

보안 과제( ), 일반 과제( O ) / 공개( O ), 비공개( ) 발간등록번호( O )  
농축산물안전유통소비기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호
11-1543000-003833-01

# 국내산 발효농용의 부가가치 향상을 위한 제품화 기술 개발

---

2022. 01. 28.

주관연구기관 / 전북대학교 산학협력단

협동연구기관 / 전주대학교 산학협력단

(재)전북바이오융합산업진흥원

한국양토양육축산업협동조합

농 립 축 산 식 품 부  
(전문기관)농림식품기술기획평가원

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “국내산 발효녹용의 부가가치 향상을 위한 제품화 기술 개발” (개발기간 : 2020. 10. ~ 2021. 10.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022. 01. 28.

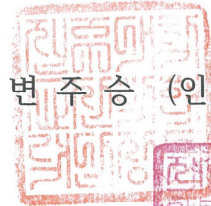
주관연구기관명 : 전북대학교 산학협력단

대표자 조 기 환



협동연구기관명 : 전주대학교 산학협력단

대표자 변 주 승 (인)



(재)전북바이오융합산업진흥원

대표자 김 동 수 (인)



한국양토양록축산업협동조합

대표자 안 현 구 (인)



주관연구책임자 : 전북대학교

황인호

협동연구책임자 : 전주대학교

오상남

(재)전북바이오융합산업진흥원

정이형

한국양토양록축산업협동조합

김용안

위탁연구책임자 : 연세대학교

전보영

신한대학교

이명호

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

# 최종보고서

보안등급

일반[ ], 보안[ ]

중앙행정기관명	농림축산식품부				사업명	농축산물안전유통소비기술개발사업						
전문기관명	농림식품기술기획평가원				내역사업명							
공고번호	농림축산식품부 공고 제 농축2020-360호(2020.7.27)				총괄연구개발 식 별번호							
					연구개발과제번호	320111-1						
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB1706 식품공정공학	35%	LB1703 식품발효학	35%	LB1708 식품위생품질관 리	30%					
	농림식품과학 기술분류	PA0103 식품가공공정	35%	PA0102 식품미생발효	35%	PA0303 식품 위생안전	30%					
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국문	농축산물안전유통소비기술개발사업										
	영문	Agricultural and livestock products safe distribution and consumption technology development project										
연구개발과제명	국문	국내산 발효농용의 부가가치 향상을 위한 제품화 기술 개발										
	영문	Development of commercialization technology to improve the added value of fermented Antlers velvet produced in Korea										
주관연구개발기관	기관명	전북대학교			사업자등록번호	402-82-15272						
	주소	(우)54907			법인등록번호							
연구책임자	성명	황인호			직위	교수						
	연락처	직장전화 전자우편				휴대전화 국가연구자번호						
연구개발기간	전체	2020. 10. 12 - 2021. 10. 11 ( 12개월)										
	단계	1단계	2020. 10. 12 - 2021. 10. 11 ( 12개월)									
연구개발비 (단위: 천원)	정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				합계			연구개발비 외 지원금	
	현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	현금	현물	합계		
	총계	130,000	-	-	-	-	130,000	-	260,000	-		260,000
1단계	1년차	130,000	-	-	-	-	130,000	-	260,000	-	260,000	-
공동연구개발기관	기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고						
	공동연구개발기관	전주대학교	오상남	조교수		역할	기관유형					
		(재)전북바이오융합산업진흥원	정이형	팀장		협동	대학교					
	위탁연구개발기관	한국양토양록농협	김용안	본부장		협동	재단					
		연세대학교	전보영	교수		협동	농협					
신한대학교		이병호	교수		위탁	대학교						
연구개발담당자 실무담당자	성명	김용안			직위							
	연락처	직장전화 전자우편				휴대전화 국가연구자번호						

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

2022 년 01 월 28 일

연구 책임자 : 황 인 호 (인)

주관연구개발기관의 장 : 전북대학교 산학협력단

공동연구개발기관의 장 : 전주대학교 산학협력단 (직인)

공동연구개발기관의 장 : (재)전북바이오융합산업진흥원 (직인)

공동연구개발기관의 장 : 한국양토양록축산업협동조합 (직인)

## < 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명	농축산물안전유통소비기술개발사업			총괄연구개발 식별번호							
내역사업명 (해당 시 작성)	국내산 발효녹용의 부가가치 향상을 위한 제품화 기술 개발			연구개발과제번호		320111-1					
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB1706 식품공정공학	35%	LB1703 식품발효학	35%	LB1708 식품위생품질관리	30%				
	농림식품과학기술 분류	PA0103 식품가공공정	35%	PA0102 식품미생발효	35%	PA0303 식품 위생안전	30%				
총괄연구개발명	농축산물안전유통소비기술개발사업										
연구개발과제명	국내산 발효녹용의 부가가치 향상을 위한 제품화 기술 개발										
전체연구개발기간	2020. 10. 12 - 2021. 10. 11 ( 12개월)										
총 연구개발비	총 260,000 천원 (정부지원연구개발비: 130,000 천원, 기관부담연구개발비: 130,000 천원)										
연구개발단계	기초[ ] 응용[○] 개발[○] 기타			기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점기준( 30%) 종료시점목표(100%)					
연구개발과제유형											
연구개발과제특성											
연구개발 목표 및 내용	최종 목표		국내산 발효 녹용의 생산 최적화 및 수율 향상 등 공정 개선을 통한 가격 경쟁력 확보								
	전체 내용		수입 녹용과의 차별화를 위하여 국내산 녹용의 마커를 개발하였으며, 발효 녹용의 질병 차단과 식품 안전성 확보를 위한 품질인증시스템을 도입함. 특히 발효 녹용의 건강 기능성 동물 모델 검증 및 수율 향상이 가능한 대량생산 표준화 기술을 개발, 국내산 녹용의 경쟁력 강화에 기여								
연구개발성과	국내산 발효 녹용의 식품 안전성·질병 차단을 위한 농협안심녹용 8단계 품질관리 시스템 구축, 국내산과 수입 녹용을 구분할 수 있는 대사체 마커 확립, 수율 향상 대량생산 제조 기술 개발 및 발효 녹용 추출물에 대한 동물 모델 검증을 통한 항균 항노화 기능성 확인 연구를 통하여 수입 녹용과의 차별화, 안전성 확보, 경쟁력 확보, 제품화에 기여										
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	① 국내산과 수입 녹용 원산지를 구분할 수 있는 대사체 마커기술 확보(특허 1), ② 녹용의 품질, 질병차단, 식품안전성 강화 전처리 기술 개발 및 녹용이력제 등을 포함한 “농협안심녹용 8단계 품질관리시스템”을 도입하여 소비자 불안감 해소에 기여하였으며, 이를 통한 제품화(3개 제품)를 성공하여 국내산 녹용 경쟁력 강화에 도움이 될것으로 사료 됨 ③ 발효녹용의 항노화·면역증진 효능 검증 및 수율 향상 대량 산업화 표준모델 개발 등(특허2)으로 국내산 녹용 소비촉진이 기대 됨										
연구개발성과의 비공개여부 및 사유	공개 2년 유예 요청 : 금차 과제에서 사슴소모성질병(CWD)에 대한 검증을 80개 샘플에 대하여 실시하였으나, 후속 과제(과제번호321033-3)에서 보다 많은 시료를 검증할 예정이며, 검증 이후 특허를 추진코자 합니다. 2년 동안 공개 유예를 신청합니다.										
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구시 설·장 비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	화합물	정보
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)	녹용		식품 안전성		유효성분		발효		부가가치 향상		
영문핵심어 (5개 이내)	Antler velvet		Food safety		Active ingredient		Fermentation		Value added improvement		

210mm×297mm[(백상지(80g/m<sup>2</sup>) 또는 중질지(80g/m<sup>2</sup>)

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요 .....	3
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용 .....	15
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도 .....	113
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성) .....	123
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도 .....	124
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획 .....	125
별첨 자료 (참고 문헌 등) .....	126

# 1. 연구개발과제의 개요

## 가. 국내 사슴산업의 현황

- 사슴의 녹용(Antler velvet, Cervus 鹿角)을 약용으로 사용한 것은 기원전 168년 중국 후난성 무덤 두루마리에서 찾아 볼 수 있으며, 2000년 이전부터 동양 전통 의학(神農本草經)에서 다양한 질병을 치료하기 위해 이용되어 왔다(Wu at al. 2013 ; Kawtikwar at al. 2010). 지난 몇 년 동안 화학 성분, 생리활성 성분, 기능성 지질, 약리에 대한 연구는 건강기능 및 의학적 치료제로 사용될 수 있음을 보여 주었다(Kawtikwar at al. 2010; Sui at al. 2014; Pham at al. 2019).
- 최근 국민의 건강 기능성 제품에 대한 관심 증가로 녹용 표시 제품 품목과 판매수량은 급증하고 있으나, 아이러니하게도 지난 10년 동안(2007년부터 2017년) 녹용 총 소비량은 43.7% 감소하였고, 그중 수입 녹용은 40.9%, 국내산 녹용은 54.0%가 감소하였다. 즉, 국내 다수의 녹용 제품이 전통적인 녹용 함량 보다 훨씬 못 미치고 있으며, 이로 인하여 국내 사슴 산업이 크게 위축(그림1-1)되는 큰 원인이 되었다.
- 오랫동안 국내 전통적 녹용 복용량은 1,250~2,500mg이며, 뉴질랜드의 경우 1,000~2,000mg 이상을 권장하고 있으나, 국내의 경우 녹용 1일 권장량이 없기 때문에 식품업체들은 아주 소량만 사용하고 있어, 이로 인하여 소비자와 국내 사슴업계 모두가 피해를 보고 있다. 녹용 복용량은 임상실험에서 1g/kg 용량을 투여해도 독성학적 조직병리학적 이상이 없고, 전립선 암세포 항종양 시험에서 4g/kg 용량에 대하여 돌연변이 유발성과 독성이 없다는 보고가 있다.



그림 1-1) 사슴 산업 현황 (출처 : 한국양록협회 2019, 농림수산식품부 2019 보고자료)

## 나. 국내 녹용 유통 현황

- 2019년 기준으로 국내 녹용 원료 소비시장은 374.7톤(약 630억원)을 소비하고 있으며, 세계 20여 개 소비 국가 중에서 우리나라는 중국 다음으로 세계 2번째로 많은 녹용을 소비하는 국가이다.
- 국내에서 한약제로 유통되는 수입 녹용은 뉴질랜드산(레드디어), 러시아산(엘크)이 주종을 이루고 있으며, 녹용 수입량은 306톤(523억원)이 수입되었다 (표 1-1).
- 국내산 녹용은 약 68.6톤이 생산(표 1-2)되고 있으며, 엘크(대형종)가 47.0톤, 매화록(소형종)이 18.5톤이 생산되고 있다.
- 국내산 녹용은 예로부터 가족 건강을 책임지는 으뜸 보약으로 인식되어, 수입 녹용에 비하여 가격이 비싸지만(뉴질랜드산 대비 191%, 러시아산 대비 138%), 편의성 및 신토불이를 신뢰하는 소비자 인식에 기인하여, 국내 녹용 시장 18.3%를 점유하고 있다.
- 국내산 녹용은 주로 건강원 및 다림방 등에서 생녹용을 가공하여 녹용중탕용으로 소비를 하여 왔으나, 최근 COVID-19 영향과 대기업의 녹용 시장 진입으로, 폐업과 도산이 증가하고 있다. 이로 인하여 국내산 녹용의 소비처가 많이 단절된 상태이다.

표 1-1) 국내 녹용 수입량 : 306톤, 523억원

구분		수입량		수입금액 (천불USD)	무역수지 (천불USD)	수입금액 (억원)
		(톤)	비중			
총계		306.1	100 %	44,971	△ 44,971	526.16
뉴질랜드	기타	21.2	6.9 %	1,568	△ 1,568	
	녹각	-	-	-	0	
	전지	207.9	67.9 %	30,141	△ 30,141	
러시아연방	전지	51.4	16.8 %	12,757	△ 12,757	
	녹각	25.7	8.4 %	505	△ 505	

※ 출처 : 2019년 관세청 무역 통계 자료

표 1-2) 국내산 녹용 생산량 : 68.6톤

구분	꽃사슴	레드디어	엘크	순록	기타	계
사육 두수	13,298 두	1,084 두	12,928 두	106 두	1,457 두	28,873 두
비율(%)	46.1%	3.8%	44.8%	0.4%	5.0%	100.0%
숫사슴비율	65.0%	65.0%	65.0%	65.0%	65.0%	65.0%(평균)
두당생산량	2.15 kg	4.25 kg	5.60 kg	0.00 kg	0.00 kg	
총생산(P)	18,584 kg	2,995 kg	47,058 kg	0 kg	0 kg	68,636 kg
	27.1%	4.4%	68.6%	0.0%	0.0%	100.0%

※ 총생산량(P)는 2019년 농림축산식품부 사슴사육두수 및 암수성비를 근거로 추정함

## 다. 국내산 녹용 재고 증가

- 한류 FTA 체결 및 평가 때까지만 해도, 육용종 사슴(레드디어)으로부터 생산된 뉴질랜드 녹용은 국내 소비자들로부터 외면을 받아 왔으나, 2018년 한국담배인삼공사의 뉴질랜드 녹용 광고(△관장, 천○)로 인하여, 이에 대한 국민의 인식이 바뀌었다.
- 그동안 국내산 원료를 사용하던 B2B 업체 제약, 홈쇼핑 전문업체 대부분이 뉴질랜드산 녹용을 이용하게(전체 수입 녹용의 74.8%) 되었으며, 이로 인하여 국내산 녹용이 큰 타격을 받고 있다.
- 또한, 수입 녹용 관련 종사자들과 일부 한의사들이 국내산 녹용에 대하여, 오래전에 발생한 가축 질병 사례를 악의적으로 전파하여 소비자 불안감을 조성하고 있으며(그림 1-2 좌측 상단), 국내산 녹용을 불량식품으로 유도하여 국내산 소비를 더욱 위축시키고 있다.
- 이로 인하여 매년 국내산 녹용의 51%(37.5톤, 1백만냥, 200억원)를 소비하여 왔던 전통 녹용 추출 가공업체(다림방, 건강원 등)의 폐업이 급증하였으며, 녹용 판매 부진과 녹용 재고 증가로 인하여, 사슴 농가의 경영난으로 지난 10년 동안(2007년부터 2017년) 사슴사육 농가 73%가 폐업하게 되었다.

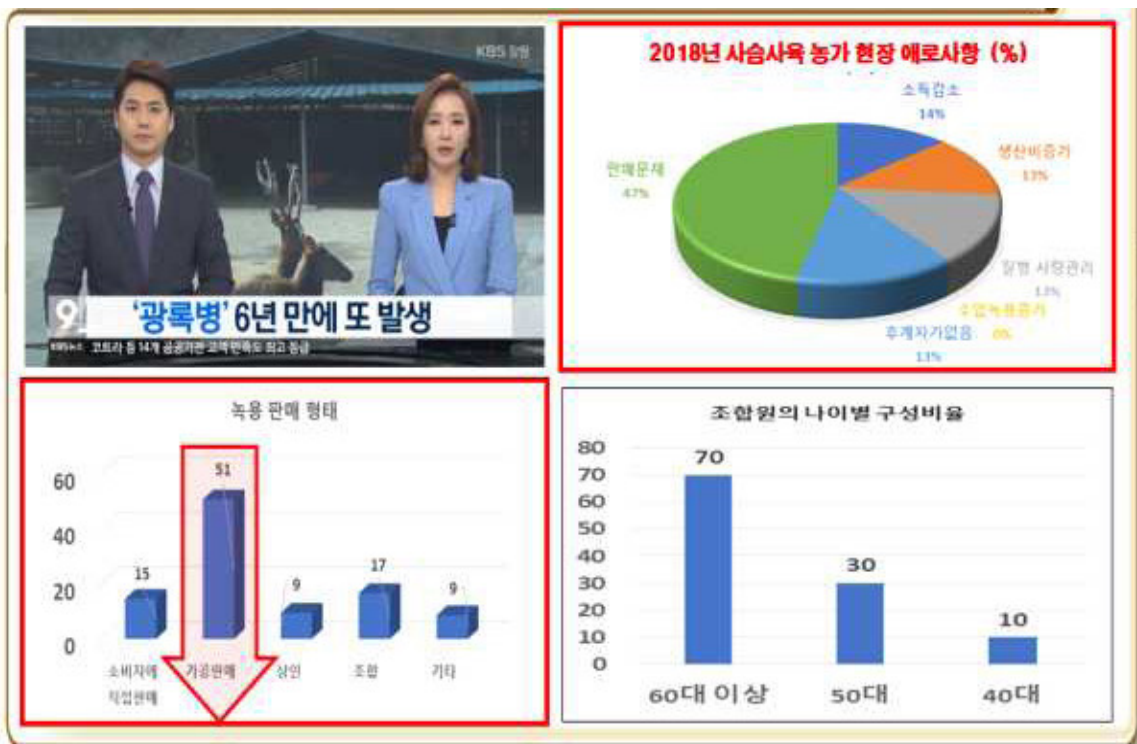


그림 1-2) 국내산 녹용 재고 증가 원인 (2019.5월 한국양도양록농협 조사 자료)



## 라. 국내 녹용 연구 기술 현황

- 녹용 추출 방법 및 발효 녹용과 관련된 국내 특허는 35건(표 1-3)으로 주로 발효 녹용의 최적화와 수율 향상 공정 관련 기술이 있으며,
- 녹용 발효 조건을 통한 항산화, 면역, 정신건강, 성장발육 및 펩타이드 화를 통한 미용 흡수성 등의 다양한 연구들이 있으나. 다음과 같은 미흡한 점도 있다.

### [ 국내산 녹용 차별화와 경쟁력 강화 관점, 국내 연구 기술 개발이 필요한 분야 ]

- ① 녹용 원료 식품 안전성 확보 : 현재 국내산 양록 산업 발전을 위하여 많은 연구가 진행되었으나, 현 국내산 녹용 산업화 기술의 가장 취약한 점은 양록 산업 산업화 체계 확립 미진으로, 소비자 또는 수입 녹용 취급 상인들로부터 공격받고 있는, 국내산 녹용의 가축 질병(결핵, CWD등) 제어를 위한 제도적인 식품 안전장치가 없다.  
☞ 국내산 녹용의 식품 안전장치가 없는 그 어떠한 연구사업도 기술 가치는 제로이다.
- ② 실용성 : 국내산 생녹용(냉동)의 유통 현실은 녹용 제조과정 중 유효성분 소실, 파괴, 불활성화 문제점을 갖고 있으며, 이를 개선하는 실용적인 산업화 기술은 아직 없다.  
☞ 국내 녹용 원료(생녹용)의 저장, 유통에 대한 인식 부족으로, 산학연 연구가 미흡함
- ③ 최적화된 수율관리 : 기업 입장의 수율 만능주의는 바람직하지 않음. 수율 향상과 원가절감 기술은 녹용 원료 고유의 기능성 물질이 파괴되지 않는 전제 조건하에 개발되어야 하며, 또한 대량생산 가공처리 효율가치를 고려되어야 한다. B2B 기업의 요구사항과 산업표준화에 필요한 요건이 미흡하다.  
☞ 수율 향상을 주목적으로 한 기술은 소비자들로부터 외면당하게 된다.
- ④ 품질 표준화 : 산업화를 위해서는 원료 투입조건, 가공 방법의 표준화가 필요하며, 녹용 원료 투입 매뉴얼을 준수할 때, 예상되는 유효성분, 품질 및 생산량이 예측되어야 하나 국내산 녹용에 적합한 가공업체 표준화 기술이 없다.
- ⑤ 차별화된 기능성 (동물모델 검증) : 성장 촉진과 면역력 관련 기술이 주류이며, 아직 항노화 관련 기술은 미흡하다. 또한 향후 GMP 개별 인증을 위한, 1단계 동물실험과 독성 실험을 포함한 국제 저널(SCI) 수록이 필요하다.
- ⑥ 원산지 판별 기술 : 종종 값싼 수입산 녹용을 국내산으로 둔갑하여 판매하는 것이 문제가 되고 있으나, 현재 원료에 대한 유전자 판별 기술은 있으나, 열처리 가공으로 유전자가 파괴된 원료에 대한 원산지 판독을 할 수 있는 기술은 개발되어 있지 않다.
- ⑦ 대량생산 산업화, 규모화 : 국내산 녹용 재고 감축을 위해서는 연간 15톤 (생녹용 원료 기준 40 만냥) 이상을 가공 판매할 수 있는 규모의 산업화된 표준 기술의 개발이 필요하다.

표 1-3) 국내 지적재산권 현황

특허명	등록일자	출원인	발명자	등록번호	출원국
녹용 고압추출물의 제조 방법	2020-02-28	(주) 한국인삼공사,이원희	이원희	KR102082991B1	대한민국
녹용 및 녹각유래의 골 이식재 및 그의 제조 방법	2020-02-28	김범수	김범수	KR20200021143A	대한민국
콘드로이친 함량이 증가된 녹용 가수분해 발효물, 그 제조 방법, 및 이를 포함하는 증가된 식품	2019-11-29	(주) 바이오션,조정은	조정은	KR102033501B1	대한민국
발효녹용을 유효성분으로 포함하는 근육질환 예방 또는 치료용 또는 근 기능개선용 조성물	2019-07-08	(주) 허브앤슬루션,서승태	서승태	KR101997060B1	대한민국
면역증진 효과가 있는 녹용 약침 및 이의 제조 방법	2018-11-06	한약진흥재단,신흥목	신흥목	KR20180120436A	대한민국
높은 강글리오이드 함량을 지니는 녹용 발효물 고형 제제의 제조 방법 발효물	2017-09-08	유창우	유창우	KR101776686B1	대한민국
녹용 효소 가수분해 추출물을 포함하는 가공식품물	2018-02-13	전남대학교 산학협력단, 정선희	정선희	KR20180015343A	대한민국
녹용의 고생리활성성분을 함유한 녹용 효소가 가수분해 추출물의 제조 방법 및 녹용 효소가 수분해 추출물	2018-01-29	전남대학교 산학협력단, 정선희	정선희	KR101822752B1	대한민국
녹용 추출물을 포함하는 마스크팩 조성물	2017-04-17	김일태	김일태	KR20170041399A	대한민국
녹용 함유 한약추출물과 엠에스엠을 이용한 약학 조성물 제조 방법	2016-04-12	건국대학교 글로컬 산학협력단, 전병태	전병태	KR101611966B1	대한민국
대추 및 녹용 추출물을 이용한 유산균 발효 음료의 제조 방법	2015-07-15	충청북도 보은군,안준배	안준배	KR20150081921A	대한민국
녹용 초고압추출발효조성물 및 이의 제조 방법	2014-10-14	최성원	최성원 서승태	KR101448496B1	대한민국

특허명	등록일자	출원인	발명자	등록번호	출원국
고체상 발효를 통한 주름 개선 활성을 갖는 녹용추출물 및 그 제조 방법	2014-08-13	(주)삼성신약, 이성권	이성권	KR20140099755A	대한민국
시알산 함량이 녹용 추출물의 제조 방법	2013-08-07	(주) 한국인삼공사, 강봉구	강봉구	KR20130087670A	대한민국
항염 활성을 갖는 발효 녹용 추출물의 제조 방법, 이로부터 얻어진 추출물 및 이러한 추출물의 용도	2013-04-25	(주)메레데코리아, 정창휘	정창휘	WO2013058594A2	대한민국
녹용의 효소 분해처리를 통하여 유효성분 함량이 높은 녹용 추출물을 제조하는 방법	2013-07-10	케이비에프 주식회사, 최미애	최미애	KR20130078724A	대한민국
녹용 가수분해 추출물을 포함하는 피부 노화 방지 화장품 조성물	2012-07-24	주식회사 엘지생활건강, 박선규	박선규	KR20120082587A	대한민국
녹용으로 수용성 물질의 제조를 위한 추출 방법의 개발과 추출물의 생리활성	2012-06-07	주식회사 제이비티, 김상민	김상민	KR20120057699A	대한민국
눈꽃동충하초를 이용한 녹용 발효 추출물의 제조 방법 및 그로부터 제조된 녹용 발효 추출물, 녹용 칼슘 그리고 눈꽃동충하초 농축액	KR20110030288A	생물공학천연물연구소(주), 남명식	남명식	KR20110030288A	대한민국
녹용 보관 방법	2007.07.11	주식회사 천지인 (주)팜맥스, 남권희	남권희, 배기화, 김윤수, 박영민, 한병도	10-0740553	대한민국
사슴뿔의 급속동결 건조 방법	2005.06.17	이성복	이성복	10-0497598	대한민국
건조 사슴뿔 절편 제조 방법	2002.06.27	류시훈	류시훈	10-0343818	대한민국
녹용 분말의 제조 방법	2005.01.28	김승용	김승용, 이부용	10-0715628	대한민국
녹용 캡셀제	1999.06.15	백인범	백인범	10-0219439	대한민국
녹용 분말 캡슐의 제조 방법	2006.09.15	오상형	오상형	10-0627157	대한민국
생약 추출물을 함유한 녹용 추출물의 제조 방법과 이에 의해 제조된 녹용 추출물, 그리고 이를 함유하는 식품 및 의약품	2006.12.15	매일유업 주식회사.	이임식, 김용기, 윤송섭, 전정옥, 전호남	10-0660477	대한민국

특허명	등록일자	출원인	발명자	등록번호	출원국
녹용으로부터 추출된 항진균 조성물 및 이의 제조 방법	2005.12.28	전길자, 최원자, 한소엽	전길자, 최원자, 한소엽, 이윤진, 김영아, 민주영	10-0540941	대한민국
항산화 효과가 우수한 녹용 추출물의 제조 방법 및 이에 의해 제조된 녹용 추출물	2010.04.15	광동제약주식회사, 장문식	장문식, 우문재, 부성준	10-0954386	대한민국
녹용 추출의 제조 방법	2011.01.27	주식회사 보고신약	이성권, 태경환	10-1012612	대한민국
항산화 및 피부세포의 멜라닌생성을 억제하는 녹용 발효물의 제조 방법 및 그에 의한 녹용 발효물	2010.06.17	경희대학교 산학협력단	김동현, 김영수	10-1966139	대한민국
2단계 방식에 의한 기능성 강화 가공 발효 녹용 및 그 제조 방법	2012.02.02	(주)비오티	정용진, 장세영	10-1114495	대한민국
항염 활성을 갖는 발효 녹용 추출물의 제조 방법, 이로부터 얻어진 추출물 및 이러한 추출물의 용도	2012.07.24	(주)메레데코리아, 정창휘	정창휘, 최학주, 김동희	10-1169775	대한민국
버섯을 이용한 녹용, 사슴육 또는 가슴뼈의 발효 방법 및 그 발효물	2011.12.14	김중순, 김영희	김중순, 김영희	10-1096642	대한민국
녹용을 함유하는 과자류 및 한과류의 제조 방법	2005.07.19	전병태	전병태	10-0503974	대한민국
녹용에서 추출한 콜라겐을 함유하는 기능성 강화 화장료 조성물 및 그 제조 방법	2008.06.05	김도완	김도완, 박연경	10-0837879	대한민국
녹용 농축액 제조 방법	2007.06.11	(주)제이비티	전병태	10-0729513	대한민국
녹용 및 기타 한약재를 포함하는 한방 음료	2004.04.14	매일유업주식회사	이진태, 안봉전, 이임식	10-0429244	대한민국
녹용을 이용한 기억력 및 학습 능력 증진 기능성 식품 조성물	2012.08.29	(주)제이비티	전병태, 이치호	10-1179766	대한민국
녹용을 포함하는 한방생약 복합추출물을 함유한 화장료 조성물	2006.08.21	(주)코리아나 화장품	이장태, 정지현, 조병기	10-0616251	대한민국

## 마. 국외 녹용 연구 기술 현황

- 최근 많은 연구에서 녹용의 기능은 조직과 뼈의 건강과 활력의 향상, 근골격계 기능 개선, 질병 및 면역 체계 조절에 의한 저항력증가, 혈류 및 혈압 조절 향상, 치료의 촉진과 관련되었다고 보고하였다.
- 국외의 경우, 녹용 복용에 대한 인식이 우리나라의 인식과는 상이하여 중국을 제외하고는 녹용 중탕(파우치 제품)과 관련된 제품은 거의 없으며, 국내 제품처럼 다양화되어 있지 않다. 주로 녹용 분말, 녹혈 분말, 알콜 추출 농축액 및 분무 제품이 주종을 이루고 있다.
- 녹용 기능성 분야별 효능입증을 위한 과학적 임상시험 연구와 녹용 기능성 식품 개발 연구에 관심이 증가하고 있다. 주요 국외 녹용 연구기관과 협회, 대표기업 및 지적재산권 현황은 표 1-4) 표 1-5) 표 1-6)과 같다.
- 녹용의 현재까지 40여 개 주요 유기물질과 500여 개의 활성 성분이 인체 유익하다고 발표되고 있다. 하지만 녹용은 아직도 밝혀지지 않은 다양한 기능성 생리활성 물질을 가지고 있으며, 녹용의 수확시기, 녹용의 부위, 가공 방법에 따라 그 기능성 생리활성 물질이 달라지기 때문에 녹용의 지표 물질 표준화가 현실적으로 어렵다.
- 녹용의 생리활성 물질은 확인된 성분보다는 미확인 생리활성물질이 더 많으며, 현재에도 녹용 고유의 기능성 물질에 관한 연구가 국내외에서 계속 연구 진행 중이다.

표 1-4) 사슴 연구 연구기관 및 협회

국제 연구기관 및 협회 (국명),	주요 기능
The British Deer Society (UK)	사슴 보호, 교육, 연구 (영국사슴협회)
British Deer Farms and Parks Association (UK)	영국 사슴농장 및 공원협회 (국가공인)
Federation of European Deer Farmers Associations (Europe)	유럽사슴농가협회연맹(유럽 18개국)
National Deer Association(NDA)	북미 사슴 동물보호 및 사슴 사냥 기술 단체
Deer and Elk	사슴산업 연구 정보 (온타리오주 농림축산식품부)
North American Deer Farmers Association (US)	북미 사슴농가협회
AgResearch (NZ)	뉴질랜드 정부 독립적인 연구 개발, 정보 제공
Deer Industry New Zealand (NZ)	뉴질랜드 사슴산업 발전 지원, 뉴질랜드 사슴사육업의 대표
DEEResearch (NZ)	투자 사슴 연구 및 광범위한 연구 정보 제공
The Royal Society of New Zealand (NZ)	뉴질랜드 왕립학회, 독립적인 국립아카데미
Australian Deer Research Foundation (AU)	호주 사슴 생물학, 생태 (사슴 연구 재단)
Deer Industry Association of Australia (AU)	호주사슴협회

표 1-5) 녹용 생산 대표적 기업

대표 기업 (국명),	관련 제품
길림시쌍사약품유한공사 (CN)	녹용황기익신드링크제
Evergreen life (NZ)	액티브 녹용마누카꿀
UB-BIO (NZ)	숫사슴피질분 캡슐제
All green (NZ)	웰러스 녹혈
Yurtland Natural Health (CA)	녹용함유 기능성 캡슐제-캐나다 대표업체

표 1-6) 국외 지적재산권 현황

특허명	등록일자	출원인	발명자	등록번호	출원국
Deer antler extract for promoting angiogenesis	2011.11.29	Velvet Antler research New Zealand Limited	Coates Dawn Elizabeth, Haines Stephen Roy, Suttie James Miller	08067364	미국 호주 유럽
Health-care wine and preparing method thereof	2005.12.30	Yang Jianan	Yang Jianan, Yang Song	1990852	중국
Velvet antler insulin active factor extraction method	2008.12.16	Northeast Forestry University	Wang Zhenyu, Jiao Yan	101422486	중국
Hairy antler powder capsule and preparation method thereof	2007.07.11	Fushun Jiujiu Deer Industry Co., Ltd.	Tang Shuyou, Zhao Jiayu, Lin Rentang, Ye Deming	1994321	중국
Method for preparing bone grafting material with pilose antler and deer bone as material and the bone grafting material prepared by the method	2008.03.26	Wang Xiwen	Li Deshan, Wang Xiwen	101147809	중국
Velvet deerhorn liquor for delaying apoplexis and improving sleep and preparation method thereof	2009.01.28	Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd.	Xiao Wei, Dai Xiangling, Ling Ya, Wang Zhenzhong, Gao Gong, Zhu Yuefei, Fei Jingzhong, Xu Lianming	101352509	중국
Method for the extraction of deer antler	2006.06.28	Velvet Antler Res New Zealand	Coates Dawn Elizabeth, Haines Stephen Roy, Suttie James Miller	1795204	중국
Improved extraction process	2010.11.03	Velvet Antler research New Zealand Limited	HAINES, Stephen	01606232	유럽

특허명	등록일자	출원인	발명자	등록번호	출원국
Maca and antler for augmenting testosterone levels	2006.04.12	B i o t i c s Research Corporation	Deluca Daryl, L Sparks, William S, Deluca Denis R.	01263448	유럽
Method for preparing gel from velvet antlers and waste in their pharmaceutical processing	2005.03.27	Kuleshove R S, Jartsev V G, Kuleshov S M	Kuleshove R S, Jartsev V G, Kuleshov S M	2248802	러시아
Method for reprocessing and preserving of Siberian stag and sika deer velvet antlers	2001.02.27	Tikhonov Sergei Nikolaevich, Shihliakov Konstantin Nikolae	Tikhonov S N, Shihliakov K N	2163438	러시아
Method of producing ultradispersed power from velvet antlers for preparation of food additives or pharmaceutic and cosmetic preparations	2000.03.20	Tikhonov Sergei Nikolaevich, Shihliakov Konstantin Nikolae	Tikhonov S N, Shihliakov K N	2146525	러시아
Man sexual potency enhancing drug	2008.11.10	Verkholantsev Jurii Anatol Evi, Kuranov Grigorii Vladimirovich	Verkholantsev Jurii Anatol Evi, Kuranov Grigorii Vladimirovich	2337570	러시아
Method of obtaining drug on base of velvet antlers of deer	1995.10.10	Nii Farmakologii, Tom Nauchnogo	Goldberg Evgenii D, Dygai Aleksandr M, Suslov Kikolai I, Litvinenko Vasilii I, Popova Tatyana P, Agafonov Vladimir I	2045269	러시아
Antler herb medicine fermented with chicken gizzard and a method for preparation thereof	2002.11.19	Lee Youn-Soo	Lee Youn-Soo	06482443	미국
Hyaluronic acid and chondroitin sulfate based hydrolyzed collagen type II and method of making same	2004.08.24	BioCell Technology, LLC	Ishaq Suhail	06780841	미국
Antler composition and its manufacturing process	2006.02.28	Eve Szu-Ju Chen	Eve Szu-Ju Chen	07005144	미국
Process of purifying antler-derived bone growth factors	1995.04.18	Rhone-Poulenc Rorer Pharmaceuticals Inc., OsteoSA Inc.	Mundy; Gregory R., Gutierrez; Gloria E., Garrett; Ian R.	05408041	미국

## (1) 중국의 동향

- 중국은 녹용을 수천년 동안 중국 의학의 귀한 원료로 사용하여 왔다. 중국은 주로 시카사슴의 녹용을 연간 400톤 이상 생산하고 있다. 가공 방법도 녹건, 녹혈, 녹미, 녹신, 녹태 등으로 다양하다. 건조 녹용과 건조 녹용 분말을 많이 사용하며, 최근에는 극저온 초 미세 분쇄 기술(-60℃, 12Pa)을 사용하여 동결건조 분말 제조에 활용하고 있다.
- 특이하게, 부유층에서는 기름 분골(jelly tip, crown 5Cm 이내)을 선호하고 있어 국내 뉴질랜드 수입 녹용중 상당수가 다시 중국으로 역수출되는 현상이 발생하고 있다. 이로 인하여 국내 시판 뉴질랜드산 녹용 제품은 기름분골이 없는 것이 많다.
- 최근에는 세계 3번째 대형종인 Sambar 사슴(수록)을 중국 전통종으로 기표하고 있으며, 이에 대한 연구가 활발하다. 녹용의 다양한 약리 성분을 밝히기 위해 대사체 분석에 대한 많은 연구가 진행되고 있으며, 녹용 줄기세포와 사향 사슴 인공 번식에 대한 연구도 진행되고 있다.

## (2) 러시아의 동향

- 녹용은 재정 러시아 이전부터 마법의 약으로 알려져 있으며, 1930년대부터 Pantocrin(판토크린, 녹용 알콜 추출물)으로 판매되고 있다. 1930년부터 대규모 사슴 개량을 시작하여 현재는 사육에 적합한 엘크종이 보급되어 있다. 현재 중국 및 우리나라의 한의사들이 선호하는 외관이 우수한 건조 녹용을 원료로 수출하고 있다.
- 러시아는 오래전부터 사슴 박제 기술이 매우 발달되어 있으며, 이러한 박제 기술을 응용한 녹용 건조 생산 기술과 경험은 녹용 절편 시 외관이 좋은 녹용을 생산하기 적합한 기술을 제공한다.
- 러시아는 역도선수 및 스포츠 선수들에 대한 스포츠 응용과학이 발달하였으며, 특히 운동선수의 근육 및 근력 향상에 많은 관심과 연구가 진행되어 왔으나 최근 세계반도핑기구(World Anti-Doping Agency, WADA)에서는 녹용에 들어있는 IGF-1을 이유로 녹용 스프레이를 경계하고 있어 향후 귀추가 주목된다.
- 러시아는 사슴과 다른 동물에 대한 “연방 내 생물다양성 보존을 위한 전략 및 실행 계획(Strategy and Executive Plan for the Conservation of Biodiversity within the Russian Federation, 2014)”에 의하여 사슴 번식, 레크레이션 및 녹용 생산 등 다양한 공간 규모에서 여러 가지 생태계 서비스를 지원하고 있다.
- 최근 러시아에서는 사슴 혈액 목욕 방법(하루에 한 번씩 10 번)이 각광 받고 있고, 푸틴 대통령이 사슴 혈액 건강프로그램에 여러 차례 참여한 바가 있어 녹혈 치유 건강 프로그램을 육성하고 있다.



### (3) 뉴질랜드의 동향

- 뉴질랜드는 세계 최대의 사슴 사육 두수를 보유하고 있으며, 시카, 레드디어, 엘크, 외피티 품종으로부터 연간 450~550톤의 녹용을 생산하고 있다. 뉴질랜드의 경우 자국 내 양육 산업 발전과 육성을 위해 사슴과 녹용의 효능에 대한 연구와 소비자의 기호에 적합한 제품을 개발하여 판매 또는 수출하고 있으며, 중국, 한국의 판매를 위하여 녹용 품질 등급제도를 가지고 있다.
- 뉴질랜드 일부에서는 발효 녹용을 이용하여, 고분자 단백질을 수용성의 저분자 펩타이드로 분해시킴으로써 흡수율 증진 효과가 있는 제품 등을 국내에 수출하고 있다.
- 또한 러시아 회춘 프로그램과 비슷한 Live-Cell Therapy 프로그램과 태반 캡슐 기술을 통한 활력과 젊음을 되찾거나, 기적적인 회춘 능력, 노화 지연, 젊음 유지 방법 등이 개발되고 있다.
- 녹용 수출을 위하여, 벨트랙 제도(생산자 이력제)을 도입 중에 있으며, COVID-19에 대한 녹용의 면역력 및 녹용의 COVID-19 치료 개선 효과 등에 대한 연구가 진행되고 있다.
- 최근 뉴질랜드 녹용의 주요 마케팅 파트너가 한국에서 중국으로 전환되었으며, 녹용 생산부터 가공 후 제품에 이르기까지 중국 구매자가 원하는 상품 형태로 전환되고 있다. 육류 겸용종인 레드디어의 단점을 보완하기 위하여 엘크 등 녹용 종과의 교배에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

### (4) 북미의 동향

- 미국 식품의약국(FDA)은 녹용의 분말, 추출물, 스프레이 제품 등에 대해 승인을 한 바 있으며, 특히 스포츠 경기력 향상과 부상 회복의 목적의 다양한 녹용 스프레이 제품과 보충제로 많은 제품이 시판되고 있다.
- 특히 일반 보디빌더에게는 최고의 상품으로 평가받고 있으며, 이러한 단백질 보충 제품, 근육 보조제품 및 부상회복제품은 소비가 크게 증가하고 있다.
- 하지만 WADA(세계반도핑기구)는 전문 경기력의 프로선수 및 내셔널 풋볼리그(NFL) 및 PGA투어 골퍼는 녹용 스프레이의 경우, 메틸테스토스테론 반응 및 IGF-1에 대한 반응을 보일 수 있으므로 극도로 경계할 것을 권고하고 있다.
- 최근 북미 학회는 어떤 경로로 COVID-19가 사슴에게 전파되었는지 알 수 없지만, 자연 상태의 다수의 사슴에서 COVID-19에 대한 항체가 발견되었다고 발표하였다.
- 북미에서는 연간 40톤의 녹용이 생산되고 있으며, 이들에 대한 부가가치 창출과 상업적 가치를 높이기 위하여 많은 연구가 진행 및 다양한 종류의 제품이 FAD 승인을 기다리고 있다.

## 2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

### 가. 전북대학교 연구 개발 내용 (주관 연구기관)

목표 : 국내산 녹용의 지표성분 대사체 (UPLC/MS/MS Metabolic Profiling) 연구 및 분석법 검증, 녹용 및 발효녹용 향기 원인 물질 이화학적 탐색 및 개선 방향 확립

#### (1) 개요

- 벨벳 녹용 (Velvet Antlers, VA)은 사슴 중 (화록, 적록, 대록 등)의 석회화 이전 성장 단계에서 연한 녹용으로 알려져 있다. 뿔 제거 후 수컷 사슴이나 엘크는 매년 새로운 뿔을 재생 할 수 있다(Li, 2012). 빠른 성장 및 차별화된 성장속도는 다음과 같은 많은 요인들에 기인한다. 이들은 아미노산, 폴리펩티드, 인지질 및 성장 인자 등이 녹용 조직에 풍부하게 존재하기 때문으로 알려져 있다(Lai et al., 2007; Zhang et al., 2019).
- VA(녹용)은 2000년 이상 동안 전통 한약으로 이용되었다. 현재까지 다양한 형태 (예 : 분말 또는 추출물 및 캡슐 형태)로 가공되어 의료, 식품 보조제 및 건강 증진 제품 등으로 여러 나라의 시장에서 판매되고 있습니다(Gilbey and Perezgonzalez, 2012). VA 제품은 면역 체계 개선, 에너지 및 성장 향상, 수명 연장, 노화 방지, 항염증 효과, 혈압 조절, 항암 등을 포함하여 광범위한 건강상의 이점이 있는 것으로 보고되고 있다(Gilbey 및 Perezgonzalez , 2012; Kawtikwar et al., 2010; Wu et al., 2013).
- 국내의 경우, 대록(*Cervus canadensis*)과 마록(*Cervus elaphus*)의 녹용이 가장 많이 사용되고 있다(Lee et al., 2007). 그러나 국내 수요 증가와 생산 부족으로 인해 상당량의 녹용(VA)을 러시아 및 뉴질랜드와 같은 다른 국가에서 수입하고 있다 (Je et al., 2011). 이 두 국가는 세계에서 가장 큰 녹용(VA) 생산 및 수출국이다. 뉴질랜드 산업통계(2018)에 따르면 약 725톤의 사슴 VA가 생산되었으며 그 중 약 200톤이 국내 건강식품 업체로 수출된 것으로 나타났다. 한편 러시아 벨벳 산업은 매년 약 80 톤의 VA를 생산하고 있는 것으로 보고되었다(Dalisova et al., 2019).
- 현재까지 뉴질랜드 VA(Je et al., 2010) 또는 러시아 VA(Je et al., 2011) 및 중국 VA(Zhang et al., 2019)에서 향산화 활성 및 화학적 조성을 규명하기 위해 연구가 일부 수행되었다. 하지만 국내산 VA 과 수입 VA 사이의 생물학적 활성, 화학적 조성, 향미 및 생리 활성 화합물에 공통으로 존재하는 물질과 독립적으로 존재하는 물질은 무엇이며, 각국의 녹용에만 존재하는 물질에 대해서는 알려져 있지 않고 있다.

- 전체적인 맥락에서 VA의 사용을 이해하려면 화학 성분과 생리 활성 화합물의 식별을 규명하는 것이 필요하다. 따라서 본 연구의 주된 목적은 국내산 및 수입산 VA의 생리활성 대사산물을 동정하여 비교하고, 각 국가 VA의 공통적인 지표 대사산물과 각 국가별 VA에만 존재하는 마커 대사산물을 찾는 데에 있다.
- 한편, 풍미는 식품에 대한 전반적인 수용도를 결정하는 가장 중요한 감각적 특성이 다(Matsuishi et al., 2004). 그 중에서 아로마 향미는 원료 (예 : 육류 또는 동물 유래 유래 물질)에 존재하는 전구체 (예 : 아미노산, 펩타이드, 탄수화물 및 지질)로부터 형성되는 다양한 휘발성 화합물에 의해 생성되며 이들 휘발성 화합물 생성에는 열처리 중 산화 / 분해 및 Maillard 반응 (Macleod, 1994; Mottram, 1998)이 크게 영향을 미친다.
- 이와 같은 풍미가 갖는 중요성으로 해서 육류 및 육류 제품의 풍미와 같은 식품의 화학적 성분을 이해하기 위한 많은 연구가 수행되었다(Ba et al., 2013; Elmore et al., 2004; Machiels et al., 2003; Macleod, 1994; Mottram, 1998). 이와 더불어 연구자들은 동일한 동물 종일지라도 다른 품종이 다른 풍미 특성을 가질 수 있음을 발견 했다(Matsuishi et al., 2004). 녹용(VA)은 아미노산 및 특히 지질과 같은 풍미 전구체가 풍부하다(Lai et al., 2007). 따라서 우리는 다른 원산지과 품종에 따라 녹용(VA)의 향미 전구체가 다를 수 있으며, 이는 추후 추출물과 같은 최종 제품의 향미 특성에 영향을 미칠 수 있다는 가설을 세워 수행하였다.

## (2) 재료 및 방법

### (가) 재료

- 국내 녹용 유통시장의 대다수를 차지하는 사슴 중대형종에 대한 원산지별 분석을 위해 국내산 녹용(KVA)은 대륙(*Cervus canadensis*, Elk) 품종을, 러시아산 녹용(RVA, 마륙)과 뉴질랜드산 녹용(NZVA, 적륙)은 붉은사슴(*Cervus elaphus*, Red deer) 품종의 녹용을 대한민국 소매 녹용유통시장에서 원산지별로 24점씩 총 5.4 Kg을 구매하였다(그림 가-1). 각 원산지별 녹용은 해당 국가 녹용의 원산지임을 증명하는 온라인-물에서 12개, 오프라인-물에서 12점을 구입하였다. 각 1점당 시료 중량은 건조녹용 절편형태의 2냥(75g)이며, 부위는 분골·상대로 하였다. 국내산 건조녹용(KVA), 러시아산 녹용(RVA) 및 뉴질랜드산 녹용(NZVA)의 75g 당 평균 가격은 각각 110,565원, 102,498원, 74,291원 으로 국내산 가격이 가장 높았다.
- 건조된 녹용 절편 슬라이스의 수분 함량은 KVA, RVA 및 NZVA가 각각 7.0, 7.5 및 8.02%이었다. 시험에 사용한 시약은 탈 이온수, 아세트니트릴 (ACN), 포름산, 메탄올 및 질량 분석 등급의 Trolox, 2,2-Diphenyl 1 picrylhydrazyl (DPPH) 및 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) 등을 Sigma-Aldrich에서 구입하였다.



그림 가-1) 원산지별 건조 녹용

### (나) 미생물 분석

- 각 원산지 별 미생물 분석은 VA(각 유형 당 n = 24)에서 분석용 시료를 각 10g 채취하여 멸균 플라스틱 파우치에 90mL의 식염수 용액을 첨가한 후 스토마커 (Characteristic, B & F Korea)를 사용하여 1분 동안 균질화하였다. 균질화한 샘플을 식염수로 희석하여 총 호기성 플레이트 수 (APC) 및 곰팡이 측정에 사용하였다. 희석된 샘플 1mL를 APC Petrifilm and Mold and Yeast Petrifilm(3M Healthcare., Paul, MN, USA)에 도포하고 37°C에서 48시간 동안 배양한 후 그램 당 log<sub>10</sub>콜로니 형성 단위 (CFU / g)로 표시하였다. 각 샘플은 3반복 측정하였다.

(다) 미네랄, 고형분함량, 항산화 활성, 아로마 및 생리 활성 화합물 분석을 위한 녹용분말(VAP) 및 녹용추출물 (VAE) 준비

- 추출 전에 한약 제조 분쇄기(화진바이오텍, 한국)에서 VA를 80 mesh 크기로 분쇄하였다. 녹용 건조 분말(VAP)은 그대로 미네랄 분석에 사용하였으며 모든 녹용 추출액(VAE)은 동일한 조건에서 추출하였다. 각 원산지 별 VA에 대해 6개의 추출 배치(각각 750g)를 전기추출기(경서기계(주), 서울, 대한민국)를 이용하여 95℃에서 20시간 가열 후 추출하였다. 그 후 한약 추출용 천 여과기를 통해 여과하였다.
- 녹용 추출물(VAE)의 고형분 함량은 디지털 측정 장치(ATAGO PAL-2, 서울, 대한민국)를 사용하여 중량을 측정하였다. 건녹용 750g에 대한 VAE(고형분 12.5%)의 평균 추출량은 KVAE, RVAE 및 NZVAE, 각각 2,114, 2,182 및 2,182kg이었다. 마지막으로, 12.5%의 고체를 포함하는 3개 원산지의 VAE 모두 원래 추출물로 간주하였다.
- 항산화 분석은 VAE를 동결 건조기에서 건조 분말 형태로 농축한 다음 항산화 물질을 분석하였다. 아로마 및 생리 활성 화합물의 분석은 추출된 샘플에서 VAE를 추가 처리 없이 10ml를 취해 분석에 사용하였다.

(라) 항산화 활성

**【 DPPH 자유 라디칼 소거 활성 】**

- DPPH 테스트는 Zhao 등(2010)의 방법에 따라 수행하였다. VAE를 증류수로 4단계 농도로 희석한 후, 95% 에탄올 1.9mL와 0.5mM DPPH를 0.1mL와 샘플 0.1ml를 Vertex mix를 이용 혼합하여 암실, 실온에서 30분 동안 암실에서 배양하였다. 흡광도는 분광광도계를 사용하여 517nm에서 측정하였다. 다른 농도의 Trolox를 사용하여 표준 곡선 방정식과 양성 대조군을 준비하였다. VAE의 DPPH 라디칼 소거 활성을 계산하고 VAE 그램 당  $\mu\text{mol Trolox}$  당량(TE) ( $\mu\text{mol TE} / \text{g VAE}$ )으로 표시하였다.

**【 ABTS 라디칼 양이온 소거 활성 】**

- ABTS 분석은 Re 등(1999)의 방법을 수정, 사용하였다. ABTS + 양이온 라디칼은 수용액 2mM ABTS와 2.45mM과 황산칼륨(1 : 1 비율) 사이의 반응에 의해 생성되었다. 반응 혼합물을 사용하기 전에 12-16 시간 동안 실온, 암실 보관 후, ABTS · 라디칼 용액을 95% 에탄올로 희석, 분광광도계를 사용하여 734nm에서 0.730단위의 흡광도를 얻었다. 그런 다음 서로 다른 농도의 0.1mL의 VAE를 1.9 mL의 ABTS · 라디칼 용액과 혼합하여 암실, 상온에서 10분간 배양한 후 분광 광도계를 이용하여 734nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 다양한 농도로 준비된 Trolox를 양성대조군으로 사용했다. 추출물의 ABTS 자유 라디칼 소거 활성을 계산하고 VAE 그램 당  $\mu\text{mol Trolox}$  당량(TE) ( $\mu\text{mol TE} / \text{g VAE}$ )으로 표시했다.

