

IP12
2023

연자육을 활용한 피로 개선과
혈행 개선을 위한 식품원료용
기능성 소재 개발

2024

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
고부가가치 식품기술개발산업(R&D) 2023년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004614-01

연자육을 활용한 피로 개선과 혈행 개선을 위한 식품원료용 기능성 소재 개발

2024. 06. 12

주관연구기관 / (주)신우코퍼레이션
공동연구기관 / 대구한의대학교 산학협력단

농림축산식품부
(농림식품기술기획평가원)

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “연자육을 활용한 피로 개선과 혈행 개선을 위한 식품원료용 기능성 소재 개발”(개발기간 : 2022.04.01.~ 2023.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

납본일자 2024.06.12.

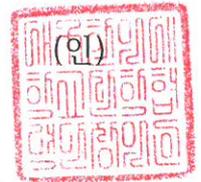
주관연구기관명 : (주)신우코퍼레이션

(박신재)



공동연구기관명 : 대구한의대학교 산학협력단

(황세진)



주관연구책임자 : 정동민



공동연구책임자 : 최학주



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

공동연구개발기관						공동연구개발기관	대학(4년 이상)
연구개발과제 실무담당자	성명	국가 연구자번호	직위	직장전화	휴대전화	전자우편	

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2024.02.29

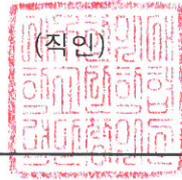
연구책임자: 정 동 민



주관연구개발기관의 장: 박 신 재



공동연구개발기관의 장: 황 세 진



중앙행정기관의 장 귀하

< 요약 문 >

사업명	고부가가치 식품기술개발(R&D)			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
내역사업명 (해당 시 작성)	미래대응식품 기술개발			연구개발과제번호		RS-2022-1P122023	
기술분류	국가과학기술표준분류	1순위 바이오식품	50%	2순위 기능성 바이오 소재	30%	3순위 식품가공학	20%
기술분류	농림식품과학기술분류	1순위 식품가공·공정	100%		%		%
기술분류	6T관련기술코드	1순위 기타 농업·해양·환경 응용기술	100%		%		%
기술분류	녹색기술분류코드	1순위 녹색기술관련 과제 아님	100%		%		%
기술분류	국가과학기술표준분류_적용분야분류	1순위 건강	100%		%		%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명		연자육을 활용한 피로 개선과 혈행 개선을 위한 식품원료용 기능성 소재 개발					
전체 연구개발기간		2022-04-01 ~ 2023-12-31 (21개월)					
총 연구개발비		총 291,250 천원 (정부지원연구개발비: 233,000천원, 기관부담연구개발비 : 58,250천원, 지방자치단체: 0천원, 그 외 지원금: 0천원)					
연구개발단계		기초 <input type="checkbox"/> 응용 <input type="checkbox"/> 개발 <input type="checkbox"/>			기술성숙도 (해당 시 작성)		착수시점 기준 <input type="checkbox"/>
		기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우) <input type="checkbox"/>					종료시점 목표 <input type="checkbox"/>
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)		연구개발과제성격: [연구관리]					
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)		기술료 징수 구분: [징수]					
연구개발 목표 및 내용		최종 목표	연자육을 활용하여 피로 개선과 혈행 개선을 위한 기능성 소재를 개발함으로써 웰빙식품 트렌드에 발맞춰 미래대응식품 개발을 하고자 함 (최종 개발 제품: 연자육 추출분말, 연자육 발효추출분말)				
		전체 내용	■ 연구개발 배경: <ul style="list-style-type: none"> • 자사의 연자육 추출농축액(기존제품)은 대기업 완제품에 들어가는 부원료로 제안을 받아서 개발되어 판매 중에 있음 • 연자육 원료는 단순 건조물이나 분쇄하여 분말형태로 대부분 판매되고 있으나 추출물 유형은 거의 판매되고 있지 않음 • 기존제품은 효소처리 공정을 통하여 고형분 60% 이상의 고농도 연자육 추출농축액 제조에 성공하였으나, 기능성 연구에 대한 과학적 자료가 필요한 상태임 • 기존제품은 현재 고형분 기준으로 생산되고 있으나, 지표성분 규격이 없는 상태임 				

- 현재 유산균을 활용한 포스트바이오틱스 제품개발이 활발히 진행되고 있으므로 자사는 세계김치연구소로부터 기술이전 받은 유산균주를 활용하여 연자육 발효추출분말을 개발하고자 함

■ 연구개발 내용 1: 연자육 원료 수급 및 특성 확인

- 원산지별 원료 특성 확인 및 선별
- 원재료 선정
- 연자육의 지표성분 확립: 지표성분 선정
- 원료 속의 지표성분 규명, 선정 및 함량 확인: Alkaloids 분석
- 원료 속의 지표성분 규명, 선정 및 함량 확인: Phenolic compound 분석
- 원료 속의 지표성분 규명, 선정 및 함량 확인: Fatty acid 분석

■ 연구개발 내용 2: 연자육 원료의 추출농축 공정 확립

- 추출조건(추출시간)에 따른 고형분 수율
- 추출조건(온도)에 따른 고형분 수율
- 효소처리조건(처리시간, 온도)에 따른 고형분 수율
- 농축조건(농축온도, 압력)에 따른 고형분 수율

■ 연구개발 내용 3: 연자육 추출분말 최적 공정 확립

- 분말화 조건(분무건조, 동결건조)에 따른 고형분 수율
- 농축액과 부형제의 혼합비 결정

■ 연구개발 내용 4: 연자육 추출물의 발효 공정 확립

- 연자육 추출물을 포함하는 식용배지 조성 확립: 유산균의 선정 및 연자육 추출물의 제조
- 연자육 추출물을 포함하는 식용배지 조성 확립: 상용배지(MRS, YPD)와 연자육 추출물 배지에서의 유산균 생육 특성 조사
- 연자육 추출물을 포함하는 식용배지 조성 확립: 연자육 추출물 배지의 함량에 따른 유산균 생육 특성 조사
- 연자육 추출물을 포함하는 식용배지 조성 확립: 연자육 추출물 배지의 미량원소에 따른 유산균 생육 특성조사
- 연자육 추출물을 포함하는 식용배지 조성 확립: 연자육 추출물 배지의 탄소원에 따른 유산균 생육 특성조사
- 연자육 추출물을 포함하는 식용배지 조성 확립: 연자육 추출물 배지의 탄소원과 미량원소에 따른 유산균 생육 특성 조사
- 연자육 추출물의 최적 발효조건 확립 : 발효조건, 생장곡선

■ 연구개발 내용 5: 연자육 제품(추출분말, 발효추출분말) 대량생산 조건 확립

- 연자육 추출분말 대량생산 조건 확립: 추출
- 연자육 추출분말 대량생산 조건 확립: 농축
- 연자육 추출분말 대량생산 조건 확립: 분말화
- 연자육 발효추출분말 대량생산 조건 확립: 효소처리 및 발효

		<ul style="list-style-type: none"> • 연자육 발효추출분말 대량생산 조건 확립: 분말화 • 제조공정도확립 • 대량생산 <p>■ 연구개발 내용 6: 연자육 제품(추출분말, 발효추출분말)의 안정성 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> • 연자육 제품(추출분말, 발효추출분말)에 대한 흡습성 분석 • 연자육 제품(추출분말, 발효추출분말)에 대한 미생물 안정성 평가 • 연자육 제품(추출분말, 발효추출분말)에 대한 유해물질 안정성 평가 <p>■ 연구개발 내용 7: 연자육의 항산화활성 및 총 폴리페놀 함량</p> <ul style="list-style-type: none"> • 항산화 활성 • 폴리페놀 함량 <p>■ 연구개발 내용 8: 원료의 표준화</p> <ul style="list-style-type: none"> • 원재료에 관한 자료 • 연자육 추출분말의 제조방법 및 그에 관한 자료 • 연자육 추출분말 특성에 관한 자료 : 성상 • 연자육 발효추출분말 제조방법 및 그에 관한 자료 • 연자육 발효추출분말 특성에 관한 자료 : 성상 <p>■ 연구개발 내용 9: 피로개선</p> <ul style="list-style-type: none"> • 강제수영 동물모델 실험을 통한 연자육 추출물의 피로개선 효과 검증 <p>■ 연구개발 내용 10: 혈행개선</p> <ul style="list-style-type: none"> • In vitro 혈소판 응집 저해능 평가 • In vivo 혈행개선 동물 기능성 평가
연구개발성과	특허 2건 출원, 고용 7명, 품목제조보고 4건, 매출액 5,000만원	
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<p>■ 연구개발성과의 활용계획</p> <ul style="list-style-type: none"> • 피로 개선 및 혈행 개선을 매개로 한 다양한 질환의 예방 효과가 있는 건강기능성 식품 개발로 유사 다양한 분야에 활용 • 피로 개선 및 혈행 개선과 연관된 특정 질환에 대한 치료제와 함께 복용하여 치료에 도움이 되는 건강기능식품을 함께 활용 • 소재가 개발될 경우 협력업체와의 협업을 통하여 우선적으로 제품화함과 동시에 사업화 <p>■ 기대 효과</p> <ul style="list-style-type: none"> • 건강기능식품 시장은 고령화 시대와 건강을 중시하는 트렌드에 힘입어 매년 성장을 거듭해 고부가가치 산업으로 자리잡고 있을 뿐만 아니라 신종 코로나바이러스 감염증(코로나19)로 인해 건강에 대한 관심이 커지면서 더욱 성장할 것으로 전망 • 고령친화 사회 대비 실버세대들의 삶의 질 향상을 위한 미래 산업화를 통한 농식품 고부가가치화기반 기술 확립 및 산업화 토대 구축 • 건강기능식품을 요구하는 주 소비층이 4·50대 중장년층 위주에서 2·30대 젊은 층으로 확대되면서 고부가가치 품목으로 확대 • 중소식품기업의 투자 활성화로 새로운 시장 및 일자리 창출 	

	<ul style="list-style-type: none"> • 특허기술의 상용화뿐만 아니라, 식품소재 생산 및 건강기능식품 제품을 생산하여 관련 산업을 활성화시키고, 기업매출 증대에 기여 • 새로운 고기능성 식품소재를 개발하여 국내뿐만 아니라, 일본, 미국 등 시장규모가 큰 해외 선진국도 이에 대한 식품소재 및 완제품에 대한 요구가 강하므로, 당사는 기존 해외 거래처를 통한 수출시장을 개척해 나갈 것이고 시장의 니즈에 부합되는 요건을 갖추게 된다면 수출가능성이 높을 것으로 판단됨 • 개발된 기술을 이용하여 농촌에 존재하는 모든 유무형의 자원을 바탕으로 농업(1차 산업)과 식품·특산품 제조·가공(2차 산업) 및 유통·판매, 서비스(3차 산업) 등을 연계시킴으로서 새로운 부가가치 창출 및 농가소득이 증대될 것으로 예상됨 											
연구개발성과의 비공개여부 및 사유	해당없음											
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신제품	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
국문핵심어 (5개 이내)	연자육		피로 개선		혈행 개선		기능성 식품		발효			
영문핵심어 (5개 이내)	lotus seed		improvement fatigue		blood circulation		health supplement		fermentation			

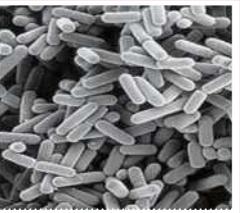
최종보고서										보안등급				
										일반	<input checked="" type="checkbox"/>	보안	<input type="checkbox"/>	
중앙행정기관명		농림축산식품부			사업명		사업명		고부가가치 식품기술 개발(R&D)					
전문기관명(해당 시 작성)		농림식품기술기획평가원					내역사업명(해당 시 작성)		미래대응식품 기술개발					
공고번호		2021000029			총괄연구개발 식별번호(해당 시 작성)									
					연구개발과제번호		RS-2022-IP122023							
기술분류	국가과학기술표준분류	1순위 바이오식품	50%	2순위 기능성 바이오 소재	30%	3순위 식품가공학	20%							
기술분류	농림식품과학기술분류	1순위 식품가공·공정	100%		%		%							
기술분류	6T관련기술코드	1순위 기타 농업·해양·환경 응용기술	100%		%		%							
기술분류	녹색기술분류코드	1순위 녹색기술관련 과제 아님	100%		%		%							
기술분류	국가과학기술표준분류_적용분야분류	1순위 건강	100%		%		%							
총괄연구개발명(해당 시 작성)		국문												
		영문												
연구개발과제명		국문		연자육을 활용한 피로 개선과 혈행 개선을 위한 식품원료용 기능성 소재 개발										
		영문		Development of functional food materials to improve fatigue and blood circulation using lotus seed										
주관연구개발기관		기관명		(주)신우코퍼레이션			사업자등록번호		1388180365					
		주소		경남 진주시 문산읍 월아산로 991 (재)진주바이오산업진흥원 성장지원동303호			법인등록번호		1341110230685					
연구책임자		성명						직위						
		연락처		직장전화						휴대전화				
				전자우편						국가연구자번호				
연구개발기간		전체			2022-04-01~2023-12-31									
		단계		1단계	2022-04-01~2023-12-31									
연구개발비(단위:천원)		정부지원 연구개발비		기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				합계		연구개발비 외 지원금		
		현금		현물		지방자치단체		기타()		현금			현물	
총계		233,000	0	3,325	54,925	0	0	0	0	236,325	54,925	291,250	0	
1단계		1연차	100,000	0	0	25,000	0	0	0	0	100,000	25,000	125,000	0
		2연차	133,000	0	3,325	29,925	0	0	0	0	136,325	29,925	166,250	0
공동연구개발기관 등(해당 시 작성)		기관명		책임자		직위		휴대전화		전자우편		비고		
												역할	기관유형	

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	1
2. 연구개발과제의 수행 과제 및 수행내용	9
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도	11
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)	85
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도	86
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획	87

1. 연구개발과제의 개요

1) 사업개요

<p>개발목표</p>	<p>기존제품은 효소처리 공정을 통하여 고형분 60% 이상의 고농도 연자육 추출농축액 제조에 성공하였으나, 지표성분 규격과 기능성 연구에 대한 과학적 자료가 필요한 상태임. 현재 유산균을 활용한 포스트바이오틱스 제품개발이 활발히 진행되어 자사는 세계김치연구소로부터 기술이전 받은 유산균주를 활용하여 연자육 발효추출분말을 개발하고자 함</p>	
<p>개발 컨셉</p>	<p>자사의 원료 표준화공정을 활용하여 BtoB용 연자육 원료(추출분말, 발효추출분말)를 개발함으로써 기존 제품 대비 기능성 연구 및 포스트바이오틱스 신제품 사업화</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p style="text-align: center; background-color: #4a86e8; color: white; padding: 2px;">기능성 원료</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;">   </div> <p style="text-align: center;">연꽃 연자육</p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p style="text-align: center; background-color: #e91e63; color: white; padding: 2px;">핵심기술</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;">   </div> <p style="text-align: center;">효소처리과정 유산균 발효</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> <p>㈜신우코퍼레이션</p>  <p>ShinWoo CO.,LTD Natural Food Ingredients</p> <p>BtoB용 원료 개발·제조·판매 전문기업</p> <p style="background-color: #4a86e8; color: white; padding: 2px;">추출분말, 발효추출분말</p> <p style="background-color: #4a86e8; color: white; padding: 2px;">원료표준화</p> <p style="background-color: #4a86e8; color: white; padding: 2px;">대량생산</p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> <p>대구한의대학교</p>  <p>Daegu Haany University</p> <p>개별인정형 원료 전임상 전문연구기관</p> <p style="background-color: #f4a460; color: white; padding: 2px;">피로 개선</p> <p style="background-color: #f4a460; color: white; padding: 2px;">혈행 개선</p> <p style="background-color: #f4a460; color: white; padding: 2px;">독성 실험</p> </div> </div>	
<p>소재/기술</p>	<p>연자육 (기능성 연구: 피로 개선, 혈행 개선)</p>	<p>원료 표준화공정 연자육 추출분말 연자육 발효추출분말</p>
<p>최종 예상 개발품</p>	<p>BtoB용 연자육 제품</p> <ul style="list-style-type: none"> - 추출분말 2종: 연자육 추출분말, 연자육 발효추출분말 <div style="display: flex; justify-content: flex-end; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;"> <p style="font-size: small; border: 1px solid black; padding: 1px;">추출분말</p>  </div> <div> <p style="font-size: small; border: 1px solid black; padding: 1px;">발효추출분말</p>  </div> </div>	
<p>차별성·우수성</p>	<p style="text-align: center;">기존제품</p> <ul style="list-style-type: none"> • 제품유형: 연자육 추출농축액 • 규격: 고형분 60% 기준 (지표성분 기준 미비) 	<p style="text-align: center;">개발제품</p> <ul style="list-style-type: none"> • 제품유형: <ul style="list-style-type: none"> - 추출분말 : 분무건조, 동결건조 - 발효추출분말 : 분무건조, 동결건조 (BtoB용 기능성 원료 형태로 판매) • 기능성: 피로 개선, 혈행 개선 기능성 강조 • 발효: 유산균 발효를 통한 포스트프로바이오틱스 개발

2) 건강관련식품에 대한 사회적 요구 증대

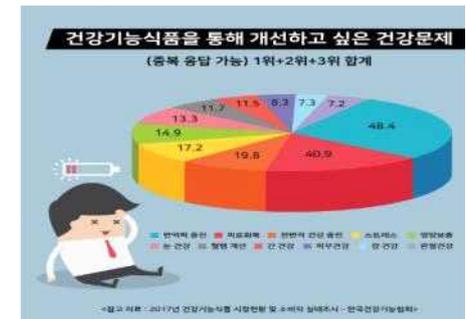
- (식품 트렌드의 변화) ‘건강’과 ‘웰빙’은 지난 몇 해간 전 세계 식품업계에 빠지지 않고 등장하는 가장 강력한 트렌드 중 하나임
- (건강식품 수요 소비자 계층 확대) 혼족, 만혼, 비혼주의, 고령화 등 인구구조 변화와 육류, 가공식품의 섭취 및 야근문화와 회식 등 현대인들의 식생활에 따른 건강관리를 위해 몸에 좋은 건강식품의 소비가 증장년층뿐만 아니라 2030 젊은층까지 확산됨
- (건강기능식품 국내외 시장규모, 빠른 성장세) 세계 건강기능식품 시장규모는 2019년 기준 약 170조로 추정되며, 2015년 133조에 비해 27.8% 증가함. 국내건강기능식품 시장도 식약처 통계에 따르면 2018년 기준 4조 5,821억원 수준으로 최근 5년간 연평균 성장률이 11.1%임. 건강기능식품을 챙겨먹는게 대중화되면서 다양한 기능성 원료를 사용한 건강식품이 출시되고 있음

3) 피로 개선 및 혈행 개선 소재 개발의 중요성

- (피로 개선에 대한 관심의 증대) 바쁜 일상으로 인한 영양 불균형 및 각종 업무, 환경적 스트레스로 인하여 많은 현대인들이 만성피로에 호소하고 있으며, 한국건강기능협회에서 실시한 건강기능식품 시장 실태 조사(2017)에 따르면 국내 소비자들이 건강기능식품을 통해 개선하고 싶은 문제로 면역력 증진과 피로회복을 각 1, 2위로 선정되었고, 취업포털 사이트 ‘사람인’에서 직장인을 대상으로 설문 조사한 결과 응답자 중 56%가 ‘만성 피로 증후군’을 겪고 있다고 답했으며, 뿐만 아니라 번아웃 증후군과 같은 여러 정신적 문제 또한 동반되는 것으로 보고됨. 이에 따라 최근 현대인들의 건강관리 중점은 ‘피로회복’에 맞춰지고 있는 추세로, 최근 건강기능식품 시장에서는 비타민 B군 복합체, 홍삼, 밀크씨슬 등과 같은 피로회복 및 건강증진에 도움을 줄 수 있는 영양제에 관심이 증대됨
- (피로의 위험성) 만성피로 및 스트레스의 과도한 축적은 수면장애, 무기력증, 우울증, 호르몬 불균형, 신경성 장애, 염증 및 암 등을 유발할 수 있으며, 이는 일상에서 얻는 정신적 요인 및 암, 결핵, 당뇨, 심부전증 등과 같은 신체적 질환에 의해 나타남



[그림 1] 직장인 증후군 설문조사 결과



[그림 2] 건강기능식품을 통해 개선하고 싶은 건강 문제 실태조사(2017)



[그림 3] 혈관

상은 혈류의 항상성을 파괴하여 동맥경화, 뇌졸중 등의 심혈관계 질환을 발생시킴. 또한 과도한 지혈작용 및 혈괴의 생성은 혈액의 흐름을 방해하여 혈행 이상을 초래하며 혈전과 같은 병변을 유발함. 따라서 혈행 개선은 만성 성인병 예방에 매우 중요함

- (혈행이란) 각 조직으로 산소와 영양분을 공급하고, 세포가 만들어낸 노폐물 제거, 우리 몸에 필요한 호르몬 운반 등 신체기능 유지를 위해 매우 중요한 혈액의 흐름을 혈행이라 함
- (혈행 개선) 혈행 개선에는 혈액을 구성하는 혈장 및 혈구세포가 주로 관여함. 이들 조직은 혈류의 항상성을 유지 시키며, 혈관의 손상된 부위나 염증 부위에서 정상적인 지혈과 보호 작용을 함으로써 인체의 정상적인 기능을 유지함. 그러나 혈장 내의 coagulation factors의 지나친 활성화, 혈소판 응집 촉진, 적혈구 변형 이상은 혈류의 항상성을 파괴하여 동맥경화, 뇌졸중 등의 심혈관계 질환을 발생시킴. 또한 과도한 지혈작용 및 혈괴의 생성은 혈액의 흐름을 방해하여 혈행 이상을 초래하며 혈전과 같은 병변을 유발함. 따라서 혈행 개선은 만성 성인병 예방에 매우 중요함

- 식약처에 등재된 피로 개선 및 혈행 개선에 대한 기능성 원료)

[표 1] 식약처 등재 기능성 원료 구분

기능성	기능성 원료	
피로 회복	고시형	매실 추출물, 인삼, 홍삼, 홍경천 추출물
	개별인정형	돈태반 발효추출물, 발효 생성아미노산 복합물, 헛개나무과병추출분말
혈행 개선	고시형	EPA 및 DHA 함유 유지, 감마리놀렌산 함유 유지, 영지버섯 자실체 추출물, 홍삼, 은행잎 추출물
	개별인정형	HK 나토배양물, 나토균배양분말, 멜론추출물, 상황버섯등 추출복합물, 카카오분말, 정제오징어유, L-아르기닌 등

- (현재 판매중인 피로 개선 및 혈행 개선 관련 건강기능식품) 피로 개선을 위한 건강기능식품은 주로 간 기능 개선 및 뇌신경세포 보호, 뇌 신경전달 물질 및 관련 호르몬 조절, 항스트레스 효과 등을 통해 피로 개선에 도움을 줌. 한편, 혈행 개선 식품의 경우 혈액 내 혈소판과 혈액응고인자들의 작용에 관여하여 혈액이 원활히 흐르도록 도움을 주는 역할을 함

[표 2] 판매 중인 피로 개선 건강기능식품

피로 개선 건강기능식품				
업체명	뉴트리원	바이탈헬스	정관장	대웅제약
제품 사진				
제품명	피로 개선 홍경천 & 밀크씨슬	피로 개선 올인원	홍삼정 에브리타임	우루사
기능성 원료	홍경천 추출물 밀크씨슬	밀크씨슬 추출물, 홍경천 추출물, 10종 멀티비타민	홍삼 추출농축액	타우린, 비타민 B 군
제품유형	캡슐	알약	액포	알약
가격(원)	29,900	55,000	75,000	15,000

[표 3] 판매 중인 혈행 개선 건강기능식품

혈행 개선 건강기능식품				
업체명	네추럴플러스	일양약품	SK케미칼	스윗레인
제품 사진				
제품명	올트라 혈행 개선 DHA 건강기능식품 장용성 오메가3	DHA 식물성 건강기능식품 혈행 개선 오메가3	기넥신 에프정	써큐 플로우 케어
기능성 원료	오메가 3 (DHA)	오메가 3 (DHA)	은행엽건조엑스	은행잎 추출물, 홍국, 엽산
제품유형	캡슐	캡슐	알약	알약
가격(원)	162,000	173,000	25,000	50,000

4) 기능성 소재로서의 연자육



[그림 4] 연자육

- **(연자육)** 연꽃(수련과)의 잘 익은 종자를 말하며, 약 7,000년간 식용 및 약재로 사용되어옴. 열매는 회갈색의 단단한 껍질에 싸여 있으며 이를 연자(蓮子) 혹은 석련자(石蓮子)라 함. 연자의 껍질을 벗기면 열은 황갈색~적갈색의 씨껍질에 싸인 씨를 볼 수 있고 씨껍질을 벗기면 연한 황백색의 씨를 볼 수 있는데 이를 연자육(蓮子肉) 또는 연육(蓮肉)이라 함
- **(연자육의 성분)** 인, 칼륨, 철, 마그네슘, 엽산, 비타민 C 등의 무기질과 비타민군이 풍부하며, nuciferine, liensinine, isoliensinine, neferine, (+)-1(R)-coclaurine 등의 각종 alkaloid(aporphine계, phenol계, benzyloquinoline계) 화합물을 다량 함유. 그 밖에 (+)-catechin, (+)-gallo catechin, quercetin, kaempferol 등의 flavonoid 화합물 및 페놀성 화합물 함유
- **(연자육의 영양학적 특성)**
 - 연자육의 열량 : 88 kcal/100 g
 - 탄수화물(61.3%) 및 단백질(19.5%)을 다량 함유한 고영양 식품
 - 높은 비율의 불포화지방산 함유 (linoleic acid 함량이 58.3%)
 - 16 종의 아미노산 함유, 특히 필수 아미노산이 매우 풍부함(WHO에서 권장하는 이상적 단백질 공급원인 36%의 천상의 E/T 비율(필수아미노산/총아미노산)로 고품질의 아미노산 공급체). glutamic acid 가장 높은 함량(4.5%)이며, 필수아미노산 함량은 아미노산 중 35.1% 차지함. 메티오닌 함량 多 (= 은행 2배, 생강 20배, 호박 24배 함유)
 - 다량 영양소(탄,단,지)뿐만 아니라 인, 칼슘, 마그네슘, 철 및 기타 비타민 풍부
- **(연자육의 효능)** 연자육은 항혈전 및 심혈관계 개선 효과, 신경세포 보호 효과 및 호르몬 조절, 피로 개선, 항우울, 학습능력 개선, 면역조절 활성화에 대해 약리학적 효과가 보고되어 있으며, 그 밖에도 항산화, 항비만, 항염, 항당뇨에 대해 활성을 나타내어 현대인들의 건강증진을 위한 혈행 및 피로 개선에 탁월한 효과가 있을 것으로 예상됨
- **(국내 연자육 생산량 증가)** 연(蓮)의 재배환경으로 적합한 우리나라 환경(여름철 고온다습 기후 및 논토양)에 매우 빠른 성장 속도, 용이한 재배 조건, 다방면에서 산업적 이윤 창출이 가능하며, 연자육뿐만 아니라 연꽃, 연잎, 연근 모두 산업적 활용 가능함. 최근 식품산업의 변화로 벼 재배농가 감소현상이 나타남. 이에 2007년, 농수산물식품부로부터 '연'이 벼 대체 작물로 지정되어 연 재배 확대사업이 진행되었으며, 이를 통해 벼 농가의 안정성 도모 및 농가소득 증진, 논 기능 유지, 신소득원 확보를 가능하게 함
- **(연자육 국외 생산현황)** 아시아 남부가 원산지로 주로 아시아, 호주, 북미 동부 및 남부에서 발견됨. 특히 아시아(베트남, 중국, 인도)에서는 우수한 경제적 작물로 인식되어 광범위한 재배가 이루어지고 있음
 - 중국 : 연간 50~70만 ha 면적에서 45,000 ton의 종자 생산 (종자 생산량 약 75 kg/ha)
 - 인도 : 연꽃이 인도의 국화로 종자 생산량 약 200 kg/ha
- **(연자육 국내 생산현황)** 국내산 연자육의 수확시기는 여름철 개화 이후 9~10월경임. 주요 생산 지역으로는 경남·경북지역(진주, 함안, 거창, 밀양, 대구 등)과 경기도 화성, 김포, 경북 구미, 충남 논산 등이 있음.
 - 연근(연자육 포함) 국내 재배면적 : 전국(603ha), 경남권(224ha), 대구(202ha)

종자

▶ 신재영 | 종자

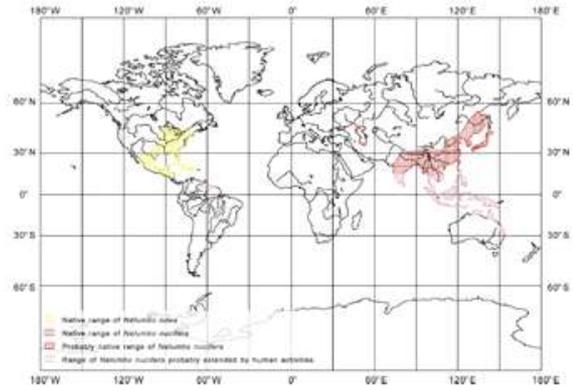
연(蓮), 벼 이외의 대체작물로 논 이용률 증진

▶ 장남농기원, 연 유전자원 100여종 수집전시 및 시험재배

장남농기원@newsam.com | 등록 2017.05.26 09:54:15

과잉생산 되는 쌀에 대한 대체작물로 연(蓮)이 뜨고 있다. 논에 연(蓮)을 심으면 벼를 심지 않으면서도 물이 에 따라 연재배 벼농사로 전환이 가능하기 때문에 논 기능을 유지 할 수 있기 때문. 또한 물면, 백면 등 100여 종 이상의 국내외 다양한 연을 수집해 방문객들에게도 시경관용으로도 활용 가능하기 때문이다. 이런 추세에 발 맞춰 경상남도농업기술원(원장 이상태)이 논에 벼 대신 연(蓮)을 재배하여 물 농업을 대체하기 위하여 다양한 연(蓮) 유전자원을 수집해 전시하고 있어 눈길을 끈다. 또 농업기술원 시험포장에 심은 연(蓮)은 벼 대체작물로서 활용성과 시험포장을 찾는 내방객들을 위한 길관작물로서의 가능성을 검토하기 위해 시험재배하고 있다고 전했다.

장남농기원은 "이번 연 유전자원 전시 설치는 최근 쌀 수급 불균형으로 인한 재고누적으로 쌀의 생산조정이 요구되고 있는데, 쌀 재배 면적을 줄이고 안정적인 농가 소득을 올리기 위한 다양한 벼 대체작목 변화가 요구되고 있는 현상을 적극 반영했다"고 밝혔다.



