

발간 등록 번호  
11-1543000-001866-01

# 지리산 권역 약용작물의 고부가가치 제품 및 6차 산업 연계 모델 개발

최종보고서

(0.1cm)

2017. 09. 12.

주관연구기관 / 경남과학기술대학교 산학협력단  
협동연구기관 / 경상대학교 산학협력단  
(재)경남한방약초연구소

농림축산식품부

11-  
1543000-  
001866-  
01

제지리산권역  
품및 6차산업연계  
및 6차산업연계  
의 고부가가치  
개발

최종보고서

2017

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “지리산권 권역 약용작물의 고부가가치 제품 및 6차산업 연계 모델 개발” (개발기간 : 2014.07.29 ~ 2017.07.28)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 09. 12.

주관연구기관명 : 경남과학기술대학교 산학협력단 (대표자) 전중창 (인)

협동연구기관명 : 경상대학교 산학협력단 (대표자) 정중일 (인)

협동연구기관명 : (재)경남한방약초연구소 (대표자) 최용초 (인)

참여기관명 : 몽고식품(주) (대표자) 김현승 (인)

참여기관명 : (주)자연애제약 (대표자) 장미정 (인)

참여기관명 : 경남생약농업협동조합 (대표자) 윤종택 (인)

주관연구책임자 : 조 계 만

협동연구책임자 : 박 상 원

협동연구책임자 : 김 윤 근

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

## 보고서 요약서

과제고유번호	314021-3	해 당 단 계 연구 기 간	2014.07.29.~ 2017.07.28	단 계 구 분	(해당단계)/ (중 단 계)
연구 사업 명	중 사업 명	농생명산업기술개발사업 생명자원 활용			
	세부 사업명	농림식품경제·사회-농(산)촌사회·문화-농(산)촌휴양·관광 개발 식품-식품공학-식품가공·공정			
연구 과제 명	대 과 제 명	약용작물의 고부가가치 산업화 제품 및 6차 산업화 연계모델 개발			
	세부 과제명	지리산 권역 약용작물의 고부가가치 제품 및 6차 산업화 연계모델 개발			
연구 책임자	조계만	해당단계 참 여 연구원 수	총: 129명 내부: 56명 외부: 73명	해당단계 연구 개발비	정부: 1,290,000천원 민간: 510,000천원 계: 1,800,000천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 129명 내부: 56명 외부: 73명	총 연구개발비	정부: 1,290,000천원 민간: 510,000천원 계: 1,800,000천원
연구기관명 및 소속 부서 명	경남과학기술대학교 산학협력단 (식품과학부, 농학한약자원학부, 창업학과)			참여기업명: 몽고식품(주), (주)자연애제약, 경남생약농업협동조합	
협 동 연 구	연구기관명: 경상대학교 산학협력단 (재)경남한방약초연구소			연구책임자: 박상원 (변경 전: 김현준) 김윤근 (변경 전: 김준영)	

### 1. 연구결과 요약

- 소스 및 조미료 제조용 발효미생물 확보와 이를 이용한 식물성소스 및 자연조미료 제조공정 확립, 시제품화 및 제품화
- 약용작물 복합추출물을 활용한 기능성음료(항산화, 항고혈압, 간보호, 항당뇨) 제품화 기술 확보
- 약용작물(도라지, 하수오, 자소엽, 당귀)의 일반성분, 특수성분 및 가공 중 향기성분과 후각검사를 통한 관능평가 실시
- 주요약용작물의 유전자원 수집, 기내 증식과 부정근 배양 조건 확립 및 ARMS-PCR 기술과 HRM curve 패턴을 이용한 약용작물의 기원 판별 기술 확립. 특히, 백수오와 이엽우피소 판별법을 확립하여 농가실증시험 완료
- 농산업 트렌드변화 분석을 통한 6차산업 조직변화 방향 제시와 참여기업의 지속적인 성장을 위한 컨설팅 실시
- 세포실험과 동물실험을 통해 약용버섯 추출물, 약용작물 복합추출물 및 적하수오 추출물의 안전성, 효능 및 기전을 분석
- 약용작물의 지표물질, 기능성대사체 분석과 약용작물 재배시스템 확립 및 대량추출체계 확립
- 지리산권 약용작물 6차산업 네트워크 구축을 위한 심포지엄, 워크숍 및 교육 실시. 특히 산청군 한방약초산업 제2의 부흥을 위해 산청향노화포럼 조직을 통한 산청군 한방향노화산업 로드맵 제시