#### (마) 미네랄, 조지방 및 단백질 함량

- 미네랄 함량은 Matilainen과 Tummavuori(1996)의 방법을 수정하여 분석했다. 테플론 용기에 7mL 질산을 넣고 VAE (각각 1g)을 혼합한 후 실온에서 12시간 동안 보관했다. 샘플 용액을 180℃에서 50분 동안 가열한 다음 실온에서 냉각시켰다. 원자방출분광광도계 ICP-OES(모델 : iCAP 7400 Duo, Thermo Fisher Scientific, 그림 가-2)를 사용하여 미네랄을 분석했다. 검출을 위해 각 광물에 대해 588.9nm의 Na, 248.3nm의 Fe, 279.5nm의 Mn, 213.9nm의 Zn 등과 같은 다른 파장을 설정했다. 검증을 위해 서로 다른 농도의 미네랄 표준을 사용하고 동일한 조건에서 실행했으며, VAE에 있는 각 미네랄의 최종 농도는 표준 보정 곡선을 사용하여 계산하였다. 조지방 및 단백질 함량은 mg / 100g VAE로 표시하였다.



그림 가-2) 유도결합플라즈마 방출분광기 iCAP 7400 Duo

#### (바) 아미노산 (AA) 측정

- 녹용추출액(VAE)에 존재하는 AA 함량은 Qu 등(2002) 방법을 적용하였다. 각 샘플 (분말 형태의 2.5g)을 5mL 증류수로 균질화했다. 0.45µm 필터 멤브레인 (Merk Millipore Ltd., Carrigtwohill, Cork, Ireland)을 통해 여과한 후, 여과액을 아미노산 분석에 사용했다. 아미노산은 Intrada 아미노산 컬럼에 연결된 초고성능액체크로마토 (UPLC, Waters, Milford, USA)를 사용하여 컬럼 2x50mm, 3µm (Imtakt, Uphur St, Suite A, Portland)로 분석하였다. 크로마토그래피 분리는 용매 A(ACN : 100mM 포름산 암모늄, 20:80 v / v) 및 B(ACN : 테트라 히드로 푸란 : 포름산 암모늄 : 포름산, 9 : 75 : 16 : 0.3 v / v)을 사용하였다. 분리조건은 3분 동안 100% B, 3.5분 동안 83% B, 3.5분 동안 100% A로 7분 동안 100% B를 유지하고 다음 샘플 주입 전에 다시 평형화하였다. 아미노산은 표준 아미노산 혼합물의 머무름시간을 기준으로 분석하였으며 유리아미노산값은 µmol / g 단위로 표시하였다.

### (사) 휘발성 향료 화합물

- 녹용 추출액(VAE)에서 향미화합물의 추출은 Ba 등(2010)의 방법에 따라 SPME (Solid Phase Micro-Extraction)를 사용하여 수행하였다. 이후, 휘발성물질은 Ba 등(2010) 및 Murat 등(2012)의 조건을 적용하여 가스크로마토그래피 / 질량분석법 (GC / MS) 시스템을 사용하여 분석하였다. 1.0 ml의 시료 VAE를 20ml 헤드 스페이스 바이알에 넣고 1.0  $\mu$ l의 내부 표준 (2-methyl-3- heptanon, 메탄올 816mg / mL)을 추가한 후, 바이알 추출을 위해 PTFE- 실리콘 뚜껑을 사용하였다. 향미 화합물의 추출, 흡수 및 탈착은 질량분광광도계 (Mass Spectrophotometry)를 사용하여 가스크로마토그래피 (모델:7890BGC)에 연결된 carboxen-poly dimethyl siloxane(75  $\mu$  m) 섬유(Supelco, USA)가 장착된 SPME 샘플전처리기(모델 : 5977B MSD, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA, 그림 가-3)를 사용하여 분석하였다.



그림 가-3) GasChromatography(7890BGC,Agilent) / MassSpectrometry(5977B,MSD)

- 추출은 60 $^{\circ}$ C에서 60분 동안 흡착하여 휘발성물질을 포함하는 섬유는 10mL/min의 분할 흐름으로 5분 동안 주입 포트에서 250 $^{\circ}$ C에서 탈착하였다. 휘발성물질의 분리는 1mL/min의 일정한 유속으로 모세관 컬럼 (30m x 0.25mm i.d. x 0.25  $\mu$  m 필름 두께)에서 오븐 온도는 40 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 유지한 다음 8 $^{\circ}$ C / min의 속도로 250 $^{\circ}$ C 까지 가온하여 이 온도에서 5분 동안 유지하였다. 휘발성 향기 화합물은 질량 스펙트럼 라이브러리 (Agilent Technologies)에 있는 것과 비교하거나 머무름시간을 외부 표준물질과 비교하여 판별하였다. 확인된 화합물은 내부 표준물질의 피크면적과 샘플 피크면적을 비교하여 정량하였다.

### (아) 생리 활성 화합물 분석

- 분석 전에 모든 녹용 추출액(VAE) 각각 1g을 증류수에 녹인 다음 0.45 $\mu$ m 필터 멤브레인(Merck Millipore)을 통해 여과하였다. 초고성능액체크로마토그래피 탠덤 질량 분광법 (UPLC-Q-TOF-MS / MS, Xevo TQ-5, Waters, Milford, USA)을 사용하여 VAE에서 생물 활성 화합물의 분리하고 검출 조건을 결정하였다. Zhang 등 (2019)의 프로토콜을 적절히 수정, 크로마토그래피 분리는 ACQUITY UPLC HSS T3 칼럼 (100mm  $\times$  2.1mm, 1.8 $\mu$ m, Waters)에서 40 $^{\circ}$ C, 0.5ml / min의 유속에서 각 VAE를 주입 후 분석하였다. 이동상은 용매 A(증류수 + 0.1% 포름산)와 용매 B(ACN + 0.1% 포름산)로 구성하였다. 용출성분은 0~5분 동안 97% 상 A로 설정하였다. 5~16분 동안 3~100% 라이너 그라데이션 단계 B;16~17분 동안 100% 상 B; 17 ~ 19분 동안 100 ~ 3% 단계 B; 19~25분 동안 97% A 상 칼럼에서 용출된 화합물은 양이온 및 음이온 모드에서 고해상도직렬질량분석기 SYNAPT G2 Si HDMS QTOF, Waters, 그림 가-4)로 검출하였다.



그림 가-4) 고분해능 질량분석기 SYNAPT G2 Si HDMS QTOF (Waters)

- 양이온 모드의 경우 모세관 전압과 콘 전압은 각각 2kV 및 40V로 설정하였고 음이온 모드는 각각 1kV 및 40V로 설정하였다. Centroid MS 모드는 질량 분석 데이터를 수집하는 데 사용하였다. 1차 스캔 범위는 50 ~ 1200Da이고 스캔 시간은 0.2초였다. 모든 부모 이온은 20~40eV를 사용하여 조각화 하였다. 모든 조각의 정보가 수집되었고 스캔 시간은 0.2초였다. 데이터 수집 과정에서 LE 신호는 실시간 품질 보정을 위해 3초마다 획득하였다. 정확한 질량 획득을 위해 10 $\mu$ L/min의 유속에서 류신 너염을 잠금 스프레이 인터페이스에 의해 잠금질량으로 사용하여 양성 ([M+H]<sup>+</sup>=556.2771) 및 음성 ([M-H]<sup>-</sup>= 554.2615)을 모니터링하였다. 이온 모드 데이터 수집 및 분석은 UNIFI V1.71 소프트웨어(Waters)를 사용하여 제어와 통계 분석하였으며 이후 UNIFI V1.71(Waters)의 적절한 과학 라이브러리를 이용해 스크리닝하여 각각의 피크를 식별했다. 원산지별 마커에 대한 신뢰도는 PCA 분석을 통하여 확인하였다.



### (자) 통계 분석

- 데이터는 통계 분석 시스템 (SAS Institute, Cary, NC, USA, 2007)의 일원 분산 분석 절차를 사용하여 분석하였으며 변수에 대한 평균 및 표준 오차를 산출하였다. VA의 원산지는 모델의 주요 효과로 간주하였고 Duncan의 다중 범위 테스트를 사용하여 통계 분석하였다. 유의차 검정은  $p < 0.05$  수준에서 하였다.

### (3) 결과 및 고찰

#### (가) 녹용(VA)의 미생물학적 품질

- 원산지별 세 가지 녹용(VA) 유형의 미생물학적 품질은 그림 가-5)와 같다. 호기성 플레이트 수(APC)는 적절한 온도와 호기성 조건에서 성장할 수 있는 총 박테리아 수이다. 본 연구에서 APC는 KVA, RVA 및 NZVA에서 각각 4.91, 4.54 및 4.36  $\log_{10}$  CFU/g이었으나 VA 유형 간의 유의적인 차이는 없었다( $p > 0.05$ ). 대장균군의 경우 모든 VA 샘플에서 비교적 낮은 수(1.69~2.58  $\log_{10}$  CFU / g)가 검출되었다. 지금까지 건조 녹용(VA) 샘플의 진균 수준을 보고한 연구 결과는 없었다. 본 연구에서 분석한 결과에 따르면 Perez-Chabela 및 Rodriguez-Serrano(1999)가 소매 판매 중인 다양한 육류(예 : 쇠고기, 닭고기, 말 및 양)에 대해 보고한 진균 수준(3~4.87  $\log_{10}$  CFU/g)에 비해 VA 샘플이 더 낮은 결과를 보였다.

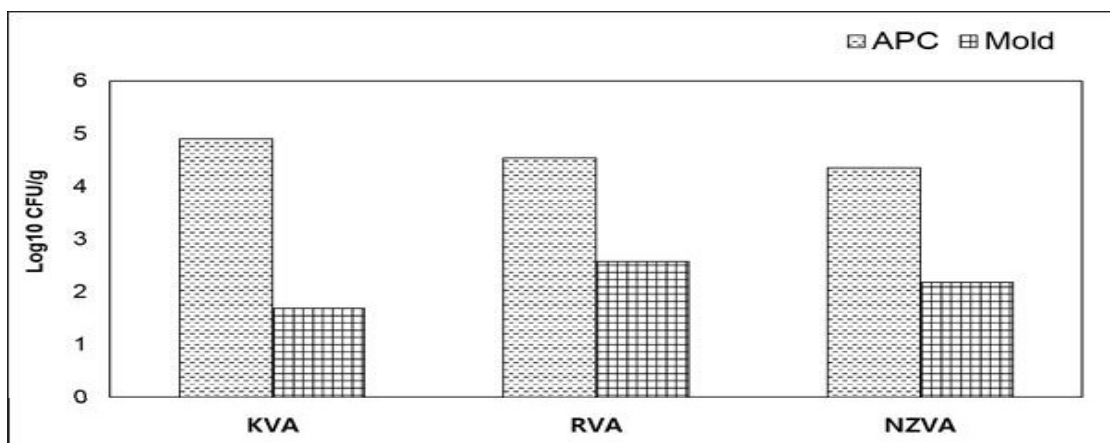


그림 가-5) The aerobic bacterial (APC) and mold loads of dried velvet antler samples from Korean velvet antler (KVA), Russian velvet antler (RVA), and New Zealand velvet antler (NZVA).

- 이와 같은 결과는 높은 수분 또는 수분 활성에서 진균류가 잘 성장하는 특성 때문에 조사된 샘플 유형 간의 수분 함량 차이에 기인하는 것으로 추정할 수 있다 (Rico-Munoz et al., 2019). 진균류는 식품 부패뿐만 아니라 독소와 알레르겐 생성으로 인한 식품 안전 문제를 유발하는 것으로 보고되고 있다(Rico-Munoz et al., 2019). 또한 동물 유래 제품에서 진균류가 자라면 이취와 불쾌한 외관이 발생할 수 있는 것으로 나타났다(Delgado et al., 2016).

- 식품 산업에서 APC 및 진균류의 수준은 식품의 일반적인 품질 및 유통 기한에 대한 유용한 정보로 간주되고 있다. 식품 안전, 식품 및 환경 위생 센터(2014)의 미생물 가이드라인에 따르면, 식품의 APC 최대 한계는 10CFU/g 미만이어야 한다. 따라서 이 가이드라인을 바탕으로 볼 때 모든 종류의 녹용(VA)은 미생물 품질 측면에서 안전하다고 할 수 있다.

#### (나) VAE 간의 항산화 활성

- 자유 라디칼에 의한 파괴적인 영향으로부터 세포를 보호하는 항산화 활성은 천연 물질에 존재하는 항산화 중 가장 중요시하는 유익한 항산화 활성 중 하나이다. 녹용 추출액(VAE)의 항산화 활성은 단일 메커니즘에 기인하지 않을 수 있다. 따라서 현재 연구에서는 DPPH와 ABTS를 포함한 두 가지 다른 분석을 사용하여 VAE의 항산화 능력을 평가하였다.
- 세 가지 VAE의 항산화 활성 결과는 그림 가-6)과 같이 추출물 그램 당  $\mu\text{mol Trolox}$  당량( $\mu\text{mol TE} / \text{g}$ )으로 표시하였다. ABTS 항산화능력 분석과 관련하여 VAE의 자유 라디칼 소거 활성은 KVA > NZVA > RVA로서 각각 50.26, 41.21 및 10.39  $\mu\text{mol TE} / \text{g}$  등가의 평균값으로 나타났다. 따라서 이 분석에서는 국내산 녹용(KVA) 추출액의 항산화성이 가장 높았으나, 수입된 VA는 항산화 활성이 국내산 VA보다 낮았다( $p < 0.05$ ).

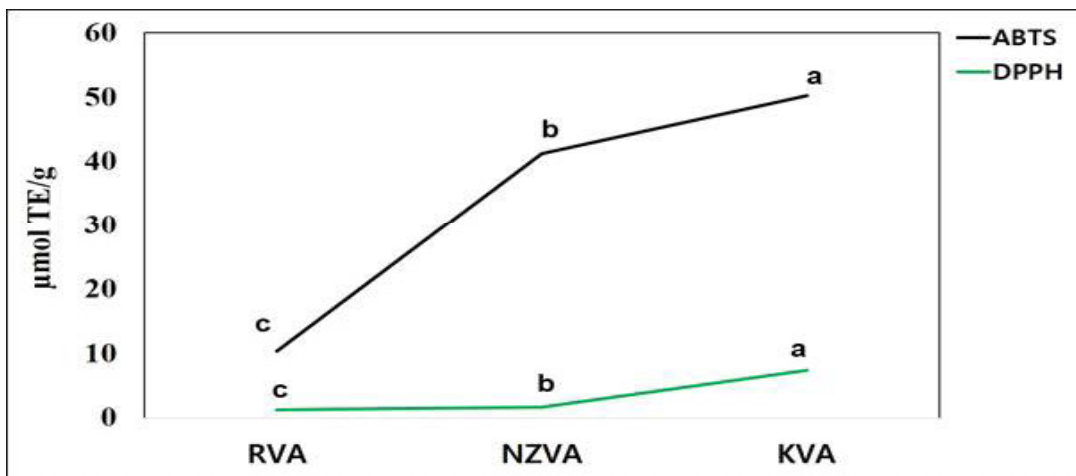


그림 가-6) The DPPH free radical scavenging and ABTS radical cation scavenging activity of extracts obtained from Korean velvet antler (KVA), Russian velvet antler (RVA), and New Zealand velvet antler (NZVA). Different letters (a,b,c) in each assay indicate significant difference at  $p < 0.05$ .

- 지금까지 DPPH 자유 라디칼 소거 분석은 천연 추출물의 항산화 활성을 결정하는 데 널리 사용되어 왔다(Lopez-Alarcon and Denicola, 2013). 이 분석에서 VAE의 자유 라디칼 소거 활성은 KVA > NZVA > RVA 순서로 각각의 평균값은 7.37, 1.65 및 1.02  $\mu\text{mol TE} / \text{g}$ 로 나타났다. KVA는 수입된 NZVA 및 RVA에 비해 항산화 능력이 현저하게 ( $p < 0.05$ ) 높았다. 항산화제는 DPPH- 자유 라디칼 소거의 기본 메커니즘인 DPPH에 수소 원자를 제공하는 작용이 있는 것으로 보고되었다(Shimada et al., 1992).

- 꿀과 식초의 경우 장기 저장 유통중 항산화활성 및 물리화학적 특성이 감소하는 특징이 있다( Zarei et al., 2019; Kang et al., 2020). 따라서 수입 녹용에서의 항산화활성의 저하는 품종간의 특징이기 보다는 수입 녹용의 원거리 이송·장기 유통보관으로 인한 녹용 고유생리활성물질의 소실로 인한 결과일 수 있다.
- KVA 또는 NZVA 추출물의 항산화 활성과 비교하여 Zhao 등(2010)은 Chines 수컷 붉은 사슴의 수성 추출물에 대해 낮은 DPPH 유리 라디칼 소거 활성( $4 \mu\text{mol TE} / \text{g}$ )을 보고하였다. 연구자들은 아미노산, 뉴클레오티드 및 펩타이드가 VA 추출물의 항산화 활성을 담당하는 주요 활성 성분임을 발견하였다(Zhao et al., 2010). 마찬가지로, 시험관 내 연구에서도 사슴 VA 단백질 가수 분해물의 높은 항산화 활성이 보고되었다(Wu et al., 2013; Yu et al., 2011). 따라서 수입된 VA (예 : NZVA 또는 RVA)에 비해 국내산 녹용(KVA)이 더 강력한 항산화 활성을 나타냈으며, 국내산이 더 높은 항산화 능력을 가지고 있음을 시사하고 있다.

#### (다) VAE 중 조 지방, 단백질 및 미네랄 함량

- 원산지별 세 가지 녹용 추출액(VAE) 유형의 조단백질과 지방 및 미네랄 함량은 표 2에 나와 있다. 모든 VA를 동일한 조건 (동일한 샘플 중량, 시간 및 온도 추출)에서 추출하였다. 미네랄은 인간의 건강 유지에 중요한 역할을 하는 중요한 미량 영양소로 알려져 있다(Tapiero and Tew, 2003). 표 가-1)에 나타난 바와 같이 검출된 미네랄 중 Fe의 농도가 RVA 추출물에 비해 국내산 녹용(KVA) 추출물에서 유의하게 더 높았다( $p < 0.05$ ). 반면, Mn, Zn, Ca 함량은 KVA 또는 NZVA 추출물에 비해 러시아산 녹용(RVA) 추출물에서 더 높았다 ( $p < 0.05$ ). 세 가지 VA 유형간에 Cu 및 Mg 함량에는 차이가 없었다( $p > 0.05$ ). 현재까지 이러한 모든 미네랄은 중국 사슴의 VA 추출물에서도 보고된 바 있다(Wu et al., 2013).

표 가-1) The mineral contents in extracts from Korean (KVA), Russian (RVA) and New Zealand (NZVA) velvet antlers

Item	KVA	RVA	NZVA
Mn ( $\mu\text{g/g}$ )	$0.97 \pm 0.03^c$	$2.49 \pm 0.03^a$	$12.40 \pm 0.02^b$
Cu ( $\mu\text{g/g}$ )	$2.50 \pm 0.01$	$2.00 \pm 0.02$	$2.07 \pm 0.01$
Zn ( $\mu\text{g/g}$ )	$51.37 \pm 2.25^{ab}$	$55.52 \pm 3.12^a$	$46.47 \pm 2.14^b$
Ca (mg/g)	$97.16 \pm 3.57^{ab}$	$103.03 \pm 4.01^a$	$92.37 \pm 3.22^b$
Fe (mg/g)	$0.46 \pm 0.01^a$	$0.34 \pm 0.01^b$	$0.40 \pm 0.01^{ab}$
Mg (mg/g)	$2.02 \pm 0.02$	$2.09 \pm 0.01$	$2.00 \pm 0.02$
Crude protein (g/100g)	$13.90 \pm 1.11^a$	$9.21 \pm 1.52^b$	$12.11 \pm 0.58^{ab}$
crude fat (g/100g)	$0.80 \pm 0.01^a$	$0.711 \pm 0.02^b$	$0.22 \pm 0.01^c$

- VAE 중 단백질 및 지방 농도는 각각  $9.21 \sim 13.90\text{g} / 100\text{g}$  및  $0.22 \sim 0.80\text{g} / 100\text{g}$  범위이었다. 흥미롭게도 KVA 샘플은 나머지 다른 VA 유형에 비해 지방 및 단백질 함량이 훨씬 더 높았다( $p < 0.05$ ). 따라서 이와 같은 미네랄, 지방 및 단백질 함량 차이는 원산지가 다른 세 가지 VA 유형 간의 번식 및 사료 공급 차이와 연관이 있을 것으로 추정할 수 있다.

(라) VAE 중 아미노산 함량

○ KVA, RVA 및 NZVA 추출물의 AA 함량은 표 가-2)와 같다. AA 함량은 맛과 풍미(Macleod, 1994; Mottram, 1998)와 생물학적 활성 (항산화 및 항염증 능력)에 기여한다(Zhao et al., 2016). 분석 결과, 세 가지 VAE 유형 모두에서 총 20개의 AA가 검출된 것으로 나타났다. 그러나 이들 중 6개의 AA(글리신, 알라닌, 프롤린, 라이신, 메티오닌 및 티로신)만이 VA 원산지의 영향을 받았다. 특히 글리신, 알라닌, 메티오닌 및 티로신의 농도는 RVA 또는 NZVA에 비해 국내산 녹용(KVA)에서 유의하게 높았다( $p < 0.05$ ). 반면, 라이신과 프롤린의 농도는 러시아산(RVA)에 비해 뉴질랜드산 녹용(NZVA)에서 더 높았다( $p < 0.05$ ). 또한 글리신, 알라닌, 류신 및 발린은 세 가지 VAE 유형 모두에서 가장 우세한 AA임을 알 수 있었다. Jeon 등 (2010, 2011)은 이러한 AA가 모든 녹용 성장단계 및 VA 절단 부위에서 한국 엘크 VA가 더 우세하다고 하였다.

표 가-2) Concentration ( $\mu\text{mol/g}$ ) of amino acids in extracts from Korean (KVA), Russian (RVA) and New Zealand (NZVA) velvet antlers

Items	KVA	NZVA	RVA
Glycine	6.28±0.21 <sup>a</sup>	5.830±0.14 <sup>b</sup>	4.89±0.08 <sup>c</sup>
Alanine	5.36±0.12 <sup>a</sup>	5.28±0.13 <sup>ab</sup>	4.83±0.04 <sup>b</sup>
Serine	1.17±0.00	1.68±0.03	1.28±0.01
Proline	1.65±0.02 <sup>b</sup>	2.05±0.01 <sup>a</sup>	1.64±0.01 <sup>b</sup>
Valine	2.21±0.05	2.11±0.02	1.68±0.01
Threonine	0.76±0.00	1.02±0.02	0.72±0.01
Leucine	2.94±0.07	2.65±0.04	2.54±0.01
Isoleucine	0.56±0.00	0.65±0.02	0.48±0.02
Asparagine	0.01±0.00	0.03±0.00	0.03±0.00
Aspartic acid	0.25±0.00	0.66±0.01	0.35±0.01
Lysine	0.73±0.01 <sup>ab</sup>	0.87±0.02 <sup>a</sup>	0.45±0.13 <sup>b</sup>
Glutamine	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
Glutamic acid	1.99±0.07	2.06±0.00	1.65±0.01
Methionine	0.34±0.00 <sup>a</sup>	0.16±0.00 <sup>ab</sup>	0.13±0.00 <sup>b</sup>
Histidine	0.24±0.01	0.26±0.01	0.22±0.02
Phenylalanine	1.06±0.02	0.95±0.00	0.86±0.00
Arginine	0.01±0.00	0.17±0.00	0.13±0.00
Tyrosine	0.74±0.00 <sup>a</sup>	0.58±0.01 <sup>ab</sup>	0.43±0.00 <sup>b</sup>
Tryptophan	0.09±0.00	0.06±0.00	0.03±0.00
Cysteine	0.001±0.00	0.01±0.00	0.00±0.00

Means within a same row with different superscripts (a,b,c) differ significantly at ( $p < 0.05$ ).

#### (마) VAE 중 휘발성 풍미 화합물

- 풍미의 일부인 냄새는 식음료 제품에 대한 소비자의 구매 결정뿐만 아니라 감각적 품질에 영향을 미치는 매우 중요한 구성 요소이다(Charalambous, 1978; Macleod, 1994).
- 지금까지 한국, 중국, 일본 및 캐나다 시장에서 사슴과 엘크 VA에서 유래한 다양한 상업적 건강 증진 또는 기능성 식품 및 기능성 보조제품을 구입할 수 있다(Wu et al., 2013).
- 그러나 실제로 이러한 녹용(VA) 제품의 휘발성 냄새 성분을 보고한 연구 결과는 없다. 원산지별 세 가지 녹용 추출액(VAE)에서 확인된 휘발성 화합물은 표 3-3)에 나와 있다. SPME/ GC-MS 기술을 사용하여 에스테르(12), 알코올(3), 알데히드(1), 케톤(6)을 포함한 총 32개의 휘발성 화합물과 탄화수소(10), 피라진(5), 황 함유 화합물(7) 및 퓨란(2)이 VAE에서 처음으로 확인되었다.
- 그중 에스테르는 12종으로 가장 우세한 부류이다. 흥미롭게도 이들 12종의 에스테르는 모두 국내산 녹용(KVA) 전부에서 발견된 반면, RVA 또는 NZVA 샘플에서는 8종의 에스테르 (예 : methylacetate, methylpropionate, ethylbutanoate, ethylhexanoate, 2-isobutoxyethylpropionate, chrysanthenylpropionate, isobutylpentylcarbonate, methyloctanoate)만 발견되었다.
- 그러나 통계 분석 결과, 두 개의 Ester (1-methoxy-2-propylacetate and ethyloctanoate)만이 세 가지 VAE 유형 간에 유의하게 다른 것으로 나타났으며, RVA 및 NZVA에 비해 국내산 녹용(KVA)의 양이 더 많았다( $p < 0.05$ ).
- 에스테르는 일반적으로 알코올과 산의 에스테르 화로 형성되는 주요 지질 유래 산물로 알려져 있다(Macleod and Ames, 1988; Mottram, 1998). 추출 과정 동안 지질의 산화 / 분해로 인해 알코올과 산이 형성되고 서로 반응하여 에스테르를 형성하고 이때의 화합물은 ethylacetate 또는 ethylbutanoate 및 ethyloctanoate 등이며 이들은 아세로라 과일 추출물(Vendramini 및 Trugo, 2000), 딸기주스 (Lambert et al., 1999) 및 배 주스(Riu-Aumatell et al., 2004; Chung et al 1993) 등의 휘발성 풍미 주성분이다.
- 또한, ethylhexanoate, methylacetate 및 methyloctanoate는 각각 조리된 양고기 (Bueno et al., 2011)와 쇠고기(Schindler et al., 2010)에서 보고되었다. Ethylbutanoate는 과일 주스(Lambert et al., 1999), 꽃, 살구, 과일 및 치즈의 냄새를 구성하는 성분 일부로 보고되었으며(Lambert et al., 1999) methyloctanoate 및 ethylhexanoate는 감귤류, 딸기, 버터의 풍미와 관련이 있다. 그러나 검출된 각 에스테르의 냄새 특성과 VAE에서 냄새 감지 임계값을 특성화하려면 추가의 연구가 필요하다. 이외에도 eucalyptol, 2,4-Di-tert-butylphenol 및 2-furanmethanol과 같은 알콜류 화합물이 국내산 녹용(KVA)에서 발견되었다.

표 가-3) Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ) of volatile compounds of Korean, Russian and New Zealand velvet antler extracts

Compound	Retention Time	Korean Velvet Antler	Russian Velvet Antler	New Zealand Velvet Antler	Identification <sup>1)</sup>
<i>Esters</i>					
Methyl acetate	1.80	0.002±0.001	ND	ND	MS+STD
Ethyl Acetate	2.25	0.04±0.005	0.06±0.00	0.05±0.00	MS+STD
Methyl propionate	2.40	0.01±0.003	ND	ND	MS+STD
Ethyl butanoate	3.75	0.002±0.001	ND	ND	MS
1-Methoxy-2-propyl acetate	8.24	0.011±0.000 <sup>a</sup>	0.008±0.00 <sup>b</sup>	0.006±0.00 <sup>b</sup>	MS
Methyl hexanoate	9.88	0.002±0.001	ND	ND	MS
2-Isobutoxyethyl propionate	12.37	0.001±0.000	ND	ND	MS
Chrysanthenyl propionate	12.52	0.002±0.000	ND	ND	MS
Isobutyl pentyl carbonate	13.53	0.001±0.000	ND	ND	MS
Methyl octanoate	14.57	0.004±0.000	ND	ND	MS+STD
Ethyl octanoate	16.08	0.007±0.001 <sup>a</sup>	0.002±0.00 <sup>b</sup>	0.002±0.00 <sup>b</sup>	MS+STD
Heptyl heptanoate	22.02	0.001±0.000	0.003±0.00	0.003±0.00	MS
<i>Alcohols</i>					
2-Furanmethanol	7.85	0.001±0.000	0.007±0.00	ND	MS+STD
Eucalyptol	12.60	0.003±0.000	ND	ND	MS
2,4-Di-tert-butylphenol	21.35	0.002±0.000	0.001±0.00	0.001±0.00	MS
<i>Aldehydes</i>					
3-methyl-butanal	2.70	ND	0.001±0.00	0.001±0.00	MS+STD
<i>Ketones</i>					
2-Heptanone	8.89	0.002±0.000	ND	ND	MS+STD
2,4-dimethyl-3-hexanone	10.72	0.15±0.011 <sup>a</sup>	0.08±0.01 <sup>b</sup>	0.083±0.001 <sup>b</sup>	MS
2,5-dimethyl-3-hexanone	10.99	0.014±0.001	ND	0.11±0.01	MS
3-Octanone	11.02	0.023±0.000	0.03±0.00	0.03±0.003	MS+STD
2,4-dimethyl-3-Hexanone	11.10	0.037±0.000	0.001±0.00	0.02±0.001	MS
2-Undecanone	17.80	0.016±0.000	0.015±0.00	0.02±0.001	MS
<i>Hydrocarbons</i>					
2,2,6-trimethyl-octane	11.55	0.008±0.00	0.004±0.00	0.006 ±0.00	MS
Decane	11.83	0.007±0.00	0.002±0.00	ND	MS
2-methyl-undecane	12.92	0.002±0.00	ND	ND	MS
3,7-dimethyl-nonane	13.03	0.004±0.00	ND	ND	MS
3,6-dimethyl-undecane	13.29	0.005±0.00	0.001±0.00	ND	MS
2,5-dimethyl-dodecane	13.59	0.003±0.00	ND	ND	MS
1-(hexyloxy)-5-methyl-hexane	13.79	0.002±0.00	ND	ND	MS
Hexyloxyoctane	14.08	0.002±0.00	ND	ND	MS
Tridecane	17.93	0.002±0.00	ND	ND	MS
Tetradecane	19.65	0.001±0.00	ND	ND	MS

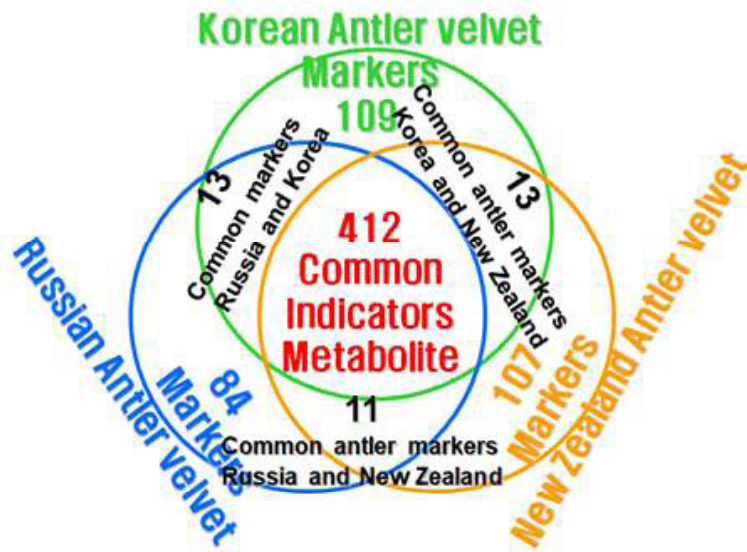
ND: Not detectable;

<sup>1)</sup>: Identification: The compounds were identified by either mass spectra (MS) from library or authentic standards (STD); Means within a same row with different superscripts (a,b) differ significantly at ( $p < 0.05$ ).

- 한편, 2,4-Di-tert-butylphenol은 RVA와 NZVA에서도 발견되었지만, VA 유형 간에는 이러한 알코올에 대해 유의한 차이가 발견되지 않았다( $p>0.05$ ). 그중에서 2-furanmethanol은 아미노산과 환원당 사이의 Maillard 반응에서 생성된 생성물로 알려져 있다(Ba et al., 2013).
- 이 화합물은 일반적으로 조리된 육류에서 나타난다(Ba et al., 2010; Elmore et al., 2004). RVA( $0.001 \mu\text{g} / \text{mL}$ )와 NZVA( $0.001 \mu\text{g} / \text{mL}$ )에서 3-methylbutanal과 같은 알데히드가 비교적 적은 양 발견되었다. 이 알데히드는 조리된 쇠고기에서 초콜릿과 카라멜 냄새를 띠는 것으로 보고되어 있으며 주로 leucin의 strecker 분해로 인해 생성된다(Machiels et al., 2003).
- 케톤류는 2,4-dimethyl-3-hexanone 만이 RVA 및 NZVA에 비해 KVA가 더 양이 많았( $0.15 \mu\text{g} / \text{mL}$ )으며 3가지 VAE 유형 간에 유의한 차이를 보였다( $p<0.05$ ). 케톤은 가열 / 조리 과정에서 생산되는 지질 유래 산물로 알려져 있다(Mottram, 1998). 그중 2-heptanone은 KVA에서만 발견되었고, 2,5-dimethyl-3-hexanone은 RVA에서 발견되지 않았다. 2-heptanone은  $C_{18} : 2n-6$ 의 산화로 생성되며(Ba et al., 2013), 조리된 쇠고기에 과일 향, 매운맛, 가스 및 그레이비 냄새를 생성하는 것으로 보고 되었다(Calkins and Hodgen, 2007; Machiels et al. al., 2003).
- 현재 연구에서 탄화수소는 에스테르 다음으로 두 번째로 우세한 휘발성 화합물이다. 탄화수소는 일반적으로 가열 / 조리 과정에서 육류 및 육류 제품의 지질 산화 / 분해 또는 Maillard 반응에 의해 형성된다(Macleod, 1994; Mottram, 1998). 모든 탄화수소가 KVA에서 발견되었지만 세 가지 VAE 유형 모두에서 2,2,6-trimethyl-octane이 발견되었다.
- 일반적으로 확인된 휘발성 화합물의 대부분은 건조 및 추출 과정에서 지질 산화 / 분해에서 비롯된 반면, 환원당과 아미노산 사이의 Maillard 반응에서 생성된 것은 거의 없다. 또한 수입된 VA에 비해 국내산 녹용(KVA)에서 휘발성 냄새 화합물의 품질과 양이 더 다양하다는 점은 주목할 만하다. 이러한 결과는 벨벳 뿔의 풍미 전구체(예 : 지질 조성)에 영향을 미칠 수 있는 동물 품종 및 사육 시스템 등의 차이와 관련이 있을 수 있는 것으로 추정할 수 있다(Lee et al., 2007; Ward et al., 2014).

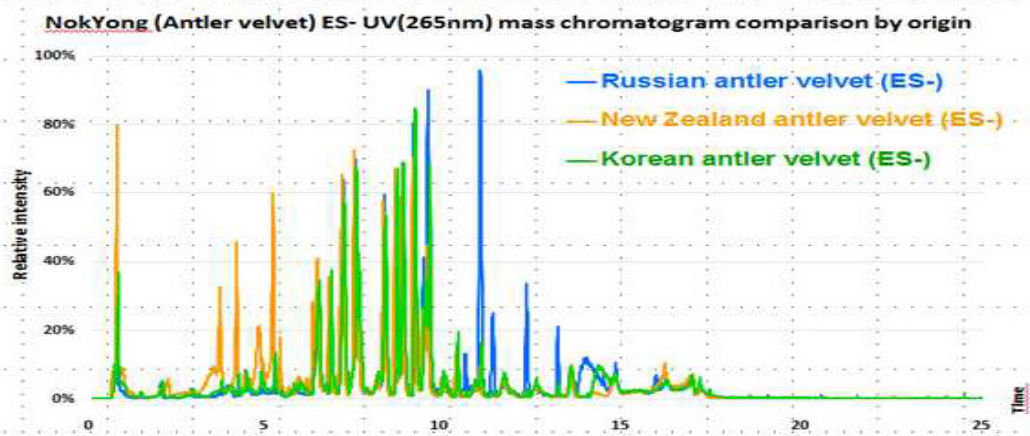
#### (바) VAE 중 생리 활성 화합물

- UPLC-QTOF-MS / MS 분석 결과 600개가 이상의 다양한 생리 활성물질이 나타났다. 이러한 많은 수의 확인 된 화합물로 인해 결과를 자세하게 제시하는 데 약간의 어려움이 있어 세 국가의 VAE 대사 프로파일을 간단히 그림 가-6)에 요약하였다.
- 원산지가 다른 3개국의 모든 녹용 추출물(VAE)에서 공통으로 발견되는 412개의 후보 지표 물질인 생체 화합물을 발견하였다(원의 겹침 영역에 표시됨). 흥미롭게도 KVA, NZVA 및 RVA 추출물에서만 각각 109, 107 및 84 개의 후보 화합물이 발견되었다. 또한 일부 화합물은 두 국가의 VAE에서 발견되었다. 구체적으로는 각 13, 13 및 11개의 화합물이 KVA와 RVA; KVA와 NZVA; RVA와 NZVA 추출물에서 발견되었다.

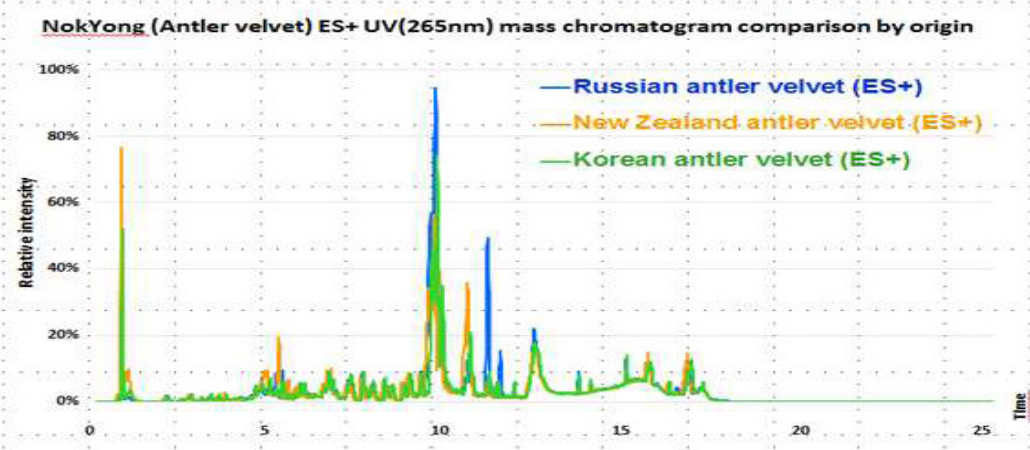


A)

Common indicators and distinguishable marker substances for antler velvet from Korean (Elk), Russian (MARAL), and New Zealand (Red deer) deer



B)



C)

그림 가-6) Results of UPLC-Q-TOF-MS/MS obtained on three different velvet antler types:

- (A): Common indicators and distinguishable marker substances for Korean, Russian and New Zealand velvet antler extracts,
- (B, C) the representative diagram shows the peaks, retention times and peak relative intensity (%) among the three velvet antler extracts.



- 확인된 화합물의 정량화는 수행되지 않았으나 그림 4B에 표시된 바와 같이 세 가지 VAE 유형 간에 수준 차이가 약간 있을 수 있다. VAE 사이에서 피크의 상대적 강도 (피크 면적 백분율)의 변동이 높았다. Zhang 등(2019)도 중국 사슴의 VAE에서 84 개의 생체 활성 화합물이 존재함을 보고하여 이와 유사한 결과를 보였다. 또한 확인된 화합물이 스테로이드, 알칼로이드, 에스테르, 아미노산, 펩타이드 및 인지질과 같은 다양한 화학적 종류에서 나올 수 있음을 발견했다(데이터는 표시되지 않음).
- 3개 국가의 412개의 공통적인 후보 지표물질에서는 Ganglioside GA2 (d18 : 1/18 : 0)(accepted ID: HMDB 04891)와 Ganglioside-like Metabolite인 trans, octakis-decaprenylphospho- $\beta$ -D-erythro-pentofuranosid-2-ulose(1-) (accepted ID: CHEBI 65067) 및 4-Amino-1-[(2xi)-5-O-{hydroxy [(hydroxy {(2R)-3- [(12-methyltridecanoyl)oxy]-2-[(9Z,11Z)-9,11- (accepted ID: CSID 74877900)이 발견되었다.
- 또한 각 국가 고유의 마커 물질에는 국내산 녹용(KVA)에서는 호베니 돌시오 사이드 A2 (허용ID : HMDB41029), 진세노사이드 F3 (허용ID : HMDB39556) 및 Uralsaponin B (허용ID : HMDB39310)과 같은 일부 대표적인 화합물이 발견되었다. 러시아산 녹용(RVA)에서는 노토진세노사이드I (허용ID : HMDB31371), Acutissimin A (허용ID : HMDB39207), 및 가노테르 산 H (허용ID : HMDB35987)가 특징적이며, 뉴질랜드산 녹용(NZVA)에서는 에이지리놀 (허용ID : HMDB33914), 탈라소스 피라미드 A (허용ID : CSID17214520) 및 파폴라칸딘 (허용ID : CHEBI72611)가 발견되었다. 이들 모두는 문헌에서 중요한 생물학적 기능 (예 : 면역 활동 및 질병 치유 및 항암 등)을 발휘하는 것으로 보고되고 있다 (Elkhatee et al., 2018; Ghosh and Yuan, 2009; Zhang 및 Wang, 2006).
- 특이하게도 세 가지 유형의 모든 녹용은 A-90289 B, DHAP(18:0), Hypoxylan C, cis-cyclo-(His, Leu), Cabotegravir, Monapilosusazaphilone 등 50여 종 이상의 항생물질, HIV(human immunodeficiency viruses) 등 바이러스 치료물질을 스스로 생성하고 있는 것으로 나타났다. 이는 사슴은 나쁜 환경으로부터 스스로 보호하기 위해 저항물질을 생성하거나, 나쁜 질병의 침입으로부터 스스로 보호하기 위한 자가 면역·치유·항생물질을 스스로 만드는 특별한 능력이 있는 것으로 유추할 수 있다. 이러한 생리 활성 물질의 변화는 세 가지 VAE 유형 간에 서로 다른 환경적 영향으로 약리 및 의학적 특성을 초래할 수 있다.
- 원산지별 3개 국가의 VAE는 모두 다양한 생리활성 물질을 풍부히 함유한 것으로 나타났다. 상세하게 살펴보면 412개 VA 지표 물질 후보는 국가별 피크에서 큰 차이가 없는 반면, 국가 별 원산지를 구분할 수 있는 후보 마커물질은 원산지별 고유 사슴의 먹이(헛개나무, 인삼, 감초; 죽절인삼, petraea 껍질, 영지; 파슬리 뿌리, 해양성 이끼, 아미노글리코사이드)에서 축적된 것으로 추정되는 여러 유형의 대사체 유기화합물이 포함되어 있다. 따라서 각 국가별 사슴 먹이 및 사양관리 방법에 따라 생리활성 대사 화합물이 크게 달라질 수 있음을 유추 할 수 있다.

- 한편, 많은 연구자들이 사슴과 뿔의 성장에는 풍부한 양질의 사료와 동물성장에 적합한 사양관리가 중요하다고 하였다(K Tajchman et al., 2019; C Suresh et al., 2013; T Feldt et al., 2017; GO Tona, 2018). 본 연구에서 발견된 각 국가별 주요 마커 물질을 살펴보면, 세 가지 유형의 사슴이 성장하는 주변 환경 먹이에서 유래한 생리 활성 물질이 녹용에 존재하는 것은 다른 축종의 동물과 비슷한 결과이다. 사슴의 녹용이 원산지별 품종 영향보다는 사료나 사양관리에 의하여 더 많은 영향을 받는다는 주장을 뒷받침하고 있다.
- 세 가지 유형의 생리활성물질의 검증을 위하여 PCA 검사를 실시하였다(그림 가-7). 본 연구에서 확인된 생체 활성 대사체 화합물은 녹용(VA)의 표준 지표 물질 후보로서 원산지별 식별을 위한 바이오마커로 잠재적인 응용 프로그램에 활용할 수 있을 것으로 예상할 수 있다.

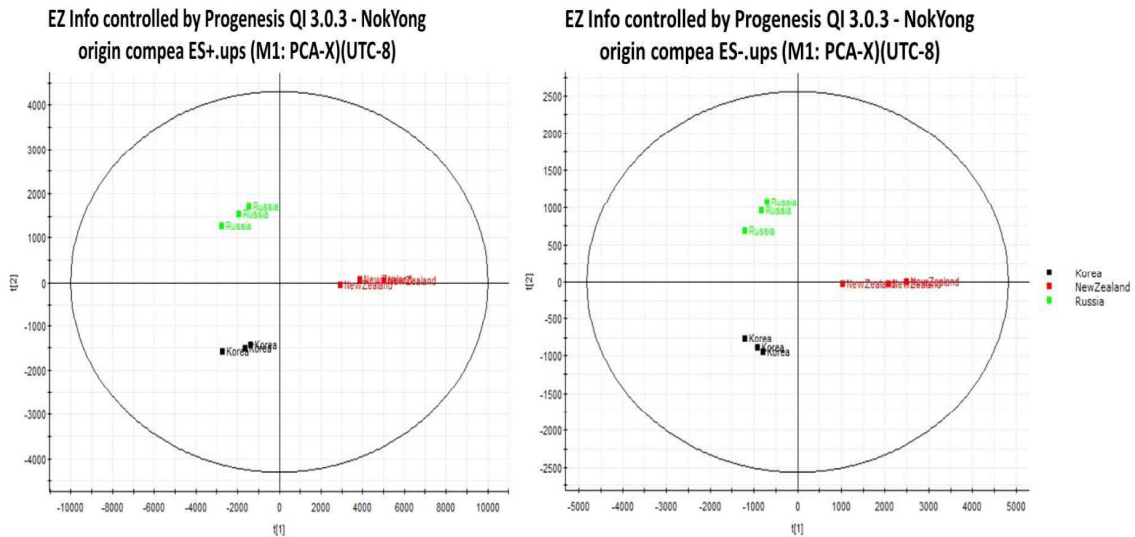


그림 가-7) Overview of NokYong for distinguishable marker substances origin (Korea, Russian, New Zealand) compare ES-, EC+ analysis PCA-X result

The model has 4 scores components. These scores are weighted averages of the original ones, hence providing a good summary of all the X variables.

The scores t[1] and t[2] are the two most important new variables in summarizing the dataset. Each point in the plot corresponds to an observation. Observations near each other in the plot are similar; observations far away from each other are dissimilar. The plot shows the possible presence of atypical observations, groups, similarities, trends and other patterns in the data. Atypical observations are outside the ellipse.

### CERTIFICATE OF APPLICATION

출원인 Applicant	성명 Name	한국양도양록축산업협동조합 KOREA RABBIT AND DEER FARMERS' COOPERATIVE	주민번호 Residence No	114671-0*****
	주소	서울특별시 강동구 길동 400	전화번호	02-489-2222
출원번호 Application Number		특허-2020-0188073 PATENT-2020-0188073	출원일자 Filing Date	2020년 12월 30일 DEC 30, 2020
발명(고안)의 명칭. 디자인을 표현할 물품. 상품(서비스업)류 구분		녹용의 원산지 판별용 지표물질 바이오마커 조성물 및 이의 용도 Composition of biomarker indicator material for identification of origin of antler and use thereof		

그림 가-8) 특허출원(2020-0188073) 녹용의 원산지 판별용 지표물질 바이오마커 조성물 및 이의 용도

- 선행 연구들에 따르면 녹용은 40여 개의 주요 유기물질과 500여 개의 활성 성분이 인체에 유익한 역할을 하고 있다고 보고되고 있다. 그러나 아직도 녹용에는 정확하게 규명되지 않은 4,500여 개의 미지의 생리활성 물질이 존재하고 있다. 따라서 녹용의 생리활성 지표물질을 의학, 건강학적으로 활용하기 위해서는 녹용 추출액(VAE)에 대한 보다 심층적인 연구가 필요하다.

#### (4) 결론

- 이 연구는 처음으로 다양한 원산지별 녹용의 미생물학적 품질, 항산화 활성, 미네랄 측정 및 향기성분과 생리활성물질의 마커물질을 확보하였다.
- 일반적으로 세 가지 VA 유형 모두에서 식품 안전 가이드라인 이내의 비교적 낮은 수준의 호기성 플레이트 수와 진균류 수가 검출되었다.
- DPPH 및 ABTS 항산화 활성은 국내산 녹용(KVA) 수입 녹용(VA)보다 더 높은 자유 라디칼 소거 활성을 나타내어, 더 강력한 항산화 능력을 보였다. 미네랄은 국내산 녹용(KVA)이 RVA에 비해 더 많은 양의 Fe 함량을 포함 하고 있는 반면, KVA 또는 NZVA 추출물에 비해 RVA 추출물에서 Mn, Zn, Ca 함량이 더 높았다.
- 필수 아미노산 분석에서 국내산 녹용(KVA)은 수입된 VA에 비해 글리신, 알라닌 및 메티오닌과 같은 일부 필수 아미노산의 함량이 훨씬 더 높았다.
- 녹용 추출액(VAE)에서 총 32개의 휘발성 향기 화합물이 확인되었으며, 국내산 녹용(KVA)은 러시아와 뉴질랜드에서 수입한 VA에 비해 휘발성 향기 화합물의 다양성 (품질 및 양 모두)이 더 높았다. 이는 KVA가 수입 제품에 비해 더 강한 향기 강도가 있음을 의미한다. 따라서 아로마 분석 결과는 소비자의 선호도에 따라 제품의 VA 함량을 조정하는 중요한 기반이 될 수 있는 것으로 추정할 수 있었다.
- VAE에서 700개 이상의 대사 화합물이 확인되었으며, 이 중 412개 화합물이 세 가지 VA 유형 모두에서 공통적인 지표로 발견되었다. 특히 사슴은 외부 불량환경 및 질병으로부터 대응하여 50종 이상의 자가 면역물질, 항생물질, HIV치료물질 등을 스스로 생성하는 특별한 능력이 있음을 확인하였다.
- 원산지를 구분할 수 있는 하는 마커 대사산물 300여종 이었으며, KVA, NZVA 및 RVA에서 각각 109, 107 및 84개의 마커가 발견되었다. 마커와 지표 물질은 사슴의 먹이와 사육관리 조건에 따라 생리활성물질이 다르게 나타남을 알 수 있었다. 이 기술을 활용한 원산지 판별기술(특허출원 2020-0188073) 은 유전자가 손상된 가공식품의 원산지 판별에 도움을 줄 수 있을것으로 사료된다.
- 건강 기능성 식품으로 간주되는 3가지 유형의 녹용 (한국, 러시아, 뉴질랜드 VA)은 모두 AA, 미네랄, 휘발성 향기화합물, 및 기능성 생리 활성물질의 풍부하였다. 국내산 녹용에 비하여 수입산 녹용에서 항산화 활성, 휘발성 향기물질 및 생리활성물질 등이 다소 낮게 나타났으며, 이는 원산지별 특징이기 보다는 수입 녹용의 원거리 이송·장기 유통보관으로 인한 녹용 고유 생리활성물질의 소실로 인한 결과일 수 있다.

