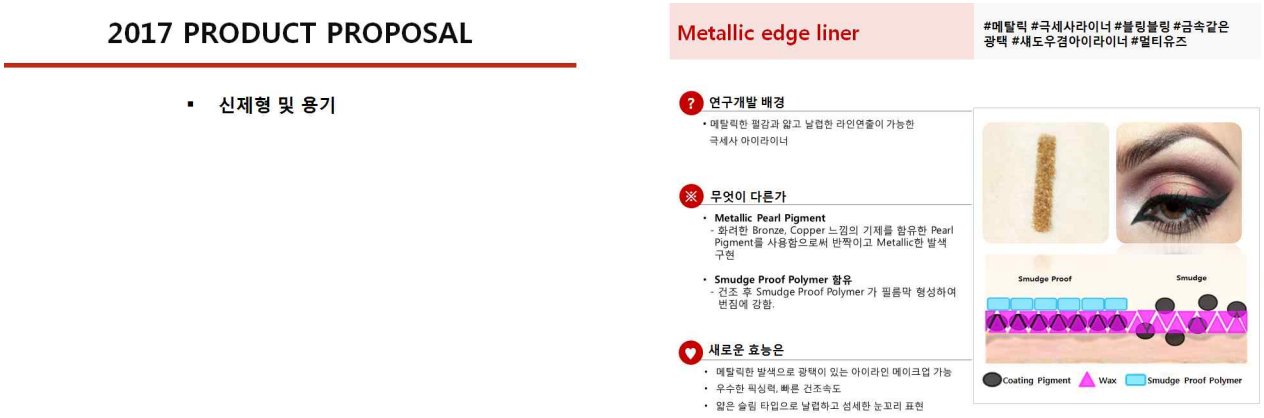


그림 98. 흡수성, 발림성 및 향취 평가

다.유색미를 활용한 화장품 제형 안정성 연구-1

(1) 2017년 기초·색조 트렌드 분석을 통한 유색미 제품개발 기획안(왼→오)



Big brow stick

#곰손도그린다 #쉬운눈썹만들기 #컨투어링스틱

연구개발 배경

• 아이메이크업 초보자도 손쉽게 사용이 가능하며, 컨투어 음영 스틱으로도 활용 가능한 멀티스틱

무엇이 다른가

• **HARD WAX + COATING PIGMENT SYSTEM**

- 원형크기가 크지만 경도가 강한 왁스를 사용하여 최대한 눈썹이 뭉치지 않고, 코팅된 색소를 사용하여 사용감 및 발색력을 최대한 끌어 올림.

• **유연한 피부구조와 알맞은 형태의 폴리머 사용**

- 유연하고 많은 피지를 분비하는 눈썹에 알맞도록 미세 구상 미립자 파우더를 사용, 눈썹의 빈틈없이 도포 가능.

새로운 효능은

• 초보자도 쉽게 아이메이크업 가능
• 강한 경도지만, 부드럽게 발리며 보송한 사용감 부여
• 벨벳을 만지는 듯한 부드러운 사용감
• 자연스러운 발색력, 파우더 듀얼 타입으로 그라데이션 가능

<눈썹의 두께에 최적화된 크기의 브로우>

Cushion / Palette

Key point

✓ 단가가 저렴한 세 가지 사이즈로 구성 된 NEO 에어 쿠션 용기

✓ 소비자가 원하는 제품을 선택하고 원하는 위치에 쉽고 편리하게 배치 할 수 있는 자석 팔레트 용기

적용가능 제품 Image

SHYAHSIN(SH172040, SH172041, SH172042)
Neo cushion
Size : 소, 중, 대
Material : ABS, PP

• 부품수가 3pcs로 용기 단가 절감
• 다양한 사이즈로 여러 색조제품 접목 가능

LI HAO PLASTIC
Palette
Size :
Material : ABS

• 자석을 이용한 홈 구성의 팔레트
• 소비자가 원하는 제품 및 컬러로 세트 구성

Applicator tube

Key point

✓ 어플리케이터가 달린 라미네이트, PE 튜브

✓ 국내보다 저렴한 단가

적용가능 제품 Image

3apples
Flocking type tube
Size : Ø19
Material : PP, PE

• 후로킹 어플리케이터 장착 튜브
• 기본 사출타입에 비해 발림 성 우수
• 부드러운 감촉으로 도포

Wanlong
Swab tube
Size : Ø19(2ml)
Material : cotton, PE

• 일반면봉의 10배보다 큰 사이즈의 왕 면봉 내장
• 한번 사용하고 버리는 1회용 튜브용기로 위생적
• 주로 각질제거 전용인 필링 제품으로 사용

Contain
applicator tube
Size : Ø19, Ø25
Material : ceramics, zinc alloy

• 수술도구로 사용할 정도의 안전한 재질로 피부에 자극 없이 마사지 가능
• 쿨링감으로 피부의 탄성력과 피부진정에 효과적

Blister / Mask pack

Key point

✓ 자사 블리스터 기계 도입

✓ 다양한 블리스터 제품 생산 가능

✓ 독자개발 신개념 삼각 블리스터 제품 생산

적용가능 제품 Image

3apples
Blister
Size : all
Material : PET

• 견본품, 본 품 패키지 용기로 적용
• 삼각 블리스터의 경우 각각 다른 네 가지 내용물 적용 가능

3apples
Mask pack
Size : all

• 충진 : 8시간 1대 기준 35,000EA 생산(설비 8대 보유)
• 자동 시트 접지 : 8시간 1대 기준 20,000EA 생산 (접지설비 10대 보유)

Spout / Remover pouch

Key point

✓ 다양한 제품에 적용이 가능한 파우치

✓ 자동기계 도입으로 생산성이 우수하며 위생적

✓ 슬림하고 부피가 작아 휴대 성이 뛰어남

✓ 저렴한 단가

적용가능 제품 Image

3apples
Spout pouch
Size : all
Head : 두 가지 타입 가능

• 다 회성의 스파우트가 장착된 파우치
• 공기에 노출되지 않아 위생적이며, 얇고 부피가 작아 휴대 용이

3apples
Remover pouch
Size : 2.5g
Sheet :

• 일회용 물티슈 형태로 한 장씩 개별포장 제품으로 위생적
• 여행, 외출 시 슬림하고 간편하게 휴대 가능

Tube

Key point

✓ 여행용 키트용기로 활용 가능한 실리콘 튜브

✓ BOBBIBROWN에서 출시한 LIP 용기

✓ 바디부분이 유연한 재질로 튜브처럼 짜내어 사용

적용가능 제품 Image

TAC-501
Silicon tube
Size : small, medium
Material :

• 실리콘 형 튜브 용기
• 여행용으로 사용 가능

TAC-601
Lip tube
Size :
Material :

• BOBBIBROWN 에서 출시한 LIP 용기
• 유연한 바디부로 튜브처럼 짜내어 사용

24

2017/FW Trend Proposal

Cabaret - 다양성

차별, 우월주의에 맞서 다양성에 대한 관심이 대두되고 있다. 종교, 인종, 성별에 대한 차별 없이 조화되던 카바레(cabaret)의 개념을 바탕으로 상반된 성향이 한데 어우러지는 현상을 보인다. 밝고 어두운 상반된 성향의 컬러가 혼재되면서 퇴폐적인 매력을 발산한다.

출처 – 한국컬러인드 패션트렌드 센터(www.http://cft.or.kr/) 3

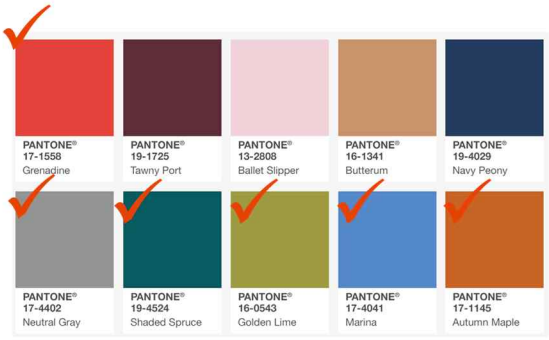
2017/FW Trend Proposal

Craftware – 회귀, 레트로

가상현실, 기술의 발전이 늘어감에 따라 과거의 아날로그, 핸드메이드, 고전으로의 회귀현상이 나타나고 있다. 그레이와 브라운같이 차가우면서도 따뜻한 중성적인 컬러를 밝은 컬러와 섞어 흑백TV를 보듯 과거의 향수를 불러일으키는 컬러 팔레트를 완성한다.

출처 – 한국컬러인드 패션트렌드 센터(www.http://cft.or.kr/) 4

2017 FW PANTONE COLOR REPORT



출처 – 팬톤 (http://www.pantone.kr/) 7

2017 FW PANTONE COLOR REPORT

PANTONE®
17-1558
Grenadine

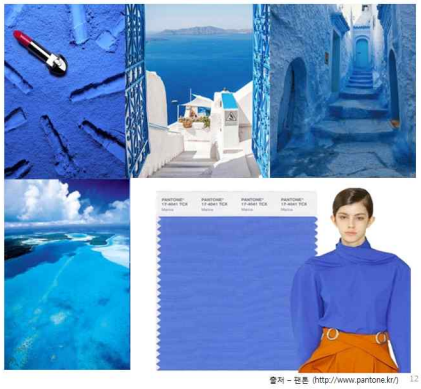
- 2017 FW 대표컬러.
- 네일 뿐 아니라 립 컬러로도 많이 선보임
- 펄 조합
  : 골드, 아이보리, 브론즈 골드

출처 – 팬톤 (http://www.pantone.kr/) 8

2017 FW PANTONE COLOR REPORT

PANTONE®
17-4041
Marina

- 마린 블루 컬러와 마룬 핑크 컬러 조화.
- 글리터 조합
  : 실버, 마룬 핑크&다크골드
- 컬러 조합
  : 마룬 핑크, 바이올렛



출처 – 팬톤 (http://www.pantone.kr/) 12

2017 FW PANTONE COLOR REPORT

PANTONE®
17-1145
Autumn Maple

- 메이플 컬러와 레드 컬러 조화.
- 글리터 조합
  : 레드&골드, 브론즈&골드

출처 – 팬톤 (http://www.pantone.kr/) 13

(2) 미생물 시험

방부테스트 결과보고서

작 성 자 : 이유영 2017 .6. 9

실 험 자 : 이유영 2017. 5.15. ~6. 5

검 수 자 : 천정윤 2017. 6. 12

실험균주 : *Staphylococcus aureus* (KTCC No. 3881)
Escherichia coli (KTCC No. 2571)
Candida albicans (KTCC No. 7965)
Aspergillus niger (KTCC No. 6971)

실험목록 : 토너, 마스크팩, 수분크림, 미스트, 클렌저, 핑크세럼
쌀추출물

THURINGEN KOREA

▣ 방부력 시험에 사용되는 시험균주 (CTFA Microbiology Guidelines)
= 자사 보유 균주

미생물 타입	미생물	국문명
Gram Positive Cocci	***Staphylococcus aureus***	황색 포도상구균
Fermentative Gram Negative Rod	***Escherichia coli***	대장균
Non Fermentative Gram Negative Rod	***Pseudomonas aeruginosa***	녹농균
Yeasts	***Candida albicans***	캔디다 알비칸스
Molds	***Aspergillus niger***	흑곰팡이

▣ 접종균주 Level : Bacteria : 1×10^6 CFU/g , Yeast, Mold : 1×10^5 CFU/g

0.1ml (100ul) in 10ml sample : 10ml 화장품 안에 0.1ml의 균을 접종함.

37℃, 24~72시간 배양 → 균 사멸 99%

※ 토너 A3RC09

	검출여부	결과사진
NA (*E. coli*)	미검출	
MA (*A. n*)	미검출	
YMA (*C. a*)	미검출	
TSA (*S. a*)	미검출	

※ 마스크팩 J2RB23

	검출여부	결과사진
NA (*E. coli*)	미검출	
MA (*A. n*)	미검출	
YMA (*C. a*)	미검출	
TSA (*S. a*)	미검출	

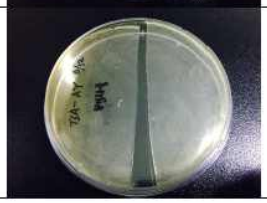
※ 수분크림 A6RC28

	검출여부	결과사진
NA (*E. coli*)	미검출	
MA (*A. n*)	미검출	
YMA (*C. a*)	미검출	
TSA (*S. a*)	검출 특이사항 → Day에 따른 방부TEST 시험 필요	

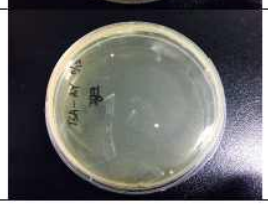
※ 미스트 A2RF07

	검출여부	결과사진
NA (*E. coli*)	미검출	
MA (*A. n*)	미검출	
YMA (*C. a*)	미검출	
TSA (*S. a*)	미검출	

※ 클렌저 A53RF07

	검출여부	결과사진
NA (E. coli)	미검출	
MA (*A. n*)	미검출	
YMA (C. a)	미검출	
TSA (S. a)	미검출	

※ 핑크세럼 A12RF08

	검출여부	결과사진
NA (E. coli)	미검출	
MA (*A. n*)	미검출	
YMA (C. a)	미검출	
TSA (S. a)	미검출	

※ 쌀추출물

	검출여부	결과사진
PDA (진균)	미검출	
TSA (세균)	미검출	

결론 및 요약

- 각 균의 특성에 따른 대수증식기에 균주 투입 -> 3시간 배양 -> after 24hr -> 확인
- 모도상 구균에서 검출됨 : 수분크림
- 특히 수분크림은 균주 투입 후 배양시간 48~72hr 까지 관찰 필요->99%사멸가능성 높음
- 녹농균 방부 시험 추가 진행

(3) 컨셉 제품 및 디자인 시안

- 스킨, 에센스, 로션(크림) : 피부 타입에 따른 제형 구분 : 쌀추출물 0.1% 함유	- 폼클렌징 - 핑크색 - 유색미 쌀추출물 0.1% 함유

포맨 올인원 스킨

남성 피부에 가장 적절한 유수분 밸런스 180°를 찾아 깨끗하고 부드러우면서 건강한 피부 관리 !!

SOLUTIONS

1. **쉽고 간편한 All In One SKIN!**
   바쁜 생활 속에서 남자의 피부 고민을 손쉽게 해결할 수 있는
   올인원 타입으로 스킨+로션+에센스를 한 번에 해결해드립니다.

2. **더 빠르게, 더 촉촉하게 파워 수분 충전!**
   피부 속의 건조함을 느끼는 남자의 피부에 끈적임 없는
   수분 보습막을 형성하여 유수분 밸런스가 바로잡힌 촉촉하고
   부드러운 피부로 가꾸어드립니다.

3. **자신감 넘치는 피부 케어!**
   적은 알코올 함량으로 피부의 번들거림을 잡아주며
   깔끔하고 은은한 광이 나는 피부로 가꾸어드립니다.

포맨 올인원 에센스

피지 분비로 번들거리는 남성 피부를 위한 에센스로 산뜻한 사용감으로 스킨케어 가능 !!

SOLUTIONS

1. **쉽고 간편한 ALL IN ONE LOTION !**
   바쁜 생활 속에서 남자의 피부 고민을 손쉽게 해결할 수 있는 올 인 원 타입으로 스킨 + 로션 + 에센스를 한번에 해결하는 워터 에센스입니다.
2. **위치하젤잎수 90%이상**
   피부에 수분을 공급하는 미네랄워터와 예민하고 울긋불긋한 피부 진정에 도움을 주는 위치하젤잎수가 정제수 대신 함유되어 탄력있는 피부 관리에 도움을 줍니다.
3. **하루종일 산뜻하게 !**
   국제 모공 특허 성분 에버매트성분이 과다 피지를 조절하여 번들거림을 완화해주며 모공수렴기능이 피부를 매끄럽고 탄력있게 도움을 줍니다.
4. **자극없이 진정케어**
   중성pH로 반복되는 면도로 인해 상처받은 피부에도 자극 없이 케어해주며 5가지 허브추출물이 피부 턴-오버 밸런스를 맞추어 피부 진정 완화에 도움을 줍니다.

포맨 올인원 로션

끈적임 없이 촉촉하고 부드럽게 발리며, 보습력과 진정효과에 뛰어남 !!

SOLUTIONS

1. **쉽고 간편한 ALL IN ONE LOTION !**
   바쁜 생활 속에서 남자의 피부 고민을 손쉽게 해결할 수 있는 올 인 원 타입으로 스킨 + 로션 + 에센스를 한번에 해결하는 보습력 가득한 로션입니다.
2. **병풀잎수 60%이상 함유**
   피부에 수분을 공급하는 미네랄워터와 예민한 피부진정에 도움을 주는 병풀잎수가 정제수 대신 함유되어 피부를 자극없이 촉촉하게 유지시켜줍니다.
3. **피부 속 수분충전 & 보습효과**
   알로에 성분이 함유되어 피부를 진정, 완화시켜주고 천연 보습인자인 소듐하이알루로네이트가 피부의 보호막을 생성하여 피부 수분을 유지시켜줍니다.
4. **자극없이 진정케어**
   약산성제품으로 피부 pH밸런스에 도움을 주어 건강한 피부로 관리해주며 5가지 허브추출물이 피부 턴-오버 밸런스를 맞추어 피부 진정 완화에 도움을 줍니다.