[그림 5] 연의 벼 대체작물 지정

[그림 6] 연의 국가별 생산 분포도

- (연자육의 기능성 연구) 연자육은 항비만, 항산화, 항우울, 항염 및 미백, 항균, 피부질환, 혈행 개선 및 심혈관질환에 효과가 있다고 알려져 있으나, 가장 큰 문제점은 과학적 근거가 충분히 확보되어 있지 않음. 본 연구사업을 통한 연자육의 기능성에 대한 과학적 근거 설립의 필요

[표 4] 연자육 관련 논문

연자육 논문		
<p>Anti-inflammatory activity of ethanol extract from Lotus (Nelumbo lutea) seed and its effect on adipogenesis</p>	<p>Phytochemical Profile and Biological Activity of Solanum elaeagnifolium</p>	<p>Assessment of anti-depressant effect of nelumbinis semen on rats under chronic mild stress and its subchronic oral toxicity in rats and beagle dogs</p>
항비만효과	피부질환 및 심혈관질환치료	항우울 효과
<p>Effect of Nelumbo lutea seeds on the reproductive organs of female rats</p>	<p>Flavonoids of Lotus (Nelumbo lutea) Seed Embryos and Their Antioxidant Potential</p>	<p>Proximate and functional analysis of Nelumbo lutea seed embryo powder in feed for broiler chickens and its effect on growth performance</p>
항에스트로겐 성질	항산화작용	스트레스 완화효과

[표 5] 연자육 관련 특허

연자육의 특허	
특허명	특허내용
연잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품	항혈전
연자방 에탄올 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전증의 예방 또는 약학적 조성물 및 건강기능식품	항혈전
우울증 치료용 연자육 추출물, 이를 포함하는 약학적조성물 및 건강식품	우울증치료
호두 및 연자육 추출물 및 이를 유효성분으로 함유하는 스트레스 해소용 조성물	스트레스 완화
홍경천 및 연자육을 포함하는 수면 장애 개선용 조성물	수면장애 개선
연꽃, 연잎, 연줄기, 연근, 연자육의 열수 추출 방법 및 그에 의하여 제조된 추출물을 유효 성분으로 하는 주름 개선 효과를 가지는 화장료 조성물	주름 개선
연자육 추출물을 함유하는 인지기능 장애 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물	인지기능 장애 예방 및 치료
형개, 연자육을 이용한 화장료 조성물	항염, 항산화 및 미백, 항균 효과
알파-글루코시다아제 효소활성을 억제하는 연자육 추출물의 제조방법 및 이를 함유하는 화장료 조성물	미백효과

- (연자육 식품원료) 연자육은 거의 건조 연자육 또는 연자육 분쇄 분말 등으로 판매되며, BtoB 용 연자육추출분말 제품은 없는 실정임

(현시점의 연자육 제품의 문제점)

- 기존제품은 효소 처리 공정을 통하여 고형분 60% 이상의 고농도 연자육 추출농축액 제조에 성공하였으나, 기능성 연구에 대한 과학적 자료가 필요한 상태임
- 기존제품은 현재 고형분 기준으로 생산되고 있으나, 지표성분 규격이 없는 상태임

5) ㈜신우코퍼레이션의 선행 기술개발 역량 및 내용

- (기업개요) 당사는 식품, 건강기능식품 및 첨가물의 원료개발, 제조, 판매, 수출입 기업으로 20여 종 이상의 천연물 자원의 추출, 농축, 분말 제조공정 기술 및 원료의 표준화 기술을 확보하고 있으며 벤처제조업, 건강기능식품 벤처제조업, HACCP 인증을 받음
- (건강기능식품 개발) 최근 건강기능성식품 개별인정형 원료를 개발 중에 있음. 또한 이러한 노하우를 바탕으로 건기식 개별인정형 원료개발에 중점을 두고있음
- (프로바이오틱스 개발) 세계김치연구소로부터 기술이전 받은 유산균주를 통해 현재 판매중인 제품이 있으며 이를 활용하여 연자육 추출농축액을 발효시켜 분말화한 제품을 개발하고자 함

(연자육 추출발효분말)

- 현재 유산균을 활용한 포스트바이오틱스 제품개발이 활발히 진행되고 있으므로 자사는 세계김치연구소로부터 기술이전 받은 유산균주를 활용하여 연자육 발효추출분말을 개발하고자 함

- (자사 보유 공장 및 기업부설연구)



추출, 농축탱크



분무건조기



LC, GC

[그림 7] (주)신우코퍼레이션의 천연물(200종 이상) 유래 산업적 유용소재 개발 및 표준화



벤처기업 확인서



기업부설연구소 인정서



HACCP 인증서

[그림 8] (주)신우코퍼레이션 인증현황



[그림 9] (주)신우코퍼레이션의 원료표준화, 대량생산화 및 개별인정형 원료 개발

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용

[1] 연자육 원료 수급 및 특성 확인

- ① 원산지별 원료 특성 확인 및 선별
- ② 원재료의 선정
- ③ 연자육의 지표성분 확립: 지표성분 선정
- ④ 원료 속의 지표성분 규명, 선정 및 함량 확인: Alkaloids 분석
- ⑤ 원료 속의 지표성분 규명, 선정 및 함량 확인: Phenolic compound 분석
- ⑥ 원료 속의 지표성분 규명, 선정 및 함량 확인: Fatty acid 분석

[2] 연자육 원료의 추출농축 공정 확립

- ① 추출조건(추출시간)에 따른 고형분 수율
- ② 추출조건(온도)에 따른 고형분 수율
- ③ 효소처리조건(처리시간, 온도)에 따른 고형분 수율
- ④ 농축조건(농축온도, 압력)에 따른 고형분 수율

[3] 연자육 추출분말 최적 공정 확립

- ① 분말화조건(분무건조, 동결건조)에 따른 고형분 수율
- ② 농축액과 부형제의 혼합비 결정

[4] 연자육 추출물의 발효 공정 확립

- ① 연자육 추출물을 포함하는 식용배지 조성 확립: 유산균의 선정 및 연자육 추출물의 제조
- ② 연자육 추출물을 포함하는 식용배지 조성 확립: 상용배지(MRS, YPD)와 연자육 추출물 배지에서 유산균 생육 특성 조사
- ③ 연자육 추출물을 포함하는 식용배지 조성 확립: 연자육 추출물 배지의 함량에 따른 유산균 생육 특성 조사
- ④ 연자육 추출물을 포함하는 식용배지 조성 확립: 연자육 추출물 배지의 미량원소에 따른 유산균 생육 특성조사
- ⑤ 연자육 추출물을 포함하는 식용배지 조성 확립: 연자육 추출물 배지의 탄소원에 따른 유산균 생육 특성조사
- ⑥ 연자육 추출물을 포함하는 식용배지 조성 확립: 연자육 추출물 배지의 탄소원과 미량원소에 따른 유산균 생육 특성 조사
- ⑦ 연자육 추출물의 최적 발효조건 확립 : 발효조건, 성장곡선

[5] 연자육 제품(추출분말, 발효추출분말) 대량생산 조건 확립

- ① 연자육 추출분말 대량생산 조건 확립: 추출
- ② 연자육 추출분말 대량생산 조건 확립: 농축
- ③ 연자육 추출분말 대량생산 조건 확립: 분말화
- ④ 연자육 발효추출분말 대량생산 조건 확립: 효소처리 및 발효
- ⑤ 연자육 발효추출분말 대량생산 조건 확립: 분말화
- ⑥ 제조공정도확립
- ⑦ 대량생산

[6] 연자육 제품(추출분말, 발효추출분말)의 안정성 평가

- ① 연자육 제품(추출분말, 발효추출분말)에 대한 흡습성 분석
- ② 연자육 제품(추출분말, 발효추출분말)에 대한 미생물 안정성 평가
- ③ 연자육 제품(추출분말, 발효추출분말)에 대한 위해물질 안정성 평가

[7] 연자육의 항산화활성 및 총 폴리페놀 함량

- ① 항산화 활성
- ② 폴리페놀 함량

[8] 원료의 표준화

- ① 원재료에 관한 자료
- ② 연자육 추출분말의 제조방법 및 그에 관한 자료
- ③ 연자육 추출분말 특성에 관한 자료 : 성상
- ④ 연자육 발효추출분말 제조방법 및 그에 관한 자료
- ⑤ 연자육 발효추출분말 특성에 관한 자료 : 성상

[9] 피로개선

- ① 강제수영 동물모델 실험을 통한 연자육 추출물의 피로개선 효과 검증

[10] 혈행개선

- ① In vitro 혈소판 응집 저해능 평가
- ② In vivo 혈행개선 동물 기능성 평가 방법

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

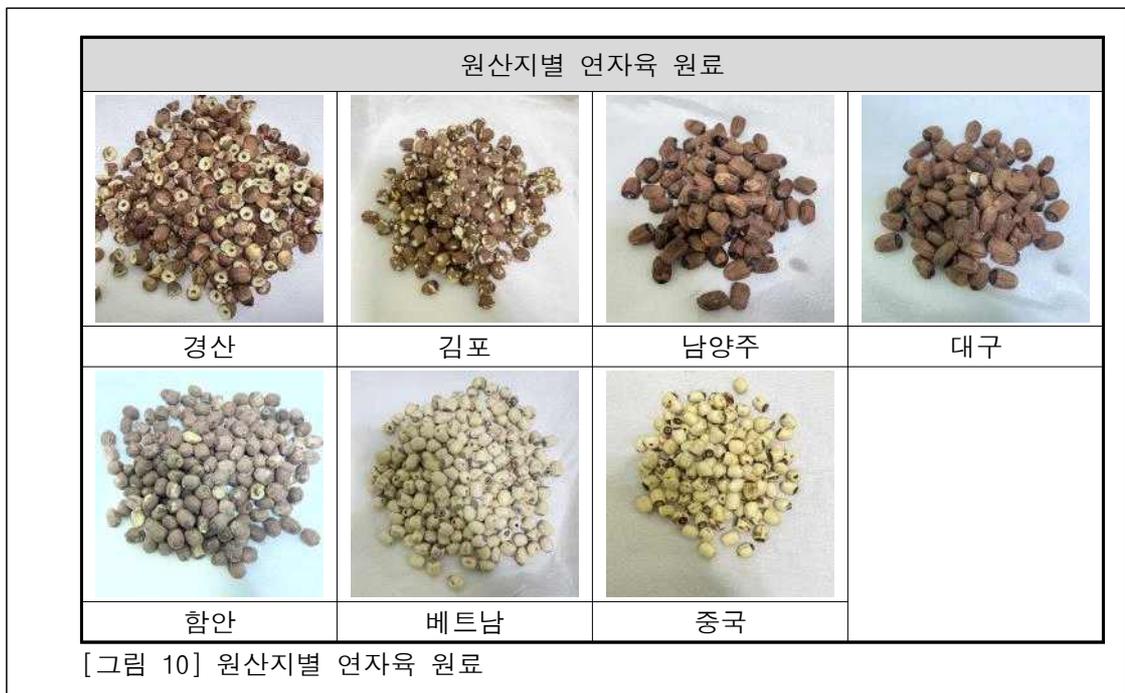
[1] 연자육 원료 수급 및 특성 확인

① 원산지별 원료 특성 확인 및 선별

가. 수행방법

(1) 개발 소재의 원산지별 연자육 원료의 특성을 확인하기 위해 경산, 김포, 남양주, 대구, 함안, 베트남, 중국산 연자육을 구매하여 사용하였음[그림 10]

나. 수행결과



② 원재료의 선정

가. 수행방법

(1) 상기 원산지별 연자육의 수율 확인을 위해 물 10배수를 가한 후, 90℃, 4시간, 2회 반복 추출, 농축하여 진행하였음

나. 수행결과

(1) 수율을 확인해본 결과 [표 6]과 같이 베트남산이 19.21%로 가장 높았고, 김포 18.07%, 중국산 17.78%, 대구 17.59%, 함안 15.67%, 경산 15.12%, 남양주 14.88%로 확인되었음
 (2) 수율 및 향산화, 폴리페놀 등 실험 결과를 통해 대구산 연자육을 원료로 선정하였음
 [표 6] 원산지별 수율

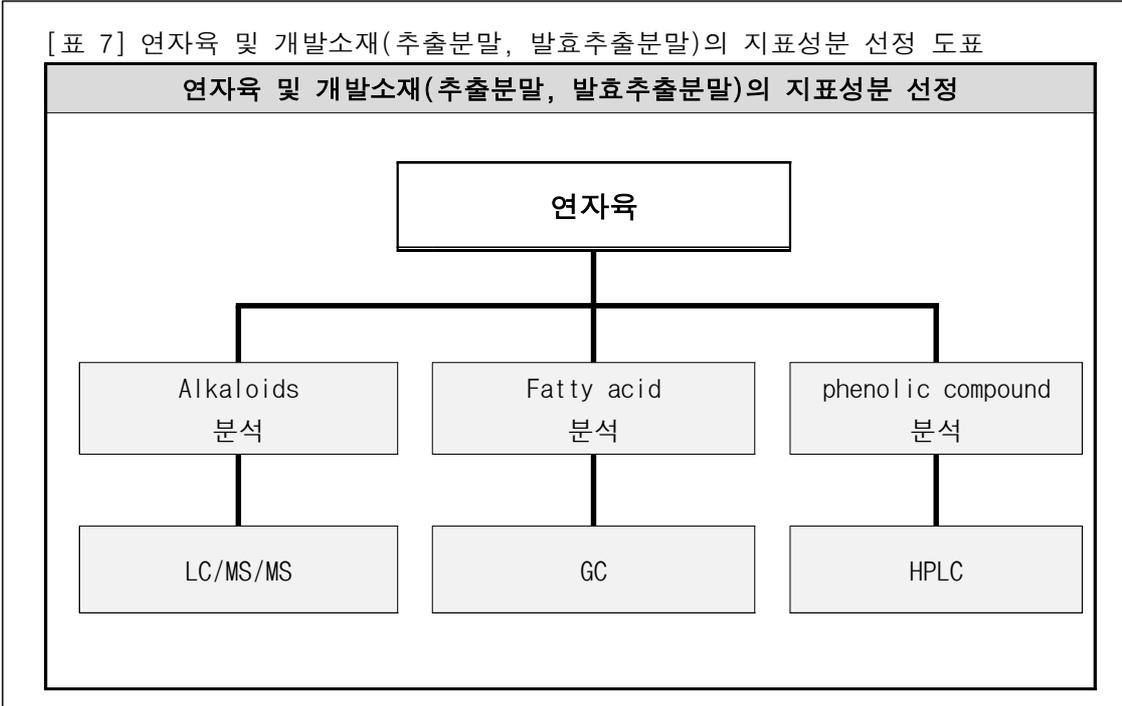
물 추출	추출 온도(10배수, 4시간, 2회)						
	경산	김포	남양주	대구	함안	베트남	중국
수율(%)	15.12	18.07	14.88	17.59	15.67	19.21	17.78

③ 연자육의 지표성분 확립: 지표성분 선정

가. 수행방법

(1) 연자육 원재료 및 개발소재(추출분말, 발효추출분말)의 지표성분 선정을 위해 LC/MS에 의한 알칼로이드(Alkaloids) 분석, GC/MS에 의한 지방산(Fatty acid) 분석, HPLC에 의한 페놀릭 성분(Phenolic acid) 분석을 수행하였음

나. 수행결과



4 연자육 추출분말의 지표성분 확립: Alkaloids 분석

가. 수행방법

Y. Chen et al. / Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 43 (2007) 99–104 101

tion. The products were finally verified by Mass spectrum and ^1H - and ^{13}C NMR.

2.3. LC-ESI-MS/MS

Identification and quantification of the analytes were carried out using a Varian LC-MS/MS system (Palo Alto, CA, USA) equipped with a ProStar 410 autosampler, two ProStar 210 pumps, a 335 diode array detector and a 1200 L electrospray tandem mass spectrometer. Firstly, a solution of phenolic alkaloid sample (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was infused into the electrospray source at a constant flow-rate of 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ to tune the mass spectrometer parameters, using a Harvard Model 11 Plus syringe pump. Then, the analysis was carried out using a MonoChrom C18 column (4.6 mm \times 200 mm i.d., 10 μm , Varian Inc., USA) and the mobile phase of acetonitrile-water (containing 0.2% acetic acid (v/v) and 0.1% triethylamine (v/v)) (16:84, v/v) at a flow rate of 1.4 ml/min (the column effluent was split: 0.2 ml/min to MS and 1.2 ml/min to DAD) with the column temperature kept at 30 $^\circ\text{C}$ and the injection volume of 20 μl . The DAD recorded UV spectra in the range from 190–400 nm with HPLC chromatogram monitored at 282 nm. The electrospray capillary potential was set to 55 V. Nitrogen was used as a drying gas for solvent evaporation. The API housing and drying gas temperatures were kept at 50 and 300 $^\circ\text{C}$. The spectra over the mass range of m/z 350–800 spectra of the phenolic alkaloid solution was collected with the scan time 1 s and the detector multiplier voltage 1090 V.

For lab-scale preparative chromatography experiments, a Varian prep-HPLC system consisting of a manual injector with a 10-ml loop, two PrepStar 218 pumps, a 325 UV-vis dual

calibration curve, five different concentrations were used. The contents of them in the quality control (QC) samples including the crude extract and processed sample (the phenolic alkaloids) were calculated with the respective calibration curves.

The following criteria were used to evaluate the method: sensitivity, linearity (r^2), repeatability, accuracy and stability. Sensitivity was assessed by evaluating the LOD and LOQ values. Measurement of intra- and inter-day variability was utilized to determine the repeatability of the method. The intra- and inter-assay precision was determined by the RSD obtained on one day and on different days at three levels. Accuracy experiments were carried out using standard addition method. The recovery of the added standard alkaloids was studied by spiking the phenolic alkaloid sample with the standard solution at three different mass concentrations. Triplicate experiments at each level were performed. The recoveries for the three alkaloids were calculated by subtracting the mass concentrations of non-spiked herb extracts using internal standard linear regression. The accuracy was expressed as the percentage of alkaloids recovered by the assay. Since the three alkaloids were relatively stable when stored at 4 $^\circ\text{C}$ [43], the stability was tested with the standard solution of three different concentrations that were stored at room temperature and analyzed every 2 h within 12 h.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of LC-ESI-MS/MS parameters

To obtain better sensitivity and detection, the ESI parameters were optimized in a flow injection sequence. Due to the basic

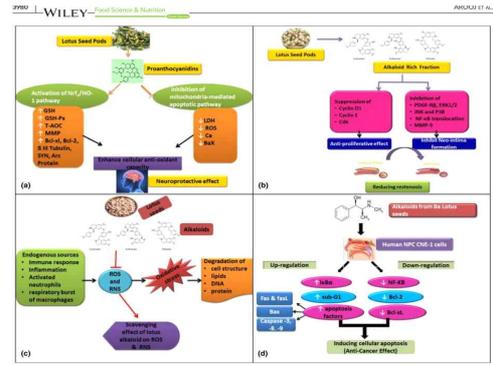


FIGURE 2 (a) shows the mechanism on how lotus seedpod proanthocyanidins (LSPC) prevented neurotoxicity (b) inhibitory effect of lotus seeds alkaloid rich extract on neo-intima formation and VSMC proliferation in a rat model (c) shows that the total crude alkaloids and

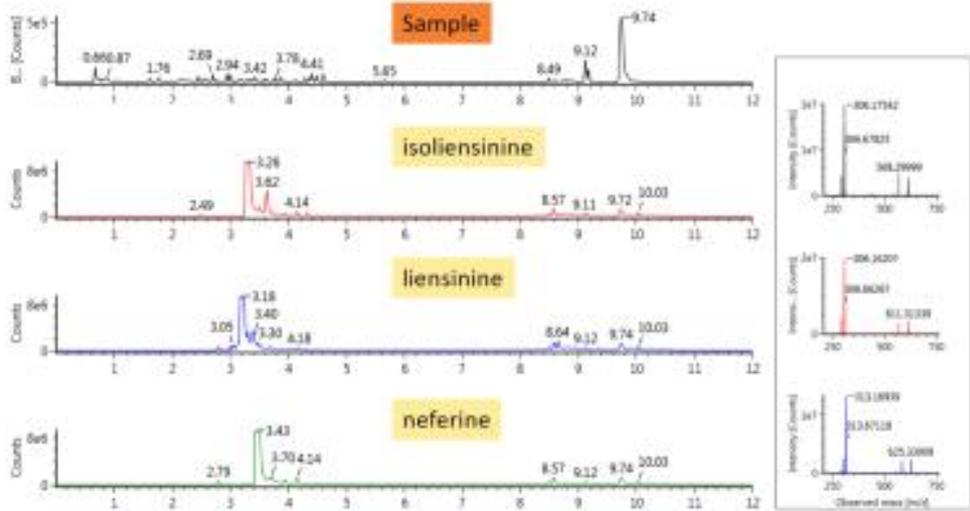
[그림 11] 참고문헌 관련 이미지

(1) Chen 등(2007)과 Arooj 등(2021)의 내용을 근거로 하여 연자육의 대표 phenolic alkaloids인 liensinine, isoliensinine, neferine을 지표물질 후보군으로 채택, 다음과 같이 LC/MS/MS 분석 진행

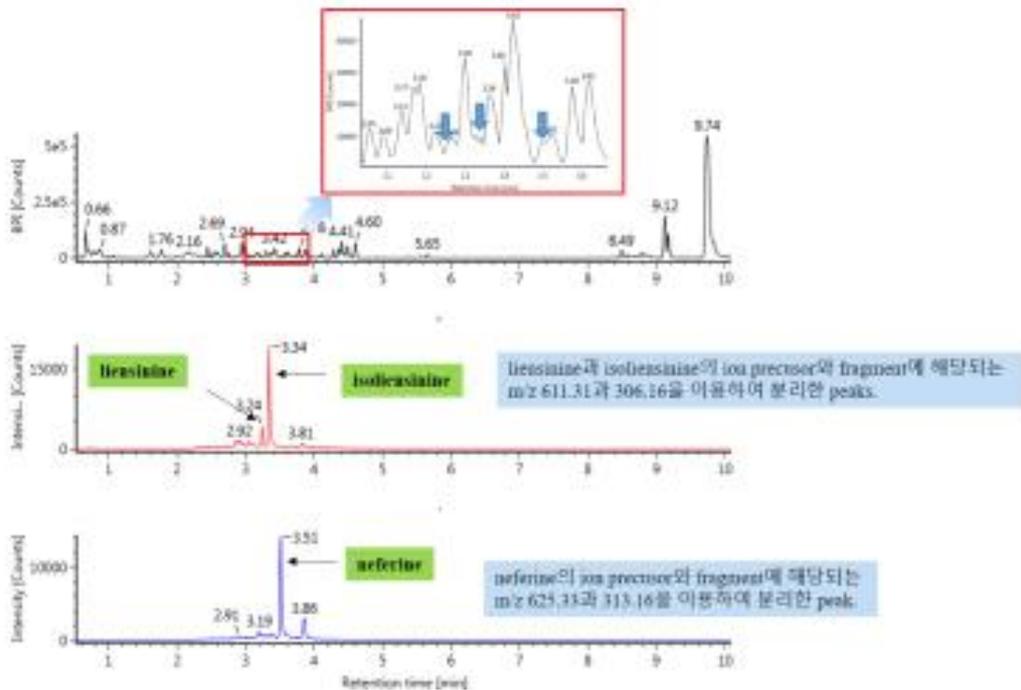
- i. system : Varian LC-MS/MS system (Palo Alto, CA, USA)
- ii. coulumn : Varian MonoChrom C18 (4.6 mm \times 200 mm i.d., 10 μm)
- iii. mobile phase : acetonitrile, 0.1% triethylamine 및 0.2% acetic acid 함유 water
- iv. injection volume : 20 μL
- v. flow rate : 1.4 ml/min
- vi. column temperature: 30 $^\circ\text{C}$

나. 수행결과

(1) 분석결과, 연자육 추출분말에서 페놀성 알칼로이드 표준물질 3종(liensinine, isoliensinine, neferine)이 모두 동정됨. 그러나 해당 성분들의 함량이 매우 낮으나 정량분석은 가능함



[그림 12] 연자육 추출분말과 표준물질의 크로마토그램



[그림 13] 연자육 추출분말에서 분리된 알칼로이드 크로마토그램

⑤ 원료 속의 지표성분 규명, 선정 및 함량 확인: Phenolic compound 분석

가. 수행방법

In this study, we analyzed flavonoids in various edible and inedible lotus tissues, including young leaves, mature leaf pulps, mature leaf veins, leaf stalks, flowers (stalks, petals, stamens, pistils), fruit coats and seed (coats, kernels), with some modified and improved procedures. The objective was to establish suitable and efficient HPLC-DAD-ESI-MSⁿ methods to analyze flavonoids in various lotus tissues, and to determine the characteristics of flavonoid composition and content. The methods described here may be useful for quality control of the lotus used in traditional Chinese medicines and could make valuable contributions to the clear identification of the medical values of different tissues of lotus.

2. Experimental

2.1. Plant material

Plants of the lotus cultivar 'Ti-1' were grown in a pool in Wuhan Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan. Twelve different tissues including young leaves, mature leaf pulps, mature leaf veins, leaf stalks, flower stalks, flower petals, flower stamens, flower pistils, fruit coats, seed coats, seed kernels, and seed embryos (known as plumula nelumbinis) were manually collected in mid-July from three individual plants, comprising three replicates. Seed embryos were picked when the color of seed coats turned into black.

Except for seed embryos, approximately 50 g of fresh tissues were powdered immediately in liquid nitrogen with an analytical mill (IKA A11 basic machine, Germany) and then stored at -40 °C for later analysis. The seed embryos were frozen and lyophilized, and then stored at room temperature in a closed desiccator for later analysis.

2.2. Extraction

One of the most important experimental variables during flavonoid extraction of fresh and dry materials is the ratio of solution to tissue. A preliminary study showed that a dry lotus sample should be extracted at a high ratio of solution to tissue. Through the comparison of different ratios, it was determined that about 0.5 g dry seed embryos should be extracted with 25 mL methanol-water (70:30, v/v), and 1 g of the other fresh tissues should be extracted with 30 mL methanol-water (70:30, v/v) at 4 °C for 36 h. The extract was centrifuged at 20,000 × g for 10 min, the supernatant was collected, and the tissues were re-extracted as above two additional times. The combined supernatant solutions were evaporated to

The fruit coat was chosen for detection of the aglycone compositions, since it contained the most flavonoid peaks during HPLC separation. A hydrolysis procedure was modified on previous study [25] and carried out as follows: first, 10 g of powdered fruit coat was dissolved in 300 mL MeOH and extracted at 4 °C for 36 h. Then, the solution was centrifuged at 20,000 × g for 10 min. The supernatant was purified using a solid phase cartridge as shown in Section 2.2, dried in a rotary evaporator (35 °C) and finally re-dissolved in 30 mL 2 M HCl in a methanol-water solution (50:50, v/v). The solution was heated in a capped tube at 105 °C for 90 min. The hydrolyte obtained was purified before HPLC analysis.

2.5. HPLC methods

All the reagents were HPLC grade from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Extracted and hydrolyzed solutions were analyzed by HPLC-UV (Agilent 1290 series; Agilent, Palo Alto, CA, USA), Columns of Waters Sunfire C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm, Waters, USA), reverse-phase Xbridge Amide C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm) and Atlantis® T3 (150 mm × 4.6 mm; 3.5 μm, Waters, USA) were compared in this study. In the solvent system, eluent A was Milli-Q water (Millipore, Billerica, MA, USA) containing 0.5% (v/v) formic acid, and eluent B was CH₃CN containing 0.1% (v/v) formic acid. The separation of flavonoids from seed embryo was accomplished using the Atlantis® T3 column at 30 °C with a linear elution gradient protocol of 0–5 min, 10% B; 5–37 min, 10–20% B; 37–45 min, 20–30% B; 45–48 min, 30–60% B; and 48–53 min, 10% B, at a flow rate of 0.6 mL min⁻¹. The separation of flavonoids in all other tissues was done as described by Chen et al. [25].

For aglycone analyses from all tissues, the Waters Sunfire C₁₈ column was used at 30 °C with a gradient program of 0–25 min, 20–40% B; and 25–26 min, 40–20% B, at a flow rate 1.0 mL min⁻¹. Chromatograms were acquired at 350 nm and photodiode array spectra were recorded from 210 to 600 nm.

2.6. Identification of flavonoids

Structural elucidation of flavonoids was based on mass spectral data. HPLC-UV was used for separation, and HPLC-MS was used for identification (Agilent 1290 and 6460 triple quad mass spectrometry series; Agilent, Palo Alto, CA, USA). Electrospray ionization (ESI) was performed in both positive (P) and negative (N) modes for MS analyses. Nitrogen auxiliary gas was provided.

The identification conditions were confirmed with available standards, with the positive mode as follows: HV voltage, 3.5 kV;

of the links between food composition and health (Johanningmeier et al., 2016). The carbohydrates, unsaturated fatty acids, and mainly the main indicators for the quality of food (Chen et al., 2012a) and alkaloids (Chen et al., 2012b) were identified in lotus seeds in various lotus seed samples. Chen et al. (2012a) reported 10 flavonoid-O-glycosides (rutin, hyperoside, pterol 3-O-robinobioside, isorhamnetin 3-O-glucuronide) in lotus seed embryos by HPLC/DAD/ESI-MSⁿ and their contents by UV. The total flavonoid contents of these five flavonoids were 63.78, 140.78, and 64.74 mg 100 g⁻¹ dry weight, respectively. More recently, the flavonoids from five stages of growth were identified and C-DAD and HPLC-ESI-MSⁿ. As a result, 13 flavonoids were identified in all samples. Most importantly, seed plumules differed significantly from the stems. Thirteen C-glycosyl flavonoids and six O-glycosyl flavonoids were identified in lotus seed plumules, in which 13 flavonoids and five C-glycosyl flavonoids were discovered for the first time in lotus (Li et al., 2014). Total flavonoids increased in seed plumules, stems and kernels, or remained constant in lotus seed embryos. In addition, it was reported that the polyphenols of lotus seed epicarp were also rich in flavonoids (Chen et al., 2014). During ripening (Liu et al., 2015), Liu et al. (2015) reported the polyphenols of lotus seed epicarp at green, half ripening, and full ripening stages by HPLC-ESI-MS/MS, and four compounds were identified, including two flavan-3-ols (epicatechin and two quercetin glucosides pterin). The polyphenols contents of lotus seed epicarp at green, half ripening stage were 13.08, 10.95, and 6.73%, respectively, and that of quercetin in the seed ripened. Lignans, isochlorogenic acid, and the predominant alkaloids in lotus seed of biologically active ingredients in lotus

Metabolomics-Assisted Breeding of Lotus Seeds

Human selection and breeding of lotus seeds have been more than 1800 years (Li et al., 2010). The breeding programs have been intensified in recent decades, and metabolomic strategy is gradually applied to facilitate strategic breeding

TABLE 1 | The flavonoids identified in lotus seeds.