## 나. 전주대학교 연구 개발 내용 (협동 1)

- Bio-Convergence 기술 활용한 발효 녹용의 항노화·면역증진 효능 평가 검증 및 산업화 기술 이전
- 발효녹용의 세포독성, 생존율 및 동물실험 평가
- 예쁜 꼬마선충 및 동물 모델을 이용한 기능성 평가를 통한 고부가가치 경쟁력 확보

### (1) 한국 전통 발효 식품 유래 미생물 발굴 및 발효조건 최적화

#### (1) 단백질 분해효소, 지질 분해효소 및 발효 미생물을 적용한 바이오컨버전 조건의 최적화

- 녹용 농축 후 생성된 녹용박에 단백질 및 지질 분해효소를 사용하여 농도, 시간, pH에 따른 가수분해 특성을 확인하였다. 가수분해 효소를 통한 녹용의 유효성분 추출의 효과는 지표성분으로써  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), GAG, sialic acid, 항산화 능력, 단백질 양, 아미노산 등의 양을 측정하여 비교하였음. 또한 전통식품 및 유아의 분변에서 분리한 유산균을 이용하여 녹용의 발효를 실시하였으며, 같은 지표성분을 통해 최적화된 미생물을 선발하고자 하였다.

#### (2) 한국 전통식품에서 신규 프로바이오틱스 균주 분리

- 된장, 청국장, 고추장, 된장 등 한국 전통식품을 획득한 후 바로 ice box에서 냉장상태로 보관하면서 신속하게 실험실로 시료를 이동하고, 각각의 시료 5.0 g을 10 배 부피의 Ringer's solution(Oxoid)에 넣고 상온에서 2분간 stomacher를 이용하여 균질을 실시한 후 얻어지는 샘플원액 1 mL을 희석액에 연속 희석을 실시하였다. 신규 프로바이오틱스 균주를 분리하기 위하여 희석액을 L-cystein 희석액(8.5 g NaCl, 0.5 g L-cystein)에 혼합한 후 연속 희석하고 MRS-BCP(bromocresol purple) 배지에 plating하여 혐기상태에서 37°C, 48시간 동안 배양한 다음 노란색 집락을 띄는 균주들을 선택하여 순수 분리하였다. 선발된 균주는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 및 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology에 따라 그람염색, catalase test, gas 형성 등을 조사하여 신규 프로바이오틱스 유산균을 분리하고, 모든 균주는 cryoprotectants로 50% glycerol을 첨가한 후 -80°C에서 보관하였다. 균주의 동정을 위해 SL-1(5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 SL-2(5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3')을 이용하여 sequencing을 통해 NCBI database(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)에서 유사성 조사 후 최종 동정을 실시하였다.

### (3) 예쁜 꼬마선충 *C. elegans*를 이용한 항노화 활성평가

- overnight 배양한 후보 균주를 원심분리 (6,000×g, 20 min)하여 세포 pellet만 회수한 후 M9 buffer로 5회 세척하고 최종적으로 5배 농축균액을 제조한 후 NGM agar에 분주한 후 상온에서 1시간 건조 후 4°C에서 보관하면서 수명 연장 plate로 2주간 사용하였다. L4/young adult까지 성장시킨 예쁜 꼬마선충 *fer-15;fem-1* mutant를 수명연장 plate에 옮긴 후 25°C에서 3주간 매일 생존율을 측정하였다. 대조군으로 일반 미생물 먹이는 *E. coli* OP50 를 사용하였고 일반적으로 백금 wire를 이용하여 조심스럽게 터치한 후 반응을 나타내면 살아있는 것으로 평가하는 방식으로, 대조군인 OP50과 비교하여 후보 균주의 수명이 유의하게 증가한 것을 확인하였다.

### (4) 녹용박 효소처리 추출물

- 본 연구의 녹용박은 녹용 1차 추출후 잔여물질을 식품관련법을 준수하여 추출조에서 별도의 이송이 없이 직접 원료를 파우치에 넣어 멸균하거나, 멸균후 재 동결건조 분말화한 중간 단계의 식품원료를 사용하였다.
- 녹용박 5 g, 10 g에 각각 단일효소 처리와 복합 효소 처리, 30분 처리, 60분 처리로 조건을 다르게 하여 추출하였다. 단일 효소 처리는 Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, protamex, papain, lipopan를 1% 첨가하여 50° C에서 100 rpm으로 30분과 60분간 각각 shaking incubator를 이용하여 반응시켰다. 복합 효소처리는 단일 효소 Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, protamex, papain를 녹용박 5 g, 10 g에 1%를 첨가하여 30분간 50°C에서 100 rpm으로 shaking incubating 후 Lipopan을 1% 첨가 후 30분간 50°C에서 100 rpm으로 shaking incubating하였다. 그 후 95°C water bath에서 10분간 효소 불활성화를 시킨 후 거름망을 이용해 녹용박을 걸러준 후 원심분리 후 상등액을 시료로 사용하였다.

### (5) 녹용박 고상발효

- 녹용박의 고상발효에 사용한 배지는 prebiotic minimum media(1 L 기준: peptone 5g, sodium acetate 2.5g, 1M magnesium sulfate 7H<sub>2</sub>O 0.5mL, 1M manganese sulfate 4H<sub>2</sub>O 0.5mL, Tween80 5mL, diammonium citrate 1g, dipotassium phosphate 1g, Glucose 20g, L-glutamic acid 1g)을 사용함. 실험 균을 키운 MRS Broth를 원심분리 후 상등액 제거하고 남은 pellet에 prebiotic minimum media 첨가하여 준비하였고, 녹용박 100g을 병에 담아 고압멸균 후 실험 균이 섞인 prebiotic minimum media 10 mL 접종(10% 접종)하여 37°C 120시간(5일) 정치 배양하였다. 배양물을 원심분리한 후 상등액 획득 후 pH 7로 맞춘 후 d.w로 최종 볼륨을 10mL로써 분석시료로 활용하였다.

#### (6) 녹용 추출물 액상발효

- 녹용 추출물의 액상발효는 녹용 추출액 2%를 포함한 prebiotic minimum media(1 L 기준: 녹용 1차 추출액 20g, peptone 5g, sodium acetate 2.5g, 1M magnesium sulfate 7H<sub>2</sub>O 0.5mL, 1M manganese sulfate 4H<sub>2</sub>O 0.5mL, Tween80 5mL, diammonium citrate 1g, dipotassium phosphate 1g, Glucose 20g, L-glutamic acid 1g) 제조한 후 121°C, 15분간 고압멸균 후 Sonication으로 배지 속 녹용 추출물(젤)을 분쇄하여 사용하였다. 완성된 녹용 Media를 45mL씩 50mL conical tube에 aliquot (1개 실험 균 당 3개씩) 후 각각의 tube에 실험 균 1% 접종하여 사용하였다. 37°C에서 24시간, 48시간, 72시간 정치배양해 1일~3일 차 각각 유산균 발효한 배양물 획득하였고 원심분리 후 상등액을 0.22 μm syringe filter로 필터링한 후 시료로 사용하였다.

#### (7) pH 측정 및 산도 측정

- 고상 발효한 녹용박과 액상 발효한 녹용 추출액을 원심분리한 후 상등액 sampling 후 남은 녹용박의 pH를 측정하여 시간에 따른 pH 변화를 확인하였다. 산도는 1일~3일차 액상 발효한 녹용 발효물을 원심분리한 후 상등액 1mL에 지시약 1% phenolphthalein solution 10mL 첨가한 후 0.1N NaOH 50~100 mL씩 넣고 흔들어서 연한 분홍색(종말점)이 될 때까지 넣어주어 측정한 후, 첨가된 0.1N NaOH 양을 계산하여 총산도(%)는 NaOH 소비량(mL)\*NaOH 역가(1.002)\*NaOH 젯산 함유량(0.009)/시료량(mL)\*100으로 계산하였다.

#### (8) 생균 수 (Colony Forming Unit) 측정

- 배양 시간에 따른 유산균의 성장을 조사하기 위해 MRS broth에 키운 실험균 배양액 100mL를 0.1% peptone water로 serial dilution 후 MRS Agar plate에 10mL씩 3반복 떨어뜨린 후 37°C, 48시간 배양한 뒤 형성된 콜로니 수를 계수하여 초기 생균수와 비교하여 일차별 생균수를 측정하였다.

#### (9) GABA (γ-aminobutyric acid; 감마-아미노뷰티르산) 측정

- GABA분석을 위해 발효액 3mL, 0.5M 탄산수소나트륨 1.5mL, 0.715mg/ml 1-플루오로-2, 4-디니트로벤젠 0.5mL을 잘 섞은 후 60°C에서 1시간 반응시키고, 상온에서 냉각시킨 후, 0.22 μm syringe filter를 이용하여 필터링하여 얻어진 추출액에 GABA는 Shimadzu 20A series HPLC로 분석하였다. Column은 Symmetry C18 column (5 μm, 3.9 x 150mm)을 이용하고, oven 온도는 30°C로 유지하고, Mobile phase 2중, 아세트산암모늄과 아세토나이트릴을 85:15 (v/v) 비율로 isocratic 조건으로 20분간 용출 하였음. Injection volume은 10 μL이고, wavelength는 360nm를 이용하여 분석하였다.

#### (10) 시알산 분석

- 먼저 시료 중에 sialic acid를 추출하기 위해서 발효 녹용 sample 0.1mL에 0.2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액 0.1mL를 가하여 85℃에서 1시간 동안 가수분해한 후 2mL periodate solution(0.25M NaIO<sub>4</sub> in 9M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>로 제조)을 첨가하여 상온에서 20분간 반응하고, 0.1mL m-arsenite reagent(10% NaAsO<sub>2</sub> in 0.1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> with 0.5M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 용액을 첨가하여 과량의 periodate를 환원시킨 후 0.25mL TBA 용액(0.6% TBA in 0.5M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)을 첨가한 후 85℃에서 15분간 발색시켜 상온에서 냉각하였다. cyclohexanone 1mL을 첨가한 후 원심분리(900g, 7분)를 진행하고 상등액을 96 well plate에 옮겨 549nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### (11) 총질소량 분석

- 총 질소분석은 흡광광도법을 이용하였다. 발효액을 25배 희석시킨 후 0.2% HCl 5mL, 20mL 증류수, 10mL 3% 알칼리성 과황산칼륨용액 (pH 9.7) 을 넣고 잘 섞고 120℃에서 30분간 가열 분해한 후 분해병을 꺼내어 냉각 후 5mL 0.06% HCl을 넣은 후 잘 섞어주고, 최종 샘플은 220nm에서 흡광도를 측정하여, 질산칼륨을 이용하여 미리 작성한 검량선으로부터 질소의 양을 구하였다.

#### (12) 총아미노산 분석

- 50 μL 발효액, 2mL 증류수, 1mL 아세트산-아세트산나트륨 (pH 6.0)과 1mL 2% 닐하이드린 용액을 잘 섞은 후 100℃에서 15분간 반응시킴. 냉각 후 최종적으로 10mL 50% 에탄올용액을 넣고 잘 섞고 최종 샘플은 220nm에서 흡광도를 측정하여, 아르기닌을 이용하여 미리 작성한 검량선으로부터 아미노산의 양을 구하였다.

#### (13) 단백질 분석

- 단백질 정량은 Bradford protein assay를 이용함. 96 well plate에 1/2로 희석한 발효물 10 μL와 bradford dye를 1차 증류수로 1:5로 희석한 후 whatman paper로 거른 bradford dye solution 200 μL를 5분 동안 반응시킨 후 595nm에서 흡광도를 측정하였다. Bovine serum albumin으로부터 얻은 표준곡선을 활용하여 계산하였다.

#### (14) 우론산 분석

- 우론산 함량 측정은 100배 희석한 발효물을 ep tube에 100 μL씩 담고 sodium tetraborate를 25mM의 농도로 Sulfuric acid에 녹인 solution을 400 μL 첨가해 준 후 100℃에서 10분간 가열하고 실온으로 식혀주었다. 시료가 실온이 되면 absolute ethanol에 0.125% carbazole을 녹인 용액을 100 μL 넣어주고 다시 100℃에서 10분간 가열해 반응시켜 준 후 실온으로 충분히 식힌 후 96 well plate로 100 μL씩 옮겨 550nm에서 흡광도를 측정함. Uronic acid의 함량은 D-glucuronic acid로 작성한 표준 곡선으로부터 함량을 계산하였다.

### (15) Glycosaminoglycan(GAG) 분석

- 글리코사미노글리칸은 Dimethylmethylene blue assay에 의해 측정하였다. DMMB 용액은 1L 기준으로 DMMB 16mg, glycine 3.04g, NaCl 1.6g, 0.1M acetic Acid 95mL을 넣고 pH 3으로 맞춰준 후 0.45  $\mu$ m syringe filter로 필터링한 후 사용 직전에 whatman filter로 거른 후 사용하였다. 96well plate에서 시료 20  $\mu$ L에 DMMB reagent 200  $\mu$ L를 넣어준 후 5초간 pate shaking 후 525nm에서 흡광도를 측정하였다.

### (16) DPPH 라디칼 소거 기능 평가

- 항산화능은 DPPH assay에 의해 측정되었다. ep tube에 시료 500  $\mu$ L와 Methanol에 용해시킨 1mM의 DPPH solution 1mL을 암실에서 30분간 반응시킨 후 96 well plate에 100  $\mu$ L씩 옮겨 517nm에서 흡광도를 측정하였다. L-ascorbic acid를 이용하여 작성한 표준곡선을 작성하였고 DPPH 라디칼 소거능(%)은  $\frac{Abs(control)-Abs(sample)}{Abs(control)} * 100$  을 활용하여 계산하였다.

### (17) Tricine SDS PAGE

- 저분자 단백질의 분자량을 확인하기 tricine SDS-PAGE를 실시하였다. 시료를 2X Tricine sample buffer와 1:1로 혼합한 후 85 $^{\circ}$ C에서 2분간 가열해 단백질 변성을 일으킨 후, 가열한 시료를 16.5% polyacrylamide gel에 24  $\mu$ L씩 로딩한 후 Tricine SDS PAGE buffer를 넣고 80V로 전기영동하였다. 유리판에서 gel을 분리하여 coomassie blue로 1시간 염색 후 methanol:acetic acid:water (1:1:8)를 이용해 24시간 탈색한 후 저분자 단백질 밴드를 확인하였다.

## 나. 발효농용에 대한 안전성 및 독성 평가

### (1) 시험물질 발효농용분말의 안전성 및 독성 평가

- 시험물질 발효농용분말을 암수 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경구 투여하였을 때, 발현되는 독성반응을 관찰하고 개략의 치사량을 구하기 위하여 수행하였다. 「의약품 등의 독성시험기준」 식품의약품안전처 고시 제2017-71호(2017.8.30.)에 의한 시험기준을 준수하여 실시하였다.
- 본 시험은 「동물보호법」 법률 제16977호(2020.2.11. 일부개정)에 근거한 한국식품산업클러스터진흥원 IACUC(Institutional Animal Care and Use Committee)에 의해 승인(IACUC-21-008)을 통해 진행하였으며, 「동물보호법」 및 「실험동물의 관리와 사용에 관한 법률」에 따라 수의학적 관리를 실시하였다.



- 시험은 대조군(멸균증류수)와 시험물질(발효농용분말) 5,000mg/kg/day 투여군으로 구성하였고, 군당 암수 각 5마리에 단회 경구 투여로 설계하였고, 투여 후, 14일 동안 일반증상관찰 및 체중측정을 실시하고 관찰기간 종료일에 안락사 시켜 부검하였다.
- 시험항목: 사망유무, 일반증상관찰, 체중측정, 사료섭취량, 음수섭취량, 장기중량, 분변이상도, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 뇨검사를 포함하였다.
- 모든 생존동물에 대하여 부검 전 약 18시간 이상 절식시킨 후, 부검 일에 CO<sub>2</sub>로 마취하여 배대정맥으로부터 혈액을 채취하였다. 혈액학적 검사는 채취한 혈액 약 1mL을 EDTA 함유 튜브에 넣은 후, 혈구분석기(ADVIA 2120i, SIEMENS Healthineers, Germany)로 WBC, RBC, HGB등의 10가지 혈액학적 항목들을 측정하였다.

Hematology Parameters	
Total leukocyte count (WBC)	Mean corpuscular hemoglobin (MCH)
Total red blood cell count (RBC)	Mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC)
Hemoglobin (HGB)	Platelet count (PLT)
Hematocrit (HCT)	Reticulocyte count
Mean corpuscular volume (MCV)	WBC differential count

그림 나-1) 혈액학적 검사 항목

- 혈액생화학적 검사는 배대정맥에서 채취한 혈액 중 혈액학적 검사용 혈액을 제외한 나머지 혈액을 실온에서 약 30분 방치 후 3,000rpm 으로 10분간 원심분리하여 분리한 혈청을 취하여 이용하였다. 혈액생화학 분석기(TBA120FR, Toshiba LTD, Japan)로 다음 항목들을 측정하였다.

Clinical Chemistry Parameters	
Glucose (GLU)	Alanine aminotransferase (ALT)
Blood urea nitrogen (BUN)	Total bilirubin (TBIL)
Creatinine (CREA)	Alkaline phosphatase (ALP)
Total protein (TP)	Gamma glutamyl transpeptidase (GGT)
Albumin (ALB)	Creatine phosphokinase (CK)
Serum Iron	Calcium (Ca)
Total cholesterol (TCHO)	Inorganic phosphorus (IP)
Triglyceride (TG)	Sodium (Na)
Phospholipid (PL)	Potassium (K)
Aspartate aminotransferase (AST)	Chloride (Cl)
HDL-cholesterol	LDL-cholesterol

그림 나-2) 혈액생화학적 검사 항목

## 다. 발효녹용에 대한 면역증강 평가 및 항균능력 평가

### (1) 프로바이오틱스 발효물의 SCFA(short chain fatty acid) 생성능

- 배양상등액에 증류수로 희석하여 homogenizer로 30초간 균질화하고 원심분리 (13,000rpm, 10분)한 후 상등액을 0.22  $\mu$ m syringe filter filter로 여과하여 HPLC Ultimate 3,000로 분석하였고, HPLC의 조건은 다음과 같이 column은 Aminex-87H column으로 이동상은 0.01N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 0.5mL/min의 속도로 적용함. Detector는 RI으로 검출 파장은 210nm로 설정하며 injection volume은 10  $\mu$ L이고 SCFA 분석을 위한 standard는 VOAs mixture을 사용하였다.

### (2) 예쁜 꼬마선충 *C. elegans*를 이용한 항균 효능평가

- *C. elegans* L4/젊은 성충을 비 발효 녹용 배지(AC, 10 mg/mL), 발효 녹용 추출물 (AF, 10 mg/mL) 및 *E.coli* OP50을 25° C에서 24시간 동안 컨디셔닝 NGM 플레이트에 접종함. 플레이트당 30마리를 사용하였고 이후 AC, AF, OP50으로 전처리된 선충을 *Salmonella typhi* SL 1344, *Listeria monocytogenes* EDG-e, *E.coli* EDL933 병원체 플레이트에 옮겨 25° C에서 배양한 후 24시간 간격으로 현미경으로 관찰하였다. 모든 벌레가 죽을 때까지 벌레는 백금으로 부드럽게 만지면 살아있는 벌레 또는 죽은 벌레로 계산하였다.

### (3) 비장 세포의 분리

- C57BL/6 마우스(24주령 암컷, 20-2g)로부터 비장 조직을 적출하여, 10% FBS, 항생제를 함유하는 RPMI-1640 배지에서 40  $\mu$ m 세포 스트레이너 통과를 통해 파쇄 분리하고 세포를 4° C에서 10분 동안 2000rpm에서 원심분리를 통해 정제하고 적혈구(RBC)를 제거하였다. 3분 동안 적혈구 용해 완충액(RBC lysis buffer)를 처리한 후, 비장세포를 10% FBS를 함유하는 RPMI로 세척하고 항생제를 2,000rpm에서 10분 동안 4° C에서 10분 동안 원심분리하여 생성된 세포 pellet을 현탁하여 분리된 비장세포를 계수하였다.

### (4) 세포 독성 및 증식 측정

- 세포 생존을 분석은 EZ-Cytox 세포 생존을 분석 키트를 사용하여 수행하였다. 비장세포를 96 well plate (5x10<sup>6</sup>/mL)에 접종하고 0, 0.1, 0.5 및 1mg/mL의 AC(발효되지 않은 녹용추출물), AF(발효된 녹용추출물) 샘플로 48시간 동안 처리하는 동안 면역억제제인 Cyclophosphamide 1.6mg/mL 을 녹용 샘플과 함께 처리하였다. 각 well에 EZ-Cytox 시약 10  $\mu$ L를 첨가하고 1시간 동안 배양한 후 흡광도 450 nm에서 측정하여, 대조군과 비교하였다.

(5) 마우스에서 사이클로포스파미드 유도 면역억제 모델의 준비

○ 10주령 암컷 C57BL/6 마우스(19-20g)를 12/12시간 조명/온도(22°C ± 2°C) 및 습도(50% ± 5%)가 조절된 사육환경에서 적응 1주일 후, 마우스를 무작위로 4개의 그룹(n = 5)으로 나누었다(대조군, Cy 처리군(100mg/kg), CY+비발효녹용(AV) 2mg/Kg 그룹, CY+발효녹용(AF) 2mg/Kg). 녹용을 처리한 그룹은 해당 농도로 약 28일 동안 경구 투여하였고, 대조군과 Cy 그룹은 같은 양의 식염수만 경구 투여하였다. Cy를 처리하는 군은 21일, 24일에 총 부피 200 μL의 식염수에서 Cy(100mg/kg)를 복강 내 주사하여 마우스를 처리하고, 실험이 끝나면 마우스를 희생시킨 다음 모든 마우스의 비장을 수집하였다.



Group	100mg/kg cyclophosphamide	Sample	Mouse
NC	X	X	6
CY	O	X	6
CY+녹용control(A.C)	O	O (2mg/20g/1day)	6
CY+녹용발효(A.F)	O	O (2mg/20g/1day)	6
CY+생녹용(A)	O	O (원액 200uL/20g/1day)	6

그림 나-3) 면역저하 유도 마우스에서의 발효녹용 및 비발효 녹용 투여실험

(6) RNA 분리 및 정량적 실시간 역전사 중합효소 연쇄 반응(RT-qPCR)

○ total RNA Mini Kit (T2010S; New England BioLabs, Ipswich, MA)를 사용하여 비장 조직으로부터 총 RNA를 분리했고. cDNA synthesis kit(170-8891, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)는 프라이머를 사용하여 총 RNA 10g에서 cDNA를 합성하는 데 사용하였다. 아래 열거된 면역 관련 사이토카인 등 유전자 특이 프라이머를 사용하여 표적 유전자 발현을 분석하였다. 실시간 발현 분석은 SYBR Green PCR Mastermix(1725121; Bio-Rad Laboratories, 미국)를 사용하여 StepOnePlus Real-time PCR 시스템(Applied Biosystems)에서 수행되었으며, 사이클 임계값은 β-actin 유전자 발현 수준에 대해 표준화되었다.

표 나-1) Primer sequences for real-time PCR

Gene	Sequence	Length (bp)
IL-6	F: 5'-AGTTGCCTTCTTGGGACTGA-3' R: 5'-TCCACGATTTCCCAGAGAAC-3'	159
IL-10	F: 5'-GACAACATACTGCTAACCGACTCC-3' R: 5'-GCTCCTTGATTTCTGGGCCATG-3'	139
iNOS	F: 5'-GCATGGACCAGTATAAGGCAAGCA-3' R: 5'-GCTTCTGGTCGATGTCATGACGAA-3'	222
IFN $\gamma$	F: 5'-TCTGGAGGAACTGGCAAAAG-3' R: 5'-GCTGATGGCCTGATTGTCTT-3'	107
TNF- $\alpha$	F: 5'-AGCCCCCAGTCTGTATCCTT-3' R: 5'-CTCCCTTGCAGAACTCAGG-3'	212
$\beta$ -Actin	F: 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3' R: 5'-CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA-3'	228

## 라. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

(정성적 연구개발 성과 및 결과 : 전주대학교)

### (1) 녹용박 효소 처리 추출물의 GABA 측정

○ 녹용박의 반응 최적 비율은 20% 녹용박, 50℃에서 60분 동안 효소반응 조건으로 확립하였고, 각 효소의 반응을 적용하여 생성물의 GABA를 정량한 결과이다. 녹용박에 Alcalase, Neutrase, Protamex, Papain, Lipopan 효소 반응물과 효소를 처리하지 않는 녹용박 20%, 60분 효소반응 모두 GABA 함량을 측정할 수 없었다. Flavourzyme 효소 반응물 (0.0000741mg/mL)이 유일하게 GABA 함량이 높아졌다.

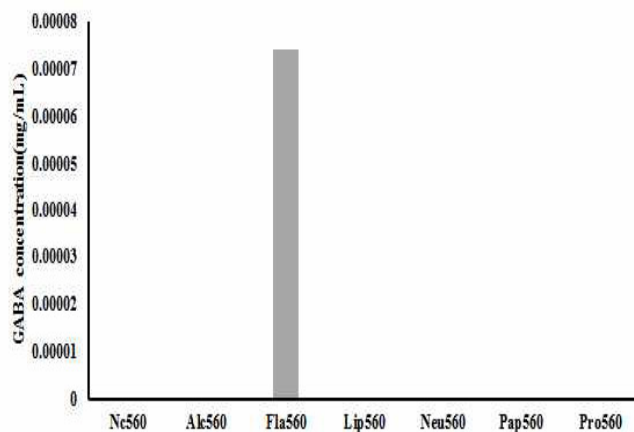


그림 나-4) 녹용박 효소 처리 추출물의 총 GABA 함량  
Nc560:효소미처리, 반응조건만 적용함

## (2) 녹용박 효소 처리 추출물의 시알산 측정

- Sialic acid 정량 결과는 녹용박에 Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, Protamex, Papain, Lipopan 효소 반응물 모두 효소를 처리하지 않는 녹용박 (0.022mg/mL) 보다 Sialic acid 함량이 낮게 나타났다.

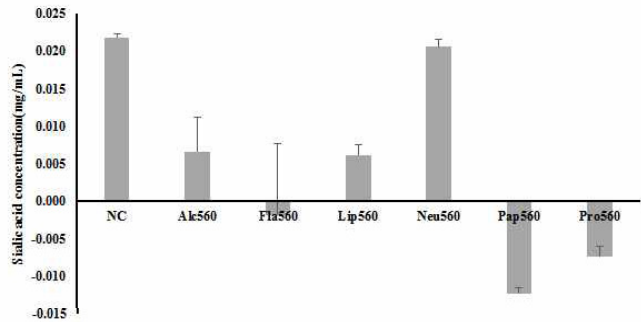


그림 나-5) 녹용박 효소 처리 추출물의 시알산 함량

## (3) 녹용박 효소 처리 추출물의 우론산 측정

- 녹용박 효소 반응물의 Uronic acid를 정량하였다. Uronic acid 정량 결과는 녹용박에 Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, Protamex, Papain, Lipopan 효소 반응물 중 Flavourzyme 효소반응물과 Papain 효소반응물이 효소를 처리하지 않는 녹용박 보다 Uronic acid 함량이 높게 나타난 것을 알 수 있다. 녹용박 Papain 효소 반응물 (0.154mg/mL)이 Uronic acid의 함량이 가장 높고, 효소를 처리하지 않은 녹용박 (0.19mg/mL) 보다 7.7배 증가하였다.

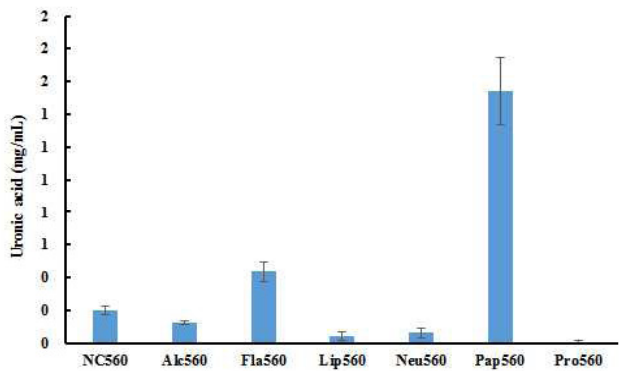


그림 나-6) 녹용박 효소 처리 추출물의 우론산 함량

## (4) 녹용박 효소처리 추출물의 Glycosaminoglycan(GAG) 분해능

- 5g 녹용박을 60분간 단일 효소 처리한 시료를 dymethylmethylene blue(DMMB) 분석법으로 녹용박에 효소처리를 하지 않은 control 배지의 흡광도 값에서 효소처리를 한 시료의 흡광도 값을 빼준 값을 통해 GAG가 얼마나 분해되었는지를 확인하였다. 그 결과 Papain 효소 처리를 한 시료가 2.6%로 가장 높았으며 Neutrase가 0.867%, Alcalase가 0.833%, Lipopan이 0.333%로 나타났다. Flavourzyme과 Protamex를 처리한 시료는 분해능이 나타나지 않았다.

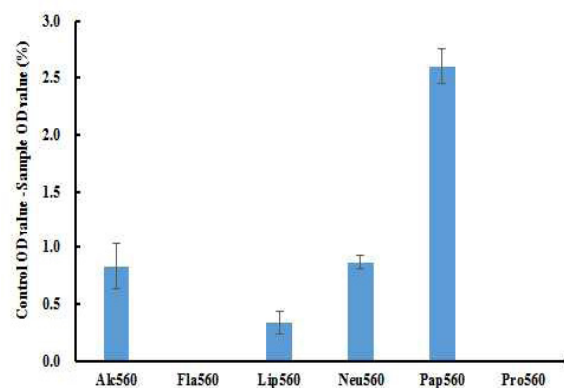


그림 나-7) 녹용박 효소처리추출물의 GAG 함량

(5) 녹용박 효소 처리 추출물의 Amino acid 정량

○ 녹용박 효소 반응물의 Amino acid를 정량하였다. Amino acid 정량 결과는 녹용박에 Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, Protamex, Papain, Lipopan 효소 반응물 모두 효소를 처리하지 않는 녹용박 보다 Amino acid 함량이 높게 나타난 것을 알 수 있다.

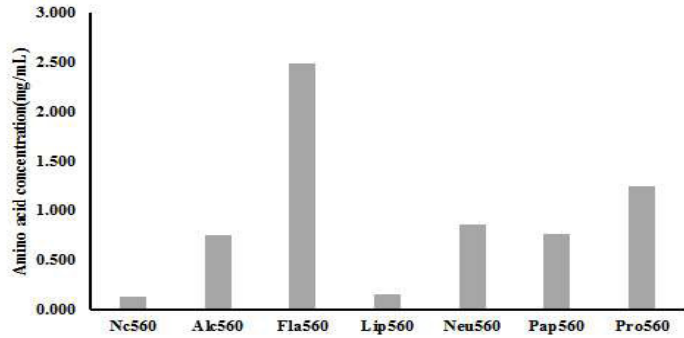


그림 나-8) 녹용박 효소 처리 추출물의 아미노산 정량

녹용박 Flavourzyme 효소 반응물(2.493mg/mL)이 Amino acid의 함량이 가장 높고, 효소를 처리하지 않은 녹용박(0.19mg/mL) 보다 18배 증가한 것을 알 수 있다.

(6) 녹용박 효소 처리 추출물의 총 질소 정량

○ 녹용박 효소 반응물의 총 질소를 정량하였다. 총 질소 정량 결과는 녹용박에 Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, Protamex, Papain, Lipopan 효소 반응물 모두 효소를 처리하지 않는 녹용박 보다 총 질소 함량이 높게 나타난 것을 알

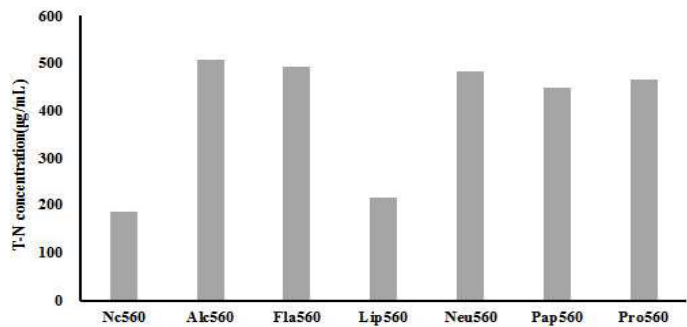


그림 나-9) 녹용박 효소 처리 추출물의 총 질소량

수 있다. 녹용박 Alcalase 효소 반응물(506.71 µg/mL)은 총 질소 함량이 가장 높고, Flavourzyme 효소 반응물(493.28 µg/mL)은 총 질소의 함량이 두 번째로 높은 것을 알 수 있다.

(7) 효소 처리 녹용박과 발효 녹용의 Tris-tricine SDS PAGE

○ 녹용 발효물의 분자량 크기를 측정하기 위하여 전기영동 실험을 수행한 결과, 효소에 의해 분자량 크기가 작아져 인체에 흡수가 용이한 크기로 전환됨을 알 수 있다. 그 중 명확한 사이즈의 펩타이드가 많이 나온 효소반응물은 flavozyme 으로 확인이 되었다(그림 나-10).

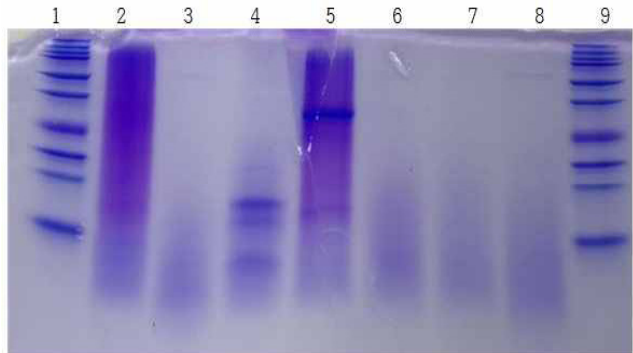
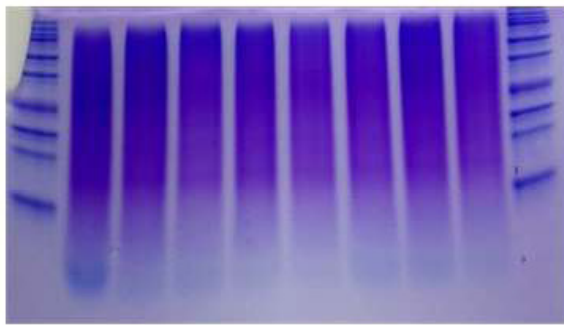
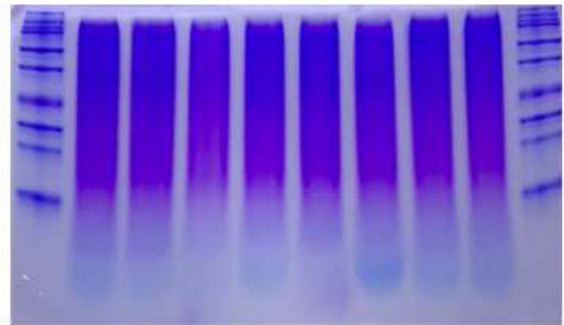


그림 나-10) 녹용박 효소 처리 추출물 SDS PAGE 결과 1)Ladder 2)효소미처리녹용 3)Akc560 4)Fla560 5)Lip560 6)Neu560 7)Pap560 8)Pro560 9)Ladder

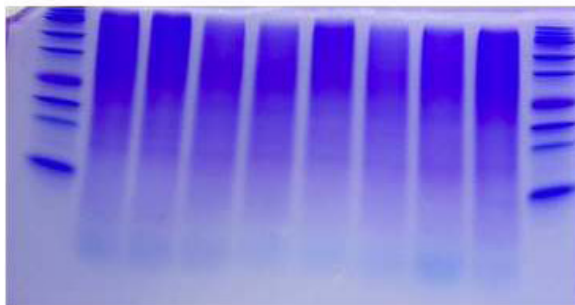
○ 특이하게도, 락토바실러스를 이용하여 발효를 진행한 녹용 농축액의 SDS PAGE 결과로 락토바실러스를 이용한 발효에 의한 저분자 펩타이드는 효소에 의해 고분자 단백질의 분해되는 양상은 크게 차이가 나지 않았다.(그림 나-11, 각각의 균에 대한 2일, 3일 발효 결과, 원액과의 차이가 크지 않음.) 하지만, 동일 연구과제의 다른 연구(발효조건 및 발효기간이 다른 연구)에서는 저분자 펩타이드화가 나타나고 있어, 발효시간, 발효조건 및 가공 방법에 따라 다른 저분자 펩타이드화에 대한 추가적인 전기영동 연구가 필요할 것으로 보인다.



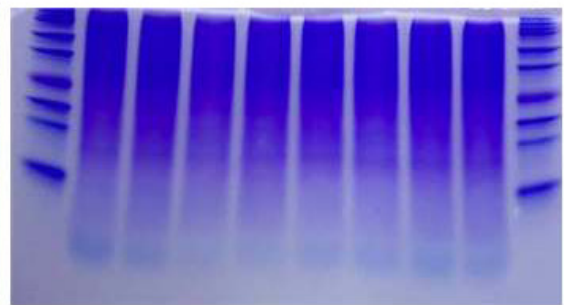
1)Ladder 2)녹용 3)A20-2d 4)A89-2d 5)B49-2d 6)D34-2d  
7)E18-2d 8)LFR20-001-2d 9)LFR20-002-2d 10)Ladder ↓



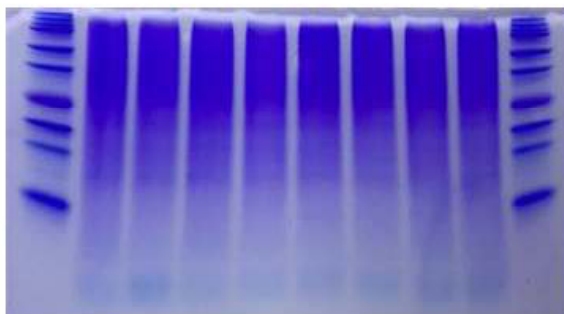
1)Ladder 2)LFR20-003-2d 3)LFR20-004-2d 4)LFR20-005-2d  
5)LFR20-006-2d 6)LFR20-007-2d 7)LFR20-008-2d 8)MR1-2d  
9)MR14-2d 10)Ladder ↓



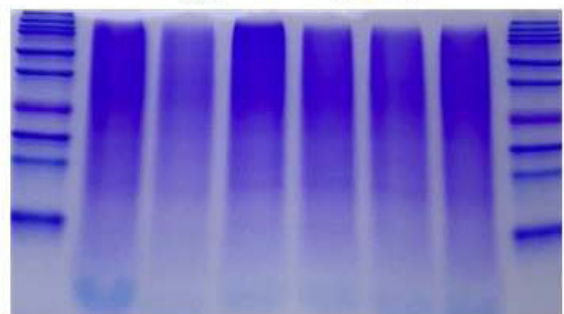
1)Ladder 2)MR19-2d 3)MR4-2d 4)MR43-2d 5)MR45-2d  
6)MR5-2d 7)MR50-2d 8)LFR20-009-2d 9)A20-3d 10)Ladder ↓



1)Ladder 2)A89-3d 3)B49-3d 4)D34-3d 5)E18-3d  
6)LFR20-001-3d 7)LFR20-002-3d 8)LFR20-003-3d  
9)LFR20-004-3d 10)Ladder ↓



1)Ladder 2)LFR20-005-3d 3)LFR20-006-3d 4)LFR20-007-3d  
5)LFR20-008-3d 6)MR1-3d 7)MR14-3d 8)MR19-3d 9)MR4-3d  
10)Ladder ↓



1)Ladder 2)MR50-3d 3)MR43-3d 4)MR45-3d 5)MR5-3d  
7)LFR20-009-3 8)Ladder ↓

그림 나-11) 녹용박의 각 발효균 17종을 2일과 3일 처리한 후 발효액의 SDS-PAGE결과

(8) 항노화 기능성 프로바이오틱스 균주 선정

- 녹용의 발효에 활용할 균주로서 “식품의약품안전처 식품안전나라” 에서 제시된 “식품에 사용할 수 있는 원료” 의 미생물 균주 만을 선발하여 사용하였다. *Lactobacillus brevis*와 *Lactobacillus sakei* 는 식품 원료로써 활용하는데 제한사용 기준이 없고, 또한 식약처에서 고시된 19종의 프로바이오틱스인 *L. plantarum*와 *L. rhamnosus* 가 포함되어 있다. 이러한 기준에 따라 전주대학교와 서울대학교에서 보유한 균주 및 신규 분리한 균주 중 김치와 유아 분변에서 분리한 균주인 *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*를 포함한 유산균주 150개를 대상으로 내산, 내담, 부착능 실험을 통과한 균주 들 중에서 17종의 미생물을 선발하여 *C.elegans* (*Caenorhabditis elegans*) 모델에서 수명 연장에 도움을 줄 수 있는지 평가하였다.
- 예쁜 꼬마선충인 *C.elegans*는 선형동물의 일종으로써 다수의 유용미생물에 대한 항노화실험을 위한 최적의 마우스 대체 동물모델로써 활용도와 가치가 매우 높아, 저비용, 고효율, 제한된 시간 내에 항노화효능을 평가하기 유용하다(Richard Nass와 Iqbal Hamza, 2007;Masaharu Uno와 Eisuke Nishida, 2016; Heidi A. Tissenbaum, 2014). 대조군으로써 *L.rhamnosus* GG를 활용하였으며, 이보다 우수한 균주로써 LFR20-003, 004, 007과 MR-4, -5, -14, -19, -43, -45로 보여지고 있다 (그림 나-11).

표 나-2) *Lactobacillus* strains evaluated by the present study

Strain ID <sup>1</sup>	Sources <sup>2</sup>	Oxygen <sup>3</sup>	Temperature	Species <sup>4</sup>
FR20-001	Kimchi	Anaerobic	37° C	<i>L. sakei</i>
LFR20-002	Kimchi	Anaerobic	37° C	<i>L. brevis</i>
LFR20-003	Kimchi	Anaerobic	37° C	<i>L. rhamnosus</i>
LFR20-004	Kimchi	Anaerobic	37° C	<i>L. rhamnosus</i>
LFR20-005	Kimchi	Anaerobic	37° C	<i>L. sakei</i>
LFR20-006	Kimchi	Anaerobic	37° C	<i>L. rhamnosus</i>
LFR20-007	Kimchi	Anaerobic	37° C	<i>L. sakei</i>
LFR20-008	Kimchi	Anaerobic	37° C	<i>L. brevis</i>
LFR20-009	Kimchi	Anaerobic	37° C	<i>L. brevis</i>
MR1	Infant feces	Anaerobic	37° C	<i>L. plantarum</i>
MR4	Infant feces	Anaerobic	37° C	<i>L. plantarum</i>
MR5	Infant feces	Anaerobic	37° C	<i>L. plantarum</i>
MR14	Infant feces	Anaerobic	37° C	<i>L. plantarum</i>
MR19	Infant feces	Anaerobic	37° C	<i>L. plantarum</i>
MR43	Infant feces	Anaerobic	37° C	<i>L. plantarum</i>
MR45	Infant feces	Anaerobic	37° C	<i>L. plantarum</i>
MR50	Infant feces	Anaerobic	37° C	<i>L. plantarum</i>

<sup>1</sup> LFR number was provided after screening probiotic properties among 150 strains. <sup>2</sup> Infant feces from 10 babies, which study was approved by Jeonju University Ethics Committee (jjIRB-210215-HB-2021-0212). <sup>3</sup> Oxygen requirements; <sup>4</sup> Provided only lactic acid bacteria which was identified by 16S rRNA sequencing. To amplify the V4 region from the 16S rRNA gene, 341F/805R primers were used. 16S rRNA gene amplicon sequencing was performed on the Illumina MiSeq platform at Macrogen, Inc. (Seoul, Republic of Korea).



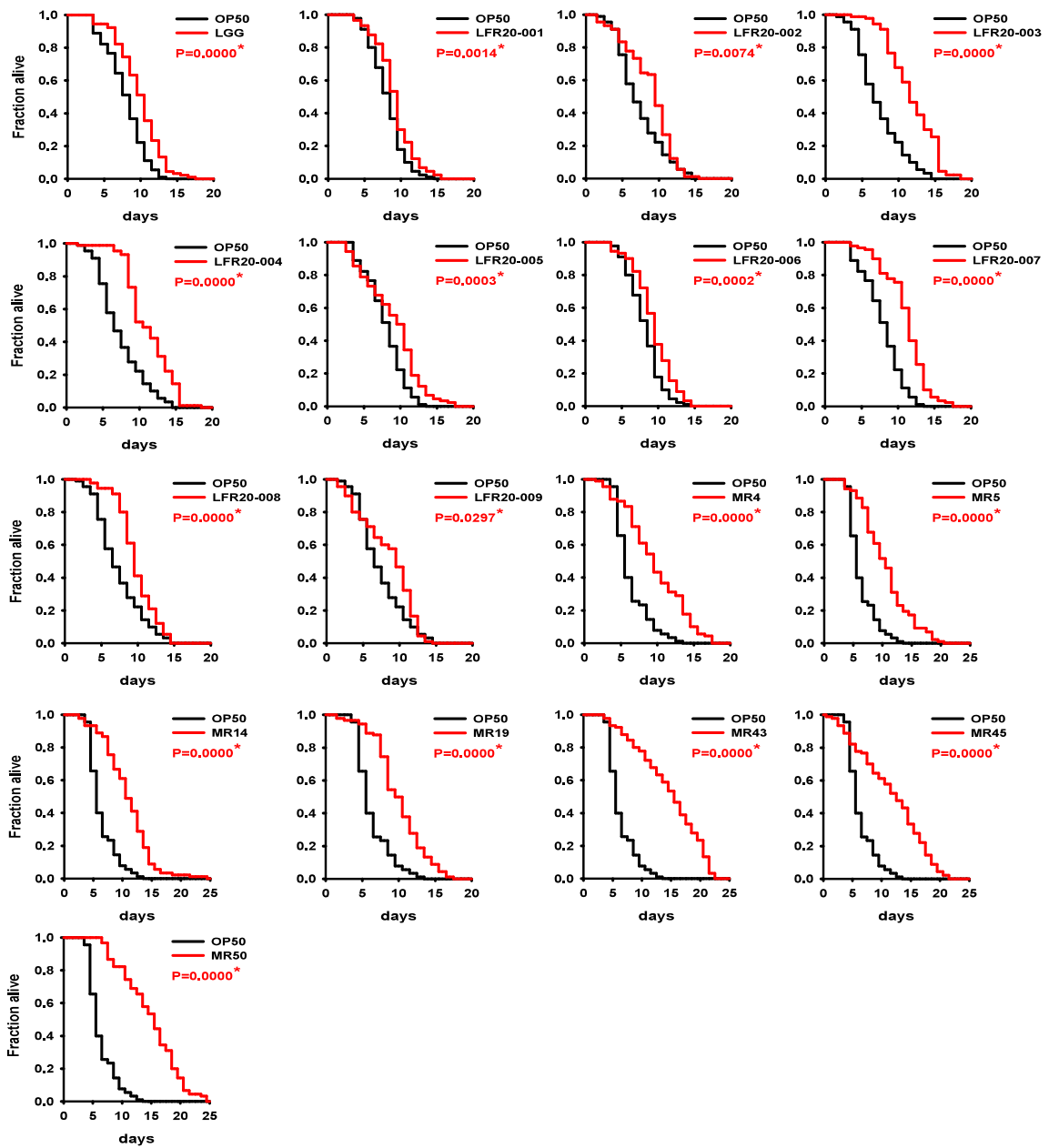


그림 나-12) 선발된 17 개 프로바이오틱스 가능 균주의 *C.elegans* 수명 연장 효능 평가

### (9) 녹용 농축액(추출물)의 유산균 발효에 따른 pH 및 산도 측정

○ 녹용 농축액 2% 첨가한 배지에 선발된 락토바실러스 균주 1%를 접종하여 총 5일 동안 발효하면서 매일 pH 및 산도를 측정하였고, 초기 배양 1~3일에 해당하는 결과를 그래프로 나타내었다. 실험 균주 모두 시간이 지남에 따라 락토바실러스에 의해 녹용추출물 및 녹용박의 pH가 낮아지며, 젖산을 기준으로 하는 총 산도(%)는 증가함을 알 수 있다. 실험 균주 대체로 시간이 지남에 따라 녹용의 산도가 높아진 것을 알 수 있으며, 선발된 균주 모두 2일 이상의 높은 젖산 발효능을 가진 것으로 보였다.

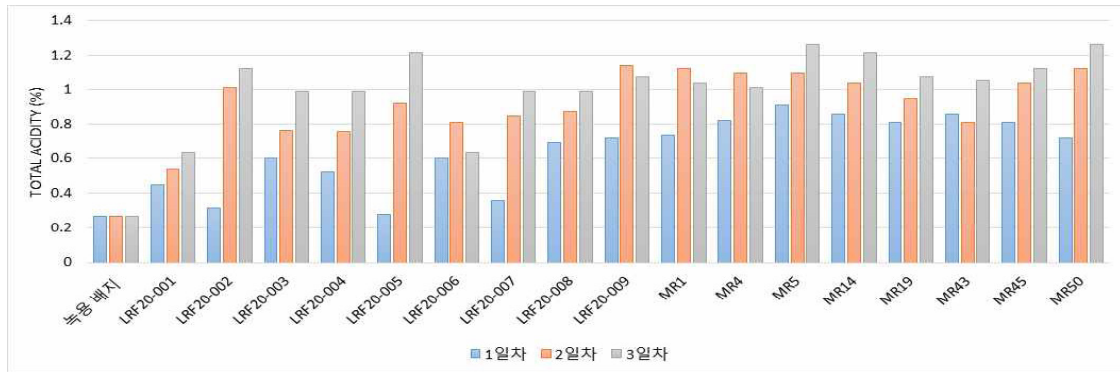


그림 나-13) 녹용 액상배지 발효물 1~3일 차 산도 변화

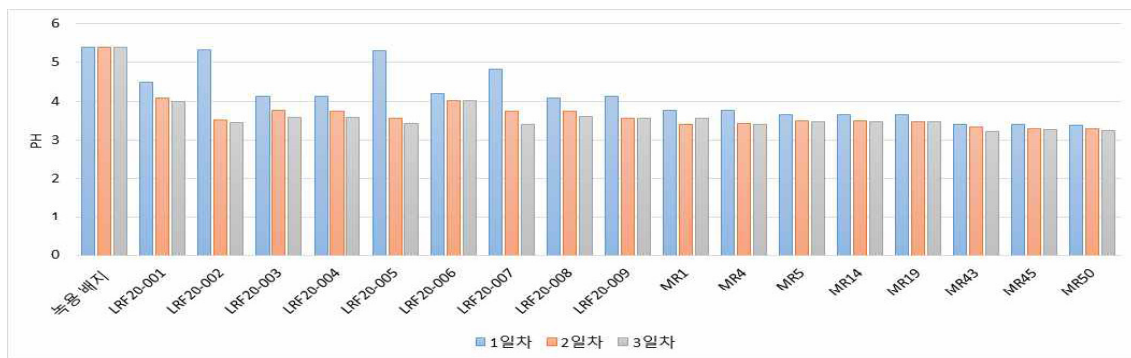


그림 나-14) 녹용 액상배지 발효물 1~3일차 pH 변화

### (10) 녹용 추출물의 발효액 내 생균수 측정

○ 녹용 농축액 2% 첨가한 배지에 선발된 락토바실러스 균주 1%를 접종하여 3일 동안 발효하면서 매일 발효물 내 존재하는 접종된 균의 생균수(CFU)를 측정하였다. 그림 5는 액상 발효한 녹용 농축액의 CFU 결과를 나타내었다. LRF20-001을 제외한 16개의 선발균들이 녹용 농축액에서 잘 증식함을 보였고, 특히 LRF-002, 003, 004, 005, 007, 009, MR-45는 1억마리 이상의 높은 생균수를 보였다.

