



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0160646
(43) 공개일자 2023년11월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 8/9789 (2017.01) A61Q 19/00 (2006.01)

A61Q 19/02 (2006.01) A61Q 19/08 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 8/9789 (2017.08)

A61Q 19/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0060432

(22) 출원일자 2022년05월17일

심사청구일자 2022년05월17일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

오수진

제주특별자치도 서귀포시 안덕면 한창로 104

임승택

서울특별시 도봉구 해등로 32, 106동 303호

심민정

서울특별시 송파구 송파대로 345, 212동 1902호

(74) 대리인

정은열, 김태훈

전체 청구항 수 : 총 10 항

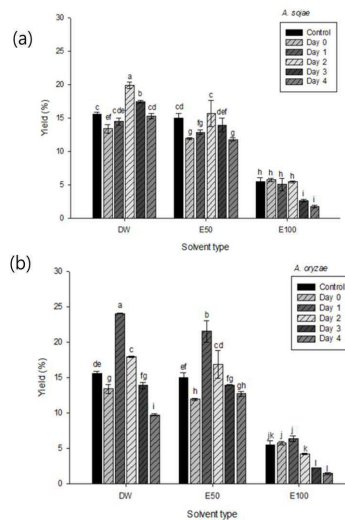
(54) 발명의 명칭 발효된 보리겨 추출물을 유효성분으로 함유하는 항산화, 피부 미백 및 주름 개선용 복합 기능성 화장료 조성물

(57) 요약

본 발명은 발효된 보리겨 추출물을 유효성분으로 함유하는 항산화, 피부 미백 및 주름 개선용 복합 기능성 화장료 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 발효된 보리겨 추출물을 이용하면 발효 및 추출 과정을 통해 보리겨의 총 페놀 함량, 항산화 능력, 피부 미백 및 주름 개선 능력이 현저하게 향상된 화장료 조성물을 제공할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61Q 19/02 (2013.01)

A61Q 19/08 (2013.01)

A61K 2800/522 (2013.01)

A61K 2800/85 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345341537
과제번호	2021R1A6A3A01086642
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	곰팡이 발효된 보늬를 이용한 미백 및 주름 개선 소재 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.09.01 ~ 2022.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

발효된 보리겨 추출물을 유효성분으로 포함하고,

상기 발효된 보리겨 추출물은 아스퍼질러스 속(*Aspergillus* spp.) 균주를 접종하여 발효된 후 추출된 것을 특징으로 하는 향산화, 피부 미백 및 주름 개선용 복합 기능성 화장품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 아스퍼질러스 속 균주는 *Aspergillus sojae* 또는 *Aspergillus oryzae*인 것을 특징으로 하는 향산화, 피부 미백 및 주름 개선용 복합 기능성 화장품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 발효는 1일 내지 4일 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 향산화, 피부 미백 및 주름 개선용 복합 기능성 화장품 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 발효된 보리겨 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 에틸아세테이트, 아세톤, 글리세린, 에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 및 부틸렌글리콜로 이루어진 군에서 선택된 적어도 어느 하나의 추출용매로 추출된 것을 특징으로 하는 향산화, 피부 미백 및 주름 개선용 복합 기능성 화장품 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 추출 용매는 물, 에탄올 또는 메탄올인 것을 특징으로 하는 향산화, 피부 미백 및 주름 개선용 복합 기능성 화장품 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 발효된 보리겨 추출물은 상기 물을 1차 추출용매로 추출된 1차 추출물을 상기 에탄올 또는 메탄올을 2차 추출용매로 추출된 2차 추출물인 것을 특징으로 하는 향산화, 피부 미백 및 주름 개선용 복합 기능성 화장품 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 발효된 보리겨 추출물은 상기 1차 추출물과 상기 2차 추출물의 혼합물인 것을 특징으로 하는 향산화, 피부 미백 및 주름 개선용 복합 기능성 화장품 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 에탄올 또는 메탄올의 농도는 30 내지 70%(v/v)인, 향산화, 피부 미백 및 주름 개선용 복합 기능성 화장품

조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 발효는 상기 보리겨 100 중량부에 대하여 상기 아스퍼질러스 속 균주 0.1 내지 20 중량부를 접종한 후, 15 내지 40℃에서 배양함으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 항산화, 피부 미백 및 주름 개선용 복합 기능성 화장료 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 조성물은 용액, 외용 연고, 크림, 폼, 영양 화장수, 유연 화장수, 팩, 유연수, 유액, 메이크업 베이스, 에센스, 비누, 액체 세정료, 입욕제, 선 스크린 크림, 선 오일, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 로션, 파우더, 비누, 계면 활성제 함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 패취 및 스프레이로 이루어지는 군에서 선택된 제형을 갖는 항산화, 피부 미백 및 주름 개선용 복합 기능성 화장료 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 발효된 보리겨 추출물을 유효성분으로 함유하는 항산화, 피부 미백 및 주름 개선용 복합 기능성 화장료 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 피부 노화는 크게 내적 요인에 의한 노화와 외적 요인에 의한 노화로 나눌 수 있으며 그 요인에 따라 피부의 구조적, 기능적 변화를 초래한다. 피부는 외부 환경에 항상 노출되어 있으므로 노화에 따른 피부 변화의 많은 부분이 자외선과 같은 외부의 영향을 받는다. 노화가 진행함에 따라 피부는 건조해지고 피부색이 어두워지며 탄력을 잃어 주름이 발생하게 된다.

[0003] 노화의 주된 원인 중 하나인 활성산소 (oxygen free radical)는 산소가 필요한 대사과정에서 불가피하게 발생한다. 활성산소는 매우 불안정한 상태로 존재하게 되므로 체내의 조직을 공격하여 세포를 산화시키고 손상시켜 노화를 유발한다.

[0004] 활성산소는 체내의 단백질을 산화시키거나 세포막의 지질을 산화시키게 되면서 인체 기능이 저하되고 DNA를 손상시켜 돌연변이나 암을 유발하는 원인이 될 수도 있다. 또한, 피부에 탄력을 주는 콜라겐 (collagen)과 피부 섬유질을 공격하여 피부 노화가 진행되어 피부가 처지고 늘어져 주름이 생기게 된다.

[0005] 체내에는 SOD (Superoxide Dismutase)처럼 과잉 활성 산소를 제거하는 방어 효소 시스템이 있는데 20대까지는 인체의 항산화 효소의 방어시스템이 활발하여 신체를 건강하게 지켜나가는데 무리가 없으나 이후 점차 나이가 들어감에 따라 급속히 항산화 효소의 기능이 약화되면서 인체는 활성산소에 더욱 쉽게 노출되며 노화의 진행이 가속화되므로, 안티에이징을 위해 활성산소의 적절한 제거가 필요하다.

[0006] 노화에 의해 나타나는 조직적인 변화로는 피부의 각 구조별로 차이가 있겠으나 일반적으로 표피의 두께가 얇아지고 표피와 진피의 경계부가 편평해지며 탄력섬유의 수도 감소하게 되어 주름이 생기게 된다.

[0007] 또한, 피부의 주름형성은 근본적으로 나이가 들거나 자외선의 영향으로 피부의 노화가 진행됨으로써 진피층의 콜라겐과 엘라스틴의 변화에 관련한다. 피부의 콜라겐 (collagen)과 엘라스틴 (Elastin)이 줄어들게 되면 피부의 탄력이 감소하게 되어 결국 주름이 형성되게 된다.

[0008] 인체에서의 멜라닌은 아민, 유리기, 금속이온 등과 같은 세포 독성 물질에 대한 보호 기능을 수행하지만 과잉 생산 시에는 기미, 주근깨 등의 색소 침착을 형성하고 피부노화를 촉진한다.

[0009] 멜라닌 (melanin)은 자연계에 널리 분포하는 페놀류의 고분자 물질로 검은 색소와 단백질의 복합체다. 멜라닌은 멜라노사이트 (melanocyte) 내에서 티로신(tyrosine)이라는 아미노산으로부터 출발하여 도파 (DOPA)가 생성되었다가, 다시 산화하여 도파퀴논 (DOPA-quinone)이 생성되는 단계에서 산화효소인 티로시나아제(tyrosinase)가 관여한다. 그 후 자동산화 반응을 거치면서 흑갈색의 멜라닌을 만들어낸다. 때문에 화이트닝 화장품은 티로시나아

제의 효소활성 저해를 통해 멜라닌 생성을 억제함으로써 화이트닝 효과를 기대할 수 있다.

[0010] 한편, 보리겨는 보리를 생산하는 과정 중 껍질을 벗기는 과정에서 생성되는 부산물을 말하는데, 종래에는 상기 보리겨를 활용하지 않고 대부분 버리거나 가축의 이들은 대부분 가축의 비료로 한정하여 사용하고 있었다. 그러나 최근 들어서는 보리겨를 비롯한 곡물의 부산물에 대한 다양한 기능성 연구를 통해 식품 및 화장품 산업에 이용하는 기술들이 개발중에 있으나, 아직까지 개발 수준은 미약한 실정이다.

[0011] 전술한 기술적 배경하에서 본 발명자들은 보리겨의 효능에 대해 연구하던 중, 특정 균주에 의해 발효된 보리겨 추출물이 항산화 효과, 피부 미백 및 주름개선 효과를 현저하게 향상시킬 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 발효된 보리겨 추출물을 유효성분으로 함유하는 항산화, 피부 미백 및 주름 개선용 복합 기능성 화장품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여, 발효된 보리겨 추출물을 유효성분으로 포함하고, 상기 발효된 보리겨 추출물은 아스퍼질러스 속(*Aspergillus* spp.) 균주를 접종하여 발효된 후 추출된 것을 특징으로 하는 항산화, 피부 미백 및 주름 개선용 복합 기능성 화장품 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명에 따르면, 상기 아스퍼질러스 속 균주는 *Aspergillus sojae* 또는 *Aspergillus oryzae*일 수 있다.

[0015] 본 발명에 따르면, 상기 발효는 1일 내지 4일 동안 수행될 수 있다.

[0016] 본 발명에 따르면, 상기 발효된 보리겨 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 에틸아세테이트, 아세톤, 글리세린, 에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 및 부틸렌글리콜로 이루어진 군에서 선택된 적어도 어느 하나의 추출용매로 추출된 것일 수 있다.