슈퍼 Rice 폼 클렌져

1. CC쿠션과 립스틱 사용

자~ 봐봐, 간단해

2. **(1차 오일 세안)**
폼 을 짜서 부드럽게 마사지 하며 충분히 롤링 합니다

3가지 천연 유색 쌀추출물이 피부에 영양을 공급해 줍니다

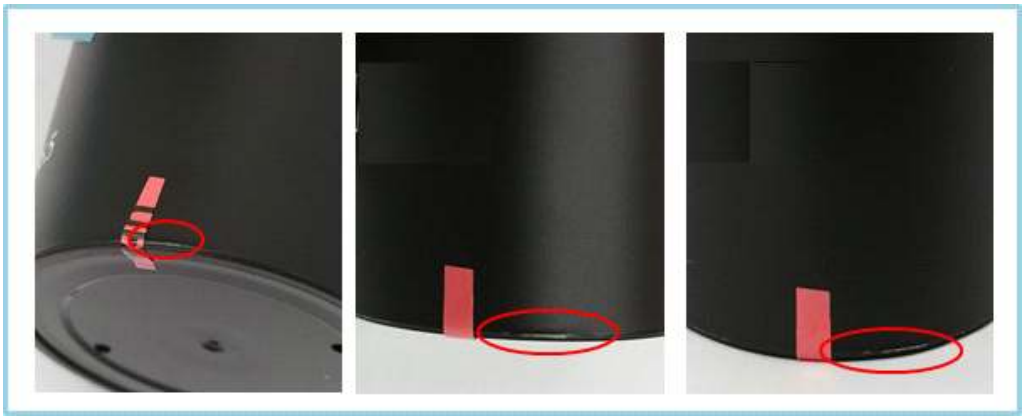
슈퍼 Rice 폼 클렌져

3. 충분히 마사지 하며 롤링 후 오일상 메이크업이 지워져 뿌옇게 됩니다.

4. 미온수 물로 깨끗하게 헹구어 냅니다

* 클렌징 오일과 폼클렌저 두가지를 사용하기 번거로우신 분들께 추천

(4) 용기 및 부자재 선정 내용물과 적합성 test



수분 크림

품질관리 – 안정성(Cycle) – 재시험

- 제형실험일자 : 2017.04.17
- 시험번호 : **RD17S01**
- 실험일자 : 2017.04.26(수) ~ 2017.04.28(금)
- 안정성 시험
  - 3℃, 45℃ : 안정
  - Cycle (-15℃▶-10℃▶-5℃▶0℃▶15℃▶25℃▶35℃▶45℃▶35℃▶25℃) : 제품 표면에 물이 생

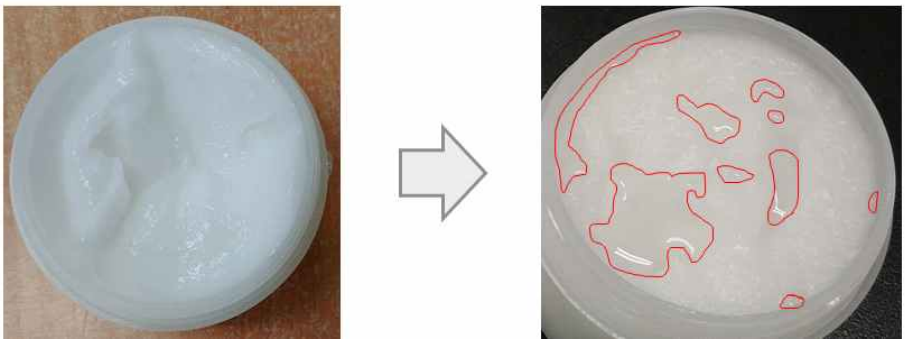
<가정1>
시험제품의 속캡이 제대로 닫혀있지 않아 cycle 온도변화로 인해 수증기가 생겨 물이 생겼을 가능성이 있다.

동일 용기의 다른 제품도 비슷한 현상인지 시험진행
: 2017.04.28(금) ~ 2017.05.01(월)

시험결과 : "다른 유화제품 w/s"에선 **이상 없음**

■ 1차 재시험 (RD17S01)

- 시험일자 : 2017.05.01(월) ~ 2017.05.08(월)
- Cycle 안정성 시험 (-10℃▶-5℃▶0℃▶5℃▶25℃▶35℃▶45℃▶35℃▶25℃▶5℃) : 제품 표면에 물이 생김



■ 2차 재시험 (RD17S01)

- 시험일자 : 2017.05.08(월) ~ 2017.05.11 (목)
- Cycle 안정성 시험 ((-10℃▶-5℃▶0℃▶5℃▶25℃▶35℃▶45℃▶35℃▶25℃▶5℃) : 제품 표면에 물이 생김

[2017.05.08 시험전 / 상온]

[2017.05.09 24h후 / 45℃]

[2017.05.10 48h후 / 25℃]

[2017.05.11 72h후 / 25℃]

3일간 안정성(cycle) 시험결과

∴ 물이 생김

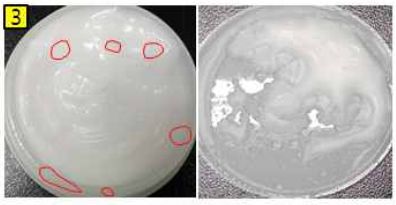
■ 3차 재시험 (RD17S01)

- 시험일자 : 2017.05.22(월) ~ 2017.05.25 (목)
- Cycle 안정성 시험 (-5℃▶0℃▶15℃▶25℃▶35℃▶45℃▶35℃▶25℃▶15℃▶0℃) : 제품 표면에 물이 생김

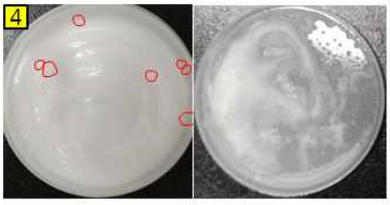
[2017.05.22 시험전 / 상온]

[2017.05.23 24h후 / 0℃]

∴ 물이 생김



[2017.05.24 48h후 / 0℃]



[2017.05.25 72h후 / 25℃]

■ 4차 재시험 (RE17S01)

- 시험일자 : 2017.05.23(화) ~ 2017.05.26 (금)
- Cycle 안정성 시험 (-5℃▶0℃▶15℃▶25℃▶35℃▶45℃▶35℃▶25℃▶15℃▶0℃) : 제형 안정화 됨

[2017.05.23 시험전 / 상온]

[2017.05.24 24h후 / 0℃]

현상 없어짐

[2017.05.25 48h후 / 25℃]

[2017.05.26 72h후 / 35℃]

(5) 유색미 함량에 따른 색상의 변화

- 유화 타입 에센스 적용

→ Essence Formulation

: 일반 유화 타입으로 에센스 제형 적용

: 무향에센스

: 유색미 1,0% 농도로 자연스러운 핑크색을 나타냄,

: W/O 타입으로 지용성 유색미 추출물

: 추출물의 안정성을 위해 45도에서 투여

INCI Name	Contents %(W/W)							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Water	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100
Glycine Soja (Soybean) Germ Extract	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Aloe Barbadensis leaf Extract	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Glycerin	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Anthemis Nobilis Flower Extract	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Glycyrrhiza Glabra (Licorice) Root Extract	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Butylene Glycol	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Propylene Glycol	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Hamamelis Virginiana (Witch Hazel) Leaf Extract	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Alcohol	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Collagen	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Adenosine	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
RICE Extract	Q.S	Q.S	Q.S	5.0	0.1	3.0	1.5	1.0
Tocopheryl Acetate	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Allantoin	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Panthenol	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Xanthan Gum	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Sodium Hyaluronate	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Phenoxyethanol	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S
Fragrance	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	Q.S	0.005	0.001	0.0

- pH 30일 동안 안정 범위 내 적합함

→ 폼클렌징 pH 6.0

→ 마스크시트 pH 5.8

→ 에센스(유화타입) pH 6.2

→ 아이크림 pH 6.8

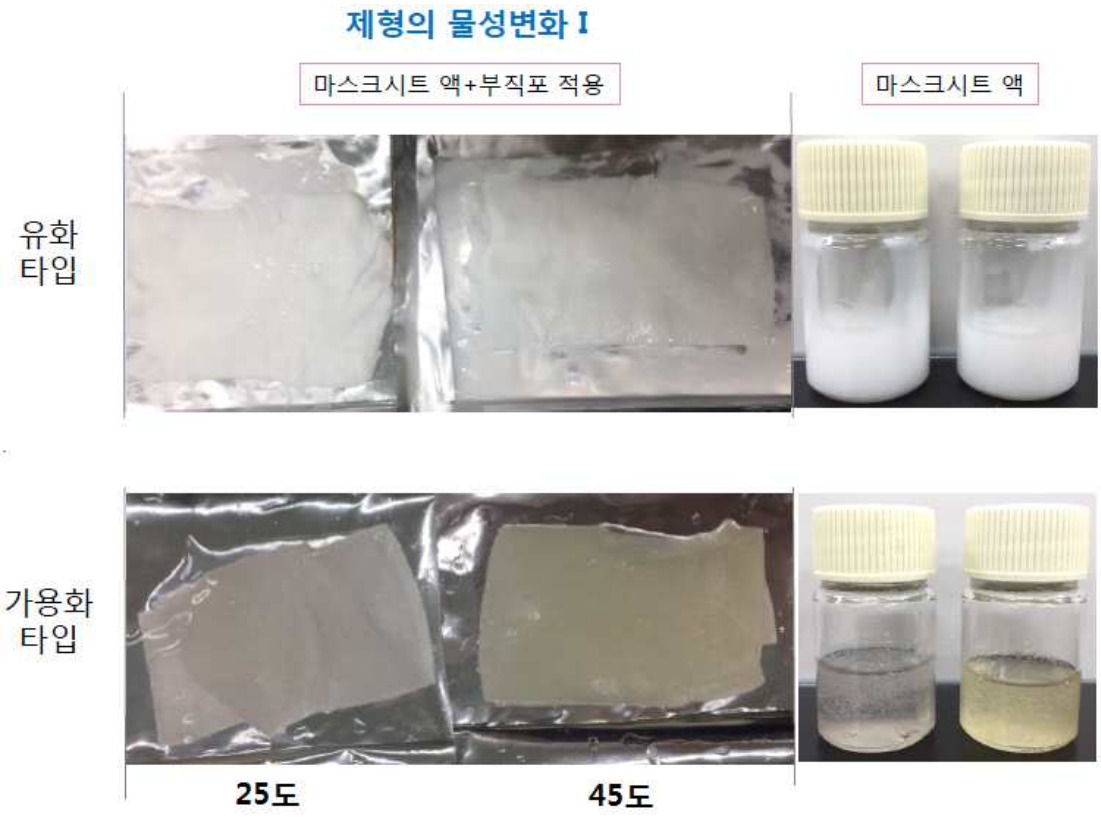
- Viscosity(점도)

→ Essence 제형의 온도별 보관에 따른 90일 동안의 pH 변화 측정 6.00~6.50의 범위로 매우 안정적임. Emulsion 아이크림의 경우 또한 pH 5.5~6.9의 범위로 매우 안정함. Cream은 고온에서의 물성의 변화가 있었으나, 일시적이었으며 점증제와 왁스의 함량, 내상의 증가로 제형안정성 확보함.

→ 마스크시트 제형의 온도별 보관에 따른 90일 동안의 viscosity 변화 측정 브룩필드 점도계(63S, 53%)를 이용하여 측정하였으며, 4850cps 범위로 매우 안정적임. Emulsion의 경우 또한 viscosity(65S, 51%) 변화가 매우 안정함. Cream은 고온에서의 물성의 변화가 있었으나, viscosity(65S, 49%) 일시적이었으며 점증제와 왁스의 함량, 내상의 증가로 제형 안정화 함.

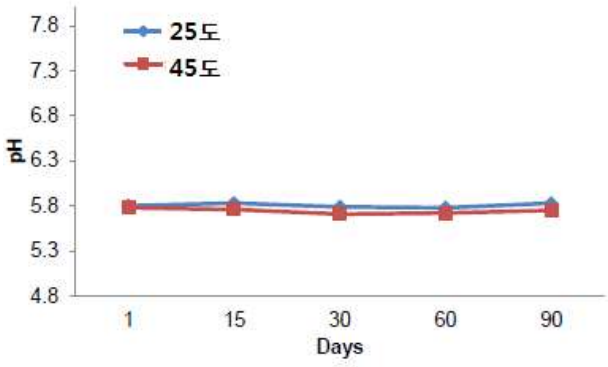
- 온도별 제형 안정성 TEST : 분리, 변취 없었으나, 토너에서 30일 이후부터 색상이 흐려지는 현상이 발생됨. 특히 빛에 노출될 경우 가속화 되는 경우가 관찰됨(7일 이내)

(5) 유색미 적용된 마스크 시트 물성 안정성

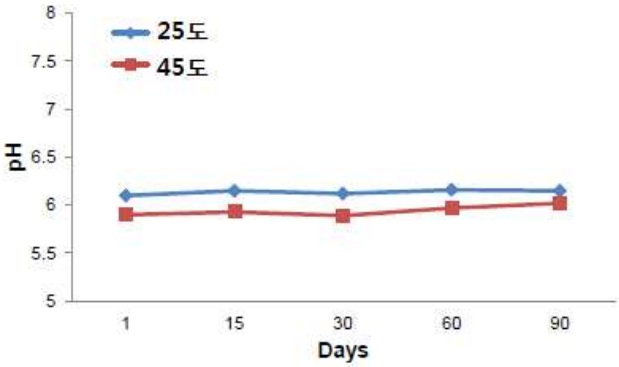


제형의 물성변화 II

<가용화 타입>



<유화 타입>



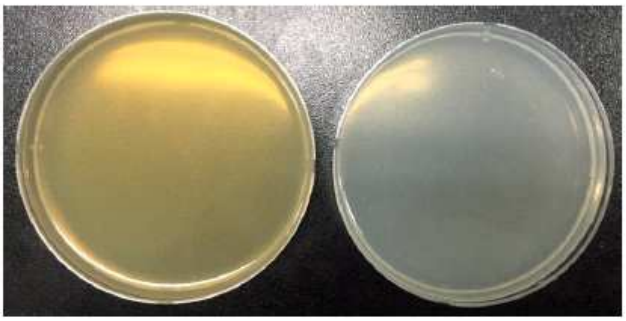
❖ 시간의 경과에 따른 미생물 시험 결과

미생물 시험 결과

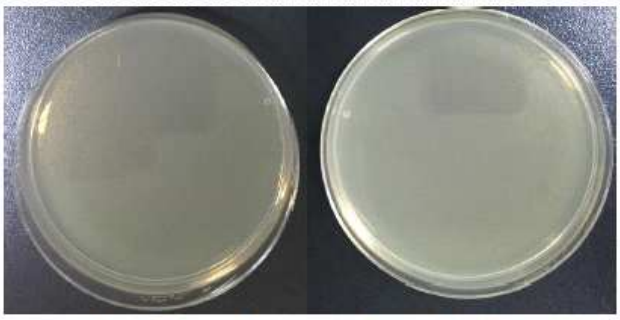
<진균> TSA

<세균> PDA

가용화 타입



유화 타입



- 90일 이후(약 3개월 동안 RT 보관) 미생물 시험결과 진균, 세균 모두 관찰되지 않았음

❖ 시간의 경과에 따른 미생물 시험 I

[1. 시험준비]

[2. 시료 개봉]

[3. 시료 희석]

[6. 시료 분주 1]

[5. 시료 적량 분주]

[4. 시료 배합]

[7. 시료 분주 2]

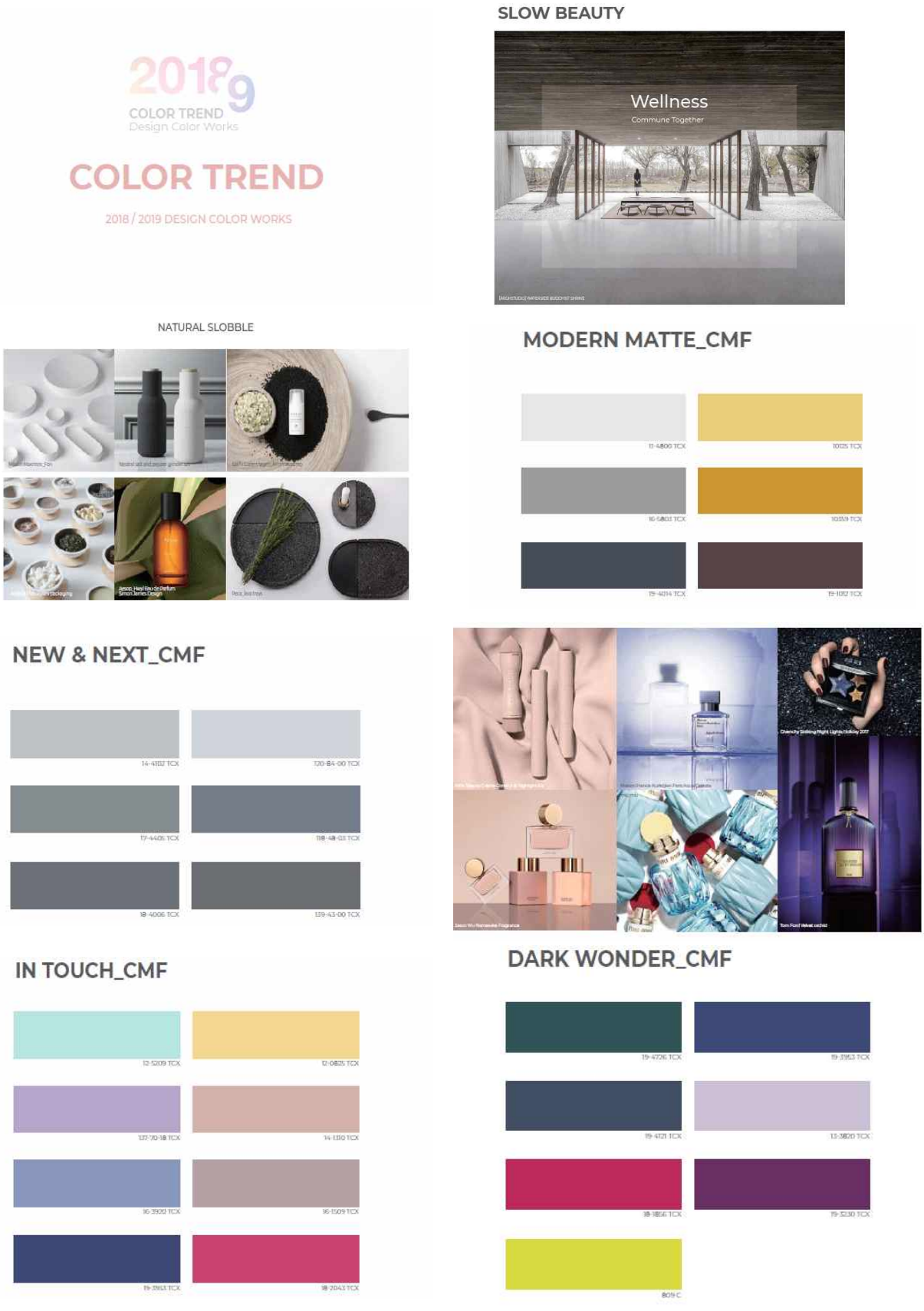
[8. 시료 도말]