No	Compounds	Reference
1	Rutin	Chen et al., 2012a
2	Hyperoside	Chen et al., 2012a
3	Isoquercetin	Chen et al., 2012a
4	Kaempferol 3-O-robinobioside	Chen et al., 2012a
5	Isohamnetin 3-O-glucuronide	Chen et al., 2012a
6	Isohamnetin 3-O-hesperidol	Li et al., 2014
7	Diocoumarin-7-nitroside	Li et al., 2014
8	Quercetin-3-methoxyglucuronide	Li et al., 2014
9	Luteolin-7-nitroside	Li et al., 2014
10	Myricetin 3-O-glucuronide	Chen et al., 2012a
11	Myricetin 3-O-glucuronide	Chen et al., 2012a
12	Quercetin 3-O-glucuronide	Chen et al., 2012a
13	Aetinigenin	Chen et al., 2012a
14	Syringetin 3-O-glucuronide	Chen et al., 2012a
15	Isohamnetin 3-O-glucuronide	Chen et al., 2012a
16	Kaempferol 3-O-glucuronide	Chen et al., 2012a
17	Quercetin	Koels et al., 2010
18	Quercetin	Li et al., 2014
19	Isoquercetin	Li et al., 2014
20	Vitamin	Li et al., 2014
21	Isoquercetin	Li et al., 2014
22	Apigenin-6,8-di-C-glucoside	Li et al., 2014
23	Luteolin-6-C-glucoside-8-O-pentose	Li et al., 2014
24	Luteolin-6-C-pentose-8-O-glucoside	Li et al., 2014
25	Apigenin-6-C-glucoside-8-C-xylose	Li et al., 2014
26	Apigenin-6-C-xylose-8-C-glucoside	Li et al., 2014
27	Schaftoside	Li et al., 2014
28	Isoschaftoside	Li et al., 2014
29	Apigenin-6-C-glucoside-8-C-rhamnose	Li et al., 2014
30	Apigenin-6-C-rhamnose-8-C-glucoside	Li et al., 2014

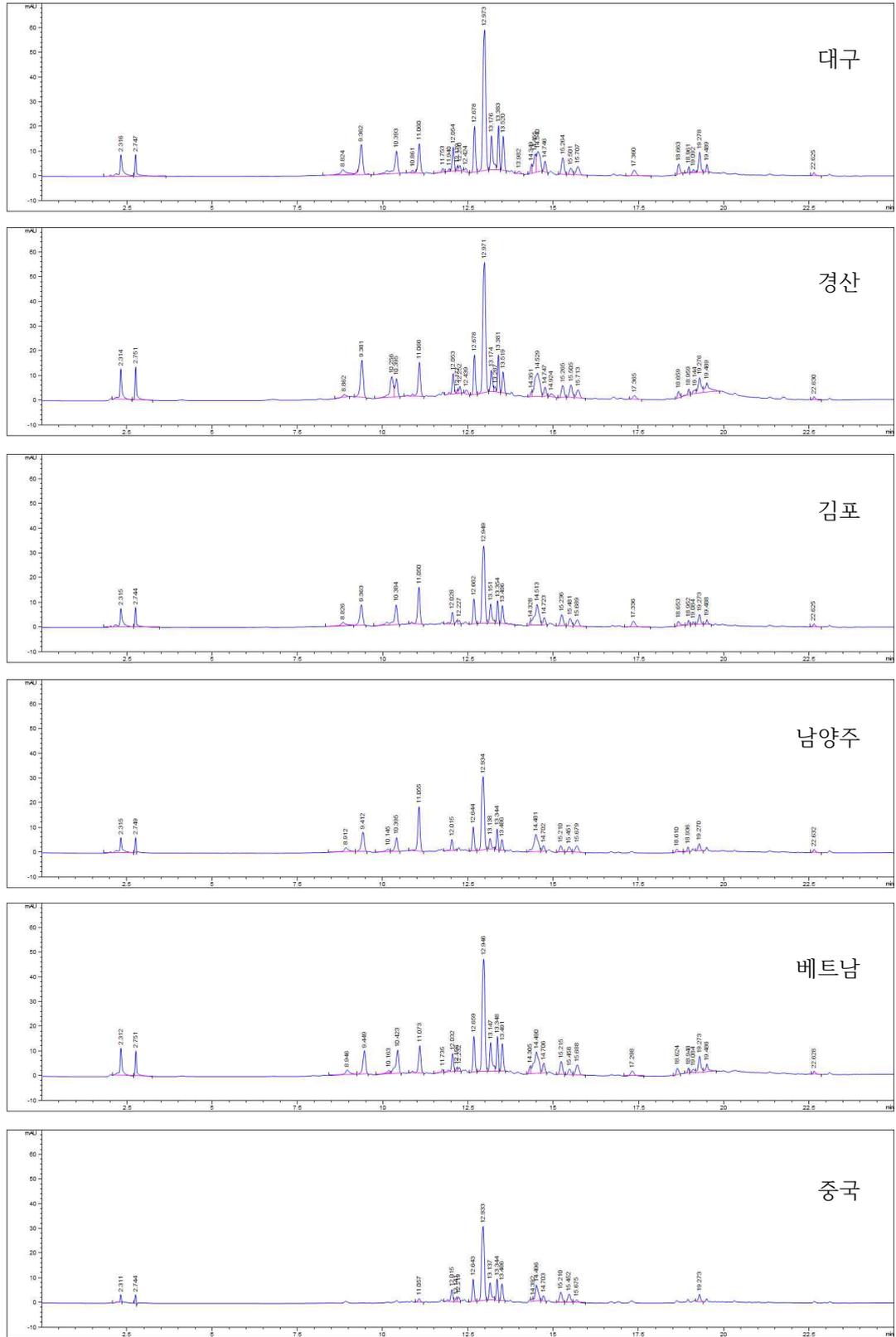
TABLE 2 | The alkaloids identified in lotus seeds.

[그림 14] 참고문헌 관련 이미지

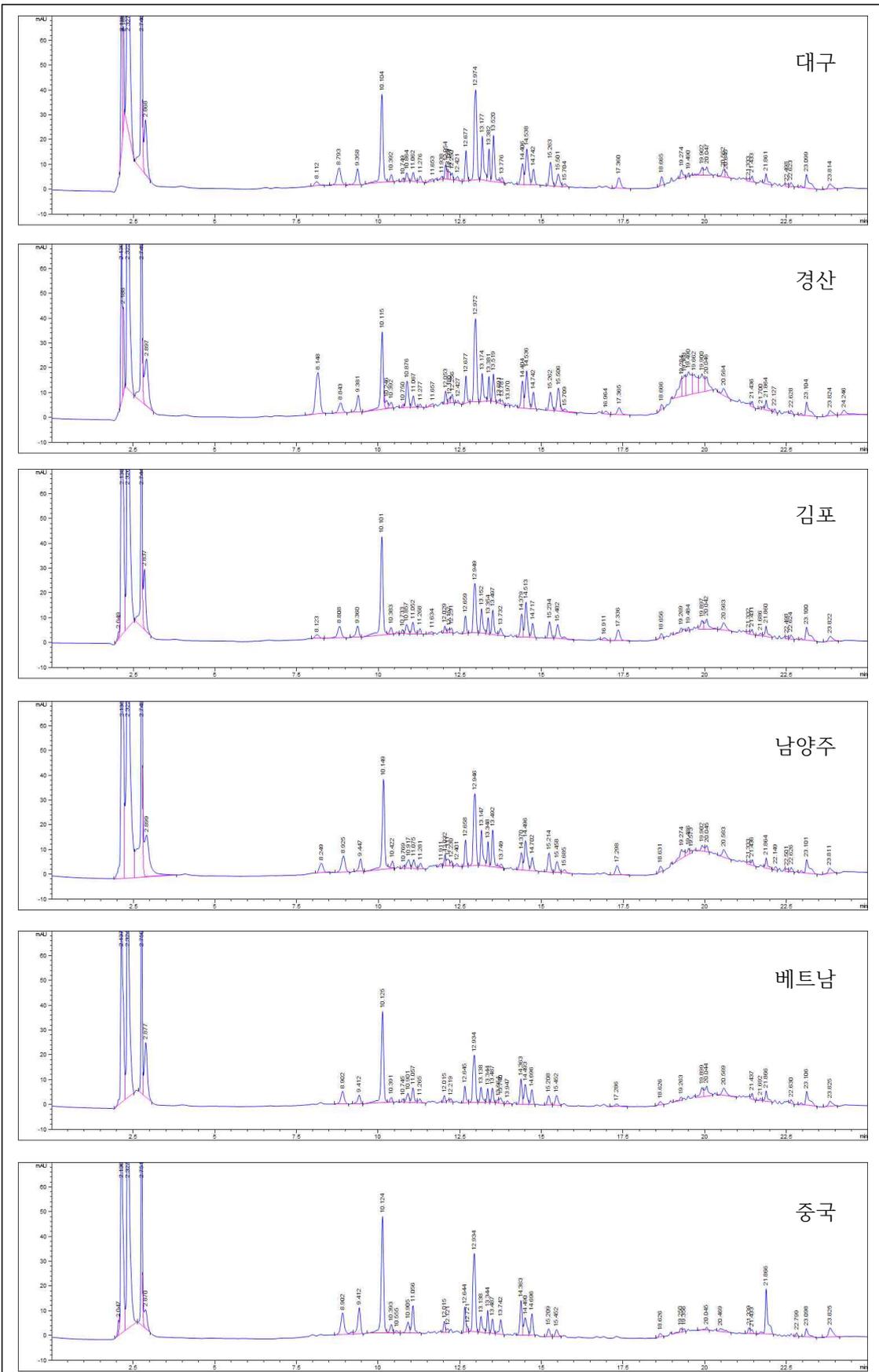
- (1) Chen 등(2012)과 Zhu 등(2016)의 내용을 근거로 하여 연자육의 phenolic compound를 지표물질 후보군으로 지정함. 다음과 같이 HPLC를 통해 시료의 페놀성 화합물의 특성을 분석함[그림 14]

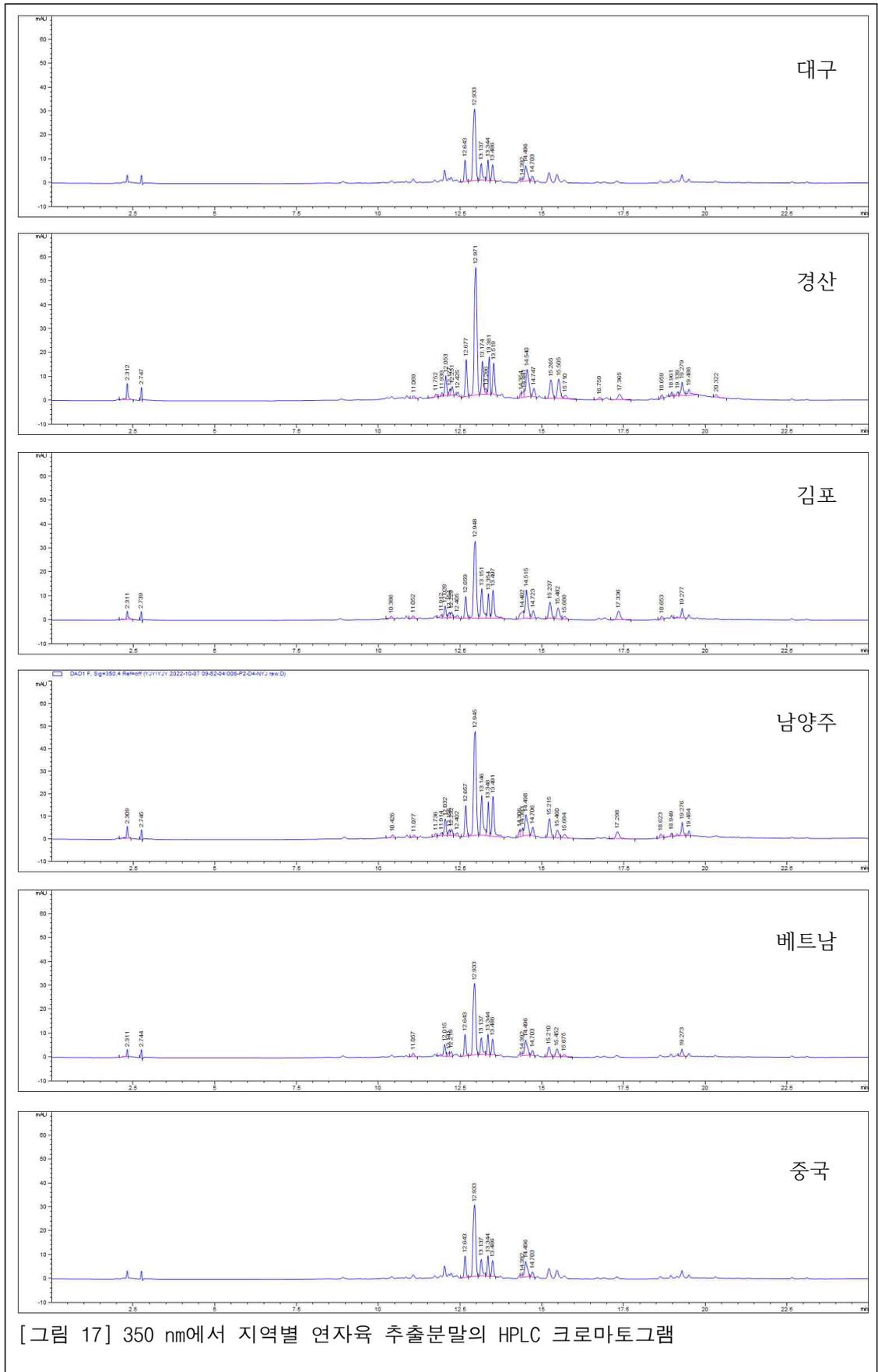
나. 수행결과

- (1) HPLC 분석결과, 다양한 페놀성 화합물 검출 및 특이적 화합물 검토되었음
- (2) 시료 7종의 HPLC 크로마토그램 동일성 확인하였음
- (3) HPLC 크로마토그램 Peak의 페놀성 화합물을 동정중에 있음



[그림 15] 320 nm에서 지역별 연자육 추출분말의 HPLC 크로마토그램





[그림 17] 350 nm에서 지역별 연자육 추출분말의 HPLC 크로마토그램

⑤ 원료 속의 지표성분 규명, 선정 및 함량 확인: Fatty acid 분석

가. 수행방법

Journal of Agricultural and Food Chemistry

원방의 유지와 단백질의 구성에 관한 연구 1189

18 **ABSTRACT:** The purpose of this study was to investigate the fatty acid and phytosterol
 19 contents in ethanol extracts of lotus seeds and rhizomes. These ethanol extracts were
 20 extracted with hexane. The hexane extracts were hydrolyzed in a microwave reactor and total
 21 fatty acids and phytosterols were analyzed. The hexane extracts were also subjected to silica
 22 gel column chromatography. Nonpolar components (triglycerides and steryl-fatty acid esters)
 23 were hydrolyzed and then the contents were analyzed. Polar components (diglycerides,
 24 monoglycerides, fatty acids, and phytosterols) were analyzed directly. Seeds contained higher
 25 concentrations of fatty acids and phytosterols compared to rhizomes. **Linoleic acid, palmitic**
 26 **acid, and oleic acid were the main fatty acid components in seeds and rhizomes,** and most of
 27 them in seeds were in the ester form. In seeds, phytosterols existed mainly in the free form
 28 rather than in steryl-fatty acid esters form. β -Sitosterol was the most abundant phytosterol in
 29 seeds and rhizomes.

[그림 18] 참고문헌 관련 이미지

(1) Shin 등(1999)과 Zhao 등(2013)에 의하면 연자육은 불포화지방산의 비율이 상대적으로 높고, 그중에서도 필수지방산인 리놀레산을 다량 함유하는 것으로 보고됨. 한편, 이 같은 식물유래 지방산들은 다방면에서 우수한 생리활성을 나타내는 것으로 보고되고 있음. 이를 근거로 하여 본 연구에서는 연자육의 새로운 지표물질 후보군으로 지방산을 지정, GC를 활용하여 분석 진행

나. 수행결과

(1) 분석결과 연자육에서는 총 5가지의 지방산(Octadecadienoic acid, Palmitic acid, Oleic acid, Behenic acid, α -Linolenic acid)이 검출되었으며 그 중 Octadecadienoic acid 이 가장 높은 함량을 보였음[표 8]

(2) 최종적으로 연자육 원재료, 연자육 추출분말, 연자육 발효추출분말에서 지표물질로 Octadecadienoic acid이 검출되었음. 따라서 본 연구 개발에서 지표물질로 선정하였음

(3) 또한 이 지표물질은 추출, 농축, 발효 공정 중에도 안정성이 확보되었음

[그림 19] 연자육의 표준물질의 크로마토그램

[표 8] 연자육의 지방산 함량

지방산	g/100g	지방산	g/100g
Butyric acid	-	Octadecadienoic acid	0.5841
Caproic acid	-	Arachidic acid	0.0168
Caprylic acid	-	γ -Linolenic acid	-
Capric acid	-	Eicosenic acid	0.0059
Undecanoic acid	-	α -Linolenic acid	0.0605
Lauric acid	-	Heneicosanoic acid	0.0036
Tridecanoic acid	-	Eicosadienoic acid	-
Myristic acid	0.0061	Behenic acid	0.0755
Tetradecenoic acid	-	Eicosatrienoic acid(20:3n-6)	0.0447
Pentadecanoic acid		Docosaenoic acid	
Palmitic acid	0.2694	Eicosatrienoic acid(20:3n-3)	-
Hexadecenoic acid	-	Arachidonic acid	0.0026
Margaric acid	-	Tricosanoic acid	-
Margaroleic acid	-	Docosadienoic acid	-
Stearic acid	0.0215	Lignoceric acid	0.0200
Elaidic acid	-	Eicosapentaenoic acid	-
Oleic acid	0.1197	Nervonic acid	-
Linolelaidic acid	-	Docosahexaenoic acid	-

[2] 연자육 원료의 추출농축 공정 확립

① 추출조건(추출횟수)에 따른 고흡분 수율

가. 수행방법

- (1) 개발 소재의 추출 횟수별 수율 확립을 위해 상기 선정된 온도 조건에서 1~3회 반복 추출을 실시하였음

나. 수행결과

- (1) 횟수별 물 추출은 [표 9]과 같이 1회 14.81%, 2회 17.59%, 3회 19.10%로 3회 반복 추출이 가장 높았음
- (2) 50% 주정은 [표 10]과 같이 1회 12.37%, 2회 14.90%, 3회 15.43%로 3회 반복 추출이 가장 높았음
- (3) 수율 확인 결과 물 3회 반복 추출이 수율 가장 높으나 경제성을 고려해 2회 반복 추출로 확립 후 지표성분을 확인하였음

[표 9] 물 추출 횟수별 수율

물 추출	추출 횟수(10배수, 4시간, 90℃)		
	1회	2회	3회
수율(%)	14.81	17.59	19.10

[표 10] 50% 주정 추출 횟수별 수율

50% 주정 추출	추출 횟수(10배수, 4시간, 70℃)		
	1회	2회	3회
수율(%)	12.37	14.90	15.43

㉓ 추출조건(온도)에 따른 고형분 수율

가. 수행방법

- (1) 개발 소재의 추출 용매 및 온도 조건을 확립하기 위해 물추출 시 80℃, 90℃, 100℃에서 50% 주정 추출 시 50℃, 60℃, 70℃에서 각각 10배수, 4시간, 1회 추출 후 수율을 비교하였음

나. 수행결과

- (1) 물 추출의 경우 아래의 [표 11]과 같이 80℃에서 10.33%, 90℃ 14.81%, 100℃ 16.23%로 100℃ 추출 온도가 가장 수율이 높게 확인되었음
- (2) 50% 주정 추출의 경우 [표 12]와 같이 50℃ 9.91%, 60℃ 10.43%, 70℃ 12.37%로 물 추출보다 수율이 낮게 나타났음
- (3) 수율 확인 결과, 추출 용매 및 온도는 경제성 및 수율을 고려하여 용매는 물, 온도는 90℃ 추출조건으로 확립 후 지표성분을 확인하였음

[표 11] 물 추출 온도별 수율

물 추출	추출 온도(10배수, 4시간, 1회)		
	80℃	90℃	100℃
수율(%)	10.33	14.81	16.23

[표 12] 50% 주정 추출 온도별 수율

50% 주정 추출	추출 온도(10배수, 4시간, 1회)		
	50℃	60℃	70℃
수율(%)	9.91	10.43	12.37

㉔ 효소처리조건(처리시간, 온도)에 따른 고휘분 수율

가. 수행방법

(1) 개발 소재의 효소처리 조건을 확립하기 위해 프로타아제를 투입 후 30℃, 40℃, 50℃에서 각 30분, 1시간, 2시간 처리 후 수율을 비교하였음

나. 수행결과

- (1) 30℃에서 효소처리 시 아래의 [표 13]과 같이 30분에서 7.3%, 1시간 8.1%, 2시간 8.9%로 2시간 효소처리 시 가장 높았음
- (2) 40℃에서 효소처리 시 아래의 [표 14]과 같이 30분에서 8.4%, 1시간 9.2%, 2시간 9.4%로 2시간 효소처리 시 가장 높았음
- (3) 50℃에서 효소처리 시 아래의 [표 15]과 같이 30분에서 8.1%, 1시간 8.8%, 2시간 8.9%로 2시간 효소처리 시 가장 높았음
- (4) 수율 확인 결과, 효소처리 온도, 시간은 경제성 및 수율을 고려하여 40℃ 2시간 처리조건으로 확립 후 지표성분을 확인하였음

[표 13] 효소처리 30℃ 수율

프로타아제 30℃	처리 시간		
	30분	1시간	2시간
수율(%)	7.3	8.1	8.9

[표 14] 효소처리 40℃ 수율

프로타아제 40℃	처리 시간		
	30분	1시간	2시간
수율(%)	8.4	9.2	9.4

[표 15] 효소처리 50℃ 수율

프로타아제 50℃	처리 시간		
	30분	1시간	2시간
수율(%)	8.1	8.8	8.9

④ 농축조건(농축온도, 압력)에 따른 고품분 수율

가. 수행방법

(1) 개발 소재의 농축조건을 확립하기 위해 추출액을 각각 40℃, 50℃, 60℃와 50mbar, 70mbar, 90mabr 조건에서 30brix 농축 후 수율 및 소요시간을 비교하였음

나. 수행결과

(1) 40℃에서 농축 시 아래의 [표 16]과 같이 50mbar에서 95.2%/22분, 70mbar에서 96.2%/27분, 90mbar에서 96.5%/31분으로 측정되었음
 (2) 50℃에서 농축 시 아래의 [표 17]과 같이 50mbar에서 95.7%/20분, 70mbar에서 95.4%/26분, 90mbar에서 95.9%/29분으로 측정되었음
 (3) 60℃에서 농축 시 아래의 [표 18]과 같이 50mbar에서 95.3%/17분, 70mbar에서 95.0%/19분, 90mbar에서 95.8%/22분으로 측정되었음
 (4) 수율 확인 결과, 조건별 차이가 크게 나지 않았으며 경제성 및 시간을 고려하여 60℃ 50mbar 조건으로 확립 후 지표성분을 확인하였음

[표 16] 농축 40℃ 수율 및 시간

농축 40℃	처리 시간		
	50mbar	70mbar	90mbar
수율(%)	95.2	96.2	96.5
소요시간(분)	22	27	31

[표 17] 농축 50℃ 수율 및 시간

농축 50℃	처리 시간		
	50mbar	70mbar	90mbar
수율(%)	95.7	95.4	95.9
소요시간(분)	20	26	29

[표 18] 농축 60℃ 수율 및 시간

농축 60℃	처리 시간		
	50mbar	70mbar	90mbar
수율(%)	95.3	95.0	95.8
소요시간(분)	17	19	22

[3] 연자육 추출분말 최적 공정 확립

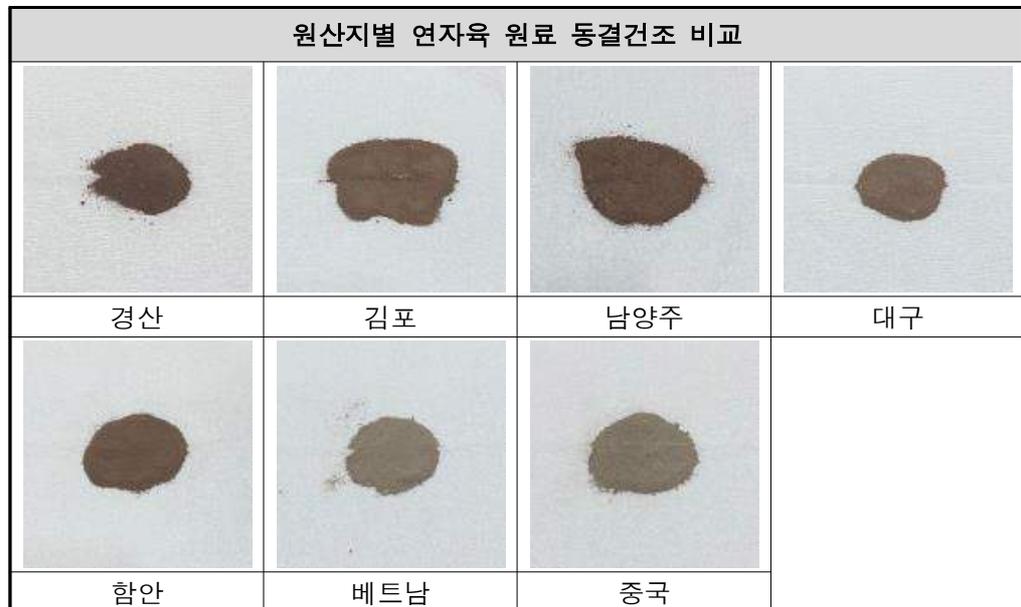
① 분말화조건(분무건조, 동결건조)에 따른 고휘분 수율

가. 수행방법

- (1) 개발소재의 추출 최적조건에 따라 제조한 농축액을 부형제 첨가 없이 살균 후 분무건조를 통해 실시하였음
- (2) 개발소재의 추출 최적조건에 따라 제조한 농축액을 부형제 첨가 없이 살균 후 동결건조를 통해 실시하였음

나. 수행결과

- (1) 개발소재의 분무건조 분말은 색상 및 수율이 부적합함. 이에 부형제를 비율별로 혼합 후 분말을 제조하여 비교할 예정
- (2) 개발소재의 동결건조 분말은 흡습으로 인한 뭉침이 발생하였음. 이에 동결건조 공정은 적절하지 못하였음
- (3) 연자육 추출분말 제조공정은 분무건조로 선정하였음



[그림 20] 원산지별 연자육 동결건조 분말

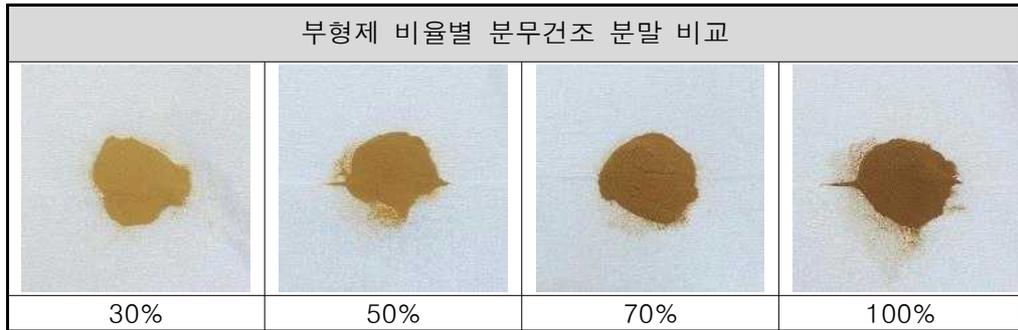
② 농축액과 부형제의 혼합비 결정

가. 수행방법

- (1) 개발소재의 추출 최적조건에 따라 제조한 농축액에 덱스트린을 고휘분 대비 비율별로 혼합 및 살균하여 분무건조를 실시하였음
- (2) 개발소재의 분무건조 분말은 [그림 21]과 같이 부형제 혼합 비율별 분말의 색 및 성상을 비교하였음

나. 수행결과

(1) 성상 및 경제성을 고려하여 덱스트린 50% 혼합 분말로 확립하였음

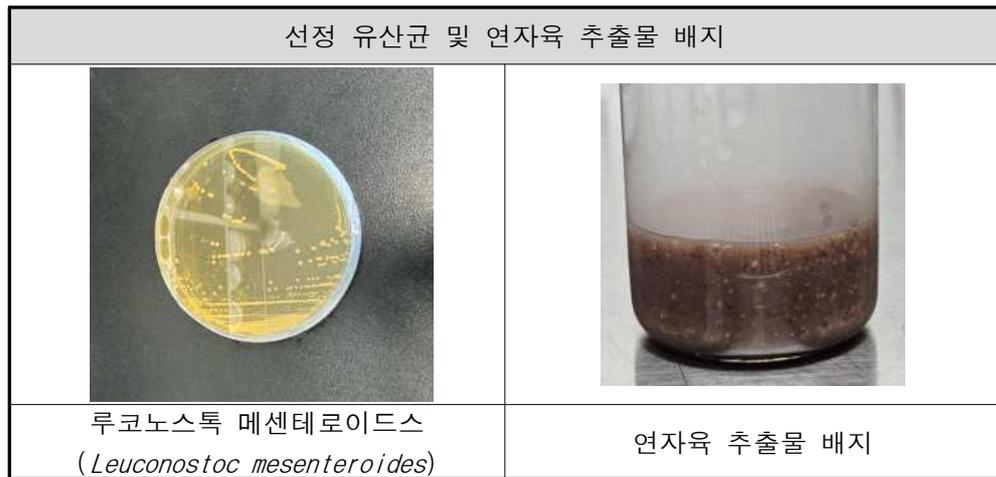


[그림 21] 부형제 비율별 분무건조 분말

[4] 연자육 추출물의 발효 공정 확립

① 연자육 추출물을 포함하는 식용배지 조성 확립: 유산균의 선정 및 연자육 추출물 제조
가. 수행방법

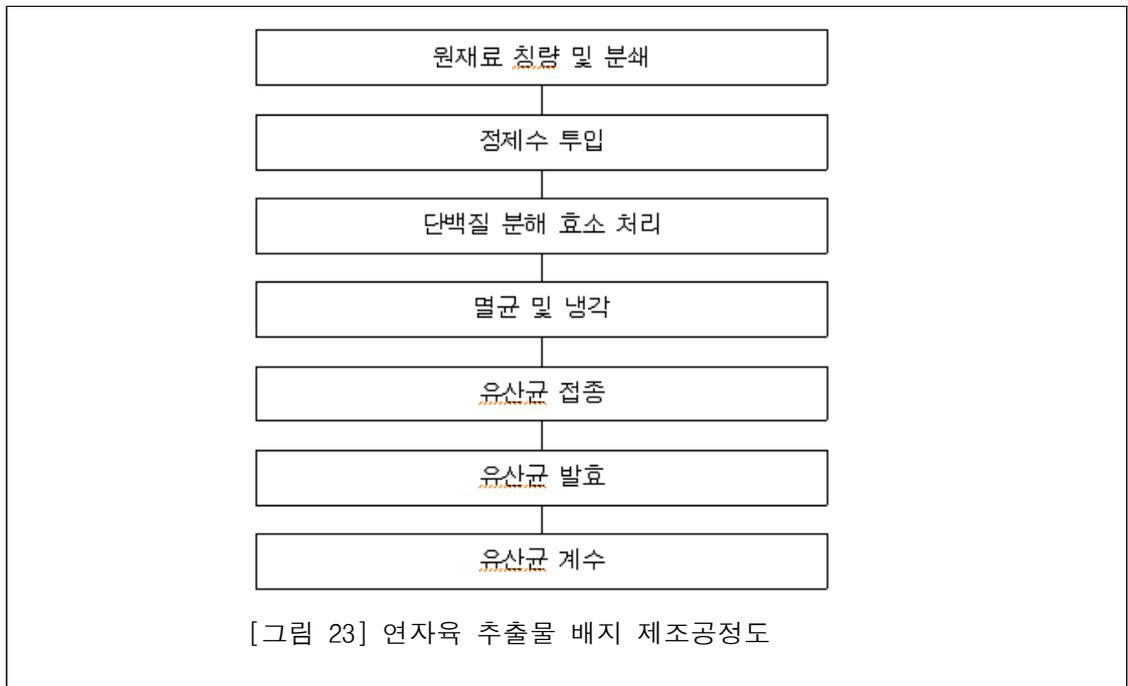
- (1) 본 연구개발에 사용한 균주는 세계김치연구소로부터 기술이전 받은 유산균 루코노스톡 메센테로이드스 WK32를 사용하였음
- (2) 본 연구개발에 사용한 연자육 추출물 배지는 연자육을 분쇄하여 분말로 사용하였음. 연자육과 물의 중량비는 실험의 조건에 따라 제조한 후 효소처리하고 최종적으로 121℃에서 15분간 멸균하여 유산균 배지로 사용하였음