[0017] 본 발명에 따르면, 상기 추출 용매는 물, 에탄올 또는 메탄올일 수 있다.

[0018] 또한, 상기 발효된 보리겨 추출물은 상기 물을 1차 추출용매로 추출된 1차 추출물을 상기 에탄올 또는 메탄올을 2차 추출용매로 추출된 2차 추출물일 수 있다.

[0019] 또한, 상기 발효된 보리겨 추출물은 상기 1차 추출물과 상기 2차 추출물의 혼합물일 수 있다.

[0020] 또한, 상기 에탄올 또는 메탄올의 농도는 30 내지 70%(v/v)일 수 있다.

[0021] 본 발명에 따르면, 상기 발효는 상기 보리겨 100 중량부에 대하여 상기 아스퍼질러스 속 균주 0.1 내지 20 중량부를 접종한 후, 15 내지 40℃에서 배양함으로써 수행될 수 있다.

[0022] 본 발명에 따르면, 상기 조성물은 용액, 외용 연고, 크림, 폼, 영양 화장수, 유연 화장수, 팩, 유연수, 유액, 메이크업 베이스, 에센스, 비누, 액체 세정료, 입욕제, 선 스크린 크림, 선 오일, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 로션, 파우더, 비누, 계면 활성제 함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 패취 및 스프레이로 이루어지는 군에서 선택된 제형을 가질 수 있다.

발명의 효과

[0023] 본 발명에 따른 발효된 보리겨 추출물을 이용하면 발효 및 추출 과정을 통해 보리겨의 총 페놀 함량, 항산화 능력, 피부 미백 및 주름 개선 능력이 현저하게 향상된 화장품 조성물을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 발효된 보리겨 추출물(증류수 추출물: DW, 50% 에탄올 추출물: E50, 100% 에탄올 추출물: E100)의 발효 기간에 따른 추출 수율을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 2는 본 발명의 실시예에 따른 발효된 보리겨 추출물(증류수 추출물: DW, 50% 에탄올 추출물: E50, 100% 에탄올 추출물: E100)의 발효 기간에 따른 총 페놀 함량 변화를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 3은 본 발명의 실시예에 따른 발효된 보리겨 추출물(증류수 추출물: DW, 50% 에탄올 추출물: E50, 100% 에탄올 추출물: E100)의 발효 기간에 따른 DPPH 라디칼 소거 활성 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 본 발명의 실시예에 따른 발효된 보리겨 추출물(증류수 추출물: DW, 50% 에탄올 추출물: E50, 100% 에탄올 추출물: E100)의 발효 기간에 따른 미백 활성 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명의 실시예에 따른 발효된 보리겨 추출물(증류수 추출물: DW, 50% 에탄올 추출물: E50, 100% 에탄올 추출물: E100)의 발효 기간에 따른 주름 개선 효과 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

도 6은 본 발명의 실시예에 따른 발효된 보리겨 추출물의 추출 방법 및 추출물의 혼합에 따른 미백 활성 및 주름 개선 효과 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0027] 본 발명은 발효된 보리겨 추출물을 유효성분으로 포함하고, 상기 발효된 보리겨 추출물은 아스퍼질러스 속(*Aspergillus* spp.) 균주를 접종하여 발효된 후 추출된 것을 특징으로 하는 항산화, 피부 미백 및 주름 개선용 복합 기능성 화장품 조성물을 제공한다.
- [0028] 이때, 상기 아스퍼질러스 속 균주는 *Aspergillus sojae* 또는 *Aspergillus oryzae*인 것이 바람직하고, 하기 실시예의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, 상기 균주를 이용하여 발효 과정을 수행함으로써, 발효된 보리겨 추출물의 총 페놀 함량, DPPH 라디칼 소거능(DPPH radical scavenging activity, DPPH), 항산화 활성, 티로시나아제 활성 저해능 및 엘라스타아제 활성 저해능 등을 현저하게 향상시킬 수 있다.
- [0029] 또한, 상기 발효는 고체 발효, 액체 발효 또는 이의 혼합으로 수행할 수 있으며, 바람직하게는 고체 발효 방법으로 수행할 수 있다.
- [0030] 또한, 상기 발효는 1 내지 4일 동안 수행하는 것이 바람직하다. 하기 실시예의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이 발효 기간이 상기 기간 미만이면 총 페놀 함량, DPPH 라디칼 소거능(DPPH radical scavenging activity, DPPH), 항산화 활성, 티로시나아제 활성 저해능 및 엘라스타아제 활성 저해능 향상 효과가 미미하며, 상기 기간을 초과하면 더 이상 진술한 효과들이 향상되지 않는다는 문제가 있다.
- [0031] 또한, 상기 발효된 보리겨 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 에틸아세테이트, 아세톤, 글리세린, 에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 및 부틸렌글리콜로 이루어진 군에서 선택된 적어도 어느 하나의 추출용매로 추출하여 제조될 수 있고, 물, 탄소수 1 내지 4의 무수알코올 또는 함수알코올, 및 이들의 혼합물 중에서 선택된 용매로 추출되는 것이 더욱 바람직하다. 이때, 상기 탄소수 1 내지 4의 알코올은 메탄올, 에탄올, n-프로판올, iso-프로판올, n-부탄올, tert-부탄올 등이 있다. 이들 추출용매 중 물(또는 증류수), 에탄올 또는 메탄올이 가장 바람직하며, 상기 에탄올 또는 메탄올의 농도는 30 내지 70%(v/v)인 것이 바람직하다.
- [0032] 또한, 상기 발효된 보리겨 추출물은 상기 물을 1차 추출용매로 추출된 1차 추출물을 상기 에탄올 또는 메탄올을 2차 추출용매로 추출된 2차 추출물일 수 있다.
- [0033] 또한, 상기 발효된 보리겨 추출물은 상기 1차 추출물과 상기 2차 추출물의 혼합물일 수 있다. 하기 실시예의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, 물(증류수)를 추출용매로 한 1차 추출물은 수용성 성분인 페놀산이 다량으로 추출되어 항산화 및 미백 개선 효과가 향상될 수 있으며, 상기 1차 추출물에 대하여 에탄올 또는 메탄올을 추출용매로 한 2차 추출물은 지용성 성분인 파이토스테롤이 다량으로 추출되어 주름 개선 효과가 향상될 있다. 또한, 하기 실시예의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, 상기 1차 추출물과 상기 2차 추출물의 혼합물은 수용성 및 지용성 성분이 모두 다량으로 포함될 수 있는바, 상기 1차 및 2차 추출물 단독 대비 항산화, 미백, 주름 개선 효과가 현저하게 향상될 수 있다.
- [0034] 또한, 상기 발효는 상기 보리겨 100 중량부에 대하여 상기 아스퍼질러스 속 균주 0.1 내지 20 중량부를 접종한 후, 15 내지 40℃에서 배양함으로써 수행하는 것이 바람직하다.
- [0035] 또한, 본 발명의 조성물에서 상기 발효된 보리겨 추출물은 화장품 조성물의 총 중량에 대하여 분말형태 또는 액

상형태로 0.01 내지 50 중량% 함유될 수 있으며, 바람직하게는 화장료 조성물 총 중량에 대하여 분말형태 또는 액상형태로 0.1 내지 10 중량% 함유될 수 있다.

[0036] 본 발명의 화장료 조성물은 용액, 외용 연고, 크림, 폼, 영양 화장수, 유연 화장수, 팩, 유연수, 유액, 메이크업 베이스, 에센스, 비누, 액체 세정료, 입욕제, 선 스크린 크림, 선 오일, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 로션, 파우더, 비누, 계면 활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 패취 및 스프레이로 이루어진 군에서 선택되는 제형으로 제조할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 본 발명의 상기 화장료 조성물은 일반 피부 화장료에 배합되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 추가로 포함할 수 있으며, 통상의 성분으로 예를 들면 유분, 물, 계면 활성제, 보습제, 저급 알코올, 증점제, 킬레이트제, 색소, 방부제, 향료 등을 적절히 배합할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0038] 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체는 화장료 조성물의 제형에 따라 다양하다.

[0039] 본 발명의 제형이 연고, 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는, 담체 성분으로서 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화 아연 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0040] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는, 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록사이드, 칼슘 실케이트, 폴리아미드 파우더 등이 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로하드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진제를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0041] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는, 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제 등이 이용될 수 있으며, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일 등이 이용될 수 있고, 특히, 목화씨 오일, 땅콩 오일, 옥수수 배종 오일, 올리브 오일, 피마자 오일 및 참깨 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0042] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는, 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타하이드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0043] 본 발명의 제형이 비누인 경우에는, 담체 성분으로서 지방산의 알칼리 금속염, 지방산 헤미에스테르 염, 지방산 단백질 히드롤리제이트, 이세티오네이트, 라놀린 유도체, 지방족 알코올, 식물성 유, 글리세롤, 당 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0045] [실시예]

[0046] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0048] 실시예 1. 발효된 보리겨 추출물의 제조

[0049] 발효에 사용된 곰팡이 균주인 *Aspergillus sojae* ATCC 9362와 *Aspergillus oryzae* ATCC 96684는 KCCM(서울, 한국)에서 구입하였다. 각 균주를 PDA (Potato Dextrose Agar; Difco, Sparks, MD, USA) 플레이트에 놓고 30℃에서 14일 동안 배양하였다. PDA 플레이트에 0.01% 트윈 80 용액을 붓고 멸균 처리한 스프레더를 사용하여 포자를 긁어내어 수집하였다. 이후 포자 현탁액을 여과하고 0.8% 식염수로 세척하였다. 포자 수는 hemocytometer를 사

용하여 계산하고 30% 글리세롤로 희석하여 10^6 CFU/mL의 최종 농도로 만들었다.