[10. 48~72hr 후 관찰]

[9. 인큐베이터 배양: 세균37℃, 진균25℃]

다. 유색미를 활용한 화장품 제형 안정성 연구-2

(1) 2018년 기초·색조 트렌드 분석을 통한 유색미 제품개발 기획안(왼→오)



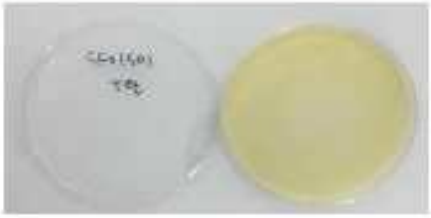
(2) 미생물 시험

(주)튜링겐 코리아	미생물 시험성적서	개정번호	0

시험의뢰번호 : 시험의뢰일 : 2018-06-15 시험의뢰자 : 김창호

구 분	☐ 벌크제품	☐ 완제품	☑ 기 타		
제품코드	VA182	제 품 명	반트상십육정오 판테놀 모이스춰 크림		
제조번호	SF01S01	채 취 자	홍영주	채 취 일	2018-06-15
채 취 량	10 g	채취방법	Random	시 험 일	2018-06-19
시험번호		시 험 자	박수현	시험방법	

구 분	항 목	체 크	비 고
시험 전 준비 및 주의사항	교차오염 여지 확인	☑	
	배양기 온도 확인	☑	
	시험자의 시험복장 준수여부 확인	☑	
	시험도구 멸균처리 여부 확인	☑	
	70% 에탄올로 손소독 후 시험시작	☑	

구 분	특정세균	총호기성생균
기준	불검출	< 1,000CFU/ml
사 진		
적합여부	적합	적합
비 고		

종합 판정	적합	결재	작성자	검토자	승인자
종합 판정일	2018-06-22		박수현	정다운	
			6 / 22	6 / 22	6 / 22

(주)튜링겐 코리아	미생물 시험성적서	개정번호	0

시험의뢰번호 : 시험의뢰일 : 2018-06-22 시험의뢰자 : 김창호

구 분	☐ 벌크제품		☐ 완제품		☑ 기 타
제품코드	VA183	제 품 명	반트삼십육정오 딴태놀 마일드 클렌저		
제조번호	SE30S01	채 취 자	홍영주	채 취 일	2018-06-22
채 취 량	10 g	채취방법	Random	시 험 일	2018-06-22
시험번호		시 험 자	박수현	시험방법	

구 분	항 목	체 크	비 고
시험 전 준비 및 주의사항	교차오염 여지 확인	☑	
	배양기 온도 확인	☑	
	시험자의 시험복장 준수여부 확인	☑	
	시험도구 멸균처리 여부 확인	☑	
	70% 에탄올로 손소독 후 시험시작	☑	

구 분	특정세균	총호기성생균
기준	불검출	< 1,000CFU/ml
사 진		
적합여부	적합	적합
비 고		

종합 판정	적합	결재	작성자	검토자	승인자
종합 판정일	2018-06-25		박수현	정다운	
			6 / 25	6 / 25	6 / 25

(주)튜링겐 코리아	미생물 시험성적서	개정번호	0

시험의뢰번호 : 시험의뢰일 : 2018-07-09 시험의뢰자 : 한혜우

구 분	☑ 벌크제품		☐ 완제품		☐ 기 타
제품코드	VA185	제 품 명	반트삼십육점오 에스오에스 시카 젤		
제조번호	SG09S01	채 취 자	박수현	채 취 일	2018-07-09
채 취 량	10 g	채취방법	Random	시 험 일	2018-07-10
시험번호		시 험 자	박수현	시험방법	

구 분	항 목	체 크	비 고
시험 전 준비 및 주의사항	교차오염 여지 확인	☑	
	배양기 온도 확인	☑	
	시험자의 시험복장 준수여부 확인	☑	
	시험도구 멸균처리 여부 확인	☑	
	70% 에탄올로 손소독 후 시험시작	☑	

구 분	세균	진균
기준	< 1,000CFU/ml	< 1,000CFU/ml
사 진		
적합여부	적합	적합
비 고		

종합 판정	적합	결재	작성자	검토자	승인자
종합 판정일	2018-07-16		박수현 7 / 16	정다운 7 / 16	7 / 16

(주)튜링겐 코리아	미생물 시험성적서	개정번호	0

시험의뢰번호 : 시험의뢰일 : 2018-06-01 시험의뢰자 : 한협우

구 분	☐ 벌크제품		☐ 완제품		☑ 기 타
제품코드	VA184	제 품 명	반트삼십육점오 유브이 선 라이트 프로텍터		
제조번호	—	채 취 자	박수현	채 취 일	2018-06-01
채 취 량	10 g	채취방법	Random	시 험 일	2018-06-08
시험번호		시 험 자	박수현	시험방법	

구 분	항 목	체 크	비 고
시험 전 준비 및 주의사항	교차오염 여지 확인	☑	
	배양기 온도 확인	☑	
	시험자의 시험복장 준수여부 확인	☑	
	시험도구 멸균처리 여부 확인	☑	
	70% 에탄올로 손소독 후 시험시작	☑	

구 분	특정세균	호기성생균
기준	불검출	< 1,000CFU/ml
사 진		
적합여부	적합	적합
비 고		

종합 판정	적합	결재	작성자	검토자	승인자
종합 판정일	2018-06-11		박수현	정다운	
			6 / 11	6 / 11	6 / 11

(주)튜링겐 코리아	미생물 시험성적서	개정번호	0

시험의뢰번호 : 시험의뢰일 : 2018-01-29 시험의뢰자 : 김창호

구 분	☐ 반제품		☐ 완제품		☑ 기 타
제품코드	VA097	제 품 명	반트삼십육점오 토탈 커버 비비 크림		
제조번호	SA23S01	채 취 자	홍영주	채 취 일	2018-01-30
채 취 량	10 g	채취방법	Random	시 험 일	2018-01-30
시험번호		시 험 자	박수현	시험방법	

구 분	항 목	체 크	비 고
시험 전 준비 및 주의사항	교차오염 여지 확인	☑	
	배양기 온도 확인	☑	
	시험자의 시험복장 준수여부 확인	☑	
	시험도구 멸균처리 여부 확인	☑	
	70% 에탄올로 손소독 후 시험시작	☑	

구 분	특정세균	총호기성생균
기준	불검출	< 1,000CFU/ml
사 진		
적합여부	적합	적합
비 고		

종합 판정	적합	결재	작성자	검토자	승인자
종합 판정일	2018-02-02		박수현	정다운	
			2 / 2	2 / 2	2 / 2

(3) 제품 기획 및 컨셉 시안

- 판테놀 크림, 판테놀 클렌저, SOS시카젤, UV 선라이트 프로텍터 : 수분, 보습, 진정 컨셉의 제품 : 판테놀, 마데카소사이드, 쌀추출물 0.5% 함유

봄·여름 수분크림 생략하면 낭패, 사계절 피부결 고보습관리 필수

이영은 기자 승인 2018.05.17 10:27

최근 계절을 불문하고 건조한 피부로 인한 고민을 호소하는 이들이 많아졌다. 보통 피부건조는 공기 중 수분 함량이 적고 풍속이 강한 가을, 겨울철에 나타난다고 생각하기 쉽지만 요즘에는 계절에 관계없이 공기청정기를 가동하고 냉난방기 사용이 일상화되어 있어 사계절 어느 때나 피부건조가 발생하기 쉽다.

흔히 피부가 건조하다고 느끼는 이유는 피부 각질층의 수분함량이 낮아졌기 때문이다. 평소 피부 각질층은 약 30%의 수분 함유율을 보이는데, 10% 이하로 떨어질 경우 인체는 피부가 건조하다는 느낌을 받는다

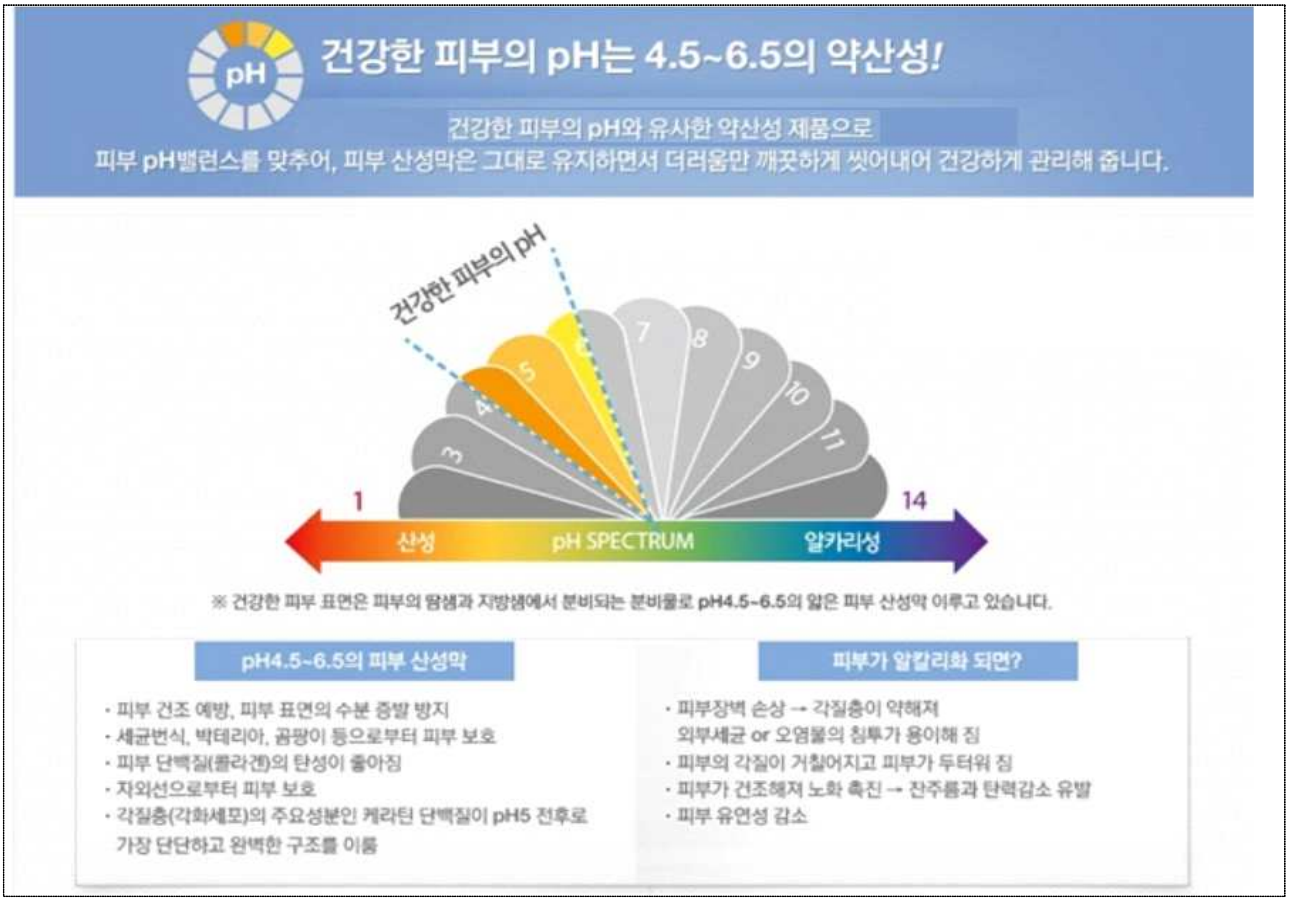
문제는 피부수분이 줄어들 경우 자연보습인자를 만드는 효소가 활성화되지 않는다는 것이다. 이는 지질이 부족해진 피부장벽의 무너짐을 유발하고 자연보습인자의 감소로 이어져 결국 건조함이 심화되는 악순환을 낳는다. 더군다나 피부건조는 각질층을 두꺼워지게 만드는데, 이는 안색을 칙칙하게 하는 것은 물론 빛의 산란을 막아 피부 투명도까지 떨어뜨린다.

따라서 계절에 관계없이 평소 꾸준한 수분관리를 해주는 것을 추천한다. 대게 봄, 여름 하절기에는 피지분비가 왕성해 수분크림을 생략하는 경우도 많지만 그러한 경우 과도한 피지

판테놀 크림 pH 6.16

판테놀 클렌져 pH6.20

건강한 피부를 위한 약산성 처방



착한 성분의 착한 크림 / 클렌져

믿고 쓰는 성분

병풀추출물

판테놀

오가닉컴플렉스

마데카소사이드

쌀추출물(유색미)

라벤더오일

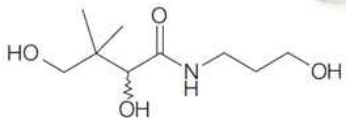
티트리잎오일

모이스춰 크림	:	판테놀 10% , 병풀잎수 52% , 마데카소사이드1,000ppm, 쌀추출물 5,000ppm
마일드 클렌저	:	판테놀 0.5% , 병풀잎수 17% , 마데카소사이드 100ppm, 쌀추출물 5,000ppm

판테놀이란? 1

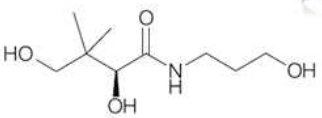
- 판토텐산(비타민 B5)의 다른 이름으로 체내에서 판토네닉산(비타민 B)의 프로비타민이 비타민으로 변하는 물질임.
- 판토텐산은 수용성이면서 불안정한 구조를 띄고 있어 피부친화성과 안정성이 높은 구조로 피부에 잘 흡수될 수 있도록 알코올 유도체로 바꾼 것을 판테놀 이라고 함.
- 물에 잘 녹는 비타민으로 필수 영양소 중의 하나임
- 습윤제, 연화제, 보습제의 역할을 하며 피부 보습유지기능을 향상시킴.
- 두 가지 이성질체인 D와 L중 D형태인 판테놀 만이 생물학적 활성을 가짐
- 화장품에서는 천연인 D-판테놀과 D와 L이 혼합된 DL-판테놀 두가지 모두 사용함
- DL-판테놀과 D-판테놀 구조와 성질이 비슷함.

D,L-Panthenol



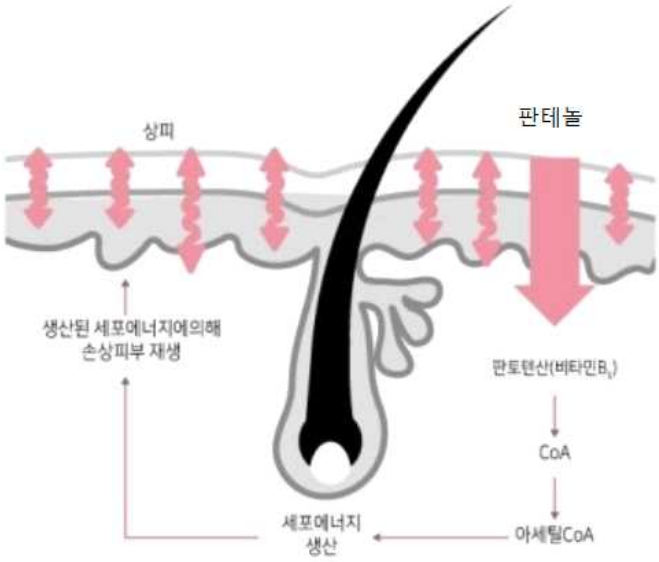
분말형태/cream

D-Panthenol



끈적이는 액상/cleanser

피부효능



- 덱스판테놀은 피부에 적용하면 흡수된 후 바로 판토텐산으로 전환되어, 판토텐산은 코엠자임A(CoA)의 합성에 사용됨.
- 코엔자임A는 3대 영양소(탄수화물, 단백질, 지방)의 에너지 대사 과정에서 주효소가 되어 효소의 작용을 돕는 효과가 있음.
- 코엔자임A는 세포의 에너지 생성(APT)과 아셀틸산 및 Stero합성에 의해 손상된 피부조직을 재생시키고 기능을 촉진 시킴.
- 화장품에서 덱스판테놀은 습윤제, 보습제의 역활을 하며 피부의 보습유지기능을 향상시키고 피부의 재생에 관여하게 됨.
- 이를 뒷받침해주는 연구결과가 2011년 발표됨(뒷면 계속)

➔ 피부에 판테놀을 15일, 30일 사용한 피부와 판테놀을 사용하지 않는 피부를 비교하였을 때 경피수분 손실을 막아주어 피부 자체의 수분을 유지시키는 보습기능을 활성화 한다는 내용

J. Cosmet. Sci., 62, 361–369 (July/August 2011) 2011년 국제화장품과학저널지

http://www.beauty-review.nl/wp-content/uploads/2015/05/Skin-moisturizing-effects-of-panthenol-based-formulations.pdf

Skin moisturizing effects of panthenol-based formulations

FLÁVIO B. CAMARGO, Jr., LORENA R. GASPAR, and PATRÍCIA M. B. G. MAIA CAMPOS, *Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Av. do Café s/n, Bairro Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP, Brazil 14040-903.*

Accepted for publication April 16, 2011.