[그림 22] 선정 유산균 및 연자육 추출물 배지

나. 수행결과

- (1) 유산균 루코노스톡 메센테로이드스 WK32의 최적배양조건은 정치배양 조건에서 35~37도에서 잘 자라며, 대수증식기(exponential growth phase)는 16~20시간임. 따라서 본 연구개발에서는 연자육 발효를 위해서 유산균은 정치배양 조건과 배양 온도 36도 조건에서 배양하였음
- (2) 유산균 발효를 위한 연자육 추출물 배지 제조방법은 다음과 같은 공정을 개발하였음[그림 23]. 본 연구개발에서 식용배지 최적화를 위해서 연자육 추출물 배지에 탄소원과 미량원소를 첨가할때는 효소처리 공정 후 첨가하여 사용하였음



② 연자육 추출물을 포함하는 식용배지 조성 확립: 상용배지(MRS, YPD)와 연자육 추출물 배지에서 유산균 생육 특성 조사

가. 수행방법

- (1) 상용배지는 MRS배지와 YPD배지를 사용하였고, 연자육 추출물 배지는 YPD배지 조성물 중 질소원인 Peptone과 Yeast 함량을 연자육 함량으로 대체하여 사용하였음
- (2) YPD배지와 연자육 추출물 배지는 미량원소 0.2% K₂HPO₄를 첨가하였음[표 19]

[표 19] 배지별 조성물

구분	조성물
MRS 배지	제품명: Difco Lactobacilli MRS Broth(회사명:BD)참고
YPD 배지	1% Yeast, 2% Peptone, 2% Dextrose(Glucose)
연자육 추출물 배지	3% 연자육분말, 0.2% Dextrose,

나. 수행결과

- (1) 세 가지 배지에서의 생육 특성을 조사하기 위해서 배양시간 1일과 2일 후의 생균수를 확인하였음
- (2) 배양 1일 후의 생균수는 MRS배지의 경우 13.5×10^8 CFU/mL, YPD 배지의 경우 5.5×10^8 CFU/mL, 연자육 추출물 배지의 경우 0.9×10^8 CFU/mL 이었음. 배양 2일 후의 생균수는 세 가지 배지에서 모두 감소하였음. 따라서 연자육 추출물을 활용하여 유산균 발효의 가능성을 확인하였음[표 20]

[표 20] 배지별 배양 생균수

구분	MRS 배지	YPD 배지	연자육 추출물 배지
배양 1일 생균수	13.5×10^8	5.5×10^8	0.9×10^8
배양 2일 생균수	2.0×10^8	0.9×10^8	0.4×10^8

- (3) 일반적으로 미생물을 배양하기 위해서는 성장에 필요한 영양분을 적절히 배합하여 공급하여야 함. 특히 산업현장에서 미생물을 배양할 시에는 최소한의 비용이 소비

되는 배지 조성이 필수적임. 이러한 경제적인 배지를 제조하기 위해서는 불필요한 영양소의 첨가를 최소화하고 같은 영양소를 가지는 저렴한 물질 개발이 필수적임. 미생물의 영양요소는 주로 물, 탄소원, 질소원, 인산, 마그네슘, 기타 무기염류, 비타민 등이 있음

- (4) 상용배지 MRS의 경우, 오랫동안 유산균 배지로 사용되고 있지만 고가이며 식용이 불가능한 원료 때문에 산업적으로 이용하기 부적합함. 미생물의 배지 영양소 중 질소원으로 사용되는 효모추출물과 펩톤은 상업적으로 많이 사용되나 주로 동물성 유래 단백질로서 인체에 부작용을 유발시키는 위험성이 있어 최근에는 식물성 유래 질소원 개발 중에 있음. 이에 연자육을 이용한 배지는 산업용 미생물 식물성 배지로서 유용한 개발 가치가 있음

㉔ 연자육 추출물을 포함하는 식용배지 조성 확립: 연자육 추출물 배지의 함량에 따른 유산균 생육 특성 조사

가. 수행방법

- (1) 식물성 배지인 연자육 추출물 배지는 연자육의 함량을 5, 10, 15, 및 20%가 포함하도록 하고 미량원소는 각각 동일하게 0.2% K_2HPO_4 를 첨가하여 배지를 제조하였음
 (2) 연자육 추출물 배지의 함량에 따른 유산균 생육 특성을 조사하기 위해서 배양 1일 후 흡광도, pH, 생균수를 측정하였음

나. 수행결과

- (1) 연자육의 함량 5, 10%은 생균수가 증가하였으나 15%와 20%는 연자육의 농도가 높아짐에 따라 굳는 현상이 발생하여 측정할 수 없었음[표 21].
 (2) 연자육 추출물 배지 (10% 연자육과 0.2% K_2HPO_4)에서 균체의 흡광도(OD), pH, 생균수는 각각 1.460, 4.17, 6.0×10^8 CFU/mL 이었음. 따라서 연자육 추출물 배지의 연자육 함량은 10%로 선정함

[표 21] 배지별 결과값

연자육 추출물 배지조성	OD(600nm)	pH	생균수(CFU/mL)
5% 연자육	0.355	4.13	3.4×10^8
5% 연자육 + 0.2% K_2HPO_4	0.687	4.19	3.6×10^8
10% 연자육 + 0.2% K_2HPO_4	1.460	4.17	6.0×10^8
15% 연자육 + 0.2% K_2HPO_4	-	-	-
20% 연자육 + 0.2% K_2HPO_4	-	-	-

④ 연자육 추출물을 포함하는 식용배지 조성 확립: 연자육 추출물 배지의 미량원소에 따른 유산균 생육 특성조사

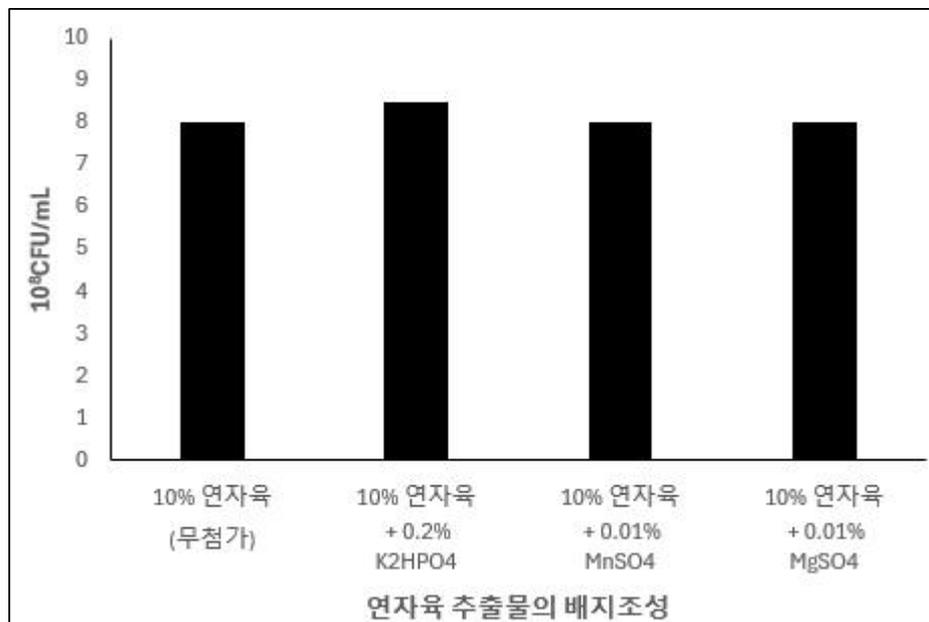
가. 수행방법

(1) 10% 연자육 추출물 배지의 미량원소에 따른 유산균 생육 특성 조사를 위해 0.2% K_2HPO_4 , 0.01% $MnSO_4$, 0.01% $MgSO_4$ 를 첨가하여 유산균을 1일 배양하여 생균수를 측정하였음

나. 수행결과

(1) 가장 많은 생균수는 0.2% K_2HPO_4 첨가한 실험군이었으며 반면 미량원소를 첨가하지 않는 실험군에서는 가장 적은 생균수가 측정되었음[그림 24]

(2) 연자육 추출물 배지의 최적화를 위해서는 미량원소를 첨가하기로 결정함



[그림 24] 연자육 추출물의 미량원소 배지별 생균수

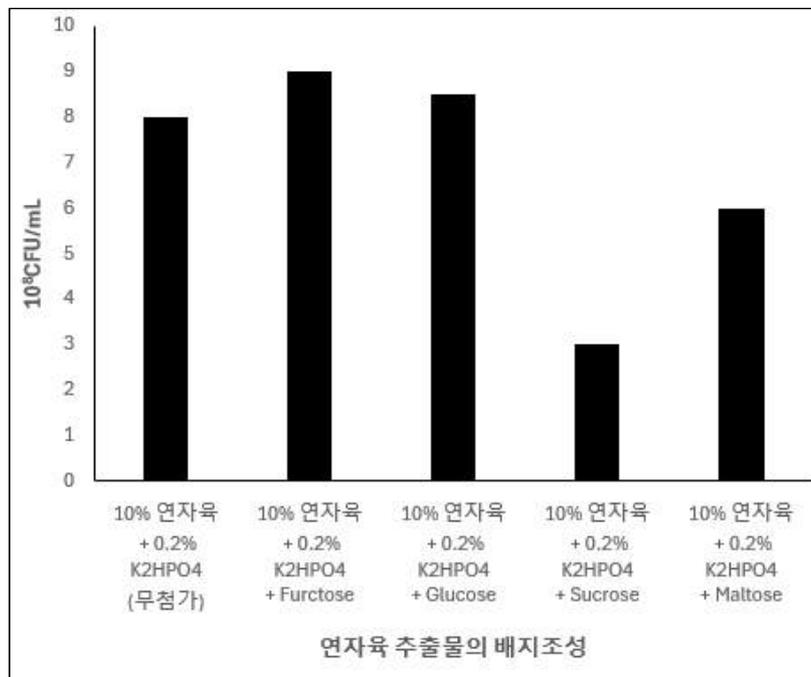
⑤ 연자육 추출물을 포함하는 식용배지 조성 확립: 연자육 추출물 배지의 탄소원에 따른 유산균 생육 특성조사

가. 수행방법

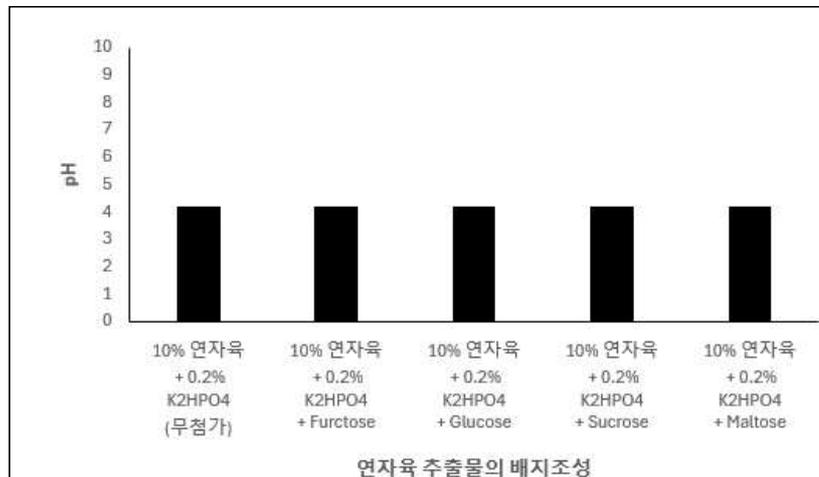
(1) 10% 연자육 추출물 배지의 탄소원에 따른 유산균 생육 특성 조사를 위해 2% 과당(Fructose), 포도당(Glucose, Dextrose), 설탕(Sucrose), 엿당(Maltose)을 첨가하여 유산균을 1일 배양하여 pH와 생균수를 측정하였음

나. 수행결과

(1) 생균수의 경우 과당>포도당>엿당>설탕 순으로 많았음. 당을 첨가하지 않는 실험군에서는 포도당을 첨가한 실험군과 거의 유사한 생균수가 측정되었음[그림 25]. pH의 경우 모든 실험군에서는 약 4.2 였음[그림 26]



[그림 25] 연자육 추출물의 탄소원 배지별 생균수



[그림 26] 연자육 추출물의 탄소원 배지별 pH

⑥ 연자육 추출물을 포함하는 식용배지 조성 확립: 연자육 추출물 배지의 탄소원과 미량원소에 따른 유산균 생육 특성 조사

가. 수행방법

- (1) 10% 연자육 추출물 배지의 탄소원과 미량원소에 따른 유산균 생육 특성 조사를 위해 탄소원은 2% 과당(Fructose), 포도당(Glucose, Dextrose), 설탕(Sucrose), 엿당(Maltose)을 각각 첨가 및 무첨가하였음
- (2) 미량원소는 0.2% K₂HPO₄, 0.01% MnSO₄, 0.01% MgSO₄를 첨가 및 무첨가하여 유산균을 1일 배양하여 생균수를 측정하였음

나. 수행결과

- (1) 10% 연자육 추출물 배지에 탄소원과 미량원소를 첨가한 실험군에서는 생균수의 경우 과당>포도당>엿당>설탕 순으로 많았음[표 22]. 산업적 측면에서 유산균의 프리바이오틱스로써 과당보다는 포도당이 유리함
- (2) 또한 10% 연자육 추출물 배지에 탄소원과 미량원소를 무첨가한 실험군에서도 유산균이 잘 자라는 것을 확인하였음
- (3) 따라서, 최종적으로 연자육 추출물을 포함하는 식용배지의 조성은 10% 연자육, 2% 포도당, 0.2% K₂HPO₄, 0.01% MnSO₄, 0.01% MgSO₄ 로 정하였음.

[표 22] 연자육 추출물의 탄소원과 미량원소에 따른 배지별 생균수

연자육 추출물 배지 조성			생균수(CFU/mL)
연자육	미량원소	탄소원	
10% 연자육	무첨가	무첨가	8.0 × 10 ⁸
	0.2% K ₂ HPO ₄ 0.01% MnSO ₄ 0.01% MgSO ₄	2% Fructose	9.5 × 10 ⁸
		2% Glucose	8.7 × 10 ⁸
		2% Sucrose	3.0 × 10 ⁸
		2% Maltose	5.0 × 10 ⁸

⑦ 연자육 추출물의 최적 발효조건 확립 : 발효조건, 성장곡선

가. 수행방법

- (1) 상기 실험 결과들과 산업적 경제성을 고려하여 연자육 추출물의 유산균 발효 최적 조건을 정하였음
- (2) 최적 발효 공정에 따라 배양액의 흡광도를 측정하여 유산균의 성장곡선을 나타내었음

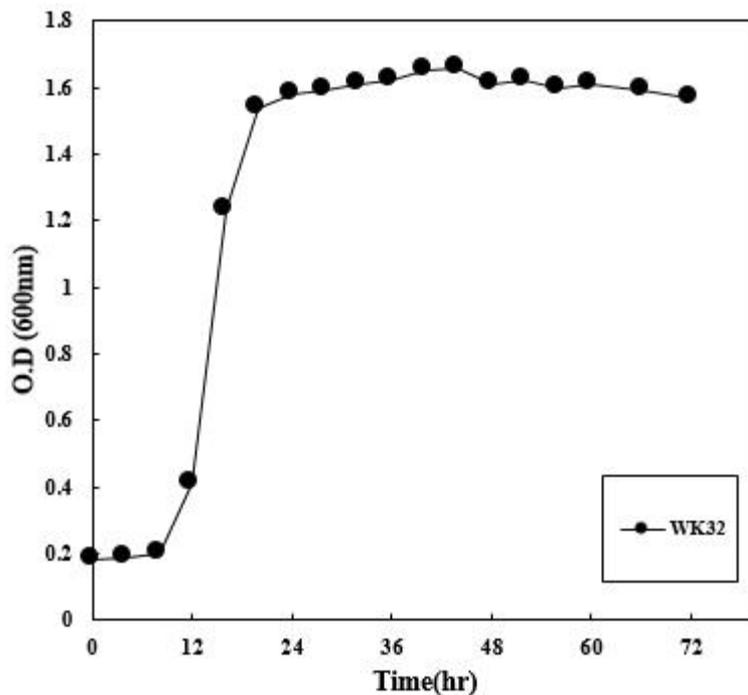
나. 수행결과

- (1) 상기 실험 결과들을 바탕으로 산업적 경제성을 고려하여 [표 23]와 같은 최적 발효조건을 정하였음

[표 23] 최종 배지조성 및 발효조건

유산균	배지조성	발효온도	교반조건	발효시간
루코노스톡 메센테로이드스 (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>)	10% 연자육, 2% Glucose, 0.2% K ₂ HPO ₄ , 0.01% MnSO ₄ , 0.01% MgSO ₄	36℃	정치배양	24시간

- (2) 최적 발효 조건에 따른 유산균 성장곡선을 다음과 같이 나타냈음[그림 27]



[그림 27] 최적 발효 조건에 따른 유산균 성장곡선

- (3) 최종적으로 연자육 추출물의 발효 공정을 확립하였으며, 이 공정으로 스케일업과 대량생산을 수행하였음

[5] 연자육 제품(추출분말, 발효추출분말) 대량생산 조건 확립

① 연자육 추출분말 대량생산 조건 확립: 추출

가. 수행방법

(1) 자사가 보유한 20kg, 200kg, 700kg 추출기 [그림 28]을 이용하여 scale-up 과정 중 문제점 및 수율을 확인하였음



[그림 28] 추출 scale-up

나. 수행결과

(1) 개발소재의 추출탱크 용량별 수율은 최적 추출조건에서 재현성 확인을 위해 2회 반복 진행하였고, 최종 수율은 [표 24]와 같이 20kg 추출기에서 21.87%, 200kg 24.31%, 700kg 25.15%로 점차 증가하였음
 (2) 개발소재의 scale-up 중 추출탱크 scale이 증가할수록 수율도 증가하였으며, 대량 생산 시에도 문제가 없을 것으로 생각됨

[표 24] 추출탱크 용량별 수율

scale-up	추출기			
	구분	20kg	200kg	700kg
수율(%)	1회	21.22	24.50	25.34
	2회	22.51	24.12	24.96
	average	21.86	24.31	25.15

② 연자육 추출분말 대량생산 조건 확립: 농축

가. 수행방법

- (1) 개발소재의 대량생산중 농축조건 확립을 위해 순차적인 scale-up 농축 진행
- (2) 농축기 20리터 → 200리터 → 1톤 순으로 진행
- (3) 각 scale-up 공정별 성상 및 수율 확인

나. 수행결과

(1) 20L, 200L, 1t 농축기로 진행한 결과 수율 및 성상에 유사한 결과를 확인하였음. 따라서 대량생산에 적용할 수 있을 것으로 판단됨

		
20L 농축기	200L 농축기	1t 농축기

[그림 29] 농축 scale-up

③ 연자육 추출분말 대량생산 조건 확립: 분말화

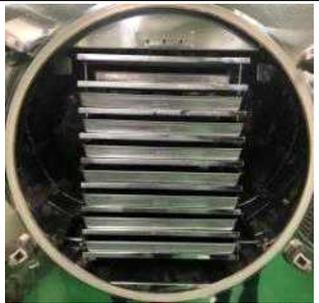
가. 수행방법

- (1) 개발소재의 대량생산중 분말화 조건 확립을 위해 분무건조와, 동결건조 scale-up 진행
- (2) 파일럿 분무건조기, 동결건조기 → 대량생산용 분무건조기, 동결건조기 순으로 진행
- (3) 분무건조 분말 성상 확인을 위한 분무건조 진행 후 각 시료별 성상 및 수율 확인
- (4) 동결건조 분말 성상 확인을 위한 동결건조 진행 후 각 시료별 성상 및 수율 확인

나. 수행결과

(1) 파일럿 분무건조기, 대량생산용 분무건조기에서 순차적으로 진행한 결과, 수율 및 성상에 유사한 결과를 확인하였음. 따라서 대량생산에 적용할 수 있을 것으로 판단됨

(2) 최종적으로 연자육 추출분말화 공정은 동결건조 분말 생산 시 흡습으로 인한 뭉침이 발생하였음. 이에, 농축액의 부피와 시간대비 경제성을 고려하여 분무건조 공정이 적합하다고 판단됨

		
파일럿 분무건조기	대량생산용 분무건조기	동결건조

[그림 30] 분말화 scale-up

④ 연자육 발효추출분말 대량생산 조건 확립: 효소처리 및 발효

가. 수행방법

- (1) 개발소재의 대량생산중 발효 조건 확립을 위해 순차적인 scale-up 효소처리 및 발효 진행
- (2) 발효조 20리터 → 200리터 → 1톤 순으로 진행
- (3) 각 scale-up 공정별 성상 및 수율 확인

나. 수행결과

- (1) 20L, 200L, 1t 발효조를 이용, 순차적으로 진행한 결과 수율, 균수 및 성상에 유사한 결과를 확인하였음. 따라서 대량생산에 적용할 수 있을 것으로 판단됨



[그림 31] 발효 scale-up

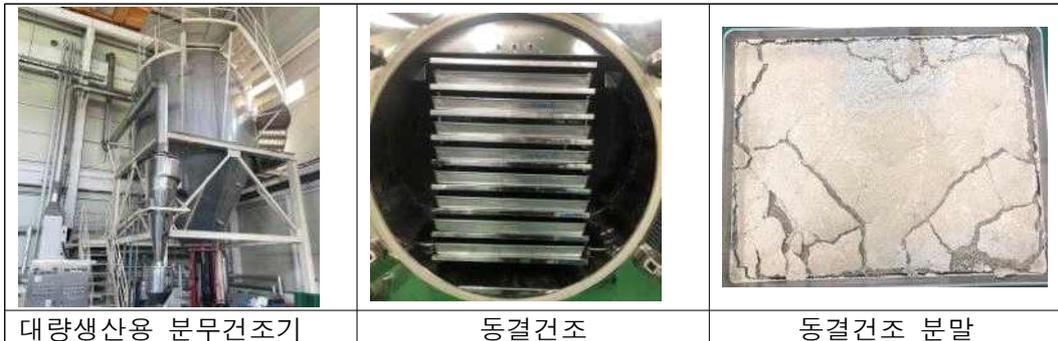
⑤ 연자육 발효추출분말 대량생산 조건 확립: 분말화

가. 수행방법

- (1) 개발소재의 대량생산중 분말화 조건 확립을 위해 분무건조와, 동결건조 scale-up 진행
- (2) 파일럿 분무건조기, 동결건조기 → 대량생산용 분무건조기, 동결건조기 순으로 진행
- (3) 분무건조 분말 성상 확인을 위한 분무건조 진행 후 각 시료별 성상 및 수율 확인
- (4) 동결건조 분말 성상 확인을 위한 동결건조 진행 후 각 시료별 성상 및 수율 확인

나. 수행결과

- (1) 파일럿 분무건조기, 대량생산용 분무건조기에서 순차적으로 진행한 결과 수율 및 성상에 특이사항은 없으나 분말의 유산균수 측정 시 동결건조 분말에 비해 부족함
- (2) 최종적으로 연자육 발효추출분말화 공정은 동결건조 분말 생산 시 분무건조 분말에 비해 유산균수가 많았으며, 균수 확보를 위해 동결건조 분말이 적절하다고 판단됨. 이에, 연자육 발효추출분말은 동결건조 공정으로 정함



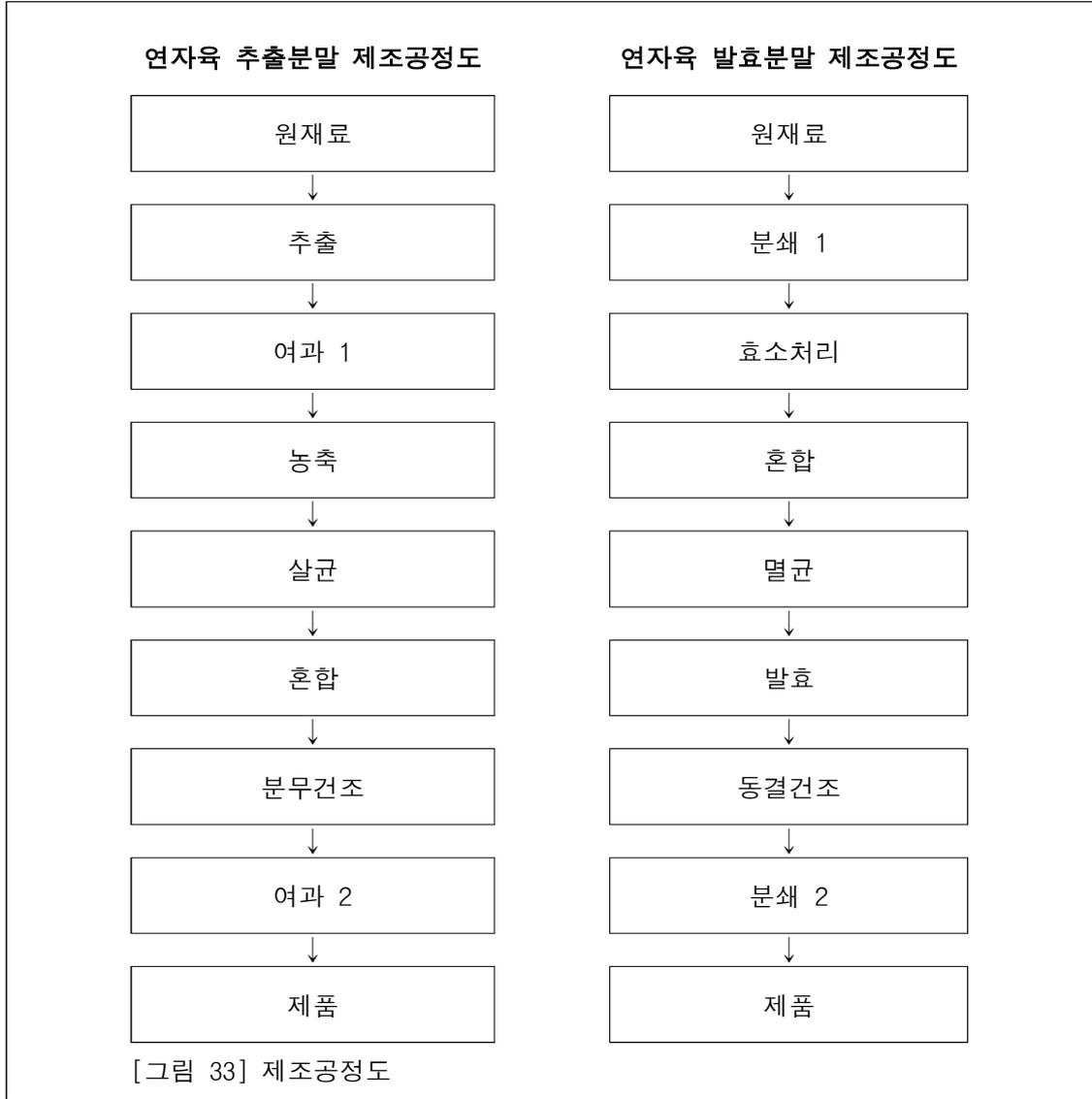
[그림 32] 분말화 scale-up

⑥ 제조공정도 확립

가. 수행방법

(1) 개발소재의 확립된 최적조건을 토대로 개발제품의 제조공정도를 나타내었음
[그림 33]

나. 수행결과



⑦ 대량생산

가. 수행방법

- (1) 연자육 추출분말의 제조공정도에 따라 1t 추출 및 분무건조를 통해 시생산 하였음
- (2) 연자육 발효추출분말의 제조공정도에 따라 1t 발효 및 동결건조를 통해 시생산 하였음

나. 수행결과



[6] 연자육 제품(추출분말, 발효추출분말)의 안정성 평가

① 연자육 제품(추출분말, 발효추출분말)에 대한 흡습성 분석

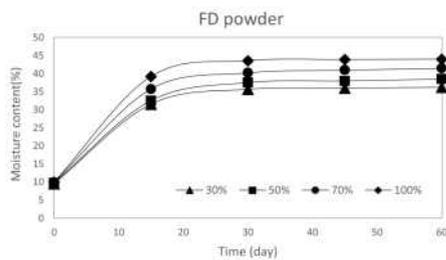
가. 수행방법

- (1) 저장 중 연자육 추출분말과 발효추출분말의 제형적 안정성 검토를 위해 다음과 같이 시료를 저장한 뒤 이의 흡습성을 조사함
- i. 저장조건 : 온도 35℃, 상대습도 85%의 고온다습한 조건에서 2달간 시료 저장, 염용액으로 포화된 데시케이터에 동량의 시료군이 담긴 페트리디쉬를 넣고 항온기에서 각각 평형에 도달시키며 저장
 - ii. 시료 : 고형분 함량이 각기 다른 연자육 추출 FD/SD 분말
 - iii. 수분함량 변화검토 : 시료의 수분함량은 105℃ 상압 건조법으로 측정
 - iv. 육안평가 : 원료 표면의 수분감 확인, 분말의 고결화 정도 확인, 변색확인
 - v. 흡습량 측정 : 초기 무게에서 증량된 만큼의 무게를 측정하여 흡습량 추정