[0050] 고체 발효를 하기 위해 보리겨(10.0g)를 1:1(w/v) 비율의 물(10.0mL)과 혼합하고 오토클레이브 (121℃에서 15분)를 사용하여 멸균하였다. 그런 다음, 보리겨를 펠트리 접시로 옮기고 각각 1%(100 μ L) *Aspergillus spp.* (*A. sojae*, *A. oryzae*)의 포자 현탁액을 접종하고 혼합물을 0, 1, 2, 3, 4일 동안 30℃에서 고체 상태로 발효시켰다. 대조군으로는 일반 보리겨를 사용하였다. 샘플을 -80℃에서 보관한 뒤 오펜 동결 건조기 (경기도, 대한민국)를 이용하여 동결 건조하여 블렌더로 분말 형태로 분쇄하였다.

[0051] 상기 배양 균주 및 배양 기간별로 수집된 발효 보리겨 각각을 1:10(w/v)의 비율로 세가지 다른 추출 용매(증류수, 50% 에탄올, 100% 에탄올)를 이용하여 45℃에서 24시간 동안 진탕 추출하였다. 추출된 분산액을 3500 rpm에서 15분 동안 원심 분리 및 여과하였다. 추출 단계를 2회 반복하였으며, 상층액을 수집하고 감압농축기 (Eyela, N-1100, Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Tokyo, Japan)로 농축시켜 고체 발효 보리겨 추출물을 제조하였다.

[0053] 실험예 1. 추출 수율 측정

[0054] 발효 보리겨 추출물의 수율은 하기 [식 1]에 따라 계산하였다.

[0055] [식 1]

$$[0056] \text{수율} = \frac{A}{B} \times 100$$

[0057] A = 상층액의 건조 뒤 무게 (g)

[0058] B = 보리 겨 건조 뒤 무게 (g)

[0060] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 발효된 보리겨 추출물(증류수 추출물: DW, 50% 에탄올 추출물: E50, 100% 에탄올 추출물: E100)의 발효 기간에 따른 추출 수율을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[0061] 도 1에 나타난 바와 같이, *A. sojae*로 발효시킨 보리 겨(SFBB)의 모든 샘플에서 추출 수율(w/w, 건조 중량 기준)은 발효 2일째에 가장 높았으며 이후 발효에 의해 고형분 함량이 감소하였다. 또한, 대조군의 수율이 15.59%인 것에 비해 발효 2 일째 DW 추출물의 수율은 19.92%로 가장 높았다. 또한, *A. oryzae* 로 발효시킨 보리 겨(OFBB)로 추출한 샘플의 추출 수율은 발효 1일째에 가장 높았으며, 이후 발효에 의해 고형분 함량이 감소하였다. 발효 1일째 DW 추출물의 수율이 가장 높았으며 그 수치는 24.05%였다. 두번째 추출 수율이 높은 용매는 E50으로 그 수율은 21.53%였다. 결과적으로 추출 효율면에서 용매의 경향성은 두 균주간에 일치했지만 절대적인 수치는 다르며, 두 균주 모두 DW 추출물과 E50 추출물은 유사하게 높은 추출 효율을 보인 반면 E100 추출물은 매우 낮은 효율을 나타내는 것으로 확인되었다.

[0063] 실험예 2. 총 페놀 함량(Total phenolic content, TPC 측정)

[0064] 상기 실시예 1에 따라 제조된 발효 보리겨 추출물의 총 페놀 함량 (TPC)은 Folin-Ciocalteu 방법을 사용하였다. 구체적으로 발효 보리겨 추출물(0.1 mL)을 증류수(9.9 mL)로 희석하고, 희석된 샘플 (50.0 μ L)을 96-well plate에서 1N Folin-Ciocalteu 시약 (25.0 μ L)과 혼합하였다. 1분 후 12.5%(w/v) 탄산나트륨 (125.0 μ L)을 넣고 40분 동안 어두운 곳에 보관하였다. 그 후, BioMate 3S UV-Spectrometer로 750 m에서 혼합물의 흡광도를 측정하고, Gallic acid를 표준 물질로 사용하여 TPC를 계산하고, 그 결과를 하기 도 2에 나타내었다.

[0065] 도 2는 본 발명의 실시예에 따른 발효된 보리겨 추출물(증류수 추출물: DW, 50% 에탄올 추출물: E50, 100% 에탄올 추출물: E100)의 발효 기간에 따른 총 페놀 함량 변화를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[0066] 도 2의 결과를 통해, 두 균주에 의한 발효된 보리겨 추출물은 모두 일반 보리겨보다 더 많은 총 페놀 함량을 나타내는 것을 확인하였다.

[0067] 구체적으로, *A. sojae*로 발효시킨 보리 겨(SFBB)의 경우 총 페놀산 함량은 DW로 추출 시 발효 2, 3, 4일차에 각각 6.1, 6.6, 6.2 mg/g으로 발효 전(2.2 mg/g) 대비 현저하게 향상되는 것을 확인하였고, E50으로 추출 시에도 발효 2, 3, 4일차에 각각 3.2, 3.8, 3.7 mg/g으로 발효 전(2.0 mg/g) 대비 현저하게 향상되는 것을 확인한 반

면, E100으로 추출시에는 총 페놀산 함량이 발효전과 유사하거나 오히려 감소되는 것을 확인하였다. 또한, *A. oryzae*로 발효시킨 보리 겨(OFBB)의 경우, DW로 추출 시 발효 2, 3, 4일차에 각각 6.3, 5.8, 4.9 mg/g으로 발효 전 대비 현저하게 향상되는 것을 확인하였고, E50으로 추출 시에도 발효 2, 3, 4일차에 각각 3.8, 4.4, 4.0 mg/g으로 발효 전 대비 현저하게 향상되는 것을 확인한 반면, E100으로 추출시에는 총 페놀산 함량이 발효전 대비 증가하는 경향을 보이거나 절대량은 적은 것을 확인할 수 있었다

[0069] 실험예 3. 항산화 활성 측정

[0070] 상기 실시예 1에 따라 제조된 발효 보리겨 추출물의 항산화 활성을 DPPH 라디칼 소거 활성 (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DDPH) radical scavenging activity) 측정을 통해 관찰하였다. 구체적으로, 추출물(0.1 mL)을 에틸 알코올 (9.9 mL)로 희석한 후, 0.2mM DPPH 용액을 희석된 샘플(1.0mL)과 혼합하고 실온에서 30분 동안 어두운 곳에서 반응시켰다. 정확한 측정을 위해 혼합물을 0.2 μm 시린지 필터로 여과하고 BioMate 3S UV - Spectrometer를 사용하여 517nm에서 흡광도를 측정하였으며, Trolox를 표준물질로 사용하였다.

[0071] 도 3은 본 발명의 실시예에 따른 발효된 보리겨 추출물(증류수 추출물: DW, 50% 에탄올 추출물: E50, 100% 에탄올 추출물: E100)의 발효 기간에 따른 DPPH 라디칼 소거 활성 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

[0072] 도 3을 통해, *A. sojae*로 발효시킨 보리 겨(SFBB)의 경우 DW로 추출 시 발효 전 기간 동안 DPPH 라디칼 소거 활성이 발효 전 대비 향상되는 경향을 보이며 특히 발효 2, 3, 4일차에 각각 208.5, 205.6, 198.5 ug/g으로 발효 전(95.6 ug/g) 대비 현저하게 향상되는 것을 확인하였고, *A. oryzae*로 발효시킨 보리 겨(OFBB) 또한, DW로 추출 시 발효 전 기간 동안 DPPH 라디칼 소거 활성이 발효 전 대비 향상되는 경향을 보이며 특히 발효 1, 2, 3, 4일차에 각각 200.8, 208.5, 209.0, 202.6 ug/g으로 발효 전 대비 현저하게 향상되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, E50으로 추출 시에는 SFBB, OFBB 모두 발효 기간에 관계없이 DPPH 라디칼 소거 활성이 가장 높은 수준을 유지하는 것을 확인한 반면, E100으로 추출 시에는 SFBB, OFBB 모두 증류수 또는 E50으로 추출한 경우 대비 DPPH 라디칼 소거 활성이 낮은 것을 확인하였다.

[0074] 실험예 4. 미백 활성 측정

[0075] 상기 실시예 1에 따라 제조된 발효된 보리겨 추출물의 미백 활성은 피부 색소 침착을 유발하는 멜라닌 중합체 생합성 주요 단계에 관여하는 티로시나제의 저해 활성 측정을 통해 평가하였다.

[0076] 구체적으로 10mM L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)을 기질로 사용하고 Tyrosinase (200.0 U/mL)를 효소로 사용하였다. 기질, 효소 및 발효된 보리겨 추출물 샘플을 0.1 M 인산 칼륨 버퍼(pH 6.8)에 희석하였다. 이후 40.0 μL 샘플, 40.0 μL 효소 및 80.0 μL 버퍼를 96-well plate에 넣고 25℃에서 10분간 배양하였다. 이후, 40.0 μL의 기질을 넣고 25℃에서 5분간 배양하였으며, BioMate 3S UV-분광계로 475nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로 Kojic acid를 사용하였다. 티로시나제 저해 활성(%)은 하기 [식 2]에 따라 계산하였으며, 그 결과를 하기 도 4에 나타내었다.

[0077] [식 2]

[0078] 티로시나제 저해 활성 (%) = $\frac{((A-B)-(C-D))/(A-B)}{1} \times 100$

[0079] A = 티로시나제가 포함된 공시료

[0080] B = 티로시나제가 포함되지 않은 공시료

[0081] C = 티로시나제가 포함된 시료

[0082] D = 티로시나제가 포함되지 않은 시료

[0084] 도 4는 본 발명의 실시예에 따른 발효된 보리겨 추출물(증류수 추출물: DW, 50% 에탄올 추출물: E50, 100% 에탄올 추출물: E100)의 발효 기간에 따른 미백 활성 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

[0085] 도 4를 통해, SFBB, OFBB 모두 DW로 추출시 발효 2일차 부터 발효 전 대비 티로시나제 저해 활성이 현저하게 향상되는 경향을 보였으며, 구체적으로 SFBB는 발효 2, 3, 4일 차에 각각 20.2, 31.2, 34.6%로 발효 전(17.9%)

대비 현저하게 향상되는 것을 확인하였고, OFBB 또한, 발효 2, 3, 4일 차에 각각 29.7, 39.0, 28.6%로 발효 전 대비 현저하게 향상되는 것을 확인하였다. 또한, E50 또는 E100으로 추출시에는 SFBB, OFBB 모두 티로시나제 저해 활성이 대조군과 유사하거나 대부분 낮은 수치를 보이는 것을 확인하였다.