Synopsis

This study aims to evaluate the skin moisturizing efficacy of formulations containing different concentrations of panthenol. Formulations supplemented with or without 0.5%, 1.0%, or 5.0% panthenol were applied daily to the forearms of healthy subjects. Skin conditions in terms of moisture and transepidermal water loss (TEWL) were analyzed before and after 15- and 30-day periods of application. The formulations were also applied after skin washing with sodium laureth sulphate (SLES) to evaluate the immediate effects on TEWL and skin moisture. Panthenol-containing formulations (1.0% and 5.0%) produced significant decreases in TEWL after 30-day applications. In skin washed with SLES, significant reduction of TEWL was evident two hours after application of formulations loaded with panthenol when compared with control and vehicle. It is concluded that skin integrity is maintained by the improved protective effect of 1.0% panthenol added to the formulation.

(4) 제품 셀링 포인트

판테놀 모이스춰 크림

영문명	VANT36.5 PANTHENOL MOISTURE CREAM (반트삼십육점오 판테놀 모이스춰 크림)			제 형 감	크림
용량	50 ml	용기	튜브		
제조원	㈜류링견코리아	판매가	미정	기능성 정보	없음
상품이미지	단상자, 튜브 디자인 시안 참조				
작 용	* 보습력은 높이고, 끈적임없이 부드럽게 작용하여 답답하지 않음				
주요성분 함량 & 원료설명	* 판테놀 10% 함유 * 마데카소사이드 1,000ppm(0.1% 함유) * 병풀잎수 (52%) 함유 : 제조공정상 정제수 포함 없음. * 쌀추출물 함유 : 5,000 ppm(0.5%) * EWG 그린 등급 원료 사용				
추천 피부타입	* 모든 피부 타입 사용가능 * 진정이 필요한 피부(붉은 피부, 열감이 있는 피부) * 피지분비로 인하여 유수분 밸런스가 깨진 피부			사용방법	본 품 적당량을 취해 피부에 골고루 펴발라 줍니다.
셀링포인트 특장점 & 효능/효과	특장점 * 판테놀 : 피부 보습, 피부 진정, 고함량 함유 * 마데카소사이드 성분 함유 * 정제수 대신 병풀잎수 함유 * 쌀추출물 함유 * 인공향 / 인공색소 / PEG 계열 / 실리콘 오일 / 파라벤 / 페녹시에탄올 / SLS 광물유/ 벤조페논/ 에탄올/ 디에탄올아민 : 무첨가 효능/효과 기능성 제품이 아니므로, 필수 표기사항 없음.				
전 성 분	첨부파일 참조(단상자)				
*사용방법	아침, 저녁 스킨케어 크림 사용 단계에서 적당량을 덜어 자극받고 민감해진 피부 위에 부드럽게 펴바른 뒤, 손바닥으로 피부를 가볍게 감싸 흡수시켜 줍니다.				
*주의사항	1. 화장품 사용 시 또는 사용 후 직사광선에 의하여 사용부위가 붉은 반점, 부어오름 또는 가려움증 등의 이상 증상이나 부작용이 있는 경우 전문의 등과 상담할 것 2. 상처가 있는 부위 등에는 사용을 자제할 것 3. 보관 및 취급 시의 주의사항 가) 어린이의 손이 닿지 않는 곳에 보관할 것 나) 직사광선을 피해서 보관할 것				

판테놀 마일드 클렌저

영문명	VANT36.5 PANTHENOL MILD CLEANSER (반트삼십육점오 판테놀 마일드 클렌저)			제 형 감	부드러운 폼클렌져
용량	100 ml	용기	튜브		
제조원	㈜튜링겐코리아	판매가	미정	기능성 정보	없음

상품이미지	* 단상자, 튜브 디자인 시안 참조		
작 용	* pH6.0의 피주 저자극 마일드 클렌저 * 부드러운 거품력 * 세안후 당김 적음(당김 거의 없음)		
주요성분 함량 & 원료설명	* 판테놀 0.5% 함유 * 마데카소사이드 100ppm(0.01% 함유) * 쌀추출물 함유 * 병풀잎수 (17%) 함유 : 제조공정상 정제수 포함 없음. * EWG 그린 등급 원료 사용		
추천 피부타입	* 모든 피부 타입 사용가능 * 진정	사용방법	본 품 적당량을 취해 피부에 골고루 펴발라 줍니다.
셀링포인트 특장점 & 효능/효과	특장점 * 판테놀 : 피부 보습, 피부 진정, 고함량 함유 * 마데카소사이드 성분 함유 * 정제수 대신 병풀잎수 함유 * 쌀추출물 함유 * 인공향 / 인공색소 / PEG 계열 / 실리콘 오일 / 파라벤 / 페녹시에탄올 / SLS 광물유/ 벤조페논/ 에탄올/ 디에탄올아민 : 무첨가 효능/효과 기능성 제품이 아니므로, 필수 표기사항 없음.		
전 성 분	첨부파일 참조(단상자)		
*사용방법	적당량을 덜어 거품을 낸 다음 얼굴에 마사지하듯 부드럽게 문지른 후 미온수로 깨끗하게 씻어내 줍니다.		
*주의사항	1. 화장품 사용 시 또는 사용 후 직사광선에 의하여 사용부위가 붉은 반점, 부어오름 또는 가려움증 등의 이상 증상이나 부작용이 있는 경우 전문의 등과 상담할 것 2. 상처가 있는 부위 등에는 사용을 자제할 것 3. 보관 및 취급 시의 주의사항 가) 어린이의 손이 닿지 않는 곳에 보관할 것 나) 직사광선을 피해서 보관할 것		

SOS 시카 젤

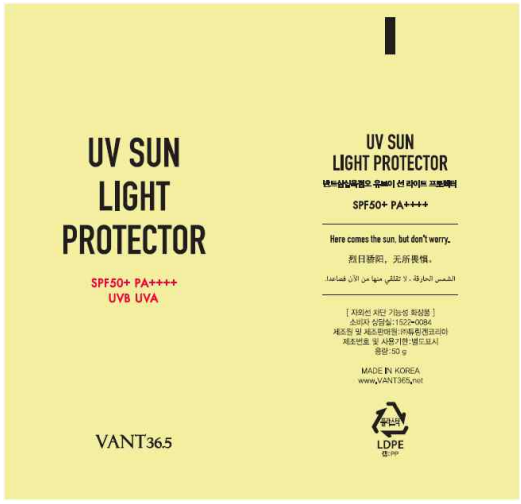
영문명	VANT36.5 UV SUN LIGHT PROTECTOR (반트삼십육점오 유브이 썬 라이트 프로텍터)			제 형 감	푸른빛 청량감이 가득한 젤타입
용량	25 ml	용기	튜브		
제조원	㈜퓨림전코리아	판매가	* 컨크림 구매 시 추가 제공	기능성 정보	없음
상품이미지	단상자, 튜브 디자인 시안 참조				
작 용	* 피부 쿨 다운 : 여름철 뜨거운 햇볕에 달아오른 피부에 즉각적인 쿨링효과 * 피부 진정				
주요성분 함량 & 원료설명	* 정제수 대신 병풀잎수 71% 함유 * EWG 그린등급 * 피부진정에 도움 : 오이추출물, 카모마일 추출물, 감초추출물 * 발추출물 함유 * 엑티브 4 : 락모일추출물, 장엽대황뿌리추출물, 인동덩굴꽃추출물, 시베리안엘갈나무목부추출물 * 오가닉 과일 콤플렉스 : 포도, 오렌지, 사과, 블베, 바나나추출물				
추천 피부타입	* 모든 피부 타입 사용가능			사용방법	본 품 적당량을 취해 피부에 골고루 펴발라 줍니다.
셀링포인트 특장점 & 효능/효과	특장점 * 구아이아졸렌 : 푸른색을 띄는 피부진정 물질 : 천연 색소겸, 피부진정에 도움을 줌 / 천연색소 -> 여드름피부 또는 햇볕으로 붉게 타오를 피부, 락싱 이후 피부를 잠재우기 위해 많이 사용함. * 라벤더 오일 : 천연 에센셜 오일 / 천연향 * 즉각적인 저자극 쿨링 / 기분까지 상쾌함 효능/효과 자외선 차단 기능성 (SPF50+ PA++++) UV A 차단지수 최고				
전 성 분	전성분 제공서 참조				
*용법용량 *효능효과	얼굴 전체에 적당량을 취하여 부드럽게 펴 바른 후 가볍게 두드리듯 흡수시켜 줍니다. 피부의 진정에 도움을 줍니다.				
*주의사항	1. 화장품 사용 시 또는 사용 후 직사광선에 의하여 사용부위가 붉은 반점, 부어오름 또는 가려움증 등의 이상 증상이나 부작용이 있는 경우 전문의 등과 상담할 것 2. 상처가 있는 부위 등에는 사용을 자제할 것 3. 보관 및 취급 시의 주의사항 가) 어린이의 손이 닿지 않는 곳에 보관할 것 나) 직사광선을 피해서 보관할 것				

유브이 선 라이트 프로텍터

영문명	VANT36.5 UV SUN LIGHT PROTECTOR (반트삼십육점오 유브이 선 라이트 프로텍터)			제형 감	크림 타입의 멀티 선크림
용량	50 g	용기	튜브		
제조원	㈜휴림진크리아	판매가	미정	기능성 정보	SPF50, PA++++
상품이미지	단상자, 튜브 디자인 시안 참조				
작 용	* 끈적임없이 피부에 자연스럽게 밀착 * 피부 톤 보정 효과로 해롯한 피부표현 * 보태니컬 추출물 함유로 피부 보습 및 외부자극 으로 부터 보호 * 발추출물 함유 * 특허추출물 함유				
주요성분 함량 & 원료설명	* 특허 추출물 함유 : 수수잎/줄기추출물, 아스파질러스발효물 [대기오염물질에 의한 피부손상의 방지효과가 있는 수수발효물 및 이를 함유하는 화장료 조성물 "특허번호 제 10-1803265호"] * 오가닉 컴플렉스 : 병풀추출물, 레몬버베나잎추출물, 로즈마리골드꽃추출물, 레몬밤잎추출물, 마시멜로뿌리추출물 * 오가닉 과일 콤플렉스 : 포도, 오렌지, 사과, 올리브, 바나나추출물 * 액티브 4 : 시베리안잎갈나무목부추출물, 약모밀추출물, 장엽대황뿌리추출물, 인동덩굴꽃추출물 * 발추출물 함유				
추천 피부타입	* 모든피부타입			사용방법	큰 콩 적당량을 취해 피부에 골고루 펴발라 줍니다.
셀링포인트 특장점 & 효능/효과	특장점 * 반트 선크림 중 가장 높은 자외선 차단지수 * 자연스러운 피부 톤 보정효과 * 멀티 선크림 * 정제수 대신 병풀잎수 함유 효능/효과 자외선 차단 기능성 (SPF50+ PA++++) UV A 차단지수 최고수치				
전 성 분	전성분 제공서 참조				
*기능성 주요성분	티타늄디옥사이드 징크옥사이드 에칠헥실트리아존 디에칠아미노하이드록시벤조일헥실벤조에이트 비스-에칠헥실옥시페놀메톡시페닐트리아진				
*용법용량 *효능효과	큰 콩 적당량을 취해 피부에 골고루 펴발라 줍니다. 자외선으로부터 피부를 보호한다.				
*주의사항	1. 화장품 사용 시 또는 사용 후 직사광선에 의하여 사용부위가 붉은 반점, 부어오름 또는 가려움증 등의 이상 증상이나 부작용이 있는 경우 전문의 등과 상담할 것 2. 상처가 있는 부위 등에는 사용을 자제할 것 3. 보관 및 취급 시의 주의사항 가) 어린이의 손이 닿지 않는 곳에 보관할 것 나) 직사광선을 피해서 보관할 것				

UV SUN LIGHT PROTECTOR
PANTHENOL
SOS CICA GEL

MULTI SUNBLOCK
UV SUN LIGHT PROTECTOR
SPF50+ PA++++
UVB UVA
VANT36.5


UV SUN LIGHT PROTECTOR
SPF50+ PA++++
UVB UVA
VANT36.5
UV SUN LIGHT PROTECTOR
SPF50+ PA++++
Here comes the sun, but don't worry.
烈日骄阳，无所畏惧。
MADE IN KOREA
www.VANT365.net
LDPE

토탈 커버 비비 크림

영문명	VANT36.5 TOTAL COVER BB CREAM			제 형 감	초콜릿색 크림 타입의 제형
용량	30 g	용기	튜브		
제조원	㈜튜링겐코리아	판매가	미정	기능성 정보	3중 기능성 (미백, 주름, 자외선, SPF40 PA+++)

상품이미지

작 용

* 자외선이나 외부환경 요인으로 칙칙해진 피부톤을 맑고 투명하게 가꿔줌.
* 피부톤을 맑고 화사하게 보정해주고, 갑티를 커버하여 깨끗한 피부를 연출함.

주요성분 함량 & 원료설명

* 허브 콤플렉스 추출물 (라벤더, 캐모마일, 마지현, 베르가못, 세이지추출물/유기농)
* 알추출물 함유
* 티타늄디옥사이드(9%)
* 에칠헥실메톡시신나메이트(7.5%)
* 알부틴(2%)
* 아데노신(0.04%)

저용 손등에 발언을 때는 어두운 초콜릿색이지만
얇게 펴 바르면 생각지 못한 밝고 자연스러운 색으로 발린다.
반전의 매력이 있다.

추천 피부타입

* 모든 피부타입
* 자외선 차단과 함께 피부톤 보정을 원하시는 분
* 자연스러우면서 효과적인 커버력을 원하시는 분

사용방법

메이크업 베이스나 파운데이션 단계에서 내용물을 적당량 취해 두드려 펴발라 준다.

셀링포인트

특장점 & 효능/효과

특장점

* 피부진정에 도움을 주는 5가지 허브complex추출물로 피부의 turn-over 밸런스를 맞추어 피부를 진정 및 완화시켜줌.
* 화이트닝의 대표적 성분인 알부틴이 피부의 투명도를 올려주면서 자연스럽고 화사하게 밝혀줌.
* 칙칙하고 고르지 못한 피부톤을 보정 -> 균일한 피부결을 연출가능.
* 사용시 번들거림없이 산뜻하고 매끄러운 마무리감.
* 소량 사용으로도 자연스러운 커버력.
* 튜브타입으로 사용법이 간편하고 휴대가 용이함.

효능/효과

* 피부의 미백, 주름개선, 자외선 보호와 같은 기능을 가진다.

전 성 분

[국문명]
정제수, 티타늄디옥사이드, 에칠헥실메톡시신나메이트, 글리세린, 페닐트리메지콘, 디이소스테아릴말레이트, 세틸피이지/피피지-10/1디메지콘, C12-15알킬벤조에이트, 알부틴,1,2-헥산디올, 사이클로펜타실록산, 마이카, 오조케라이트, 마이크로크리스탈린왁스, 디메지콘, 아데노신, 시베리안낙엽송추출물, 어성초추출물, 장엽대황뿌리추출물, 금은화추출물, 자두추출물, 라벤더추출물, 캐모마일꽃추출물, 마지현추출물, 베르가못잎추출물, 세이지추출물, 알추출물, 폴리프로필실세스퀴옥산, 디메지콘/비닐디메지콘크로스폴리머, 폴리글리세릴-3폴리디메칠실록시메틸디메지콘, 디스테아디모늄헥토라이트, 소듐클로라이드, 알루미늄하이드록사이드, 트리에톡시카프릴릴실란, 황색산화철, 적색산화철, 흑색산화철, 울트라마린

[영문명]
Water, Titanium Dioxide, Ethylhexyl Methoxycinnamate, Glycerin, Phenyl Trimethicone, Diisostearyl Malate, Cetyl PEG/PPG-10/1 Dimethicone, C12-15 Alkyl Benzoate,Arbutin, 1,2-Hexanediol, Cyclopentasiloxane, Mica, Ozokerite, Microcrystalline Wax, Dimethicone, Adenosine, Larix Sibirica Wood Extract, Houttuynia Cordata Extract, RheumPalmatum Root Extract, Lonicera Japonica (Honeysuckle) Flower Extract, Prunus Salicina Fruit Extract, Lavandula Angustifolia (Lavender) Extract, Anthemis Nobilis FlowerExtract, Portulaca Oleracea Extract, Monarda Didyma Leaf Extract, Salvia Officinalis (Sage) Extract, Oryza Sativa (Rice) Extract, Polypropylsilsesquioxane, Dimethicone/Vinyl Dimethicone Crosspolymer,Polyglyceryl-3 Polydimethylsiloxyethyl Dimethicone, Disteardimonium Hectorite, Sodium Chloride, Aluminum Hydroxide, Triethoxycaprylylsilane, CI 77492, CI 77491, CI77499, Ultramarines

(5) 제품사진 컨셉촬영

- 2018년 Color를 적용한 튜브 배열

- 단순 제품 배열이 아닌, 규칙배열로 제품의 동시성 표현

NEW ITEM

순한 성분에 보습을 더하다!

판테놀 모이스춰 크림

#런칭 이벤트 50% 한정 할인

진정이 필요한 피부에 보습까지 더하다
판테놀 모이스춰 크림

SOLUTIONS

- **건조한 피부에 보습효과**
  판테놀 고함량과, 병풀잎수 함유
- **예민해진 민감성 피부에 진정효과**
  마데카소사이드 1,000ppm함유
- **유수분 밸런스가 깨진피부**
  피지분비로 인한 피부 고민해결
- **EWG 그린등급**
  미국 환경단체 유해성분 조사 안전성 1-3등급

PROBLEMS

판테놀 모이스춰 크림은 피부타입에 상관없이
모든 피부 타입에 사용하실 수 있습니다.