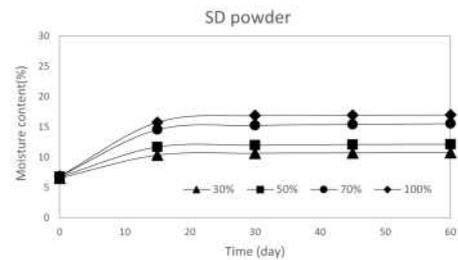
나. 수행결과

(1) 연자육 추출분말

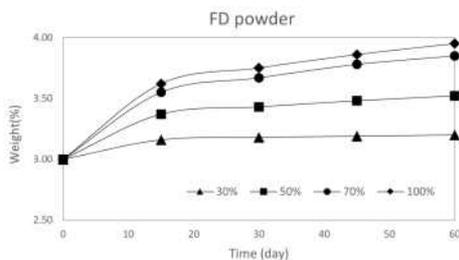
- i. 분석결과, 저장 초기 연자육 추출분말은 모두 비슷한 평균대의 수분함량을 나타냄. 이후 저장 중 고형분 함량의 비율이 높을수록 수분함량이 증가하는 모습을 보임. FD 처리한 분말은 대개 흡습에 대해 불안정한 모습을 보였으며, 육안관찰에서 큰 제형 변화를 나타냄. 반면 SD 분말은 비교적 안정적인 모습을 보였으며 외형적 특성에 큰 변화를 보이지 않음
- ii. 흡습량 측정결과, FD 분말은 초기 원료무게 대비 저장 후 최대 0.32% 증량한 반면, SD 분말은 최소 0.02%~최대 0.06%의 증량(%)을 보여 비교적 흡습에 강한 모습을 나타냄. 위 결과들을 종합하였을 때 연자육 추출분말의 제형적 안정성을 고려한 공정조건으로는 고형분 50%이하, SD 처리가 적합할 것으로 사료됨



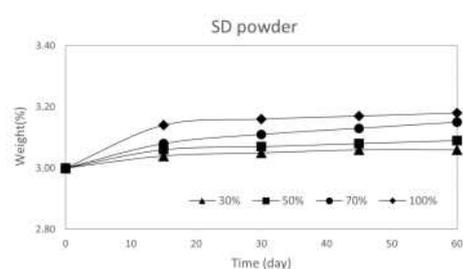
[그림 35] 연자육 추출 FD 분말의 저장 중 수분함량



[그림 36] 연자육 추출 SD 분말의 저장 중 수분함량



[그림 37] 연자육 추출 FD 분말의 저장 중 무게변화



[그림 38] 연자육 추출 SD 분말의 저장 중 무게변화

[표 25] 연자육 추출분말의 저장 중 외형적 변화

	고형분 (%)	고결화 정도	변색유무	제형적 변화
FD 분말	30	△	X	○
	50	○	○	○
	70	○	○	○
	100	○	○	○
SD 분말	30	X	X	X
	50	X	X	X
	70	X	X	X
	100	△	X	X

(2) 연자육 발효추출분말

- i. 연자육 발효추출분말은 두 달간의 저장 기간 동안 외형적 변화와 수분함량의 변화는 크게 변화가 없었음
- ii. 연자육 발효추출분말은 흡습에 안정한 것으로 판단됨

② 연자육 제품(추출분말, 발효추출분말)에 대한 미생물 안정성평가

가. 수행방법

- (1) 이물 : 식품공전 > 제2. 식품일반의 대한 공통기준 및 규격 > 3. 식품일반의 기준 및 규격
- i. 규격 : 식품은 다음의 이물을 함유하여서는 아니됨
- ① 원료의 처리과정에서 그 이상 제거되지 아니하는 정도 이상의 이물
 - ② 오염된 비위생적인 이물
 - ③ 인체에 위해를 끼치는 단단하거나 날카로운 이물 다만, 다른 식물이나 원료 식물의 표피 또는 토사, 원료육의 털, 뼈 등과 같이 실제에 있어 정상적인 제조·가공상 완전히 제거되지 아니하고 잔존하는 경우의 이물로서 그 양이 적고 위해 가능성이 낮은 경우는 제외함
 - ④ 금속성 이물로서 쇳가루는 제8. 1.2.1 마. 금속성이물(쇳가루)에 따라 시험하였을 때 식품 중 10.0 mg/kg 이상 검출되어서는 아니되며, 또한 금속이물은 2 mm 이상인 금속성 이물이 검출되어서는 아니 됨
- (2) 일반세균수 : 식품공전 > 제8. 일반시험법 > 4. 미생물시험법 > 4.5 세균수 > 건조필름법
- i. 4.3 제조법에 따른 시험용액 1 mL와 각 10배 단계 희석액 1 mL를 세균수 건조필름배지(배지 53 또는 69)에 각 2매 이상씩 접종한 후 잘 흡수시키고 35±1℃에서 48±2시간 배양한 후 생성된 붉은 집락수를 계산하고 그 평균집락수에 희석배수를 곱하여 일반세균수로 함
- ii. 시험용액을 가하지 아니한 동일 희석액 1 mL를 대조시험액으로 하여 시험조작의 무균여부를 확인함
- iii. 균수 산출 및 기재보고는 4.5.1 일반세균수 [그림 39]를 따라 함
- (3) 대장균군 : 식품공전 > 제8. 일반시험법 > 4. 미생물시험법 > 4.7 대장균군 > 건조필름법
- i. 4.3 제조법에 따른 시험용액 1 mL와 각 10배 단계 희석액 1 mL를 2매 이상씩 대장균군 건조필름배지 I(배지 54) 또는 대장균군 건조필름배지 II(배지 70)에 접종한 후, 35±1℃에서 24±2시간 배양함
- ii. 시험용액을 가하지 아니한 동일 희석액 1 mL를 대조시험액으로 하여 시험조작의 무균여부를 확인함. 대장균군 건조필름배지 I에서는 붉은 집락 중 주위에 기포를 형성한 집락수를 계산하고, 대장균군 건조필름배지 II에서는 청색 및 청녹색의 집락수를 계산하여 그 평균집락수에 희석배수를 곱하여 대장균군 수를 산출함
- iii. 균수 산출 및 기재보고는 4.5.1 일반세균수 [그림 39]를 따라 함

(1) 15-300CFU/plate인 경우

$$N = \frac{\Sigma C}{\{(1 \times n1) + (0.1 \times n2)\} \times (d)}$$

- N = 식육 g 또는 mL 당 세균 집락수
 ΣC = 모든 평판에 계산된 집락수의 합
 n1 = 첫 번째 희석배수에서 계산된 평판수
 n2 = 두 번째 희석배수에서 계산된 평판수
 d = 첫 번째 희석배수에서 계산된 평판의
 희석배수

구 분	희석 배 수		CFU/g(mL)
	1:100	1:1,000	
집 락 수	232 244	33 28	24,000

$$N = \frac{(232+244+33+28)}{\{(1 \times 2) + (0.1 \times 2)\} \times 10^{-2}}$$

$$= 537 / 0.022 = 24,409 = 24,000$$

(2) 15CFU/plate 미만인 경우

구 분	희석 배 수		CFU/g(mL)
	1:10	1:100	
집 락 수	14 10	2 1	120

$$N = \frac{(14+10)}{\{(1 \times 2) \times 10^{-1}\}}$$

$$= 24 / 0.2 = 120$$

[그림 39] 4.5.1 일반세균수 균수 산출법

나. 수행결과

(1) 연자육 추출분말 안정성평가(이물, 대장균군, 일반세균) 결과 적합함

[표 26] 연자육 추출분말 안정성평가(이물, 대장균군, 일반세균) 결과

원산지	연자육 원료	연자육 추출분말	안정성평가시험 및 규격		
			이물	대장균군	일반세균
			없어야 함	n=5, c=1, m=0, M=10	1,000 cfu/g 이하
경산			적합	적합	적합
김포			적합	적합	적합
남양주			적합	적합	적합
대구			적합	적합	적합
함안			적합	적합	적합
베트남			적합	적합	적합
중국			적합	적합	적합

(2) 연자육 발효추출분말 안정성평가(이물, 대장균군, 일반세균) 결과 적합함

[표 27] 연자육 발효추출분말 안정성평가(이물, 대장균군, 일반세균) 결과

원산지	연자육 원료	연자육 발효추출분말	안정성평가시험 및 규격	
			이물	대장균군
			없어야 함	n=5, c=1 m=0, M=10
대구			적합	적합

③ 연자육 제품(추출분말, 발효추출분말)에 대한 유해물질 안정성 평가

가. 수행방법

(1) 중금속(납) : 식품 공전 > 제8. 일반시험법 > 9. 식품 중 유해물질 시험법 > 9.1 중금속

- i. 질산분해법 및 마이크로웨이브법으로 시험용액을 조제하여 유도결합플라즈마-질량분석법(아르곤 가스에 고주파를 유도결합방법으로 걸어 방전되어 얻어진 아르곤 플라즈마에 시험용액을 주입하여 분석원소의 질량값에 대한 분석 강도를 측정하여 시험용액 중의 분석원소의 농도를 구함)에 따라 시험함
- ii. 표준용액 및 시험용액을 ICP-MS에 주입하여 시험용액의 농도를 구함. 다만 염을 다량 함유하는 검체는 염에 의한 간섭을 줄이기 위하여 염 농도를 최소화하도록 하여 분석함
- iii. 검량선에서 얻어진 표준물질과 내부표준물질의 분석강도에 대한 비[AS/AIS]를 Y축으로 하고 표준물질의 농도를 X축으로 하여 검량선을 작성하고 시험용액의 분석강도 비[ASAM/ASAMIS]를 Y축에 대입하여 분석원소의 농도를 계산함

(2) 중금속(카드뮴) : 식품 공전 > 제8. 일반시험법 > 9. 식품 중 유해물질 시험법 > 9.1 중금속

- i. 질산분해법 및 마이크로웨이브법으로 시험용액을 조제하여 유도결합플라즈마-질량분석법(아르곤 가스에 고주파를 유도결합방법으로 걸어 방전되어 얻어진 아르곤 플라즈마에 시험용액을 주입하여 분석원소의 질량값에 대한 분석 강도를 측정하여 시험용액 중의 분석원소의 농도를 구함)에 따라 시험함
- ii. 표준용액 및 시험용액을 ICP-MS에 주입하여 시험용액의 농도를 구함. 다만 염을 다량 함유하는 검체는 염에 의한 간섭을 줄이기 위하여 염 농도를 최소화하도록 하여 분석함
- iii. 검량선에서 얻어진 표준물질과 내부표준물질의 분석강도에 대한 비[AS/AIS]를 Y축으로 하고 표준물질의 농도를 X축으로 하여 검량선을 작성하고 시험용액의 분석강도 비[ASAM/ASAMIS]를 Y축에 대입하여 분석원소의 농도를 계산함

- (3) 중금속(수은) : 식품 공전 > 제8. 일반시험법 > 9. 식품 중 유해물질 시험법 > 9.1 중금속
- i . 9.1.6 원자흡광광도법에 의한 정량(환원기화법) 제조법에 따른 시험용액을 환원기화장치를 이용하여 흡광도를 측정함
 - ii . 시험용액 및 공시험용액, 염화제일주석용액을 시험용액병에 취하여 환원기화장치에 연결한 다음 다이아프램펌프(diaphragm pump)에 의해 공기를 흡수셀 중에 순환시켜 파장 253.7 nm에서 흡광도를 측정함. 수은표준용액 0, 5, 10, 15, 20 mL에 물을 가해서 100 mL로 하여 시험용액과 같은 조작을 한 다음 각각의 흡광도를 측정하여 작성한 검량선으로부터 수은(Hg)의 함량을 구함
- (4) 중금속(비소) : 식품 공전 > 제8. 일반시험법 > 9. 식품 중 유해물질 시험법 > 9.1 중금속
- i . 질산분해법 및 마이크로웨이브법으로 시험용액을 조제하여 유도결합플라즈마-질량분석법(아르곤 가스에 고주파를 유도결합방법으로 걸어 방전되어 얻어진 아르곤 플라즈마에 시험용액을 주입하여 분석원소의 질량값에 대한 분석 강도를 측정하여 시험용액 중의 분석원소의 농도를 구함)에 따라 시험함
 - ii . 표준용액 및 시험용액을 ICP-MS에 주입하여 시험용액의 농도를 구함. 다만 염을 다량 함유하는 검체는 염에 의한 간섭을 줄이기 위하여 염 농도를 최소화하도록 하여 분석함
 - iii . 검량선에서 얻어진 표준물질과 내부표준물질의 분석강도에 대한 비[AS/AIS]를 Y축으로 하고 표준물질의 농도를 X축으로 하여 검량선을 작성하고 시험용액의 분석강도 비[ASAM/ASAMIS]를 Y축에 대입하여 분석원소의 농도를 계산함
- (5) 총 아플라톡신(B1,B2,G1 및 G2) : 식품 공전 > 제8. 일반시험법 > 9. 식품 중 유해물질 시험법 > 9.2 곰팡이독소
- i . 검체 중의 아플라톡신(B1, B2, G1 및 G2)을 70% 메탄올로 추출한 후 면역친화성칼럼으로 정제하여 트리플루오로초산(trifluoroacetic acid)으로 유도체화시킨 것을 형광검출기가 부착된 액체크로마토그래프로 분석함
 - ii . 아플라톡신 혼합표준용액 1 mL를 각각 취하여 50° C에서 질소로 건조시킨 후 9.2.2 제조법에 따른 시험용액의 유도체화에 따라 조작한 것을 액체크로마토그래프에 주입한 후 얻어진 크로마토그램상의 피크 높이 또는 면적을 이용하여 검량선을 작성함
 - iii . 정성시험 및 정량시험 후 각 아플라톡신의 피크높이 또는 피크면적을 검량선에 대입하여 정량함
- (6) 잔류농약 : 식품 공전 > 제8. 일반시험법 > 7. 식품 중 잔류농약 시험법 > 7.1 식품일반
- i . 검체 1 kg에서 정한 사용부위에 해당하는 전량을 혼합·분쇄하여 균질화한 후 개별시험법에서 정한 무게를 정밀히 달아 시료로 사용함
 - ii . 7.1.1 제조법에 따른 시험용액으로 시험함
 - iii . 다성분 시험법 및 단성분시험법(시료를 아세톤으로 추출한 후 플로리실 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 기체크로마토그래프로 측정함)으로 측정함

나. 수행결과

(1) 연자육 추출분말 안정성평가(중금속, 총 아플라톡신, 잔류농약) 결과 적합함
 [표 28] 연자육 추출분말의 안정성평가(중금속, 총 아플라톡신, 잔류농약) 결과

원산지	연자육 원료		연자육 추출분말
대구			
안정성평가지험 및 규격			
구분	납	0.1mg/kg 이하	적합
	카드뮴	0.3mg/kg 이하	적합
	수은	-	적합
	비소	-	적합
	총 아플라톡신	15.0 μ g/kg 이하	불검출
	잔류농약	-	불검출

(2) 연자육 발효추출분말 안정성평가(중금속, 총 아플라톡신, 잔류농약) 결과 적합함
 [표 29] 연자육 발효추출분말의 안정성평가(중금속, 총 아플라톡신, 잔류농약) 결과

원산지	연자육 원료		연자육 발효추출분말
대구			
안정성평가지험 및 규격			
구분	납	0.1mg/kg 이하	적합
	카드뮴	0.3mg/kg 이하	적합
	수은	-	적합
	비소	-	적합
	총 아플라톡신	15.0 μ g/kg 이하	불검출
	잔류농약	-	불검출

[7] 연자육의 항산화활성 및 총 폴리페놀 함량

① 항산화 활성(in vitro)

가. 수행방법

(1) 연자육의 항산화활성을 조사하기 위해 연자육 (원재료)는 건조 연자육을 분쇄하여 분말화한 것을 사용하였고, 연자육 추출분말은 분무건조(spray drying, SD)하여 분말화한 것을 시료로 사용하였음. 이들의 항산화 활성은 DPPH radical scavenging activity를 통해 분석함. 측정방법 및 계산식은 아래와 같음

- i. sample 희석액 0.1 mL + 0.041mM DPPH 0.9 mL 혼합
- ii. 상온에서 20min 암반응
- iii. 12,000rpm에서 25℃, 20min 원심분리
- iv. 상등액 분리 후 517nm에서 흡광도 측정((UV-1601; Shimadzu, Kyoto, Japan)
- v. 양성대조구 : ascorbic acid, 음성대조구 : D.W

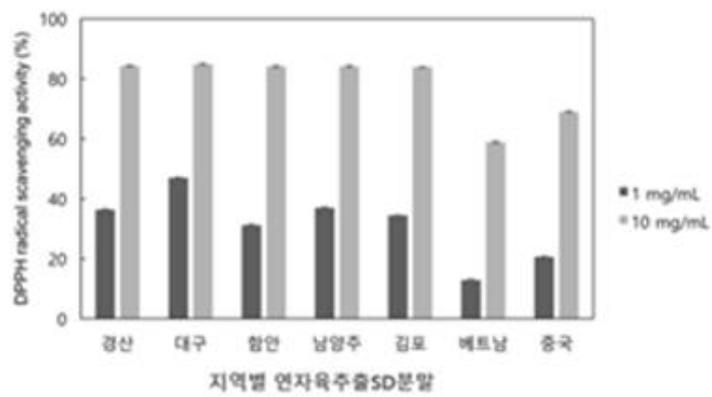
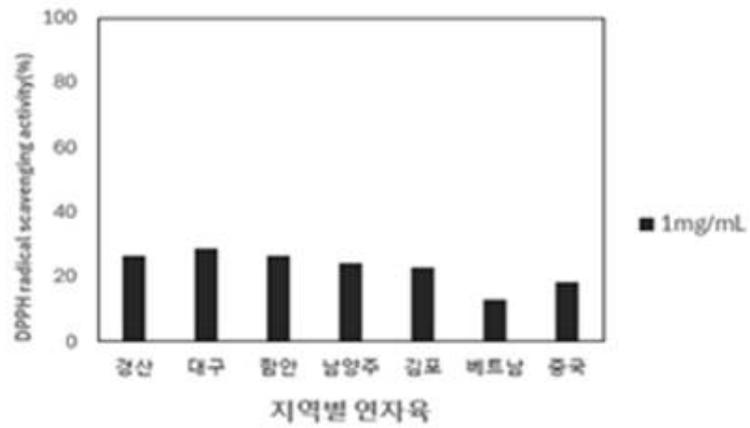
(수식 1)

$$\text{DPPH radical scavenging}(\%) = \left(1 - \frac{A-B}{C}\right) \times 100$$

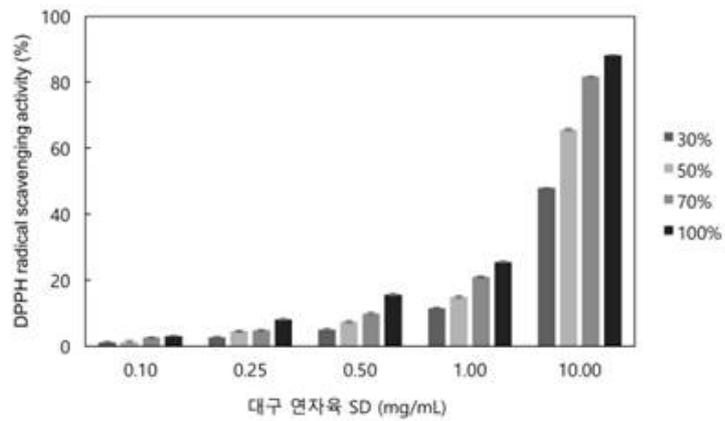
- A: Sample 흡광도
- B: Blank 흡광도
- C: Control 흡광도

나. 수행결과

- (1) 연자육(원재료) 분말의 DPPH 라디칼 소거활성을 분석한 결과, 시료 7종의 연자육은 1 mg/mL의 농도에서 국내 5개 지역의 연자육은 23~25%의 라디칼 소거능을 보였고 국외 베트남과 중국 지역의 연자육은 약13%와 약16%의 라디칼 소거능을 보였음.
- (2) 연자육 추출 분말의 DPPH 라디칼 소거활성을 분석한 결과, 국내 5개 지역의 연자육 모두 10 mg/mL의 농도에서 80% 이상의 우수한 라디칼 소거능을 보임[그림 40]. 10 mg/mL의 농도에서는 국내 5곳 시료 모두 유사한 결과를 보였고 1 mg/mL에서는 유의미한 차를 보여 대구가 가장 우수한 라디칼 소거활성을 보였음. 연자육 추출 분말은 대구가 가장 우수한 항산화활성을 가지는 것으로 나타났으며, 고품분 함량에 따라, 농도 의존적으로 라디칼 소거활성이 증가함이 확인됨. 한편, 국외 지역인 베트남과 중국의 연자육 추출 분말은 국내 연자육 대비 20~40% 이상 낮은 라디칼 소거활성을 보였음[그림 41]



[그림 40] 각 지역별 연자육 및 연자육 추출 SD분말의 DPPH 라디칼 소거활성



[그림 41] 대구 연자육 추출 SD분말의 DPPH 라디칼 소거활성

② 총 폴리페놀 함량

가. 수행방법

- (1) 연자육의 총 폴리페놀 함량을 조사하기 위해 연자육 (원재료)는 건조 연자육을 분쇄하여 분말화한 것을 사용하였고, 연자육 추출분말은 분무건조(spray drying, SD)하여 분말화한 것을 사용하였고, 연자육 발효추출분말은 동결건조 (freeze drying, FD)하여 분말화한 것을 시료로 사용하였음. 이들의 총 폴리페놀 함량 측정방법은 아래와 같으며 계산은 gallic acid(GA)를 사용한 표준농도곡선으로부터 환산, GA 당량(GAE/mL)으로 산출
- i. 희석한 연자육 분말 용액 0.5 + 2% Na₂CO₃ 1 mL 첨가 후 실온 3분 반응
 - ii. 50% Folin-Ciocalteu 시약 0.2 mL 첨가 후 20분간 실온, 암반응
 - iii. 12,000rpm에서 10분간 원심분리
 - iv. 상등액 분리 후 750nm에서 흡광도 측정

나. 수행결과

- (1) 연자육(원재료) 분말의 총 폴리페놀 함량을 분석한 결과, 시료 7종의 연자육은 14~18 mg GAE/g을 보였고 이 중 대구가 18.17 mg GAE/g 으로 가장 높았음
- (2) 각 지역별 연자육 추출분말의 총 폴리페놀 함량을 분석한 결과, 대구가 65.61 mg GAE/g 으로 가장 높았으며, 그 외 국내 지역들은 비슷한 수준의 함량을 보였음 [표 30]. 한편, 베트남과 중국의 연자육 시료는 국내 연자육 시료보다 상대적으로 페놀 함량이 낮은 것으로 확인됨
- (3) 고형분 함량에 따른 대구 연자육 추출분말과 발효추출 분말의 총 폴리페놀 함량 변화는 [표 31]와 같음

[표 30] 각 지역별 연자육 및 연자육 추출 SD 분말의 총 폴리페놀 함량

Total polyphenol content of <i>Nelumbo nucifera</i> Seed powder							
지역	경산	대구	함안	남양주	김포	베트남	중국
mg GAE/g	15.16	18.17	15.23	16.30	16.24	15.06	14.56
Total polyphenol content of <i>Nelumbo nucifera</i> Seed SD powder							
지역	경산	대구	함안	남양주	김포	베트남	중국
mg GAE/g	39.86	65.61	40.79	46.45	42.71	31.49	35.21

[표 31] 대구지역 연자육 추출 SD분말 및 연자육 발효 FD분말의 총 폴리페놀 함량

Total polyphenol content of <i>Nelumbo nucifera</i> Seed SD powder				
고형분 함량	30%	50%	70%	100%
mg GAE/g	11.61	18.55	25.73	38.82
Total polyphenol content of <i>Nelumbo nucifera</i> Seed FD powder				
고형분 함량	30%	50%	70%	100%
mg GAE/g	6.54	12.74	18.62	23.84

[8] 원료의 표준화

① 원재료에 관한 자료

가. 수행방법

- (1) 원재료는 국내산 연자육을 사용함
 (2) 영양성분과 지표성분은 공인시험분석기관에 의뢰함

나. 수행결과

(1) 원재료의 기원에 관한 정보

[표 32] 연자육

	원재료명		연자육	
	학명		<i>Nelumbo nucifera</i>	
	원산지		대한민국(대구)	
	사용부위		씨앗	
고유번호	명칭	기타명칭 또는 시장명칭	학명	사용부위
A가125200	연꽃	연, Sacred Lotus, East Indian Lotus	Nelumbo nucifera Gaertner	뿌리, 잎 ※(하엽), 꽃(수술), 씨앗(심제외) ※(연자육)

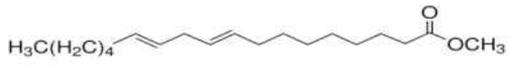
(2) 원재료 성분

- i. 알칼로이드(alkaloid) : Liensine, Neferine, Isoliensinine 등
- ii. 폴리페놀(polyphenol) : Quercetin 배당체, Myricetin 배당체, Kaempferol 배당체 등
- iii. 지방산(fatty acid) : Palmitic acid, Linoleic acid, Oleic acid 등

[표 33] 연자육의 영양성분

성분	100g 당 함량	성분	100g 당 함량
열량(Kcal/100g)	364.7 Kcal	지방	2.7 g
나트륨	23.2 mg	트랜스지방	0.0 g
탄수화물	64.4 g	포화지방	0.8 g
당류	6.3 g	콜레스테롤	0.0 mg
단백질	20.7 g		

[표 34] 연자육의 지표성분: Octadecadienoic acid

일반명	옥타데카다이노익 산(Octadecadienoic acid)
구조	
분자식	C ₁₈ H ₃₂ O ₂
분자량	280.4 g/mol
CAS No.	2566-97-4

② 연자육 추출분말의 제조방법 및 그에 관한 자료

가. 수행방법

(1) 원재료(연자육)는 열수추출 및 여과, 농축, 부형제 덩스트린 혼합, 분무건조하여 제조함

나. 수행결과

[표 35] 제조공정도

제조업체	제조공정	공정, 식품, 식품첨가물	기능/지표성분 함량변화 (mg/g)	중량(kg)
(주)신우 코퍼레이션 (GMP무 대한민국, 자사제조)	원재료	<i>Nelumbo nucifera</i> 사용부위 : 씨앗 대구산, 건조물	-	100
	↓			
	추출	추출용매: 정제수(1000kg) 추출조건: 90℃, 4시간 추출횟수: 2회	-	2100
	↓			
	여과	1 μm 필터	-	1950
	↓			
	농축	농축온도: 60℃ ± 5 진공도 : -500~600 mmHg 농축조건: 고형분 20%까지 농축	-	125
↓				
혼합	말토덱스트린 25 kg 첨가 (고형분 대비 50%)	-	150	
↓				
건조	분무건조(SD): inlet 180℃ (± 10℃) outlet 80℃ (± 5℃)	-	47	
↓				
원료	추출물 고형분 : 부형제 = 50 : 50	0.5	47 (수율 37%)	

(1) 제조공정

- i. 칭량: 건조된 상태의 원재료 연자육을 전자저울을 이용하여 칭량하여 추출기에 넣음
- ii. 추출: 칭량한 연자육에 추출용매 정제수 10배를 추출기에 투입하고, 추출온도 90℃, 추출시간 4시간, 2회 추출함
- iii. 여과: 추출액은 여과기(1 μm)를 사용하여 농축기에 투입함
- iv. 농축: 농축액에서 60도의 온도에서 진공감압농축하여 고형분 20%가 되도록 함
- v. 혼합: 농축액에 부형제 말토덱스트린을 농축액 고형분 대비 50%를 첨가하여 혼합함
- vi. 건조: 분무건조기에서 건조함

㉓ 연자육 추출분말 특성에 관한 자료 : 성상

가. 수행방법

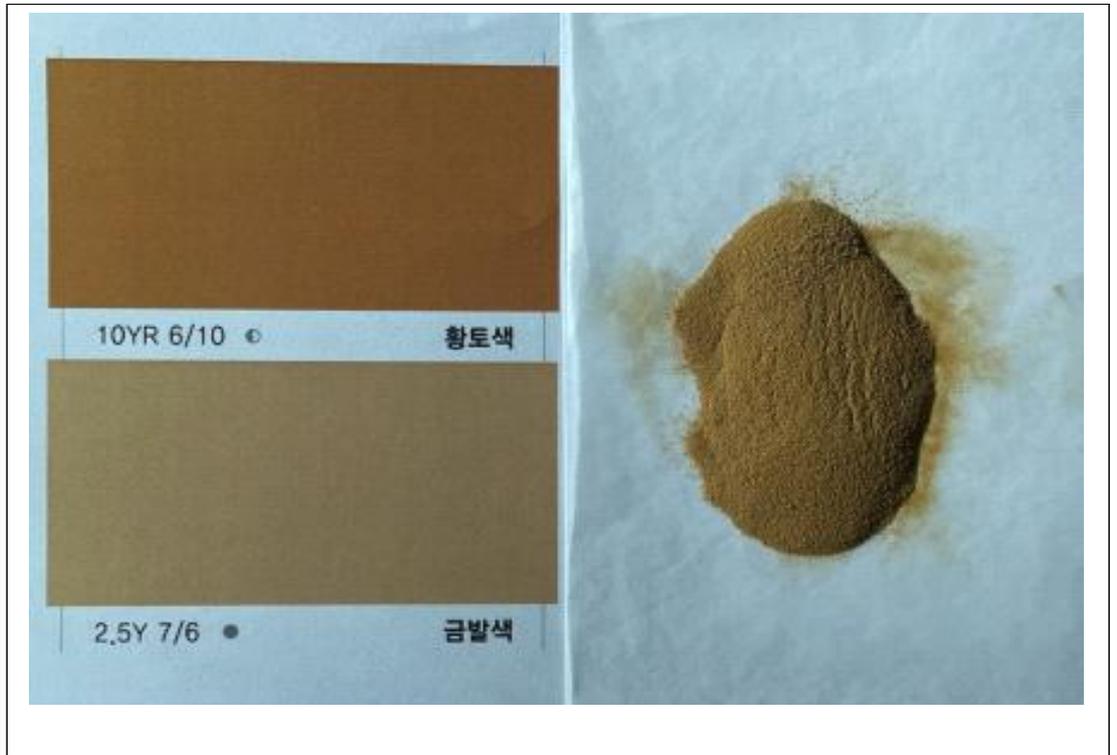
(1) 색차계를 이용하여 성상을 확인하였음

나. 수행결과

(1) 성상: 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 없는 황토색의 분말

[표 36] 성상

맛	향	색상 -채도/명도 -광택	색상 - 색이름 (유채색, 무채색)	형태 - 모양 -기계적 특성 -기화학적 특성	제형
고유의 향미가 있고 이미·이취가 없음		흐린	황토색	분말	-