### 2. 연구성과 요약

- 사업화 지표 : 특허출원 17건과 등록 1건 (1건 진행 중), 기술 실시 1건 (2건 진행 중), 기술가치평가 1건, 기술인증 1건, 제품화 4건, 매출액 203백만원
- 연구기반 지표 : SCI급 논문 5편, KSCI급 논문 13편, 학술대회 발표 48건, 교육지도 33건, 인력양성 22명(박사후 1명, 박사 5명, 석사 13명, 학사 3명), 정책활용 2건, 홍보전시 28건, 보고서 4건, 수상 5건, 민간조직 3건

보고서 면수 : 452

## 〈 국문 요약문 〉

	코드번호	D-01
<b>연구의 목적 및 내용</b>	<p><b>1. 최종목표 :</b> 산청군 한방약초 6차 산업화를 통한 한방약초산업 발전</p> <p>(1) 정성적 목표 :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 약용작물/약용버섯 활용 천연소스/조미 제품화 기술 개발</li> <li>○ 약용작물 활용 기능성 음료/드링크 제품화 기술 개발</li> <li>○ 약용작물/약용버섯의 비만/고지혈증/당뇨 개선효과</li> <li>○ 약용작물 활용 제품의 영양특수성분 표준화 및 관능평가</li> <li>○ 약용작물의 유전자원 수집, 판별, 보존 및 보급 체계 구축</li> <li>○ 약용작물 기반 기능성 대사체 대량추출 및 표준화</li> <li>○ 산청군 한방약초를 기반으로 하는 6차 산업 비즈니스 모델 제시</li> <li>○ 산청군 한방약초를 기반으로 하는 지속적 수익창출 비즈니스 모델 제시</li> <li>○ 약용작물 활용 가공제품의 마케팅 모델 제시</li> <li>○ 산청군 한방약초 6차 산업 육성을 위한 산·학·연·관 네트워크 구축</li> </ul> <p>(2) 정량적 목표 (사업종료 후 3년) :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 사업화 지표 : 특허출원 8건과 등록 8건, 기술거래 4건, 제품화 4건, 기술인증 2건</li> <li>○ 연구기반 지표 : SCI급 논문 10편, KSCI급 논문 18편, 학술대회 발표 21건, 교육지도 9건, 인력양성 10명, 정책활용 3명, 홍보전시 20건</li> </ul> <p><b>2. 연구 내용 :</b></p> <p>(1) 지리산 권역 약용작물 활용 천연소스·조미 제품화 기술 및 6차 산업 네트워크 구축</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 고초균 발효를 이용한 천연소스 및 천연조미 제품 제조</li> <li>○ 식용/약용버섯균사체 발효를 이용한 천연소스 및 천연조미 제품 제조</li> <li>○ 젖산균 발효를 이용한 천연소스 및 천연조미 제품 제조</li> <li>○ 산청군 한방약초 6차 산업 육성을 위한 산·학·연·관 네트워크 구축</li> </ul> <p>(2) 지리산 권역 약용작물 활용 기능성 음료·드링크 제품화 기술</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 약용작물의 추출 및 혼합 최적화 연구</li> <li>○ 약용작물 복합추출물의 최적 발효조건 확립</li> <li>○ 음료류 개발을 위한 최적의 혼합 레시피 개발</li> </ul> <p>(3) 지리산 권역 약용작물 활용 제품의 표준화 및 관능평가</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 약용작물 제조 조건의 영양 및 특수성분 표준화</li> <li>○ 약용작물 제품의 위해성 성분 검토</li> <li>○ 약용작물 제품의 관능검사</li> </ul> <p>(4) 지리산 권역 자생 토종 약용작물의 판별 마커 및 보존 기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 자생하는 토종 약용작물(하수오, 당귀, 천궁)의 유전자원 수집 및 보존 체계 구축</li> <li>○ 유사 약용작물의 중·속간 구분용 분자생물학적 바코드의 개발 구축</li> <li>○ 자생 토종 약용작물의 기원 판별을 위한 분자생물학적 마커 개발</li> </ul> <p>(5) 지리산 권역 약용작물 활용 6차 산업 및 수익창출 모델 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 지리산 권역 약용작물 활용 6차 산업 및 수익창출 모델 개발 업무 프로세스</li> <li>○ 산청군 한방약초를 기반으로 하는 지속적 수익창출 비즈니스 모델 제시</li> <li>○ 산청군 한방약초 재배 농민과 가공업체 재직자 역량강화 교육 및 네트워크 구축</li> <li>○ 산청군 한방약초를 기반으로 하는 스토리 발굴과 가공제품의 마케팅 모델 개발</li> </ul> <p>(6) 지리산 권역 약용작물 복합추출물의 생활습관성 질환 개선 효과 검증</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 약용작물의 안전성 및 효능을 세포주를 이용하여 검증</li> <li>○ 비만/고지혈증 동물모델을 활용한 고지혈증 및 비만 개선효과 평가</li> <li>○ 지방간 동물모델에서 추출물의 지방간 개선효과 평가 및 기전 연구</li> <li>○ 약용버섯 추출물의 생활습관성 질환(비만/지방간/당뇨) 개선효과 평가</li> </ul> <p>(7) 지리산 권역 약용작물의 대량생산 및 표준화</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 약용작물의 기능성 chemical marker 탐색</li> <li>○ 약용작물 소재 기반 기능성 대사체 대량추출 체계 확립 및 표준화</li> <li>○ 약용작물의 원료보급을 위한 원료 수급시스템 구축 및 대량 추출물 생산</li> </ul>	