건성 지성 민감성 복합성

#pH6.0 #아침세안

피부엔 순하게! 세정력은 강하게 버블 클렌징
피부 수분을 지켜주는 착한 클렌징폼

SOLUTIONS

- 모든 피부에 순하게! All Skin Type
  pH6.0 저자극 클렌징으로
  모든 피부에 사용 가능한 클렌징 폼입니다.
- 병풀잎수 함유, 피부 진정 클렌징
  피부 건강을 생각한 천연 보습성분으로 세안 후에도 당김 없이
  피부 자극없이 순하고 촉촉하게 가꾸어 드립니다.
- 한번에 싹! 원스텝 클렌징
  부드러운 거품이 묵은 각질은 물론 모공 속 쌓인 노폐물까지
  한번에 관리해줍니다.

PROBLEMS

클렌징 폼은 피부타입에 상관없이 모든 피부 타입에 사용하실 수 있습니다.

건성 지성 민감성 복합성

민감해진 피부를 시카젤로 회복하자
촉촉하게 피부 진정효과 SOS CICAGEL

SOLUTIONS

- 저자극 쿨링감으로 피부진정 SOS 시카젤
  즉각적인 쿨링효과와 천연 라벤더 오일
- 예민해진 민감성 피부에 진정효과
  오가닉 과일 추출물, 천연추출물로 케어
- 병풀잎수 함유
  피부에 생기와 활력부여
- EWG 그린등급
  미국 환경단체 유해성분 조사 안전성 1-3등급

PROBLEMS

SOS 시카젤은 피부타입에 상관없이
모든 피부 타입에 사용하실 수 있습니다.

건성 지성 민감성 복합성

WHY? 토탈 커버 비비 크림인가?

높은 커버력

초콜릿 색상의 비비 크림이
바르는 순간 내 피부에 맞게
보정되어 피부의 결점을
완벽하게 감춰줍니다.

촉촉한 수분감

수분크림을 바른듯한
보습력으로 윤기있고 촉촉한
피부로 만들어 줍니다.

3중 기능성

SPF 40 PA+++ 자외선 차단,
미백, 주름개선의 3중 기능성을
인증받은 기능성 비비크림 입니다.

가벼운 밀착력

여러번 덧발라도 뭉침과
들뜸없이 얇고 가볍게 밀착됩니다.

뛰어난 지속성

공기처럼 가벼운 밀착력으로
바른듯 안바른듯 내 피부처럼
오래도록 유지됩니다.

NO 다크닝

시간이 지나도 칙칙해지지않고
밝고 화사한 피부로 유지됩니다.

TOTAL COVER BB CREAM

어두웠다 밝아지는 반전 비비!

바르는 순간
내 피부색으로
완벽 커버!

미백, 주름,
자외선 차단
하나로 해결!

브라이트닝
파우더 함유로
윤기나는 피부!

메마르고
칙칙한 피부에
생기 수분충전!

(6) 피부안전성 테스트

2. 신뢰성 보증 확인서

- 시험명: (주)튜링젠코리아 "반드삼십육점오 판테놀 마일드 클렌저" 외 7종 24시간 피부 첩포를 통한 일차 자극 평가시험
- 시험번호: KDRI-2018-333-J
- IRB 승인번호: KDRI-IRB-18333

본 효능 평가 시험은 시험 책임자의 주관 하에, 대한피부과학연구소의 자체 실험 규정 및 임상시험 실시 기준 (Good Clinical Practice)에 따라 성실하게 실시되었습니다.
실험기간 중 획득한 모든 시험 결과는 본 보고서에 빠짐없이 사실 그대로 기재되었으며, 시험 책임자 및 기관장은 본 보고서의 모든 내용을 보증합니다.

점검	점검내용	점검일	연구책임자 보고일
시설	연구실 구조 및 배치	2018.07.18	2018.07.18
	시험물질 보관 시설	2018.07.18	2018.07.18
	문서 보관 시설	2018.07.18	2018.07.18
절차	시험계획서	2018.07.18	2018.07.18
	시험기기 표준작업지침서	2018.07.18	2018.07.18
	시험시설 표준작업지침서	2018.07.18	2018.07.18
시험	기관생명윤리위원회 승인	2018.06.26	2018.06.26
	시험 시작일	2018.07.24	2018.07.24
	시험 종료일	2018.07.27	2018.07.27
	최종 보고서	2018.08.08	2018.08.08

대한피부과학연구소

연구책임자 피부과 전문의 이 경 렬 (인)

연구소장 이 동 환 (인)

신뢰성 보증 책임자 오 종 진 (인)

본 보고서는 "저작권법" 및 "영업비밀에 관한 법률"에 의거 허가된 목적 외의 다른 용도로 이용할 수 없으며, 본 연구소의 서면동의 없이 부분 혹은 전체의 내용을 양도, 열람, 인용, 복제, 전송 및 공개할 수 없습니다.

별첨 1. 피부과 전문의의 평가에 의한 피부 자극 지수

1) 반트삼십육점오 판테놀 마일드 클렌저 : 0.020 점, 저자극
2) 반트삼십육점오 판테놀 모이스춰 크림 : 0 점, 무자극
3) 반트삼십육점오 유브이 선 라이트 프로텍터 : 0 점, 무자극
4) 반트삼십육점오 에스오에스 시카 젤 : 0.005 점, 무자극
5) 반트삼십육점오 모이스트 마스크 시트 : 0.005 점, 무자극
6) 반트삼십육점오 화이트 마스크 시트 : 0.029 점, 저자극
7) 반트삼십육점오 타이트 마스크 시트 : 0.029 점, 저자극
8) 반트삼십육점오 토탈 커버 비비 크림 : 0 점, 무자극

→ (주)튜링겐코리아 "반트삼십육점오 판테놀 마일드 클렌저", "반트삼십육점오 화이트 마스크 시트" 및 "반트삼십육점오 타이트 마스크 시트"시료는 일차자극 측면에서 저자극 물질로 판단되며, "반트삼십육점오 판테놀 모이스춰 크림", "반트삼십육점오 유브이 선 라이트 프로텍터", "반트삼십육점오 에스오에스 시카 젤", "반트삼십육점오 모이스트 마스크 시트" 및 "반트삼십육점오 토탈 커버 비비 크림" 시료는 일차자극 측면에서 무자극 물질로 판단됨.

대한피부과학연구소

(주)튜링겐코리아 "반트삼십육점오 슈퍼 플라워 오일 투 폼" 시료는 1% 희석액 상태로 24 시간 첩포 시험을 실시하였다. 패치 제거 후 30 분, 24 시간, 48 시간에 각각 일차 피부자극 유무를 피부과 전문의가 판정하였다. 피부반응 판정은 ICDRG 기준 및 PCPC 가이드라인에 의거하였으며, 각 피험자들의 피부반응 점수를 이용하여 자극 지수를 산출한 결과 피부자극 지수를 산출한 결과 피부자극 지수 0 점을 얻어 **(주)튜링겐코리아 "반트삼십육점오 슈퍼 플라워 오일 투 폼" 시료를 무자극 물질로 판단**하였다.

(주)튜링겐코리아 "반트삼십육점오 포 맨 올 인 원 에센스" 시료는 의뢰사에 제공한 상태 그대로 (As is) 24시간 첩포 시험을 실시하였다. 패치 제거 후 30분, 24시간, 48시간에 각각 일차 피부자극 유무를 피부과 전문의가 판정하였다. 피부반응 판정은 ICDRG 기준 및 PCPC 가이드라인에 의거하였으며, 각 피험자들의 피부반응 점수를 이용하여 자극 지수를 산출한 결과 피부자극 지수 0점을 얻어 **(주)튜링겐코리아 "반트삼십육점오 포 맨 올 인 원 에센스" 시료를 무자극 물질로 판단**하였다.

(주)튜링겐코리아 "반트삼십육점오 포 맨 올 인 원 로션" 시료는 의뢰사에 제공한 상태 그대로 (As is) 24시간 첩포 시험을 실시하였다. 패치 제거 후 30분, 24시간, 48시간에 각각 일차 피부자극 유무를 피부과 전문의가 판정하였다. 피부반응 판정은 ICDRG 기준 및 PCPC 가이드라인에 의거하였으며, 각 피험자들의 피부반응 점수를 이용하여 자극 지수를 산출한 결과 피부자극 지수 0점을 얻어 **(주)튜링겐코리아 "반트삼십육점오 포 맨 올 인 원 로션" 시료를 무자극 물질로 판단**하였다.

(7) 제품의 전성분 리스트

순번	제품명
1	VANT36.5 포 맨 올인원 스킨
2	VANT36.5 포 맨 올인원 에센스
3	VANT36.5 포 맨 올인원 로션
4	VANT36.5 슈퍼 플라워 오일 투 폼
5	VANT36.5 어드밴스드 모이스춰 크림
6	VANT36.5 판테놀 모이스춰 크림
7	VANT36.5 판테놀 마일드 클렌저
8	VANT36.5 에스오에스 시카 젤
9	VANT36.5 유브이 선 라이트 프로텍터
10	VANT36.5 토탈 커버 비비 크림
11	VANT36.5 모이스트 마스크 시트
12	VANT36.5 화이트 마스크 시트
13	VANT36.5 타이트 마스크 시트

제시한 제품 리스트 중 VANT36.5 포맨 올인원 스킨, VANT36.5 포맨 올인원 에센스, VANT36.5 포맨 올인원 로션, VANT36.5 슈퍼 플라워 오일 투 폼은 리뉴얼 대상 제품이라 제품 단상자 전성분(쌀추출물)이 표시 되지 않았으나 현재 리뉴얼된 제품의 단상자와 홈페이지에 표시 광고되어 있으며 아래와 같이 쌀추출물을 포함한 전성분을 표시 하였다.

1) VANT36.5 포맨 올인원 스킨

ALL IN ONE SKIN [올 인 원 스킨]

VANT365 satisfies your desire for beauty and gives you radiant youth and stunning beauty, realizing your dream for vitalized skin.

용량 : 120ml
제조년월일 : 별도표시
제조사 : 제품 내 표기
품질보증기간 : 상세설명 참조
사용기간 : 별도표시
주요성분 : 상세설명 참조
제조국 : 대한민국
소비자 상담실 : 1522-0084(반트소비자 상담실)

전성분
정제수, 알로에베라잎추출물, 글리세린, 부틸렌글라이콜, 글리세릴아크릴레이트/아크릴릭애씨드코폴리머, 에탄올, 부틸옥틸살리실레이트, 1,2-헥산디올, 페닐트리메치콘, 알루미늄스타치옥테닐석시네이트, 호호바씨오일, 토코페릴아세테이트, 녹차추출물, 위치하젤잎추출물, 로즈마리추출물, 피나무꽃추출물, 국화꽃추출물, 설령쥐오줌풀뿌리졸기/뿌리추출물, 알란토인, 소듐하이알루로네이트, 아크릴레이트/C10-30알킬아크릴레이트크로스폴리머, 베타-글루칸, 피피지-26-부테스-26, 피이지-40하이드로제네이티드캐스터오일, 디메치콘, 디메치콘/피이지-10/15크로스폴리머, 트리에탄올아민, 디소듐이디티에이, 향료, 쌀추출물

사용방법
세안 후 적당량을 덜어 피부에 고루 펴 발라 줍니다.

2) VANT36.5 포맨 올인원 로션

FOR MEN ALL IN ONE LOTION [포맨 올 인 원 로션]

VANT365 satisfies your desire for beauty and gives you radiant youth and stunning beauty, realizing your dream for vitalized skin.

용량 : 120ml
제조년월일 : 별도표시
제조사 : 제품 내 표기
품질보증기간 : 상세설명 참조
사용기간 : 별도표시
주요성분 : 상세설명 참조
제조국 : 대한민국
소비자 상담실 : 1522-0084(반트소비자 상담실)

전성분
병풀잎수, 글리세린, 카프릴릭/카프릭트리글리세라이드, 글리세릴스테아레이트, 사이클로펜타실록산, 라벤더추출물, 캐모마일꽃추출물, 마치현추출물, 베르가못잎추출물, 세이지추출물, 선인장열매추출물, 알라토인, 소듐하이알루로네이트, 알로에베라잎가루, 베타인, 미네랄워터, 자두추출물, 시베리안낙엽송추출물, 어성초추출물, 장엽대황뿌리추출물, 금은화추출물, 알지닌, 세테아릴알코올, 폴리소르베이트60, 잔탄검, 붉은누룩곰팡이추출물, 카보머, 1,2-헥산디올, 카프릴릴글라이콜, 향료, 쌀추출물

사용방법
1. 세안 후 적당량을 덜어 피부에 고루 펴 발라 줍니다.

3) VANT36.5 포맨 올인원 에센스

FOR MEN ALL IN ONE ESSENCE [포맨 올 인 원 에센스]

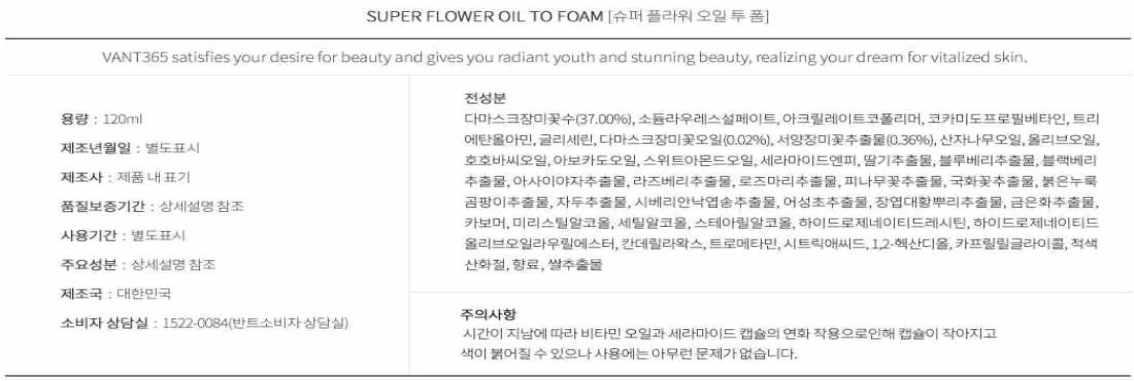
VANT365 satisfies your desire for beauty and gives you radiant youth and stunning beauty, realizing your dream for vitalized skin.

용량 : 120ml
제조년월일 : 별도표시
제조사 : 제품 내 표기
품질보증기간 : 상세설명 참조
사용기간 : 별도표시
주요성분 : 상세설명 참조
제조국 : 대한민국
소비자 상담실 : 1522-0084(반트소비자 상담실)

전성분
위치하젤잎수, 글리세린, 베타인, 세틸에칠헥사노에이트, 호동씨오일, 에난티아 클로란타껍질추출물, 미네랄워터, 알루미늄스타치옥테닐석시네이트, 라벤더추출물, 캐모마일꽃추출물, 마치현추출물, 베르가못잎추출물, 세이지추출물, 자두추출물, 시베리안낙엽송추출물, 어성초추출물, 장엽대황뿌리추출물, 금은화추출물, 올레아놀릭애씨드, 사이클로펜타실록산, 소듐아크릴레이트/소듐아크릴로일디메칠타우레이트코폴리머, 이소헥사데칸, 폴리소르베이트80, 디메치콘, 디메치콘/비닐디메치콘크로스폴리머, 1,2-헥산디올, 카르릴릴글라이콜, 향료, 쌀추출물

사용방법
1. 세안 후 적당량을 덜어 피부에 고루 펴 발라 줍니다.

4) VANT36.5 슈퍼 플러워 오일 투 폼



SUPER FLOWER OIL TO FOAM [슈퍼 플라워 오일 투 폼]

VANT365 satisfies your desire for beauty and gives you radiant youth and stunning beauty, realizing your dream for vitalized skin.

용량 : 120ml
제조년월일 : 별도표시
제조사 : 제품 내 표기
품질보증기간 : 상세설명 참조
사용기간 : 별도표시
주요성분 : 상세설명 참조
제조국 : 대한민국
소비자 상담실 : 1522-0084(반트소비자 상담실)

전성분
다마스크장미꽃수(37.00%), 소듐라우레스설페이트, 아크릴레이트코폴리머, 코카미도프로필베타인, 트리에탄올아민, 글리세린, 다마스크장미꽃오일(0.02%), 서양장미꽃추출물(0.36%), 산자나무오일, 올리브오일, 호호바씨오일, 아보카도오일, 스위트아몬드오일, 세라마이드엔피, 딸기추출물, 블루베리추출물, 블랙베리추출물, 아사이야자추출물, 라즈베리추출물, 로즈마리추출물, 피나무꽃추출물, 국화꽃추출물, 붉은누룩곰팡이추출물, 자두추출물, 시베리안낙엽송추출물, 어성초추출물, 장엽대황뿌리추출물, 금은화추출물, 카보머, 미리스틸알코올, 세틸알코올, 스테아릴알코올, 하이드로제네이티드레시틴, 하이드로제네이티드올리브오일라우릴에스터, 칸데릴라왁스, 트로메타민, 시트릭애씨드, 1,2-헥산디올, 카프릴릴글라이콜, 적색산화철, 향료, 쌀추출물

주의사항
시간이 지남에 따라 비타민 오일과 세라마이드 캡슐의 연화 작용으로인해 캡슐이 작아지고 색이 붉어질 수 있으나 사용에는 아무런 문제가 없습니다.

5) VANT36.5 어드밴스드 모이스춰 크림

ADVANCED MOISTURE CREAM [어드밴스드 모이스춰 크림]

VANT365 satisfies your desire for beauty and gives you radiant youth and stunning beauty, realizing your dream for vitalized skin.