[0087] 실험예 5. 주름 개선 활성 측정

[0088] 상기 실시예 1에 따라 제조된 발효 보리겨 추출물의 주름 개선 활성을 엘라스타아제 저해 활성 (Elastase inhibition activity) 측정을 통해 관찰하였다. 구체적으로, 5mM N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide (SANA)를 기질로 사용하고 엘라스타아제 (1.1U/mL)를 효소로 사용했다. 기질, 효소 및 발효된 보리겨 추출물 샘플을 0.2 M Tris-HCl 버퍼(pH 8.0)에 희석하였다. 이후, 샘플 30.0 μL, 효소 10.0 μL, 버퍼 100.0 μL를 96-well plate에 넣고 25℃에서 20분간 배양하였다. 이후, 40.0 μL의 기질을 넣고 25℃에서 10분간 배양하였다. BioMate 3S UV-분광계로 410 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 양성 대조군으로 Oleic acid를 사용하였다. 엘라스타아제 저해 활성(%)은 하기 [식 3]에 따라 계산하였으며, 그 결과를 하기 도 5에 나타내었다.

[0089] [식 3]

[0090] 엘라스타아제 저해 활성 (%) = $\frac{((A-B)-(C-D))}{(A-B)} \times 100$

[0091] A = 엘라스타아제가 포함된 공시험

[0092] B = 엘라스타아제가 포함되지 않은 공시험

[0093] C = 엘라스타아제가 포함된 시험

[0094] D = 엘라스타아제가 포함되지 않은 시험

[0096] 도 5는 본 발명의 실시예에 따른 발효된 보리겨 추출물(증류수 추출물: DW, 50% 에탄올 추출물: E50, 100% 에탄올 추출물: E100)의 발효 기간에 따른 주름 개선 효과 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

[0097] 도 5를 통해, SFBB, OFBB 모두 DW로 추출시 발효 전 기간 동안 엘라스타아제 저해 활성이 향상되는 경향을 보였으며, 특히 SFBB의 경우 발효 1, 2, 3, 4일 차에 각각 4.2, 8.3, 13.6, 14.3%로 발효 전(2.8%) 대비 현저하게 향상되는 것을 확인하였고, OFBB 또한, 발효 1, 2, 3, 4일 차에 각각 3.7, 11.5, 7.5, 4.4, 6.6%로 발효 전 대비 현저하게 향상되는 것을 확인하였다. 또한, E50 또는 E100으로 추출시에는 SFBB, OFBB 모두 발효 기간에 관계없이 엘라스타아제 저해 활성이 높은 수준을 유지하는 것을 확인하였다.

[0099] 실험예 6. 페놀산 성분 분석

[0100] 상기 실시예 1에 따라 제조된 발효 보리겨 추출물의 페놀산 조성을 분석하기 위해 액체 크로마토그래피를 사용하여 성분 분석을 진행하였다. 분석을 용이하게하기 위해 샘플을 전처리했다. 추출된 샘플은 감압농축기를 사용하여 용매를 증발시킨 후 10.0mL HCl (pH 1.0)로 산성화시켰다. 그 후, 에틸 아세테이트(1:2, v/v)로 30분 동안 5회 분획하였다. 이 과정은 유리된 페놀산을 에틸 아세테이트 층으로 옮겨 깨끗한 피크를 얻기 위함이다. 총 100.0 mL의 에틸 아세테이트 층을 모아 45℃에서 감압농축하였다. 그런 다음 샘플을 메탄올 (2.0 mL)에 재용해하고 0.20 μm PTFE 주사기 필터를 통해 여과시켰다. 분석을 위해 HPLC (UltiMate 3000 HPLC, Thermo Scientific, MA, USA)를 사용하였으며, HPLC는 VWD-3100 detector, LPG-3400SD pump, WPS-3000SL autosampler 및 YMC-Pack Pro C18 RS (250 × 4.6 mm ID, 5 μm, YMC) 역상 컬럼으로. 표준 물질로는 Caffeic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, sinapic acid, gallic acid, hydroxybenzoic acid, protocatechuic acid, ellagic acid등 8개의 페놀산을 사용하였다.

[0101] 이동상 A 용매의 경우, 1.0 mL/min의 유속에서 0.02% TFA in DW (v/v) 및 0.02% TFA in methanol (v/v)을 이동상 용매 B로 사용하였다. 용매 구배 (A : B 비율)는 다음과 같다 : 0-30분, 10:90; 30-45분, 15:85; 45-60분, 25:75; 60-65분, 50:50; 65-75분, 75:25; 75-90분, 90:10. 컬럼 오븐 온도는 40 ℃, 주입량은 30.0 μL로 설정했다. UV 스펙트럼은 hydroxybenzoic acid (gallic acid, ellagic acid, benzoic acid, protocatechuic acid)와 hydroxycinnamic acid (caffeic acid, coumaric acid, ferulic acid, sinapic acid)를 각각 분석하기 위해 280nm와 325nm로 설정되었다.

[0102]

상기 실시예 1에 따라 제조된 발효 보리겨 추출물의 용매 종류 및 발효 시간에 따른 유리 페놀산의 변화에 대한 HPLC 분석 결과는 하기 표 1(발효 균주: *Aspergillus sojae*) 및 표 2(발효 균주: *Aspergillus oryzae*)에 나타내었다.

표 1

Extraction Solvents	Fermentation time	Phenolic acids** (mg/100g dried barley bran)								
		CFA	p-COA	FA	SNA	GLA	PCA	4-HBA	ELA	Total
Distilled water	Control***	ND****	ND	1.2 ± 0.1 ^k	1.2 ± 0.0 ^{fg}	ND	ND	3.4 ± 0.1 ^{bcd}	ND	5.9 ± 0.2 ^a
	Day0	ND	0.3 ± 0.6 ^{ab}	3.1 ± 0.8 ^h	1.2 ± 0.0 ^f	1.6 ± 1.4 ^{bc}	1.1 ± 2.0 ^f	2.1 ± 1.8 ^{cd}	ND	9.5 ± 2.4 ^{de}
	Day1	0.7 ± 1.2 ^{bc}	0.8 ± 0.7 ^{ab}	5.2 ± 0.1 ^a	1.5 ± 0.6 ^{defg}	0.6 ± 1.1 ^f	ND	2.1 ± 1.8 ^{cd}	ND	10.3 ± 1.5 ^{de}
	Day2	3.1 ± 2.6 ^a	1.7 ± 1.5 ^a	49.3 ± 2.4 ⁱ	3.3 ± 0.3 ^a	4.3 ± 1.1 ^a	ND	3.5 ± 3.0 ^{bcd}	1.5 ± 1.3 ^a	63.7 ± 8.5 ^a
	Day3	2.3 ± 2.0 ^{ab}	1.3 ± 1.2 ^{ab}	42.0 ± 6.0 ^f	3.7 ± 0.3 ^a	2.8 ± 2.5 ^{ab}	0.9 ± 1.7 ^a	7.7 ± 4.0 ^a	0.8 ± 1.4 ^a	59.3 ± 6.5 ^a
	Day4	1.3 ± 1.1 ^{bc}	0.8 ± 0.7 ^{ab}	22.2 ± 4.2 ^{fg}	2.6 ± 0.4 ^b	2.3 ± 2.0 ^{bc}	ND	6.3 ± 3.7 ^{ab}	0.8 ± 1.4 ^a	35.1 ± 9.2 ^b
50% ethanol	Control	ND	1.0 ± 0.0 ^{ab}	9.9 ± 0.6 ^{gh}	1.5 ± 0.0 ^{fg}	ND	ND	3.5 ± 0.0 ^{bcd}	ND	15.9 ± 0.6 ^{cd}
	Day0	ND	0.7 ± 0.6 ^{ab}	3.5 ± 0.3 ^h	1.3 ± 0.0 ^{fg}	ND	ND	3.3 ± 0.1 ^{bcd}	ND	8.7 ± 0.8 ^{de}
	Day1	ND	0.7 ± 0.6 ^{ab}	5.0 ± 0.5 ^{ghi}	1.6 ± 0.5 ^{defg}	ND	ND	3.3 ± 0.1 ^{bcd}	ND	10.6 ± 0.5 ^{de}
	Day2	ND	0.8 ± 0.7 ^{ab}	21.2 ± 3.0 ^{de}	2.2 ± 0.2 ^{bcde}	1.2 ± 2.0 ^{bc}	1.0 ± 1.7 ^a	3.3 ± 1.0 ^{bcd}	0.8 ± 1.3 ^a	30.4 ± 7.0 ^b
	Day3	2.1 ± 0.7 ^{ab}	0.8 ± 0.7 ^{ab}	18.4 ± 1.4 ^d	2.6 ± 0.1 ^{bc}	1.1 ± 2.0 ^{bc}	ND	5.4 ± 1.7 ^{bc}	0.7 ± 1.3 ^a	29.0 ± 1.3 ^b
	Day4	ND	0.7 ± 0.6 ^{ab}	9.5 ± 0.5 ^{hi}	2.4 ± 0.4 ^{bc}	ND	ND	4.6 ± 0.9 ^{abcd}	0.7 ± 1.3 ^a	17.8 ± 0.7 ^c
95% ethanol	Control	ND	1.0 ± 1.0 ^{ab}	6.0 ± 2.5 ^{ij}	1.8 ± 0.5 ^{defg}	ND	ND	3.2 ± 0.1 ^{bcd}	ND	12.0 ± 1.4 ^{de}
	Day0	ND	1.0 ± 1.0 ^{ab}	3.4 ± 0.4 ^h	2.0 ± 0.7 ^{bcdef}	ND	ND	2.0 ± 1.8 ^{cd}	ND	8.4 ± 0.5 ^{de}
	Day1	ND	0.7 ± 1.1 ^{ab}	4.2 ± 0.3 ^{hi}	2.0 ± 0.8 ^{bcdef}	ND	ND	2.1 ± 1.9 ^{cd}	ND	9.0 ± 2.6 ^{de}
	Day2	ND	0.6 ± 1.1 ^{ab}	5.5 ± 0.1 ^{ef}	2.0 ± 0.3 ^{bcdef}	ND	ND	3.5 ± 0.3 ^{cd}	ND	11.6 ± 1.5 ^{de}
	Day3	ND	0.7 ± 1.3 ^{ab}	7.0 ± 0.4 ^a	2.3 ± 0.5 ^{bcd}	ND	ND	2.4 ± 2.1 ^{cd}	ND	12.5 ± 3.0 ^{de}
	Day4	ND	ND	4.9 ± 0.2 ^{ij}	2.0 ± 0.3 ^{bcdef}	ND	ND	1.2 ± 2.0 ^d	ND	8.4 ± 2.7 ^{de}

*Data expressed as mean ± standard deviation (n=3), and different alphabets indicate statistical significance among data (p<0.05). **CFA, Caffeic acid; p-COA, p-coumaric acid; FA, ferulic acid; SNA, sinapic acid; GLA, gallic acid; PCA, Protocatechuic acid; 4-HBA, 4-hydroxybenzoic acid; ELA, Ellagic acid. ***Control, native barley bran without any treatment. ****ND, Not detected.