연구개발  
성과

1. 연구결과

- (1) 지리산 권역 약용작물 활용 천연소스·조미 제품화 기술 및 6차 산업 네트워크 구축
- 영지버섯, 적하수오의 성분분석 및 생리활성(*in vitro*) 확인
    - 영지버섯의 일반성분,  $\beta$ -glucan, 비타민 분석 및 생리활성 확인
    - 적하수오의 생리활성 물질 및 산화적 스트레스 개선효과 확인
  - 식물성 소스 및 조미료 제조
    - 식물성 소스 및 조미료 제조를 위한 고초균 그룹 선발 및 동정 : 2종
    - 식물성 소스 및 조미료 제조를 위한 가바생성 유산균 그룹 선발 및 동정 : 2종
    - 선발 고초균 이용 청국장 베이스 식물성 소스 제조 및 생리활성 확인
    - 선발 유산균 이용 발효음료, 콩발효물 혹은 발효조미료 제조 및 생리활성 확인
  - 진균류에 의한 활성글루텐 가수분해-발효물을 이용한 약초조미료 제조
    - 진균류 4종을 이용한 활성글루텐 가수분해-발효물 제조하고 이를 베이스로 약초 복합추출물 첨가 조미료 제조와 생리활성 확인
    - 삼 발효물과 송이버섯균사체 콩발효물 이용 기능성 조리료 제조 및 생리활성 확인
  - 지리산권 약용작물 6차산업 네트워크 구축
    - 심포지엄, 워크숍 및 교육 실시
    - 산청항노화포럼 조직 결성 : 산청군 한방항노화산업 로드맵 제시  
(1차 전략약초 생산, 2차산업 가공제품 및 3차산업 항노화 웰니스 관광 연계)
- (2) 지리산 권역 약용작물 활용 기능성 음료·드링크 제품화 기술
- 백하수오와 자소엽을 활용한 기능성 음료개발
    - 백하수오와 자소엽 복합추출물의 생리활성 검정
    - 백하수오와 자소엽 복합추출물의 최적 발효조건 확립
  - 도라지와 영경귀를 활용한 기능성 음료개발
    - 도라지와 영경귀 복합추출물의 생리활성 검정
    - 도라지와 영경귀 복합추출물의 최적 발효조건 확립
  - 영경귀, 백하수오, 자소엽, 당귀 및 도라지를 활용한 기능성 음료개발
    - 영경귀, 당귀 및 도라지 복합추출물의 간보호 및 항산화활성 검정
    - 백하수오, 당귀 및 도라지 복합추출물의 항고혈압 및 항산화활성 검정
    - 자소엽, 당귀 및 도라지복합추출물의 항당뇨 및 항산화활성 검정
- (3) 지리산 권역 약용작물 활용 제품의 표준화 및 관능평가
- 4가지 약용작물의 구성 및 유리 아미노산 조성 및 무기질 성분 탐색결과를 통해서 개발 예정 제품의 영양적 특성 파악을 위한 기초자료로 활용가능
  - 4가지 약용작물의 총페놀함량 및 항산화성을 통한 항산화 기능을 가지는 제품의 개발을 위한 중요한 결과 제시
  - 4가지 약용작물내 벤조피렌의 성분 유무를 통해 제품의 안정성 확보
  - 4가지 약용작물의 휘발성 향기성분 결과를 통해 개발 예정제품의 관능적 특성을 제시
- (4) 지리산 권역 자생 토종 약용작물의 판별 마커 및 보존 기술 개발
- 백도라지, 백수오, 당귀, 꾸지뽕, 영경귀 등의 국내자생종 및 외국종의 수집, 보존, 기내 증식, 부정근 배양 조건 확립
    - 경남농업기술원, 경남한방약초연구소 및 경남생약조합간의 협력을 통한 우수 약용 자원 농가보급시스템 구축
  - 핵내 ITS 및 엽록체(trnL-trnF, mat K)유전자의 SNP를 이용한 국내 자생 토종 약용작물의 판별 마커 개발 : ARMS-PCR기술 적용
    - 농가에서 수집한 백수오의 진위여부 판별
    - 참당귀, 세발당귀, 중국당귀, 일당귀, 구당귀의 판별 마커 개발
    - 꾸지뽕과 영경귀의 국내자생종 판별 기술 개발
  - HRM curve 패턴 비교 분석기술을 이용한 국내자생 토종 약용작물의 판별 및 혼입 여부 분석 조건 확립
    - 참당귀, 세발당귀, 중국당귀, 일당귀, 구당귀의 판별 및 혼재여부 확인 조건 확립
    - 국내 자생 꾸지뽕과 영경귀의 판별과 외국종과의 혼재 여부 확인 조건 확립