용량 : 200ml
제조년월일 : 별도표시
제조사 : 제품 내 표기
품질보증기간 : 상세설명 참조
사용기간 : 별도표시
주요성분 : 상세설명 참조
제조국 : 대한민국
소비자 상담실 : 1522-0084(반트소비자 상담실)

전성분
정제수, 사이클로펜타실록산, 글리세린, 알로에베라잎추출물, 캐모마일추출물, 베타-글루칸, 오이추출물, 디메치콘, 피이지-10디메치콘, 디메치콘/피이지-10/15크로스폴리머, 아스퍼질러스/쌀발효추출물, 쌀추출물, 쌀겨추출물, 여주열매추출물, 포도추출물, 오렌지추출물, 사과추출물, 배추출물, 바나나추출물, 소듐클로라이드, 페녹시에탄올, 향료

사용방법
크림 사용 단계에서 적당량을 덜어 얼굴 전체에 부드럽게 펴 바른 후 가볍게 두드려 흡수시켜 줍니다.

6) VANT36.5 판테놀 모이스춰 크림

PANTHENOL MOISTURE CREAM [판테놀 모이스춰 크림]

VANT365 satisfies your desire for beauty and gives you radiant youth and stunning beauty, realizing your dream for vitalized skin.

용량 : 50ml
제조년월일 : 별도표시
제조사 : 제품 내 표기
품질보증기간 : 상세설명 참조
사용기간 : 별도표시
주요성분 : 상세설명 참조
제조국 : 대한민국
소비자 상담실 : 1522-0084
(반트소비자 상담실)

전성분
병풀잎수, 판테놀, 메틸프로판다이올, 페닐트라이메티콘, 시어버터, 세테아릴알코올, 세틸에틸헥사노에이트, 카프릴릭/카프릭트라이글리세라이드, 세테아릴글루코사이드, 솔비탄올리베이트, 베타인, 마데카소사이드, 포트마리골드꽃오일, 호동씨오일, 알란토인, 약모밀추출물, 장엽대황뿌리추출물, 인동덩굴꽃추출물, 시베리안잎갈나무목부추출물, 자두추출물, 쌀가루, 라벤더오일, 티트리잎오일, 비즈왁스, 잔탄검,메틸메타크릴레이트크로스폴리머, 카보머, 글리세릴스테아레이트, 트로메타민, 1,2-헥산다이올, 카프릴릴글라이콜

7) VANT36.5 판테놀 마일드 클렌저

PANTHENOL MILD CLEANSER [판테놀 마일드 클렌저]

VANT365 satisfies your desire for beauty and gives you radiant youth and stunning beauty, realizing your dream for vitalized skin.

용량 : 100ml
제조년월일 : 별도표시
제조사 : 제품 내 표기
품질보증기간 : 상세설명 참조
사용기간 : 별도표시
주요성분 : 상세설명 참조
제조국 : 대한민국
소비자 상담실 : 1522-0084(반트소비자 상담실)

전성분
소듐메틸코코일타우레이트, 아크릴레이트코폴리머, 병풀잎수, 포타슘코코일글리시네이트, 메틸프로판다이올, 소듐코코일이세티오네이트, 코코-글루코사이드, 글라이콜다이스테아레이트, 트로메타민, 베타인, 판테놀, 마데카소사이드, 유칼립투스잎오일, 라벤더오일, 티트리잎오일, 티타늄디옥사이드, 하이드록시아세토페논, 1,2-헥산다이올, 약모밀추출물, 장엽대황뿌리추출물, 인동덩굴꽃추출물, 시베리안잎갈나무목부추출물, 자두추출물, 쌀가루, 포도추출물, 오렌지추출물, 사과추출물, 돌배추출물, 바나나추출물

8) VANT36.5 에스오에스

SOS CICA GEL [에스오에스 시카 젤]

VANT365 satisfies your desire for beauty and gives you radiant youth and stunning beauty, realizing your dream for vitalized skin.

용량 : 25ml
제조년월일 : 별도표시
제조사 : 제품 내 표기
품질보증기간 : 상세설명 참조
사용기간 : 별도표시
주요성분 : 상세설명 참조
제조국 : 대한민국
소비자 상담실 : 1522-0084
(반트소비자 상담실)

전성분

병풀잎수, 글리세린, 에탄올, 마카다미아씨오일, 스위트아몬드오일, 오이열매추출물, 베타-글루칸, 부틸렌글라이콜, 다이프로필렌글라이콜, 폴리솔베이트20, 알로에베라잎가루, 콜라겐, 캐모마일꽃추출물, 스페인감초뿌리추출물 다이메틸설폰, 알란토인, 소듐하이알루로네이트, 마데카소사이드, 페퍼민트오일, 구아이아줄렌, 캐모마일꽃오일, 라벤더오일, 자두추출물, 약모밀추출물 장엽대황뿌리추출물, 인동덩굴꽃추출물, 시베리안잎갈나무목부추출물 쌀가루, 포도추출물, 오렌지추출물, 사과추출물, 돌배추출물, 바나나추출물 카보머, 트로메타민, 캠퍼, 1,2-헥산다이올, 카프릴릴글라이콜

9) VANT36.5 토탈 커버 비비 크림

TOTAL COVER BB CREAM [토탈 커버 비비 크림]

VANT365 satisfies your desire for beauty and gives you radiant youth and stunning beauty, realizing your dream for vitalized skin.

용량 : 30g
제조년월일 : 별도표시
제조사 : 제품 내 표기
품질보증기간 : 상세설명 참조
사용기간 : 별도표시
주요성분 : 상세설명 참조
제조국 : 대한민국
소비자 상담실 : 1522-0084(반트소비자 상담실)

전성분

정제수, 티타늄디옥사이드, 에칠헥실메톡시신나메이트, 글리세린, 페닐트리메치콘, 디이소스테아릴말레이트, 세틸피이지/피피지-10/1디메치콘, C12-15알킬벤조에이트, 알부틴,1,2-헥산디올, 사이클로펜타실록산, 마이카, 오조케라이트, 마이크로크리스탈린왁스, 디메치콘, 아데노신, 시베리안낙엽송추출물, 어성초추출물, 장엽대황뿌리추출물, 금은화추출물, 자두추출물, 라벤더추출물, 캐모마일꽃추출물, 마치현추출물, 베르가못잎추출물, 세이지추출물, 폴리프로필실세스퀴옥산, 디메치콘/비닐디메치콘크로스폴리머, 폴리글리세릴-3폴리디메칠실록시에칠디메치콘, 디스테아디모늄헥토라이트, 소듐클로라이드, 알루미늄하이드록사이드, 트리에톡시카프릴릴실란, 황색산화철, 적색산화철, 흑색산화철, 울트라마린, 쌀추출물

사용방법

1. 기초 화장을 먼저 한 후, 베이스단계에서 적당량의 크림을 손이나 퍼프에 덜어 줍니다.
2. 피부에 잘 스며들도록 골고루 펴 발라 줍니다.
3. 커버가 필요한 부분은 한번 더 화사하고 촉촉한 피부를 유지할 수 있습니다

10) VANT36.5 모이스트 마스크 시트

MOIST MASK SHEET [모이스트 마스크 시트]

VANT365 satisfies your desire for beauty and gives you radiant youth and stunning beauty, realizing your dream for vitalized skin.

용량 : 25ml*10
제조년월일 : 별도표시
제조사 : 제품 내 표기
품질보증기간 : 상세설명 참조
사용기간 : 별도표시
주요성분 : 상세설명 참조
제조국 : 대한민국
소비자 상담실 : 1522-0084(반트소비자 상담실)

전성분

정제수, 글리세린, 메칠프로판디올, 프로필렌글라이콜, 에탄올, 캐모마일꽃추출물, 위치하젤잎추출물, 감초추출물,알로에베라잎추출물,알란토인,소듐구아이아줄렌설포네이트,판테놀,콜라겐,소듐하이알루로네이트, 카보머,페녹시에탄올,트리에탄올아민,향료, 쌀추출물

사용방법

1. 얼굴을 깨끗하게 세안 후 물기를 닦고, 화장솜을 이용하여 스킨 또는 토너로 피부 결을 정돈해 줍니다.
2. 파우치를 개봉한 후, 마스크 시트를 꺼낸 다음 보호 필름을 제거해 줍니다.
(보호필름이 마스크 시트를 흐트러지지않게 고정해 줍니다.)
3. 마스크 시트를 얼굴 정면에 밀착시켜 줍니다. 15~20분후에 떼어내고,
피부에 남아있는 에센스를 부드럽게 두드려 흡수시켜 줍니다.

11) VANT36.5 화이트 마스크 시트

WHITE MASK SHEET [화이트 마스크 시트]

VANT365 satisfies your desire for beauty and gives you radiant youth and stunning beauty, realizing your dream for vitalized skin.

용량 : 25ml*10
제조년월일 : 별도표시
제조사 : 제품 내 표기
품질보증기간 : 상세설명 참조
사용기간 : 별도표시
주요성분 : 상세설명 참조
제조국 : 대한민국
소비자 상담실 : 1522-0084(반트소비자 상담실)

전성분

정제수, 메칠프로판디올, 글리세린, 나이아신아마이드, 에탄올, 감초추출물, 캐모마일꽃추출물, 판테놀, 알란토인, 소듐하알루로네이트, 위치하젤잎추출물, 콜라겐, 상백피추출물,라벤더오일, 잔탄검, 페닐트리메치콘, 토코페릴아세테이트, 1,2-헥산디올, 카프릴릴글라이콜, 피피지-26-부테스-26, 피이지-40하이드로제네이티드캐스터오일, 페녹시에탄올, 향료, 쌀추출물

사용방법

1. 얼굴을 깨끗하게 세안 후 물기를 닦고, 화장솜을 이용하여 스킨 또는 토너로 피부 결을 정돈해 줍니다.
2. 파우치를 개봉한 후, 마스크 시트를 꺼낸 다음 보호 필름을 제거해 줍니다.
(보호필름이 마스크 시트를 흐트러지지않게 고정해 줍니다.)
3. 마스크 시트를 얼굴 정면에 밀착시켜 줍니다. 15~20분후에 떼어내고,
피부에 남아있는 에센스를 부드럽게 두드려 흡수시켜 줍니다.

12) VANT36.5 타이트 마스크 시트

TIGHT MASK SHEET [타이트 마스크 시트]

VANT365 satisfies your desire for beauty and gives you radiant youth and stunning beauty, realizing your dream for vitalized skin.

용량 : 25ml*10
제조년월일 : 별도표시
제조사 : 제품 내 표기
품질보증기간 : 상세설명 참조
사용기간 : 별도표시
주요성분 : 상세설명 참조
제조국 : 대한민국
소비자 상담실 : 1522-0084(반트소비자 상담실)

전성분
정제수, 메칠프로판디올, 글리세린, 나이아신아마이드, 에탄올, 감초추출물, 캐모마일꽃추출물, 판테놀, 알란토인, 소듐히알루로네이트, 위치하젤잎추출물, 콜라겐, 상백피추출물, 라벤더오일, 잔탄검, 페닐트리메치콘, 토코페릴아세테이트, 1,2-헥산디올, 카프릴릴클라이콜, 피피지-26-부테스-26, 피이지-40 하이드로제네이티드캐스터오일, 페녹시에탄올, 향료 , 쌀추출물

사용방법
1. 얼굴을 깨끗하게 세안 후 물기를 닦고, 화장솜을 이용하여 스킨 또는 토너로 피부 결을 정돈해 줍니다.
2. 파우치를 개봉한 후, 마스크 시트를 꺼낸 다음 보호 필름을 제거해 줍니다.
(보호필름이 마스크 시트를 흐트러지지않게 고정해 줍니다.)
3. 마스크 시트를 얼굴 정면에 밀착시켜 줍니다. 15~20분후에 떼어내고, 피부에 남아있는 에센스를 부드럽게 두드려 흡수시켜 줍니다.

(8) 제품 홍보 및 마케팅

- 2018년 해외 박람회 참가: 태국, 베트남

- 국외 전시회를 통한 화장품산업의 현황 및 시장동향 파악, 마케팅 활성화, 시장 판로 개척

- 태국 방콕 IMPACT 전시장 : 2018 비욘드 뷰티 아세안 방콕 전시회 2018.9.20.~ 22/3일간

- 동남아시장의 화장품산업 현황 및 시장 트랜드 동향 파악, 현지 네트워크 구축, 기업 인지도 향상

- 베트남(호치민-하노이) 2018.8.14.~16/3일간

라. 사업화성과 및 매출 실적

(1) 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	4.3억원
			향후 3년간 매출	10억원
		관련제품	개발후 현재까지	0.8억원
			향후 3년간 매출	4억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0.1% 국외 : 0 %
			향후 3년간 매출	국내 : 0.2 % 국외 : 0.2 %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 1 % 국외 : 0 %
			향후 3년간 매출	국내 : 5 % 국외 : 0.1 %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		10 위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		5 위

(2) 사업화 성과

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		1년		
	소요예산(백만원)		30백만원		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			4.3억원	10억원	15억원
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0.1%	0.2%	0.5%
		국외	0%	0.1%	0.3%
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		쌀가구 및 쌀추출물을 이용한 기능성 화장품의 주요 컨셉을 바탕으로 OEM/ODM 기업으로서 주요 제품군에 적용하고, 나아가 색조화장품의 천연 염료로 활용함으로서 다양한 제품군으로 확대 예정임.		
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)		현재	3년후	5년후
	수입대체(내수)		-	10	30
	수 출		-	20	40

제 5 절. 연구개발 성과

1. 연구성과 목표 및 대비 실적

성과목표		사업화지표											연구기반지표								
		지식재산권			기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용등)
													논문		학술발표					
		특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SCI	비SCI				정책활용	홍보전시	
최종목표		2	2		2		8						1	3	3					
1차년도	목표														1					
	실적														2					
2차년도	목표	1					4							1	1					
	실적						4						1	1	4		1			
3차년도	목표		1		2		4						1	2	1					
	실적	1			2		5							1	4		1			
소계	목표	1	1		2		8						1	3	3					
	실적	1			2		9						1	2	10		2			

나. 국·내외 논문게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부	게재일	등록번호
1	Lipopolysaccharide로 유도된 RAW 264.7 세포에서 유색미 에탄올 추출물의 항염증 작용	한국식품영양과학회지	이진태	47(9)	대한민국	한국식품영야과학회	비SCI	2018	
2	UVB에 조사된 HaCAT Keratinocytes에서의 유색미에 의한 Matrix Metalloproteinases 발현 억제 메커니즘	한국식품영양과학회지	이진태	46(5)	대한민국	한국식품영야과학회	비SCI	2017	
3	Phylogenic Analysis of 246 Koresn Rice Varieties Using Core Sets of Microsatellite Markers	Philippine Journal of Crop Science	권용삼	42(1)	Philippine	Philippine Journal of Crop Science	SCI	2017	

다. 국·내외 학술대회 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	2018 KOCS international conference	이진태	2018.11.08	포천	대한민국
2	2018년도 한국생명과학회 제59회 정기총회 및 국제학술대회	김도훈	2018.08.09	경주	대한민국
3	2018년도 한국식물생명공학회 정기학술발표회 및 총회	김도훈	2018.05.31	여수	대한민국
4	2018년도 한국생명과학회 제59회 정기총회 및 국제학술대회	이진태	2018.08.09	경주	대한민국
5	2017 한국육종학회 차세대BG21사업단 GSP사업단 공동심포지엄	권용삼	2017.07.06	대구	대한민국
6	*2017 international symposium and annual meeting of the KSABC*	이진태	2017.06.15	부산	대한민국
7	2017 international symposium and annual meeting of the KSABC	이진태	2017.06.15	부산	대한민국
8	2017 한국식물생명공학회 정기학술발표회 및 총회	김도훈	2017.06.08.	대전	대한민국
9	2016 한국육종학회-차세대BG21사업단-GSP사업단 공동심포지엄	권용삼	2016.06.29	청주	대한민국
10	2016한국응용생명과학회 정기학술총회	이재봉	2016.06.16	제주	대한민국

라. 지식재산권: 특허출원/등록

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	흑설 추출물의 포함하는 피부 주름 개선용 화장료 원료	대한민국	동아대학교산학협력단	2018.05.11	10-2018-0054351				50
			대구한의대학교산학협력단						50

마. 인력양성

연구인력 활용/양성 성과													
번호	분류	기준년도	인력양성 현황										
			학위별				성별		지역별				
1	인력지원 성과	2017, 2018	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
				2			2				2		

바. 사업화

No	사업화명	제품명	업체명	사업화형태
1	유색미 유전자원을 활용한 기능성 크림 제품 개발	기능성 크림	㈜튜링겐코리아	기술보유자의 직접사업화—기존업체-상품화
2	유색미 유전자원을 활용한 기능성 BB 크림 제품 개발	BB 크림	㈜튜링겐코리아	기술보유자의 직접사업화—기존업체-상품화
3	유색미 유전자원을 활용한 기능성 컬러 라이스 폼클렌징 제품 개발	기능성 컬러 라이스 폼클렌징	㈜튜링겐코리아	기술보유자의 직접사업화—기존업체-상품화
4	유색미 유전자원을 활용한 기능성 컬러 라이스 에센스 제품 개발	기능성 컬러 라이스 에센스	㈜튜링겐코리아	기술보유자의 직접사업화—기존업체-상품화
5	유색미 유전자원을 활용한 기능성 컬러 라이스 안티스트레스 릴렉싱 마스크 제품 개발	기능성 컬러 라이스 안티스트레스 릴렉싱 마스크	㈜튜링겐코리아	기술보유자의 직접사업화—기존업체-상품화
6	유색미 유전자원을 활용한 기능성 컬러 라이스 아이크림 제품 개발	기능성 컬러 라이스 아이크림	㈜튜링겐코리아	기술보유자의 직접사업화—기존업체-상품화
7	유색미 유전자원을 활용한 기능성 UV SUN LIGHT PROTECTOR 제품 개발	기능성 UV SUN LIGHT PROTECTOR	㈜튜링겐코리아	기술보유자의 직접사업화—기존업체-상품화
8	유색미 유전자원을 활용한 기능성 SOS CICAGEL 제품 개발	능성 SOS CICAGEL	㈜튜링겐코리아	기술보유자의 직접사업화—기존업체-상품화
9	유색미 유전자원을 활용한 기능성 클렌징폼 제품 개발	기능성 클렌징폼	㈜튜링겐코리아	기술보유자의 직접사업화—기존업체-상품화