[0103]

표 2

Extraction Solvents	Fermentation time**	Phenolic acids*** (mg/100g dried barley bran)								
		CFA	p-COA	FA	SNA	GLA	PCA	4-HBA	ELA	Total
Distilled water	Control	ND****	ND	1.2 ± 0.1 ^k	1.2 ± 0.3 ^f	ND	ND	3.4 ± 0.1 ^{bc}	ND	5.9 ± 0.2 ^d
	Day0	ND	0.3 ± 0.6 ^b	3.1 ± 0.8 ^h	1.2 ± 0.0 ^f	1.6 ± 1.4	1.1 ± 2.0 ^f	2.1 ± 1.8 ^c	ND	9.5 ± 2.4 ^{de}
	Day1	0.7 ± 1.1 ^{bc}	2.0 ± 0.2 ^a	39.6 ± 5.6 ^a	1.4 ± 0.0 ^{gh}	3.3 ± 3.2 ^b	ND	2.2 ± 1.9 ^c	ND	49.2 ± 5.2 ^a
	Day2	3.1 ± 2.6 ^a	2.0 ± 0.2 ^a	32.5 ± 2.8 ^b	3.4 ± 0.2 ^{ab}	2.3 ± 4.1 ^b	2.6 ± 2.3 ^{bc}	7.4 ± 5.2 ^a	2.0 ± 1.8 ^{ab}	55.3 ± 7.7 ^a
	Day3	2.3 ± 2.0 ^{ab}	1.5 ± 0.0 ^{ab}	24.6 ± 1.1 ^c	3.7 ± 0.2 ^a	6.4 ± 1.0 ^a	3.5 ± 0.1 ^{abc}	5.3 ± 0.1 ^{ab}	2.4 ± 0.2 ^{ab}	49.7 ± 3.0 ^a
	Day4	1.3 ± 1.1 ^{bc}	0.8 ± 0.7 ^{ab}	10.7 ± 1.1 ^g	3.2 ± 0.2 ^{abc}	3.0 ± 3.1 ^b	1.4 ± 2.4 ^c	2.3 ± 2.0 ^{abc}	1.9 ± 1.7 ^{ab}	26.0 ± 5.4 ^d
50% ethanol	Control	ND	1.0 ± 0.0 ^{ab}	9.9 ± 0.6 ^{gh}	1.5 ± 0.0 ^{fg}	ND	ND	3.5 ± 0.0 ^{bc}	ND	15.9 ± 0.6 ^{cd}
	Day0	ND	0.7 ± 0.6 ^{ab}	3.5 ± 0.3 ^h	1.35 ± 0.0 ^{ef}	ND	ND	3.3 ± 0.1 ^{bc}	ND	8.7 ± 0.8 ^{de}
	Day1	ND	1.2 ± 0.0 ^{ab}	8.2 ± 0.2 ^{ghi}	1.3 ± 0.0 ^{fg}	ND	ND	3.5 ± 0.1 ^{bc}	ND	14.2 ± 0.3 ^{cd}
	Day2	ND	1.0 ± 0.1 ^{ab}	32.5 ± 2.8 ^{ab}	2.4 ± 0.0 ^{ab}	2.1 ± 2.0 ^b	5.5 ± 0.2 ^a	4.6 ± 0.1 ^{abc}	2.3 ± 0.0 ^{ab}	33.1 ± 3.4 ^c
	Day3	2.1 ± 0.7 ^{ab}	1.1 ± 0.0 ^{ab}	17.6 ± 1.0 ^d	3.0 ± 0.2 ^{abcd}	2.8 ± 0.1 ^b	5.2 ± 0.3 ^{ab}	5.0 ± 0.3 ^{abc}	2.5 ± 0.0 ^a	39.2 ± 1.6 ^b
	Day4	ND	1.0 ± 0.0 ^{ab}	7.4 ± 0.2 ^{hi}	2.8 ± 0.1 ^{bcd}	1.5 ± 1.3 ^b	3.5 ± 3.1 ^{abc}	4.8 ± 0.1 ^{abc}	2.7 ± 0.0 ^a	23.6 ± 4.4 ^d
95% ethanol	Control	ND	1.0 ± 1.0 ^{ab}	6.0 ± 2.5 ^{ij}	1.8 ± 0.5 ^{defg}	ND	ND	3.2 ± 0.1 ^{bcd}	ND	12.0 ± 1.4 ^{de}
	Day0	ND	1.0 ± 1.0 ^{ab}	3.4 ± 0.4 ^h	2.0 ± 0.7 ^{bcf}	ND	ND	2.0 ± 1.8 ^{cd}	ND	8.4 ± 0.5 ^{de}
	Day1	ND	1.1 ± 1.0 ^{ab}	7.0 ± 0.3 ^{hi}	1.9 ± 0.7 ^{ef}	ND	ND	3.3 ± 0.2 ^{bc}	ND	13.3 ± 1.6 ^{de}
	Day2	ND	0.7 ± 1.2 ^{ab}	12.6 ± 0.7 ^{ef}	2.4 ± 0.6 ^{ab}	ND	3.2 ± 2.8 ^{abc}	3.8 ± 0.7 ^{bc}	0.9 ± 1.5 ^b	23.6 ± 3.0 ^d
	Day3	ND	1.1 ± 1.1 ^{ab}	14.2 ± 1.1 ^a	2.7 ± 0.7 ^{cd}	ND	2.9 ± 2.5 ^{abc}	3.9 ± 0.1 ^{bc}	1.6 ± 1.4 ^{ab}	26.4 ± 4.7 ^d
	Day4	ND	0.6 ± 1.1 ^b	5.8 ± 0.4 ^{ij}	2.4 ± 0.6 ^{ab}	ND	1.4 ± 2.4 ^c	2.3 ± 2.0 ^{bc}	1.6 ± 1.4 ^{ab}	14.2 ± 5.2 ^{de}

*Data expressed as mean ± standard deviation (n=3), and different alphabets indicate statistical significance among data (p<0.05). **CFA, Caffeic acid; p-COA, p-coumaric acid; FA, ferulic acid; SNA, sinapic acid; GLA, gallic acid; PCA, Protocatechuic acid; 4-HBA, 4-hydroxybenzoic acid; ELA, Ellagic acid. ***Control, native barley bran without any treatment. ****ND, Not detected.

[0105]

[0107]

상기 표 1, 표 2에 나타낸 바와 같이, Caffeic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, sinapic acid, gallic acid, protocatechuic acid, hydroxybenzoic acid, ellagic acid 등 8개의 페놀산 함량을 측정하였다. 측정 결과, SFBB 샘플의 경우 총 페놀산은 DW 및 E50 추출물에서는 발효 2일째 추출물, E100 추출물에서 발효 3일째 추출물이 가장 높은 페놀산의 가장 많은 양을 차지하는 ferulic acid의 경향성과 일치하였다. 항산화 및 미백

기능성이 있는 것으로 알려진 ferulic acid는 DW 추출물에서 대조군(3.1mg/100g)에 비해 2일차(49.3mg/100g)에 비해 15.8배 증가하였으며, E50 추출물의 경우 6.1배, E100 추출물은 2.1배 증가한 것으로 나타났다. 이러한 경향성은 SFBB뿐만 아니라 OFBB에서도 관찰되었다. Ferulic acid는 DW, E50 및 E100 추출물에서 천연 보리 겨에 비해 각각 12.7, 9.4 및 4.2 배 증가하였다. Coumaric acid와 sinapic acid의 양도 발효 기간에 따라 달라졌는데, AFBF 샘플에서 coumaric acid는 대조군에서 검출되지 않았지만 발효에 의해 유리되었으며 2일째에 최고점에 도달하였다(1.7mg/100g). Sinapic acid의 양은 0일차(1.2mg/100g)에서 증가했으며 2일(3.3mg/100g)과 3일(3.7mg/100g)에 최고점에 도달하였다. Caffeic acid, cinnamic acid, protocatechuic acid, ellagic acid등의 hydroxycinnamic acid 또한, 발효에 의해 새로 생성되거나 증가하는 경향을 나타내었다. 이 경향성은 AOFB 샘플과도 일치했다. Coumaric acid는 대조군에서 검출되지 않았고 발효에 의해 생성되었으며 3일에 가장 높았다(2.0mg/100g). Sinapic acid도 대조군(1.2mg/100g)에서 2일(3.7mg/100g)로 증가했다. 이는 발효 기간에 의존적인 페놀 산 성분이 균류의 세포벽 분해 효소에 의해 유리 형태의 페놀 산이 증가하고 균류 자체에서 페놀산이 소비되어 감소하기 때문이다. 페놀산은 우수한 항산화 능력으로 미생물의 생존에 필수적이다. 이는 발효에 의해 증가된 ferulic acid가 에탄올이 아닌 물에서 대부분 추출됨을 보여준다. 일반적으로 페놀산 자체는 물보다 에탄올에 더 잘 용해되는 것으로 알려져있다. 그러나 실험 결과에 따르면 항산화 활성뿐만 아니라 TPC, tyrosinase 저해 활성, HPLC 분석 모두 추출 용매로 물(증류수)을 이용할 경우 그 활성이 높았다. 에탄올 추출물에선 ferulic acid를 제외한 페놀산 성분들이 거의 추출되지 않았다. 또한 발효에 의한 증가량도 물이나 E50 추출물에 비해선 매우 적었다. 이는 보리 겨 내부의 대부분의 페놀산 성분들이 bind된 상태로 존재하며 PS의 matrix 내부에 숨겨져 있는데, fungi 발효를 통해서 어느 정도 끊어지기는 하나, 완전히 free state로는 만들 수 없으며 matrix외부로 드러나게 할 수 있음을 의미하며, 이를 통해, 겉으로 드러나게 된 phenolic acid는 항산화나 미백 등의 효과를 나타낼 수는 있으나 항주름 효과는 나타내기 어려움을 실험 결과를 통해 확인할 수 있었다.