[그림 42] 색차계 비교사진

[표 37] 성상시험 판정표

시험항목	시험내용		판정		비고
			예	아니오	
맛/향	고유의 향미가 있고 이미·이취가 없는가? *맛과 향에 대한 판단이 어려우므로 판정에서는 제외하나, 이미·이취가 있을 경우에는 비교란에 작성함		-	-	
색상	채도/명도	채도와 명도가 기재한 내용과 동일한가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	광택	광택이 기재한 내용과 동일한가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	색이름	유채색, 무채색 등 계통색 이름 203색채의 색상과 유사한가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
형태	모양	모양이 기재한 내용과 동일한가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	기계적 특성	탄성, 점도, 접착성이 기재한 내용과 동일한가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	기하적 특성	입자성이 기재한 내용과 동일한가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
제형	제형이 기재한 내용과 동일한가?		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
외관	파손 또는 변형된 부분이 없는가?		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	내용물이 흘러나온 흔적이 없는가?		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	표면에 이물질이 묻어있지 않는가?		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

④ 연자육 발효추출분말 제조방법 및 그에 관한 자료

가. 수행방법

(1) 원재료(연자육)는 효소처리 및 혼합 멸균, 발효, 건조, 분쇄하여 제조함

나. 수행결과

[표 38] 제조공정표

(1) 제조업체	(2) 제조공정	(3) 공정, 식품, 식품첨가물	(4) 기능/지표성분 함량변화(mg/g)	(5) 중량(kg)
(주)신우 코퍼레이션 (GMP무 대한민국, 자사제조)	원재료	<i>Nelumbo nucifera</i> 사용부위 : 씨앗 대구산, 건조물	-	100
	↓			
	분쇄 1	40 mesh	-	100
	↓			
	효소처리	프로타아제	-	101
	↓			
	혼합	연자육 덱스트로스 K ₂ HPO ₄ 정제수	-	1000
	↓			
	멸균	멸균온도: 121°C 멸균시간: 30분	-	1000
	↓			
발효	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 발효온도: 36°C±2 발효시간: 24시간 발효조건: 정치배양	-	1000	
↓				
건조	동결건조(FD)	-	100	
↓				
분쇄 2	60 mesh	-	96	
↓				
원료			11	96

(1) 제조과정

- i. 칭량: 건조된 상태의 원재료 연자육을 전자저울을 이용하여 칭량하여 추출기에 넣음
- ii. 분쇄: 칭량한 연자육을 40 mesh 크기로 분쇄기에 투입하여 분쇄함
- iii. 효소처리: 분쇄한 연자육에 프로타아제를 첨가하여 추출조에서 효소처리
- iv. 혼합 및 멸균: 발효조에 연자육, 덱스트로스, K₂HPO₄, 정제수를 혼합 후 121℃에서 30분간 멸균
- v. 발효: 멸균된 혼합액에 루코노스톡 메센테로이드스를 접종하여 36℃ ± 2, 24시간, 정치배양
- vi. 건조: 동결건조기에서 건조
- vii. 분쇄: 건조분말이 60 mesh가 되도록 분쇄기에 투입하여 분쇄

㉞ 연자육 발효추출분말 특성에 관한 자료 : 성상

가. 수행방법

(1) 색차계를 이용하여 성상을 확인하였음

나. 수행결과

(1) 성상: 이미, 이치가 없고 고유의 향미가 없는 황토색의 분말

[표 39] 성상

맛	향	색상 -채도/명도 -광택	색상 - 색이름 (유채색, 무채색)	형태 - 모양 -기계적 특성 -기하학적 특성	제형
	고유의 향미가 있고 이미·이취가 없는	하린	황회색	분말	-



[그림 43] 색차계 비교사진

[표 40] 성상시험 판정표

시험항목	시험내용		판정		비고
			예	아니오	
맛/향	고유의 향미가 있고 이미·이취가 없는가? *맛과 향에 대한 판단이 어려우므로 판정에서는 제외하나, 이미·이취가 있을 경우에는 비교란에 작성함		-	-	
색상	채도/명도	채도와 명도가 기재한 내용과 동일한가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	광택	광택이 기재한 내용과 동일한가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	색이름	유채색, 무채색 등 계통색 이름 203색채의 색상과 유사한가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
형태	모양	모양이 기재한 내용과 동일한가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	기계적 특성	탄성, 점도, 접착성이 기재한 내용과 동일한가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	기하적 특성	입자성이 기재한 내용과 동일한가?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
제형	제형이 기재한 내용과 동일한가?		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
외관	파손 또는 변형된 부분이 없는가?		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	내용물이 흘러나온 흔적이 없는가?		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	표면에 이물질이 묻어있지 않는가?		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

[9] 피로개선

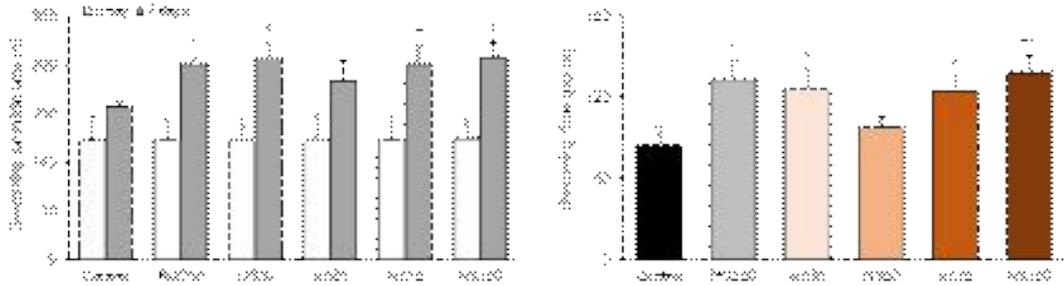
① 강제수영 동물모델 실험을 통한 연자육 추출물의 피로개선 효과 검증

가. 수행방법

- (1) 시료 : (주)신우코퍼레이션으로부터 원료표준화된 연자육 추출분말을 제공받았으며, 고형분 함량에 따른 30%, 50%, 70%, 100%의 연자육 추출분말을 각 NS30, NS50, NS70, NS100으로 명명하여 실험에 사용
- (2) 실험동물 : 6주령 웅성 ICR mouse(Daehan Biolink Co., Ltd., Chung-buk, Korea)를 구입하여 1주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험을 진행함. 동물 사육실 조건은 conventional system으로 온도 $22 \pm 2^\circ \text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$, 명암주기 (light-dark cycle)는 12시간 주기로 조절하였고, 사료(조단백질 18% 이상, 조지방 5.0% 이상, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 1.0% 이상, 인 0.85% 이상, 칼륨 0.55% 이상, 나트륨 0.25% 이상, 마그네슘 0.15% 이상; NIH-41, Zeigler Bros, Inc., Gardners, PA, USA)와 물을 충분히 공급함
- (3) 운동수행 능력 증진 및 항피로 효능 평가
 - i. 군 분리 및 약물 투여 : 실험군은 아무처리도 하지 않는 정상군 (Normal), 증류수를 투여한 대조군 (Control), 홍삼추출물 200 mg/kg를 투여한 양성대조군 (RG200), 연자육 추출물 200 mg/kg를 투여한 NS30군, NS50군, NS70군, NS100군으로 각 군당 9마리 씩 총 7군으로 분류하여 실험을 진행함. 정상군을 제외한 나머지 군은 약물 투여 시작 전 일주일간 매일 15분씩 수영훈련을 진행한 후 군 분리를 진행하였으며, 연자육 추출물과 홍삼추출물은 투여직전에 증류수에 녹여 일정한 시간에 7일간 1일 1회 씩 зонде를 이용하여 경구 투여함
 - ii. 강제수영부하실험 (forced swimming test, FST) : 육체적 피로 유발은 강제수영부하실험을 통해 실시함. 강제수영부하실험은 운동으로 인한 피로 및 지구력을 평가하는 대표적인 방법임. 투명 아크릴 수조 (가로 120 cm, 세로 70 cm, 높이 50 cm)에 증류수 ($20 \sim 22^\circ \text{C}$)를 25 cm 높이까지 채워 마우스 꼬리가 바닥에 닿지 않게 함. 투여 시작 전 (0 day)과 투여 마지막 날 (7 days)에 마우스 체중의 8% 무게의 납을 꼬리에 달아 수영을 실시하여 수영시간을 측정했으며, 마우스의 코가 수면 아래로 잠길 정도의 수영 상태가 5초간 진행되어 가라앉을 때를 탈진 (exhaustion)으로 판정하여 그 시간을 최대 수영시간으로 보고 강제수영부하실험을 종료함
- (4) 혈액 및 조직 분석 : 7일 동안 약물 투여 후 실험동물의 심장에서 혈액을 채혈한 후, 근육조직과 간조직을 적출하여 즉시 생리식염수에 헹구고 각각의 무게를 측정하였으며, 채혈한 혈액을 10분간 원심분리 ($4,000 \text{ rpm}$, 4°C)하여 혈청을 얻었으며, 혈청 내 glutamic oxaloacetic trans-aminase(GOT), glutamic pyruvic transaminase(GPT), blood urea nitrogen(BUN), ammonia, lactate dehydrogenase(LDH), D-lactate, triglyceride(TG), free fatty acid(FFA) level과 근육 조직과 간조직 내 항피로 관련 바이오마커를 분석함
- (5) 통계분석 : 실험수치는 평균과 표준오차로 표시하였으며, SPSS program for windows version 26 (SPSS Inc., Chicago, USA)를 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 실시한 후, least-significant differences (LSD) test로 사후검증을 실시하여 각 군의 평균 차이에 대한 통계적 유의성을 $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ 에서 검증함

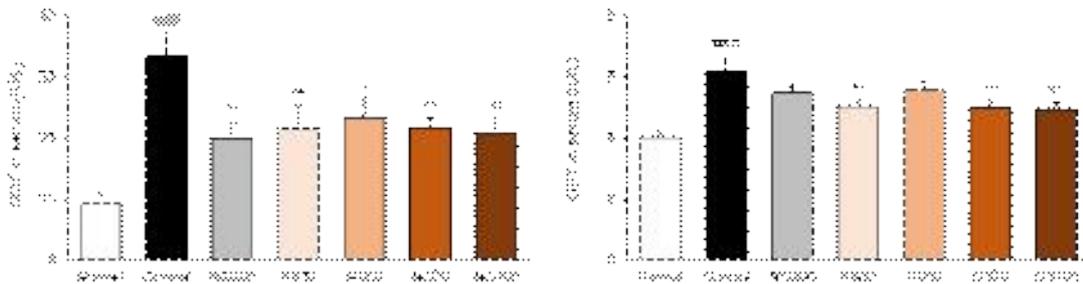
나. 수행결과

(1) 수영 가능시간 : 강제수영부하실험을 실시하여 동물모델의 피로 및 지구력을 연자육 추출분말이 얼마나 개선시켜줄 수 있는가를 분석함. 그 결과 연자육 추출분말 투입군은 대조군보다 효과적인 피로개선 및 지구력 향상을 보였으며 양성 대조군인 RG군과 유사하거나 혹은 그 이상으로 우수한 효과를 보였음. 이때 NS30과 NS100의 결과가 유의적으로 큰 차이는 없었음. 이에 NS30군으로도 충분한 피로개선 효과를 볼 수 있음을 확인함



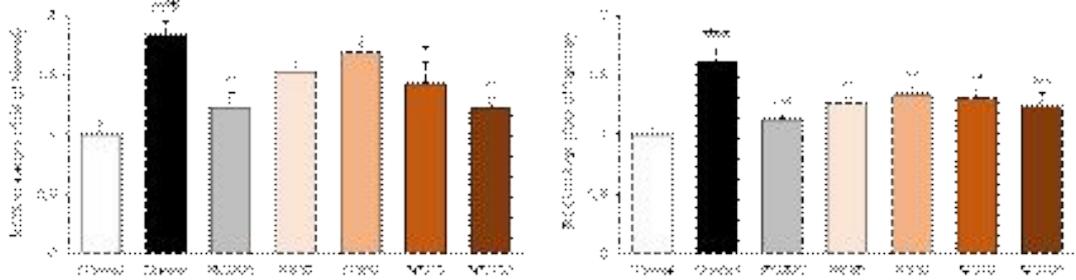
[그림 44] 강제수영부하실험에서 연자육추출분말이 수영가능시간에 미치는 영향

(2) 간 기능에 미치는 영향 : 강제수영운동 후 간 손상지표인 GOT 및 GPT의 수치를 측정한 결과, 대조군 대비 RG군 및 NS군(연자육추출분말)은 모두 혈중 GOT 및 GPT 수치를 유의적으로 감소시킴. GOT의 경우 RG군이 가장 낮은 수치를 보였으나 NS군과 큰 차이는 아니었음. GPT 수치 또한 NS군은 RG군의 결과와 유사하였으며 NS50을 제외하고 고형분 농도와 상관없이 모두 유사한 수치를 보였음. 이에 연자육 추출분말은 피로 누적으로 인한 간 기능 손상으로부터 보호효과를 줄 수 있을 것으로 생각됨



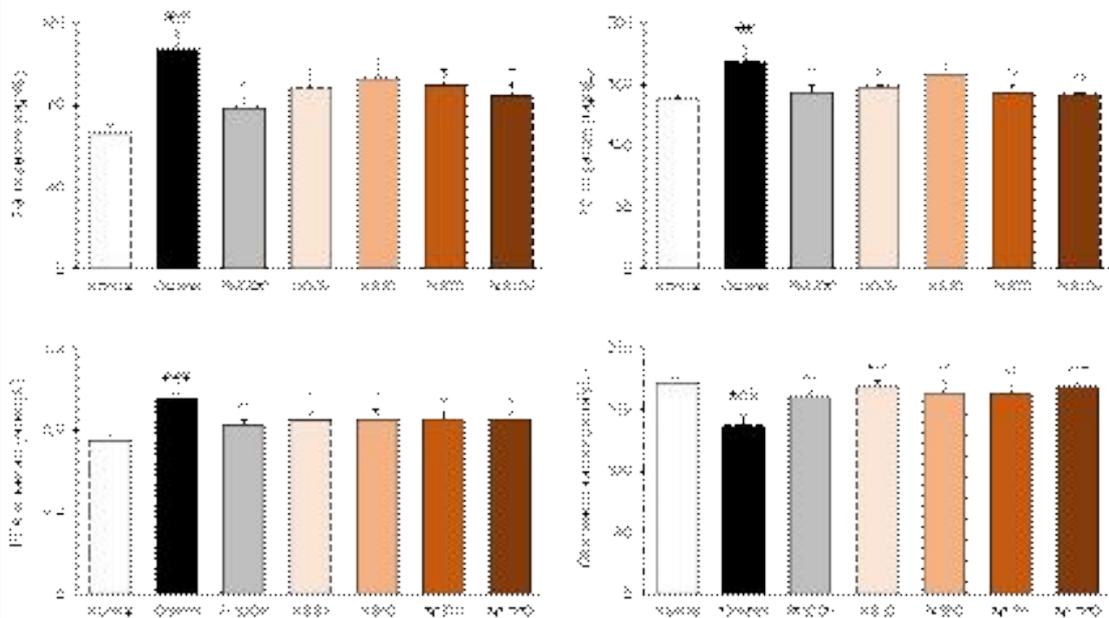
[그림 45] 강제수영부하실험에서 연자육추출분말이 간 기능 보호에 미치는 영향

(3) 혈청 및 간 조직 내 산화적 스트레스에 미치는 영향 : 강제수영운동에 의한 산화적 스트레스 발현 정도를 분석한 결과, 혈청 및 간 조직에서 RG군과 NS군은 모두 대조군보다 ROS 함량을 감소시켰으며, 혈청 내에서는 특히 NS100군이 RG군과 유사한 수준으로 ROS 함량을 감소시켰음. 한편, 간 조직 내에서는 NS군 모두 유의적으로 대조군 대비 ROS 함량을 감소시킨 모습이 관찰됨. 이에 연자육 추출분말은 피로 누적에 의한 산화적 스트레스를 감소시키는데 영향을 줄 수 있을 것으로 보여짐



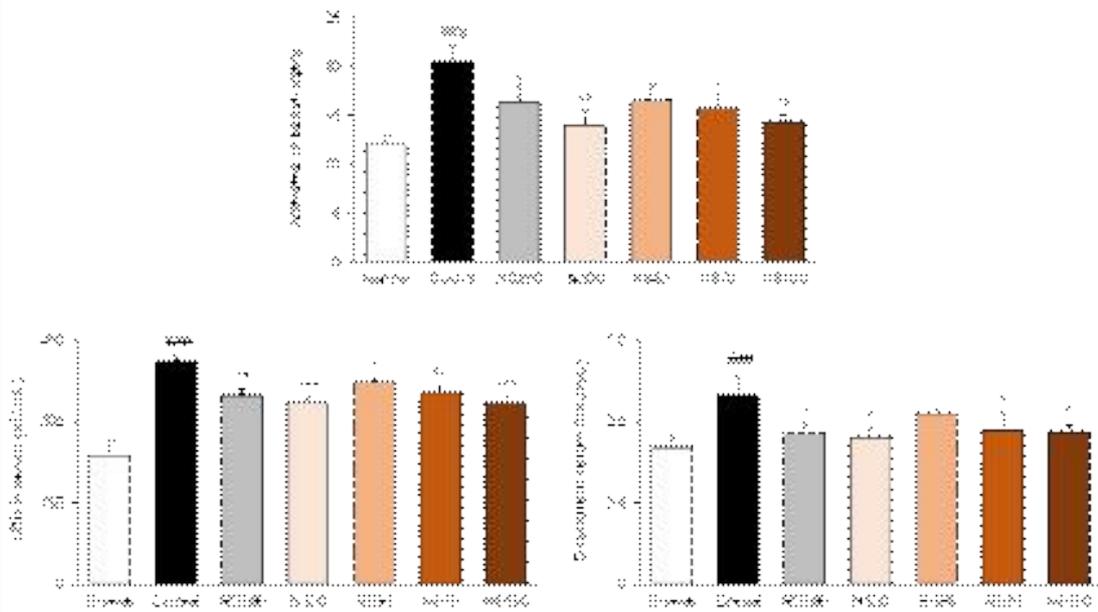
[그림 46] 강제수영부하실험에서 연자육추출분말이 산화적 스트레스에 미치는 영향

(4) 혈청 내 에너지 소비에 미치는 영향 : 연자육추출분말(NS군)이 동물모델의 에너지 소비에 미치는 영향을 혈청 내 지방(triglyceride, TG) 함량과 총 콜레스테롤(total cholesterol, TC) 함량, 유리지방산(free fatty acid, FFA) 함량 및 혈청 내 당 농도 측정을 통해 분석함. 실험결과 연자육추출분말(NS군)은 대조군 대비 TG의 분해 및 FFA의 소비를 증가시켰으며, TC 함량 또한 NS50군을 제외하고 유의적으로 감소시켰음. 혈청 내 당 농도 또한 RG군과 유사 혹은 그 이상으로 유지하는 모습을 보임. 결과적으로 연자육 추출분말의 급여는 TG 및 TC의 분해와 FFA의 소비를 증가시켜 에너지를 생성함으로써 운동항상 및 항피로 효과에 영향을 줄 수 있는 것으로 확인됨



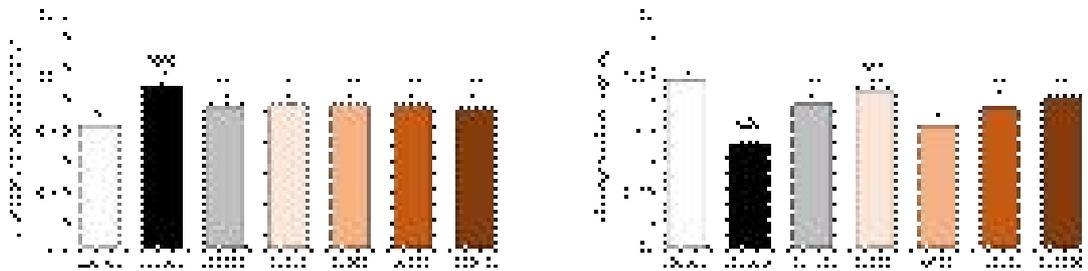
[그림 47] 강제수영부하실험에서 연자육추출분말이 에너지 소비에 미치는 영향

(5) 혈청 내 피로 요소에 미치는 영향 : 연자육추출분말(NS군)이 체내 피로누적 요소에 미치는 영향을 분석한 결과, NS군은 지구성 운동 수행 시 발생하는 암모니아의 축적을 보다 효과적으로 감소시킬 수 있음을 확인함, 특히 NS30 및 NS100이 보다 효과적이었음. 또한 NS군은 대조군 대비 유의적으로 LDH 함량 및 젖산 축적을 감소시키는 것으로 확인됨. 전체적으로 NS군은 양성대조군인 RG군과 유사하거나 혹은 보다 효과적으로 피로요소 물질들을 감소시키는 것으로 나타남. 이에 연자육 추출분말의 급여는 체내 피로요소의 축적을 억제하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 보임



[그림 48] 강제수영부하실험에서 혈청 내 피로요소에 미치는 영향

(6) 간 및 근육 내 피로 요소에 미치는 영향 : 체내 글리코겐의 고갈은 에너지 부족 및 저혈당으로 피로의 원인이 되며, 이때 부산물로 근육 내 피로유도 물질인 젖산을 발생시킴. 이에 연자육추출분말(NS군)이 운동수행 후 간과 근육 내 피로요소에 미치는 영향을 분석함. 그 결과 NS군은 양성대조군인 RG군과 유사한 수준으로 근육 내 젖산 축적을 감소시켰음. 이때 NS군은 고형분 농도와 상관없이 모두 유의한 수준에서 활성을 나타냄. 한편, 간 내 저장되는 글리코겐의 함량을 분석한 결과 NS군은 효과적으로 글리코겐의 소비를 감소시켰으며, 특히 NS30군은 운동을 전혀 하지않은 모델과 유사한 수준을 보였음. 위 결과를 통해 연자육추출분말은 에너지 고갈 및 피로누적을 감소시킬 수 있음을 확인함



[그림 49] 강제수영부하실험에서 연자육추출분말이 글리코겐 함량에 미치는 영향

[10] 혈행개선

① In vitro 혈소판 응집 저해능 평가

가. 수행방법

(1) 시료 : (주)신우코퍼레이션에서 제공한 시료는 총 6종으로 30% 연자육 추출분말, 50% 연자육 추출분말, 70% 연자육 추출분말, 연자육 분말, 연자육 발효추출분말 1, 연자육 발효추출분말2이며, 시료는 냉동보관하면서 실험에 사용하였음

[표 41] Sample Name

No.	Sample Name	Sample Description
1	30%	30% 연자육 추출분말(고형분30%)
2	50%	50% 연자육 추출분말(고형분50%)
3	70%	70% 연자육 추출분말(고형분70%)
4	분말	연자육 원재료 분쇄분말(분쇄분말)
5	발효1	연자육 발효추출분말1
6	발효2	연자육 발효추출분말2 (발효시 탄소원과 무기염류 무첨가)

(2) 시약 : 혈전용해 실험에 사용한 시약은 fibrinogen from human plasma, thrombin from human plasma, plasmin from human plasma를 Sigma에서 구입하였고 phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4)은 Gibco(Grand Island, NY,USA) 제품을 사용하였음. 응고타임에 사용된 calibration plasma, normal control, low abnormal control, PT-fibrinogen HS, SynthASil, calcium chloride 0.020 M, reference emulsion 시약은 Instrumentation Laboratory(Milano,Italy)로부터 구입하여 사용하였음. 혈소판응집 유발물질인 adenosine diphosphate(ADP)는 Chrono-Log(Havertown,PA, USA)의 제품을 사용하였음

(3) 혈소판 : 랫트의 복대동맥으로부터 venipuncture를 통해 뽑은 전혈 8 mL를 1 mL citrate phosphate dextrose solution (CPD: 90 mM Na3C6H5O7 · 2H2O, 14 mM C6H8O7 · H2O, 100 mM NaH2P04 · H2O, and dextrose 2.55 g/100 mL)와 혼합하였음. 혈액 샘플을 1700×g에서 7분간 원심분리 하여 상등액의 혈소판 부유혈장 (platelet-rich plasma, PRP)를 취하여 1200×g에서 7분간 원심 분리하여 적혈구 성분을 제거하였음. CPD solution 성분을 제거하고 혈소판을 분리하기 위하여, PRP를 3500×g에서 10분간 원심분리하여 침전된 혈소판은 Tyrode buffer (137 mM NaCl, 12 mM NaHCO₃, 5.5 mM glucose, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.3 mM NaHPO₄, pH 7.4)에서 10⁸/ml의 농도로 조정하여 사용하였음

- (4) 혈소판응집억제효과 검정 : 연자육 6종 추출물을 농도별 (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 혈장($10^8/\text{mL}$)에 2분간 37°C에서 전처리 하고 혈소판 응집촉진물질 (collagen 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, thrombin 0.1 U/mL, ADP (10 μM)를 가하여 250 g로 stirring하면서 5분간 반응시켜 혈소판 응집억제능을 측정 하였음. 혈소판응집은 Aggregometer (Chrono Log, Havertown, PA, USA)를 이용하여 측정하였음. 혈소판 응집억제 활성은 유도된 aggregation (%)을 대조군(A)으로, 상황버섯 메탄올 추출물 처리 후 유도된 aggregation (%)을 실험군(B)으로 하여 다음 계산식에 따라 저해율 (%)로 나타내었음

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

[그림 50] 계산식

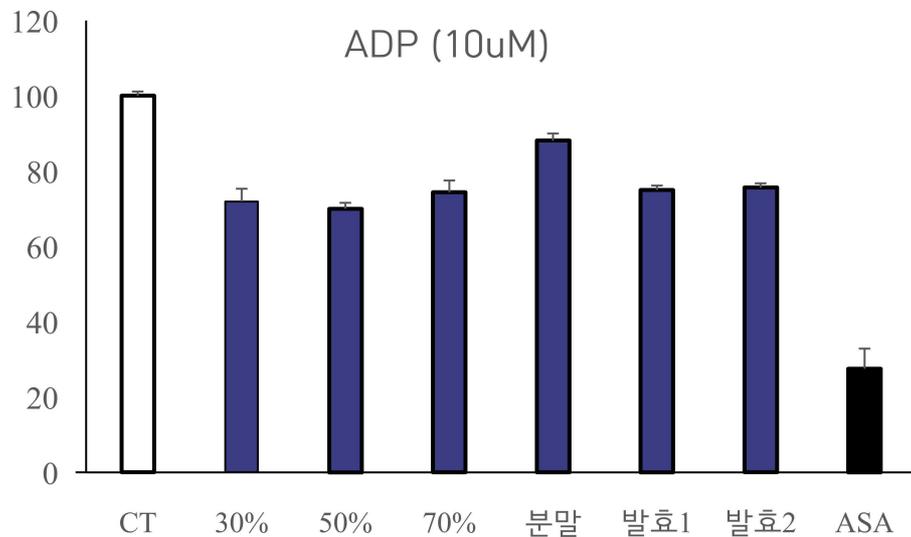
- (5) ADP release 분석 : adenosine diphosphate (ADP) release를 측정하였는데, 혈소판을 37°C에서 3분간 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 연자육 분말 추출물 6종을 전처리 하고 10 μM Adenosine diphosphate (ADP))를 가하여 5분간 반응을 유도한 후 원심분리로 상층액을 취하여 분석에 사용하였음. ADP release는 ADP assay kit (Biomedical Research Service Center, Buffalo, USA)를 사용하여 luminometer (GloMax 20/20, Promega, Madison, USA)로 측정하였음. 대조구로서 ADP release 억제 효과가 알려진 ASA (아스피린)를 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 사용하였음

- (6) 모든 실험은 3-5회 반복 시행되었으며, 결과는 평균 \pm SEM 또는 SD로 나타냈으며, 두 그룹 사이의 유의차는 unpaired Student 's t-test에 의하여 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였음

나. 수행결과

(1) 연자육의 ADP 발현에 미치는 영향

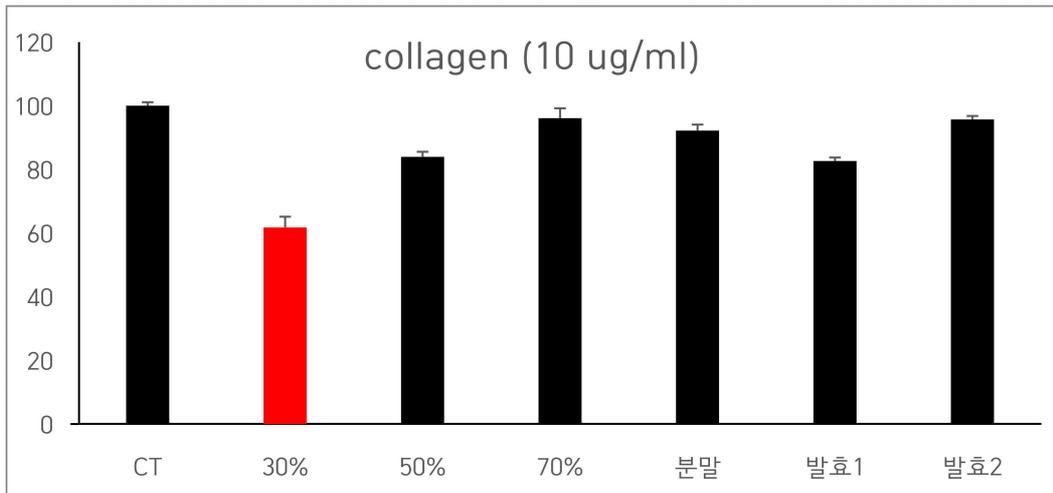
- i. 양성대조군 아스피린을 처리한 ADP 발현량은 대조군 대비 $27.5 \pm 1.3\%$ 로 나타났으며, 30% 연자육 추출분말을 처리한 ADP 발현량은 대조군 대비 $71.9 \pm 5.6\%$ 로 나타났음. 50% 연자육 추출분말을 처리한 ADP 발현량은 대조군 대비 $70 \pm 1.3\%$, 70% 연자육 추출분말을 처리한 ADP 발현량은 대조군 대비 $74.4 \pm 2.3\%$, 연자육 분말을 처리한 ADP 발현량은 대조군 대비 $88.1 \pm 3.9\%$ 로 나타나 가장 효과가 좋지 않았음. 연자육 발효추출분말1을 처리한 ADP 발현량은 대조군 대비 $75 \pm 3.3\%$ 로 나타났으며, 연자육 발효추출분말2를 처리한 ADP 발현량은 대조군 대비 $75.6 \pm 1.7\%$ 로 나타났음