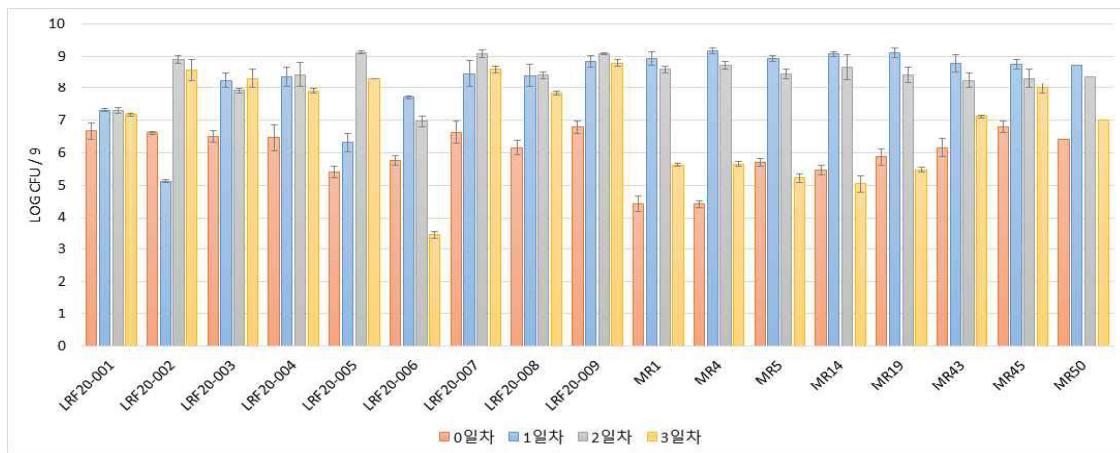


그림 나-15) 녹용 액상배지 발효물 1~3일차 접종균의 생균수(colony forming unit/g) 평가

(11) 녹용 추출물의 발효액 내 감마아미노부티르산(GABA, gamma-aminobutyric acid) 측정

○ 녹용추출물과 녹용박의 각각의 발효물에서 생성된 GABA 정량 결과를 나타내었다. 녹용 농축액에서는 발효 3일 동안 GABA양이 증가하였고, LFR20-004, LFR20-007, MR43, MR45, MR50의 GABA양 평균이 가장 높은 것을 알 수 있다. 녹용박에서는 LFR20-004의 GABA 양이 가장 높은 것을 알 수 있다.

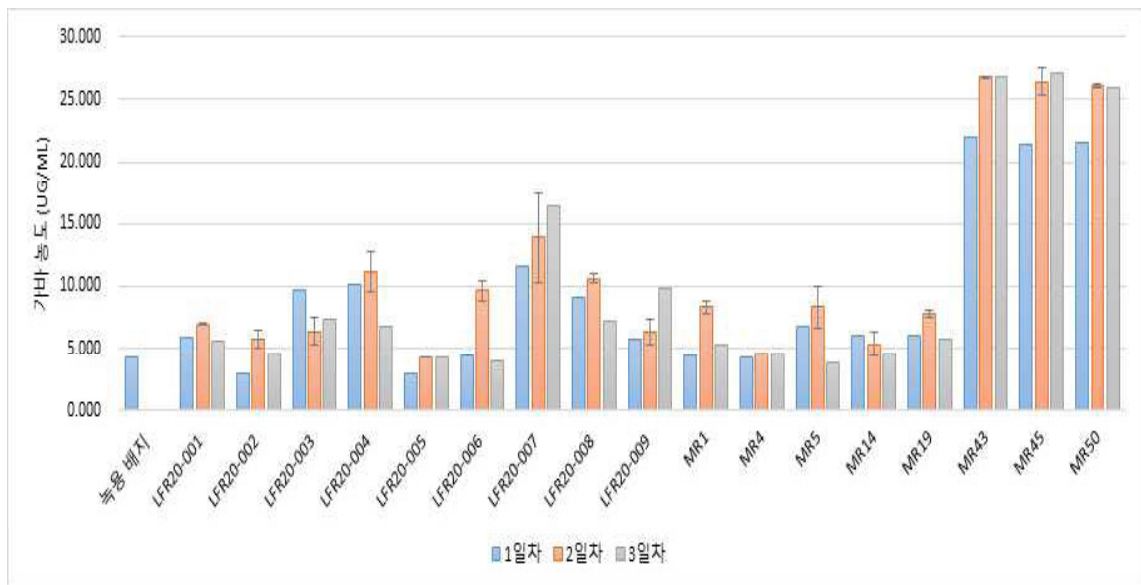


그림 나-16) 녹용 액상배지 발효물 1~3일차 총 GABA 함량

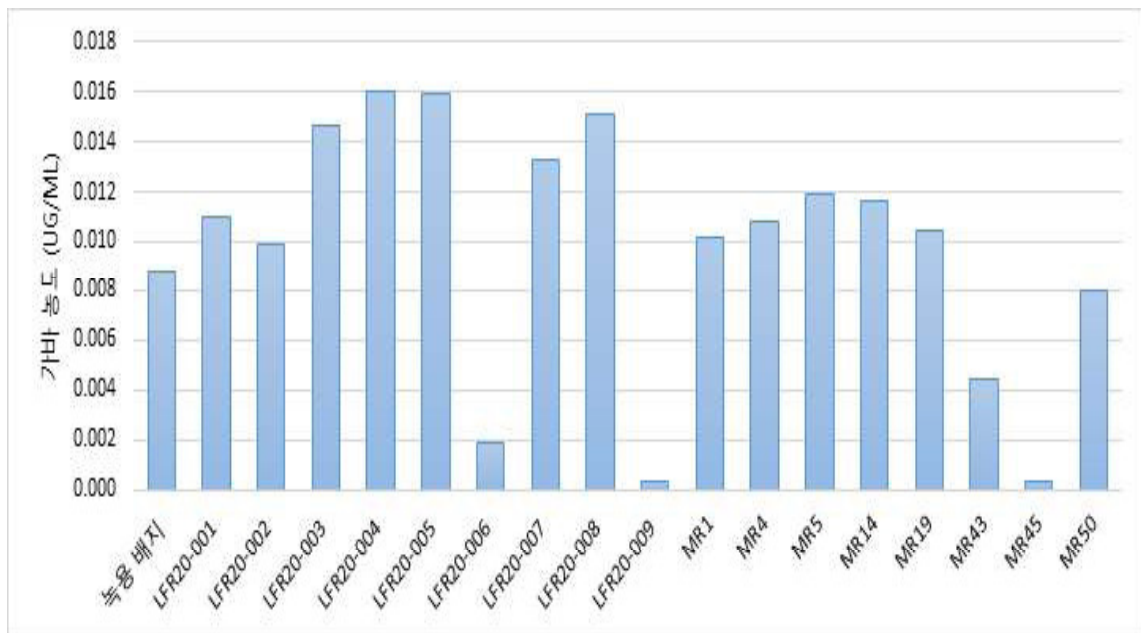


그림 나-17) 녹용박 고상배지 발효물 5일차 GABA 함량

(12) 녹용추출물의 발효액 내 시알산(sialic acid, N-acetylneuraminic acid) 측정

○ 녹용 농축액 2% 첨가한 배지에 선발된 락토바실러스 균주 1%를 접종하여 3일 동안 발효하면서 매일 발효물 내 존재하는 접종된 균에 의한 강글리오사이드의 구성성분인 시알산 생성 여부를 측정하였다. 시알산은 면역에서 매우 중요한 생리적인 작용을 하고있는 물질로써, 녹용의 유효성분 중 시알산의 함량이 중요한 지표가 되지만, 가공과정 중에서 파괴되는 단점을 보완하여, 오히려 균을 접종함으로써 함량을 높이는 발효균 선발이 매우 중요하다. 분석된 총 시알산 함량이 2일 차 및 3일 차에서 증가되었으며, 특히 LFR20-001균주는 3일 차에서 가장 높은 함량을 보이고, 2일 차에서 LFR20-004, 006, 007, 008, 009, MR14가 대조군보다 13배 이상의 현저히 증가한 함량을 보이는 것으로 평가되었다. MR14 및 MR19를 제외한 MR균주들은 다른 균주에 비해 시알산 생성이 다소 미비한 것으로 보여 진다.

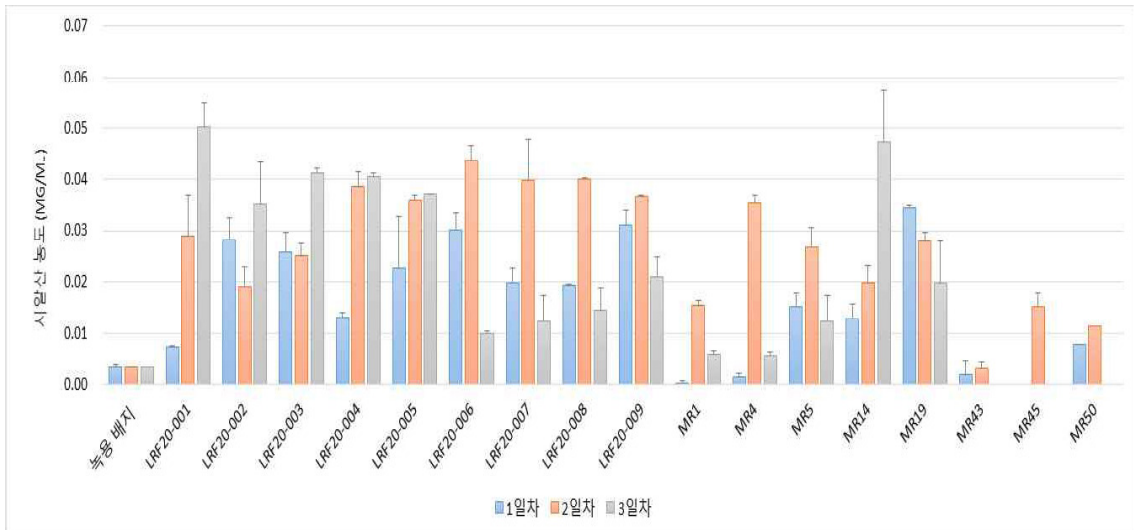


그림 나-18) 녹용 액상배지 발효물 1~3일 차 총 시알산 함량

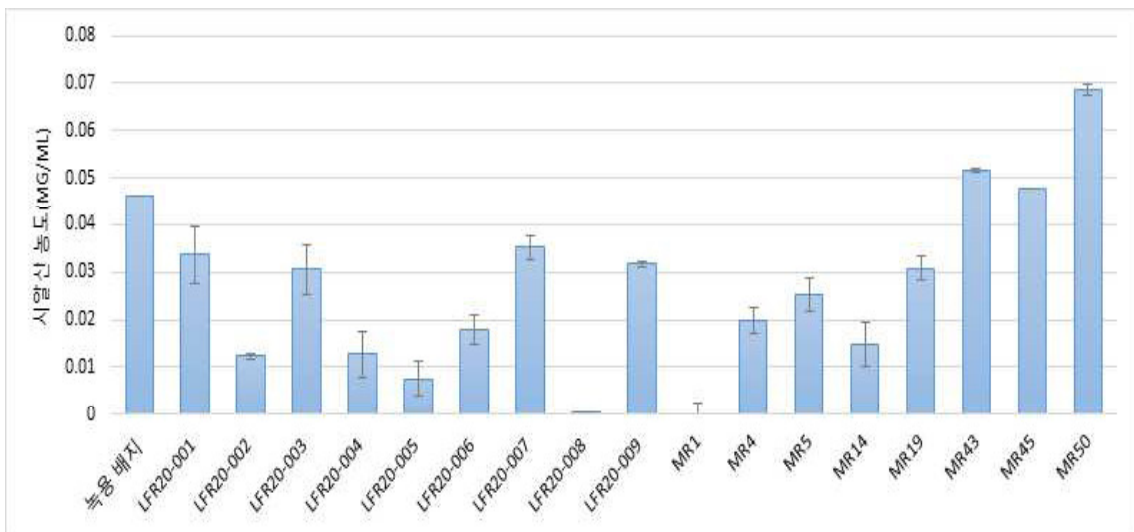


그림 나-19) 녹용박 고상배지 발효물 5일 차 시알산 함량

(13) 발효농축액의 Glycosaminoglycan(GAG) 및 우론산(uronic acid, N-acetylneuraminic acid) 측정

○ 농축액 2% 첨가한 배지에 선발된 락토바실러스 균주 1%를 접종하여 3일 동안 발효하면서 매일 발효물 내 존재하는 접종된 균에 의한 GAG 생성 여부를 측정하였다. 1,9-Dimethylmethylene blue(DMMB) 분석법으로 Glycosaminoglycan을 분석한 결과는 모든 접종균에서 약 20% 감소하였고, 우론산의 감소는 다소 상이한 감소를 보이고 있으나, 특히 3일째의 발효물에서 현저한 감소의 경향성을 보이는 것으로 확인된다. 피부, 연골에 존재하는 결합조직의 구성 성분으로 골관절염에 효능이 보이는 유효성분으로 알려져 있지만, 접종균의 발효에 따른 우론산 및 GAG의 약간의 감소를 보이고 있다. 선발된 균주는 접종 균주의 활성 및 GAG 감소추세를 보았을 때 2일째에 해당하는 발효물에서의 평가지표를 통해 선발해야 함을 보여 주고 있다.

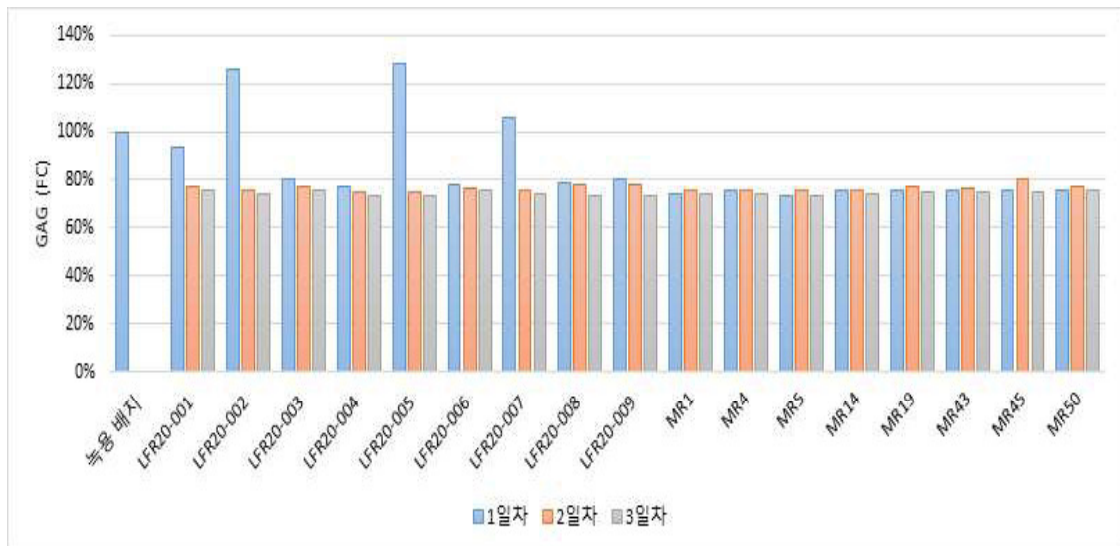


그림 나-20) 농축액상배지 발효물 1~3일차 GAG 함량

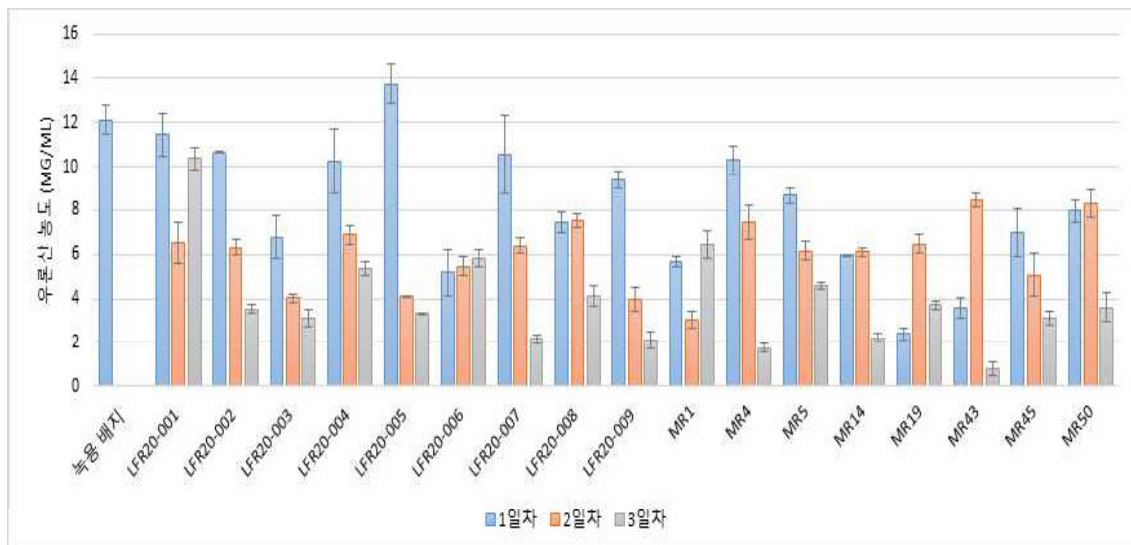


그림 나-21) 농축액상배지 발효물 1~3일차 uronic acid 함량

(14) 녹용추출물의 발효액 내 총 질소 및 단백질, 아미노산 함량

○ 녹용 추출물의 2일째 발효물을 대상으로 총질소량, 닐히드린반응을 통한 총아미노산 측정, 및 Bradford 단백질정량 분석을 실시하였다. 대체적으로 모든 측정항목에서 질소, 단백질, 아미노산의 수치가 감소하는 경향을 볼 수가 있는데, 이는 발효물을 잘 이용하는지 평가하기 위해 사용한 prebiotic minimum media(1L 기준: 녹용 1차 추출액 20g, peptone 5g, sodium acetate 2.5g, 1M magnesium sulfate 7H<sub>2</sub>O 0.5mL, 1M manganese sulfate 4H<sub>2</sub>O 0.5mL, Tween 80 5mL, diammonium citrate 1g, dipotassium phosphate 1g, Glucose 20g, L-glutamic acid 1g)를 사용한 것에 따라, peptone등의 질소원을 넣어주지 않은 것에 기인하여, 녹용 추출물을 생장에 필요한 질소원으로 효과적으로 이용한 것으로 보인다. 접종균을 넣지 않은 대조군에 비해 유일하게 총질소의 수치가 높게 나온 유산균은 MR50으로써 매우 특이적인 결과이지만, 단백질 및 아미노산의 수치는 감소한 것으로 확인된다.

표 나-3) Effect of fermentation (48 h) with probiotic *Lactobacillus* strains on the nutrient content of antler velvet extract

Strain	Total N (µg/ml)	Protein (µg/ml)	Amino acid (mg/ml)
Control	881.016±30.504	537.000±0.003	4.216±0.072
LFR20-001	222.798±15.882	380.629±0.017	3.291±0.041
LFR20-002	283.474±12.182	345.615±0.020	3.016±0.050
LFR20-003	247.888±3.236	419.414±0.008	3.763±0.100
LFR20-004	306.900±29.207	341.844±0.011	3.482±0.014
LFR20-005	394.585±23.576	306.292±0.007	2.950±0.027
LFR20-006	204.877±18.244	516.376±0.002	3.608±0.023
LFR20-007	720.238±38.258	356.389±0.009	2.945±0.033
LFR20-008	177.355±14.795	478.130±0.013	3.896±0.053
LFR20-009	244.048±9.798	351.002±0.009	3.597±0.040
MR1	322.261±8.140	405.408±0.007	3.103±0.045
MR4	333.781±28.079	322.452±0.008	3.019±0.029
MR5	291.539±10.199	473.282±0.025	2.666±0.014
MR14	285.394±22.301	405.947±0.011	2.912±0.023
MR19	322.901±24.770	412.950±0.017	2.865±0.024
MR43	449.757±40.967	476.514±0.010	3.305±0.080
MR45	462.558±30.657	421.030±0.017	3.640±0.082
MR50	915.323±33.944	444.193±0.004	3.185±0.065

(15) 발효 녹용 DPPH 라디칼 소거능 및 항균 실험

- 녹용추출물의 발효물의 항산화능을 측정한 결과 모든 액상 발효물에서의 유의적인 차이를 보이지 않았다. 또한 *Staphylococcus aureus* RN9390과 *Escherichia coli* EDL 933에 대하여 두 병원성 세균 도말을 한 platednl에 발효물을 흡수시킨 paper disc를 이용해 녹용 추출물 액상발효물과 녹용 박 고상발효물의 항균 효능을 평가한 결과, 모두 직접적인 항균 효과가 유의하지 않았다.
- 하지만, 동일 연구과제의 다른 연구(발효녹용 공정이 다른 연구)에서는 항산화 항균 활성도가 높게 나타나고 있어, 발효 시간, 발효조건 및 가공 방법에 따른 항균력 증가에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

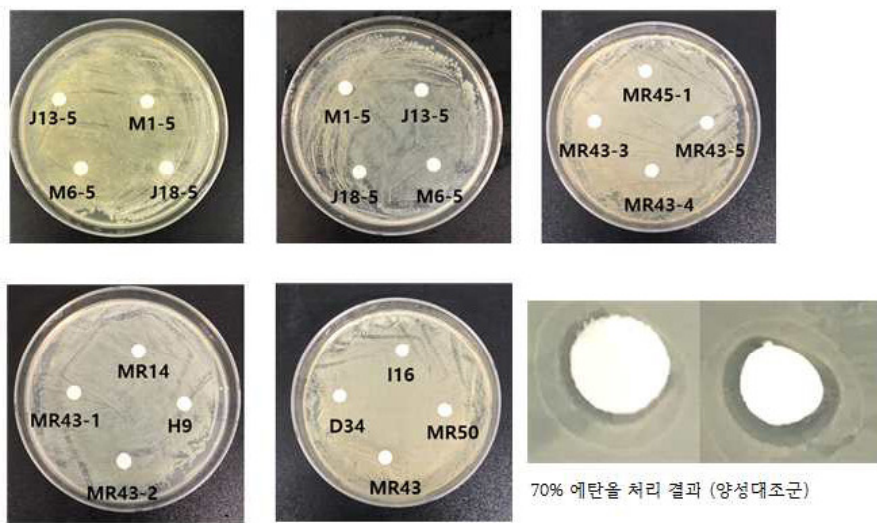


그림 나-22) 병원성균에 대한 발효물의 직접적인 항균력테스트

(16) 녹용추출물의 2일차 발효액 내 GABA 및 시알산 함량 비교

- 발효에 적합한 균주를 선발하기 위해 녹용 추출물의 2일차 발효물을 대상으로 가바 및 시알산 함량 데이터를 그래프를 다시 작성하여 비교하였다. 특이적으로 MR43, 45, 50은 가장 많은 GABA 함량을 보이는 반면,

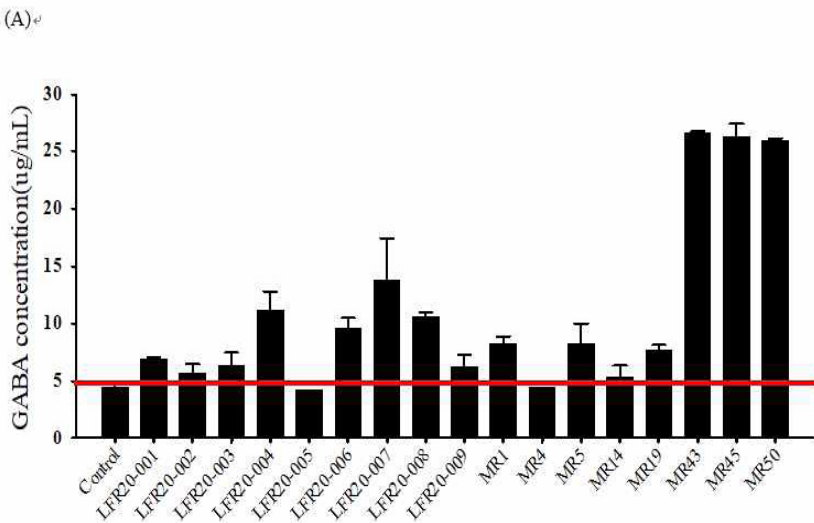


그림 나-23) 녹용 액상배지 발효물 2일차 GABA 함량 비교

- 시알산 함량이 LFR 균주보다 못 미침을 확인하였고, 대조군 정도의 수준으로 관찰되기도 하였다. 대조군보다 2배 이상의 함량을 보이는 것으로 LFR20-004, -006, -007, -008 균주에 의한 성분 함량증진이 유의적으로 보였다.

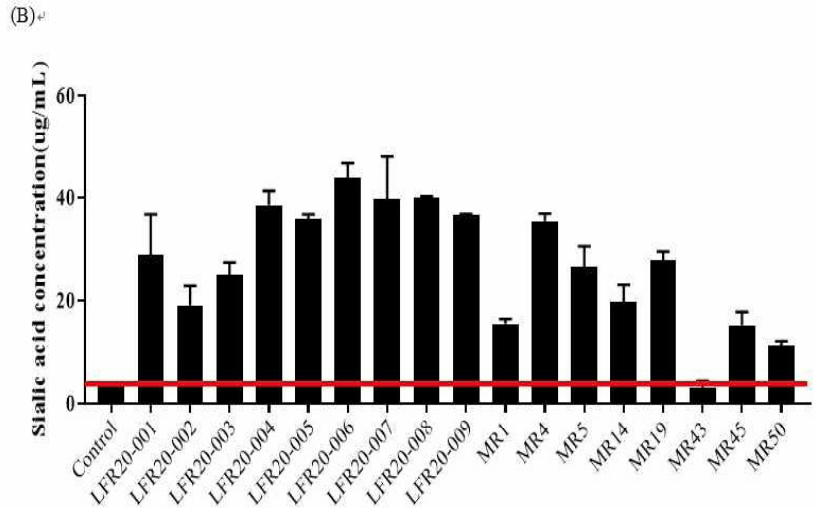


그림 나-24) 녹용 액상배지 발효물 2일차 시알산 함량

- 시알산 함량은 MR균주보다 훨씬 강화된 증가를 보였으며, 대조군과 비교하여 4배 이상 증진되는 발효물을 생성하는 균주로는 LFR20-001~009 균주으로써 *L. sakei*, *L. rhamnosus*, *L. brevis* 이었고, *L. plantarum*은 그에 비해 다소 적은 양상을 보였으나, MR45, MR50은 2-3배 가량의 GABA 생성을 보였다.

### (17) 최종선발균주 확인 및 집중균 발효에 따른 유효성분 분석

- 발효에 적합한 균주를 선발하기 위해 *C.elegans*의 수명연장 효능이 양성대조군인 LGG균의 결과보다 우수한 10개의 균주, GABA함량은 상위 6위 이내로써 2배이상의 증가를 보인 균주, 시알산 함량은 상위 10위 이내로 평가된 균주 중, 2일째 발효물 내 생균 수가 1억 마리 이상의 활성을 보이는 균주를 벤다이어그램을 활용하여 선발하였다. 최종적으로 김치에서 분리된 LFR40-004인 *Lactobacillus rhamnosus*와 LFR20-007인 *Lactobacillus sakei*가 선발되었고, 이 두 균을 활용한 이중 발효를 실시하여 발효물의 유효성분을 재분석하였다.

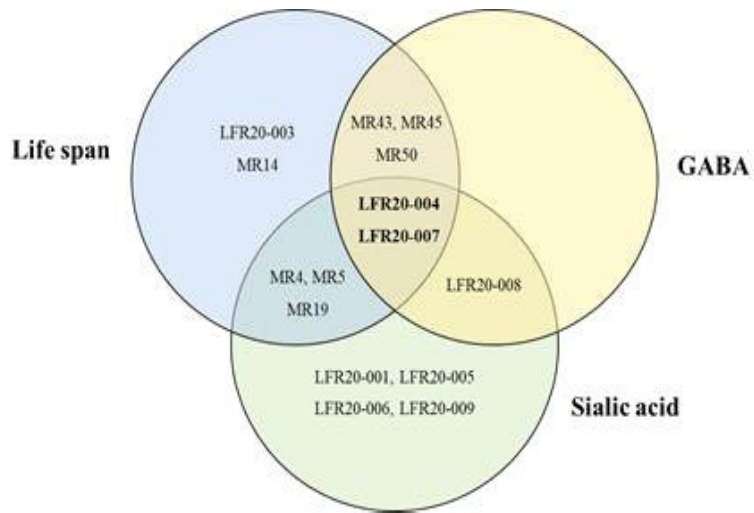


그림 나-25) 녹용발효의 최적균을 선발하기 위한 유효지표들에 대한 상위균주



(18) 녹용 혼합 발효물의 GABA, Sialic acid 함량 분석

○ 균주 LFR20-004과 LFR20-007를 녹용과 동시 발효한 발효물의 GABA, Sialic acid 분석을 진행하였다. 두 균주를 함께 발효한 녹용 추출물이 발효하지 않은 녹용에 비해 GABA는 약 2.6배 증가하였고, Sialic acid 약 2배 증가하였다.



그림 나-26) 녹용혼합발효물에서의 2일차 GABA 및 시알산 함량비교

표 나-4) Effect of co-fermentation on concentrations of bioactive molecules in antler velvet extract

	GABA (µg/mL)	Sialic acid (µg/mL)
Control	6.33±2.46	21.77±0.22
LFR20-004 + LFR20-007 혼합 발효물	16.69±1.37	40.10±2.86

(19) 녹용 혼합 발효물의 대사체(metabolites) 분석

○ 균주 LFR20-004과 LFR20-007를 동시 발효한 2일 차 발효물의 대사체 분석을 실시하였다. 클러스터링 분석을 통해 발효하지 않은 녹용과 발효한 녹용 사이에서 대사산물의 뚜렷한 차이점을 확인하였다. 발효 후 증가된 세부적인 대사체들의 함량을 비교해 보았을 때, 발효후에 propanoic acid, butanedioic acid등의 유용한 단쇄지방산들이 검출되었고, 아미노산 및 유도체들이 증가한 것을 확인하였으며, 특히 대사체 중에 D-lactic acid가 젖산발효를 통해 287배 증가되었음을 확인하였다. 또한 아미노산에서는 글리신함량이 6배 증가하였다. 글리신 아미노산은 뇌신경계의 기능뿐 아니라 대사성질환의 개선 및 예방에 매우 관련성이 깊은 것으로 보고되어 있어서 균을 활용한 발효물의 상기와 같은 결과는 매우 고무적으로 여겨진다. 또한 galatose와 mannose 단당류 등의 검출은은 감소되었다.

표 나-5) Effect of fermentation with probiotic *Lactobacillus* strains on concentrations of metabolites in antler velvet extract

	PC1	p-value	FC
<b>Metabolites increased by fermentation</b>			
D-Lactic acid	0.990	<0.001	287.20
L-Proline	0.984	0.005	+
Mevalonic lactone	0.979	0.006	+
Butanedioic acid	0.979	0.007	+
Pentanedioic acid	0.968	0.01	+
Glycine	0.955	0.009	6.091
L-Proline	0.947	0.003	+
D-Mannitol	0.945	0.013	+
Propanoic acid	0.937	0.028	+
Phenylalanine	0.920	0.040	+
Aminomalonic acid	0.907	0.053	+
<b>Metabolites reduced by fermentation</b>			
d-Galactose	-0.908	0.040	3.712
Mannose	-0.928	0.010	1.835
SC553_73mz_15.878min (Unknown)	-0.935	<0.001	-
D-(-)-Tagatose	-0.971	<0.001	-
d-Galactose	-0.983	0.005	1.735

(20) 녹용 혼합 발효물의 *C.elegans* 항균 효능평가

○ 예쁜꼬마선충에서의 병원균 3종에 대해 녹용발효 및 당귀(2%)포함 추출물의 항균력을 보기 위해 Killing assay를 실시하였다. 녹용 추출물 및 발효물에서도 유의적으로 항균 효능을 보이는 것으로 관찰되며, 특이적으로 당귀가 포함된 시료에서는 모두 공통적으로 항균 효능이 소실됨을 보였다.

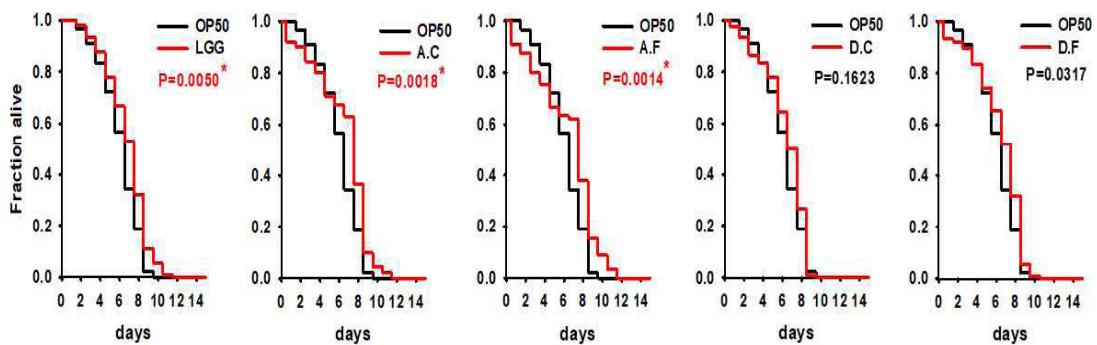


그림 나-26) *Listeria monocytogenes*의 감염에 따른 항균력 비교

(AC: 녹용추출물, AF: 녹용발효물, DA: 당귀추출물, DF: 당귀발효물)

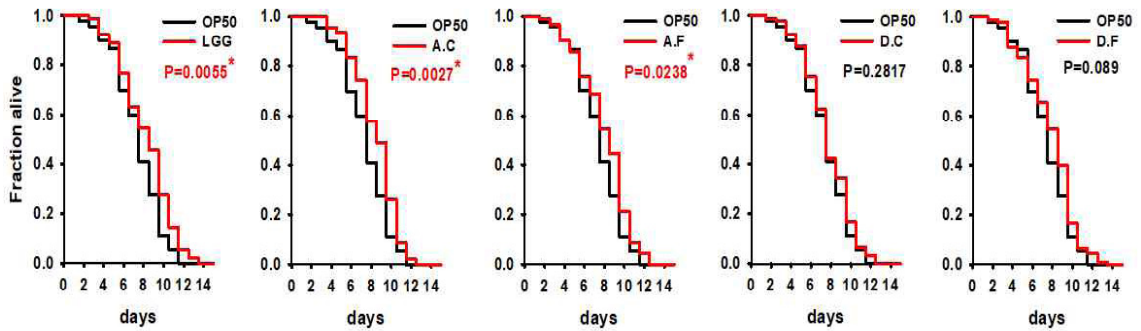


그림 나-27) E.coli O157:H7 의 감염에 따른 항균력 비교

(AC: 녹용추출물, AF: 녹용발효물, DA: 당귀추출물, DF: 당귀발효물)

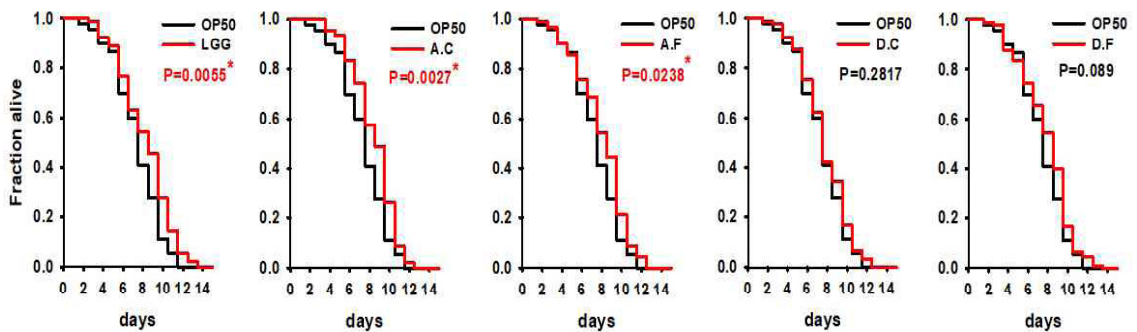


그림 나-28) Salmonella typhi SL 1344의 감염에 따른 항균력 비교

(AC: 녹용추출물, AF: 녹용발효물, DA: 당귀추출물, DF: 당귀발효물)

## (21) 녹용 혼합 발효물의 안전성평가

- 발효 녹용분말을 암수 Sprague-Dawley 랫드에 1회 경구투여하였을 때, 발현되는 독성반응을 관찰하고 개략의 치사량을 구하기 위하여 수행하였다. 본 시험은 「동물보호법」 법률 제16977호(2020.2.11. 일부개정)에 근거한 한국식품산업클러스터진흥원 IACUC(Institutional Animal Care and Use Committee)에 의해 승인되어 진행하였다 (승인번호: IACUC-21-008). 암컷과 수컷 5주령 SD 레트를 대상으로 식염수 투여군과 발효물 최대치(건조중량으로써 5g/kg/day)를 경구투여 1회 실시하였고, 2주 동안의 일반증상관찰과 체중등을 측정 후 부검하였다. 암수 5,000mg/kg/day 투여군에서 사망사례는 관찰되지 않았으며, 일반증상, 체중, 부검, 뇨검사, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사에서 시험물질 투여에 의한 유의적 결과는 관찰되지 않았다. 본 시험의 조건 하에서 암수 랫드에 발효 녹용분말을 1회 경구 투여한 결과, 개략적 치사량은 암수 모두 시험물질 5,000mg/kg/day을 상회하는 것으로 판단된다.

## (22) 녹용 혼합 발효물의 세포독성 평가

○ 노령 마우스(6개월, C57BL/6, 암컷)에서 분리한 비장세포(splenocyte,  $5 \times 10^6$ /ml)를 분주한 후, cyclophosphamide(Cy, 1.6mg/ml)를 처리하여 면역억제를 유도하여 세포의 생존율을 측정하였다. cyclophosphamide는 항암제로서 면역억제제로 사용되는 약물로도 사용이 되어 개체 및 면역세포에서 저하를 유도한다. 녹용 및 발효 녹용을 Cy와 함께 처리하여 48시간 후의 세포 생존율을 확인한 결과, 생존율이 저하된 비장세포는 CY만 처리한 음성 대조군과 비교하여, 발효 녹용의 모든 농도 처리군에서 특이적으로 생존율이 증가됨을 확인하였다. 이에 반면 발효하지 않은 녹용추출물에 대해서는 Cy 처리군에서 보다 약간 저조한 생존율이 관찰되었다.

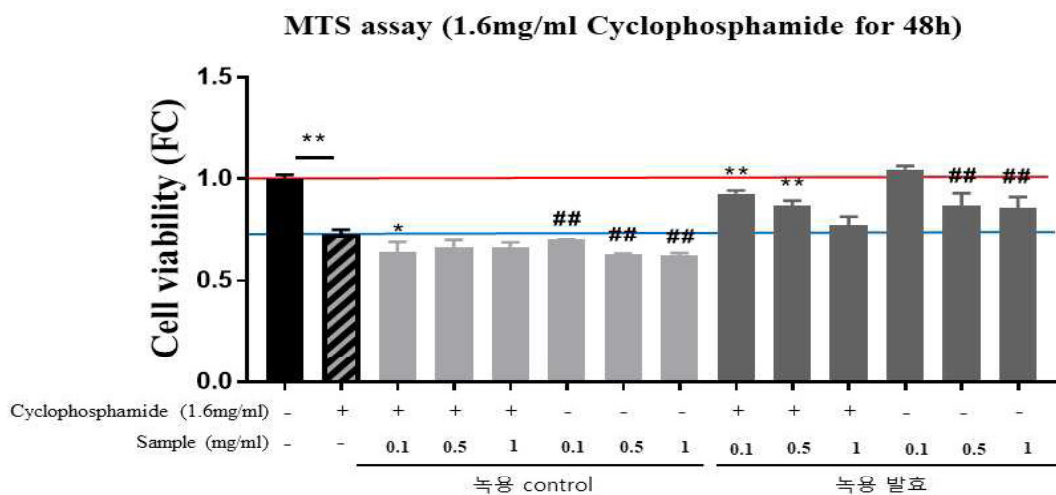


그림 나-29) 녹용발효추출물처리에 대한 생존율 측정

## (23) 녹용혼합 발효물의 경구투여 및 cyclophosphamide 투여에 대한 비장세포의 cytokine 발현

○ 녹용발효물에 대한 마우스 동물 모델 in vivo실험은 그림 23과 같다. 11주령 암컷 마우스(C57BL/6)를 대상으로 녹용 추출물 및 녹용 혼합 발효물을 4주간 매일 경구 투여한 후 cyclophosphamide를 2회 처리한 후 부검하여 비장세포 및 혈액을 분리하여 면역관련 biomarker를 분석하였다.

○ 활성화된 대식세포에 의한 인터루킨(IL)-6, IL-10, 인터페론(IFN)- $\gamma$ , 유도성 질소 생성효소(iNOS), 종양 괴사 인자(TNF)- $\alpha$ 와 같은 다양한 면역 조절제의 발현은 유해 인자에 대한 숙주 방어에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다. 인터루킨-6 및 TNF- $\alpha$ 와 같은 사이토카인은 감염 초기 단계에서 필수 면역 기능을 나타낸다(Higuchi et al., 1990; Lee et al., 2004).

○ IFN- $\gamma$ 는 제1형 T-helper(Th1) 유래 사이토카인으로서 세포 매개 면역 반응에 중요한 역할을 한다. IL-6 및 IL-10은 체액 면역을 촉진하는 type 2 T-helper(Th2) 유래 사이토카인(Constant and Bottomly, 1997)이다. NO는 병원성 미생물과 종양 세포를 중화시키기 위해 대식세포를 활성화하는 중요한 분자 iNOS에 의해 합성된다(Ren 등, 2017).

○ 면역억제 생쥐에서 분리된 비장세포에서 IL-6, IL-10, iNOS, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 와 같은 면역 조절제의 mRNA 발현을 분석했다. FAV가 비장 조직 유래 세포에서 면역 조절제의 생산을 촉진하는 반면 AV는 그렇지 않다는 것을 관찰했다. 일차 비장세포 외에도, FAV의 면역 강화 활동을 위한 생물학적 메커니즘을 설명하기 위해 자연 살해 세포, T/B 세포, 호중구, 호산구, 수지상 세포와 같은 단일 유형의 고립된 면역세포에 대한 FAV의 영향을 조사할 필요가 있다.

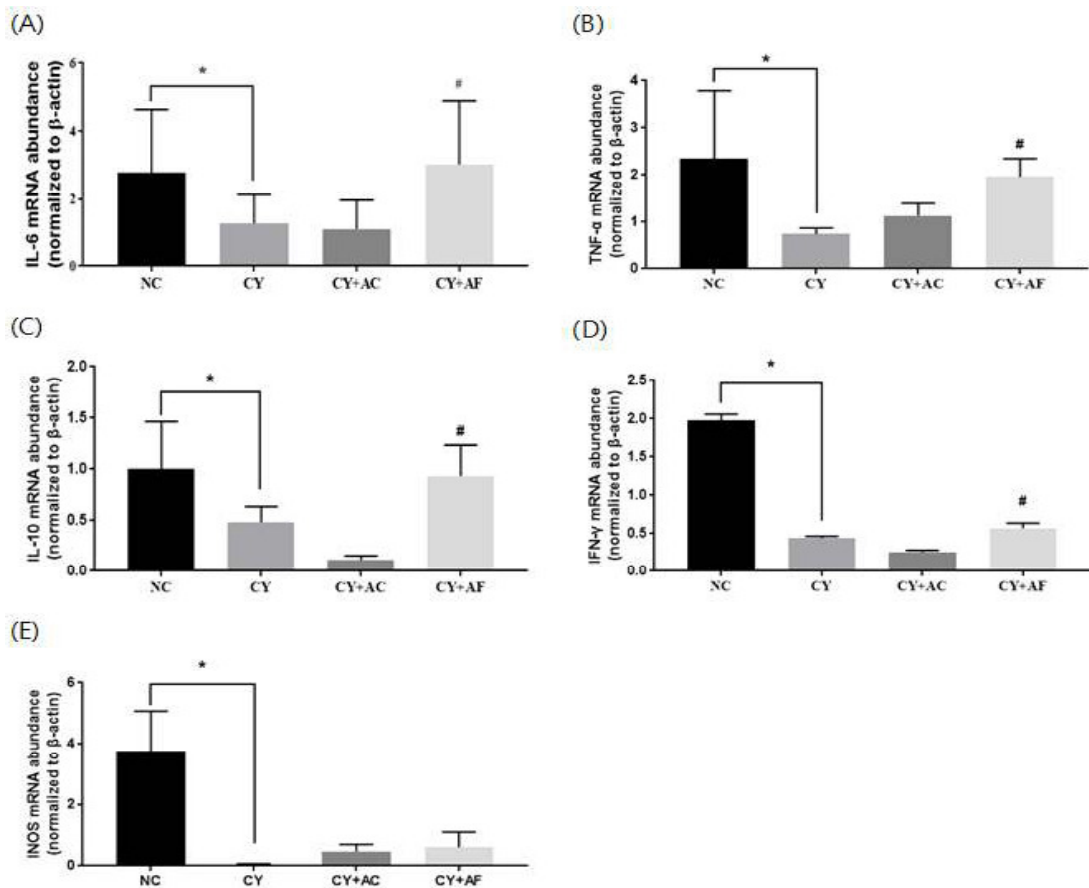


그림 나-30) 녹용발효물 경구투여 및 면역억제제 투여 후 비장세포의 mRNA발현 확인  
 (A) IL-6, (B) TNF- $\alpha$ , (C) IL-10, (D) IFN- $\gamma$ , (E) iNOS  
 (NC: 식염수투여, CY: cyclophosphamide, AC: 녹용추출물, AF: 혼합발효물)

## 다. (재)전북바이오융합산업진흥원 연구 개발 내용 (협동 2)

- 대량생산을 위한 산업화 표준 및 최적화 기술 보급 및 시제품 제작

### (1) 고상발효

- 녹용 박 발효공정의 현장산업화 표준모델 개발.

#### (가) 녹용 박 발효 적합 미생물을 활용한 발효공정 확립

- 발효녹용 최적 공정 개발, 고부가가치 효소처리공정 표준화,
- 수율향상을 위한 각 단계별 공정최적화 및 바이오컨버전 기술 도입

#### (나) 고상발효 관련 원리 및 공정 탐색

- ① 고상발효(Solid state fermentation)란 배지가 고체이긴 하나 미생물의 성장과 대사에 필요 충분한 수분을 함유한 고체상태의 배지에서 발효를 말하며, 이 발효공정은 에너지를 절약하고 폐수도 적게 배출하는 환경친화적인 공정일 뿐 아니라 농업관련 산업의 잔재를 재활용하는데 매우 유용하다.
- ② 그림 다-1)과 같이 기질 물질을 이용하려는 미생물의 활동으로 발효가 일어나고 이때 중요한 것은 효소의 역할로 기질은 물론 발효조건에 따라서 각기 다른 산물을 만들어 내는데 근래 미생물의 이런 작용을 활용하여 다양한 제품을 목적 지향적으로 만들 수 있다.

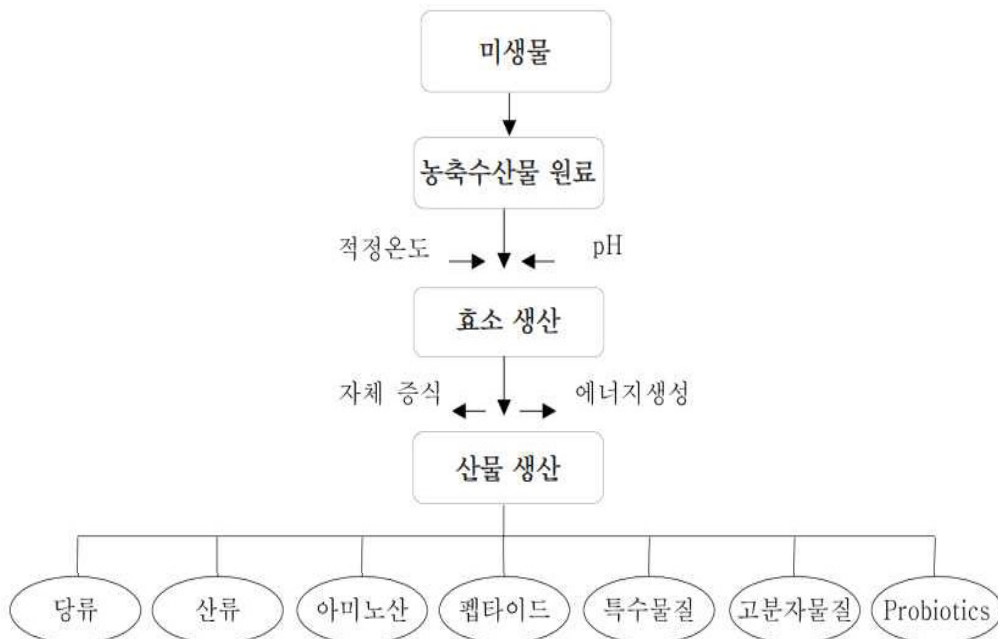


그림 다-1) 미생물과 효소에 의한 발효 과정

- ③ 고상발효는 흐르는 물 없이 젖은 기질 상태에서 미생물이 성장하게 되는데 고체 매트릭스내에 존재하는 수분을 이용하고 충분한 산소전달이 용이하기 때문에 장점이 많다.

- ④ 고상발효 공정개발을 위해 일반적으로 고려해야 할 몇 가지 요점으로 미생물과 배지, 공정의 각종 변수, 생산물의 분리와 정제를 최적화 하는 것 등이 있다.
- ⑤ 탱크배양과는 달리 수분 함량이 매우 낮기 때문에 미생물은 공기 중의 산소와 충분히 접촉할 수 있는 장점이 있다.
- ⑥ 기질의 단위질량당 수분 함량이 적기 때문에 발효조 부피가 작게 되며 통기와 교반이 용이하나, 고체 덩어리에서의 물질전달 장벽 때문에 탱크배양에 비하여 배양속도가 느린 단점이 있어, 열 전달이 용이하지 않아 온도 컨트롤이 가능한 배양 시설이 중요하다.
- ⑦ 현재 국내 대두 고상발효의 공정은 그림 다-2)와 같음

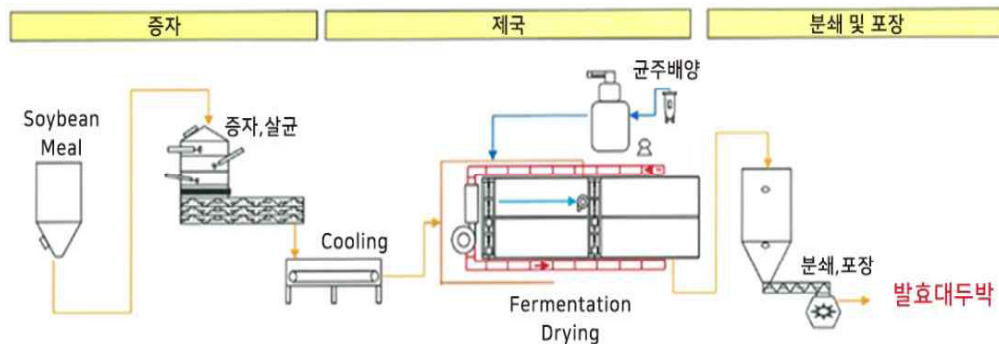


그림 다-2) 사용 원료에 따른 발효 제품

- ⑧ 고상발효시 중요한 배지의 선택은 고상물질의 물리적인 지지역할과 영양분의 근원이 되는 불용성으로 고체상태의 물질로는 농산 수확물, 농업관련 산업 폐기물 또는 불활성 지지물질들이 있으며, 불활성 물질은 영양적으로 불활성이면서도 영양액을 흡수하는 물질로서 배양 후에는 이 물질의 낮은 수분활성도와 높은 산소이동 조건을 다시 이용할 수 있다.
- ⑨ 사용하는 배지에 따라 제품의 특징(유효성분)이 다르며, 고체(Solid), 가루(Powder), 액체(Liquid), 원료의 형태로 구분된다.