<p style="text-align: center;"><b>연구개발 성과</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 가짜 백수오 등 유사약용작물 혼입 또는 교잡종의 판별 기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 핵내 유전자인 ITS와 엽록체 유전자인 trnL-trnF 및 mat K유전자의 판별마커를 이용하여 종이 동일하거나 다른 계통간 중간 또는 속간 교잡종의 판별 가능성 제시</li> </ul> </li> <li>(5) 지리산 권역 약용작물 활용 6차 산업 및 수익창출 모델 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 농산업 트렌드 변화 분석을 통한 6차산업 조직변화 방향 제시</li> <li>○ 지속적 수익창출을 위한 참여기업의 기업가정신 강화 컨설팅 진행</li> <li>○ 산청군 도라지 이용 6차산업 비즈니스 모델 수립</li> </ul> </li> <li>(6) 지리산 권역 약용작물 복합추출물의 생활습관성 질환 개선 효과 검정 <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 약용버섯 추출물과 약용작물 복합추출물의 농도별 안전성 및 효능 확인</li> <li>○ 고지방식이 동물모델에서 약용버섯 추출물의 지방축적, 지방간 및 인슐린 저항성 개선 효능과 관련 기전 확인</li> <li>○ 적하수오 추출물의 농도별 안전성 및 효능 확인과 고지방식이 동물모델에서 적하수오 추출물의 지방축적, 지방간 및 인슐린 저항성 개선 효능과 관련 기전 확인</li> </ul> </li> <li>(7) 지리산 권역 약용작물의 대량생산 및 표준화 <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 지리산권역 약용작물(도라지, 하수오, 자소엽, 당귀)의 화합물 구조·분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 백수오 (4-Hydroxyacetophenon, 2,4-Dihydroxyacetophenon), 자소엽 (scopoletin, rosmarinic acid), 당귀 (nodakenin)</li> </ul> </li> <li>○ UPLC Q-TOF 이용 약용작물(백수오, 적하수오, 이엽우피소, 당귀, 도라지, 자소엽)의 기능성 대사체 선별 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 생육시기별(묘종, 3개월 혹은 6개월) 약용작물 의 기능성 대사체 분석</li> <li>- 부위별(줄기, 잎, 뿌리) 약용작물의 기능성 대사체 분석</li> </ul> </li> <li>○ 육묘장과 재배단지 이용 약용작물 시험재배 및 대량추출체계 확립</li> </ul> </li> </ul> <p><b>2. 연구성과</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>(1) 사업화 지표 : 특허출원 17건과 등록 1건 (1건 진행 중), 기술실시 1건 (이전 2건 진행 중), 기술가치평가 1건, 기술인증 1건, 제품화 4건, 매출액 203백만원</li> <li>(2) 연구기반 지표 : SCI급 논문 5편, KSCI급 논문 13편, 학술대회 발표 48건, 교육지도 31건, 인력양성 23명(박사후 1명, 박사 5명, 석사 14명, 학사 3명), 정책활용 2건, 홍보전시 28건, 보고서 3건, 수상 5건, 민간조직 3건</li> </ul>				
<p style="text-align: center;"><b>연구개발 성과의 활용계획 (기대효과)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 한방약초 이용 경남 대표상품 및 수출전략 상품 개발</li> <li>○ 한방약초 활용 기능성음료 개발을 통한 신규 기능성음료 시장 개척</li> <li>○ 참여기업 기술이전을 통한 산업화</li> <li>○ 한방약초 추출물 혹은 발효물의 임상효능 검정 필요</li> <li>○ 국내토착 생물자원의 확보 효과</li> <li>○ 식품관련 기술 진보 효과</li> <li>○ 항노화 타겟 질병 개선에 대한 과학적 근거 마련</li> <li>○ 우리 토종 약초의 고부가가치 창출 효과</li> <li>○ 1:2:3차 산업의 동반상승에 따른 6차산업 육성 효과</li> <li>○ 산청군 혹은 경상남도 항노화산업화를 가속화시키는 시너지 효과</li> <li>○ 약초산업의 글로벌 리더로 성장 효과</li> </ul>				
<p style="text-align: center;"><b>중심어 (5개 이내)</b></p>	지리산권 약용작물	식품가공	생활습관병	비즈니스 모델	6차 산업화