[그림 51] 연자육 시료의 ADP 발현량 분석

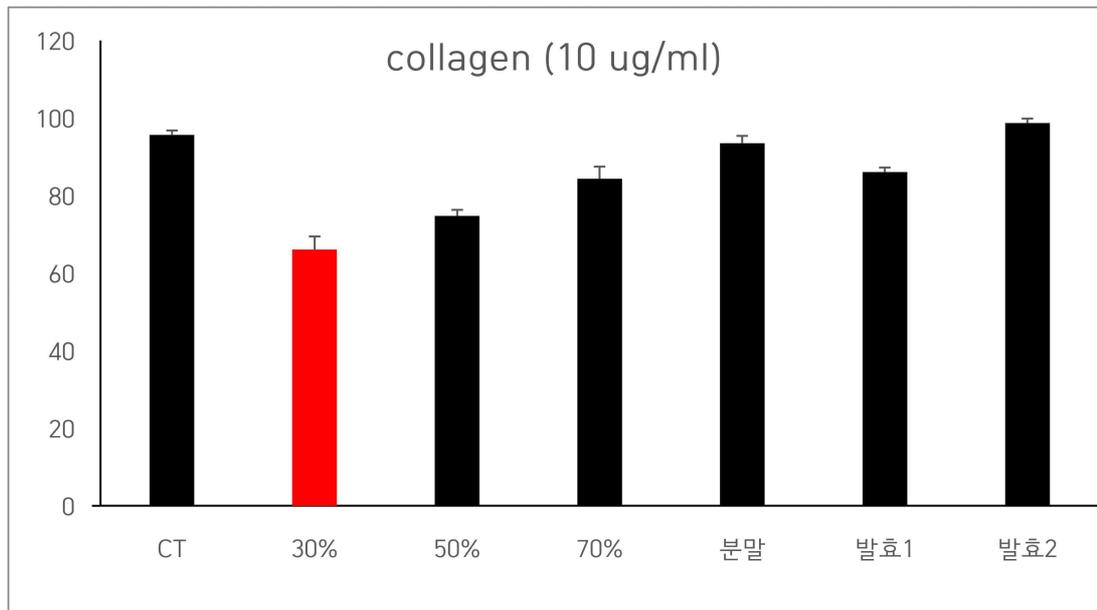
(2) 혈소판 응집력 억제능 평가

i. 연자육 6종 시료를 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리시, 콜라겐 응집 생성량을 평가하였음. 연자육 6종 시료를 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리한 후, 콜라겐 응집 생성량을 평가한 결과, 30% 연자육 추출분말을 처리한 콜라겐 응집 생성량은 대조군 대비 $61.7 \pm 3.4\%$ 로 나타났음. 50% 연자육 추출분말을 처리한 콜라겐 응집 생성량은 대조군 대비 $83.9 \pm 1.6\%$, 70% 연자육 추출분말을 처리한 콜라겐 응집 생성량은 대조군 대비 $96.1 \pm 2.3\%$, 연자육 분말을 처리한 콜라겐 응집 생성량은 대조군 대비 $92.2 \pm 1.9\%$ 로 나타났음. 연자육 발효추출분말1을 처리한 콜라겐 응집 생성량은 대조군 대비 $82.6 \pm 1.2\%$ 로 나타났으며, 연자육 발효추출분말2를 처리한 콜라겐 응집 생성량은 대조군 대비 $95.7 \pm 1.2\%$ 로 나타났음. 연자육 6종 시료를 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리한 결과, 30% 연자육 추출분말 처리시 콜라겐 생성량이 가장 적게 나타났으며, 연자육 발효추출분말1 처리군이 그 다음 콜라겐 생성량이 적었고, 50% 연자육 추출분말 처리시 콜라겐 생성량이 적게 나타났음



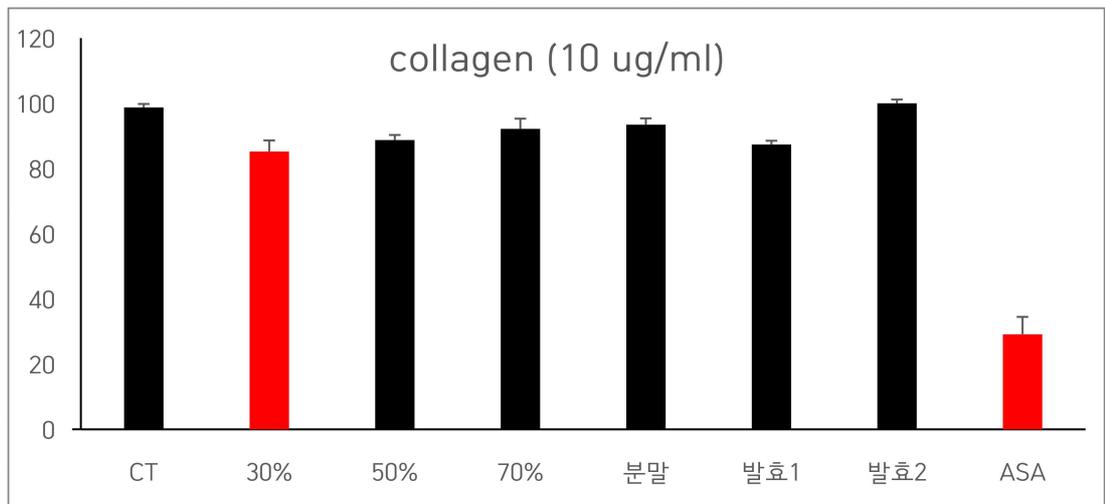
[그림 52] 연자육 6종 시료 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리시 콜라겐 생성량 비교

ii. 연자육 6종 시료를 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리한 후, 콜라겐 응집 생성량을 평가한 결과, 30% 연자육 추출분말을 처리한 콜라겐 응집 생성량은 대조군 대비 $66.1 \pm 5.3\%$ 로 나타났음. 50% 연자육 추출분말을 처리한 콜라겐 응집 생성량은 대조군 대비 $74.8 \pm 1.9\%$, 70% 연자육 추출분말을 처리한 콜라겐 응집 생성량은 대조군 대비 $84.4 \pm 1.2\%$, 연자육 분말을 처리한 콜라겐 응집 생성량은 대조군 대비 $93.52 \pm 0.4\%$ 로 나타났음. 연자육 발효추출분말1을 처리한 콜라겐 응집 생성량은 대조군 대비 $86.1 \pm 0.8\%$ 로 나타났으며, 연자육 발효추출분말2을 처리한 콜라겐 응집 생성량은 대조군 대비 $98.7 \pm 3.0\%$ 로 나타났음. 연자육 6종 시료를 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리한 결과, 30% 연자육 추출분말 처리시 콜라겐 생성량이 가장 적게 나타났으며, 50% 연자육 추출분말 처리군이 그 다음 콜라겐 생성량이 적었고, 70% 연자육 추출분말 처리시 콜라겐 생성량이 적게 나타났음



[그림 53] 연자육 6종 시료 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리시 콜라겐 생성량 비교

iii. 연자육 6종 시료를 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도와 아스피린 (ASA)을 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리한 후, 콜라겐 응집 생성량을 평가한 결과, 양성대조약물인 아스피린 처리군의 콜라겐 응집 생성량은 대조군 대비 29.1 \pm 2.4%로 가장 적은 수치를 나타내었으며, 30% 연자육 추출분말을 처리한 콜라겐 응집 생성량은 대조군 대비 85.22 \pm 5.3%로 나타났음. 50% 연자육 추출분말을 처리한 콜라겐 응집 생성량은 대조군 대비 88.7 \pm 2.0%, 70% 연자육 추출분말을 처리한 콜라겐 응집 생성량은 대조군 대비 92.2 \pm 0.4%, 연자육 분말을 처리한 콜라겐 응집 생성량은 대조군 대비 93.5 \pm 0.4%로 나타났음. 연자육 발효추출분말1을 처리한 콜라겐 응집 생성량은 대조군 대비 87.4 \pm 0.8%로 나타났으며, 연자육 발효추출분말2을 처리한 콜라겐 응집 생성량은 대조군 대비 100 \pm 1.2%로 나타나 대조군과 유의성있는 차이는 나타나지 않았음. 연자육 6종 시료를 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리한 결과, 30% 연자육 추출분말 처리시 콜라겐 생성량이 가장 적게 나타났으며, 연자육 발효추출분말1 처리군이 그 다음 콜라겐 생성량이 적었고, 50% 연자육 추출분말 처리시 콜라겐 생성량이 적게 나타났음



[그림 54] 연자육 6종 시료 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리시 콜라겐 생성량 비교

② In vivo 혈행개선 동물 기능성 평가

가. 수행방법

(1) 연자육 시료 제조

[표 42] 시료 Sample name

Sample name	Sample Description
S1	30% 연자육 추출분말
S2	50% 연자육 추출분말
S3	연자육 발효추출분말

(2) 고지혈증 유발 동물모델 제조 및 연자육 추출물 투여

- i. 본 실험에서 사용된 고지혈증 모델은 ICR 마우스에 45% 지방을 포함하는 고지방 식이를 제공하여 고지혈증과 혈행 장애를 유도하는 모델로, 5주령의 수컷 마우스 (25 ± 2 g)를 (주)오리엔트바이오 (Seongnam, Korea)를 통해 공급받아 난괴법을 이용, 무작위로 배정하여 일주일 동안 안정기를 가진 뒤, 사료 일정량과 식수를 충분히 공급하고 항온 ($25 \pm 2^\circ$ C), 항습 ($50 \pm 5\%$), dark/light 12시간의 조건을 유지하도록 하였음. 총 8주간의 동물실험은 대구한의대학교 동물실험윤리위원회 승인 (승인번호: 2023-12-151)을 받아 진행하였으며, 실험기간 동안 연구 지침을 준수하였음
- ii. 실험군은 마우스 8마리를 한 군으로 하고 5개 그룹으로 나누어 실험을 진행하였음(정상군, 대조군, 연자육처리군 3군). 첫 번째 그룹은 일반 사료를 자율 급식한 정상군이며, 두 번째 그룹은 고지방식이를 제공하여 혈행장애를 유발시킨 대조군이며, 세 번째 그룹은 고지방식이를 제공하면서 30% 연자육 추출분말을 500 mg/kg 농도로 투여한 실험군이며, 네 번째 그룹은 고지방식이를 제공하면서 50% 연자육 추출분말을 500 mg/kg 농도로 투여한 실험군이며, 다섯 번째 그룹은 고지방식이를 제공하면서 연자육 발효추출분말을 500 mg/kg 농도로 투여한 실험군임
- iii. 실험이 시작된 이후 종료될 때까지 체중은 매주 2회 측정하여 기록하였고, 식이 섭취량 또한 매주 2회 측정하여 식이효율을 산출하는 데 이용하였음

[표 43] Group

Group	Treatment
N	Normal chow control group
Con	High fat diet control group
S1	High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S1
S2	High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S2
S3	High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S3

(3) 식이효율 산출

- i. 매주 제공된 일정량의 사료 무게에서 섭취 후 남은 사료의 값을 제외하고 각 군의 평균 식이섭취량을 구하고 체중의 증감을 비교하여 식이효율을 산출하여 결과 값을 표에 나타내었음

$$\text{Food efficiency rate (FER)} = \text{Weight gain (g)} / \text{Food intake (g)}$$

[그림 55] 계산식

(4) 혈액 및 간 채취와 장기 무게 측정

- i. 실험 종료 시 avertin (2,2,2-tribromoethanol, SigmaAldrich Co., St. Louis, MO, USA)으로 마취한 뒤 안와채혈 방법을 통해 혈액을 채취하였고 이는 항응고제인 3.8% sodium citrate (Sigma-Aldrich Co.)와 9:1 비율로 섞어 혈액이 응고되지 않도록 하였음. 실험동물을 개복하여 체내 장기의 변화가 있는지 육안으로 확인하고 주요 장기의 무게를 측정하고 기록한 뒤 군 간 유의적 차이가 있는지 확인하였다. 또한 간은 phosphate buffered saline (PBS)에 세척하여 혈액을 최대한 제거한 뒤 채취하여 실험에 쓰일 때까지 초저온냉동고에 저장하였음

(5) 혈액생화학적 분석

- i. 부검시 채혈한 혈액은 원심분리하였으며, ALT, AST 및 Creatinine 측정용 키트를 구입하여 함량을 측정하였음. 이들의 흡광도는 Microplate Reader M220-pro (TECAN, 오스트레일리아)를 이용하여 측정하였음

(6) 혈장의 coagulation factor VII와 X II 측정

- i. 혈장의 혈액응고인자는 ELISA kit을 사용하여 측정하였는데, coagulation factor VII는 Mouse Coagulation Factor VII(F7) ELISA Kit(Sincere Biotech Co., Beijing, China)을 이용하였고, coagulation factor XII는 Mouse Coagulation factor XII(F12) ELISA Kit(Sincere Biotech Co.)을 이용하였음
- ii. 흡광도는 Microplate Reader M220-pro로 측정하였으며 결과 값을 그래프로 나타내었음

(7) 혈소판으로부터 방출되는 serotonin의 측정

- i. 혈중 serotonin의 농도를 알기 위한 시험으로 항체가 코팅되어 있는 ELISA kit을 사용하였음. Serotonin ELISA kit(Abnova, Taipei, Taiwan)을 이용하였고 흡광도는 Microplate Reader M220-pro를 통해 측정하고 그 결과를 그래프로 나타내었음

(8) Thromboxane B2의 측정

- i. 혈장을 이용한 실험으로 ELISA 방식의 kit을 사용해 측정하였다. TXB2 ELISA kit(Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY, USA)을 이용하였고 흡광도는 Microplate Reader M220-pro를 통해 측정하였음

(9) 프로트롬빈 시간 (Protrombin time)과 활성화 부분트롬보플라스틴 시간 (activated partial thromboplastin time) 측정

- i. 혈장으로 PT (Protrombin time)와 aPTT (activated partial thromboplastin time)를 측정하였는데, PT 측정에는 HemosIL ReconbiPlasTin 2G (Instrumentation Laboratory, Orangeburg, NY, USA)를 사용하였고, aPTT는 APTT-SP-0020006300 (Instrumentation Laboratory) 시약을 사용하였음. 시약과 혈장을 반응시켜 혈액응고 분석기 ACL9000 (Instrumentation Laboratory)에 넣고 혈장이 응고되는 시간을 측정하였음

(10) 통계처리

- i. 본 실험에서 얻어진 모든 분석 자료는 평균±표준오차 (mean±SE) 또는 표준편차 (mean±SD)로 나타내었으며, 군 간 유의성 검증은 SPSS (Statistical Package for Social Science, version 22.0. SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램의 Student's t-test 분석법을 실시하여 P<0.05 수준에서 검증하였음

나. 수행결과

(1) 식이효율 및 체중 증가

- i. Table 1의 결과와 같이 식이섭취량은 각 군당 유의적 차이가 나지 않는 반면에 체중 증가와 식이효율(FER)은 일반 정상군과 대조군 및 연자육 추출물 투여군에서 통계적 유의성이 나타났음
- ii. 정상군에 비해 고지방식이 대조군의 체중이 유의성있게 증가되었으며 (**p < 0.01), 30% 연자육 추출분말(S1)과 연자육 발효추출분말(S3) 투여군의 체중은 대조군에 비해 유의성있게 감소되었음 (#p < 0.05)
- iii. 식이섭취량은 정상군, 대조군 및 3개 실험군간의 유의성있는 차이점은 나타나지 않았으나, 식이효율은 대조군의 식이효율에 비해 30% 연자육 추출분말(S1)과 연자육 발효추출분말(S3) 투여군의 체중은 대조군에 비해 유의성있게 감소되었음 (#p < 0.05)

[표 44] 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율

Group	Weight gain ¹⁾	Food intake ²⁾	FER ³⁾
N	16.83±2.13	3.59±1.42	0.16±0.06
Con	26.91±3.76**	3.37±1.31	0.25±0.02**
S1	23.15±3.28 [#]	3.29±2.03	0.19±0.03 [#]
S2	25.35±4.03	3.42±1.86	0.24±0.02
S3	24.85±3.56 [#]	3.31±1.54	0.22±0.03 [#]

¹⁾Weight gain (g)=final body weight-initial body weight.

²⁾Food intake (g)=food intake (g/d).

³⁾FER=weight gain/ food intake.

Group N: Normal chow control group

Group Con: High fat diet control group

Group S1: High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S1

Group S2: High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S2

Group S3: High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S3

Each result represents the mean±SE. **p < 0.01 compared with the normal chow control group. [#]p < 0.05 compared with the high fat diet control group.

(2) 장기 무게

i. 각 군당 장기의 무게를 나타낸 Table 2의 결과를 보면, 군당 장기의 무게에 유의적 차이가 나타나지 않았고, 일반식이 그룹과 고지방식이 그룹 사이에 어떤 해부학적인 이상 또한 발견하지 못했음. 본 연구에서 고지혈증을 유도하기 위하여 45% fat을 포함하는 고지방식을 섭취하도록 하였는데, 혈중 중성지방이나 콜레스테롤 수치가 유의적으로 증가한 결과로 고지혈증이 발병했다는 것을 확인하였다. 반면에 각 장기의 색깔이나 모양 등이 일반식이 그룹의 음성대조군과 차이가 없다는 결과를 통해 고지혈증 외에 다른 질환의 유도는 되지 않은 것을 알 수 있었음

[표 45] 그룹별 장기무게 비교 (g)

Group	Heart	Liver	Kidney	Spleen
N	0.23±0.03	1.68±0.11	0.66±0.03	0.12±0.01
Con	0.21±0.02	1.65±0.1	0.64±0.04	0.13±0.02
S1	0.22±0.03	1.66±0.13	0.65±0.02	0.13±0.03
S2	0.22±0.02	1.65±0.08	0.65±0.03	0.12±0.01
S3	0.21±0.01	1.67±0.13	0.65±0.05	0.12±0.02

Group N: Normal chow control group

Group Con: High fat diet control group

Group S1: High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S1

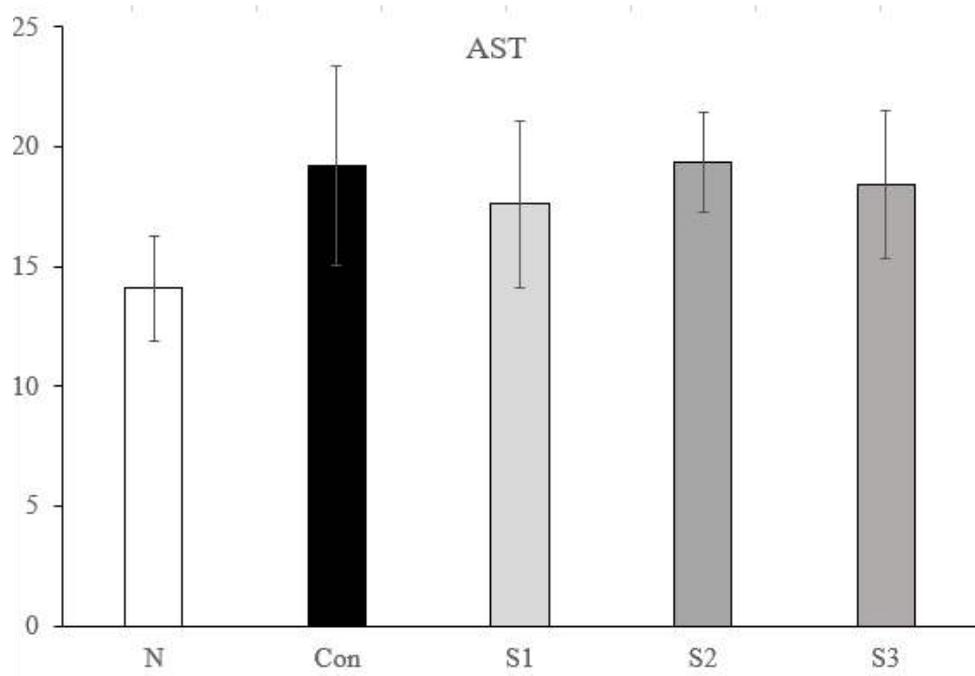
Group S2: High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S2

Group S3: High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S3

(3) 혈액생화학적 분석

i. AST 효소 함량

- Aminotransferase는 간세포 괴사의 정도를 가장 민감하게 나타내주는 검사로 간세포의 손상 정도를 평가하기 위해 가장 흔히 사용되는 검사로 알려져 있으며 ALT는 간 특이성을 가지고 있고 AST는 간과 다른 장기 손상 시에 그 수치가 증가함
- 혈청 내 AST 함량은 일반식이를 제공하는 정상군에서 14.1 ± 2.2 mU/mL로 나타났으며, 고지방식이를 제공하는 대조군의 혈청 내 AST 함량은 19.2 ± 4.2 mU/mL로 유의적인 차이를 보이지 않았음
- 30% 연자육 추출분말(S1) 투여군의 혈청 내 AST 함량은 17.6 ± 3.5 mU/mL, 50% 연자육 추출분말(S2) 투여군의 혈청 내 AST 함량은 19.3 ± 2.1 mU/mL, 연자육 발효추출분말(S3) 투여군의 혈청 내 AST 함량은 18.4 ± 3.1 mU/mL로 나타나 그룹간의 혈청 내 AST 함량은 유의성이 없었음



[그림 56] 혈청 내 AST 효소 함량

Group N: Normal chow control group

Group Con: High fat diet control group

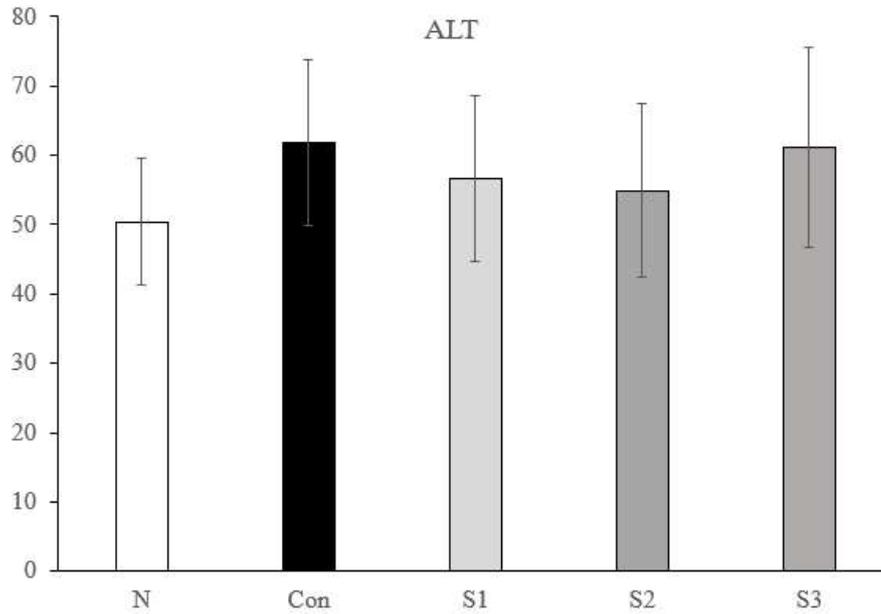
Group S1: High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S1

Group S2: High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S2

Group S3: High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S3

ii. ALT 효소 함량

- 혈청 내 ALT 함량은 일반식이를 제공하는 정상군에서 50.4 ± 9.1 mU/mL로 나타났으며, 고지방식이를 제공하는 대조군의 혈청 내 ALT 함량은 61.8 ± 11.9 mU/mL로 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 22.7% 증가되었음
- 30% 연자육 추출분말(S1) 투여군의 혈청 내 ALT 함량은 56.6 ± 12 mU/mL, 50% 연자육 추출분말(S2) 투여군의 혈청 내 ALT 함량은 54.9 ± 12.5 mU/mL, 연자육 발효추출분말(S3) 투여군의 혈청 내 ALT 함량은 61.2 ± 14.4 mU/mL로 나타나 그룹간의 혈청 내 ALT 함량은 유의성이 없었음



[그림 57] 혈청 내 ALT 함량

Group N: Normal chow control group

Group Con: High fat diet control group

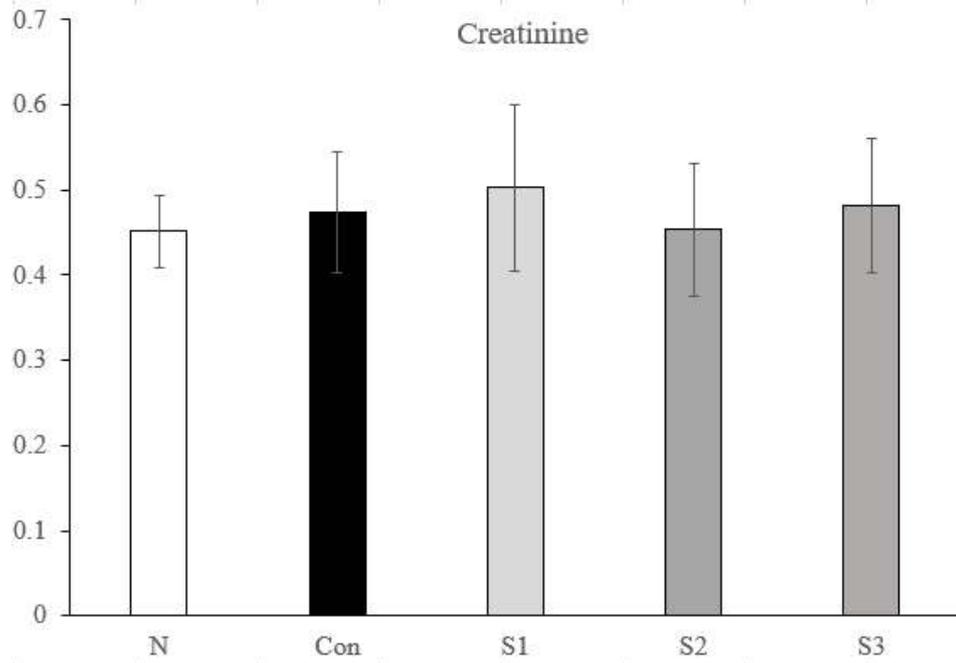
Group S1: High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S1

Group S2: High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S2

Group S3: High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S3

iii. Creatinine 효소 함량

- 혈청 내 Creatinine 함량은 일반식을 제공하는 정상군에서 0.45 ± 0.04 mg/dL로 나타났으며, 고지방식을 제공하는 대조군의 혈청 내 Creatinine 함량은 0.47 ± 0.07 mU/mL로 유의적인 차이를 보이지 않았음
- 30% 연자육 추출분말(S1) 투여군의 혈청 내 Creatinine 함량은 0.50 ± 0.1 mU/mL, 50% 연자육 추출분말(S2) 투여군의 혈청 내 Creatinine 함량은 0.45 ± 0.08 mU/mL, 연자육 발효추출분말(S3) 투여군의 혈청 내 Creatinine 함량은 0.48 ± 0.08 mU/mL로 나타나 그룹간의 혈청 내 Creatine 함량은 유의성이 없었음



[그림 58]혈청 내 creatinine 함량

Group N: Normal chow control group

Group Con: High fat diet control group

Group S1: High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S1

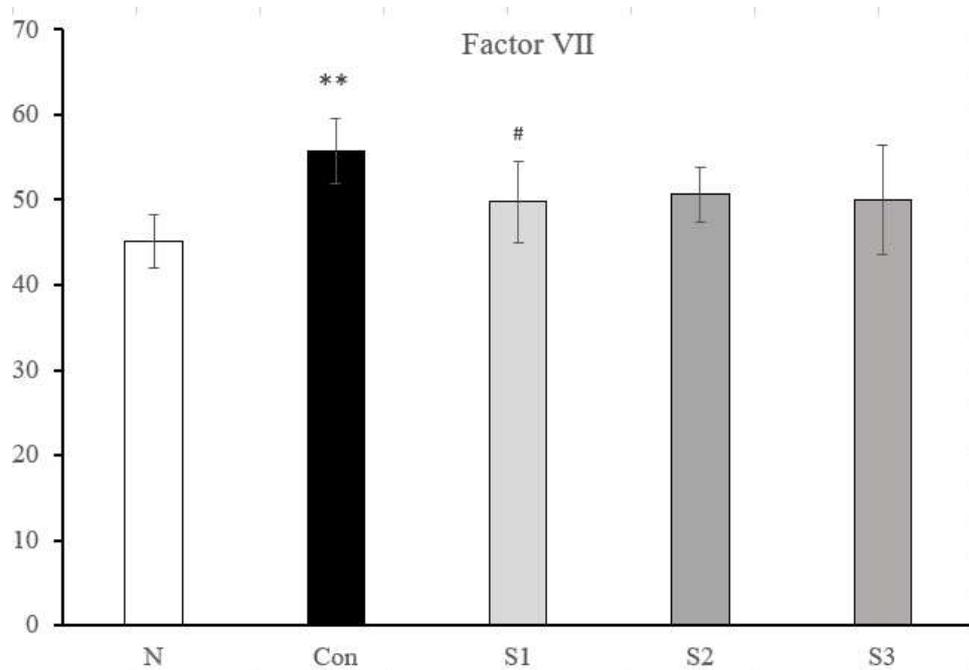
Group S2: High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S2

Group S3: High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S3

- 따라서 혈액생화학적 분석 결과를 바탕으로 고지방식이 동물에게 연자육 분말 3종을 500 mg/kg 농도로 실험기간 동안 투여한 결과 독성이 없는 것으로 확인되었으며, 이러한 결과를 바탕으로 사람이 3종 연자육 추출분말을 복용하였을 때 간장과 신장에 독성을 나타내지 않을 것이라 여겨짐

(4) 혈장의 coagulation factor VII와 XIII 측정

- i. 진단검사에서 혈액응고와 관련 되어 기본적으로 시행하고 있는 aPTT 검사는 내인성 경로의 이상 유무를 알아보는 검사이고, PT는 외인성 경로의 이상 유무를 알아보는 실험으로, 각 경로의 응고인자 활성을 알아보기 위한 실험을 진행하였음
- ii. 혈장의 coagulation factor VII 측정
 - 혈장 내 coagulation factor VII 함량을 분석한 결과, 정상군 혈장 내 coagulation factor VII 함량은 45.1 ± 3.0 ng/mL인 반면에, 고지방식이 대조군의 혈장 내 coagulation factor VII 함량은 55.8 ± 3.9 ng/mL로 유의성있게 증가되었음 (**p < 0.01).
 - 반면에, 연자육 추출분말 섭취 실험군의 혈장 내 coagulation factor VII 함량은 모두 대조군의 혈장 내 coagulation factor VII 함량보다 감소되었음. 특히, 30% 연자육 추출분말(S1) 투여군의 혈장 내 coagulation factor VII 함량은 49.8 ± 4.7 ng/mL로 대조군의 혈장 내 coagulation factor VII 함량보다 유의성있게 감소되었음 (#p < 0.05)