#### (다) 녹용 박 활용한 고상발효

- ① 제1협동기관인 전주대학교에서 선별한 균주(*Lactiplantibacillus plantarum*)와 진흥원에서 보유한 균주(*Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*)를 혼합하여 고상발효시 가장 적합한 최적의 균주선정 위한 실험 진행하였다.
- ② 고상발효로 인해 녹용 박에 포함된 유효성분(GABA, Sialic acid, Glycosaminoglycan, Uronic acid)의 함량이 변화 될 것으로 예상된다.
- ③ 고상발효시 발효물을 손에 째 쥐었을 경우 수분이 1~2 방울 떨어질 때 최적의 고상발효 수분조건으로 약 54~55%로 확인하였다(녹용박 50g + 수분 60ml)
- ④ 본 연구의 녹용박은 녹용 1차 추출후 잔여물질을 식품관련법을 준수하여 추출조에서 별도의 이송이 없이 직접 원료를 파우치에 넣어 멸균하거나, 멸균후 재 동결건조 분말화한 중간 단계의 식품원료를 사용하였다.

### (라) 녹용 박 고상발효 관련 최적 발효조건

- ① 녹용 박 50g + *Lactiplantibacillus plantarum* 11ml+ Media 49ml
- ② 녹용 박 50g + *Lactiplantibacillus plantarum* 5.5ml+ *Bacillus subtilis* 5.5ml + Media 49ml
- ③ 녹용 박 50g + *Lactiplantibacillus plantarum* 5.5ml + *Saccharomyces cerevisiae* 5.5ml + Media 49ml
- ④ 녹용 박 50g + *Lactiplantibacillus plantarum* 3.6ml+ *Bacillus subtilis* 3.6ml + *Saccharomyces cerevisiae* 3.6ml + Media 49ml



그림 다-3) 균주 조건별 녹용박 고상발효

- ⑤ 최초 녹용박의 수분함량이 약 70%로, 열풍건조(45℃, 1day) 수분함량 3%까지 건조
- ⑥ Media(1L 제조 : Glucose 2%, L-glutamic acid 1%, 증류수 1L)
- ⑦ incubator에서 37℃ 5day 발효(1~5일 일별로 Sample 분획 후 유효성분 분석)

## (2) 2차 액상발효

- 녹용 농축액의 액상 발효공정 현장산업화 표준모델 개발
- 혼합 농축액상에 기능성(항노화, 면역력) 향상을 위한 균주 첨가 후 발효 추출액 수득 및 농축액 생산

### (가) 액상발효 공정설정

- ① 제1협동기관인 전주대학교에서 선별한 균주(*Lactobacillus sakei*(M1), *Lactobacillus rhamnosus*(I20))를 활용하여 액상발효시 가장 적합한 최적의 균주선정 위한 실험 진행하였다.
- ② 액상발효시에는 녹용 박 고상발효 추출농축액과 녹용추출농축액을 혼합하여 진행하였다.
- ③ 녹용추출농축액이 18 Brix로 점성이 강하여 원활한 액상발효를 위해 녹용 박 고상발효 추출물은 약 4.5 Brix 까지 농축하여 혼합하였다.



- ④ 녹용추출농축액과 녹용박 고상발효 추출농축액의 비율을 달리하여 진행하였다.
- ⑤ Media 제조(1L 기준: peptone 5g, sodium acetate 2.5g, 1M magnesium sulfate 7H<sub>2</sub>O 0.5mL, 1M manganese sulfate 4H<sub>2</sub>O 0.5mL, Tween 80 5mL, diammonium citrate 1g, dipotassium phosphate 1g, Glucose 20g, L-glutamic acid 1g)

### (나) 액상발효 및 균주의 최적 조건설정

- ① 녹용 박 고상발효 최적 조건설정 시험 구분
  - ㉠ 녹용추출농축액 40ml + Media 59ml + 유산균 접종(I20) 1ml
  - ㉡ 녹용추출농축액 50ml + Media 49ml + 유산균 접종(I20) 1ml
  - ㉢ 녹용추출농축액 60ml + Media 39ml + 유산균 접종(I20) 1ml
  - ㉣ 녹용추출농축액 40ml + Media 59ml + 유산균 접종(M1) 1ml
  - ㉤ 녹용추출농축액 50ml + Media 49ml + 유산균 접종(M1) 1ml
  - ㉥ 녹용추출농축액 60ml + Media 39ml + 유산균 접종(M1) 1ml
  - ㉦ 녹용추출농축액 40ml + 고상발효추출농축액 59ml + 유산균 접종(I20) 1ml
  - ㉧ 녹용추출농축액 50ml + 고상발효추출농축액 49ml + 유산균 접종(I20) 1ml
  - ㉨ 녹용추출농축액 60ml + 고상발효추출농축액 39ml + 유산균 접종(I20) 1ml
  - ㉩ 녹용추출농축액 40ml + 고상발효추출농축액 59ml + 유산균 접종(M1) 1ml
  - ㉪ 녹용추출농축액 50ml + 고상발효추출농축액 49ml + 유산균 접종(M1) 1ml
  - ㉫ 녹용추출농축액 60ml + 고상발효추출농축액 39ml + 유산균 접종(M1) 1ml
- ② 상기 액상발효 및 균주의 최적 조건설정 중 1~6 건은 제조된 Media를 사용하였으며, 7~12조건은 고상발효추출농축액에 Media의 재료를 혼합하여 액상발효를 진행함

### (3) 생균수, pH 분석

#### (가) 고상발효 시험구 구분

- 녹용 박 50g + *Lactiplantibacillus plantarum* 11ml+ Media 49ml
- 녹용 박 50g + *Lactiplantibacillus plantarum* 5.5ml+ *Bacillus subtilis* 5.5ml + Media 49ml
- 녹용 박 50g + *Lactiplantibacillus plantarum* 5.5ml + *Saccharomyces cerevisiae* 5.5ml + Media 49ml
- 녹용 박 50g + *Lactiplantibacillus plantarum* 3.6ml+ *Bacillus subtilis* 3.6ml + *Saccharomyces cerevisiae* 3.6ml + Media 49ml

① 생균수

- 단일균주(*Lactiplantibacillus plantarum*)로 고상발효시 생균수가 가장 높았다.

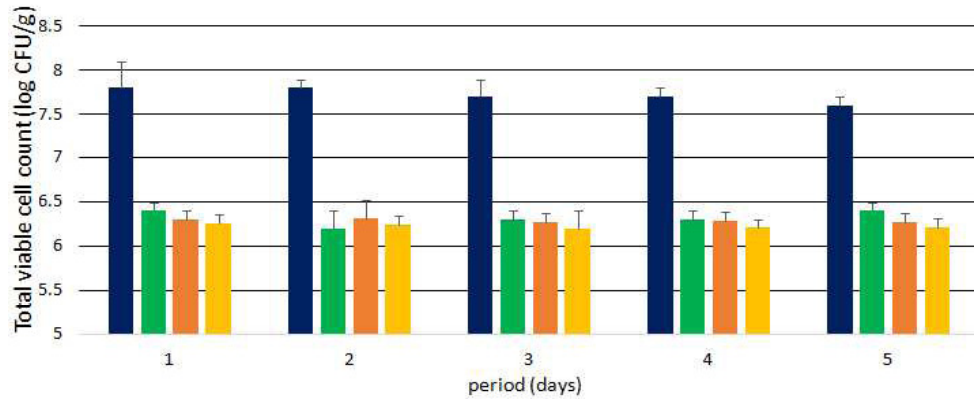


그림 다-4) 고상발효 균주 조건 발효 기간별 생균수

② pH

- 단일균주(*Lactiplantibacillus plantarum*)로 고상발효시 pH가 점차 감소하였다.

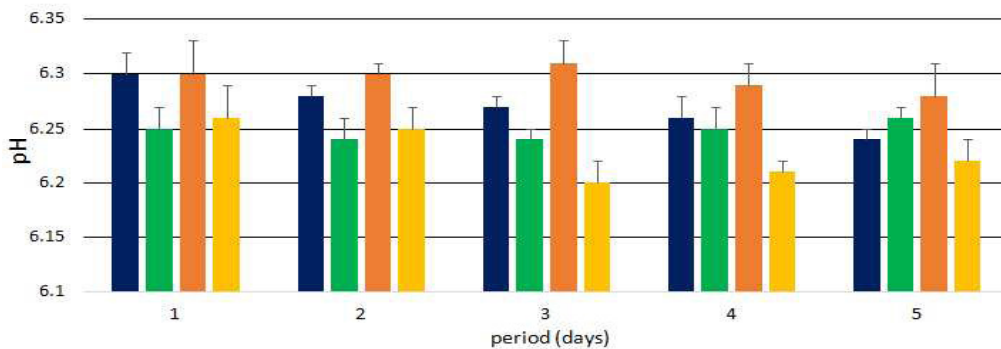


그림 다-5) 고상발효 균주조건별 1~5Day pH

(나) 액상발효 공정 설정

① 액상발효 최적 조건설정 시험 구분

- ㉠ 녹용추출농축액 40ml + Media 59ml + 유산균 접종(I20) 1ml
- ㉡ 녹용추출농축액 50ml + Media 49ml + 유산균 접종(I20) 1ml
- ㉢ 녹용추출농축액 60ml + Media 39ml + 유산균 접종(I20) 1ml
- ㉣ 녹용추출농축액 40ml + Media 59ml + 유산균 접종(M1) 1ml
- ㉤ 녹용추출농축액 50ml + Media 49ml + 유산균 접종(M1) 1ml
- ㉥ 녹용추출농축액 60ml + Media 39ml + 유산균 접종(M1) 1ml

- ㉔ 녹용추출농축액 40ml + 고상발효추출농축액 59ml + 유산균 접종(I20) 1ml
- ㉕ 녹용추출농축액 50ml + 고상발효추출농축액 49ml + 유산균 접종(I20) 1ml
- ㉖ 녹용추출농축액 60ml + 고상발효추출농축액 39ml + 유산균 접종(I20) 1ml
- ㉗ 녹용추출농축액 40ml + 고상발효추출농축액 59ml + 유산균 접종(M1) 1ml
- ㉘ 녹용추출농축액 50ml + 고상발효추출농축액 49ml + 유산균 접종(M1) 1ml
- ㉙ 녹용추출농축액 60ml + 고상발효추출농축액 39ml + 유산균 접종(M1) 1ml

## ② 생균수 측정

- 12번 조건에서 액상발효시 생균수가 가장 높았으며, 전체적으로 2일 차까지 증가하다 3일 차부터 감소하는 경향을 보였다.

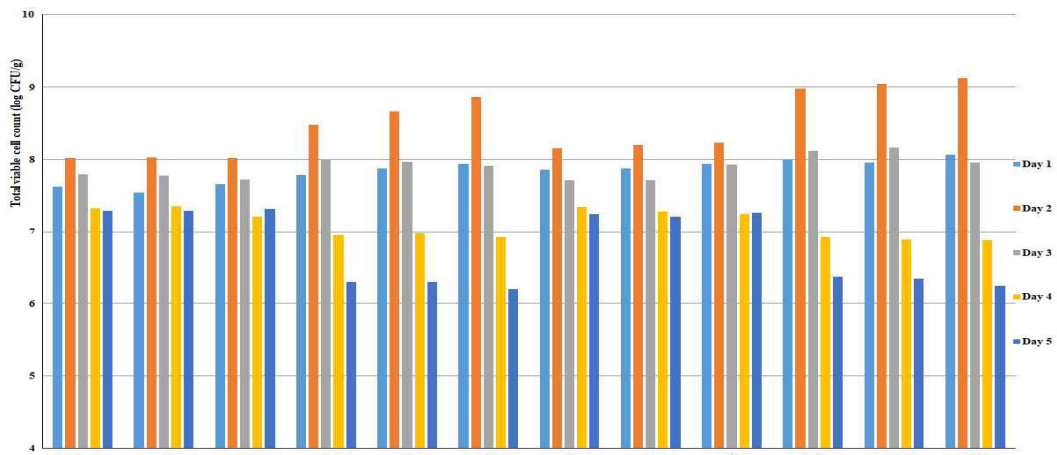


그림 다-6) 액상발효 균주 조건별 (1~5 Day) 생균수

## ③ pH 측정

- 전체적으로 2일차에 pH가 감소하였으면 이후 5일차까지는 크게 변화 없었다.

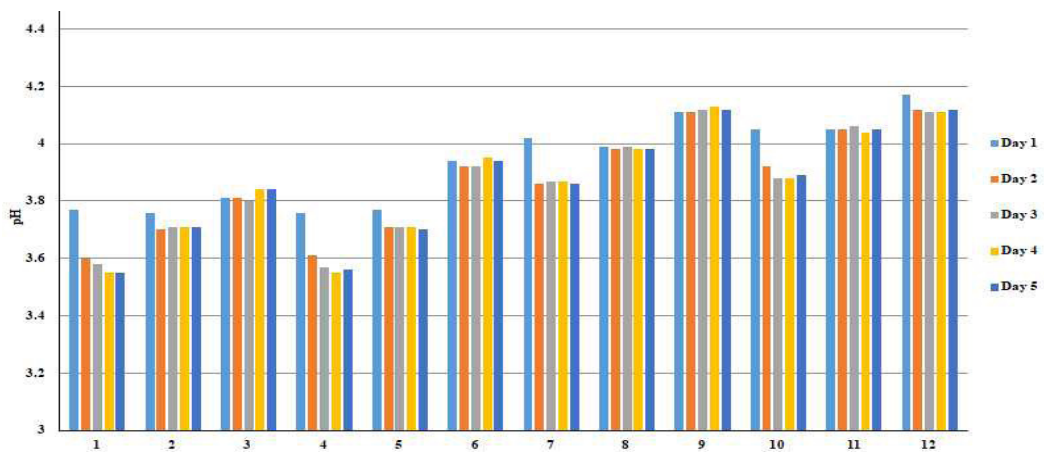


그림 다-7) 액상발효 조건별 (1~5 Day) pH 변화

#### (4) 유효성분 분석

##### (가) 고상발효 유효성분

① *Lactiplantibacillus plantarum* 단일균주 접종으로 발효시 유의적으로 유효성분이 증가하는 경향을 보였다.

■ 녹용 박 50g + *Lactiplantibacillus plantarum* 11ml+ Media 49ml

■ 녹용 박 50g + *Lactiplantibacillus plantarum* 5.5ml+ *Bacillus subtilis* 5.5ml + Media 49ml

■ 녹용 박 50g + *Lactiplantibacillus plantarum* 5.5ml + *Saccharomyces cerevisiae* 5.5ml + Media 49ml

■ 녹용 박 50g + *Lactiplantibacillus plantarum* 3.6ml+ *Bacillus subtilis* 3.6ml + *Saccharomyces cerevisiae* 3.6ml + Media 49ml

② Sialic acid 측정 결과 (면역증강, 피부미용)

- 전체적으로 3가지 균 접종시 Sialic acid 함량이 높게 나왔으며 다음으로 유산균만 접종시 Sialic acid 함량이 높았다.

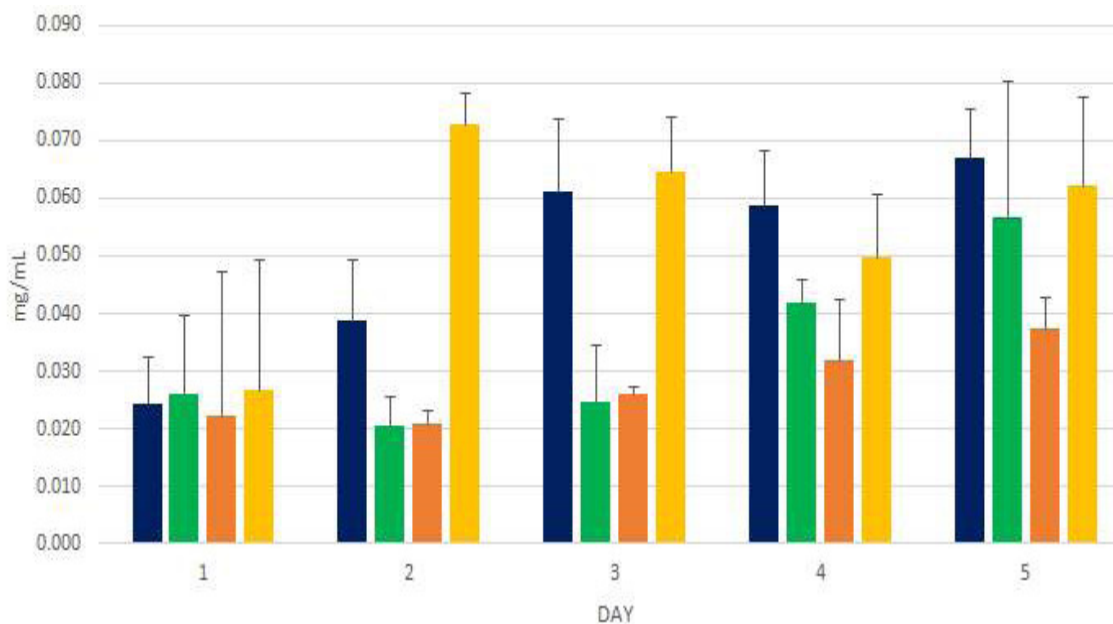


그림 다-8) 고상발효 조건별 (1~5 Day) Sialic acid 함량

③ Uronic acid 측정 (관절염 증상완화, 피부미용)

- 유산균 + 효모 접종 시 Uronic acid이 감소하는 경향을 보였으며, 유산균 접종 시 4일 차에 높은 값을 보였다.

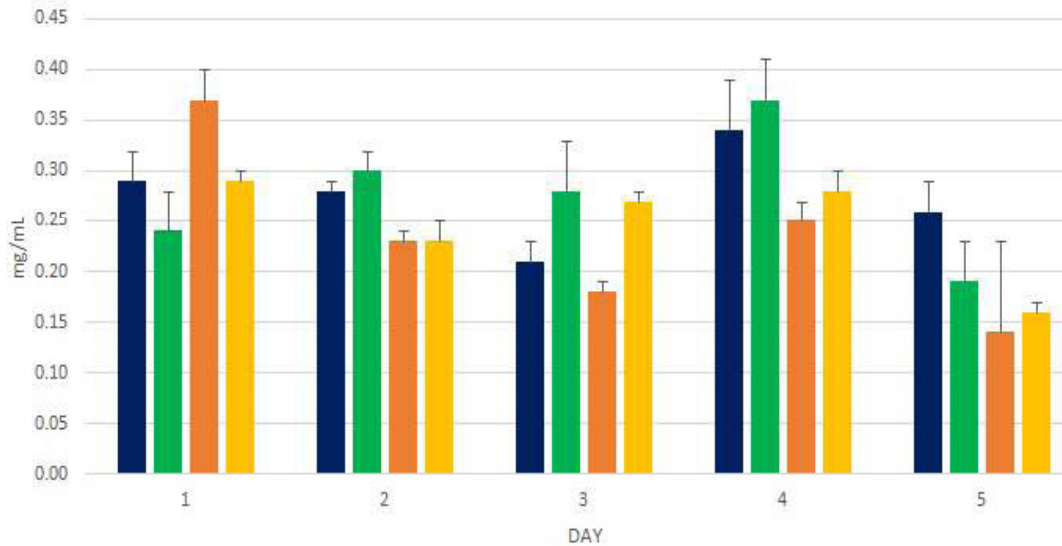


그림 다-9) 고상발효 균주 조건별 1~5Day Uronic acid 함량

④ GABA 측정

(뇌기능 개선, 정신 안정, 간 기능개선, 신장기능 활성화, 비만방지, 혈압 강하)

- 유산균 접종, 3가지 균 접종 발효 시 1~5일까지 GABA 함량이 증가하였다.

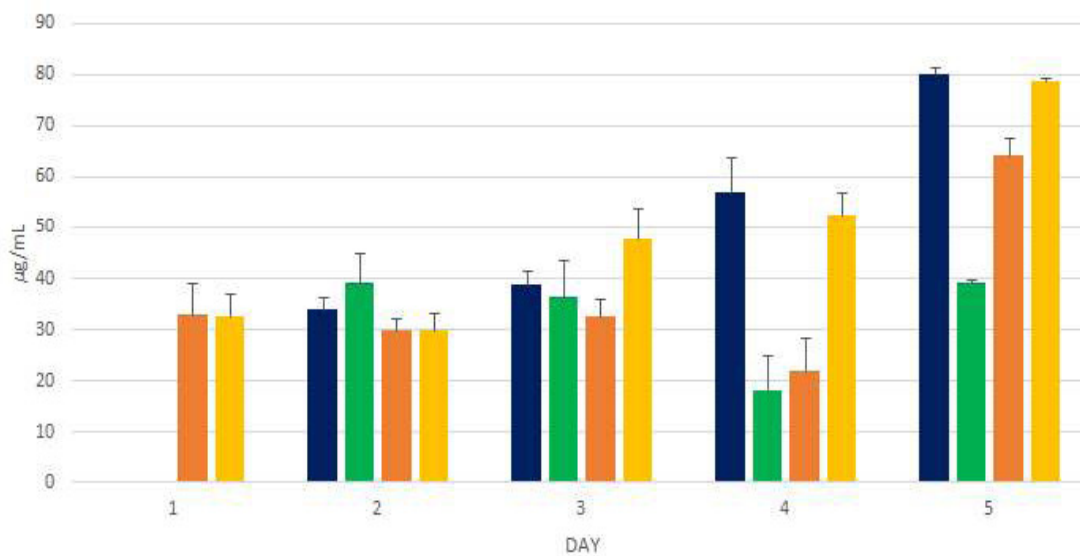


그림 다-10) 고상발효 균주 조건별 (1~5 Day) GABA 함량

(나) 액상발효 유효성분

① 액상발효 시험구 구분

- ㉑ 녹용추출농축액 40ml + Media 59ml + 유산균 접종(I20) 1ml
- ㉒ 녹용추출농축액 50ml + Media 49ml + 유산균 접종(I20) 1ml
- ㉓ 녹용추출농축액 60ml + Media 39ml + 유산균 접종(I20) 1ml
- ㉔ 녹용추출농축액 40ml + Media 59ml + 유산균 접종(M1) 1ml
- ㉕ 녹용추출농축액 50ml + Media 49ml + 유산균 접종(M1) 1ml
- ㉖ 녹용추출농축액 60ml + Media 39ml + 유산균 접종(M1) 1ml
- ㉗ 녹용추출농축액 40ml + 고상발효추출농축액 59ml + 유산균 접종(I20) 1ml
- ㉘ 녹용추출농축액 50ml + 고상발효추출농축액 49ml + 유산균 접종(I20) 1ml
- ㉙ 녹용추출농축액 60ml + 고상발효추출농축액 39ml + 유산균 접종(I20) 1ml
- ㉚ 녹용추출농축액 40ml + 고상발효추출농축액 59ml + 유산균 접종(M1) 1ml
- ㉛ 녹용추출농축액 50ml + 고상발효추출농축액 49ml + 유산균 접종(M1) 1ml
- ㉜ 녹용추출농축액 60ml + 고상발효추출농축액 39ml + 유산균 접종(M1) 1ml

② Sialic acid(면역증강, 피부미용)

- 전체적으로 *Lactobacillus sakei* 접종시 Sialic acid 함량이 높았다.

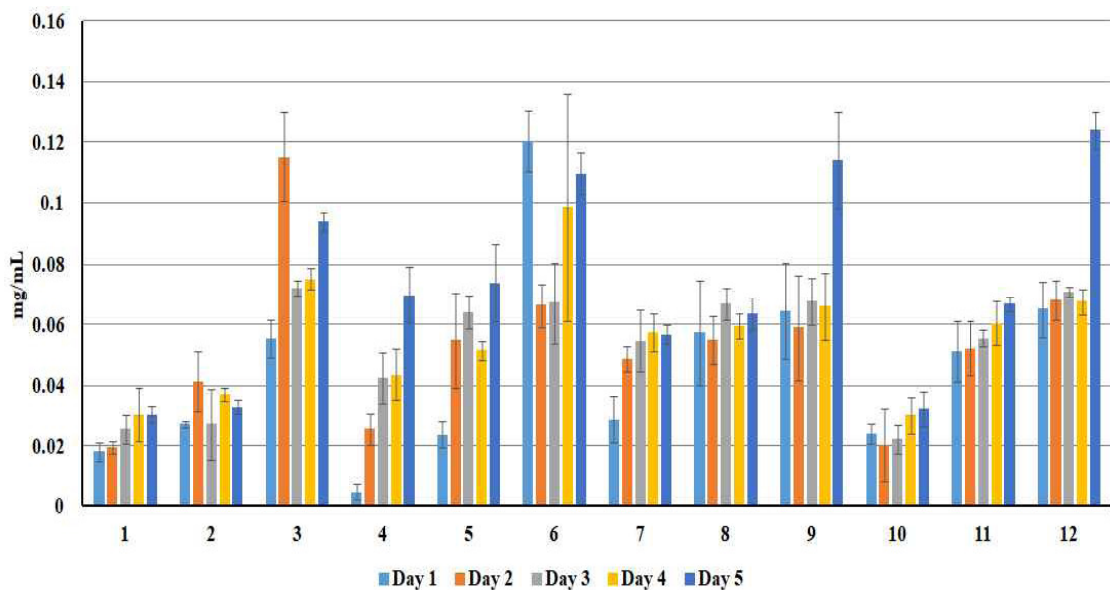


그림 다-11) 액상발효 균주 조건별 1~5Day Sialic acid 함량

### ③ Uronic acid 측정

(관절염 증상완화, 피부미용)

- Uronic acid 함량은 *Lactobacillus sakei* 접종 시 발효가 진행될수록 감소하는 경향을 보였다.

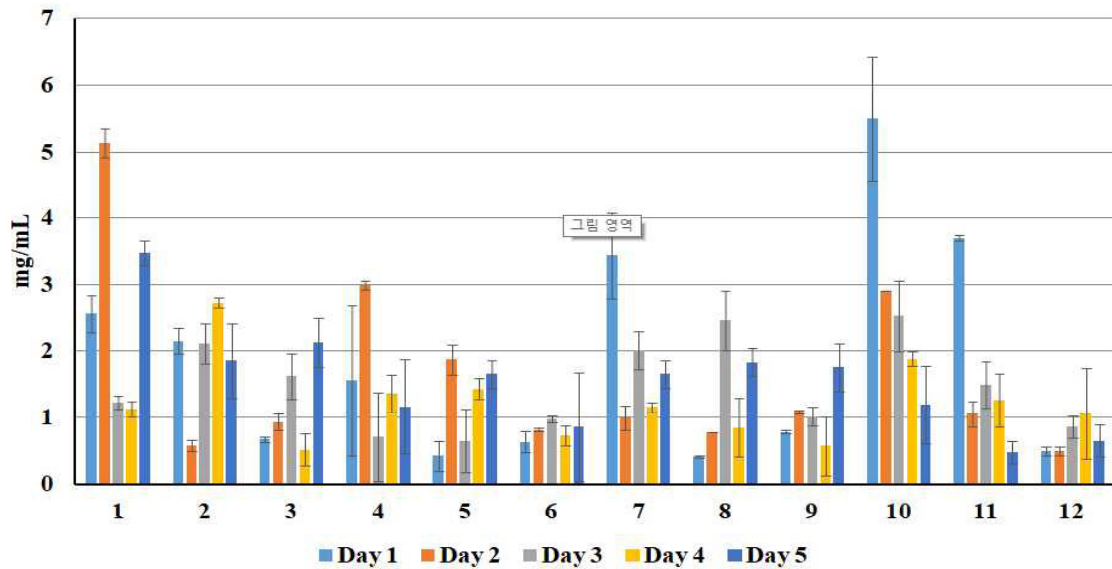


그림 다-12) 액상발효 균주 조건별 (1~5 Day) Uronic acid 함량

### ④ GABA 측정

(뇌 기능개선, 정신 안정, 간 기능개선, 신장 기능 활성화, 비만 방지, 혈압 강화)

- GABA 함량은 전체적으로 1일 차에 비해 발효가 진행될수록 소폭 증가하였다.

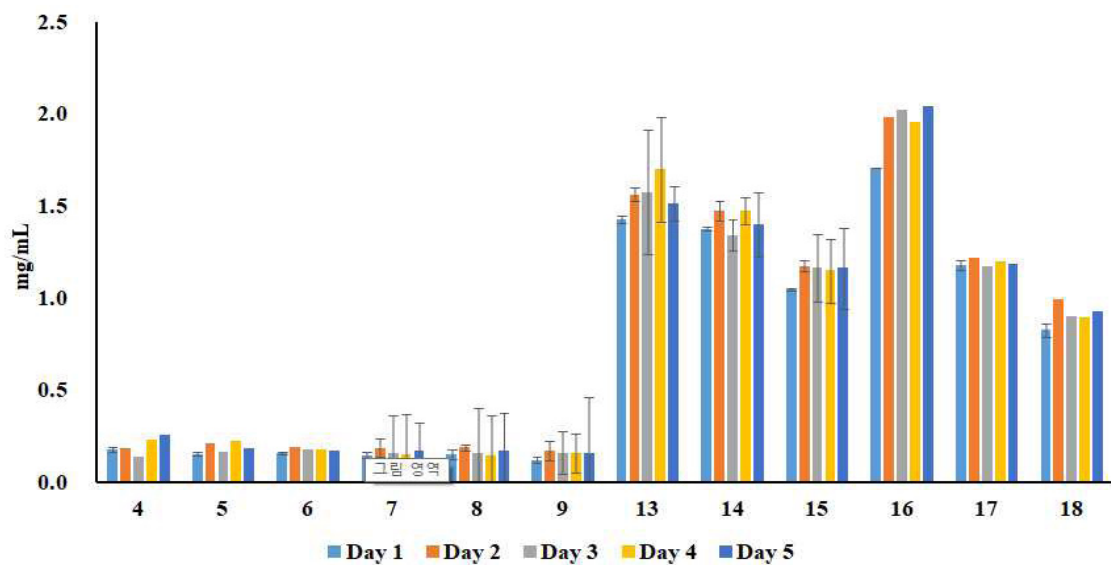


그림 다-13) 액상발효 균주 조건별 1~5Day GABA 함량

## (5) 발효 녹용의 분말 형태 시제품 제작

### (가) 발효녹용 시제품 제작

- ① 발효 원료 제조 공정
  - ㉞ 녹용박 고상발효 (발효, 추출, 농축)
  - ㉟ 녹용 농축액 액상발효 (발효, 추출, 농축, 동결건조, 분쇄)
- ② 발효 녹용 (분말 타입) 시제품 생산
  - ㉞ 원료혼합 (최적화 배합 2중)
  - ㉟ 스틱 포장

### (나) 녹용 박 고상발효

- ① 열풍건조(45℃, 1Day)
  - 고상발효시 최적 수분 조건설정을 위한 전처리
  - 열풍건조 후 수분함량 측정 결과 1.034g 중 수분함량은 3%



그림 다-14 ) 녹용박 열풍건조



그림 다-15) 녹용박 건조후 수분함량



## ② 고상발효(37℃, 5Day)

- 건조된 녹용 박을 멸균(121℃, 15min) 후 *Lactiplantibacillus plantarum* 후 10% 접종
- 고르게 혼합 후 균의 활성이 원활 하도록 배양 상자에 소분하여 발효(대량으로 한 번에 진행 시 균의 효율이 떨어짐)

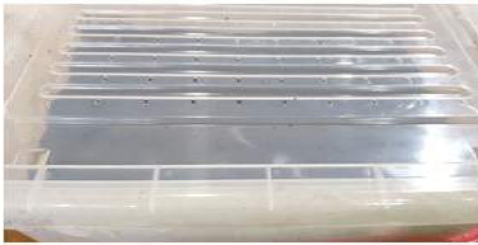


그림 다-16) 고상발효

그림 다-17) 고상발효 숙성 과정

## ③ 추출 및 농축

- 녹용 박 고상발효물에 20배수 물을 가하여 45℃, 3hr 추출 후 4.5Brix 이상 농축



그림 다-18) 고상발효 추출(좌) 및 농축(우)

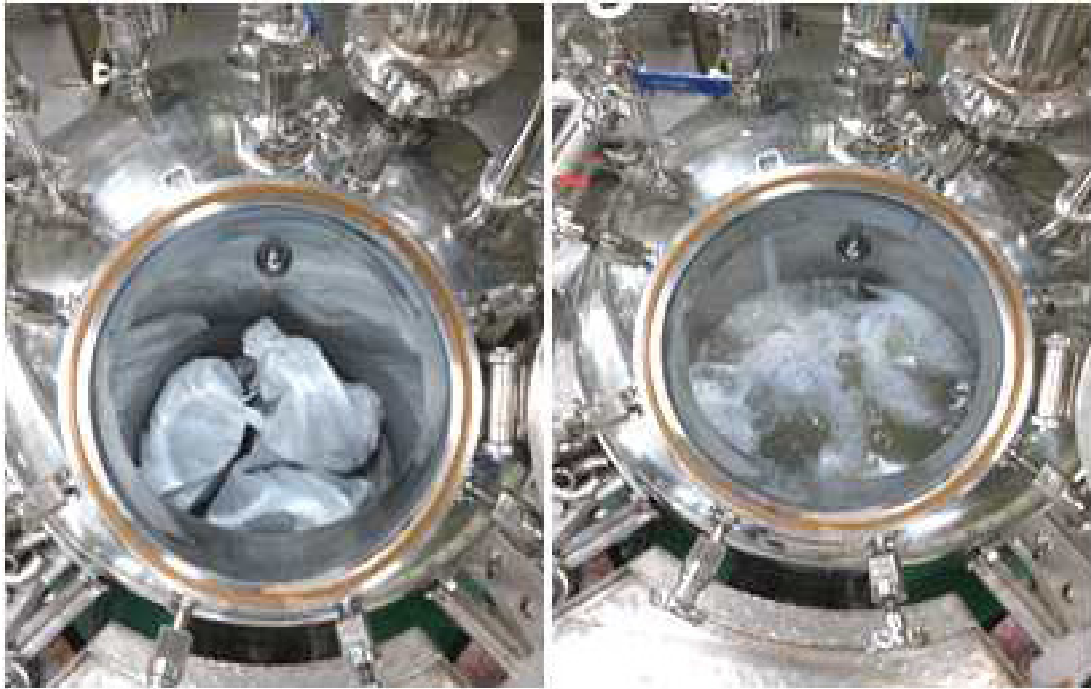


그림 다-19) 고상발효 추출용 원료 투입



그림 다-20) 고상발효 추출액 (좌, 고형분 0.3%) 및 농축액(우, 고형분 6.4%)

#### ④ 액상발효

- 녹용 박 고상발효 추출 농축액과 녹용추출 농축액을 혼합
- *Lactobacillus sakei* 1% 접종 후 37℃, 5Day 액상발효



그림 다-21) 액상발효 추출용 원료 투입

#### ⑤ 동결건조 및 분쇄

- 원활한 동결건조를 위해 액상발효물의 Brix대비 1:1 기준으로 말토덱스트린을 혼합
- 4Day 동결건조 후 동일한 입자가 되도록 분말화함



그림 다-22) 액상발효원료 동결건조 투입



그림 다-23) 액상발효 동결건조 브럭



그림 다-24) 계근 및 분쇄

### ⑥ 원료혼합

- 최종 시제품의 배합비에 근거하여 3g 기준으로 스틱포장
- 배합비 중 청포도 농축분말과 딸기 농축분말 2가지 유형으로 제작
- 배산법을 활용한 균일한 혼합(식품 조제 및 혼합시 일반적으로 사용하는 방법)
  1. 소량은 소량끼리 1차 혼합
  2. 대량으로 첨가되는 재료는 1차 혼합물에 소량으로 투합하며 혼합기를 사용하여 혼합

표 다-1) 발효 녹용 분말 시제품 배합비

재료	함량(%)
발효녹용분말	0.5
다니스코17종혼합유산균(200B)	1.5
유산균배양분말CIB001사균체/셀린바이오	0.1
자일리톨	1.0
포도당(무수결정포도당)	4.0
초유분말(미국)	1.0
크리마	10.0
청포도 농축분말 or 딸기농축분말	3.0
식물성크림혼합분말(3종혼합)/변경후	20.0
난소화성말토믹스트린(분말)	15.0
곡류혼합분말(19곡분말)	5.0
프락토올리고당/인도산/변경	36.0
효소처리스테비아(레바텐G180)	0.40
이산화규소	1.5
꿀 분말	1
합계	100 %

⑦ 원료혼합 : 혼합 원료의 스틱포장



그림 다-25) 발효녹용 분말스틱 시제품 제작 및 제품

(6) 대량생산 산업화를 위한 현장 기술 최적화

- 1차 추출(1차 발효 추출액 또는 녹용 추출액, 농협 생산)을 제외한 공정
- 추출, 농축, 여과, 고체상발효, 액상발효, 액상녹용의 분말화 등 가공 공정 단계별 최적화 및 산업형 현장 생산 공정 표준 구축



그림 다-26) 발효 녹용 공정도 (2차 고상발효 및 3차 액상발효)

## 라. 한국양토양륙 축산업협동조합 연구개발 내용 (협동 3)

### (1) 농협안심녹용 8단계 품질인증 시스템 구축 : 완료

#### (가) 농협안심녹용 품질인증시스템 개요

- 목적 : 녹용 수입업체와 일부 한의사들로부터 조장된 국내산 녹용에 대한 부정적 이미지 해소와 불신 해소를 위해, 국내산 녹용의 식품 안전보장 시스템을 구축 및 이로 인한 국내산 녹용의 소비 기반을 확충하기 위한 제도
- 개요 : 농협안심녹용 품질보증 시스템은 전북대학교(주관연구기관), 연세대학교(위탁연구기관)와 공동으로 추진한 사전 질병예방시스템을 기반으로 한국양토양륙농협에서 식품안전검사와 녹용생산이력제 등을 추가하여 만든 제도로, 양토양륙농협 이사회 승인과 농협중앙회 안심분사 (축산물도매분사)의 승인을 얻어 시행되는 제도로, 향후 국내산 녹용의 소비자 신뢰 확보 소비 촉진에 기여할 것으로 사료됨

#### (나) 농협안심녹용 8단계 품질관리 시스템

- ① 안심녹용 생산농가 : 농협안심녹용은 위생관리, 국가가축방역시스템, 식품안전, 품질인증제 준수를 약속한 조합원이 직접 생산한 녹용입니다.
- ② 주관농협 관리지도 : 조합은 안심녹용 생산농의 사양관리, 방역지도를 위하여 필요한 물품을 유무상으로 지원하고 있습니다.
- ③ 안심녹용 구매원칙 : 농협안심녹용 농가를 농협 직원이 현장 방문하여, 사슴사육 건강과 위생상태를 점검한 후 직접구매 합니다.
- ④ 안심녹용 품질검사 : 농협안심녹용은 열수세척 이후 보관하며, 안심녹용 프로그램에 의하여 식품안전검사와 품질검사를 합니다.
- ⑤ 안심녹용 승인심사 : 구매된 녹용 중에서 농협안심녹용품질심의위원회의 승인심사를 통과한 녹용만 농협안심녹용으로 사용됩니다.
- ⑥ 안심녹용 브랜드관리 : 농협안심녹용 제품은 자체검사 외에도 농협안심브랜드 관리기관에서 별도의 식품안전검사를 실시합니다.
- ⑦ 녹용생산이력제 운용 : 농협안심녹용 인증제품은 고유의 녹용생산 이력제 번호가 부여되며, 국민건강과 사고예방을 위한 식품회수프로그램을 운영하고 있습니다.
- ⑧ 고객, 고객사 지원 : 농협안심녹용은 고객만족 시스템을 구축하고 있으며, 기업에 대한 R&D지원과 기술을 지원하고 있습니다.



농협이 품질을 보증하는 축산브랜드  
농협안심농산물 품질보증시스템

59년 역사의 품격과 청정성을 담았습니다.

귀한 분께 드립니다

- [ 1 ] 농협안심농산물 품질보증 제도는 국가가축방역관리시스템과 식품안전관리에 동의한 조합원의 농산물만을 취급합니다.
- [ 2 ] 농협은 조합원을 대상으로 사슴 건강관리, 방역, 농산물채취, 절각 등 품질관리를 지도·지원하여 고품질 농산물 생산을 돕고 있습니다.
- [ 3 ] 농협안심농산물은 농협 직원이 직접 농가를 방문하여, 사슴 건강, 방역 위생을 철저히 점검하고 선별하여 수매를 합니다.
- [ 4 ] 수매된 농협안심농산물은 열수로 세척하고, 안심농산물 관리 프로그램에 의한 품질검사와 공인기관의 안전성 검증을 실시합니다.
- [ 5 ] 품질검사를 실시한 농산물을 대상으로 농협안심농산물심의위원회의 승인을 거쳐야 비로서 [농협안심농산물]로 인증 됩니다.
- [ 6 ] 농협안심농산물 가공 제품은 별도의 브랜드 관리 기관에서 추가적인 식품 안전검사를 실시합니다.
- [ 7 ] 농협안심농산물은 각각 생산이력번호가 있으며, 농협은 국민건강과 사고를 예방을 위한 생산이력제를 운영하고 있습니다.
- [ 8 ] 농협안심농산물은 고객만족과 농산물 원료 사용 기업에 대한 R&D지원과 식품안전 관리 프로그램을 운영하고 있습니다.

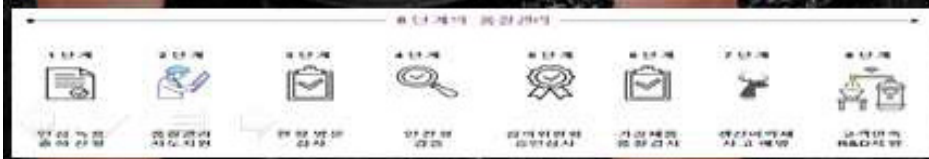


그림 라-1) 농협안심농산물 8단계 품질관리시스템 개요

(다) 농협안심녹용 생산 농가 심사 관련 시행 양식 4종

[별지 제1호 서식] <제정 2020. 11. 30.> [시행일 : 2021. 06. 01.] 한국양토양록농협

<b>20 년 농협 안심녹용 생산 농가 인증 신청서</b>	[ ] 농 장	안심녹용	[ ] 심사
	[ ] 작업장	생 산 자	[ ] 심사연장

접수번호	접수일	현장 확인	2021년 월 일
		추가 확인	2021년 월 일

조합원	영업허가(신고·등록)번호		영업허가(신고수리·등록)년 월 일	
	작업장(업소·농장) 명칭		전화번호	
안심 녹용 생산 농가	소재지	주소		
		농장[작업장]		
	대표자 성명		생년월일	
	관리 책임자		생년월일	
가축 사육 품종 또는 가공품의 유형				

본인은 질병발생시 국가가축방역통합시스템을 준수하며, 범농협가축방역표준행동 절차를 준수 할 것을 약속하며, 소비자가 안심하고 복용할 수 있는 건강한 녹용 생산을 위한 제반 사항을 준수 할 것을 약속합니다.

농협 안심녹용 생산 ([ ]농장, [ ]업소, [ ]작업장) 적합사업장으로 ([ ]심사, [ ]심사연장)을 신청합니다.

2021 년 월 일

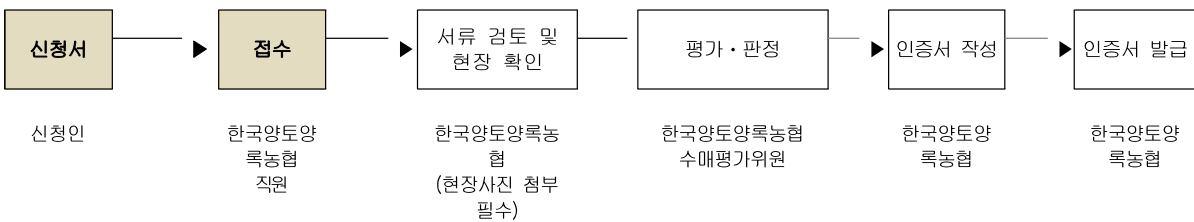
신청인 :

(서명 또는 인)

한국양토양록농협 조합장 귀하

첨부서류	신규 심사의 경우	가. 축산업(가축사육업) 허가증 (축산법 제22조제1항, 같은 법 시행령 제14조제3항 및 같은 법 시행규칙에 의한) 나. 농장·업소·작업장에 대하여 작성한 자체안전관리인증기준 (유/무) ([ ] 농장, [ ] 업소, [ ] 작업장)	수수료
	심사 연장의 경우	가. 가축사육 허가증, 영업 허가증 또는 신고필증 사본(농업인인 경우에는 축산업 허가증 또는 등록증 사본이나 그 밖에 가축을 사육하는 농업인임을 확인할 수 있는 서류) 나. 인증서 사본	조합원 없음

처리절차



210mm×297mm[백상지 80g/㎡]

그림 라-2) 농협안심녹용 생산농가 신청서



[별지 제2-1호 서식] <제정 2020. 11. 30.> [시행일 : 2021. 06. 01.] 한국양토양록농협

20 年 농협 안심녹용 생산 [ ] 농 장	확인자	위원회평가
인증 농가 현장 확인서 [ ] 작업장		[ ]적합 · [ ]부적합

접수번호	접수일	현장 확인일	2021년 월 일
		추가 확인일	2021년 월 일

안심녹용 생산농가 조합원 [ ]	영업허가(신고·등록)번호		영업허가(신고수리·등록) 년 월 일
	작업장(업소·농장) 명칭		전화번호
	소재지	주소	
		농장[작업장]	
	대표자 성명		생년월일
	관리 책임자		생년월일
	가축 사육 품종 또는 가공품의 유형		

사슴 사육 현황 전년( 두) : 당년( 두)	엘크		마록		기타( )		합계	
	성록	자록	성록	자록	성록	자록	성록	자록
(두)								
조합 출하 녹용 (개)								
조합 출하 중량 (Kg)								
사슴 건강 상태 (허약축)	없 음 : 우수 (농가) 1두 이하 : 지도 (관리) 2두 이상 : 중점 (관리)							
사양관리 기록	상(3)·중(2)·하(1)·미흡(0)							
먹이(급이)관리	상(3)·중(2)·하(1)·미흡(0)							
음용수 관리	상(3)·중(2)·하(1)·미흡(0)							
바닥, 분변 관리	상(3)·중(2)·하(1)·미흡(0)							

사육장 사진 (주의 : 허약 의심가축의 녹용은 반드시 사진 촬영 및 녹용 수매시 구분표시, 별도 보관 관리 조치)

(사진 1)

(사진 2)

처리절차

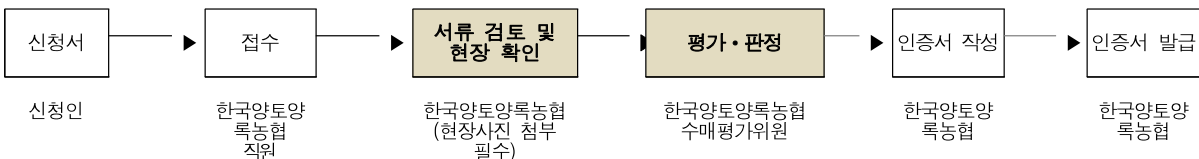


그림 라-3) 농협 안심녹용 생산 인증 농가 현장 확인서

[별지 제2-2호 서식(P.1)] <제정 2020. 11. 30.> [시행일 : 2021. 06. 01.] 한국양도양록농협

20__년 농협 안심녹용 생산농가 [ ] 농 장	확인자	위원회평가
녹용 수매 이력 확인서 [ ] 작업장		[ ]적합 · [ ]부적합

접수번호	접수일	수매 확인	2021년 월 일
		추가 확인	2021년 월 일

안심녹용 생산농가  조합원 [ ]	작업장(업소·농장) 명칭		전화번호
	소재지	주소	
		농장[작업장]	
대표자 성명		생년월일	

구 분	품 종 (특이사항)	이력 수매번호	등급 (중량 / Kg)				합계
			1등급	2등급	3등급	기타	
01							
02							
03							
04							
05							
06							
07							
08							
09							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							
합 계	중량						
	갯수						

그림 라-4) 농협 안심녹용 생산농가 녹용 수매 이력 확인서

## 농협 안심녹용 생산 농가 인증 확인서

접수 번호	접수일	현장 확인	2021년	월	일
		추가 확인	2021년	월	일

조합원 안심녹용 생산농가	영업허가(신고·등록)번호		영업허가 (신고수리·등록) 년 월 일			
	작업장(업소·농장) 명칭		전화번호			
	소재지	주소				
		농장[작업장]				
	대표자 성명		생년월일			
	관리 책임자		생년월일			
가축 사육 품종 또는 가공품의 유형						

사슴 사육 현황 전년(    두) : 당년(    두)	엘크		마록		기타(    )		합계	
	성록	자록	성록	자록	성록	자록	성록	자록
(    두)								
조합 출하 녹용 (개)								
조합 출하 중량 (Kg)								

상기 사슴농장은 가축질병발생시 국가가축방역통합시스템을 준수하며, 범농협가축방역표준행동 절차를 준수하여, 소비자가 안심하고 복용할 수 있는 건강한 녹용 생산을 위한 제반 사항을 지킬 것을 서약 농장입니다.

2021년 한국양토양록농협의 농협안심녹용 수매관리기준에 적합한 녹용을 생산하였으며, 농협안심녹용 수매관리 기준에 합격한 녹용을 생산한 생산농가임을 인증합니다.