## < SUMMARY >

	코드번호	D-02
Purpose & Contents	<p><b>1. Final purpose</b> : Herbal medicine industry is developed through 6th industrialization of Oriental herb medicine at Sancheong-gun</p> <p>(1) Qualitative purpose :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Development technology of natural source and seasoning using medicinal plants or mushrooms</li> <li>○ Development technology of functional beverage or drink using medicinal plants</li> <li>○ Improved Obesity, hyperlipemia, or diabetic effects of medicinal plants or mushrooms</li> <li>○ Standardization and sensory evaluation of products containing components of medicinal plants</li> <li>○ Collection, identification, preservation and dissemination of genetics of medicinal plants</li> <li>○ Mass extraction and standardization of functional metabolites based on medicinal plants</li> <li>○ 6th industrial business model based on herbal medicine industry at Sancheong-gun</li> <li>○ Continuous revenue-generating business model based on herbal medicine industry at Sancheong-gun</li> <li>○ Marketing model of processed products using medicinal plants</li> <li>○ Construction of network related industry, University, institute, and administrative agencies for developed 6th industry with herbal medicine at Sancheong-gun</li> </ul> <p>(2) Quantitative purpose (3 years after project completion) :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Industrializing products : 8 patent application for 8 registration, 4 technology transfer, 2 new employments, 4 final products, and 2 technical certification</li> <li>○ Scientific products : 10 SCI journal publications, 12 KCI journal publication, 21 conference presentation, 4 technical guidances; 4 manpower cultivation, 3 policy utilizations, and 20 promotions-exhibitions</li> </ul> <p><b>2. Research contents</b></p> <p>(1) Development technology of natural source and seasoning using medicinal plants in Mt. Jiri and the network construction for 6th industry</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Manufacture of natural sauces and natural seasonings using the fermentation of Bacillus</li> <li>○ Manufacture of natural sauces and natural seasonings using the fermentation of mycelium of edible or medicinal mushroom</li> <li>○ Manufacture of natural sauces and natural seasonings using the fermentation of lactic acid bacteria</li> <li>○ Construction of network related industry, University, institute, and administrative agencies for developed 6th industry with herbal medicine at Sancheong-gun</li> </ul> <p>(2) Development technology of functional beverage or drink using medicinal plants produced Mt. Jiri area</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Study on extraction and mixing optimization of medicinal plants</li> <li>○ Establish optimal fermentation condition of the mixtures of medicinal plants</li> <li>○ Development of optimal mixed recipe for beverage products</li> </ul> <p>(3) Standardization and sensory evaluation of products containing components of medicinal plants in Mt. Jiri</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Standardization of nutritions and biological compounds of medicinal plants</li> <li>○ Risk component investigation of products containing components of medicinal plants</li> <li>○ Sensory evaluation of products containing components of medicinal plants</li> </ul> <p>(4) Development of discrimination markers and preservation technology of medicinal plants in Mt. Jiri</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Genetic resource collection and preservation system construction of medicinal plants</li> <li>○ Development of molecular biologic barcode for classification of dependent medicinal plants</li> <li>○ Development of molecular biologic barcode for the identification of the origin of native medicinal plants</li> </ul>	