사. 기술실시

No	기술명	실시기관	기술실시일	기술실시권 유형	유무상여부	기술유형
1	유색미를 이용한 화장품 원료 적용기술	에이치씨매드	2019.02.28	전용실시권	무상	노하우
2	식물자원 유색미를 활용한 화장품 기능성 소재 및 천연색소의 개발	튜링겐코리아(주)	2019.02.28	전용실시권	유상	노하우

제 4 장. 목표달성도 및 관련 분야 기여도

제 1 절. 목표달성도

가. 연차별 목표달성도

1) 1차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
1차 년도 (2016)	(제 1 세부) 국내 벼 품종 및 유색미 유전자원을 이용한 기능성 물질 탐색	○ 국내외 유전자원을 이용한 고기능성 유색미 계통 선발	○ 유색미 유전자원 : 500점 - 흑미 ; 350점, 적미 ; 150점 ○ 안토시아닌 함량 차이에 따른 계통 선발 ○ 프로안토시아니딘 함량 차이에 따른 계통 선발 ○ 플라보노이드 함량 차이에 따른 계통 선발 ○ 페놀성 화합물 함량 차이에 따른 계통 선발 ○ 유색미 추출물에 대한 항산화 활성 검정 ○ 생리활성 우수 유색미 유전자원 탐색	100
	(제 2 세부) 분자생물학적 기술을 활용한 고기능성 함유 벼 계통 육성	○ 유색미 유전자원에 분자마커 검정	○ 공시 유전자원 : 500점 - 흑미 ; 350점, 적미 ; 250점 ○ 분석방법 : SSR 분석법 활용 - 다형성 정도가 높은 15개 이상 활용 (HvSSR11-28, RM8085, RM72 등) ○ 자동염기서열분석기(ABI3730XL)와 GeneMapper 프로그램을 활용한 분석 실시 ○ PowerMarker 등 컴퓨터프로그램을 활용한 군집 분석	100
		○ 유색미 유전자원의 주요 농업 형질 조사	○ 조사형질 - 식물체 : 간장, 수장, 주당수수, 식물체 부위 및 영의 안토시아닌 착색 정도 - 종자 : 천립중, 현미종피색, 종자내부의 안토시아닌 착색 정도 ○ 유색미 유전자원의 고정이 높은 계통 → **제1협동 과제 제공**	100
	(제 1 협동) 기능성 화장품 개발을 위한 기능성 유색미	○ 유색미 개체 중 기능성이 뛰어난 개체 선발	○ 항산화 활성평가 - DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능, SOD 유사활성능, H_2O_2 소거능, 환원력 등 실험진행	100

	소재 개발		○ 미백 활성평가 - Tyrosinase from mushroom 억제 실험 진행 ○ 주름 억제 활성 평가 - Elastase 억제 실험, Collagenase 억제 실험 진행 ○ Gen5 등 컴퓨터프로그램을 활용한 통계적 분석	
		○ 선발된 유색미 개체를 사람의 세포에 적용하여 유효성 평가	○ 인간의 피부세포활용 - Human Keratinocyte Cell, Human Normal Fibroblast Cell등을 활용 ○ 물질의 세포독성 평가 - MTT법 이용 ○ 항산화 활성평가 - DCF법을 이용한 세포 형광분석	100
	(제 2 협동) 유색미를 활용한 기능성 화장품 개발	○ 유색미를 활용한 화장품 제형 안정성 연구	○ 시장 분석 및 판매 타켓설정 (기능별 또는 연령대별) ○ 제품 기능별 8종 라인업 (폼클렌징, 토너, 에센스, 에멀젼, 아이크림 등) ○ 유색미의 특정 기능성에 맞는 기능성 화장품 연구 ○ 다양한 유화법을 이용한 유색미의 기능성 물질 안정화와 피부 침투성을 돕기 위한 제형개발 - Liposome, Nano Emulsion (D-phase Emulsion, PIT Emulsion 등), Multiple Emulsion, Pickering Emulsion 등을 이용하여 개발 ○ 유색미의 기능성 물질을 제형화하여 시제품 개발	100
		○ 추출물 소재 제형 적용 가능성 분석 (향취, 색상)	○ 제형 내 최적조건 설정 (추출물 유효농도) ○ 방부시험을 통한 최적조건의 제형 개발 ○ 사용감 개선(발림성, 향)	

2) 2차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
2차 년도 (2017)	(제 1 세부) 국내 벼 품종 및 유색미 유전자원을 이용한 기능성 물질 탐색	○ 기능성 화장품 소재용 유색미 계통 선발	○ 안토시아닌 고함유 유색미 계통의 기능성 지표성분 분석 (C3G) ○ 프로안토시아니딘 고함유 유색미 계통의 기능성 지표성분 분석 ○ 플라보노이드 고함유 유색미 계통의 기능성 지표성분 분석 (luteolin) ○ 페놀산 고함유 유색미 계통의 기능성 지표성분 분석 (vanillic acid) ○ 선발된 유색미 계통의 항산화 활성 검정 ○ 선발된 유색미 계통의 가바 및 감마오리자놀 함량 분석	100
	(제 2 세부) 분자생물학적 기술을 활용한 고기능성 함유 벼 계통 육성	○ 현미 종피색을 판별하는 프라이머 및 흑미 선별용 프라이머를 이용한 유전자원 선발 효율성 탐색	○ 농촌진흥청에서 개발된 현미 종피색을 판별하는 프라이머 및 흑미 선별용 프라이머를 활용 ○ 종피색 및 안토시아닌 발현 관련 분자마커 유전자형과 상관 분석	100
		○ 유색미 유전자원의 분자마커 특성과 주요 농업형질 및 기능성 물질과의 상관 관계 분석	○ 컴퓨터 프로그램 활용 군집분석 실시	100
		○ 유색미 유전자원의 계통 선발 및 고정	○ 분자생물학적 특성과 주요농업형질 및 기능성 물질을 고려한 유용 계통선발 **→ 제1협동 과제 제공** ○ 계통내 분리가 일어날 경우 약배양에 의한 고정실시	100
		○ 기능성 성분 함량이 높은 계통간 잡종 집단 육성	○ 흑미×적미, 흑미×흑미, 적미×적미, 흑미×백미, 적미×백미 등에 대한 F1 양성	100
	(제 1 협동) 기능성 화장품 개발을 위한 기능성 유색미 소재 개발	○ 선발된 유색미 개체를 사람의 세포에 적용하여 단백질 발현량 측정	○ 인간의 피부세포활용 - Human Keratinocyte Cell, Human Normal Fibroblast Cell등을 활용 ○ 항산화, 항염증, 미백, 주름 관련 단백질 발현 측정 - Western Blot법을 이용한 MMPs, Catalase, iNOS, COX-2 등의 발현량 측정	100
		○ 유색미가 미치는 분자생물학적 분석	○ 유색미를 적용시켜 유전적 영향 분석	100

			- RT-PCR, RealTime PCR 등을 이용하여 DNA 단계에 유색미가 미치는 영향 분석	
	(제 2 협동) 유색미를 활용한 기능성 화장품 개발	○ 화장품 제형 안정성 측정 (물성변화 측정)	○ pH 안정성 ○ Viscosity 점도안정성 ○ 온도별 안정성 측정 (Cycle, 3℃, 25℃, 37℃, 45℃) - 온도 Cycle에 변화를 주어 온도의 변화에 따른 유화의 불안정성 확인 ○ 광안정성 측정 ○ 미생물 시험(세균, 진균)	100
		○ 제품 시험평가/피부 안전성 시험 (공인인증 DATA 확보)	○ 공인 시험기관 기능성 평가 (주름, 미백 활성 평가) ○ 첩포 시험을 통한 피부 안전성 테스트	100

3) 3차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
3차 년도 (2018)	(제 1 세부) 국내 벼 품종 및 유색미 유전자원을 이용한 기능성 물질 탐색	○ 유색미 유전자원의 생리활성 물질 탐색	○ 유색미 용매별 추출 및 용매 극성에 따른 분획물 제조 ○ 유색미 추출 분획의 주요 성분 분획 작성 ○ 유색미 추출 분획별 항산화 활성 검정 ○ 유색미 생리활성 분획에 대한 물질 분리 ○ 유색미 분획 함유 특수 기능성 성분 분리 및 구조 동정 ○ 선발된 유색미 계통의 이화학적 성분분석 ○ 선발된 유색미 계통의 생리활성 물질 분석(토코페롤, 토코드리에놀)	100
	(제 2 세부) 분자생물학적 기술을 활용한 고기능성 함유 벼 계통 육성	○ 분자마커를 이용한 벼 종피색 관련 유전자원의 선발 효율성 탐색	○ 기 분석된 결과의 반복재현성 검정 및 효율성 비교분석 ○ DNA 검정 및 기능성 물질분석 결과와 상관관계 분석	100
		○ 유색미 유전자원의 선발 및 종자증식	○ 분자생물학적 특성과 주요농업형질 및 기능성 물질을 고려한 유용계통선발 → **제1협동 과제 제공** ○ 계통내 분리가 일어날 경우 약배양에 의한 고정실시	100

		○ 기능성 성분 함량이 높은 계통간 잡종 집단 육성	○ 흑미×적미, 흑미×흑미, 적미×적미, 흑미×백미, 적미×백미 등에 대한 F1에 대한 세대진전	100
	(제 1 협동) 기능성 화장품 개발을 위한 기능성 유색미 소재 개발	○ 유색미가 미치는 분자생물학적 분석	○ 유색미를 적용시켜 유전적 영향 분석 - RT-PCR, RealTime PCR 등을 이용하여 DNA 단계에 유색미가 미치는 영향 분석	100
	(제 2 협동) 유색미를 활용한 기능성 화장품 개발	○ 시제품화	○ M.O.Q 적용 제품공정화 ○ 온라인을 통한 제품(선)판매 소비자 패턴 분석 ○ 제품 대량생산 공정화	100
		○ 제품 용기 및 박스디자인 ○ 제품 홍보; 박람회	○ 기능별 특성에 따른 용기 설정 ○ 용기 디자인(색상, 폰트디자인 등) ○ 단상자 디자인	100

나. 목표 달성 여부

연구계획서 상의 정성적 목표는 전체 100% 달성하였고, 정량적 성과는 특허 등록 1건 및 논문(비SCI) 1건이 미달성됨

다. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성등)

○ 제2세부 연구책임자였던 동아대학교 권용삼교수의 사망으로 인해 연구수행기간 동안의 특허등록 1건 및 논문 1건의 정량적 성과가 미달됨. 이후, 주관기관인 동아대학교에서 현재 논문 1건과 특허출원 1건을 진행 중에 있음

○ 제2협동 과제인 ㈜튜링겐코리아에서는 기업의 매출액 10% 상승을 활용목표로 선정하였으나, 국내 화장품 시장의 경쟁심화와 중국시장 진출 제한으로 인해 기업의 총 매출액이 감소하였음.

○ 하지만 쌀(유색미)추출물을 이용한 제품군의 기업의 주요 제품군으로 3년간 약 4.3억원의 주요 매출액을 나타내었으며, 2년간 지속적으로 매출액 규모가 확대되어 기업의 주요 상품군으로 자리 잡음.

○ 3년간 12종의 제품군에 기술개발결과물을 적용하였으며, 이외에도 쌀추출물을 판매함으로서 기업의 매출처 및 품목 다양화에 큰 역할을 차지 할것으로 생각됨.

○ 유색미의 추출분획과 고시된 기능성 화장품 원료와의 단순혼합한 제품을 실제 개발되어 있으나, 본 기술개발 사업의 목표는 기능성 화장품 개발을 위한 기능성 유색미 소재 개발로서 고기능성 함유 벼 계통을 이용하여 분획별 효능검증 및 안전성평가를 진행하였으며, 분획별 추

출물을 이용하여 화장품 개발을 진행하였음

○ 본 과제를 통해 개발된 효능 있는 유색미 추출물의 기능성 원료 등재 또는 최종 제품의 기능성 입증이 후속 전개되어야 하는 의견이 있었으나, 본 기술개발 사업의 개발의 목표는 기능성 화장품 개발을 위한 기능성 유색미 소재 개발로서 고기능성 함유 벼 계통을 이용하여 분획별 효능검증 및 안전성 평가를 진행하였으며, 분획별 추출물을 이용하여 화장품 개발을 진행하였음

○ 피부임상 기능성 입증을 위한 연구 또는 기능성 화장품 등록을 위한 입증이 필요하다는 의견이 있었으나, 피부임상 기능성 입증의 사업비 부분이 많이 차지하여 안전성 실험을 동물대체 실험법을 이용하여 진행하였고, 기능성 화자품 비고시원료 등록 신청 또한 본 과제규모로 진행하기에는 무리가 있어 기능성 소재를 입증하는 연구로 진행하였음

제 2 절. 관련분야 기여도

가. 연구개발 결과의 활용방안

○ 유색미 유전자원에 대한 주요 농업형질 및 기능성 물질 함량 DB 구축

- 기능성 제품 소재에 따른 적합 품종 개발을 위한 육종 재료로 활용
- 안토시아닌, 감마오리자놀 등과 같은 유용물질 관련 유전자의 mapping 등 분자유전학적 연구 재료 식물로 활용

○ 유색미 유전자원의 분자생물학적 특성 평가 자료

- 유색미 유전자원에 대한 핵심 집단 구축을 위한 자료로 활용
- 안토시아닌 색소 등 다양한 기능성 물질의 유전양상 분석에 활용

○ 유색미 및 식물체를 활용한 화장품 시제품 개발

- 유색미 종자 뿐만 아니라 식물체 등을 활용한 화장품 소재 개발 → 재료의 안정적 공급
- 기업체에 기술이전 및 참여기업체를 활용한 제품화에 활용

○ 현재 기술실시 계약을 통하여 ㈜에이치씨메드 제품을 OEM 개발 중이며, 쌀 추출물 함유 13개 품목을 제품화 예정임

○ 현재 쌀 추출물 함유 6개 제품을 출시하였으며, 나머지 7개에 대한 제품 출시는 상반기 중으로 출시 예정으로 개발 중임

나. 기대성과

1) 기술적 측면

- 유색미 유전자원에 대한 주요농업형질, 기능성물질 및 분자생물학적 검정을 활용한 최초

의 핵심집단 구축이 가능

- 적미와 흑미 관련된 안토시아닌 합성 등에 대한 새로운 유전자의 탐색에 이용
- 종자뿐만 아니라 식물체를 활용한 수용성 및 지용성 화장품 소재 개발로 활용

2) 경제·산업적 측면

- 쌀 소비의 다양화를 통한 부가 가치 증대
- 신기능성 화장품 개발을 통한 국민 피부 건강에 기여
- 천연 화장품이기 때문에 이슬람 시장의 제품 수출도 가능

제 5 장. 연구개발결과의 활용계획

제 1 절. 연구개발결과의 활용 계획

국내외 수집된 유색미 유전자원을 활용하여 분자생물학적 특성을 검정하고 주요농업형질 및 기능성 물질을 고려한 유용계통을 선발하고, 분자마커를 이용하여 고기능성 함유 벼 계통을 육성하여 이로부터 얻어진 검정결과에 대한 지적소유권을 우선 확보하고, 기술이전을 통하여 경제적 이익을 추구할 것이다. 이때 화장품 소재로서의 유색미 유전자원을 활용하기 위하여 관련 전공자(식물 생리·생화학자 및 화장품약리학자 등)와의 공동연구를 적극 추진할 것이며, 이러한 연구 결과는 유색미 유전자원을 활용한 화장품 소재로서의 기술이전에 있어서 보다 부가가치를 높일 것이다.