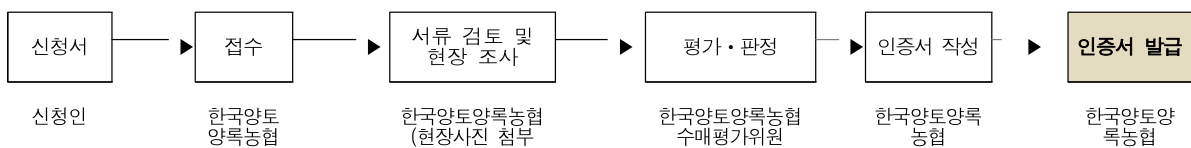
인증기간 : 2021. 06. 00부터 1년간

(2021년 06월 : 차기 년도 안심녹용생산 농가 인증심사일 이전까지)

2021 년    월    일

### 한국양토양록농협 조합장

#### 처리절차



210mm×297mm[백상지 80g/㎡]

그림 라-5) 농협 안심녹용 생산농가 인증 확인서

## (2) 농축산물을 혼합한 콜라보레이션 시제품 개발 및 제품화

- 목표 : 2개 제품
- 성과 : 4개 제품 (농협안심녹용 품질보증 시스템 적용, 출시제품 3종, 시제품 1종)

### 아이튼튼 녹용홍삼스틱 및 뷰티플러스 백수오녹용 콜라겐 스틱 “농협안심녹용 품질보증시스템” 이 적용된 신제품 2종 출시 - 어린이와 여성을 위한 농협안심녹용 제품 출시 -

- 농림축산식품부-농협중앙회 공동펀딩(역매칭) 연구개발사업 ‘농축산물안전유통소비 기술개발 및 제품화’ 연구과제를 통하여, ‘농협안심녹용 아이튼튼 녹용홍삼스틱’ 과 ‘농협안심녹용 뷰티플러스 백수오녹용 콜라겐스틱’ 이 개발되었다.
- 농협안심녹용 아이튼튼 녹용홍삼스틱은 출시 14일만에 완판 기록을 갖고 있는 히트상품으로, 전체 녹용 중 두뇌 건강과 성장발육에 도움이 되는 강글리오사이드, IGF-1 성분이 많은 분골 상대 비율이 33%이상 된다. 또한 엄마의 마음을 담아 합성색소, 합성향료가 없는 오로지 천연으로 만들었으며, 천연과일 맛과 향기에 어린이 충치 예방을 위해 자일리톨을 함유하고 있다.
- 농협안심녹용 뷰티플러스++ 백수오녹용 콜라겐스틱은 동서양 미인 양귀비와 클레오파트라가 미모를 가꾸기 위해 사용했다는 ‘백수오’ 와 ‘석류’ 및 녹용이 주원료이며, 여성 이너뷰에 도움을 주는 타트첼리, 콜라겐, 히알루론산, 엘라스틴으로 여성 호르몬의 균형과 호트리진 피부의 균형을 동시에 맞춰주는 제품이다.
- 특히 본 연구과제를 통하여, 국내산 녹용의 가축질병(CWD)의 사전 차단을 위한 검사 방법을 세계 최초로 개발하였으며, 녹용안심이력제를 포함한 “농협안심녹용 8단계 관리시스템”을 구축하였다. 이 연구를 2가지 제품에 반영하였다. 본 연구는 향후 소비자의 신뢰성 향상과 국내산 녹용 소비에 큰 역할을 할 것으로 크게 기대되고 있다.



농협안심녹용

아이튼튼 녹용홍삼스틱

품목제조번호 19860435013-10592



농협안심녹용

뷰티플러스 백수오녹용콜라겐스틱

품목제조번호 19860435013-1132

그림 라-6) 아이튼튼 녹용홍삼스틱, 뷰티플러스 백수오녹용 콜라겐스틱 제품 출시 내역

**농협안심녹용 녹용백수오 혼합농축액 출시 및 발효녹용 스틱 출시 예정**  
**농협안심녹용 품질보증시스템이 적용된 B2C 전용 상품 출시**  
**- “녹용 백수오 혼합농축액” 및 발효녹용홍삼 제품 출시 예정 -**

- ‘농협안심녹용 녹용백수오 혼합농축액’ 은 녹용+백수오+당귀를 1:1:1로 혼합하여 추출한 원료로, 특히 과거 이슈가 되었던 이엽우피소 문제 해결 및 백수오에 대한 소비자 신뢰를 확보하기 위하여, 유전자 검사 확인된 원료만을 사용한 것이 특징이다. 이 원료는 갱년기 여성과 기력이 약화된 시니어 제품 개발에 사용되는 원료로, 동종 유사 원료 공급사 대비 가격 경쟁력이 높다.
- ‘농협안심녹용 발효녹용’ 은 본 연구과제의 3단계 발효 녹용 제품을 원료로 하여, “발효 녹용홍삼 제품” 과 “발효 녹용분말 스틱(전북바이오융합산업진흥원)” 시제품을 만들었으며, 발효를 통하여 녹용 고유의 기능성 성분을 증대하였으며, 특허균주를 통하여 항노화 기능성까지 기대할 수 있는 기능성 보조식품으로 상품화 될 예정이다. 시제품이므로 향후 시장성을 감안, 추가적인 연구 개발이 필요할 것으로 보인다.

			
<p align="center"><b>농협안심 녹용</b></p> <p align="center"><b>녹용 백수오 혼합농축액</b></p>		<p align="center"><b>농협안심 녹용</b></p> <p align="center"><b>발효녹용홍삼 액상분말(상, 좌), 발효녹용 분말스틱(우)</b></p> <p align="center"><b>시제품</b></p>	
<p>제품명: 농협안심녹용 녹용 백수오 혼합농축액</p> <p>식품의 유형: 추출기능식품 (레포트식/알균제품)</p> <p>원재료명 및 함량: 정제수, 녹용 12.5% (동결건조녹용 100% 국내산), 백수오 12.5% (국내산), 당귀 12.5% (국내산)</p> <p>고형분: 18.0% 이상 내 용 량 1kg (580kcal)</p> <p>제조원: (주)신영에이치에스 충북 제천시 바이오밸리로 67</p> <p>판매원: 농협경제지주주식회사 안심축산분사 / 서울 서대문구 충정로 60 한국양도양목농협 / 서울 경진구 영화사로 24 Tel: 02-488-4343</p> <p>포장재질: 폴리프로필렌 (내면)</p> <p>품목보고번호: 200804351681150</p> <p>유통기간: 별도표기일까지</p> <p>반품및교환: 구입처 및 판매원</p>	<p>영양정보: 총내용량 100g, 58kcal</p> <p>총내용량: 1일 영양성분 기준치에 대한 비율</p> <p>나트륨 62mg 3%</p> <p>탄수화물 8g 2%</p> <p>당류 4g 4%</p> <p>지방 0g 0%</p> <p>트랜스지방 0g 0%</p> <p>포화지방 0g 0%</p> <p>클레스테롤 0mg 0%</p> <p>단백질 6g 11%</p> <p>1일 영양성분 기준치에 대한 비율(%)은 2,000kcal 기준이므로 개인의 필요 열량에 따라 다를 수 있습니다.</p>	<p>· 이 제품의 백수오 원료는 한국양도양목농협에서 “공인기관 유전자검사에서 합격된 원료”만을 사용하였습니다. · 혼합농축액 배합비율 = 녹용 : 백수오 : 당귀 = 1 : 1 : 1</p> <p>· 이 제품은 메밀, 고등어, 복숭아, 참, 호두, 토마토, 쇠고기, 알류, 우유, 밀, 대두, 아황산류, 돼지고기, 새우, 땅콩, 계, 오징어, 닭고기, 조개류(굴, 바지락, 홍합), 한약재 등을 사용한 제품과 같은 제조시설에서 제조하고 있습니다. · 이 제품은 공정거래위원회 고시 소비자분쟁해결기준에 의거 교환 또는 보상받을 수 있습니다. · 부정·불량식품신고는 국번없이 1399</p>	
<p align="center">농협안심 녹용</p> <p align="center"><b>녹용 백수오 혼합농축액</b></p> <p align="center">품목제조번호 20090435168-1150</p>			

그림 라-7) 백수오녹용 혼합농축액 출시 제품 및 발효녹용 시제품

### (3) 국내 녹용 유통과정중 품질저하 방지 전처리 및 저온 숙성발효 기술

#### (가) 발효녹용 원료의 품질 규격 및 선발

- 2019년 기준 국내 녹용 원료 소비시장은 약 630억원 374.7톤으로 녹용을 소비하는 세계 20여 개 국가 중에서 우리나라는 중국 다음으로 세계 2번째로 녹용을 많이 소비하는 국가이다. 국내에서 한약제로 유통되는 수입 녹용은 뉴질랜드산(레드디어), 러시아산(엘크)이 주종을 이루고 있으며, 2019년 녹용 수입량은 306톤(523억원)이 수입되고 있으며, 국내산 녹용은 약 68.6톤이 생산되고 있으며, 엘크(대형종)가 47.0톤, 매화록(소형종)이 18.5톤이 생산되고 있다.
- 녹용은 사슴종(대록 *Cervus canadensis* 및 마록 *Cervus elaphus* 등)의 숫 사슴이 계절적 영향(일조량이 단일에서 장일로 전환)을 받아 매년 낙각 된 이후 새로운 뿔이 완전히 성장하기 전에 채취한 어린 연골 조직을 의미하며, 아직 골질화가 되지 않았거나 약간의 골질화가 된 연한 사슴의 뿔을 잘라 말린 것을 지칭한다.
- 녹용의 기질은 부드럽고 연약하며, 녹용의 표면은 부드러운 털로 뒤덮여 있고, 녹용의 내면은 사슴의 피로 채워져 있으며, 성장단계에서 완전한 석회화가 진행되기 이전을 말한다.
- 일찍 절각된 녹용 조직은 아미노산, 폴리펩티드, 인지질 및 성장인자 등이 풍부하게 존재한다 (김동교 등 2021). 녹용은 많은 기능성 연구 보고서를 기반으로 의료, 식품 보충제 및 건강 증진 제품으로 다양하게 이용되고 있으며, 동의보감과 본초강목에 따르면, 녹용은 강장, 보혈, 강정, 진통, 조혈, 생장발육, 기능향진 및 몸의 기력을 북돋고 뇌 기능을 강화하며, 뼈와 근육을 튼튼하게 하는 것으로 알려져 있다.
- 사슴 중대형종은 계절성 번식 특징을 갖는다. 이러한 특성으로 인하여 녹용은 연간 일조시간이 최고점에 도달하여 IGF-1등 성장 인자가 가장 높은 하지 시기를 녹용의 최적 절각 시점 기준으로 한다.
- 녹용의 부위는 최 성장점을 기준으로 턱·분골·상대·중대·하대·녹각의 상태로 구분하고 있으며, 턱에서 녹각으로 진행될수록 유용성 기능 물질의 현저한 감소가 발생한다 (이부용 등, 2003).
- 이러한 녹용의 사용 용도는 녹용 추출액을 활용한 건강식품이 주종을 이루고 있으며, 파우치, 스틱, 분말, 액상 분말 제품으로 활용되고 있으며, 최근, 다양한 발효 녹용 가공제품의 수요가 늘어나고 있다.
- 그러나, 발효녹용 원료로 사용하고 있는 녹용의 품질(골질화, 노화 상태, 부위에 따른 품질 차이)에 따라 효능의 차이가 현저하므로 이에 대한 각별한 주의가 요구되고 있다.

- 품질이 떨어지는 등외 등급의 녹용(늦게 절각한 녹용) 및 녹각(사슴 뿔의 성장물질이 없어 대부분 골질화된 오래된 녹용, 숫사슴 뿔같이 할 때 저절로 떨어지는 뿔)을 활용한 발효 방법은 대조구(녹각)와 비교할 때 발효 효과가 있다고 하나, 녹각의 발효는 품질 좋은 녹용(녹용 고유의 기능성 유용성분이 높은 1등급 녹용 및 분골 상대 부위)과의 비교시 근본적으로 녹용 고유성분의 저하가 있을 수 밖에 없다.
- 국내산 대형종(대륙, 엘크)의 경우 하지 이후 녹용의 급속한 성장과 골질화가 진행되어 생산량은 높으나, 녹용 고유 기능성 유용성분의 저하가 발생한다. 이런 생리학적 관점에서 볼 때, 품질이 낮은 녹용(녹각, 오래된 녹용, 하대 부위)의 발효는 균주의 기능성에 따른 프로바이오틱 효과를 기대할 수 있으나, 근본적으로 녹용 고유의 기능성 물질이 결여를 가져올 수 있다.
- 따라서 발효 녹용의 일정한 품질 유지를 위한 발효 녹용 원료의 선발 기준이 적용되어야 하며, 발효 녹용 생산 이전에 발효 녹용의 이후의 최종 품질을 예측할 수 있도록 녹용 원료 투입기준이 필요하다.
- 한국양토양록농협은 전체 연구과제에 필요한 국내산 녹용 원료를 공급하였으며, 전체 연구에 동일한 품질의 녹용이 유지되도록 하였다. 동일한 사슴 품종, 동일한 녹용 품질 등급, 동일한 부위의 규격과 선발을 통하여 예측 가능한 품질을 유지하였으며, 이러한 발효 녹용에 사용된 선발 기술은 다음과 같은 특징을 갖는다.
- ㉠ 한국양토양록농협에서는 이러한 녹용의 품질을 뿔의 성장 정도, 절각 시기, 중량 및 녹용의 노화 상태에 따라 1등급에서부터 4등급으로 구분되며, 비정상적인 제품은 등외 등급으로 구분한다.

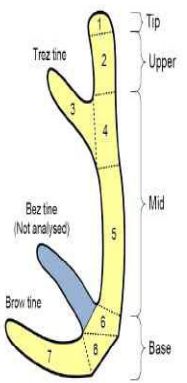

등급	수매 등급 규격 (2019년도)	수매가격	비고
1 등급	- 중량 0.5kg이상(1개 기준) 4지 분봉(각관분지)이 5.0 cm이내 상대 부분 발육 상태 매우 양호한 것	12,000원	
2 등급	- 중량 6.5kg이상(1개 기준) 4지 분봉(각관분지)이 7.5 cm이내 상대 부분 발육 상태 매우 양호한 것	11,000원	
3 등급	- 중량 3.5kg이상(1개 기준) 4지 분봉(각관분지)이 7.5 cm이내 상대 부분 발육 상태 매우 양호한 것	10,000원	
등외	1등급 ~3등급 이외 녹용	8,000원	
			

그림 라-8) 한국양토양록농협 국내산 녹용 수매기준

- ㉡ 일일 일조량이 최고점에 도달하여 IGF-1등 성장인자가 가장 높은 하지 시기를 녹용의 최적 절각 시점 기준(80일)으로 좋은 품질의 우수 등급 녹용을 원료 투입 기준으로 적용하도록 하였다.

- ㉔ 한국양토양육농협은 외형상 제4지 원지 분봉이 벌어지지 않는 시점을 1등급으로 평가하고, 절각 시기가 늦어져 제4지 각관 분지가 길어질수록 2~4등급으로 평가한다. 4지 이내이나 정상적인 엘크 형태를 벗어난 녹용은 등외이며, 5지 이상은 수매를 하지 않는다.
- ㉕ 발효 녹용과 관련된 연구기관에 공급된 국내산 녹용 원료는 2등급을 기준으로 하였으며, 기름분골, 분골, 상대, 중대, 하대의 전체 부위를 가공한 전 녹용을 기준으로 공급하였으며, 녹용 개체별 부위별 차이에 따른 품질차이 및 유용성분의 편차를 최소화하기 위하여 1회 가공 수량을 80벌 이상 가공하여, 공급 원료의 생리활성 물질이 일정하도록 하였다 (n=80).
- ㉖ 국내산 녹용과 수입 녹용(러시아 및 뉴질랜드)과의 비교를 필요한 분석에 공급된 원료 부위는 분골, 상대 부위를 기준으로 하였으며, 녹용 개체별 품질 편차를 최소화하기 위하여 40샘플 이상에서 수집된 녹용을 원료를 기준으로 공급하였다.

생녹용 열수 세척	열수 세척후 모습	분골상대 측정
		
분골 상대 생녹용	생녹용 절편화 작업	생녹용 절편
		
일반 건조 녹용	건조 녹용	건조녹용 절편
		

그림 라-9) 연구용 원료 공급용 생녹용 및 건녹용 작업





그림 라-10) 연구용 숙성 및 동결건조 작업

### (나) 품질 저하 방지를 위한 LTLT 저온 숙성 발효 동결건조 기술 개발

- 각종 품질에 영향을 미치는 첫 번째 원인은 냉동저장 유통 방법이다.
- 국내 상당수의 일반 사슴 농가는 급속동결 시설이 부족하며, 이로 인하여 녹용이 완전한 동결이 진행으로 인한 녹용의 최대 빙결정 생성대(  $-1^{\circ}\text{C}$  내지  $-5^{\circ}\text{C}$ , 빙결률 80%) 통과 시간이 길어짐으로서, 큰 얼음결정과 녹용 조직의 수분 빙결정화가 발생한다.
- 완전 냉동으로 공극이 확장된 녹용의 공극의 외벽에는 염류와 금속이온과 유기산이 농축되어 붙어 있으며, 이로 인하여 기존의 관행적인 열풍건조 방법이나 전통적인 한약재 추출 방법을 사용시 녹용 고유성분의 불용성 증가와 생산수율 감소가 진행될 수 있다.
- 이로 인한 염류와 금속이온과 유기산 등의 농축으로 인하여 공극화 증가 현상이 발생한다 (그림 라-9 좌측 사진).

- 이러한 건조 녹용 절편 가공시 공극화 증가 현상은 한의사 또는 소비자에게 저품질 녹용으로 오해할 수 있는 원인을 제공하여, 비호감 원인이 될 수 있다. 이러한 영향으로 핵산 물질, 유리 아미노산 등의 유용성 정미 성분의 감량이 발생할 수 있으며, 완만하게 냉동된 녹용은 2에서 5%의 수율 저하가 발생하기도 한다(그림 라-10 좌측 그림, 국내산 슬라이스 건조 녹용).
- 따라서 완만 냉동 녹용의 불용성 최소화 및 발효 녹용의 일정한 품질 유지를 위하여 공극 외벽에 붙어 말라버린 유기물질이 정상적으로 잘 용해될 수 있도록 제조 공정의 변화 시 필요하다.

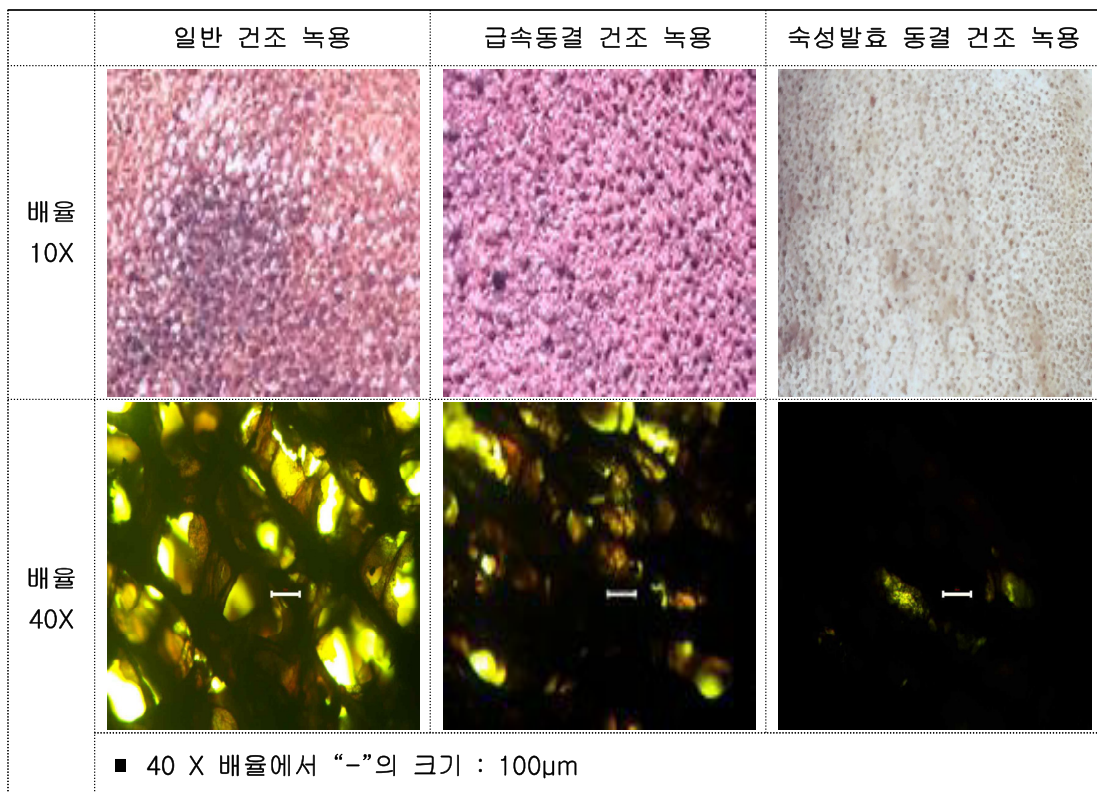
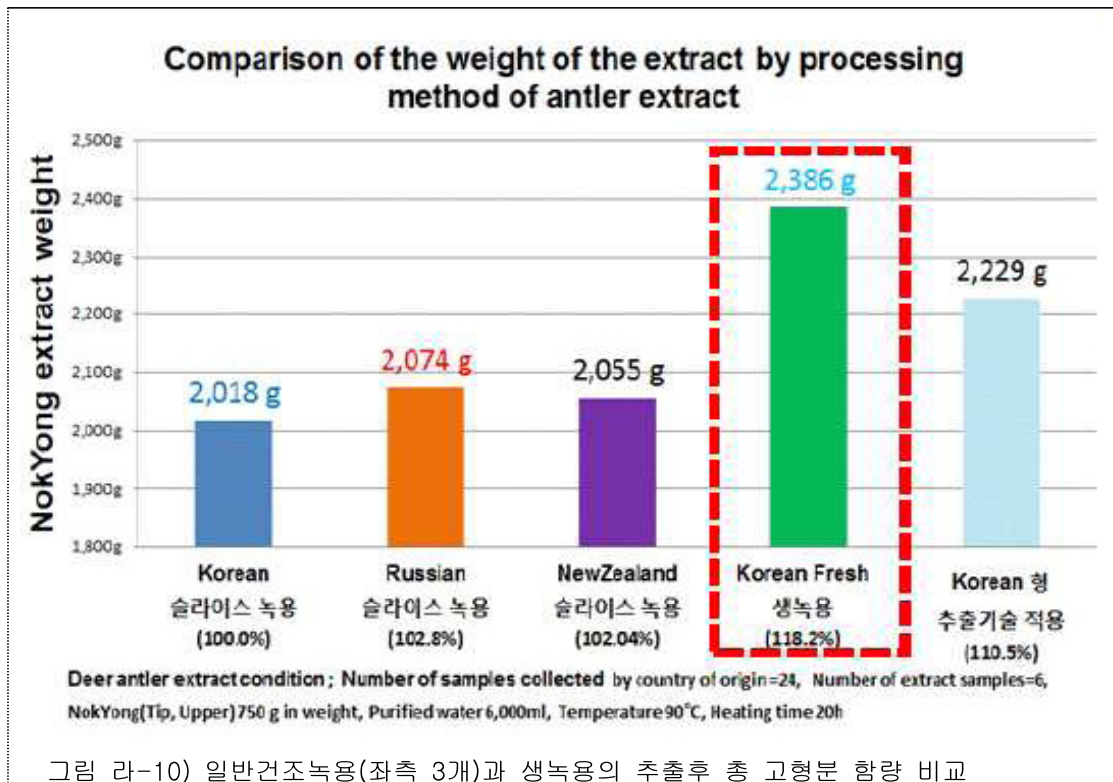


그림 라-9) 완만한 냉동 저장 녹용의 건조시 슬라이스 녹용 절단면 공극화 비교

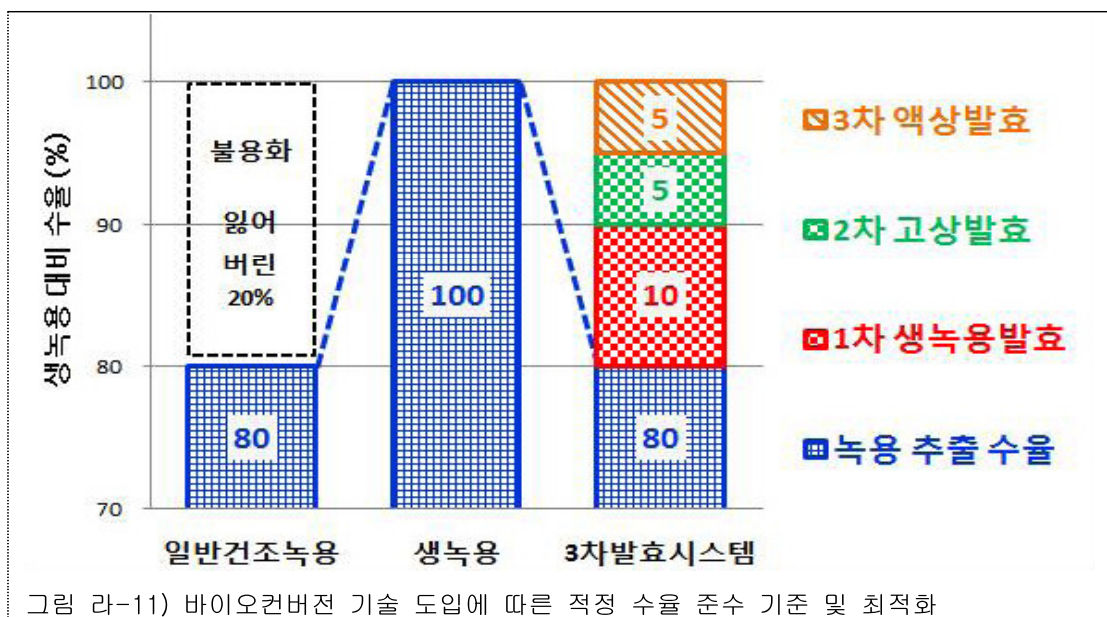
- 두 번째 원인은 가공중 발생하는 물리화학적 변성으로 인한 품질의 저하다.
- 동물성 단백질과 조직은 65℃ 이상에서 변성과 불용화가 진행된다. 기존 전통적인 녹용의 추출 가공은 워터쿠킹 ⇒ 열건조 ⇒ 온풍건조 ⇒ 건조 녹용(원지)의 유통기간중 충격 ⇒ 슬라이스 ⇒ 건조의 과정을 ⇒ 소주 및 알콜 주입을 거친다.
- 일반건조 녹용은 생녹용에 비하여, 총 단백질 함량의 감소, 필수아미노산의 감소, 유기물질의 감소로 이어지며, 열수 추출 후 총고형분은 18~20%의 감소가 발생한다.

- 이렇게 여러 차례의 물리화학적 충격으로 인한 변성은 녹용 고유 유기 성분의 변성과 불용화의 원인이다.
  - 생산수율의 감량은 총 핵산물질 함량, 총 유리 아미노산 함량 등의 유용성 정미 성분의 감량으로 이어진다.
  - 따라서 한국양토양록농협은 조합원에게 구매된 일부 완만 냉동 녹용의 불용성을 최소화하기 위하여 녹용 숙성 방법을 연구하였으며, 과제에 필요한 국내산 녹용 원료 공급에 적용하여, 동일한 품질의 녹용이 유지되도록 하였다. 이러한 발효 녹용에 사용된 의 선별 기술은 다음과 같은 특징을 갖는다.
- ㉔ 한국양토양록농협에서는 국내산 녹용의 완만 냉동녹용 문제점 개선 및 녹용 고유의 유기물질의 불용화를 최소화하고, 기능성 유효성분의 증가와 수율 획득을 위하여, 해동·숙성·동결건조 가공과정과 저온 장시간(LTLT) 방법을 개발하였다.
  - ㉕ 다른 연구에서 동결 건조 녹용은 가열처리 녹용보다 생리활성물질 및 추출 수율이 높다고 하였으며(LJ Ke et al., 2008 ; L Jun et al., 2011), 동결 건조 방법으로 건조된 슬라이스 녹용 단면은 일반 건조 녹용에 비하여 공극이 줄어들었으며(그림 라-9 중앙), 추출 후 고형분 수율도 함께 증가하였다(그림 라-10 우측).



(다) 수율 향상을 위한 각 단계별 공정 최적화 및 바이오컨버전 기술 도입

- 옛부터 전통적으로 약탕기를 사용한 한약의 추출 방법은 한약재를 먼저 추출하여 먹은후(1차 추출), 남은 약제 2봉을 말려 다시 재탕하여 사용하여 왔다(2차 추출). 전통 약리학에는 1차 추출 후 남아 있는 약제에도 상당한 약리 물질이 있다고 판단하였다. 이러한 개념을 바이오컨버전스 기술 도입하였다.
- 하지만 현대 과학은 수율(고형분 함량 기준)을 60~80%까지 높일 수 있다. 이렇게 과도한 수율 중심 추출시, 녹용 고유 기능성 물질의 저하가 발생할 수 있다. 따라서 본 기술의 수율 증가는 건조녹용의 불용화로 인하여, 생녹용 추출 수율 대비 20% 감소되는 범위 이내에서 수율 증량 한계점을 설정하여 운용 하였다(그림 라-11).



- 즉, 건조 녹용의 불용화로 생녹용 대비 18~20% 감량 발생 부분의 정상적인 녹용의 최대 수율로 보았다(그림 라-11).
- 한국양토양록농협은 LTLT 저온 장시간 숙성 발효 동결건조 기술을 통하여, 3차 발효 불용화로 손실된 20%을 확보는 수율 증대 기술을 개발하였으며, 20% 증가한 수율임에도 불구하고,
- 녹용 고유의 지표성분으로 알려진 ㉠글리코사미노글리칸 (Glycosaminoglycan, GAG), ㉡우론산 (uronic acid, N-acetylneuraminic acid), ㉢감마아미노부티르산 (gamma-aminobutyric acid, GABA) 및 ㉣시알산 (sialic acid, N-acetylneuraminic acid)의 증가 (전주대학교 및 전북바이오진흥원 연구) 및 항노화 항균 활성화 기능을 가져온 기술을 바탕으로 특허를 추진했다 (출원 내역 10-2021-0166105 ; 접수번호 1-1-2021-1372683-74).

- 발효녹용에 활용한 균주는 “식품의약품안전처 식품안전나라”에 제시된 “식품에 사용할 수 있는 원료”의 미생물균주를 선별하여 사용하였다. *Lactobacillus brevis*와 *Lactobacillus sakei*는 식품 원료로써 활용하는데 제한사용기준이 없고, 또한 식약처에서 고시된 19종의 프로바이오틱스인 *L. plantarum*와 *L. rhamnosus*가 포함되어 있다.
- 이러한 기준에 따라 전주대학교와 서울대학교 공동연구를 통하여 보유균주 및 신규 분리균주 중 김치와 유아 분변에서 분리한 균주인 *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*를 포함한 유산균주 150개를 대상으로 내산, 내담, 부착능 실험을 통과한 균주들 중에서 *C.elegans* (Caenorhabditis elegans) 모델에서 수명 연장에 도움을 줄 수 있는지 평가하였다. 이 중 17개의 균주를 선별하였으며, 아래 3종의 균주를 국립농업과학원에 특허 미생물을 기탁하였다.
  - Ⓐ *Lactobacillus rhamnosus* JLFRLR04 (수탁증 번호 KACC92399P)
  - Ⓑ *Lactobacillus sakei* JLFRLS07 (수탁증 번호 KACC92398P)
  - Ⓒ *Lactobacillus plantarum* LP20B49 (수탁증 번호 KACC92397P)
- 특이하게도, 발효녹용 균주는 각 발효 방법 (고상발효, 액상발효) 및 단계별 녹용 원료 품질 상태(녹용등급, 부위, 원료상태, 각질화 등)에 따라 발효 녹용에 적합한 최적의 균주가 달리 적용된다.
- 수율 향상을 위한 각 단계별 공정 최적화 및 바이오컨버전 기술과 특허는 금차 연구 과제에 참여한 전북대학교, 전주대학교, 서울대학교, 전북바이오생물산업진흥원, 한국양토양록축산업협동조합, 연세대학교, 신한대학교, 참여 연구진과 공동으로 협력하여 만들어진 결과로 아래와 같은 특징을 가지고 있다.
  - ㉠ 첫째, 본 특허는 녹용을 심하게 가공하여 수율을 과대하게 올리겠다는 것이 아니라, 그림 라-11)와 같이 건조녹용의 불용화로 생녹용에 비하여 20%이상 수율이 감소되는 부분을 식품공학적인, 발효공학적인 기술을 활용하여, 생녹용이 가지고 본연의 수율(100%)회복하는 데 있으며, 또한 그림 라-11)와 같이 녹용이 가지고 있는 본연의 기능성 물질 확대 및 프로바이오틱스 발효를 통하여 향균, 향노화 기능성을 확보한 특징을 가지고 있다.
  - ㉡ 둘째, 생녹용의 숙성(알콜숙성) 및 발효(균주발효)는 건조 녹용 생산시 발생하는 녹용 고유 유용성물질의 불용화를 차단하는 장점이 있다. 하지만, 생녹용 발효는 식품안전성을 사전에 확보해야 하며, 신중한 접근이 필요하다. 본 연구에서는 생녹용 원료의 안전성 확보를 위해 ㉠원료의 질병검사시스템 도입(PMCA기법)하였으며, ㉢생녹용 표면의 90℃이상의 세척 ㉣절단면의 알콜 살균 ㉤ 녹용 고유 생물학적 성질을 감안하여 Hurdle Technology가 도입되었다.

- ㉔ 셋째, 생녹용의 성분이 건조 과정 중 불용화하는 것을 회복하기 위하여, 완만 냉동 녹용 내부 조직에 완만한 해동, 숙성, 가공을 위하여 저온 장시간(LTLT) 가공처리 기술을 도입하였다.
  - ㉕ 넷째, 1차 추출 후 잔여 물질을 2차 고상 발효하기 위하여 발효녹용 전용 녹용박 (40%이내 탈수분과 멸균)을 사용하였으며, 다른 한편으로 추출 후 분말(1차 추출 후 잔여 물질을 동결건조 분말) 사용하였다. 시험 결과 “추출 후 동결건조분말”의 고상발효 방법이 “탈수분 멸균 녹용박” 보다는 수율과 유용성 성분이 높았다.
- 이러한 Hurdle Technology 식품안전 기술의 확보는 생녹용의 발효를 산업화로 가능하게 하였으며, 향후 새로운 발효산업 형태로 발전될 수 있을것으로 사료 된다.
- ※ 특이사항 : 생녹용의 발효 기술과 연구성과는 농림식품기술기획평가원 연구과제 “녹용 유래 기능성지표성분 표준화 및 제품적용기술 개발 (연구과제번호 321033-3)” 과 연계된 연구 성과입니다.

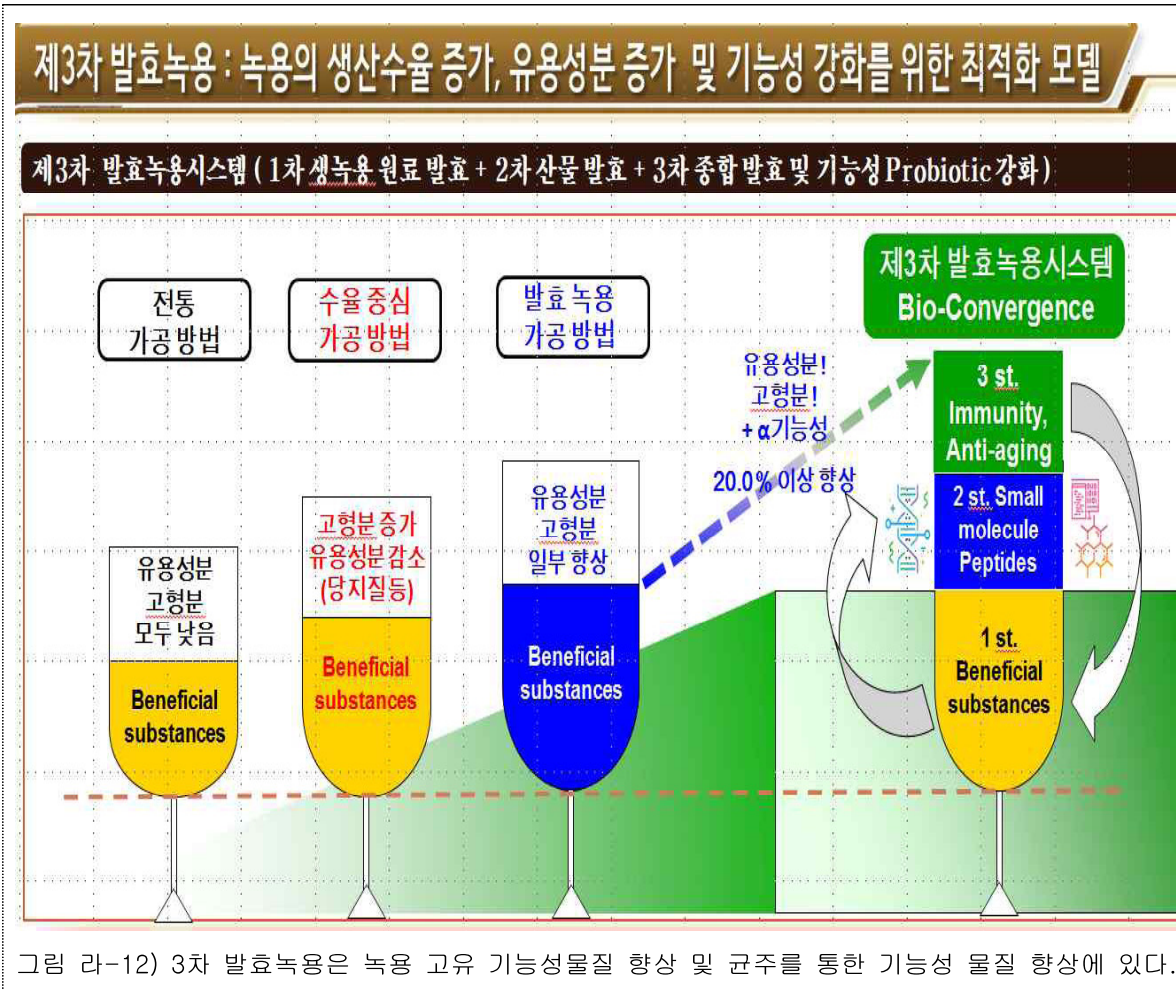


그림 라-12) 3차 발효녹용은 녹용 고유 기능성물질 향상 및 균주를 통한 기능성 물질 향상에 있다.

(라) 항노화 항균 활성화능을 갖는 발효녹용 제조방법과 이로부터 얻어진 추출물의 용도

관인생략

## 출원번호통지서

출원일자 2021.11.26  
특기사항 심사청구(무) 공개신청(무) 참조번호(PN142343)  
출원번호 10-2021-0166105 (접수번호 1-1-2021-1372683-74)  
(DAS접근코드830A)  
출원인명칭 한국양토양육축산업협동조합(2-2000-054470-6)  
대리인성명 리앤목 특허법인(9-2005-100002-8)  
발명자성명 김용안 김영훈 오상남 이명호 전보영 정이형 황인호  
발명의명칭 항노화, 항균 및 항염 활성을 갖는 발효녹용 추출물의 제조방법, 이로부터 얻어진 추출물 및 이러한 추출물의 용도

특 허 청 장

그림 라-13) 특허 출원 완료 (10-2021-0166105) 접수번호 1-1-2021-1372683-74

### 【제3차 발효녹용의 7단계 제조공정 기술】

- 본 발명은 녹용의 3차례의 발효과정을 갖는 발효 녹용 추출물의 제조방법과 각 단계별 제조에 필요한 발효 균주 적용 기술 및 이로부터 얻어진 발효 녹용 추출물의 항노화, 항균 활성 능력을 갖는 용도에 관한 것으로, 그림 라-14)와 같이 7단계 주요 기술 공정이 적용되며, 그 사항은 아래와 같다.

### 【제1차 생녹용 발효 동결건조 녹용 생산을 위한 제조 기술 단계】

- ① (단계 1) 가축질병 등의 위생검증
- ② (단계 2) 식품안전성 검사를 맞춘 원료 녹용(생녹용 원지)의 품질상태에 따라 균주를 선발한다.
- ② (단계 3) 생녹용 원지의 해동, 절편, 살균, 숙성한 이후 품질상태에 적합한 바실러스 균주를 접종하여 일정 기간 발효 후 동결건조 녹용을 제조하는 공정이다.

**【제2차 녹용박 고상 발효 제조기술 단계】 ;**

- ④ (단계 4) 제1차 추출후 녹용 잔여 생산물을 발효원료로 사용할 수 있도록 농축·탈수분·멸균을 통하여 무균화를 진행한다.
- ⑤ (단계 5) 무균화된 원료를 45% 이내의 저수분 상태의 발효녹용 전용 “녹용박”으로 만들거나, “추출후 녹용 동결건조 분말”화 하여 제2차 고상발효 원료로 사용한다.
- ⑥ (단계 6) 단계 4와 5에서 획득된 고상발효 원료를 원료상태에 따라 고상발효에 적합한 균주를 접종하여, 고상발효 하여 발효녹용을 추출한다.

**【제3차 혼합농축액 액상 발효 제조 기술 단계】**

- ⑥ (단계 7) 단계 1과 3의 공정을 거쳐 생산된 “제1차 발효 동결건조 녹용 농축액” 과 단계 4와 6의 과정을 거쳐 생산된 “제2차 고상발효 녹용 농축액”을 다시 혼합하여, 액상발효에 적합한 바실러스 균주를 접종하여 2일 내지 5일 동안 발효 한다. 제3차 발효를 마친 발효녹용은 농축액 또는 액상분말화 하여, 다른 기능성 제품의 원료로 사용할 수 있도록 한다.

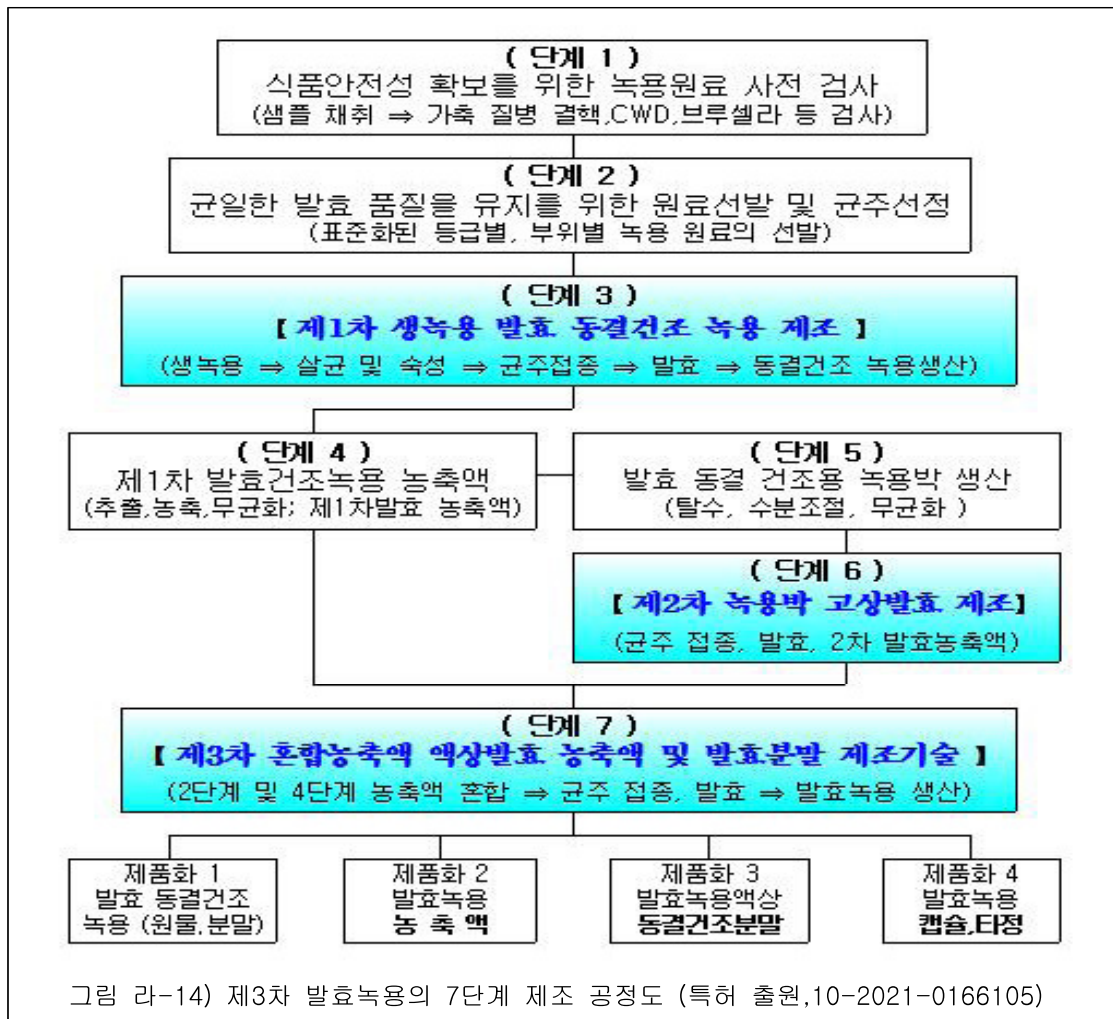


그림 라-14) 제3차 발효녹용의 7단계 제조 공정도 (특허 출원, 10-2021-0166105)



- 위의 단계 1부터 7의 제조과정 및 제1차발효(생녹용발효), 제2차발효(고상발효), 및 제3차발효(액상발효)에 이르는 제조기술과 이로부터 획득된 발효녹용 추출액물의 용도에 관한 것이다.
- 또한 본 발명은 균주 선발(단계 2)시 녹용 원지(절단 이전원료)의 등급, 부위, 노화정도 등에 따른 녹용품질 상태와 원료 가공상태 (생녹용, 건조녹용, 동결건조녹용, Microwave건조녹용, 1차추출후녹용 등)에 따라 최적합한 균주의 선택과 발효방법 (온도, 시간 등)이 달라지며, 서울대학교와 전주대학교에서 최종선발된 **【녹용 발효에 적합한 17종의 락토바실러스 균주】** 가 포함한다.
- 본 7단계 제3차 발효녹용 융합기술은 Sialic acid, GAG(Glycosaminoglycan), Uronic acid, GABA( $\gamma$ -aminobutyric acid), 필수아미노산 함량, 항균 활성화(DPPH·ABTS) 등의 생리활성물질이 증가되었으며, 기호성이 높은 휘발성 아로마의 증가 및 예쁜꼬마선충(Caenorhabditis elegans)과 mouse시험을 통하여 체계적으로 향노화, 항균 활성화를 밝힘으로써, 향후 건강 기능성 식품, 의료, 화장품 등 다양한 분야에서 활용하기가 적합하다. 또한 발효 동결건조녹용, 발효녹용 농축액 및 발효녹용 동결건조 분말 등의 원료를 다양한 제품에 각각 적용하여 유용하게 활용 할 수 있다. 또한 이 제3단계 발효녹용 특허기술은 국내산 녹용의 특성 및 소비자의 니즈를 감안하여, 생산 수율 증가, 식품안전성 증가와 소비자 만족도를 높일 수 있다.

**【본 연구의 특허에는 다음과 같은 기술이 포함되어 있다.】**

- ① **【1-1. 녹용 불용화 해결을 위한 기술】** 녹용의 추출시 생녹용에 비하여 건조녹용에서 수율이 떨어지는 큰 원인은 워터쿠킹  $\Rightarrow$  열건조  $\Rightarrow$  온풍건조  $\Rightarrow$  건조된 원지의 유통기간중 외부 충격  $\Rightarrow$  소주 및 알콜주입  $\Rightarrow$  슬라이스  $\Rightarrow$  건조의 과정을 거치면서 물리 화학적 변화로 인하여, 녹용 고유의 유기물질의 불용화가 진행된다. 동물성 단백질 및 조직은 65℃ 이상에서 변성되어 불용화가 진행된다. 또한 생녹용의 동결시 완만한 동결 로 인하여 녹용의 최대 빙결정생성대(-1℃내지 -5℃, 빙결율 80%) 통과 시간이 길어짐으로서, 큰 얼음결정과 조직의 물리적 손상 및 수분 빙결정화로 인하여, 20% 정도의 수율 저하와 핵산물질, 유리 아미노산 등의 유용성 정미 성분의 감량이 발생하며, 이로 인한 염류와 금속이온과 유기산 등의 농축으로 인한 공극화 증가로 현상으로 인하여 녹용 고유성분의 불용화 및 생산수율 감소가 진행될 수 있다. 옛 부터 한약은 1차로 달려 먹은후, 남은 약제 2봉을 말려 다시 재탕하여 사용하여 왔다. 전통 동양의학에는 1차 다린후 남아 있는 약제에도 상당한 약리물질이 있다고 판단하였다. 녹용 1차 추출후 잔여물질의 재추출 방법이 필요한 이유이다.
- ② **【1-2. 녹용 불용화 해결 및 수율과 유용성분 증대 기술】** 본 특허는첫 번째 기술의 특징은 녹용을 기계 공학적 과다한 가공을 통하여, 수율을 증가 시키겠다는 것이아니라, 건조녹용 불용화로 생녹용에 비하여 20%이상 수율이 감소되는 부분을 식품공학적, 발효공학적 기술을 활용하여, 생녹용이 가지고 본연의 수율(100%)회복 및 녹용의 고유 기능성 지표 물질의 증가는 당연하며, 또한 녹항균, 향노화 기능성 프로바이오틱스 발효를 통하여 녹용이 가지고 있는 본연의 기능성 이외의 기능성(향노화 등)을 증가하는 것이 특징이다.

- ③ 둘째, 생녹용에 이미 진행되고 있는 내부 조직의 농축된 빙결정조직의 완만한 해동, 숙성, 가공을 위하여 저온 장시간(LTLT) 가공처리 기술이 도입된다. 셋째, 생녹용(Fresh velvet antler)이 변성되기 발효를 통하여 녹용 고유의 유용성 물질의 불용화의 차단에 있다. 하지만, 생녹용을 발효하기 때문에 이상 발효의 문제점이 발생할 수 있다. 따라서 생녹용 원료 사용 이전에 식품안전성 확보를 위한 질병검사가 도입(PMCA기법)되어 있으며, 생녹용 표면의 90℃이상의 세척, 알콜 살균등의 각 단계별 hurdle technology가 함께 적용되고 있다. 넷째, 제1차 추출이후 잔여물질(녹용박, 추출후분말)을 발효하기 위하여, 1차 추출후 잔여물질을 2차 고상발효를 위하여, 40%이내 탈수분과 멸균을 진행하였으며, “추출후 동결 건조분말”의 방법이 “탈수분 멸균녹용박” 보다는 수율과 유용성 성분이 높았다.
- ④ **【2-1. 녹용 품질·제형에 따른 차별화 된 균주와 발효 기술】** 사슴은 계절번식 동물이며, 녹용은 계절적 일장 변화에 의하여 호르몬의 변화가 발생하며, 이른 봄철에 일조량 증가 자극에 의한 성장호르몬 증가로 숫 사슴의 목은 뿔이 낙각된 이후 성장하며, 일조량이 가장 높은 하지전후가 IGF-1등 성장인자와 생리적 유용성분이 가장 높다. 외형적으로는 1-4분지에서 채취한 뿔은 녹용의 기질이 부드럽고, 내면은 사슴 피와 호르몬으로 채워져 있고, 녹용원지 표면은 부드러운 털로 뒤덮여 황갈색에서 갈색의 바탕에 적황색, 회흑색, 또는 갈황색의 부드러운 털이 밀생되어 있으며, 호르몬 최고점 성장단계에서 회분화가 진행되기 이전에 절각된 녹용을 벨벳(antler velvet)이라고 한다. 매년 새로 성장하여 아직 골질화가 진행되지 않았거나 약간의 골질화가 된 연한 숫 사슴 뿔로 유기적 유용성분 함량이 높은 시기에 채취한 것(절각)을 지칭한다. 절각시기는 일조량이 최고점인 하지 전후 성장 일령(대형종 80일, 중형종 50일)에 채취한 조직을 의미한다. 이러한 부드러운 녹용원지(antler velvet)의 발효는 녹용 고유의 기능성 물질 수율 획득에 도움을 준다.
- ⑤ 한편, 녹용원지는 하지 이후 가을까지 급속한 성장으로 총 생산량은 높아지나, 골질화가 진행될수록 녹용 고유의 기능성 유용성분의 급격한 저하가 발생한다. 한편 5~6분지 이상 성장하여 구성분의 유기적 유용성분 함량이 매우 떨어지고 무기적 불용화 및 석회화가 진행된 뿔을 녹각이라고 한다. 이런 생리학적 관점에서 볼 때, 늦게 절각된 녹용, 오래된 녹용(녹각), 녹용 하대, 녹용박, 추출후 분말 등은 녹용 원료 자체에는 발효균주 번식에 필요한 녹용자체의 기초 영양 성분이 매우부족하기 때문에 정상적인 프로바이오틱의 기능의 증가를 기대할 수 없으며, 별도의 균주 영양물질을 공급해야 하기 때문에 균주의 종류와 발효방법은 달라 질 수 밖에 없으며, 발효 이후에도 조기절각된 녹용에서 추출되는 녹용 고유의 생리적 성분의 증가에는 제한적일 수 밖에 없다.
- ⑥ **【2-2. 녹용 품질과 제형에 따른 균주선발과 발효방법의 차별화 기술 적용】** 첫째 (부드러운 녹용 원료의 발효) : 부드러운 녹용원료의 기준은 녹용 내면 기질이 부드럽고 , IGF-1 성장인자 등 호르몬이 풍부하고, 사슴피가 가득 채워져 있으며, 성장단계에서 회분화가 진행되기 이전에 조기 절각 건조한 녹용이다. 본 연구에서는 발효 이후에도 녹용 고유기능성 성분이 동일하게 기대 될 수 있도록 엄격한 녹용 원지 원료 선발 기준을 적용하고 있다.