[0109] 실험예 7. 파이토스테롤 함량 분석

[0110] 파이토스테롤(Phytosterol) 분석시료는 산 가수분해 및 비누화로 전처리 한 후 비검화물을 추출하였다. 발효된 보리겨 추출물 샘플 1g을 용매로 3시간 동안 추출한 다음 건조하였다. 내부 표준 (IS) 용액 4mL (에탄올 1mL 중 20 μ g)를 건조 시료에 넣고 재용해하였다. 10mL의 HCl (6M)을 첨가하고 산 가수 분해를 위해 80℃에서 가열하였다. 냉각 후, 헥산과 디에틸에테르 (1:1, v/v)를 포함하는 28mL의 용매 혼합물을 10분 동안 혼합하였다. 혼합 후 샘플을 3500g에서 15분 동안 원심 분리하여 2개의 상으로 분리하였다. 상층액은 둥근 바닥 플라스크에 모아 졌고 모든 용매는 45℃의 회전식 진공 증발기에서 증발시켰다. 비누화를 위해, 에탄올 (3%, w/v) 중 5mL의 피로 갈를을 건조 샘플에 첨가하고 완전히 용해될 때까지 적절히 흔들었다. 15mL의 포화 수산화칼륨 용액을 첨가하고 완전히 용해된 샘플을 유리관으로 옮겼다. 튜브를 80℃에서 30분 동안 가열하고 2분마다 격렬하게 흔들었다.

[0111] TMS (Trimethylsilyl) 에테르 유도체를 만들기 위해 400 μ L의 실릴화 시약 (BSTFA / TMCS, 99:1)과 800 μ L의 무수 피리딘을 시료에 넣고 60℃에서 30분간 가열하여 실릴화시켰다. 실릴화 시약을 50℃에서 증발시키고 헥산 600 μ L를 재용해한 후 가스크로마토그래피 바이알로 옮겨 분석 하였다.

[0112] 파이토스테롤의 TMS-에테르는 FID와 결합 된 Shimadzu-2010을 사용하여 비극성 컬럼 (HP-5, Agilent Technologies, Santa Clara, CA)이 있는 split GC로 분석되었습니다. 질소는 1.08mL / min의 유속, 22:1의 split ratio로 1 μ L의 주입량으로 캐리어 가스로 사용되었다. 컬럼 오븐의 온도는 초기에 245℃로 설정되었고, 5℃/min 으로 300℃까지 증가하고 18분 동안 유지되었다. 디텍터와 인젝터 온도는 각각 315℃와 310℃였다. 표준 물질로 β -sitosterol, stigmasterol, campesterol를 사용하여 식물성 스테롤을 확인하였다.

[0113] 상기 실시예 1에 따라 제조된 발효 보리겨 추출물의 용매 종류 및 발효 시간에 따른 파이토스테롤의 함량 변화에 대한 분석 결과는 하기 표 3(발효 균주: *Aspergillus sojae*) 및 표 4(발효 균주: *Aspergillus oryzae*)에 나타내었다.

표 3

Extraction Solvents	Fermentation time	Phytosterol (mg/100 g dried barley bran)			
		Campesterol	Stigmasterol	β -sitosterol	Total
Distilled water	Control**	26.2 $\pm$ 14.2 ^d	33.0 $\pm$ 17.7 ^d	38.3 $\pm$ 11.3 ⁱ	97.4 $\pm$ 27.8 ^{ab}
	Day0	0.3 $\pm$ 0.5 ^d	2.2 $\pm$ 1.56 ^a	65.6 $\pm$ 7.4 ^{hi}	68.2 $\pm$ 8.5 ^{ab}
	Day1	5.2 $\pm$ 5.2 ^d	6.0 $\pm$ 8.4 ^{da}	64.5 $\pm$ 18.3 ^{hi}	75.6 $\pm$ 31.7 ^{ab}
	Day2	6.6 $\pm$ 1.2 ^d	11.5 $\pm$ 5.6 ^{da}	96.5 $\pm$ 9.7 ^{hi}	114.5 $\pm$ 12.4 ^{af}
	Day3	ND***	ND	37.6 $\pm$ 16.2 ⁱ	37.6 $\pm$ 16.2 ^b
	Day4	ND	24.2 $\pm$ 14.6 ^{da}	70.8 $\pm$ 12.6 ^{hi}	95.0 $\pm$ 27.2 ^{fab}
50% ethanol	Control	10.7 $\pm$ 4.1 ^d	25.4 $\pm$ 10.0 ^{da}	78.2 $\pm$ 4.3 ^{hi}	114.4 $\pm$ 13.9 ^{af}
	Day0	3.4 $\pm$ 1.6 ^d	10.2 $\pm$ 2.7 ^{da}	85.4 $\pm$ 6.8 ^{hi}	99.0 $\pm$ 8.4 ^{fab}
	Day1	1.7 $\pm$ 2.4 ^d	11.5 $\pm$ 8.2 ^{da}	67.8 $\pm$ 16.0 ^{hi}	81.0 $\pm$ 24.0 ^{fab}
	Day2	19.1 $\pm$ 10.9 ^d	20.7 $\pm$ 10.1 ^{da}	140.0 $\pm$ 23.8 ^a	179.8 $\pm$ 44.7 ^a
	Day3	12.3 $\pm$ 4.3 ^d	17.7 $\pm$ 7.9 ^{da}	110.2 $\pm$ 8.6 ^{hi}	140.1 $\pm$ 1.6 ^{af}
	Day4	15.7 $\pm$ 1.9 ^d	18.9 $\pm$ 9.3 ^{da}	115.5 $\pm$ 29.2 ^{af}	150.1 $\pm$ 23.4 ^{af}
95% ethanol	Control	128.6 $\pm$ 4.2 ^{bc}	81.2 $\pm$ 7.1 ^c	335.3 $\pm$ 5.2 ^d	545.1 $\pm$ 15.8 ^{cd}
	Day0	109.6 $\pm$ 9.4 ^c	68.0 $\pm$ 13.5 ^c	321.3 $\pm$ 13.4 ^d	498.9 $\pm$ 35.4 ^d
	Day1	113.2 $\pm$ 29.0 ^c	80.1 $\pm$ 10.3 ^c	373.7 $\pm$ 7.3 ^c	567.0 $\pm$ 33.9 ^c
	Day2	162.9 $\pm$ 19.7 ^b	111.1 $\pm$ 23.7 ^b	412.8 $\pm$ 23.6 ^b	686.8 $\pm$ 65.0 ^b
	Day3	164.8 $\pm$ 23.1 ^b	113.5 $\pm$ 11.8 ^b	410.5 $\pm$ 16.7 ^b	688.7 $\pm$ 3.6 ^b
	Day4	388.7 $\pm$ 55.1 ^a	172.2 $\pm$ 28.6 ^a	639.7 $\pm$ 76.6 ^a	1,200.7 $\pm$ 62.4 ^a

*Data expressed as mean $\pm$ standard deviation (n=3), and different alphabets indicate statistical significance among data ($P<0.05$).
 ** Control, native barley bran without any treatment. *** ND, Not detected.

[0114]

표 4

Extraction Solvents	Fermentation time	Phytosterol (mg/100g dried barley bran)			
		Campesterol	Stigmasterol	β -sitosterol	Total
Distilled water	Control**	26.2 $\pm$ 14.2 ^a	33.0 $\pm$ 17.7 ^{da}	38.3 $\pm$ 11.3 ^{af}	97.4 $\pm$ 27.8 ^a
	Day0	0.3 $\pm$ 0.5 ^a	2.2 $\pm$ 1.6 ^{da}	65.6 $\pm$ 7.4 ^{af}	68.2 $\pm$ 8.5 ^a
	Day1	14.3 $\pm$ 10.1 ^a	ND	94.0 $\pm$ 17.4 ^a	108.3 $\pm$ 27.0 ^a
	Day2	ND***	ND	34.5 $\pm$ 19.4 ^{af}	34.5 $\pm$ 19.4 ^a
	Day3	6.2 $\pm$ 3.0 ^a	4.2 $\pm$ 2.1 ^{da}	93.3 $\pm$ 33.0 ^a	103.8 $\pm$ 37.2 ^a
	Day4	4.0 $\pm$ 5.7 ^a	4.0 $\pm$ 5.6 ^{da}	62.8 $\pm$ 13.8 ^{af}	70.7 $\pm$ 25.1 ^a
50% ethanol	Control	10.7 $\pm$ 4.1 ^a	25.4 $\pm$ 10.0 ^{da}	78.2 $\pm$ 4.3 ^{af}	113.4 $\pm$ 13.9 ^a
	Day0	3.4 $\pm$ 1.6 ^a	10.2 $\pm$ 2.7 ^{da}	85.4 $\pm$ 6.8 ^{af}	99.0 $\pm$ 8.4 ^a
	Day1	0.2 $\pm$ 0.3 ^a	3.1 $\pm$ 2.4 ^{da}	68.8 $\pm$ 11.5 ^{af}	72.1 $\pm$ 13.9 ^a
	Day2	ND	ND	ND	ND
	Day3	2.0 $\pm$ 2.9 ^a	0.7 $\pm$ 0.5 ^a	83.9 $\pm$ 11.2 ^{af}	86.6 $\pm$ 10.8 ^a
	Day4	5.4 $\pm$ 7.6 ^a	10.7 $\pm$ 9.1 ^{da}	79.9 $\pm$ 21.4 ^{af}	96.1 $\pm$ 37.5 ^a
95% ethanol	Control	128.6 $\pm$ 4.2 ^d	81.2 $\pm$ 7.1 ^{cd}	335.3 $\pm$ 5.2 ^d	545.1 $\pm$ 15.8 ^d
	Day0	109.6 $\pm$ 9.4 ^d	68.0 $\pm$ 13.5 ^{cd}	321.3 $\pm$ 13.4 ^d	498.9 $\pm$ 35.4 ^d
	Day1	563.1 $\pm$ 25.4 ^a	301.6 $\pm$ 129.4 ^a	842.6 $\pm$ 91.4 ^a	1,707.3 $\pm$ 160.5 ^a
	Day2	400.5 $\pm$ 54.1 ^c	130.6 $\pm$ 15.6 ^c	634.0 $\pm$ 48.4 ^c	1,165.1 $\pm$ 106.0 ^c
	Day3	441.6 $\pm$ 28.3 ^b	220.5 $\pm$ 21.8 ^b	673.8 $\pm$ 51.1 ^c	1,335.8 $\pm$ 93.8 ^b
	Day4	402.3 $\pm$ 27.9 ^c	239.3 $\pm$ 44.1 ^{ab}	773.8 $\pm$ 38.8 ^b	1,414.9 $\pm$ 38.9 ^b

*Data expressed as mean $\pm$ standard deviation (n=3), and different alphabets indicate statistical significance among data ($P<0.05$).
 ** Control, native barley bran without any treatment. *** ND, Not detected.