○ 고기능성 유색미 계통을 이용한 화장품 소재로서의 활용도를 높임

○ 고기능성 유색미 계통을 이용한 음료, 건강보조제 등 다양한 제품개발의 소재로서의 활용범위 확대

○ 천연물에서 추출한 물질을 사용하여 소비자들에게 거부감이 없는 제품개발 가능

○ 박람회를 통한 유색미를 포함한 화장품 홍보와 소비자 선호도 조사를 실시하여 바이어 발굴 시발점 마련

○ 인체에 부작용이 없는 효과가 우수한 천연물을 활용한 응용범위 확대 (피부 보습 및 노화방지 화장품, 아토피성 피부염 관련 스킨케어 및 헤어케어 제품 등)

○ 쌀 생산이 적은 국외로 원료를 수출할 수 있는 방안 모색

○ 유색미 기반 다양한 유색미 추출물을 이용한 기능성 원료 사업화를 바탕으로 주요 마케팅 전략운영을 통한 기업의 신성장 아이템으로 운영함

○ 본 기술개발사업을 통해 ㈜튜링겐코리아는 보다 과학적 검증을 바탕으로 효과적인 항노화, 주름개선 소재 및 기능성 화장품을 개발하였으며, 이를 사업화하여 기능성 화장품 시장의 기술수준을 상승시키고, 수출을 통한 대한민국 화장품의 우수성을 해회에 알리는 계기됨

○ 유색미 기반 화장품 제형 및 소재 개발을 통한 기업의 기술 수준을 향상하고 이를 바탕으로 다양한 제형 개발의 기초 기반 기술로 활용가능

○ 개발한 유색미 추출물을 화장품에 응용함으로서 천연 화장품의 객관화 및 과학화 정립

○ 유색미 추출물에 대한 연구개발로 과학화에 따른 화장품원료 등재 및 신소재 소유권을 확보함으로서 향후 추가적 제품에 적용이 가능함

○ 유색미 추출물의 화장품 원료로소 응용가능성, 객관화 검증을 통한 국내 화장품 소재시장의 선도적 역할 수행

○ 다양한 유색미 추출물의 사업화 가능성 및 기반기술 활용함으로서 기업의 신사업(천연물 소재)으로 발전 가능

○ 기능성 천연소재 및 화장품 원료화 기술 확보 시 유사한 물질의 제품화에도 적용가능

○ 중소기업의 기술개발을 통한 신규 생산공정을 구현하고, 상용화 및 기술평준화를 통한 중소기업의 시장참여 방안 모색

○ 추출물이 함유된 화장품의 피부 안전성 및 화장품 소재로서의 안정성 검증

○ 향후 발생하는 추가적 연구성과는 협의 후 기술이전을 실시 예정임

○ 유색미 추출물의 국제화장품성분사전(ICID)에 등록할 예정이었으나, 컨설턴트를 통한 의견에 쌀 추출물이 이미 ICID 등록이 되어 있어 추가적인 등록은 불가능한 것으로 의견을 받아 향후, 정확한 품종이 제시되면, 품종으로 차별화된 국제화장품성분사전에 등록 예정임

가. 산업화 방안

(1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

○ 유색미 유전자원을 활용한 고기능성 물질 신품종 육성은 화장품 및 건강기능 식품의 원료로 활용되기 때문에 제반 성분이 우수한 품종에 대해서는 품종보호 출원 등을 활용하여 지식재산권을 확보할 계획임.

○ 국내 화장품업계는 주원료를 해외 원료업체에서 조달하기 때문에 연간 1조5천억원을 해외에 지불하고 있는 상황이기 때문에 본 연구과제를 통해 개발된 유색미의 천연물질을 활용한 화장품을 개발하고 이를 직접 제품화하거나 다른 기업에 원료 물질을 공급할 계획임.

○ 유색미 유전자원에서 추출한 생물자원 원료 물질은 화장품에 국한되지 않고 건강기능 식품개발에 제공하여 산업화할 수 있는 방안도 수립할 예정임.

(2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

산업화 기준 / 항 목	1차년도	2차년도	3차년도	계
직접 경제효과	2,000	2,000	2,000	6,000
경제적 파급효과	3,000	3,000	3,000	9,000
부가가치 창출액	2,000	2,000	2,000	6,000
합 계	7,000	7,000	7,000	21,000

○ 국내 쌀 생산량의 1%를 기능성 화장품 원료로서 고기능성 유색미 계통을 생산할 경우 432만톤(년간 쌀 생산량) X 1,990원(Kg당 가격) X 1%(고기능성 유색미 계통 생산량) = 860억원 정도의 농가소득 증대 효과를 기대할 수 있다.

제 6 장. 연구개발결과의 보안등급

보안등급분류	일반과제
결정사유	해당하지 않음

제 7 장. 연구실 안전조치 이행 실적

제 1 절. 연구실 안정조치 이행 실적

○ 기술적 위험요소 분석

- 전문성을 요하는 기계 기구 사용
- 위험성 화학물질 사용

○ 안전관리대책

- GMO 품종 보관 장소 시건장치 실시 및 폐기 시 고압 멸균 하여 처리
- 물질안전 보건자료 비치 및 위험물 경고 표지 부착
- 정기적인 건강검진 실시 (년 1회)
- 학교 및 실험실 내 안전교육 실시(년 6시간 이상)
- 화학약품 및 실험실 안전점검 : 소방안전협회(년 1회)
- 방사선 안전교육 : 원자력안전아카데미 (년 1회)
- 연구실안전(연구실안전환경관리자 보수교육): 국가연구안전관리본부(1회/2년)
- 환경(환경기술인 교육): 환경보전협회(1회/3년)

○ 연구실 안전점검 실시

- 연구실안전환경조성에 관한 법률에 의거 연구실 일상점검(1회/일), 정기안전점검(1회/년), 정밀안전진단(1회/2년)을 실시하고 지적사항 발생 시 후속조치 후 결과를 안전관리실에 제출.

○ 참여 연구원의 안전관련 교육훈련 시행

- 연구실 안전환경조성에 관한 법률 제 18조에 의거, 전 직원에 대한 정기안전교육(1회/반기)을 실시함
- 교육 방법은 온라인 가상대학을 통하여 안전교육(6시간)을 실시하고, 수강 후 시험에 응시하여 10문제 중 6문제 이상 맞춰야 교육 이수로 인정함.

○ 연구 내용 및 결과물 안전 확보

유색미 유전자원 및 종자가 있는 곳은 시건장치 설치 및 경고 스티커 부착하고, 정기적으로 참여 연구원들을 대상으로 연구 결과의 안전한 관리를 위한 안전교육 실시

○ 연구실 안전 확보 계획

참여 연구원들이 안전관련 각종 법규, 규정 및 지침을 준수하도록 하며, 요구되는 안전교육 및 훈련 실시하며, 보호 장비 및 응급 키트 비치하였으며 인화성 물질 등은 격리된 곳에 보관한다.

또한 연구실 책임자 및 안전관리 담당자를 지정하여 실험실 안전을 점검한다.

제 2 절. LMO 연구시설 및 수입신고 현황

가. 주관기관: 동아대학교

시설번호	제LML08 - 246호	안전관리 등급	1등급
수입신고 (최근 1년간)		해당 없음	

제 8 장. 연구개발과제의 대표적 연구실적

코드번호	D-12

번호	구분(논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/특허등록국가	Impact Factor	논문게재일/특허출원일	사사여부(단독사사 또는 중복사사)	특기사항(SCI여부/인용횟수 등)
1	특허	흑설 추출물의 포함하는 피부 주름 개선용 화장료 원료	동아대학교산학협력단 및 대구한의대학교산학협력단		국제(PCT)		2018.05.01	단독	
2	논문	popolysaccharide로 유도된 RAW 264.7 세포에서 유색미 에탄올 추출물의 항염증 작용	대구한의대학교	교신저자	한국식품영양과학회지		2018.08.24	단독	비SCI
3	논문	UVB에 조사된 HaCAT Keratinocytes에서의 유색미에 의한 Matrix Metalloproteinases 발현 억제 메커니즘	대구한의대학교	교신저자	한국식품영양과학회지		2017.4.10	단독	비SCI
4	논문	Phylogenic Analysis of 246 Koresn Rice Varieties Using Core Sets of Microsatellite Markers	동아대	주저자	Philippine Journal of Crop Science	0.115	2017.04.03	중복	SCI

제 9 장. 참고문헌

Babu, B. K., Meena, V., Agarwal, V., & Agrawal, P. K. (2014). Population structure and genetic diversity analysis of Indian and exotic rice (Oryza sativa L.) accessions using SSR markers. *Molecular biology reports*, *41*(7), 4329-4339.

Brar, D. S. (2003). Utilization of wild species of genus Oryza in rice improvement. *Monograph on genus Oryza*, 283-309.

Choi, S. W., Kang, W. W., & Osawa, T. (1994). Isolation and identification of anthocyanin pigments in black rice. *Food Science and Biotechnology*, *3*(3), 131-136.

Chung, H. K. (2001). Changes in the Korean Food Culture with the Change of Life Style. *Korean Society of Food Science and Nutrition,*17-24.

Das, B., Sengupta, S., Parida, S. K., Roy, B., Ghosh, M., Prasad, M., & Ghose, T. K. (2013). Genetic diversity and population structure of rice landraces from Eastern and North Eastern States of India. *BMC genetics*, *14*(1), 71.

Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, *14*(8), 2611-2620.

Garris, A., Tai, T., Coburn, J., Kresovich, S., & McCouch, S. R. (2005). Genetic structure and diversity in Oryza sativa L. *Genetics*.

Jaccard P (1908). Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bull Soc Vaud Sci Nat 44: 223-270

Jarret, R. L., Merrick, L. C., Holms, T., Evans, J., & Aradhya, M. (1997). Simple sequence repeats in watermelon (Citrullus lanatus (Thunb.) Matsum. &Nakai). *Genome*, *40*(4), 433-441.

Jeung, J. U., Hwang, H. G., Moon, H. P., & Jena, K. K. (2005). Fingerprinting temperate japonica and tropical indica rice genotypes by comparative analysis of DNA markers. *Euphytica*, *146*(3), 239-251.

Khush, G. S. (1997). Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. *Plant molecular biology*, *35*(1-2), 25-34.

Kwon, Y. S., Park, E. K., Park, C. U., Bae, K. M., Yi, S. I., & Cho, I. H. (2006). Identification of rice variety using Simple Sequence Repeat (SSR) marker. *Journal of Life Science*, *16*(6), 1001-1005.

Kwon, S. J., Ahn, S. N., Hong, H. C., Hwang, H. G., & Choi, H. C. (2002). SSR diversity in Japonica rice cultivars and its association to several traits. *Korean J. Breed*, *34*(1), 57-63.

Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B., & Nei, M. (2001). MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*, *17*(12), 1244-1245.

Lee, J. H., Yeo, U. S., Cho, J. H., Lee, J. Y., Song, Y. C., Shin, M. S., ... & Sohn, J. K. (2011). Marker Assisted Selection of Brown Planthopper Resistance and Development of Multi-Resistance to Insect and Diseases in Rice (Oryza sativa L.). *Korean Journal of Breeding Science*, *43*(5).

Li, Y., Du, J., Wang, T., Shi, Y., Song, Y., & Jia, J. (2002). Genetic diversity and relationships among Chinese maize inbred lines revealed by SSR markers. *Maydica*, *47*(2), 93-101.

Lu, H., Redus, M. A., Coburn, J. R., Rutger, J. N., McCOUCH, S. R., & Tai, T. H. (2005). Population structure and breeding patterns of 145 US rice cultivars based on SSR marker analysis. *Crop Science*, *45*(1), 66-76.

McNally, K. L., Childs, K. L., Bohnert, R., Davidson, R. M., Zhao, K., Ulat, V. J., ... & Stokowski, R. (2009). Genomewide SNP variation reveals relationships among landraces and modern varieties of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(30), 12273-12278.

Morimitsu, Y., Kubota, K., Tashiro, T., Hashizume, E., Kamiya, T., & Osawa, T. (2002, November). Inhibitory effect of anthocyanins and colored rice on diabetic cataract formation in the rat lenses. In *International Congress Series* (Vol. 1245, pp. 503-508). Elsevier.

Monforte, A. J., Garcia-Mas, J., & Ar□s, P. (2003). Genetic variability in melon based on microsatellite variation. *Plant breeding*, *122*(2), 153-157.

Nachimuthu, V. V., Muthurajan, R., Duraialaguraja, S., Sivakami, R., Pandian, B. A., Ponniah, G., ... & Sabariappan, R. (2015). Analysis of population structure and genetic diversity in rice germplasm using SSR markers: an initiative towards association mapping of agronomic traits in Oryza sativa. *Rice*, *8*(1), 30.

Rohlf FJ (2000). NTSYSpc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, ver. 2.10b. Applied Biostatistics Inc., New York.

Saini, N., Jain, N., Jain, S., & Jain, R. K. (2004). Assessment of genetic diversity within and among Basmati and non-Basmati rice varieties using AFLP, ISSR and SSR markers. *Euphytica*, *140*(3), 133-146.

Second, G. (1982). Origin of the genic diversity of cultivated rice (Oryza spp.): study of the polymorphism scored at 40 isozyme loci. *The Japanese journal of genetics*, *57*(1), 25-57.

Singh, S. K., Sharma, S., Koutu, G. K., Mishra, D. K., Singh, P., Prakash, V., ... & Namita, P. (2014). Genetic diversity in NPT Lines derived from indica× japonica sub-species crosses of Rice (Oryza sativa L.) using SSR Markers. *Sch J Agric Sci*, *4*(3), 121-132.

Singh, N., Choudhury, D. R., Tiwari, G., Singh, A. K., Kumar, S., Srinivasan, K., ... & Singh, R. (2016). Genetic diversity trend in Indian rice varieties: an analysis using SSR markers. *BMC genetics*, *17*(1), 127.

Smith, J. S. C., Chin, E. C. L., Shu, H., Smith, O. S., Wall, S. J., Senior, M. L., ... & Ziegle, J. (1997). An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (Zea mays L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree. *Theoretical and Applied Genetics*, *95*(1-2), 163-173.

Song, M. T. (2002). Narrow genetic background of Korean rice germplasm as revealed by DNA fingerprinting with SSR markers and their pedigree information. *Korean J. Genetics*. *24*(4), 397-403.

Song, M. T., Jong, S. K., Lee, J. H., Cho, Y. S., Gul, J. H., Lee, S. B., ... & Hwang, H. G. (2003). Comparison of DNA-based and pedigree-based genetic similarity among Korean rice cultivars. *Korean J. Genetics. 48*(2), 74-75.

Song, Z. P., Xu, X., Wang, B., Chen, J. K., & Lu, B. R. (2003). Genetic diversity in the northernmost Oryza rufipogon populations estimated by SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, *107*(8), 1492-1499.

Surapaneni, M., Balakrishnan, D., Mesapogu, S., Raju, A. K., Rao, Y. V., & Neelamraju, S. (2016). Genetic characterization and population structure of Indian rice cultivars and wild genotypes using core set markers. *3 Biotech*, *6*(1), 95.

Surapaneni, M., Balakrishnan, D., Mesapogu, S., Raju, A. K., Rao, Y. V., & Neelamraju, S. (2016). Genetic characterization and population structure of Indian rice cultivars and wild genotypes using core set markers. *3 Biotech*, *6*(1), 95.

Thomson, M. J., Septiningsih, E. M., Suwardjo, F., Santoso, T. J., Silitonga, T. S., & McCouch, S. R. (2007). Genetic diversity analysis of traditional and improved Indonesian rice (Oryza sativa L.) germplasm using microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, *114*(3), 559-568.

UPOV (2010). UPOV/INF/17/1 Guideline for DNA-Profiling: Molecular Marker Selection and

Database Construction (“BMT Guideline”), Geneva.

Zhang, P., Li, J., Li, X., Liu, X., Zhao, X., & Lu, Y. (2011). Population structure and genetic diversity in a rice core collection (Oryza sativa L.) investigated with SSR markers. *PloS one*, *6*(12), e27565.

Nam SH, Chang SM, Kang MY. (2003). Varietal difference in antioxidative activity of ethanolic extracts from colored rice bran. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 46: 16-22.

Choi HC, Oh SK. (1996). Diversity and function of pigments in colored rice. *Korean J Corp Sci* 41: 1-9.

Choi SW, Kang WW, Osawa T. (1994). Isolation and identification of anthocyanin pigments in black rice. *Food Biotechnol* 3: 131-135.

Tsuda T, Watanabe M, Ohshima K, Norinobu S, Choi SW, Kawakishi S, Osawa T. (1994). Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O-β-D-glucoside and cyanidin. *J Agric Food Chem* 42: 2407-2411.

Nam SH, Kang MY. (1997). *In vitro* inhibitory effect of colored rice bran extracts carcinogenicity. *Agric Chem Biotechnol* 40: 307-312.

Choi SW, Nam SH, Choi HC. (1996). Antioxidative activity of ethanolic extracts of rice brans. *Food Biotechnol* 5: 305-309.

Choi SP, Kang MY, Nam SH. (2004). Inhibitory activity of the extracts from the pigmented rice brans on inflammatory reactions. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 47: 222-227.

Ryu SN, Park SZ, Kang SS. (2005). Studies on exploration and expansive use of genetic variation of functional substances rice. Report of Rural Development Administration, Suwon, Korea.

Park JY, Ham HM, Han SI, Oh SH, Song YC, Cho JH, Hur YJ, Lee YY, Lee BW, Choi YH. (2016). Comparison of antioxidant components and antioxidant activities of colored rice varieties cultivated in southern plain. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 45: 1214-1220.

Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126: 131-138.

Gross J, Lapiere CM. (1962). Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture

assay. *Proc Natl Acad Sci* 54: 1197-1204.

Li C, Wang MH. (2011). Antioxidant activity of peach blossom extracts. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 54: 46-53.

Pryor WA, Squadrito GL. (1995). The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 68: L699-L722.

Kawamata H, Ochiai H, Mantani N, Terasawa K. (2000). Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated RAW264.7 cells, a murine macrophage cell line. *Am J Chin Med* 28: 217-226.

Mori M. (2007). Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *J Nutr* 137: 1616S-1620S.

Tizard IR. (2004). V*eterinary immunology: an introduction*. 9th ed. WB Saunders Company, Philadelphia, PA, USA. p480.

Wiloughby DA. (1975). Heberden oration, (1974). Human arthritis applied to animal models. Towards a better therapy. *Ann Rheum Dis* 34: 471-478.

Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T. (1990). Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J Immunol* 144: 1425-1431.

Kim RG, Shin KM, Chun SK, Ji SY, Seo SH, Park HJ, Choi JW, Lee KT. (2002). *In vitro* antiinflammatory activity of the essential oil from *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* in murine macrophage Raw 264.7 cells. *Yakhak Hoeji* 46: 343-347.

Yun HJ, Heo SK, Yi HS, Kim CH, Kim BW, Park SD. (2008). Anti-inflammatory effect of injinho-tang in RAW264.7 cells. *Kor J Herbol* 23: 169-178.

Hume DA, Wells CA, Ravasi T. (2007). Transcriptional regulatory networks in macrophages. *Novartis Found Symp* 281: 2-18.

Nathan C. (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6: 3051-3064.

Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, Isakson PC, Seibert K. (1994). Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 *in vivo* is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 3228-3232.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.