발효녹용의 품질유지를 위한 발효 녹용 원료의 선발기준으로, 일일 일조량이 최고 점에 도달하여 IGF-1등 성장인자가 가장 높은 하지시기를 녹용 최적 절각시점 기준 품질로, 한국양토양록농협 정하는 3등급 이내의 녹용을 사용하여 녹용 발효 후 최종 품질 및 기능성을 예측할 수 있도록 녹용 원료 투입기준을 정하여 활용한다.(예 : 외형상 제4지 원지 분봉이 벌어지지 않는 시점을 1등급으로 평가하고, 절각 시기가 늦어져 제4지 각관분지가 길어질수록 4등급으로 평가한다), 이러한 우수 녹용 등급의 발효는 녹용 고유 기능성물질의 증가를 기대할 수 있다.

- ⑥ 둘째(무기물질이 높은 녹용원료의 발효) : 무기물질이 높은 녹용은 절각시기가 늦어져 회분율이 높은 등의 등급 녹용 또는 오래된 녹용(녹각), 1차 추출후 녹용박(수분40%이내), 추출후 분말(수분5%이내)등을 말하며, 갖는 녹용 고유의 기능성 성분을 증가시키는데는 제한적이나, 녹용 수율증가와 발효 균주와 배지의 투입에 따른 기능 증가를 기대할 수 있으며, 무기물질이 높은 원료를 발효한 두 번째 발효 추출만으로, 첫 번째 발효물 또는 첫 번째 추출물(녹용 본연 추출물)의 기능을 초과 할 수 있는 것처럼 하는 것은 바람직하지 않다. 본 연구에서는 고유단독 부드러운 녹용원지 발효 수득물 대비 10%를 초과하지 않는 범위에서 사용하는게 적합하다.
- ⑥ 셋째(녹용의 품질과 제형에 따른, 항균·항노화 기능성 프로바이오틱스 17종 균주 선정) : 항노화·항균활성화를 위한 기능성 프로바이오틱스 균주 선발을 위하여, 전주대학교와 서울대학교에서 보유한 균주 및 신규 분리한 균주 중 김치와 유아 분변에서 분리한 균주인 *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*를 포함한 유산균주 150개를 대상으로 내산, 내담, 부착능 실험을 통과한 균주 들 중에서 *C.elegans* (Caenorhabditis elegans) 모델에서 수명 연장에 도움을 줄 수 있는지 평가하였으며, 이 중 17 개의 균주를 선발되었으며, 대조군으로써 *L.rhamnosus* GG를 활용하였으며, 이보다 우수한 균주으로써 LFR20-003,004,005과 MR-4, 6, 14, 19, 43, 45로 보여지고 있다. 무기물질이 높은 녹용원료의 발효에는 *L. plantarum* 균종이 적합하며, 부드러운 녹용 원료의 발효 *L. rhamnosus* , *L. sakei*, 및 *L. brevis*이 적합하다.

#### (4) 결론

- 농협안심녹용 품질보증 시스템은 전북대학교(주관), 연세대학교(위탁)의 사전 질병예방시스템을 기반으로 한국양토양록농협에서 식품안전검사와 녹용생산이력제 등을 추가하여 만든 제도로, 한국양토양록농협 이사회 승인과 농협중앙회 안심분사 승인을 얻었다. 농협안심녹용 품질보증 시스템을 적용한 출시 제품은 소비자로부터 크게 각광을 받았다. 향후 국내산 녹용의 소비자 신뢰 확보 소비 촉진에 기여할 것으로 사료된다.
- 3단계 발효녹용은 “녹용 유래 기능성지표성분 표준화 및 제품적용기술 개발 (연구 과제번호 321033-3)과 연계된 연구 성과로”, 20% 고형분 수율증가가 아닌, Sialic acid, Glycosaminoglycan, GABA 등의 녹용고유 기능성성분과 발효 균주를 통한 항노화 기능성물질의 동반 상승을 가져왔다. 수입 발효녹용보다 질적인 우수성은 물론 가격적 경쟁력을 확보하였으며, 향후 제품화를 추진할 예정이며, 국내산 녹용의 기능성 발효녹용 시장을 선도할 수 있을 것으로 사료된다.

## 마. 연세대학교 연구개발 내용 (위탁 1)

국내산 녹용의 소비자 불안감 해소와 식품안전성 강화를 위한 사슴질병(결핵, CWD 등) 예방을 위한 사전 제어 기술 개발 : 완료

### (1) 사슴 녹용 시료

- 국내에서 사육되고 있는 엘크로부터 생산되어 냉동보관된 생녹용을 대상으로 사용
- 생녹용에서 상대, 중대, 및 하대 각 부분의 절편을 채취하여 시료로 사용함.

번호	시료 고유번호	번호	시료 고유번호
1	19-3454	41	19-2037
2	19-3009	42	19-2178
3	19-2011	43	19-2075
4	19-2082	44	19-1077
5	19-1002	45	19-1005
6	19-1010	46	19-3238
7	19-2065	47	19-1078
8	19-2112	48	19-1031
9	19-2061	49	19-2108
10	19-3375	50	19-3397
11	19-2159	51	19-1037
12	19-1075	52	19-1043
13	19-3383	53	19-1013
14	19-1023	54	19-1012
15	19-2039	55	19-1061
16	19-2006	56	19-2196
17	19-1006	57	19-3441
18	19-1029	58	19-2063
19	19-2085	59	19-2064
20	19-2095	60	19-2012
21	19-1036	61	19-2051
22	19-2073	62	19-3394
23	19-1047	63	19-1003
24	19-3225	64	19-2035
25	19-3352	65	19-3009
26	19-1054	66	19-3298
27	19-2004	67	19-3070
28	19-2049	68	19-3022
29	19-2059	69	19-1083
30	19-1008	70	19-3285
31	19-2089	71	19-1018
32	19-2080	72	19-1004
33	19-2026	73	19-3119
34	19-2169	74	19-2038
35	19-2168	75	19-3170
36	19-2180	76	19-3042
37	19-2109	77	19-3249
38	19-2096	78	19-3413
39	19-3104	79	19-2194
40	19-2195	80	19-2070

표 마-1) 녹용의 안전성 검사에 사용된 녹용시료 리스트

## (2) 사슴 녹용 시료에서 핵산추출

### (가) 시료 전처리

- 녹용 35g에 멸균된 증류수 5ml을 첨가한 후 조직분쇄기로 파쇄시키고 상청액을 수집

### (나) DNA 추출 키트를 이용한 DNA 추출

- ① 파쇄된 시료의 상청액에 TRIzol Reagent (Invitrogen, San Diego, CA, USA)를 동량 첨가
- ② 시료에 ALT buffer 180 ul와 Proteinase K 20 ul를 첨가하였음
- ③ Vortex한 후 완전히 용해될 때까지 56℃ 항온수조에서 처리
- ④ 96-100% ethanol 200 ul를 첨가하고 vortex하여 완전히 섞어주었음
- ⑤ DNeasy Mini spin column을 2 ml tube에 꽂고 혼합액을 column에 분주하고 6,000g로 1분간 원심분리
- ⑥ AWI buffer 500ul를 첨가하고 20,000g에서 3분간 원심분리하여 세척하였음.
- ⑦ Column을 새로운 1.5 ml eppendorf tube에 꽂고 AE buffer 200 ul를 spin colmunn membrane에 첨가한 후 분간 상온에 방치후
- ⑧ 6,000 g에서 1분간 원심분리하여 DNA를 용출시켜 DNA를 추출하였음.

## (3) 사슴 녹용 시료에 대한 검사 방법

### (가) 사슴 녹용시료에 대한 결핵병 검사법

- ① 결핵균 특이유전자에 대한 probes

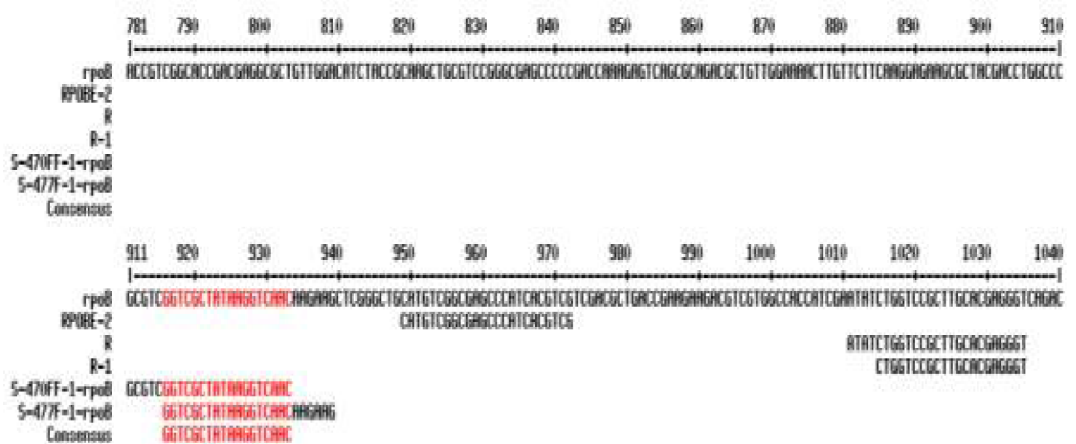


그림 마-1) rpoB 유전자에 대한 probes

② esat-6 유전자에 대한 probe

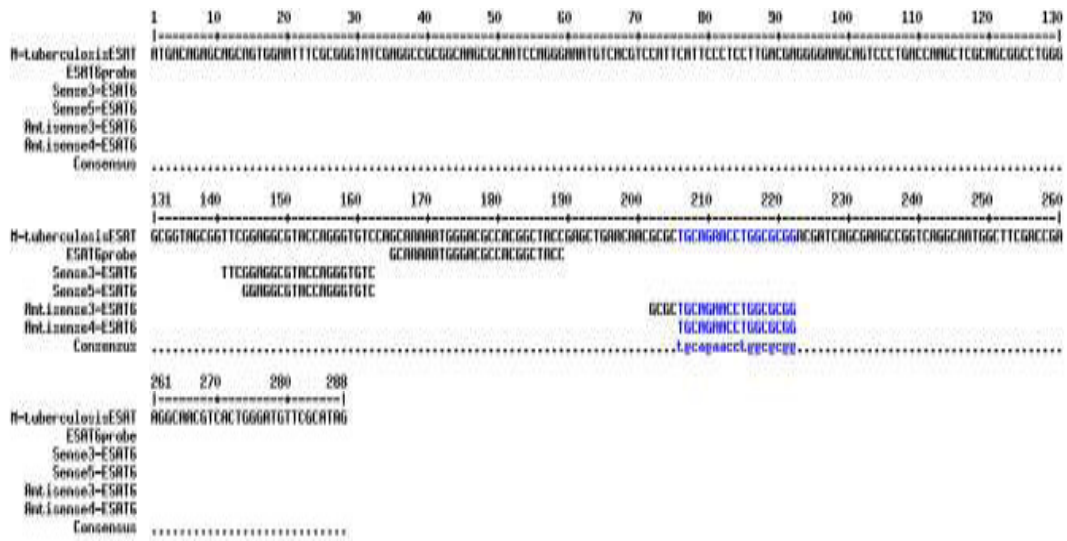


그림 마-2) esat-6 유전자에 대한 probe

③ IS6110 유전자에 대한 probes

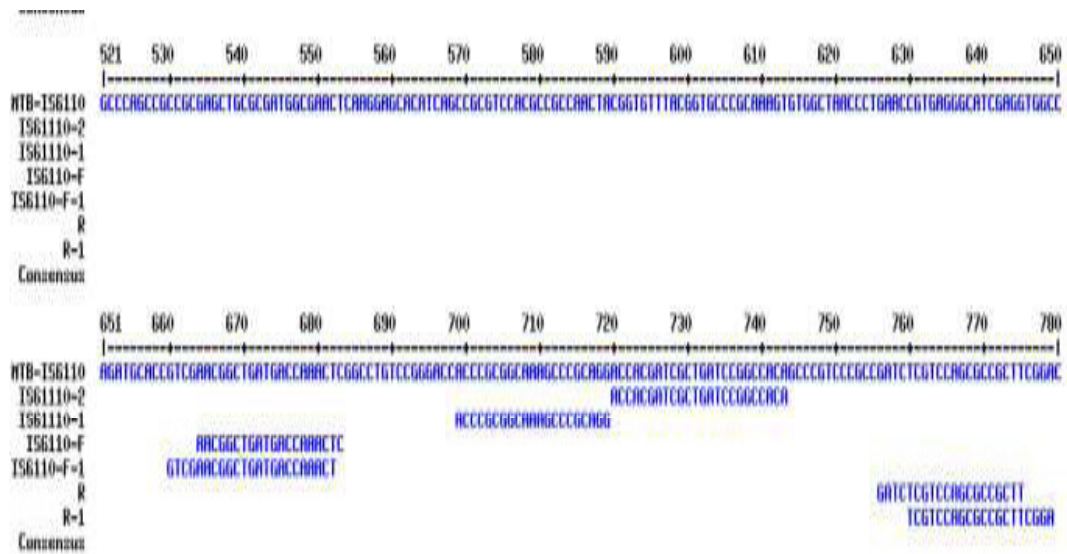


그림 마-3) IS6110 유전자에 대한 probes

(나) 결핵균 특이유전자를 이용한 qPCR의 검출한계 평가

- ① *M. tuberculosis* complex 표준균주인 H37Rv균주로부터 genomic DNA를 추출하여 DNA를 단계희석하여 각 유전자에 대한 qPCR에 대한 검출한계를 조사하였고, 검출한계를 높이기 위하여 각 유전자에 대한 probes조합에 대한 qPCR을 이용하여 검출한계를 비교분석함.

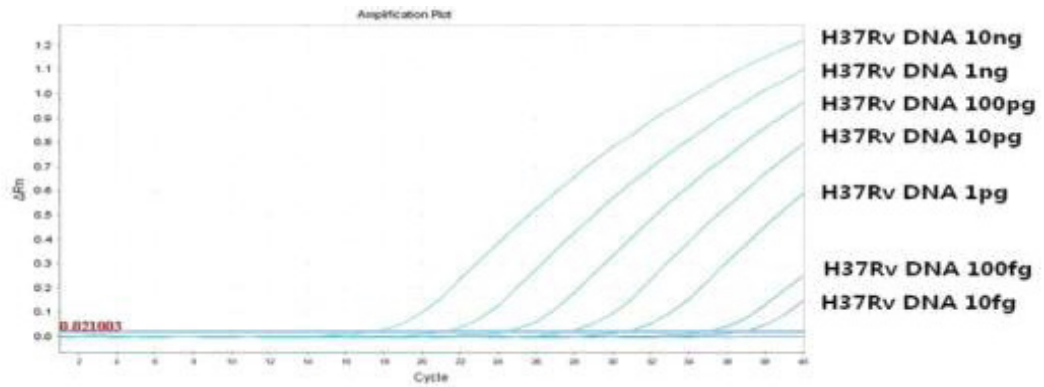
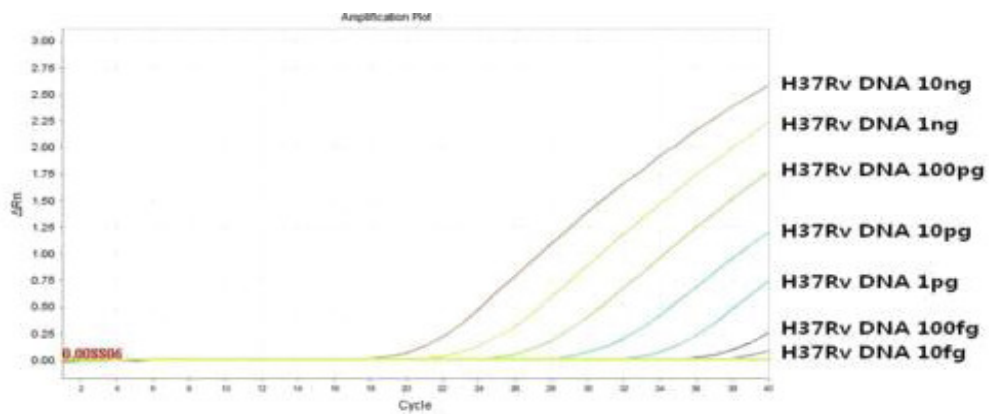
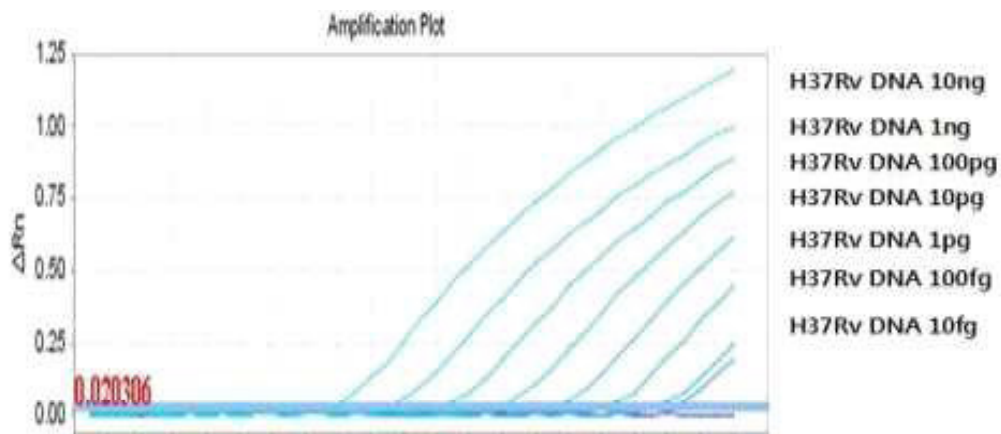


그림 마-4) qPCR을 이용하여 검출한계를 비교분석

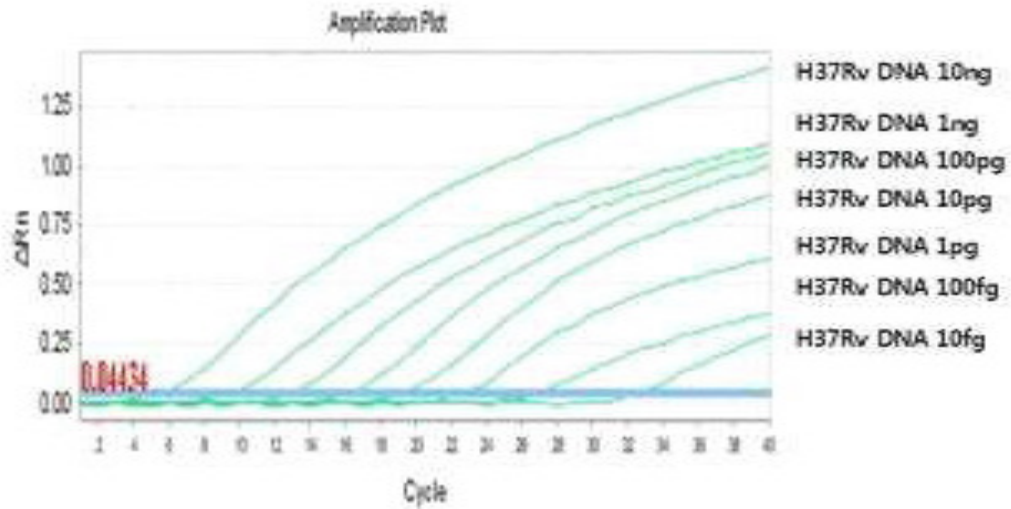
② rpoB qPCR의 검출한계 결과 (그림 마-5)



③ IS6110 qPCR의 검출한계 결과 (그림 마-6)



④ Mtb complex 3 probes combi qPCR의 검출한계 결과 (그림 마-7)



(다) 사슴 녹용시료에 대한 브루셀라병 검사법

○ 브루셀라균(Brucella species)검출 특이 PCR법

① Brucella species-specific primers (표 마-2)

Target gene	Primer sequences	Product size (bp)
16s rRNA	F4 : TCG AGC GCC CGC AAG GGG	905
	R2 : AAC CAT AGT GTC TCC ACT AA	

②Brucella species-specific PCR 반응조건 (표 마-3)

Condition	Temp.	Time	cycle
Initial Denaturation	94°C	5min	1 cycle
Denaturation	94°C	30sec	40 cycles
Annealing	57°C	30sec	
Extension	72°C	60sec	
Final extension	72°C	10min	1 cycle



(라) 사슴 녹용시료에 대한 CWD 검사법(면역블로팅, Western blotting)

**【시료 전처리】**

- ① 분쇄한 시료를 약 200을 계량하여 샘플튜브에 첨가하여. 샘플튜브를 ribolyser에 장착하여 천천히 균질화(homogenize)함
- ② 균질화된 샘플에서 고형물을 함유하지 않도록 주의하면서 250 $\mu$ l를 취하여 에펜도르프튜브에 옮김
- ③ Proteinase K 용액을 250 $\mu$ l 첨가하여 잘 혼합하고(튜브 뚜껑을 닫고 위아래로 흔들어 10회 정도 섞음), 잘 혼합 후, 재빨리 항온수조에서 37℃에서 10분간 반응을 실시함
- ④ 반응종료 후 Reagent B를 250 $\mu$ l 첨가하여 용액전체가 푸르게 될 때까지 잘 혼합함
- ⑤ Reagent B를 넣은 후 20℃에서 15,000×g에서 7분간 원심을 실시함
- ⑥ 원심종료 후, 상층액을 버리고, 상층액을 가능한 한 제거하기 위해 튜브를 상하 역으로하여 페이퍼 위에 5분간 놓아두어 건조시킴
- ⑦ 건조시킨 후, Reagent C을 25 $\mu$ l 첨가함
- ⑧ 신속하게 Heat Block에서 100℃에서 5분간 반응을 실시함
- ⑨ Heat Block에서 마이크로튜브를 꺼내어, 볼텍스로 잘 혼합함

**【면역블로팅(Western blotting)】**

- ① 시약 및 준비
- ② PrP 추출 시약
  - TN buffer : 100mM NaCl, 50mM Tris-HCl(pH7.5)
  - Detergent buffer : 4% Zwittergen 3~14, 4% Sarkosyl 100mM NaCl, 50mM Tris-HCl(pH7.5)
    - ※ detergent buffer 1ml 당: 10× TN buffer 100 $\mu$ l, 30% zwittergen 133.5  $\mu$ l, 25% sarkosyl 160.0 $\mu$ l
  - Butanol-Methanol solution: 2-Butanol : Methanol = 5 : 1
  - Proteinase K: 1mg/ml in 50mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM CaCl<sub>2</sub>
  - Pefablock : 0.1M in DDW
  - Collagenase 20mg/ml in DDW
  - DNase I : 10mg/ml in 50% glycerol, 10mM Tris-HCl(pH7.5) 10mM MgCl<sub>2</sub>
  - 2×Sample buffer : 사용 중에 소량은 실온보관가능 장기간 보존은 4℃에서 보관

1M Tris-HCl (pH6.8)	1.25ml	Glycerol	1ml
0.5M EDTA (pH8.0)	120 $\mu$ l	$\beta$ -Mercaptoethanol	800 $\mu$ l
1% bromophenol blue	800 $\mu$ l	SDS	1g
Urea	4.8g		

up to 20ml

### 【검출방법】

#### ① 추출

- ㉠ 조직 유제액 250 $\mu$ l에 detergent buffer 250 $\mu$ l를 혼합
- ㉡ 2-Buthanol 25 $\mu$ l를 넣고 혼합한 다음에 sonication을 실시
- ㉢ 12.5 $\mu$ l collagenase(20mg/ml)를 넣고 혼합
- ㉣ 37℃에서 30분간 반응시킴
- ㉤ 10 $\mu$ l 0.1M pefablock을 넣고 혼합
- ㉥ 2 $\mu$ l DNase I(10mg/ml)을 넣고 실온에서 5분간 반응시킴
- ㉦ 250 $\mu$ l Butanol-methanol용액을 넣고 혼합한
- ㉧ 20,000g에 20℃ 10분간 원심
- ㉨ 상층액을 제거하고 침전물을 건조시킴
- ㉩ Sample buffer 100 $\mu$ l를 넣고 100℃에서 5분간 끓임

#### ② 전기영동

- ㉠ Electrophoresis tank를 준비하고 gel 하단의 흰 테이프를 떼어낸 뒤 tank에 gel을 장착함
- ㉡ Gel의 상단의 plastic combs을 제거한 후 1ml 피펫을 이용하여 running buffer로 각 well을 채워줌
- ㉢ 10 $\mu$ l의 샘플과 5 $\mu$ l의 marker를 첫 번째 gel에 로딩하고 두 번째 gel에 marker와 함께 샘플을 단계 희석하여 각 well에 로딩함
- ㉣ Running buffer로 upper buffer chamber(gel과 gel사이의 공간)를 채워주고 lower buffer chamber는 gel 하단에서 3cm정도가 채워지도록 running buffer를 부어줌

- ㉞ 500 $\mu$ l의 antioxidant를 upper buffer chamber에 넣어준 후 tank의 뚜껑을 덮고 뚜껑의 소켓을 power supply에 연결한 후 150V로 약 50분 내려줌
- ㉟ Sample을 내리는 동안 transfer를 위해 transfer tank에 transfer buffer를 채워주고 cooling device를 연결하여 transfer buffer를 차갑게 함. 또한 gel에 맞추어, PVDF membrane와 filter paper를 잘라주고 membrane은 methanol에 15초간 담궈, 수화시킨 후 methanol을 버리고 transfer buffer에 담궈 둠
- ㊱ 전기영동이 끝나면 electrophoresis tank에서 gel을 꺼낸 후 precast gel의 플라스틱 틀에서 gel을 꺼낸 후 transfer buffer에 담궈 둠
- ㊲ Transfer cassette를 열어 적당한 tray에 놓고 transfer buffer를 부어주고, Cassette의 한쪽 면에 스펀지를 놓고 그 위에 filter paper를 놓고 다시 그 위에 미리 수화시킨 membrane을 올림
- ㊳ Membrane 위에 gel을 올리고 공기방울을 제거한 뒤 다시 filter paper와 스펀지를 차례로 올린 후 cassette를 닫아 transfer tank에 장착함
- ㊴ Transfer tank의 뚜껑을 닫고 membrane이 positive charge 쪽으로 오도록 소켓을 power supply에 연결 후 400mA로 1시간 30분간 transfer함

### ③ Immunodetection

- ㉞ Blocking : membrane에 blocking buffer를 잠기도록 넣은 후 실온에서 30분간 흔들며 주면서 반응시킴
- ㉟ 1st antibody : 6H4, 8E74 또는 S1 항체를 TBST에 3,000배로 희석하여 membrane이 잠기도록 넣어준 후 흔들면서 실온에 1시간 반응시키거나 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 실시
- ㊱ Washing : TBST로 5분간 3회 세척
- ㊲ 2nd antibody : 2차 항체를 3,000배로 희석하여 membrane에 넣어준 후 흔들면서 실온에 30분간 반응시킴
- ㊳ Washing : TBST로 5분간 3회 세척함
- ㊴ Luminiscence buffer를 넣어준 후 5분간 반응시킴
- ㊵ Luminiscence buffer로 CDP-star(12.5mM)를 50배 희석하여 사용함(CDP-star 최종농도:0.25mM)
- ㊶ OHP 필름위에 membrane을 올려놓고 희석한 CDP-star를 부어준 후 실온에서 5분간 반응시킴
- ㊷ Membrane에서 과도한 액체를 제거하고 OHP 필름으로 membrane을 덮어 줌
- ㊸ 암실에서 membrane에 X-ray film을 5~10분간 붙여준 후 차례로 developer와 fixer에 담그어 시그널을 확인함

(4) 사슴 녹용 시료에 대한 검사 결과

(가) 사슴 녹용시료에 대한 결핵병 검사결과

번호	시료 고유번호	결핵병 PCR결과	번호	시료 고유번호	결핵병 PCR결과
1	19-3454	미검출	41	19-2037	미검출
2	19-3009	미검출	42	19-2178	미검출
3	19-2011	미검출	43	19-2075	미검출
4	19-2082	미검출	44	19-1077	미검출
5	19-1002	미검출	45	19-1005	미검출
6	19-1010	미검출	46	19-3238	미검출
7	19-2065	미검출	47	19-1078	미검출
8	19-2112	미검출	48	19-1031	미검출
9	19-2061	미검출	49	19-2108	미검출
10	19-3375	미검출	50	19-3397	미검출
11	19-2159	미검출	51	19-1037	미검출
12	19-1075	미검출	52	19-1043	미검출
13	19-3383	미검출	53	19-1013	미검출
14	19-1023	미검출	54	19-1012	미검출
15	19-2039	미검출	55	19-1061	미검출
16	19-2006	미검출	56	19-2196	미검출
17	19-1006	미검출	57	19-3441	미검출
18	19-1029	미검출	58	19-2063	미검출
19	19-2085	미검출	59	19-2064	미검출
20	19-2095	미검출	60	19-2012	미검출
21	19-1036	미검출	61	19-2051	미검출
22	19-2073	미검출	62	19-3394	미검출
23	19-1047	미검출	63	19-1003	미검출
24	19-3225	미검출	64	19-2035	미검출
25	19-3352	미검출	65	19-3009	미검출
26	19-1054	미검출	66	19-3298	미검출
27	19-2004	미검출	67	19-3070	미검출
28	19-2049	미검출	68	19-3022	미검출
29	19-2059	미검출	69	19-1083	미검출
30	19-1008	미검출	70	19-3285	미검출
31	19-2089	미검출	71	19-1018	미검출
32	19-2080	미검출	72	19-1004	미검출
33	19-2026	미검출	73	19-3119	미검출
34	19-2169	미검출	74	19-2038	미검출
35	19-2168	미검출	75	19-3170	미검출
36	19-2180	미검출	76	19-3042	미검출
37	19-2109	미검출	77	19-3249	미검출
38	19-2096	미검출	78	19-3413	미검출
39	19-3104	미검출	79	19-2194	미검출
40	19-2195	미검출	80	19-2070	미검출

표 마-4) 국내산 사슴 녹용의 결핵병 검사 결과

(나) 사슴 녹용시료에 대한 브루셀라병 검사결과

번호	시료 고유번호	브루셀라병 PCR결과	번호	시료 고유번호	브루셀라병 PCR결과
1	19-3454	미검출	41	19-2037	미검출
2	19-3009	미검출	42	19-2178	미검출
3	19-2011	미검출	43	19-2075	미검출
4	19-2082	미검출	44	19-1077	미검출
5	19-1002	미검출	45	19-1005	미검출
6	19-1010	미검출	46	19-3238	미검출
7	19-2065	미검출	47	19-1078	미검출
8	19-2112	미검출	48	19-1031	미검출
9	19-2061	미검출	49	19-2108	미검출
10	19-3375	미검출	50	19-3397	미검출
11	19-2159	미검출	51	19-1037	미검출
12	19-1075	미검출	52	19-1043	미검출
13	19-3383	미검출	53	19-1013	미검출
14	19-1023	미검출	54	19-1012	미검출
15	19-2039	미검출	55	19-1061	미검출
16	19-2006	미검출	56	19-2196	미검출
17	19-1006	미검출	57	19-3441	미검출
18	19-1029	미검출	58	19-2063	미검출
19	19-2085	미검출	59	19-2064	미검출
20	19-2095	미검출	60	19-2012	미검출
21	19-1036	미검출	61	19-2051	미검출
22	19-2073	미검출	62	19-3394	미검출
23	19-1047	미검출	63	19-1003	미검출
24	19-3225	미검출	64	19-2035	미검출
25	19-3352	미검출	65	19-3009	미검출
26	19-1054	미검출	66	19-3298	미검출
27	19-2004	미검출	67	19-3070	미검출
28	19-2049	미검출	68	19-3022	미검출
29	19-2059	미검출	69	19-1083	미검출
30	19-1008	미검출	70	19-3285	미검출
31	19-2089	미검출	71	19-1018	미검출
32	19-2080	미검출	72	19-1004	미검출
33	19-2026	미검출	73	19-3119	미검출
34	19-2169	미검출	74	19-2038	미검출
35	19-2168	미검출	75	19-3170	미검출
36	19-2180	미검출	76	19-3042	미검출
37	19-2109	미검출	77	19-3249	미검출
38	19-2096	미검출	78	19-3413	미검출
39	19-3104	미검출	79	19-2194	미검출
40	19-2195	미검출	80	19-2070	미검출

표 마-5) 국내산 사슴 녹용의 브루셀라병 검사 결과

(다) 사슴 녹용시료에 대한 사슴 만성소모성질병 검사결과

번호	시료 고유번호	CWD 검사결과	번호	시료 고유번호	CWD 검사결과
1	19-3454	미검출	41	19-2037	미검출
2	19-3009	미검출	42	19-2178	미검출
3	19-2011	미검출	43	19-2075	미검출
4	19-2082	미검출	44	19-1077	미검출
5	19-1002	미검출	45	19-1005	미검출
6	19-1010	미검출	46	19-3238	미검출
7	19-2065	미검출	47	19-1078	미검출
8	19-2112	미검출	48	19-1031	미검출
9	19-2061	미검출	49	19-2108	미검출
10	19-3375	미검출	50	19-3397	미검출
11	19-2159	미검출	51	19-1037	미검출
12	19-1075	미검출	52	19-1043	미검출
13	19-3383	미검출	53	19-1013	미검출
14	19-1023	미검출	54	19-1012	미검출
15	19-2039	미검출	55	19-1061	미검출
16	19-2006	미검출	56	19-2196	미검출
17	19-1006	미검출	57	19-3441	미검출
18	19-1029	미검출	58	19-2063	미검출
19	19-2085	미검출	59	19-2064	미검출
20	19-2095	미검출	60	19-2012	미검출
21	19-1036	미검출	61	19-2051	미검출
22	19-2073	미검출	62	19-3394	미검출
23	19-1047	미검출	63	19-1003	미검출
24	19-3225	미검출	64	19-2035	미검출
25	19-3352	미검출	65	19-3009	미검출
26	19-1054	미검출	66	19-3298	미검출
27	19-2004	미검출	67	19-3070	미검출
28	19-2049	미검출	68	19-3022	미검출
29	19-2059	미검출	69	19-1083	미검출
30	19-1008	미검출	70	19-3285	미검출
31	19-2089	미검출	71	19-1018	미검출
32	19-2080	미검출	72	19-1004	미검출
33	19-2026	미검출	73	19-3119	미검출
34	19-2169	미검출	74	19-2038	미검출
35	19-2168	미검출	75	19-3170	미검출
36	19-2180	미검출	76	19-3042	미검출
37	19-2109	미검출	77	19-3249	미검출
38	19-2096	미검출	78	19-3413	미검출
39	19-3104	미검출	79	19-2194	미검출
40	19-2195	미검출	80	19-2070	미검출

표 마-6) 국내산 사슴 녹용의 만성소모성질병(CWD) 검사 결과

## 바. 신한대학교 연구개발 내용 (위탁 2)

국내산 녹용 제품의 관능평가 및 제품의 배합비 개발 지원 : 완료

### (1) 발효녹용에 대한 관능평가

#### (가) 관능평가 구성 및 방법

##### ① 관능평가

녹용 및 발효녹용가공품 등에서 관능평가를 시행하기 위해 패널 요원 선정 및 관능평가를 위한 예비 교육을 실시하였다.

##### ② 패널 요원 선정

녹용 및 발효녹용가공품 분석을 수행하기 위하여 관능평가 경험이 있거나, 식품관련 회사원 50명 (남 30, 여 20), 대학교 식품 관련학과 대학생 20명과 대학원생 10명 선정하여 관능평가 훈련을 진행하였다.

##### ③ 관능평가를 위한 훈련

###### ㉠ 예비 교육

관능검사의 정의, 원리 및 방법, 관능적 특성의 종류에 대해 소개하고, 본 연구의 목적과 중요성에 대해 설명하였다.

###### ㉡ 1차 훈련

1차 훈련기간은 한 주당 3~4회씩 1개월간 이루어졌으며, 매 회 훈련에 소요된 시간은 약 1시간이었다. 본 실험에 사용될 시료들을 포함한 녹용 및 발효녹용 제품을 제시하여 시료에 익숙해지는 훈련을 하였으며 특성에 대한 일련의 묘사용어를 나열하도록 하였다. 또한 맛보는 방법, 향 평가 방법 등의 평가절차를 확립하였다.

###### ㉢ 2차 훈련

2차 훈련은 1주일에 3회씩 1개월간 이루어졌으며, 매 회 훈련에 소요된 시간은 약 1시간이었다. 본 실험에서 평가할 시료의 특성 정의를 확립하였고 특성 강도 평가에 필요한 표준물질을 선정하였다. 또한 패널들이 맛(Taste), 색(color), 향미(Flavor), 부드러운정도(Softness), 조직감(Texture), 전반적인 기호도(overall acceptability)를 평가 할 때에는 개발된 표준척도를 기준으로 비교 평가하도록 훈련 시켰다.

라) 관능평가 실제

- ㉠ 관능검사를 위한 예비교육 및 1,2차 훈련을 받은 평가자들에게 실험 목적과 제품의 관능적 품질항목에 대하여 설명하고 시료의 선호도를 반영한 점수를 평가지에 표시하도록 반복 훈련시킨 후 최종 30명을 선별하여 검사를 실시한다.
- ㉡ 난수표를 이용하여 3자리 숫자로 시료번호를 지정한 후 백색접시에 담아 패널에게 제공한다.
- ㉢ 시료 제시는 25 °C 에서 2×2×2 cm 크기로 절단하여 흰색접시에 올려놓고 세 자리 난수표를 이용하여 물과 함께 제공, 다른 시료 평가 시에는 반드시 생수로 입을 가시도록 훈련하였다. 또한 시료제시 순서는 무작위로 하였고, 혀의 둔화현상을 최소화하기 위하여 각각의 시료를 먹은 후 바로 입안을물로 헹구어 다른 시료를 평가할 수 있도록 한다
- ㉣ 기호도 검사 그림 1바-1)과 같이 항목은 맛(Taste), 색(color), 향미(Flavor), 부드러운정도(Softness), 조직감(Texture), 전반적인 기호도(overall acceptability)의 정도를 9점 기호척도를 사용하여 (1=매우나쁨, 5=나쁘지도 좋지도 않음, 9=매우 좋음) 기호도가 높을수록 높은 점수로 평가하도록 한다.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
외관 (appearance)									
부드러운 정도 (Softness)									
맛 (Taste)									
색 (color)									
향미 (Flavor)									
전체적 수용도 (overall acceptability)									
Verry good .....+9 Good.....+7 Neither good Nor Poor ..... +5 Poor..... +3 Very Poor.....+1									

그림 바-1) sensory evaluation sheet



## (2) 발효 녹용 첨가 제품 관능평가 결과

### (가) 발효 녹용 농축액 첨가 Sponge Cake 제품 관능 결과

- ① 발효 녹용 농축액 첨가 spong cake 의 관능 검사 결과 Table 1과 같다. 관능검사는 향미(Flavor), 맛(Taste), 색(Color), 외형(Appearance), 질감(Texture), 전체적인 선호도(Overall Preference)로 각 특성은 9점으로 측정하였다.
- ② 향미(Flavor)와 맛(Taste)은 3% 첨가군에서 가장 높은 평가를 보였고, 첨가량이 증가 할수록 향미와 맛은 낮아지는 결과를 나타냈다( $p < 0.001$ ). 색(Color)은 3% 첨가군 경우 11.30으로 유의적으로 높은값을 나타냈고 첨가량이 증가할수록 유의적으로 낮아지는 결과를 보였다( $p < 0.001$ ).
- ③ 이는 발효녹용 농축액의 색상이 스펀지 케이크에 색상에 직접적인 영향을 미치는 것으로 판단된다. 외형(Appearance)은 대조군과 3%, 6% 첨가군에서 유의적 차이가 없었으며, 9%와 12% 첨가군에서 각각 7.60 , 4.70의 값으로 유의적으로 낮은 결과를 나타냈다.

표 바-1) Seosory evaluation of Sponge cake using fermented freeze-dry velvet extract

Starter (%)	Color	Flavor	Taste	Appearance	Texture	Overall preference
CON	12.00±1.33 <sup>a</sup>	11.30±1.64 <sup>a</sup>	11.50±1.72 <sup>a</sup>	11.90±1.29 <sup>a</sup>	12.00±0.94 <sup>a</sup>	11.90±1.29 <sup>a</sup>
FVE-3	11.30±1.57 <sup>a</sup>	11.90±2.08 <sup>a</sup>	11.60±1.65 <sup>a</sup>	11.50±1.43 <sup>a</sup>	11.40±1.71 <sup>a</sup>	11.50±1.51 <sup>ab</sup>
FVE-6	10.60±2.46 <sup>a</sup>	10.40±2.32 <sup>a</sup>	10.30±1.49 <sup>a</sup>	11.00±1.83 <sup>a</sup>	11.00±1.56 <sup>a</sup>	10.20±1.62 <sup>b</sup>
FVE-9	7.80±1.32 <sup>b</sup>	7.90±2.08 <sup>b</sup>	7.90±2.33 <sup>b</sup>	7.60±2.37 <sup>b</sup>	7.10±2.56 <sup>b</sup>	7.60±2.46 <sup>c</sup>
FVE-12	5.90±1.85 <sup>c</sup>	5.60±1.84 <sup>c</sup>	5.50±2.27 <sup>c</sup>	4.70±2.11 <sup>c</sup>	4.20±1.75 <sup>c</sup>	4.60±1.71 <sup>d</sup>
F-value	21.487 <sup>***</sup>	17.151 <sup>***</sup>	18.600 <sup>***</sup>	28.167 <sup>***</sup>	35.672 <sup>***</sup>	30.010 <sup>***</sup>

\*\*\*  $P < 0.001$ .

<sup>1)</sup>All values are mean±SD.

<sup>2)</sup>Mean±SD with different superscript within a column are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

- ④ 이러한 결과는 발효녹용 농축액 첨가량이 증가 할수록 밀가루 함량은 낮아져 스펀지케이크의 골격을 형성하는 글루텐 양도 줄어들어 외형 또한 낮아지는 것으로 판단된다. 질감(Texture) 경우 3%, 6% 첨가군에서 11.40, 11.00으로 대조군(12.00)과 유의적으로 높은 결과를 보였다( $p < 0.001$ ). 반면에 9~12% 첨가군에서는 유의적으로 낮은 평가를 나타냈다.
- ⑤ 전체적인 선호도(Overall Preference)는 대조군에서 가장 높은 평가를 보였고, 첨가량이 증가함에 따라 유의적으로 감소하는 경향을 나타냈다. 맛과 향에서는 발효녹용 농축액 3%를 첨가했을 때 전체적인 기호도가 높았고 색, 외형, 질감, 전체적인 선호도는 발효녹용 농축액 첨가량이 증가할수록 기호도는 낮아지는 결과를 나타냈다.

(나) 발효 녹용 농축액 첨가 Sugar Snap Cookies 제품 관능 결과

- ① 발효 녹용 농축액(FVE) 첨가한 슈거스냅 쿠키의 외관(appearance), 향기(flavor), 색(color), 물성(texture), 맛(taste), 전반적인 기호도(overall acceptability) 항목을 실시한 결과는 [Table. 2]에 나타내었다.
- ② 발효 녹용 농축액(FVE) 첨가 슈거스냅 쿠키의 외관(appearance)은 대조구(CON)가 6.80으로 가장 높게 평가되었으며, 발효 녹용 농축액(FVE) 첨가량이 증가할수록 유의미하게 낮아지는 결과를 보였다( $p<0.001$ ). 이는 발효 녹용 농축액(FVE)을 첨가하지 않은 대조구(CON)의 색이 가장 밝고 폭이 가장 넓었으며, 퍼짐성이 가장 좋아 발효 녹용 농축액 4%, 8%, 12% 및 16% 첨가구에 비해 높은 선호도를 얻은 것으로 사료된다.
- ③ 향(flavor)과 색(color), 질감(texture), 맛(taste) 그리고 전반적인 기호도(overall acceptability)는 8% 첨가구(RP8)에 가장 높은 값을 나타내었으며, 16% 첨가구(RP16)에서 모든 기호도가 가장 낮은 평가를 받았다( $p<0.001$ ).
- ④ 이로써 발효 녹용 농축액(FVE)을 첨가한 슈거스냅쿠키는 적당량 이상의 발효 녹용 농축액(FVE) 첨가는 오히려 선호도를 떨어뜨리는 것을 알 수 있다.
- ⑤ 발효 녹용 농축액(FVE)을 첨가한 슈거스냅쿠키의 제조에 있어 최적의 발효 녹용 농축액(FVE) 첨가량은 향(flavor)과 색(color), 질감(texture), 맛(taste), 전반적인 기호도(overall acceptability)에서 우수한 선호도를 나타낸 발효 녹용 농축액(FVE) 8% 이하의 첨가량이 제품에 가장 적합할 것으로 사료 된다.

표 바-2) Sensory evaluation of cookies with fermented freeze-dry velvet extract

Samples	CON <sup>1)</sup>	FVE 4	FVE 8	FVE 12	FVE16	F value	<i>p</i> value
Appearance	6.92±0.06 <sup>a</sup>	5.10±0.14 <sup>b</sup>	4.10±0.16 <sup>c</sup>	2.96±0.03 <sup>d</sup>	2.97±0.01 <sup>d</sup>	798.987***	0.000
Flavor	2.14±0.30 <sup>d</sup>	6.05±0.06 <sup>b</sup>	6.94±0.06 <sup>a</sup>	3.94±0.05 <sup>c</sup>	2.04±0.08 <sup>d</sup>	697.937***	0.000
Color	4.09±0.12 <sup>c</sup>	5.05±0.11 <sup>b</sup>	6.06±0.05 <sup>a</sup>	2.93±0.05 <sup>d</sup>	2.12±0.10 <sup>e</sup>	801.908***	0.000
Texture	6.03±0.27 <sup>b</sup>	5.00±0.11 <sup>c</sup>	6.90±0.10 <sup>a</sup>	3.03±0.06 <sup>d</sup>	2.09±0.08 <sup>e</sup>	567.360***	0.000
Taste	6.00±0.08 <sup>b</sup>	4.96±0.17 <sup>c</sup>	6.96±0.03 <sup>a</sup>	3.06±0.06 <sup>d</sup>	3.08±0.06 <sup>d</sup>	983.993***	0.000
Overall acceptability	6.02±0.16 <sup>b</sup>	5.02±0.14 <sup>c</sup>	6.91±0.09 <sup>a</sup>	3.99±0.11 <sup>d</sup>	3.13±0.07 <sup>e</sup>	454.727***	0.000

<sup>1)</sup>CON: Sugar snap cookies without fermented freeze-dry velvet extract  
<sup>2)</sup>FVE 4: Sugar snap cookies with fermented freeze-dry velvet extract 4%  
<sup>3)</sup>FVE 8: Sugar snap cookies with fermented freeze-dry velvet extract 8%  
<sup>4)</sup>FVE 12: Sugar snap cookies with fermented freeze-dry velvet extract 12%  
<sup>5)</sup>FVE 16: Sugar snap cookies with fermented freeze-dry velvet extract 16%

<sup>2)</sup>Mean± S.D.

<sup>3)a-e</sup>Means within a column by different superscript are significantly different at 5% significance level by Duncan's multiple range test

<sup>4)</sup>\*\*\* $p<0.001$

(다) 발효 녹용 첨가 Jelly 제품 관능 평가 결과

- ① 발효녹용 녹용추출액(FVE) 첨가 젤리의 관능검사 결과는 Table 3과 같다. 외관은 대조군에서 가장 높은 평가를 받았고, FVE 첨가량이 증가할수록 유의적으로 감소하는 경향을 보였다( $p < 0.001$ ).
- ② 향은 50% 첨가군에서 6.91의 높은 평가를 보였고, 25% > 75% > CON > 100% 순으로 나타났다.
- ③ 색상은 대조군 보다 FVE 25, 50% 첨가군이 더 높았으며, 75, 100% 첨가군에서는 유의적으로 감소하는 경향을 보였다( $p < 0.001$ ). 조직감, 맛에 대한 관능 평가의 경우 50% 첨가군에서 가장 높은 평가를 보였고, CON > 25% > 75% > 100% 순으로 나타났다. 이는 기계적 texture의 경도 결과와 일치하였다.
- ④ 전체적인 선호도 평가 역시 향, 맛, 조직감의 평가와 비슷한 결과를 보였다. 이를 보아 관능평가에서 외관이나 색도 보다 맛이나 조직감이 전체적인 선호도에 많은 영향을 미친 것으로 보인다.
- ⑤ 이와 같은 결과를 종합해보면 FVE 25~50% 첨가군이 대부분 평가 항목에서 높은 점수를 얻어 FVE의 기능적 특성을 최대한 활용하면서 전체적인 품질을 유지하기 위한 최적의 첨가 농도로 50%가 가장 적한 것으로 판단된다.

### 3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

#### 1) 연구수행 결과

##### (1) 정성적 연구개발성과

(가) 국내산 녹용원료의 소비자 신뢰성 확보와 사슴 질병차단을 위한 질병 검사 시스템 개발 (결핵, 브르셀라, CWD)을 개발하여, 농협안심녹용 8단계 품질보증시스템 구축하였다.

(나) 농협안심녹용 품질보증시스템을 이용한 제품개발 결과 생산 제품의 매출 및 성장이 증가하고 있음, 따라서 농협안심녹용 품질보증시스템은 향후 소비자의 신뢰를 높여, 국내산 녹용 소비에 기여할 것으로 사료된다.

(다) 국내산 녹용에 최적화된 3차 발효 7단계 발효 녹용 기술은 ① 식품 안전성 확보, ② 수율 향상, ③ 녹용 고유 기능성 지표 물질의 향상, ④ 항노화 프로바이오틱스 건강 기능성 강화, ⑤ 대량생산 산업화 기술 확보로 인하여, 수입 녹용과 차별화와 경쟁력을 향상시켜 국내산 녹용의 소비 확대에 기여할 것으로 사료된다.