[그림 59]혈장 내 coagulation factor VII 함량

Group N: Normal chow control group

Group Con: High fat diet control group

Group S1: High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S1

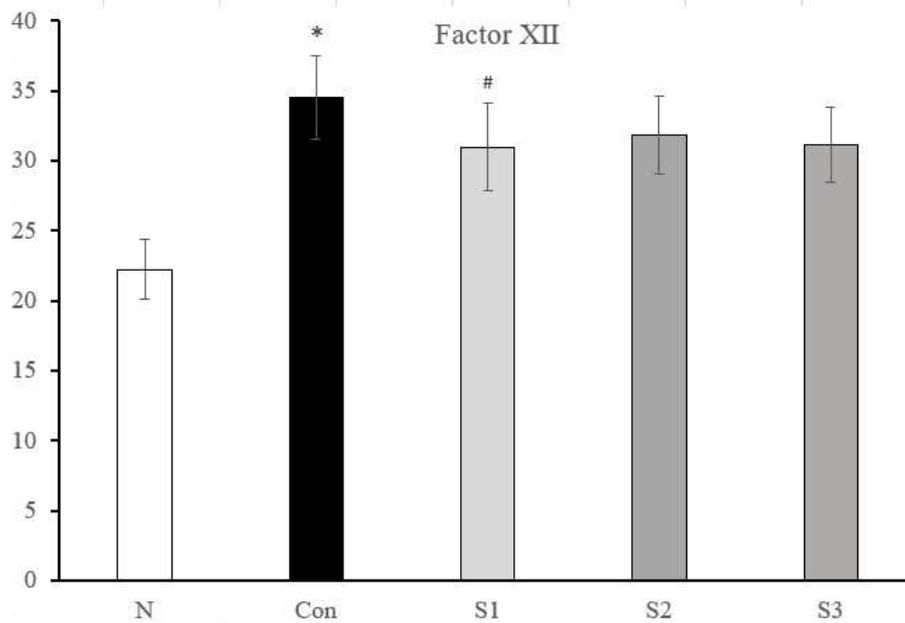
Group S2: High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S2

Group S3: High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S3

**p < 0.01 compared with the normal chow group. #p < 0.05 compared with the high fat diet control group.

iii. 혈장의 coagulation factor XII 측정

- 혈장 내 coagulation factor XII 함량을 분석한 결과, 정상군 혈장 내 coagulation factor XII 함량은 22.3 ± 2.1 ng/mL인 반면에, 고지방식이 대조군의 혈장 내 coagulation factor XII 함량은 34.5 ± 3.0 ng/mL로 유의성있게 증가되었음 (*p < 0.05)
- 반면에, 연자육 추출분말 섭취 실험군의 혈장 내 coagulation factor XII 함량은 모두 대조군의 혈장 내 coagulation factor XII 함량보다 감소되었다. 특히, 30% 연자육 추출분말(S1) 투여군의 혈장 내 coagulation factor XII 함량은 31.0 ± 3.1 ng/mL로 대조군의 혈장 내 coagulation factor XII 함량보다 유의성있게 감소되었음 (#p < 0.05)



[그림 60] 혈장 내 coagulation factor XII 측정

Group N: Normal chow control group

Group Con: High fat diet control group

Group S1: High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S1

Group S2: High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S2

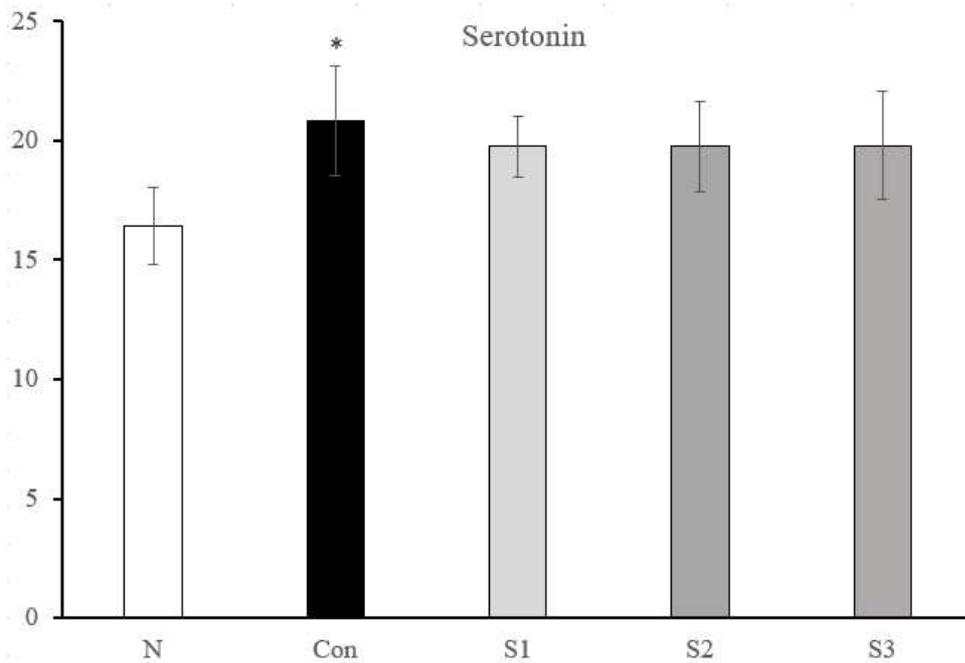
Group S3: High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S3

*p < 0.05 compared with the normal chow group. #p < 0.05 compared with the high fat diet control group.

(5) 혈소판으로부터 방출되는 serotonin과 thromboxane B2의 측정

i. Serotonin 함량 분석

- 혈소판 응집에 의한 혈관 수축을 매개하는 혈관 조절물질로는 serotonin과 thromboxane A₂(TXA₂)가 가장 대표적인 물질로 알려져 있음. Serotonin은 혈액 중에서 대부분 혈소판에 의해 uptake 되어 저장되었다가 혈소판이 활성화되면 유리되어 혈소판의 5-HT 수용체에 작용해 응집을 촉진시키기 때문에 혈소판 활성화의 바이오마커로 사용됨
- 혈장 내 serotonin 함량을 분석한 결과, 정상군 혈장 내 serotonin 함량은 16.4 ± 1.6 ng/mL인 반면에, 고지방식이 대조군의 혈장 내 serotonin 함량은 20.8 ± 2.3 ng/mL로 유의성있게 증가되었음 (**p < 0.01)
- 반면에, 연자육 추출분말 섭취 실험군의 혈장 내 serotonin 함량은 모두 대조군의 혈장 내 serotonin 함량보다 감소되었으나 유의성은 보이지 않았음



[그림 61] Serotonin 함량

Group N: Normal chow control group

Group Con: High fat diet control group

Group S1: High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S1

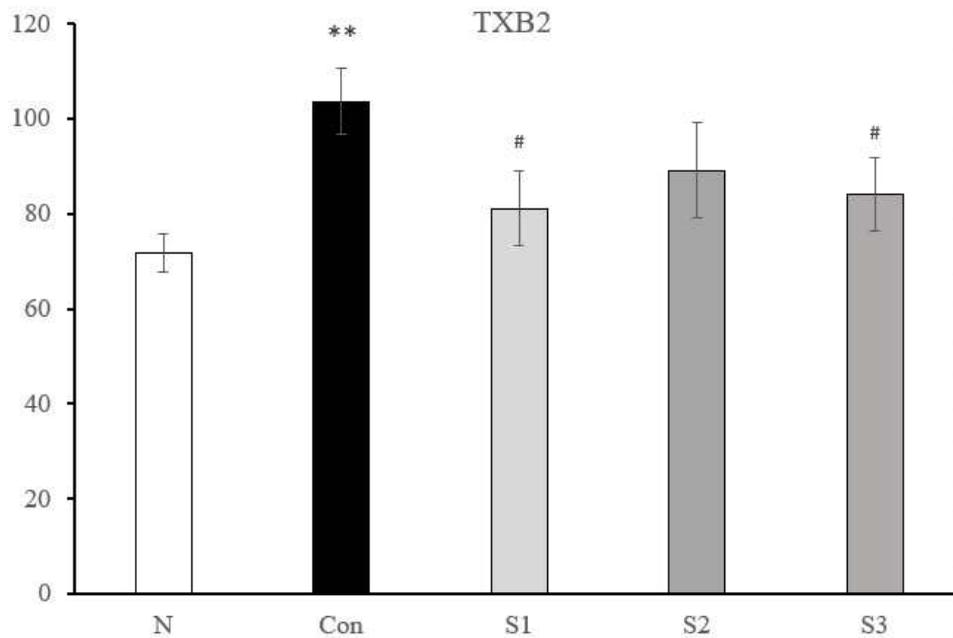
Group S2: High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S2

Group S3: High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S3

*p < 0.05 compared with the normal chow group.

ii. Thromboxane B2 (TXB2) 함량 분석

- TXA2 반감기가 약 37초 정도로 짧기때문에 그보다 안정적인 형태인 thromboxane B2 (TXB2)를 주로 측정하며 혈중 TXB2의 분비량이 증가할수록 혈액의 응고력이 강해짐
- 혈장 내 Thromboxane B2 (TXB2) 함량을 분석한 결과, 정상군 혈장 내 Thromboxane B2 (TXB2) 함량은 71.7 ± 4.1 ng/mL인 반면에, 고지방식이 대조군의 혈장 내 Thromboxane B2 (TXB2) 함량은 103.7 ± 7.1 ng/mL로 유의성있게 증가되었음 (**p < 0.01)
- 반면에, 연자육 추출분말 섭취 실험군의 혈장 내 Thromboxane B2 (TXB2) 함량은 모두 대조군의 혈장 내 Thromboxane B2 (TXB2) 함량보다 감소되었으며, 특히, 30% 연자육 추출분말(S1) 투여군의 혈장 내 Thromboxane B2 (TXB2) 함량은 81.1 ± 7.8 ng/mL, 연자육 발효추출분말(S3) 투여군의 로 혈장 내 Thromboxane B2 (TXB2) 함량은 84.2 ± 7.7 ng/mL로 감소되어 대조군의 혈장 내 Thromboxane B2 (TXB2) 함량보다 유의성있게 감소되었음 (#p < 0.05)



[그림 62] TXB2 함량

Group N: Normal chow control group

Group Con: High fat diet control group

Group S1: High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S1

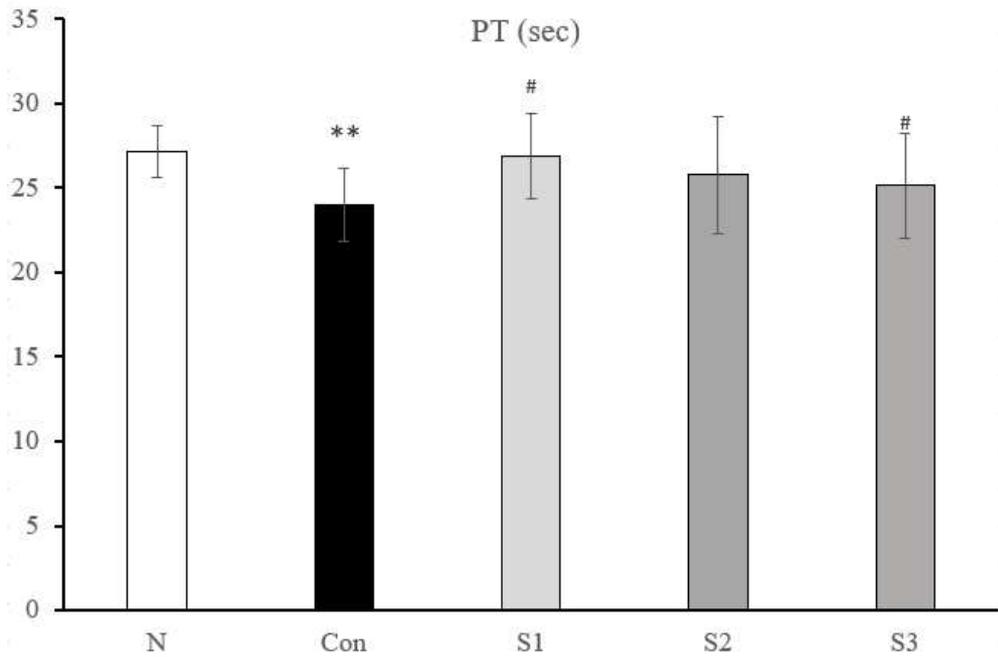
Group S2: High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S2

Group S3: High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S3

**p < 0.01 compared with the normal chow group. #p < 0.05 compared with the high fat diet control group.

(6) 프로트롬빈 시간 (prothrombin time) 측정

- i. 프로트롬빈 시간 (prothrombin time; PT)을 분석한 결과, 정상군의 프로트롬빈 시간은 27.1 ± 1.6 초로 나타났으며, 고지방식이 대조군의 프로트롬빈 시간은 24.0 ± 2.1 초로 유의성있게 감소되었음 (**p < 0.01)
- ii. 반면에, 연자육 추출분말 섭취 실험군의 프로트롬빈 시간은 대조군의 프로트롬빈 시간보다 모두 증가되었다. 특히, 30% 연자육 추출분말(S1) 투여군의 프로트롬빈 시간은 26.9 ± 2.5 초로 나타나 대조군의 프로트롬빈 시간보다 유의성있게 증가되었음 (#p < 0.05)



[그림 63] 프로트롬빈 시간 측정

Group N: Normal chow control group

Group Con: High fat diet control group

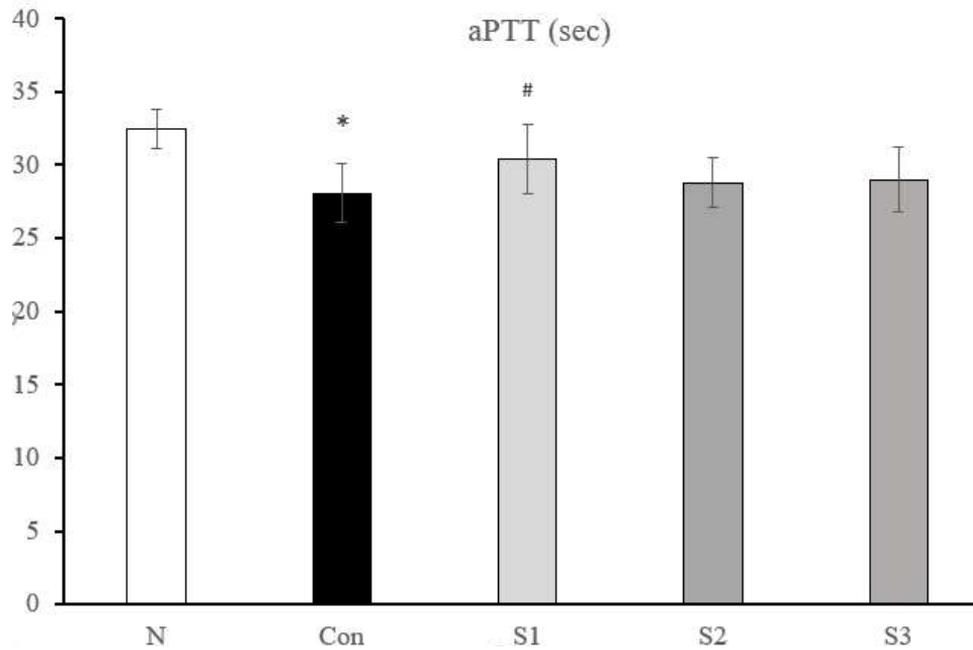
Group S1: High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S1

Group S2: High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S2

Group S3: High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S3

**p < 0.01 compared with the normal chow group. #p < 0.05 compared with the high fat diet control group.

- (7) 활성화 부분트롬보플라스틴 시간 (activated partial thromboplastin time) 측정
- i. 활성화 부분트롬보플라스틴 시간 (activated partial thromboplastin time; aPTT)을 분석한 결과, 정상군의 활성화 부분트롬보플라스틴 시간은 32.5 ± 1.4 초로 나타났으며, 고지방식이 대조군의 부분트롬보플라스틴 시간은 28.1 ± 2.0 초로 유의성있게 감소되었음 (* $p < 0.05$)
 - ii. 반면에, 연자육 추출분말 섭취 실험군의 부분트롬보플라스틴 시간은 대조군의 부분트롬보플라스틴 시간보다 모두 증가되었음. 특히, 30% 연자육 추출분말 (S1) 투여군의 부분트롬보플라스틴 시간은 30.4 ± 2.4 초로 나타나 대조군의 부분트롬보플라스틴 시간보다 유의성있게 증가되었음 (# $p < 0.05$)



[그림 64] 활성화 부분트롬보플라스틴 시간 측정

Group N: Normal chow control group

Group Con: High fat diet control group

Group S1: High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S1

Group S2: High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S2

Group S3: High fat diet group treated with Nelumbinis Semen powder S3

* $p < 0.05$ compared with the normal chow group. # $p < 0.05$ compared with the high fat diet control group.

(2) 정량적 연구개발성과

[1] 정량적 연구개발성과표

성과지표명		단계	1단계 (2022~2023)	계	가중치(%)
전담기관 등록·기탁지표	특허청	목표	특허 출원 2건, 등록 1건	3 건	20
		실적	출원	2 건	
	시청	목표	품목제조보고 2건	2 건	15
		실적	-	4 건	
	국민건강보험공단	목표	신규 인력 1명	1 명	30
		실적	-	7 명	
재무제표	목표	매출액 4,000만원 수출액 200만원	4,000만원 200만원	25	
	실적	직접 매출액 간접 수출액	5,167만원 1,000만원		
연구개발과제 특성 반영 지표	졸업증명서	목표	인력양성 1 건	1 건	10
		실적	인력양성 1건	1 건	
계			-	-	100

[2] 연구개발결과 성능지표

평가 항목 (주요성능 ¹⁾)	단위	전체 항목에서 차지하는 비중 ²⁾ (%)	세계 최고	연구개발 전 국내 성능수준	연구개발 목표치	목표설정 근거
			성능수준	성능수준	1단계 (2022~2023)	
제품의 표준화	건	25	-	-	지표물질 함량 규격 적합	공인성적서
제품의 안전성	건	25	-	-	세균수 1000cfu/ml, 대장균군 음성, 이물 적합	공인 성적서
제품의 기능성 (피로 개선)	건	25	-	-	특허1건, 논문1건	특허, 논문지
제품의 기능성 (혈행 개선)	건	25	-	-	특허1건, 논문1건	특허, 논문지

< 정량적 연구개발성과표 >

[과학적 성과]

연차		논문	생명자원 (생물자원)	화합물	기술요약	보고서원문	학술대회	생명자원 (생명정보)
1단계	계획	1	-	-	-	-	-	-
	실적	0	-	-	-	-	-	-
	달성률	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
합계	계획	1	-	-	-	-	-	-
	실적	0	-	-	-	-	-	-
	달성률	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
가중치		-	-	-	-	-	-	-

[기술적 성과]

연차		지식재산권 (특허)	지식재산권 (신품종)	저작권 (소프트웨어)	신기술지정	기술및제품 인증	표준화 (국내표준)	표준화 (국제표준)	지식재산권	저작권 (서적등)
1단계	계획	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	실적	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	달성률	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
합계	계획	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	실적	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	달성률	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
가중치		20	-	-	-	-	-	-	-	-

[경제적 성과]

연차		시제품 제작	기술실시 (이전)	사업화 투자실적	사업화 현황	매출실적 (백만원)	사업화계 획및 무역 수지개선	고용창출	고용효과	비용절감	경제적 파급효과	기술무역	산업지원 (기술지 도)
1단계	계획	2	-	-	-	40	-	1	-	-	-	-	-
	실적	2	-	-	-	51	-	7	-	-	-	-	-
	달성률	100%	0%	0%	0%	100%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%
합계	계획	2	-	-	-	40	-	1	-	-	-	-	-
	실적	2	-	-	-	51	-	7	-	-	-	-	-
	달성률	100%	0%	0%	0%	100%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%
가중치		15	-	-	-	25	-	25	-	-	-	-	

[사회적 성과] 해당없음

[인프라 성과] 해당없음

< 연구개발성과 성능지표 >

평가 항목 (주요 성능 ¹⁾)	단위	전체 항목에서 차지하는 비중 ²⁾ (%)	세계 최고 수준 보유 국/보유기관	연구개발 전 국내 수준	연구개발 목표치	목표 설정 근거
			성능수준	성능수준	1단계(22~23)	
제품의 표준화	건	25	-	-	지표물질 함량 규격 적합	공인성적서
제품의 안전성	건	25	-	-	세균수 1000cfu/ml, 대장균군 음성, 이물 적합	공인 성적서
제품의 기능성 (피로 개선)	건	25	-	-	특허1건, 논문1건	특허, 논문지
제품의 기능성 (혈행 개선)	건	25	-	-	특허1건, 논문1건	특허, 논문지

(3) 세부 정량적 연구개발성과

[과학적 성과] 해당없음

[기술적 성과]

□ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	특허	대한민국		2023. 12. 21	10-2023- 0188215	-	-	-	-	-	-
2	특허	대한민국		2023. 12. 21	10-2023- 0188344	-	-	-	-	-	-

붙임 [별첨1] 특허출원 2건.

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	연자육 추출분말	2022. 11	(주)신우코퍼레 이션	(주)신우코퍼레 이션	연구개발	3개월	-	-
2	연자육 발효추출분말	2024. 02	(주)신우코퍼레 이션	(주)신우코퍼레 이션	연구개발	3개월	-	-

붙임 [별첨1] 품목제조보고서 2건.

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
고부가가치식품기술개발사업	2022	51,678	0	51,678	판매현황표
합계		51,678	0	51,678	

붙임 [별첨1] 실적증명원 1건.

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2022년	2023년	
1	고부가가치식품기술 개발사업	(주)신우코퍼레이션	3	4	7
합계			3	4	7

붙임 [별첨1] 4대보험 가입자명부 2건.

□ 고용 효과

구분		고용 효과(명)	
고용 효과	개발 전	연구인력	1
		생산인력	1
	개발 후	연구인력	3
		생산인력	4

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	한의학	2023	-	1	-	-	-	1	-	-	1	-	-

붙임 [별첨1] 학위수여증명서 1건

[인프라 성과] 해당없음

[그 밖의 성과]

□ 품목제조보고 신고

번호	제품명	년도	비고
1	연자육추출액	2022	-
2	연자육농축액	2022	-
3	연자육추출분말	2022	-
4	연자육발효추출분말	2024	-

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항 : 해당없음

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 개발원료의 제품개발	○ 연자육 추출분말 시제품 개발 1건 ○ 연자육 발효추출분말 시제품 1건	○ 100 ○ 100
○ 개발원료의 사업화	○ 연자육 추출분말 제조공정 개발 1건 ○ 연자육 발효추출분말 제조공정 개발 1건	○ 100 ○ 100
○ 개발원료의 기능성	○ 연자육 추출분말의 효능검증 (피로개선) 1건 ○ 연자육 추출분말의 효능검증 (혈행개선) 1건	○ 100 ○ 100
○ 개발원료의 안전성	○ 개발원료의 영양성분, 세균수, 이물, 대장균군, 중금속, 곰팡이독소, 잔류농약, 지표성분 확인(공인 성적서)	○ 100
○ 개발원료의 출원 2건	○ 개발원료의 특허출원 2건 완료 (출원서)	○ 100

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 없음)

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- (1) 건강기능식품 시장은 고령화 시대와 건강을 중시하는 트렌드에 힘입어 매년 성장을 거듭해 고부가가치 산업으로 자리잡고 있을 뿐만 아니라 신종 코로나바이러스 감염증(코로나19)로 인해 건강에 대한 관심이 커지면서 더욱 성장할 것으로 전망. 건강기능식품을 요구하는 주 소비층이 4·50대 중장년층 위주에서 2·30대 젊은 층으로 확대되면서 고부가가치 품목으로 확대되는 추세로 특히 바쁜 일상으로 인한 영양불균형 및 각종 업무, 환경적 스트레스로 인하여 많은 현대인들이 만성피로에 호소하고 있으며, 번아웃 증후군과 같은 여러 정신적 문제 또한 동반되는 것으로 보고됨. 이에 따라 최근 현대인들의 건강관리 중점은 ‘피로회복’에 맞춰지고 있는 추세로, 최근 건강기능식품 시장에서는 비타민 B군 복합체, 홍삼, 밀크씨슬 등과 같은 피로회복 및 건강증진에 도움을 줄 수 있는 영양제에 관심이 증대됨. 이에 연자육 개발원료의 활용도가 높아질 것으로 기대됨.
 - (2) 연자육은 항혈전 및 심혈관계 개선 효과, 신경세포 보호 효과 및 호르몬 조절, 피로 개선, 항우울, 학습능력 개선, 면역조절 활성화에 대해 약리학적 효과가 보고되어 있으며, 그 밖에도 항산화, 항비만, 항염, 항당뇨에 대해 활성을 나타내어 현대인들의 건강증진을 위한 혈행 및 피로 개선에 탁월한 효과가 있을 것으로 예상됨, 하지만 과학적 근거가 충분히 확보되어있지 않기에 본 과제를 통해 연자육의 피로개선 및 혈행개선 기능성에 대한 과학적 근거를 설립하였음
 - (3) 본 과제를 진행하면서 당사가 보유한 기존 연자육 추출농축액을 활용하여 피로개선 및 혈행개선 기능성 연구 및 지표성분 규격을 확립한 연자육 추출분말 시제품을 개발하였고 세계김치연구소로부터 기술이전 받은 루코노스톡 메센테로이드스 유산균주를 이용하여 연자육 추출농축액을 발효시켜 분말화한 기능성이 향상된 연자육 발효추출분말 제품을 개발하였음. 이를 통해 유산균 시장 및 연자육 발효 식품 시장에 진출 할 예정임
 - (4) 개발된 제품 및 기술을 통해 효소 및 발효기술을 이용한 발전된 고기능성식품 개발과 농촌에 존재하는 모든 유무형의 자원을 바탕으로 농업농업(1차 산업)과 식품·특산품 제조·가공(2차 산업) 및 유통·판매, 서비스(3차 산업) 등을 연계시킴으로서 새로운 부가가치 창출 및 농가소득의 증가로 지역농업활성화의 고부가가치 기능성식품 개발에 기여할 것임
 - (5) 본 과제를 통해 연구 개발된 연자육 소재는 건강기능식품 완제품의 부원료로 판매되었고 또한 수출용 완제품식품의 부원료로 판매되어 기업의 매출 증대에 기여하고 있는 중임(정관장 제품의 부원료로 판매 중)
-

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- (1) 현재 연자육 제품 및 이를 이용한 발효제품은 시중에 흔하지 않으며 본 과제의 연구결과를 통해 연자육을 활용한 생물전환 및 발효기술 분야의 기초데이터로 사용할 것이며 미래식품 기술 트렌드에 응용될 것이고 국내산 농산물을 이용한 식품 개발에 앞장설 것임
- (2) 발효식품에 대한 사회·문화적 가치는 매우 크며, 미생물을 활용해 식품원료 고유 특성에 새로운 맛과 기능을 더하는 융·복합 기술로 창조농업 시대에 가장 알맞은 분야로 꼽히며 산업체와 연구기관, 정부기관 간에 정보 교류와 협력체계 구축 마련을 통한 내수기반 확대에 이어질 것으로 예상됨
- (3) 본 연구개발을 통해 개발된 연자육 소재는 일반식품용 소재로 판매하기 위해서 국내 홈쇼핑과 온라인 시장의 진입과 기존 거래처 BtoB 식품기업 및 새로운 식품기업에 마케팅을 통하여 국내시장의 개척 및 판로를 확보시킬 것임. 국외 판로는 해외 파트너를 통한 대량 판매 토대 구축, 해외 전시회 참여를 통한 바이어 발굴 및 기존 해외 파트너를 통한 연계 사업 강화할 것임
- (5) 연자육을 가공한 제품으로는 대부분 건조 연자육 또는 연자육 분쇄 분말 등으로 판매되며, 지표물질 및 기능성 연구를 통한 피로개선 등의 원료표준화된 제품은 없는 실정으로 본 과제를 통해 얻은 생산기술 및 발효기술을 접목시킨 제품을 이용하여 타 기업의 수많은 제품 속에서 차별화를 두고 경쟁력을 높이하고자 함. 또한 향후 연자육 소재의 건강기능식품 원료 개발 또는 바이오신약 개발을 위해 원료의 표준화, CMC(Cheimstry, Manufacturing and Controls) 와 같은 자료를 확보할 것임
- (6) 발효기술은 기업의 근본적인 기술이 될 것이며 기업은 성장하여 핵심소재의 국산화를 달성하고, 신소재 개발 및 상용화에 따른 신규제품을 출시함으로써 매출효과를 기대할 수 있을 것이고, 농가의 안정적 소득 창출뿐만 아니라 신규 고용 및 일자리 창출에 기여할 수 있을 것이며 미래신성장 동력원을 확보하여 기반을 조성하고 지역경제에 이바지 할 것으로 기대됨.
- (7) 기능성물질 개발이라는 동일 목적 하에 생산공정 전체과정의 기술력과 기업의 기술개발 역량을 강화시킬 수 있으며 초고령화 사회에서의 건강복지 문제 완화와 지역 균형 발전에도 기여할 것임
- (8) 향후 연자육 소재의 사업화를 위해서 원재료의 선정 및 수급 방안, 지표물질의 안정성 (추출 및 발효 전후의 함량 변화, 저장 기간 동안의 함량 변화), 발효과정 동안의 대사산물의 변화 등에 대한 자료를 확보할 것임
- (9) 본 연구를 통하여 다양한 가능성이 생김으로서 기술을 활용한 다양한 건강기능성이 증진된 국내산 농산물의 우수한 기능성 성분을 지닌 일반식품으로서 건강기능식품의 시장규모가 빠른 성장세를 보이고 있는 요즘시대에 폭넓은 시장을 확보하기 위하여 추후 건강기능식품으로 활용할 추가적인 연구와 기존 제품과 다른 형태의 제품을 개발할 필요성이 있다고 판단되며 이는 향후 산업발전 확대 및 기업성장에 더 큰 도움이 될 것으로 보임

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내	
국외논문	SCIE	-	
	비SCIE	1	
	계	1	
국내논문	SCIE	-	
	비SCIE	1	
	계	1	
특허출원	국내	2	
	국외	-	
	계	2	
특허등록	국내	4	
	국외	-	
	계	4	
인력양성	학사	-	
	석사	2	
	박사	-	
	계	2	
사업화	상품출시	1	
	기술이전	-	
	공정개발	3	
제품개발	시제품개발	5	
비임상시험 실시		-	
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	-
		2상	-
		3상	-
	의료기기	-	
진료지침개발		-	
신의료기술개발		-	
성과홍보		-	
포상 및 수상실적		-	
정성적 성과 주요 내용		-	

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업 미래대응식품 연구개발과제 최종보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부(농림식품기술기획평가원)에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.