<p><b>Purpose &amp; Contents</b></p>	<p>(5) Developed 6th industry and profit generation model using medicinal plants in Mt. Jiri</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 6th industry and development process of revenue generation model using medicinal plants in Mt. Jiri</li> <li>○ 6th industrial business models based on herbal medicine industry at Sancheong-gun</li> <li>○ Establishment of education and network strengthening capacity of cultivated farmers and processors in Sancheong-gun</li> <li>○ Story excavation and marketing model of processed products based on herbal medicine industry at Sancheong-gun</li> </ul> <p>(6) Identifying the effects of improving lifestyle-related diseases of the mixtures of medicinal plants</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Confirm safety and efficacy of the mixtures of medicinal plants based on cellular systems</li> <li>○ Evaluation of hyperlipidemia and obesity improvement effect based on high-fat diet models</li> <li>○ Assessment of liver improvement and its mechanism based on liver disease models</li> <li>○ Identifying the effects of improving lifestyle-related diseases of medicinal mushrooms</li> </ul> <p>(7) Mass production and standardization of medicinal plants in Mt. Jiri</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Research of functional chemical marker of medicinal plants</li> <li>○ Establishment and standardization of functional metabolite mass extraction system based medicinal plant resources</li> <li>○ Establishment of raw material supply system and production of mass extract for raw material supply of medicinal plants</li> </ul>
<p><b>Results</b></p>	<p><b>1. Results</b></p> <p>(1) Development technology of natural source and seasoning using medicinal plants in Mt. Jiri and the network construction for 6th industry</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Component analysis and biological activity (<i>in vitro</i>) of <i>Ganoderma lucidum</i> (GL) and <i>Polygonum multiflorum</i> (PM) <ul style="list-style-type: none"> <li>- Analysis of proximates, <math>\beta</math>-glucan and vitamin and determination of biological activity of GL</li> <li>- Confirmation of biological compounds and oxidative stress-improving effect of PM</li> </ul> </li> <li>○ Production of natural sauces and natural seasonings <ul style="list-style-type: none"> <li>- Screening and identification of <i>Bacillus subtilis</i> group for production of natural sauces and natural seasonings : 2 species</li> <li>- Screening and identification of producing GABA lactic acid bacteria for production of natural sauces and natural seasonings : 2 species</li> <li>- Production of natural sauces based on cheonggukjang with <i>B. subtilis</i> and confirmation of biological activity</li> <li>- Production of fermentative beverages, fermentative soybean or fermentative seasonings and confirmation of biological activity</li> </ul> </li> <li>○ Production of herb-seasonings using the fermentation of gluten hydrolysis broth with fungi <ul style="list-style-type: none"> <li>- Production of herb-seasonings using the fermentation of gluten hydrolysis broth with the four fungi and after produced containing medicinal plant mixtures based on its and confirmation of biological activity</li> <li>- Production of functional seasonings using fermentative broth of sprouting ginseng and fermentative soybean with mycelium of <i>Tricholoma matsutake</i> and confirmation of biological activity</li> </ul> </li> <li>○ The network construction for 6th industry with medicinal plants in Mt. Jiri <ul style="list-style-type: none"> <li>- Conduct symposiums, workshops and training</li> <li>- Establish of Sancheong Anti-aging Forum : proposition of Sancheong-gun Oriental Anti-aging Industry Roadmap</li> </ul> </li> </ul>