##### (2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명	연도		1단계	계	가중치 (%)
	2020.10.12 - 2021.10.11 (12개월)				
전담기관 등록·기탁 지표 <sup>1)</sup>	논문 (SCIE)	목표(단계별)	2	2	-
		실적(누적)	3	3	-
	특허	목표(단계별)	2	2	20
		실적(누적)	2	2	-
	발표	목표(단계별)	2	2	40
		실적(누적)	6	6	-
연구개발과제 특성 반영 지표 <sup>2)</sup>	제품화	목표(단계별)	2	2	40
		실적(누적)	3	3	-
	고용창출	목표(단계별)	5	5	-
		실적(누적)	5	5	-
	계	목표(단계별)	13	13	100
		실적(누적)	19	19	-

\* 1) 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[에스시아이 Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구 시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신물질 등을 말하며, 논문, 학술발표, 특허의 경우 목표 대비 실적은 기재하지 않아도 됩니다.

\* 2) 연구개발과제 특성 반영 지표: 기술실시(이전), 기술료, 사업화(투자실적, 제품화, 매출액, 수출액, 고용창출, 고용효과, 투자 유치), 비용 절감, 기술(제품)인증, 시제품 제작 및 인증, 신기술지정, 무역수지개선, 경제적 파급효과, 산업지원(기술지도), 교육지도, 인력양성(전문 연구인력, 산업연구인력, 졸업자수, 취업, 연수프로그램 등), 법령 반영, 정책활용, 설계 기준 반영, 타 연구개발사업에의 활용, 기술무역, 홍보(전시), 국제화 협력, 포상 및 수상, 기타 연구개발 활용 중 선택하여 기재합니다 (연구개발과제 특성별로 고유한 성과지표를 추가할 수 있습니다).

< 연구개발성과 성능지표 >

평가 항목 (주요성능 <sup>1)</sup> )	단위	세계 최고		연구개발 전	연구개발 결과	목표설정 근거 (Source)
		보유국/ 보유기관	성능수준	국내 성능수준	2020.10.12~2021.10.11	
1 녹용 추출액 분말 수율 (생녹용 1Kg기준)	g (%)	뉴질랜드	45g (4.5%)	45g (4.5%)	65g (6.5%)	Deer Velvet Technical Manual, Deer Industry NewZealand, Version 6.3.p.20
2			100%	100%	144 %	

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번 호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/ BISCIIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Comparisons of Chemical Composition, Flavor and Bioactive Substances between Korean and Imported Velvet Antler Extracts	Food Science of Animal Resources	김용안 김상우 이명호 이학교 황인호	41(3)	Korea	Korean Society for Food Science of Animal Resources	SCIE	2021 May	2636-0772	50%
2	Effects of Bacillus-based probiotics on growth performance, nutrient digestibility, and intestinal health of weaned pigs	Journal of Animal Science and Technology	문다예 경현진 공명환 송민호 김영훈	63	Korea	축산학회	SCIE	Accepted: Sep 27, 2021	2672-0191	100
3	Enhanced $\gamma$ -aminobutyric acid and sialic acid in fermented deer antler velvet and immune promoting effects	Journal of Animal Science and Technology	유지선 김용안 이주연 오상남		Korea	동물과학기술학회	SCIE	Accepted: Nor 30, 2021, jast-2021- 00367	2672-0191	100
4	Quality Characteristics and Antioxidant Properties of Jelly with Fermented Antler Velvet Extract	Culinary Science & Hospitality Research	김용안 이명호	27(7)	Korea	Culinary Society of Korea	BISCIIE	2021.7		100

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	주 제	국명
1	2021 KoSFoST 국제학술대회 한국식품과학회	CR Hong, HJ Kim, DK Song, YJ Kook, YH Chung	2021.07.07	대전 컨벤션센터	Improvement of Functional Ingredients Using Solid-Phase Fermentation in Velvet Antler Extracts Residue	Korea
2	2021 (사)한국영양학회 추계국제학술대회	J Yoo, J Lee, YA Kim, S Oh	2021.10.15	서울드레곤 시티호텔	The effect of fermented velvet antler with probiotic strains on immune response	Korea
3	2021 (사)한국영양학회 추계국제학술대회	J Yoo, J Lee, YA Kim, S Oh	2021.10.15	서울드레곤 시티호텔	Screening for Lactic Acid Bacteria for enhancing GABA in fermented deer antler extracts	Korea
4	한국식품영양학회 50주년, 2021 KFN 국제심포지엄	B Yun, M Kang, J Lee, J Yoo, S Oh	2021.10.27	부산 벅스코	<i>Lactobacillus</i> strains isolated from kimchi stimulate longevity and immune response in <i>C. elegans</i>	Korea
5	한국식품영양학회 50주년, 2021 KFN 국제심포지엄	J Lee, M Kang, S Lee, M Kang, S Hwang, J Yoo, B Yun, & S Oh	2021.10.27	부산 벅스코	Screening of Kimchi-derived Lactic Acid Bacteria for Prevention of Muscle Loss	Korea
6	2021년도 제27차 대한의생명과학회 추계학술대회	S Kang, S Monoldorova, I Titov, S Yun, JE Cho, BY Jeon	2021.11.05	경북대학교 글로벌플라자 (비대면학회)	Validation of safety on the tuberculosis of the Deer antler	Korea

□ 기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

□ 보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> JLFR LR04	KACC 92399P	국립농업과학원	2021
2	<i>Lactobacillus sakei</i> JLFR LS07	KACC 92398P	국립농업과학원	2021
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> LP20B49	KACC 92397P	국립농업과학원	2021

[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	녹용의 원산지 판별용 지표물질 바이오마커 조성물 및 이의 용도	대한 민국	김용안 황인호	2020. 12.30	10-202 0-0188 073					100%	활용
2	항노화, 항균 및 항 염 활성을 갖는 발 효녹용 추출물의 제조방법	대한 민국	김용안 김영훈 오상남 이명호 전보영 정이호	2021. 11.26.	10-202 1-0166 105					100%	활용

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
	√									

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

표준화

○ 국내 표준

번호	인증구분 <sup>1)</sup>	인증여부 <sup>2)</sup>	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 <sup>3)</sup>	제안/인증일자

\* 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.

\* 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.

\* 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제 표준

번호	표준화단계구분 <sup>1)</sup>	표준명	표준기구명 <sup>2)</sup>	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 <sup>3)</sup>	제안자	표준화 번호	제안일자

\* 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.

\* 2) 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.

\* 3) 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	농협안심녹용 아이튼튼 녹용홍삼스틱	2020. 11.19	코스맥스	현재 시판중	어린이용 건강 보조식품	1년		
2	농협안심녹용 녹용백수오 혼합농축액	2021. 04.09	신영에이치에스	현재 시판중	건강보조 식품원료	1년		
3	농협안심녹용 뷰티플러스 백수오녹용콜라겐 스틱	2021. 07.28	코스맥스	현재 시판중	여성전용 건강 보조식품	1년		
4	발효녹용엑스분말 및 발효녹용스틱	2021. 10.25	화진바이오텍 전북바이오융합 산업진흥원	제품화 검토중	건강 보조식품	2년		

농협안심녹용 아이튼튼 녹용홍삼스틱



농협안심녹용 녹용백수오 혼합농축액

**농협안심 녹용 녹용 백수오 혼합농축액**

<b>제품명</b>	농협안심녹용 녹용 백수오 혼합농축액	<b>영양정보</b>	총 내용량 100g
<b>식품의 유형</b>	중증가공식품 (레투르트식품/열균제품)		1일 권장량
<b>원재료명 및 함량</b>	정제수, 녹용 12.5% [동결건조녹용 100% (국내산)], 백수오 12.5% (국내산), 당귀 12.5% (국내산)		기준치에 대한 비율
<b>고형분</b>	18.0% 이상   내용량   1kg(580kcal)		3%
<b>제조원</b>	(신영에이치에스) 충북 제천시 바이오밸리로 67		2%
<b>판매원</b>	농협경제시주식회사 안심축산분사 / 서울 서대문구 중성로 60		4%
	한국양토양특농협 / 서울 광진구 영화사로 24 Tel : 02-488-4343		0%
<b>포장방법</b>	실온보관		0%
<b>포장재질</b>	폴리프로필렌 (내면)		0%
<b>품질보증기간</b>	200804351681150		0%
<b>유통기한</b>	유통표기일까지		11%
<b>판매교과</b>	구입처 및 판매처		OTHER

이 제품의 백수오 원료는 한국양토양특농협에서 "공인기관 유전자검사에서 합격된 원료만을 사용하였습니다. 혼합농축액 배합비율 = 녹용 : 백수오 : 당귀 = 1 : 1 : 1  
이 제품은 메달고등어, 복숭아와 송두, 토마토, 쇠고기, 알갱이, 우유, 밀, 대두, 아황산류, 돼지고기, 새우, 양귀, 게, 소금, 얼고기, 조개류 (굴, 바지락, 홍합), 환약재 등을 사용한 제품과 같은 제조시설에서 제조하고 있습니다. 이 제품은 공정거래위원회 고시 소비자분쟁해결기준에 의거 교환 또는 보상받을 수 있습니다. 부정 불량식품신고는 국번없이 1399

농협안심녹용 뷰티플러스 백수오녹용콜라겐스틱



발효녹용홍삼 엑스분말 (상, 좌)  
발효녹용 분말 스틱 (우)





기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황

\* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

사업화 현황

번호	사업화 방식 <sup>1)</sup>	사업화 형태 <sup>2)</sup>	지역 <sup>3)</sup>	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

\* 1) 기술이전 또는 자기실시

\* 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등

\* 3) 국내 또는 국외

매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
1) 농협안심녹용 아이튼튼 녹용홍삼스틱	2021년	189,019 천원		189,019 천원	농협 경제사업 전산시스템
2) 농협안심녹용 뷰티플러스 백수오녹용콜라겐스틱	2021년	24,861 천원		24,861 천원	농협 경제사업 전산시스템
합계		213,8870 천원		213,8870 천원	

사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과			제품화		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		5		
	소요예산(천원)		1,100,000		
	예상 매출규모(천원)		현재까지	3년 후	5년 후
			446,000	1,337,000	2,228,000
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
			국내	0.5%	2%
국외					
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		발효녹용 파우치(GMP), 실버세대 여성용 녹용홍삼 파우치(GMP), 녹용홍삼 젤리스틱 등 3년내 5개 제품			
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)		현재	3년 후	5년 후
	수출				

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2020년	yyyy년	
1		한국양토양록농협	5		
합계					

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	1
		생산인력	2
	개발 후	연구인력	1
		생산인력	7

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
1	녹용농축액 수율증대 (1년 생산액 기준)	2021	340천원/kg × 900kg/년 × 15% 수율증가 = 45,900	45,900
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 정수액	총 계약액	해당 연도 정수액	향후 예정액	수출/수입

[사회적 성과]

법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

전문 연구 인력 양성

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

산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일

포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

[인프라 성과]

□ 연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

\* 「과학기술기초법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

<참고 1> 연구성과 실적 증빙자료 예시

성과유형	첨부자료 예시
연구논문	논문 사본(저자, 초록, 사사표기)을 확인할 수 있는 부분 포함, 연구개발과제별 중복 첨부 불가)
지식재산권	산업재산권 등록증(또는 출원서) 사본(발명인, 발명의 명칭, 연구개발과제 출처 포함)
제품개발(시제품)	제품개발사진 등 시제품 개발 관련 증빙자료
기술이전	기술이전 계약서, 기술실시 계약서, 기술료 입금 내역서 등
사업화 (상품출시, 공정개발)	사업화된 제품사진, 매출액 증빙서류(세금계산서, 납품계약서 등 매출 확인가능 내부 회계자료) 등
품목허가	미국 식품의약국(FDA) / 식품의약품안전처(MFDS) 허가서
임상시험실시	임상시험계획(IND) 승인서

<참고 2> 국가연구개발혁신법 시행령 제33조제4항 및 별표 4에 따른 연구개발성과의 등록·기탁 대상과 범위

구분	대상	등록 및 기탁 범위
등록	논문	국내외 학술단체에서 발간하는 학술(대회)지에 수록된 학술 논문(전자원문 포함)
	특허	국내외에 출원 또는 등록된 특허정보
	보고서원문	연구개발 연차보고서, 단계보고서 및 최종보고서의 원문
	연구시설·장비	국가연구개발사업을 통하여 취득한 3천만 원 이상 (부가가치세, 부대비용 포함) 연구시설·장비 또는 공동활용이 가능한 모든 연구시설·장비
	기술요약정보	연차보고, 단계보고 및 최종보고가 완료된 연구개발성과의 기술을 요약한 정보
	생명자원 중 생명정보	서열·발현정보 등 유전체정보, 서열·구조·상호작용 등 단백질체정보, 유전자(DNA)칩·단백질칩 등 발현체 정보 및 그 밖의 생명정보
	소프트웨어	창작된 소프트웨어 및 등록에 필요한 관련 정보
	표준	「국가표준기본법」 제3조에 따른 국가표준, 국제표준으로 채택된 공식 표준정보[소관 기술위원회 를 포함한 공식 국제표준화기구(ISO, IEC, ITU)가 공인한 단체 또는 사실표준화기구에서 채택한 표준정보를 포함한다]
기탁	생명자원 중 생물자원	세균, 곰팡이, 바이러스 등 미생물자원, 인간 또는 동물의 세포·수정란 등 동물자원, 식물세포·종자 등 식물자원, DNA, RNA, 플라스미드 등 유전체자원 및 그 밖의 생물자원
	화합물	합성 또는 천연물에서 추출한 유기화합물 및 관련 정보
	신품종	생물자원 중 국내외에 출원 또는 등록된 농업용 신품종 및 관련 정보

## 2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
<p>○ 국내산 녹용에 적합한 생산 최적화 공정 개발을 통한 경쟁력 강화</p> <p>(목표 : 저널1, 특허1, 발표1) (성과 : 저널1, 특허1, 발표3)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 국산녹용 소비자 불안감 해소를 위한 식품안전성 강화 전처리 산업화 기술 개발 완료 (질병 예방을 위한 결핵, 브르셀라, CWD 사전 제어 기술) (학술발표 1)</li> <li>○ 국내 녹용 유통 과정에서 품질 저하 방지 전처리 및 저온 숙성발효 기술 개발 및 특허 출원 완료 (특허 10-2021-0166105, 특허 기술에 포함 됨)</li> <li>○ 수율 향상(20%이상)을 위한 각 단계별 공정 최적화 및 바이오컨버전 개발 및 특허 출원 완료 (특허 10-2021-0166105, 학술발표 1)</li> <li>○ 한국형 녹용 지표성분의 대사체 지표물질 분석기술 (UPLC/MS/MS Metabolic Profiling) 개발 및 특허출원 완료 (특허 10-2020-0188073) (저널 1)</li> </ul>	<p>○100%</p> <p>○100%</p> <p>○100%</p> <p>○100%</p>
<p>○ 발효녹용의 기능성 검증을 통한 경쟁력 강화</p> <p>(목표 : 저널1, 특허1, 발표1) (성과 : 저널1, 특허1, 발표3)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 발효 녹용의 항노화·면역증진 효능 평가 검증 및 산업화 기술 이전, 발효녹용의 세포독성, 생존율 및 동물실험 평가, 예쁜꼬마선충 및 동물 모델을 이용 항노화·면역증진 기능성 효능 평가 완료 (특허 10-2021-0166105 특허기술에 포함 됨)</li> <li>○ 통발효식품 유래 고기능성 고효율 프로바이오틱스 발효 조건 최적화 및 발효녹용 최적 공정 개발 및 고부가가치 효소 처리 공정 표준화 완료 (특허균주 기탁 3건, 저널1)</li> </ul>	<p>○100%</p> <p>○100%</p>
<p>○ 국산녹용 품질인증시스템 도입을 통한 제품 개발 및 대량생산 산업 표준 기술 개발</p> <p>(목표 : 제품화 2) (성과 : 제품화 3, 시제품1)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 농협 안심 녹용 품질인증시스템 시스템 구축 완료 (한 국양도양록농협 이사회 승인 및 농협안심녹용에 대한 브랜드 B.I 중앙회로부터 승인)</li> <li>○ 대량생산을 위한 산업화 표준 및 최적화 기술 보급 (학술발표 1)</li> <li>○ 녹용 및 발효녹용 향기 원인 물질 이화학적 탐색 및 개선 방향 확립 (특허 10-2020-0188073 포함)</li> <li>○ 농축산물을 혼합한 콜라보레이션 제품 개발 및 제품 관능평가와 소비자 선호도 조사를 통한, 발효 녹용 최적함 배합비 개발 완료 (제품화 3, 시제품1)</li> </ul>	<p>○100%</p> <p>○100%</p> <p>○100%</p> <p>○100%</p>

#### 4. 목표 미달 시 원인분석 (해당 사항 없음)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

---

2) 자체 보완활동

---

3) 연구개발 과정의 성실성

---

## 5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 국내산 녹용의 질병 차단 기술 개발, 경쟁력 강화를 위한 농협안심녹용 8단계 품질 관리 시스템 구축, 수입산과 차별화 기술 개발, 대량생산에 적합한 생산수율 향상 최적화 표준 공정기술 개발, 녹용 품질과 발효 방법에 따른 발효 균주 선발 및 제품화 등 생산 현장 모델 중심 실용화 기술 개발은 1년 단기 과제에서 할 수 없는 매우 많은 연구성과와 현장 접목은 모든 수행기관과 참여기관이 매우 많은 노력의 결실과 성과라 할 수 있음
- “녹용의 원산지 판별용 지표 물질 바이오마커” 기술은 국내산 녹용의 차별화와 원산지와 식약처 품종 제한 문제를 해결하였으며, “항노화, 항균 활성을 갖는 발효 녹용 추출물의 제조 방법과 추출물의 용도”는 국내산 녹용 산업의 활성화와 경쟁력 강화에 큰 도움이 될 것임, 특히 국내산 발효 녹용의 경쟁력 확보를 위해서 국내산 녹용 원료 질병차단 기술을 최초로 도입하였으며, 이를 활용한 하여 “농협안심녹용 8단계 관리시스템”을 적용하여 만든 신제품 2종(아이튼튼 녹용홍삼젤리, 뷰티플러스 백수오녹용콜라게스스틱)을 출시하여 소비자에게 큰 호응을 얻었음
- 김치와 유아 분변에서 분리한 균주인 *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*를 포함한 유산균주 150개를 대상으로 내산, 내담, 부착능 실험을 통과한 균주 들 중에서 *C.elegans* (*Caenorhabditis elegans*) 모델에서 수명 연장에 도움을 줄 수 있는지 평가하였으며, 이 중 17 개의 균주를 선발하였으며, 녹용의 발효는 녹용 원료(생녹용)의 내인성 품질(절각 시기 기준 녹용 품질 등급), 외인성 품질(기름분골, 분골, 상대, 증대, 하대, 녹각, 녹용박 등 부위 외형품질) 및 발효 방법(고상발효, 액상발효)에 따라 최적한 균주가 달라짐을 밝혀냈음, 향후 녹용 발효는 보다 녹용 품질에 따라 세분화한 발효 방법이 적용될 것으로 기대됨

## 6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

연구개발성과의 비공개 요청

공개 1년 유예 요청 : 금차 과제에서 사슴소모성질병(CWD)에 대한 검증을 80개 샘플에 대하여 실시하였으며, 후속 과제(과제번호321033-3)에서 보다 많은 시료를 검증할 예정이며, 검증 이후 특허를 추진코자 합니다. 향후 2년동안 공개 유예를 신청합니다.

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

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

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서
2.	1)
	2)



[별첨 1]

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

		과제번호	과제번호320111-1		
사업구분	농축산물안전유통소비기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	농축산물안전유통소비기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	국내산 발효농용의 부가가치 향상을 위한 제품화 기술 개발			과제유형	(응용,개발)
연구개발기관	전북대학교, 전주대학교, 전북생물산업진흥원, 한국양토양육축산업협동조합, 연세대학교, 신한대학교			연구책임자	황인호
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	1년	130,000	130,000	260,000
	2차년도				
	3차년도				
	4차년도				
	5차년도				
계					
참여기업					
상대국	상대국연구개발기관				

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2021.11.25

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
전북대학교	교수	황인호

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	황인호
----	-----

## I. 연구개발실적

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수

“녹용의 원산지 판별용 지표물질 바이오마커” 기술은 국내산녹용의 차별화와 원산지와 식약처 품종제한 문제를 해결하였으며, “항노화, 항균 활성을 갖는 발효녹용 추출물의 제조 방법과 추출물의 용도”는 국내산 녹용산업의 활성화와 경쟁력강화에 큰 도움이 될것임, 특히 국내산 발효녹용의 경쟁력확보를 위해서 국내산 녹용 원료 질병차단 기술을 최초로 도입하였으며, 이를 활용한 하여 “농협안심녹용 8단계 관리시스템”을 적용하여 만든 신제품2종(아이튼튼 녹용홍삼젤리, 뷰티플러스 백수오녹용콜라게스스틱)을 출시하여 소비자에게 큰 호응을 얻었음

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수

① 녹용의 원산지 판별용 지표물질 바이오마커 기술은 국내산 녹용 원료의 건강기능성 식품, GMP

국내산녹용이 건강기능성식품 녹용으로 사용되기 위해서는, “대한민국약전외한약(생약) 규격집”과 “식품의 기준 및 규격”에서 정하는 *Cervus canadensis* E. 품종에 대한 입증이 필요하며, 본 연구의 향후 예상되는 문제점을 해결할 수 있을것으로 사료됨

또한, 국내산 녹용의 질병차단 기술과 발효녹용 기술은 은 국내 소비자들에게 좋은 이미지를 제공하여 국내 사슴산업이 안정적으로 발전할수 있는 계기가 될것으로 사료 됨

② 농협안심녹용 품질보증 시스템은 전북대학교(주관), 연세대학교(위탁)의 사전 질병예방 시스템을 기반으로 한국양토양록농협에서 식품안전검사와 녹용생산이력제 등을 추가하여 만든 제도로, 한국양토양록농협 이사회 승인과 농협중앙회 안심분사 승인을 얻었다. 농협안심녹용 품질보증 시스템을 적용한 출시 제품은 소비자로부터 크게 각광을 받았다. 향후 국내산 녹용의 소비자 신뢰 확보 소비 촉진에 기여할 것으로 사료 됨

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

① 김치와 유아 분변에서 분리한 균주인 *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*를 포함한 유산균주 150개를 대상으로 내산, 내담, 부착능 실험을 통과한 균주 들 중에서 *C.elegans* (*Caenorhabditis elegans*) 모델에서 수명 연장에 도움을 줄 수 있는지 평가하였으며, 이 중 17 개의 균주를 선발하였으며, 녹용의 발효는 녹용원료(생녹용)의 내인성 품질(절각시기 기준 녹용품질등급), 외인성 품질(기름분골, 분골, 상대, 중대, 하대, 녹각, 녹용박 등 부위 외형품질) 및 발효방법(고상발효, 액상발효)에 따라 최적한 균주가 달라짐을 밝혀냈음, 향후 녹용 발효 산업은 녹용의 품질에 따라 각각 다른 기능성 균주가 적용되는 차별된 시장이 전개 될 것으로 추정됨

② 제3단계 발효녹용은 “녹용 유래 기능성지표성분 표준화 및 제품적용기술 개발 (연구 과제번호 321033-3)과 연계된 연구 성과로”, 20% 고형분 수율증가가 아닌, Sialic acid, Glycosaminoglycan, GABA 등의 녹용고유 기능성성분과 발효 균주를 통한 항노화 기능성물질의 동반 상승을 가져왔다. 수입 발효녹용보다 질적인 우수성은 물론 가격적 경쟁력 까지 확보하였다. 향후 제품화를 추진할 예정이며, 국내산 녹용의 기능성 발효녹용 시장을 선도할 수 있을 것으로 사료 됨

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수

국내산 녹용의 질병차단 기술개발, 경쟁력강화를 위한 농협안심녹용 8단계 품질관리시스템구축, 수입산과 차별화 기술개발, 대량생산에 적합한 생산수율 향상 최적화 표준공정 기술개발, 녹용품질과 발효방법에 따른 발효균주 선발 및 제품화 등 생산현장 모델 중심 실용화 기술 개발은 1년 단기 과제에서 할 수 없는 매우 많은 연구성과와 현장 접목은 모든 수행기관과 참여기관이 매우 많은 노력의 결실과 성과라 할 수 있음

### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수

논 문 : 4 편 (SCI 3편, 비SCI 1편)

특 허 : 2 편 (국내특허 출원 2건)

발 표 : 6 건

제품화 : 4건 (제품출시 3, 시제품1)

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
특 허 2	40	40	특허 2 특허 균주 기탁 3 건 : 우수
발 표 2	20	20	발표 6 회 : 우수
제품화 2	40	40	제품화 4 건 : 우수
합 계	100점	100점	

## III. 종합의견

### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

① 국내산 녹용 원료의 가축질병 검사법 개발을 통한 질병 차단 시스템을 기반 구성된 “농협안심녹용 품질인증시스템” 도입은 국내산 녹용에 대한 소비자 불안감을 해소하여, 국내산 녹용의 판로 확대에 많은 공헌을 할 것으로 기대된다.

② 국내산 녹용과 수입산녹용의 지표물질 마커에 대한 판별기술 (특허 10-2020-0188073)은 국내산 녹용의 차별화와 GMP용 개발에 기여 할 것으로 사료 됨

③ 국내산 녹용의 제3차 발효녹용 융합기술은 대량생산 산업화 시스템으로 개발 되었으며, 20% 수율 향상에도 불구하고 녹용 고유 기능성생리활성 지표물질(Sialic acid, Glycosaminoglycan, Uronic acid, GABA)의 증가 되어 산업적으로 매우 고무적이다.

④ 발효녹용의 추출물은 예쁜꼬마선충 시험을 통하여 항노화, 항균 활성화를 밝힘으로써 (특허 10-2021-0166105), 향후 건강 기능성식품, 의료, 화장품 등 다양한 분야에서 활용하기가 적합하다. 향후 국내산 녹용의 소비 증진과 경쟁력을 높일 것으로 추정된다.

### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항 : 없음

### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

① 국내산 녹용에 지표물질 마커 기술은 국내산 녹용에 대한 차별화와 우수성 확보를 위한 기술로 활동될 예정이며, 향후 추가적인 연구를 진행할 예정이다.

② 농협안심녹용 품질인증 시스템은 질병차단 시스템을 더욱 강화하여 소비자 신뢰를 높일 수 있도록 지속적인 사업화가 필요하며, 국내산 녹용에 대한 소비 확대에 활용할 예정이다.

③ 국내산 녹용의 7단계 제3차 발효녹용 융합기술은 발효가공 기간의 단축 및 생산비를 절감을 위한 추가적인 연구가 필요하며, GMP 인증을 위한 연구가 지속되길 희망한다.

#### IV. 보안성 검토

o 연구개발성과의 비공개 요청

공개 1년 유예 요청 : 금차 과제에서 사슴소모성질병(CWD)에 대한 검증을 80점 샘플에 대하여 실시하였으며,

후속 과제(과제번호321033-3)에서 보다 많은 시료(1,000점 이상)를 검증할 예정입니다. 녹용을 활용한 질병진단 방법론에 대한 심층 연구와 다양한 검증 결과를 통하여, 차기 연구과제 수행기간(2021년4월 ~ 2023년 12월)내에 특허를 추진코자 합니다.

향후 2023년 까지 공개 유예를 신청합니다.

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

##### 1. 연구책임자의 의견

##### 2. 연구개발기관 자체의 검토결과



4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	녹용의 원산지 판별용 지표물질 바이오마커 발굴 및 농협안심녹용 시스템 구축
②	항노화, 항균 및 항염 활성을 갖는 발효녹용 추출물의 제조방법, 이로부터 얻어진 추출물 및 이러한 추출물의 용도
③	기탁 특허미생물 ① <i>Lactobacillus rhamnosus</i> JLFRLR04 (KACC92399P), ② <i>Lactobacillus sakei</i> JLFRLS07 (KACC92398P), ③ <i>Lactobacillus plantarum</i> LP20B49 (KACC92397P)

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)					
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복	외국기술 체	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애 로결 해	정책 자료	기타
①의 기술	✓						✓		✓	✓	
②의 기술		✓					✓				
③의 기술		✓					✓				

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	국내산 녹용의 차별화 홍보, 마케팅 및 국내산 녹용의 소비자 신뢰성 향상
②의 기술	건강기능성 식품(GMP) 개발에 활용 및 국내산 녹용의 경쟁력 향상
③의 기술	녹용 원료에 따른 발효녹용 균주의 차별화 기술 적용 및 기술력의 차별화

7. 연구종료 후 성과창출 계획

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술인종	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)	
	특허출원	특허등록	품질경영등록	SMART	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출		투자유치	논문 SCI	논문 비SCI			논문평판 I-F	학술발표		정책활용
단위	건	건	건	평판등급	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	20						40							40						
최종목표	2						2			5		2			3					
연구기간내 달성실적	2						3					3	1		6					
연구종료후 성과창출 계획							1													2





## References

- Ba HV, Amna T, Hwang IH. 2013. Significant influence of particular unsaturated fatty acids and pH on the volatile compounds in meat-like model systems. *Meat Sci* 94:480-8.
- Aldunate M, Srbinovski D, Hearps AC, Latham CF, Ramsland PA, Gugasyan R, Cone RA, Tachedjian G. 2015. Antimicrobial and immune modulatory effects of lactic acid and short chain fatty acids produced by vaginal microbiota associated with eubiosis and bacterial vaginosis. *Frontiers in Physiology* 6
- Ba HV, Amna T, Hwang IH. 2013. Significant influence of particular unsaturated fatty acids and pH on the volatile compounds in meat-like model systems. *Meat Sci* 94:480-8.
- Ba HV, Oliveros MC, Ryu KS, Hwang IH. 2010. Development of analysis condition and detection of volatile compounds from cooked Hanwoo beef by SPME-GC/MS analysis. *J Food Sci Anim Resour* 30:73-86.
- Bueno M, Resconi VCR, Campo MM, Cacho J, Ferreira V, Escudero A. 2011. Gas-chromatographic-olfactometric characterization of headspace and mouthspace key aroma compounds in fresh and frozen lamb meat. *Food Chem* 129:1909-1918.
- Canon F, Nidelet T, Guedon E, Thierry A, Gagnaire V. 2020. Understanding the mechanisms of positive microbial interactions that benefit lactic acid bacteria co-cultures. *Front Microbiol* 11:2088.
- Chen J-C, Hsiang C-Y, Lin Y-C, Ho T-Y. 2014. Deer antler extract improves fatigue effect through altering the expression of genes related to muscle strength in skeletal muscle of mice. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2014:540580-540580.
- Cho YR, Chang JY, Chang HC. 2007. Production of gamma-aminobutyric acid (gaba) by *lactobacillus buchneri* isolated from kimchi and its neuroprotective effect on neuronal cells. *J Microbiol Biotechnol* 17:104-109.
- Choi SW, Moon SH, Yang HJ, Kwon DY, Son YJ, Yu R, Kim YS, Kim SI, Chae EJ, Park SJ, Kim SH. 2013. Antiresorptive activity of bacillus-fermented antler extracts: Inhibition of osteoclast differentiation. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2013:748687.
- Constant SL, Bottomly K. 1997. Induction of th1 and th2 cd4+ t cell responses: The alternative approaches. *Annual review of immunology* 15:297-322.
- Cui Y, Miao K, Niyaphorn S, Qu X. 2020. Production of gamma-aminobutyric acid from lactic acid bacteria: A systematic review. *Int J Mol Sci* 21.
- Calkins CR, Hodgen JM. 2007. A fresh look at meat flavor. *Meat Sci* 77:63-80.
- Charalambous G. 1978. *Flavor of Foods and Beverages* (1<sup>st</sup>Ed). Academic Press, Massachusetts, USA.

- Chung TY, Eiserich JP, Shibamoto T. 1993. Volatile compounds isolated from edible Korean chamchwi (Aster scaber thumb). *J Agri Food Chem* 41:1693–1697.
- Dai TY, Wang CH, Chen KN, Huang IN, Hong WS, Wang SY, Chen YP, Kuo CY, Chen MJ. 2011. The antiinfective effects of velvet antler of formosan sambar deer (*cervus unicolor swinhoei*) on staphylococcus aureus-infected mice. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011:534069.
- Daliri F, Aboagye AA, Daliri EB-M. 2020. Inactivation of foodborne pathogens by lactic acid bacteria. *Journal of Food Hygiene and Safety* 35.
- Du CN, Min AY, Kim HJ, Shin SK, Yu HN, Sohn EJ, Ahn CW, Jung SU, Park SH, Kim MR. 2015. Deer bone extract prevents against scopolamine-induced memory impairment in mice. *J Med Food* 18:157–165.
- Dalisova NA, Rozhkova AV, Stepanova EV. 2019. Russian export of products of maral breeding and velvet antler industry. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ Sci* 315:022078.
- Deer Industry New Zealand. 2018. Velvet production and pricing trends. Cited on 2020. 8.  
16<sup>th</sup>. Available at: [https://www.deernz.org/about-deer-industry/nz-deer-industry/deer-industry-statistic/velvet-production-and-pricing-trends#XZ7Q\\_OR7mUK](https://www.deernz.org/about-deer-industry/nz-deer-industry/deer-industry-statistic/velvet-production-and-pricing-trends#XZ7Q_OR7mUK).
- Delgado J, Peromingo B, Nunez F, Asensio MA. 2016. Use of molds and their antifungal proteins for biocontrol of toxigenic molds on dry-ripened cheese and meats. *Curr Opin Food Sci* 11:40–45.
- Elkhatee WA, Zaghlool GM, El-Garawani IM, Ahmed EF, Rate ME, Moneim AE. 2018. *Ganoderma applanatum* secondary metabolites induced apoptosis through different pathways: In vivo and in vitro anticancer studies. *Biomed Pharmacother* 101: 264–277.
- Elmore JS, Warren HE, Mottram DS, Scollan M, Richardson RI, Wood JD. 2004. A comparison of the aroma volatiles and fatty acid compositions of grilled beef muscle from Aberdeen Angus and Holstein-Friesian steers fed diets based on silage or concentrates. *Meat Sci* 68:27–33.
- Feldt T, Antsonantenainarivony O, and Schlecht E. 2017. Feed selection on dry rangelands in southwestern Madagascar: Implications for ruminant nutrition in view of ecological and social challenge. *Journal of Arid Environments*, 144:81–90.
- Gao Z, Daliri EB, Wang J, Liu D, Chen S, Ye X, Ding T. 2019. Inhibitory effect of lactic acid bacteria on foodborne pathogens: A review. *J Food Prot* 82:441–453.
- Geum NG, Eo HJ, Kim HJ, Park GH, Son HJ, Jeong JB. 2020. Immune-enhancing activity of *hydrangea macrophylla* subsp. *Serrata* leaves through tlr4/ros-dependent activation of jnk and nf- $\kappa$ b in raw264. 7 cells and immunosuppressed mice. *Journal of Functional Foods* 73:104139.

- Ghosh AK, Yuan H. 2009. Stereoselective synthesis of the C1–C12 segment of iriomoteolide-1a: a very potent macrolide antitumor agent. *Tetrahedron Letters*, 50: 1416–1418.
- Gilbey A, Perezgonzalez JD. 2012. Health benefits of deer and elk velvet antler supplements: a systematic review of randomized controlled studies. *N Z Med J* 125:80–86.
- Han B, Hoang BX. 2020. Opinions on the current pandemic of covid-19: Use functional food to boost our immune functions. *J Infect Public Health* 13:1811–1817.
- Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T. 1990. Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and l-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J Immunol* 144:1425–1431.
- Huang CC, Chen YM, Kan NW, Chao HL, Ho CS, Hsu MC. 2014. Cornu cervi pantotrichum supplementation improves exercise performance and protects against physical fatigue in mice. *Molecules* 19:4669–4680.
- Jang DW, Ameer K, Oh JH, Park MK. 2020. Optimization and pretreatment for hot water extraction of korean deer (*cervus canadensis erxleben*) velvet antlers. *J Microbiol Biotechnol* 30:1116–1123.
- Jang S, Park ED, Suh HJ, Lee SH, Kim JS, Park Y. 2014. Enhancement of exercise endurance capacity by fermented deer antler in balb/c mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 78:1716–1722.
- Je J, Park P, Kim E, Kim H, Lim D, Jeon B, Ahn C. 2010. Composition of Biologically Active Substances and Antioxidant Activity of New Zealand Deer Velvet Antler Extracts. *J Food Sci Anim Resour* 30:20–27.
- Je J, Park P, Lim D, Jeon B, Kho K, Ahn C. 2011. Antioxidant, Anti-acetylcholinesterase and composition of biochemical components of Russian deer velvet antler extracts. *J Food Sci Anim Resour* 31:349–355.
- Jeon BT, Cheong SH, Kim DH, Park JH, Park PJ, Sung SH, Thomas DG, Kim KH, Moon SH. 2011. Effect of antler development stage on the chemical composition of velvet antler in elk (*Cervus elaphus canadensis*). *Asian Australas J Anim Sci* 24:1303–1313.
- Jeon BT, Moon SH, Lee SR, Kim MH. 2010. Changes in amino acid, fatty acid and lipid composition by the growth period in velvet antler. *J Food Sci. Anim Resour* 30:898–996.
- Jung Y-J, Han, Dong-Oh, Park, Chul, Lee, Hye-Jung, Kim, Sung-Hoon, Hahm, Dae-Hyun. 2007. Effect of fermented herbal extracts, hp-1 on enzyme activities and gene expressions related to alcohol metabolism in ethanol-loaded rats. *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine*.

- Kang M, Ha JH, Lee Y. 2020. Physicochemical properties, antioxidant activities and sensory characteristics of commercial gape vinegars during long-term storage. *Food Sci. Technol (Campinas)* 40 (4).Oct-Dec. DOI: 10.1590/fst.25119
- Kawtikwar PS, Bhagwat DA, Sakarkar DM. 2010. Deer antlers-traditional use and future prospectives. *Indian J Tradit Know* 9:245-251.
- Ke LJ, Lin DY, Huang XN, Huo YS, Rao PF, Ye XY. 2008. Comparison of protein composition and activities of pilose antler processed by different methods, *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 01 Jan 2008, 31(1):11-14.
- Kim DK, Lee SH, Lee ED, Lee JW, Roh HJ, Lee SS, Jang A, & Kim KW. 2021. Analysis of Component Changes According to Early Cutting of Elk Velvet Antlers, *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*, 22,(2): 565-576.
- Kim M-K, Jung E-Y, Lee H-S, Shin K-S, Kim Y-K, Ra K-S, Park C-S, Woo M-J, Lee S-H, Kim J-S. 2009. Isolation of strain for the preparation of the fermented antler and its physiological activities. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* 38:1237-1242.
- Kim S-H, Ameer K, Oh J-H, Park M-K. 2020. Characterization of hot water extract from korean deer velvet antler (*Cervus canadensis* erxleben). *Korean Journal of Food Preservation* 27:725-733.
- Kim Y-A, Kim S-W, Lee M-H, Lee H-K, Hwang I-H. 2021b. Comparisons of chemical composition, flavor and bioactive substances between korean and imported velvet antler extracts. *Food Science of Animal Resources* 41:386-401.
- Kim Y, Mylonakis E. 2012. *Caenorhabditis elegans* immune conditioning with the probiotic bacterium *Lactobacillus acidophilus* strain ncfm enhances gram-positive immune responses. *Infection and immunity* 80:2500-2508.
- Kyung-Yun Choi SYH, Su-Chan Lee and Si-Kwan Kim. 2006. Effect of antler velvet ethanol extract on common serum chemistry panels and histopathological change in rats exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Korean Soc Food Sci Nutr* 35:1178-1184.
- Lai AK, Hou WL, Verdon DJ, Nicholson LF, Marling PM. 2007. The distribution of the growth factors FGF-2 and VEGF and their receptors, in growing deer antler. *Tissue Cell* 39:35-46.
- Lambert Y, Demazeau G, Largeteau A, Bouvier JM. 1999. Changes in aromatic volatile composition of strawberry after high pressure treatment. *Food Chem* 67:7-16.
- Lee SR, Jeon BT, Kim SJ, Lee SM, Moon SH. 2007. Effects of antler development stage on fatty acid, vitamin and GAGs contents of velvet antler in spotted deer (*Cervus Nippon*). *Asian-Austras J Anim Sci* 20:1546-1550.
- Lee ES, Ju HK, Moon TC, Lee E, Jahng Y, Lee SH, Son JK, Baek SH, Chang HW. 2004. Inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha (tnf-alpha) production by propenone compound through blockade of nuclear factor (nf)-kappa b activation in cultured murine macrophages. *Biol Pharm Bull* 27:617-620.

- Lee M, Sun B, Gu L, Wang C, Fang Z, Wang Z, Mo E, Ly S, Sung C. 2009. Effects of the deer antler extract on scopolamine-induced memory impairment and its related enzyme activities. *The Korean Society of Food Science and Nutrition* 30:409–414.
- Lee SH, Yang HW, Ding Y, Wang Y, Jeon YJ, Moon SH, Jeon BT, Sung SH. 2015. Anti-inflammatory effects of enzymatic hydrolysates of velvet antler in raw 264.7 cells in vitro and zebrafish model. *EXCLI J* 14:1122–1132.
- Leroy F, De Vuyst L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology* 15:67–78.
- Li C. 2012. Deer antler regeneration: a stem cell-based epimorphic process, *Birth Defects Research C: Embryo Today* 96:51–62.
- Lim PS, Loke CF, Ho YW, Tan HY. 2020. Cholesterol homeostasis associated with probiotic supplementation in vivo. *J Appl Microbiol* 129:1374–1388.
- Lopez-Alarcon C, Denicola A. 2013. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. *Anlytica Chimica Acta* 763:1–10.
- Lü Y, Zhang H, Meng X, Wang L, Guo X. 2010. A validated hplc method for the determination of gaba by pre-column derivatization with 2,4-dinitrofluorodinitrobenzene and its application to plant gad activity study. *Analytical Letters* 43:2663–2671.
- Machiels D, van Ruth SM, Posthumus MA, Istasse L. 2003. Gas chromatography-olfactometry analysis of the volatile compounds of two commercial Irish beef meats. *Talanta* 60:755–764.
- Macleod G, Ames JM. 1988. Soy flavor and its improvement. *CRC Crit Revs Food Sci Nutr* 27:219–400.
- Macleod G. 1994. Flavor of beef. In: *Flavor of Meat and Meat Product*. Shahidi F (Edt.) Blackie Academic & Professional. Bishobriggs, Glasgow, New Zealand.
- Matilainen R, Tummavuori J. 1996. Iron determination in fertilizers by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry: study of spectral and interelement effects at different wavelengths. *J AOAC Int* 79: 22–28.
- Matsuishi M, Igeta M, Takeda S, Okitani A. 2004. Sensory factors contributing to the identification of the animal species meat. *J Food Sci* 69: S218–S220.
- Microbiological Guideline for Food Safety, Food and Environment Hygiene. 2014. Queensway, Hong Kong. Cited 2020.8.15.<sup>th</sup>. Available at: <http://www//cfs.gov.hk/English/food-leg-Microbiological-Guidelines-for-Food-e.pdf>.
- Ming T, Han J, Li Y, Lu C, Qiu D, Li Y, Zhou J, Su X. 2018. A metabolomics and proteomics study of the *lactobacillus plantarum* in the grass carp fermentation. *BMC Microbiol* 18:216.
- Mosmann T, Coffman R. 1989. Th1 and th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual review of immunology* 7:145–173.

- Muntean A, Smical I, Török Z. 2017. Validation of an alternative method for total nitrogen analysis in water samples. *Studia Universitatis Babeş-Bolyai Chemia* 62:101-110.
- Mottram DS. 1998. Flavor formation in meat and meat products: a review. *Food Chem* 62:415-424.
- Murat C, Gourrat K, Jeroch H, Cayot N. 2012. Analytical comparison and sensory representativity of SAFE, SPME, and Purge and Trap extracts of volatile compounds from pea flour. *Food Chem* 135:913-920.
- Park MR, Ryu S, Maburutse BE, Oh NS, Kim SH, Oh S, Jeong SY, Jeong DY, Oh S, Kim Y. 2018. Probiotic *lactobacillus fermentum* strain jdfm216 stimulates the longevity and immune response of *caenorhabditis elegans* through a nuclear hormone receptor. *Sci Rep* 8:7441.
- Park MR, Shin M, Mun D, Jeong S-Y, Jeong D-Y, Song M, Ko G, Unno T, Kim Y, Oh S. 2020. Probiotic *lactobacillus fermentum* strain jdfm216 improves cognitive behavior and modulates immune response with gut microbiota. *Scientific Reports* 10:21701.
- Park Y, Choi HS, Lee HS, Suh HJ. 2015. Hematopoietic effect of deer antler extract fermented by *bacillus subtilis* on murine marrow cells. *Nutr Res Pract* 9:451-458.
- Patterson E, Ryan PM, Wiley N, Carafa I, Sherwin E, Moloney G, Franciosi E, Mandal R, Wishart DS, Tuohy K, Ross RP, Cryan JF, Dinan TG, Stanton C. 2019. Gamma-aminobutyric acid-producing lactobacilli positively affect metabolism and depressive-like behaviour in a mouse model of metabolic syndrome. *Sci Rep* 9:16323.
- Perez-Chabela ML, Rodriguez-Serrano GM. 1999. Microbial spoilage of meats for retail sale in Mexico City. *Meat Sci* 51:279-282.
- Qu J, Chen W, Luo G, Wang Y, Xiao S, Ling Z and Chen G. 2002. Rapid determination of underivatized pyroglutamic acid, glutamic acid, glutamine and other relevant amino acids in fermentation media by LC-MS-MS. *Analyst* 127:66-69.
- Raveschot C, Cudennec B, Coutte F, Flahaut C, Fremont M, Drider D, Dhulster P. 2018. Production of bioactive peptides by *lactobacillus* species: From gene to application. *Front Microbiol* 9:2354.
- Ren Z, Qin T, Qiu F, Song Y, Lin D, Ma Y, Li J, Huang Y. 2017. Immunomodulatory effects of hydroxyethylated hericium erinaceus polysaccharide on macrophages raw264.7. *International journal of biological macromolecules* 105:879-885.
- Rhee SJ, Lee JE, Lee CH. 2011. Importance of lactic acid bacteria in asian fermented foods. *Microb Cell Fact* 10 Suppl 1:S5.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical decoloration assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
- Rico-Munoz E, Samson RA, Houbraken J. 2019. Mold spoilage of foods and beverages: Using the right methodology. *Food Microbiol* 81:51-62.

- Riu-Aumatell M, Castellari M, Lopez-Tamames E, Galassi S, Buxaderas S. 2004. Characterization of volatile compounds of fruit juices and nectars by HS/SPME and GC/MS. *Food Chem* 87:624-637.
- Schindler S, Krings U, Berger RG, Orlie V. 2010. Aroma development in high pressure treated beef and chicken meat compared to raw and heat treated. *Meat Sci* 86:317-323.
- Shimada K, Fujikawa K, Yahara R, Nakamura T. 1992. Antioxidant properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J Agr Food Chem* 40:945-948.
- Suresh C, Das A, Katole S, Saini M, and Swarup D. 2013. Effect of Concentrate Supplementation on Feed Consumption, Nutrient Utilization and Blood Metabolite Profile in Captive Spotted Deer (*Axis axis*) Fed Oat (*Avena sativa*) and Berseem (*Trifolium alexandrinum*) Fodders Based Diet. *Zoo Biology* 32(2): 195-203.
- Sui Z, Zhang L, Huo Y, Zhang Y. 2014. Bioactive components of velvet antlers and their pharmacological properties. *J Pharm Biomed Anal* 87:229-240.
- Sun S-W, Lin Y-C, Weng Y-M, Chen M-J. 2006. Efficiency improvements on ninhydrin method for amino acid quantification. *Journal of Food Composition and Analysis* 19:112-117.
- Tajchman K, Steiner-Bogdaszewska Ż, Kowalczyk-Vasilev E, and Dąbrowski R. 2019. Effect of Ca and P supplementation on the haematological parameters and content of selected minerals in the blood of young farmed fallow deer males (*Dama dama*). *Biologia* 75:401-411.
- Tapiero H, Twe KD. 2003. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomed Pharmacother* 57:399-411.
- Tona GO. 2018. Current and Future Improvements in Livestock Nutrition and Feed Resources, *Animal Husbandry and Nutrition*, DOI: 10.5772/intechopen.73088.
- Vendramini AL, Trugo LC. 2000. Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia puniceifolia* L.) at three stages of maturity. *Food Chem* 71:195-198.
- Wang D, Berg D, Ba H, Sun H, Wang Z & Li C. 2019. Deer antler stem cells are a novel type of cells that sustain full regeneration of a mammalian organ—deer antler, *Cell Death & Disease* volume 10, Article number: 443.
- Ward JF, Asher GW, Archer JA, Nicoll GB, Dodds KG, Cox NR. 2014. Genetic effects on first antler growth in relation to live-weight of red deer farmed in New Zealand. *Livestock Sci* 167:92-99.
- Wu F, Li H, Jin L, Li X, Ma Y, You J, Li S, Xu Y. 2013. Deer antler base as a traditional Chinese medicine: A review of its traditional uses, chemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol* 145:403-415.

- Widyastuti Y, Febrisiantosa A, Tidona F. 2021. Health-promoting properties of lactobacilli in fermented dairy products. *Front Microbiol* 12:673890.
- Yu WY, Gao YG, Hao JX, Li P, Zhang LX. 2011. Enzymatic hydrolysis of coronet protein and antioxidative activity of hydrolysate. *Lishizhen Medi Mat Med Res* 22:2699–2700.
- Yadav H, Jain S, Rastamanesh R, Bomba A, Catanzaro R, Marotta F. 2012. Fermentation technology in the development of functional foods for human health: Where we should head. *Ferment Technol* 1.
- Zarei M, Fazlara A, Alijani N. 2019. Evaluation of the changes in physicochemical and antioxidant properties of honey during storage. *Functional Foods in Health and Disease* 9(9), 2019 DOI: 10.31989/ffhd.v9i9.616
- Zha E, Li X, Li D, Guo X, Gao S, Yue X. 2013. Immunomodulatory effects of a 3.2kda polypeptide from velvet antler of cervus nippon temminck. *Int Immunopharmacol* 16:210–213.
- Zhao Z, Wu X, Chen H, Liu Y, Xiao Y, Chen H, Tang Z, Li Q, Yao H. 2021. Evaluation of a strawberry fermented beverage with potential health benefits. *PeerJ* 9:e11974.
- Zhou QL, Liu YQ, Wang Y, Guo YJ, Wang BX. 2001. [a comparison of chemical composition and bioactivity of polypeptides from velvet antlers of cervus nippon temminck and cervus elaphus linnaeus]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 26:699–702.
- Zhang HS, Wang SQ. 2006. Notoginsenoside R1 inhibits TNF- $\alpha$ -induced fibronectin production in smooth muscle cells via the ROS/ERK pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, 40: 1664–1674.
- Zhang L, Wang J, Li T, Li P, Wang Y, Yang M, Liu J, Liu J. 2019. Determination of the chemical components and phospholipids of velvet antler using UPLC/QTOF-MS coupled with UNIFI software. *Exp Ther Med* 17:3789–3799.
- Zhao L, Wang X, Zhang X, Xie Q. 2016. Purification and identification of anti-inflammatory peptides derived from simulated gastrointestinal digests of velvet antler protein (*Cervus elaphus Linnaeus*). *J Food Drug Anal* 24:376–384.
- Zhao L, Pei R, Ji B, Luo Y, Zhang D, Xu Z, Jia X. 2010. Antioxidant activity of aqueous extract fractions of velvet antler (*Cervus elaphus Linnaeus*). *J Food Drug Anal* 18:319–327.
- Zhou QL, Liu YQ, Wang Y, Guo YJ, Wang BX. [A comparison of chemical composition and bioactivity of polypeptides from velvet antlers of Cervus nippon Temminck and Cervus elaphus Linnaeus]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2001;26(10):699–702.



#### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농축산물안전유통소비기술개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농축산물안전유통소비기술개발 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.