[0115]

[0117]

에탄올 추출시 엘라스타제 저해 활성을 증가시킨 물질을 알아내기 위해 보리겨 내에 존재하는 파이토스테롤을 분석한 결과 총 파이토스테롤 함량은 DW와 E50의 경우 2일 차에 최고점(114.51, 179.75mg/100g), E100의 경

우엔 4일차(1137.76mg/100g)에 최고점을 나타냈으며 지용성 물질인 스테롤은 다른 용매보다 E100에서 매우 높은 수치를 보였다(표 3). 베타-시토스테롤은 대표적인 항산화 물질뿐만 아니라 Elastase 억제능이 있는 것으로 알려져있다. 또한 보리겨 내에 존재하는 파이토스테롤은 에스테르 결합되어 있는 상태로 존재한다. 하지만 DPPH 결과 스테롤에 의한 항산화 작용은 다른 유효 성분들에 비해 극히 미미하다. 이는 발효 과정에 의해 파이토스테롤 성분은 유리되지만 그 함량과 효과가 다른 페놀산 계열 성분들에 비해 낮다는 것을 의미한다. 또한 다당류(PS)와 결합되어 에탄올 추출시 침전되는 페놀산 계열과는 달리 스테롤 성분들은 발효에 의해 PS와의 결합을 완전히 끊어내어 유리된 상태로 존재하고 있음을 알 수 있다. 또한 페놀산 성분들은 엘라스타제 저해 활성이 있는 것으로 알려져있다. 하지만 본 실험에선 E100 추출물, 즉 PS에 결합된 페놀산들이 가장 적은 추출물이 엘라스타제 저해 활성이 가장 높게 나타난 것으로 보아, 엘라스타제 저해 활성을 나타내기 위해선 유효 물질들이 어딘가에 결합되어있는 상태가 아니라 완전히 유리된 형태여야 가능함을 알 수 있다.

[0118] OFBB의 GC sterol 분석 결과를 살펴보면 다른 결과들과 마찬가지로 용매별로 경향성이 완전히 일치하지 않았다. 물 추출과 E50 추출의 경우엔 발효에 의한 파이토스테롤 증가를 관찰할 수 없었지만 E100추출의 경우엔 발효 전(545.13mg/100g) 보다 1일차(1649.85mg/100g)에 가장 높은 파이토스테롤 함량을 관찰할 수 있었다. 이는 보리겨 내에 존재하는 유효 성분들이 다당류들과 밀접한 연관이 있음을 더욱 뒷받침해준다.

[0120] 실험예 8. 추출 용매 및 추출물의 혼합에 따른 미백, 주름 개선 활성 측정

[0121] 먼저, 상기 실시예 1 중 증류수를 추출 용매로 발효 2일차에 추출된 보리겨 추출물을 대상으로 에탄올을 2차 추출 용매로 추출된 발효된 보리겨의 2차 추출물을 제조하였다. 구체적으로, 아스퍼질러스 속 균주(*A. sojae*, *A. oryzae*)로 2일 동안 발효된 보리겨를 1:10 (w/v)의 비율로 증류수로 추출하고, 100 rpm, 45℃에서 24 시간 동안 진탕시켰다. 샘플을 3500 rpm에서 15 분 동안 원심 분리하고 여과하였다. 추출 단계를 1회 반복하였다.

[0122] 다음으로, 상기 1차 추출된 발효된 보리겨 추출물을 1:10 (w/v)의 비율로 50% 에탄올로 추출하고, 100 rpm, 45℃에서 24시간 동안 진탕시켰다. 샘플을 3500 rpm에서 15분 동안 원심 분리하고 여과하였다. 추출 단계를 1회 반복하였다. 상등액을 수집하고 증발시켜 농축시킴으로써, 증류수로 1차 추출후 에탄올로 2차 추출된 발효된 보리겨 추출물을 제조하였다.

[0123] 다음으로, 증류수 1차 추출물과, 증류수 1차 추출 후 에탄올로 2차 추출한 2차 추출물 및 상기 1차 추출물과 2차 추출물을 1:1의 비율로 혼합한 혼합 추출물에 대하여 미백 및 주름 개선 활성을 측정하였으며, 그 결과를 하기 도 6에 나타내었다.

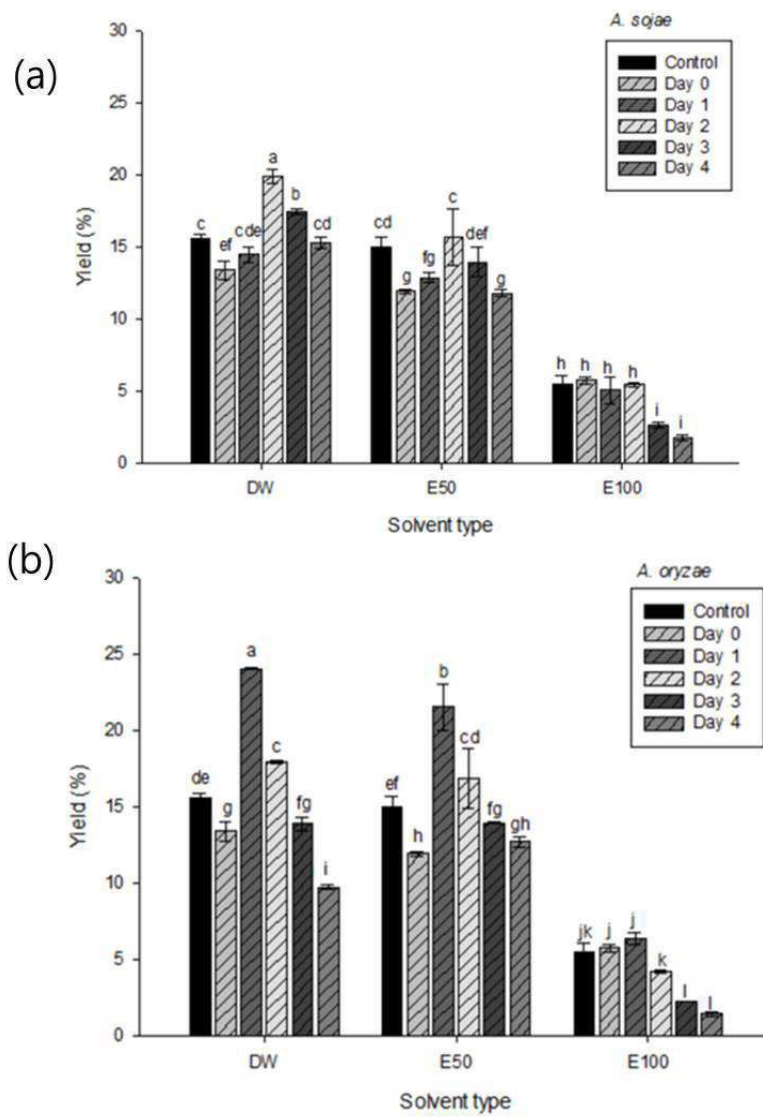
[0124] 도 6에 나타난 바와 같이, *A. sojae*로 발효된 보리겨(SFBB)의 1차 증류수(DW) 추출물의 경우, 미백과 주름 개선 활성이 18.3, 20.5%였으며, E50으로 2차 추출한 2차 추출물의 경우 8.6, 16.3%로 측정된 반면, 상기 1차 추출물과 2차 추출물의 혼합 추출물의 경우 26.9, 36.7%으로 미백과 주름 개선 활성이 현저하게 향상되는 것을 확인하였다. *A. oryzae*로 발효된 보리겨(OFBB) 추출물 또한, DW 추출물의 경우 18.3, 20.5%였으며, E50으로 2차 추출한 2차 추출물의 경우 10.4, 17.9%로 측정된 반면, 상기 1차 추출물과 2차 추출물의 혼합 추출물의 경우 28.7, 38.4%으로 미백과 주름 개선 활성이 현저하게 향상되는 것을 확인하였다.

[0125] 이러한 결과를 통해, 항산화, 미백에 도움이 되는 수용성 성분인 페놀산이 다량으로 함유된 발효 보리겨의 1차 DW 추출물과, 주름 개선에 도움이 되는 지용성 성분인 파이토스테롤이 다량으로 함유된 발효 보리겨의 2차 E50 추출물을 혼합할 경우, DW 또는 E50 단독 추출물 대비 미백과 주름 개선 활성이 더욱 향상될 수 있음을 확인하였다.