<p style="text-align: center;"><b>Results</b></p>	<p>(2) Developments of functional beverages using mixtures of medicinal plants produced Mt. Jiri area</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Development of functional beverages using <i>C. wilfordii</i> and <i>P. sikokiana</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Certification of biological activity of <i>C. wilfordii</i> and <i>P. sikokiana</i> mixture</li> <li>- Establishment of optimum fermentation condition of <i>C. wilfordii</i> and <i>P. sikokiana</i> mixture</li> </ul> </li> <li>○ Development of functional beverages using <i>C. japonicum</i> and <i>P. grandiflorus</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Certification of biological activity of <i>C. japonicum</i> and <i>P. grandiflorus</i> mixture</li> <li>- Establishment of optimum fermentation condition of <i>C. japonicum</i> and <i>P. grandiflorus</i> mixture</li> </ul> </li> <li>○ Development of functional beverages using <i>C. japonicum</i>, <i>C. wilfordii</i>, <i>P. sikokiana</i>, <i>A. gigas</i> and <i>P. grandiflorus</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Certification of liver protection and antioxidant effects of <i>C. japonicum</i>, <i>A. gigas</i> and <i>P. grandiflorus</i> mixture</li> <li>- Certification of anti-hypertension and antioxidant effects of <i>C. wilfordii</i>, <i>A. gigas</i> and <i>P. grandiflorus</i> mixture</li> <li>- Certification of anti-diabetic and antioxidant effects of <i>P. sikokiana</i>, <i>A. gigas</i> and <i>P. grandiflorus</i> mixture</li> </ul> </li> </ul> <p>(3) Standardization and sensory evaluation of products containing components of medicinal plants in Mt. Jiri</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Determination of proximates (free &amp; structure amino acids and minerals) in medicinal plants in Mt. Jiri</li> <li>○ Determination of total phenolic compounds and antioxidant capacities in medicinal plants in Mt. Jiri</li> <li>○ Assay of benzopyrene contents in medicinal plants in Mt. Jiri</li> <li>○ Evaluation for sensory properties and sniffing tests of medicinal plants in Mt. Jiri</li> </ul> <p>(4) Development of discrimination markers and preservation technology of medicinal plants in Mt. Jiri</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Collect and preserve various medicinal plant resources, Chinese balloonflower, <i>Cynanchum wilfordii</i>, Danggui, <i>Cudrania tricuspidata</i>, and thistle, and develop the culture condition for the propagation and adventitious roots. <ul style="list-style-type: none"> <li>- Establish the collaborate system with Gyeongsangnam-do Agricultural Research and Extension Services, Gyeongnam Oriental Medicinal Herb Institute, and other institutes for the distribution of elite medicinal plant resources in Gyeongnam province.