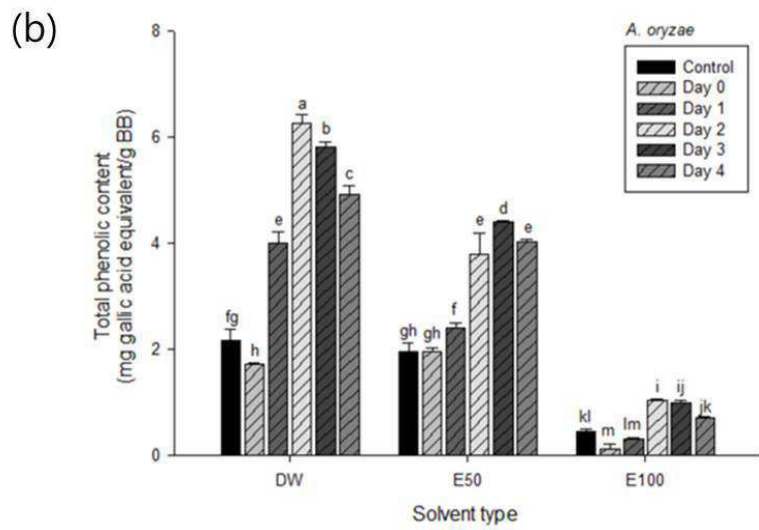
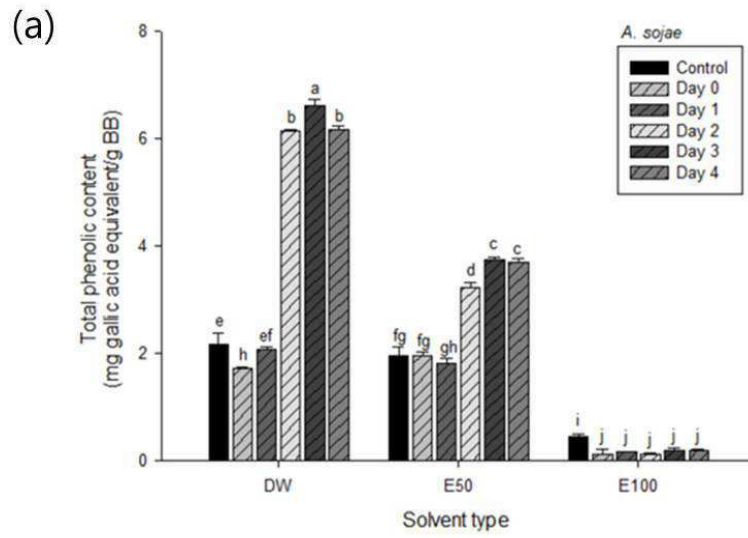
[0127] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시형태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

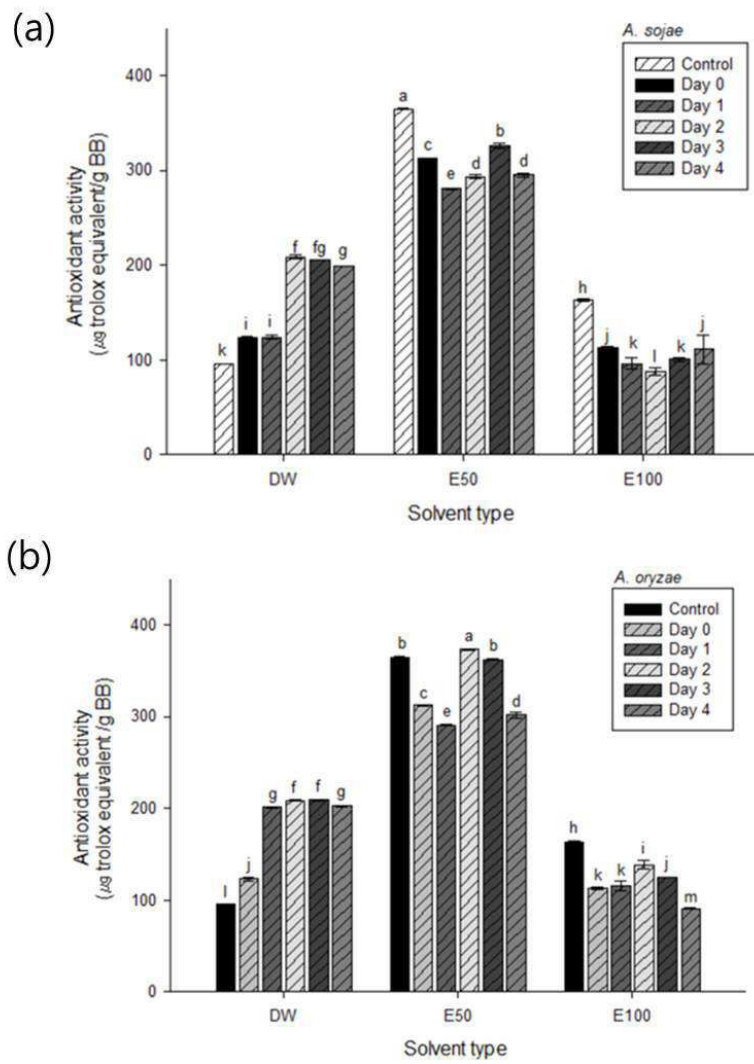
도면1



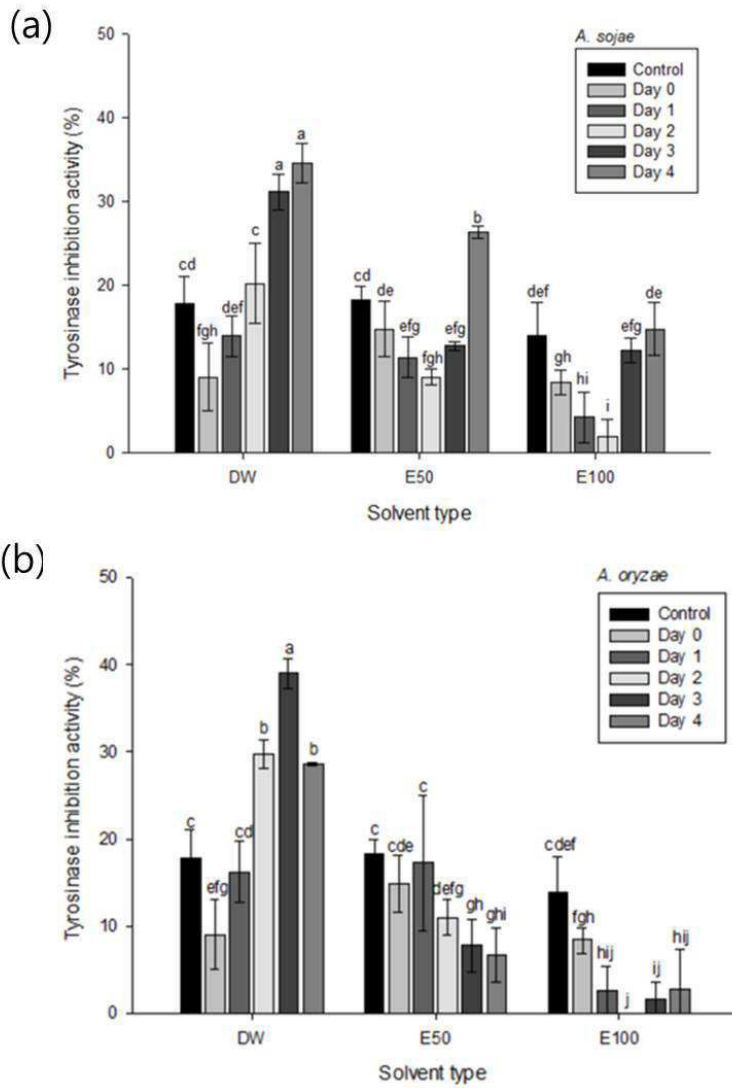
도면2



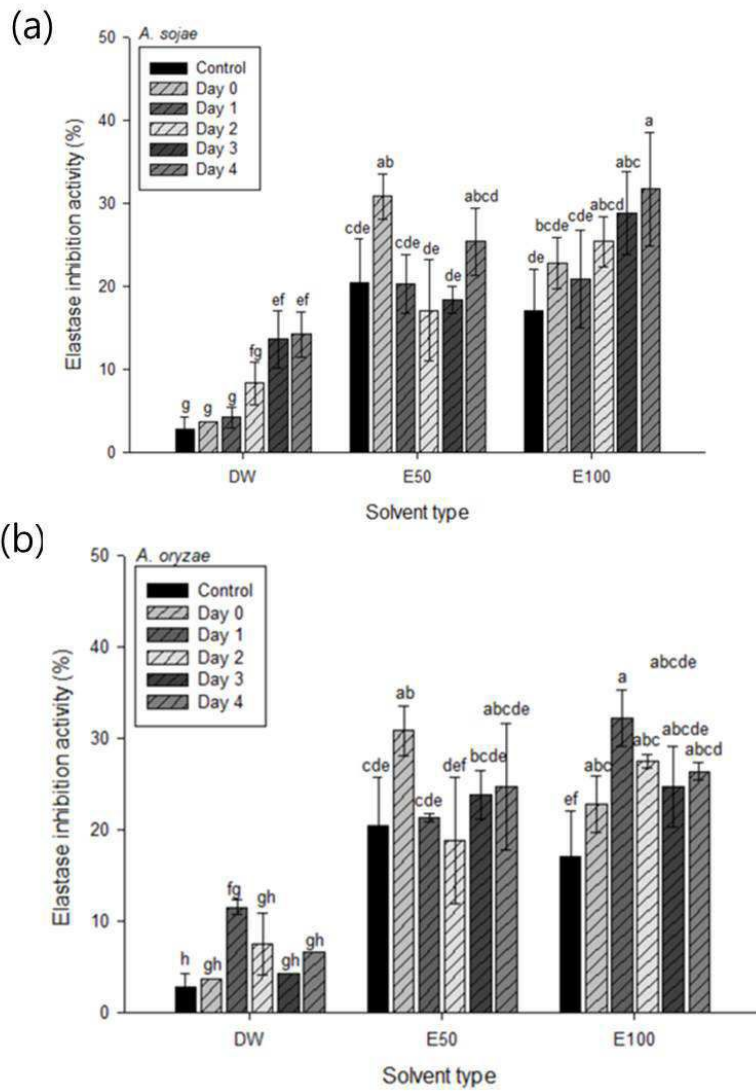
도면3



도면4



도면5



도면6