</li> </ul> </li> <li>○ Development of molecular markers of ARMS-PCR using SNP in nuclear ITS and chloroplast genes for the differentiation of indigenous medicinal plant resources. <ul style="list-style-type: none"> <li>- Verification of Backsuho (<i>Cynanchum wilfordii</i>) collected from farmers</li> <li>- Development of molecular markers for the differentiation of Danggui (<i>Angelica gigas</i> Nakai, <i>Angelica gigas</i> jiri, <i>Angelica sinensis</i>, <i>Angelica acutiloba</i>, <i>Levisticum officinale</i>, indigenous <i>Cudrania tricuspidata</i> Bureau, indigenous thistle against other species collected from several countries.</li> </ul> </li> <li>○ Establishment for the condition of differentiation of indigenous medicinal plant resources as described above by using HRM curve analyses techniques and detection of the contamination of other species in samples</li> <li>○ Verification of contaminated with adulterants or hybrid plants produced by cross-fertilization between closely related medicinal plant species</li> </ul> <p>(5) Developed 6th industry and profit generation model using medicinal plants in Mt. Jiri</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Changes in the 6th industry organization through analysis of agricultural industry trend change</li> <li>○ Consulting for enhancing entrepreneurship of participating companies for continuous profit generation</li> <li>○ Establish business model of 6th industry in Sancheong-gun of balloon flower</li> </ul>
---	---

<p><b>Results</b></p>	<p>(6) Identifying the effects of improving lifestyle-related diseases of the mixtures of medicinal plants</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Cytotoxic and anti-steatotic concentrations of <i>Ganoderma lucidum</i> and medicinal herbal mixture were determined</li> <li>○ <i>Ganoderma lucidum</i> improved obesity, steatosis and insulin resistance in the mice fed with high fat diet</li> <li>○ <i>Polygonum multiflorum</i> improved obesity, steatosis and insulin resistance in the mice fed with high fat diet</li> </ul> <p>(7) Mass production and standardization of medicinal plants in Mt. Jiri</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Structure and analysis of chemical compounds of medicinal plants in Mt. Jiri <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Cynanchum wilfordii</i> (4-Hydroxyacetophenon, 2,4-Dihydroxyacetophenon), <i>Perilla frutescens</i> (scopoletin, rosmarinic acid), and <i>Angelica gigas</i> Nakai (nodakenin)</li> </ul> </li> <li>○ Functional metabolite selection of medicinal plants (<i>C. wilfordii</i>, <i>Polygonum multiflorum</i>, <i>Cynanchum auriculatum</i>, <i>A. gigas</i>, <i>Platycodon grandiflorus</i>, and <i>P. frutescens</i>) using UPLC Q-TOF mass <ul style="list-style-type: none"> <li>- Functional metabolite analysis of medicinal plants according to growth stages (seedling, 3 months, or 6 months)</li> <li>- Functional metabolite analysis of medicinal plants according to parts (stem, leaf, or root)</li> </ul> </li> <li>○ Test cultivation of medicinal plants using seedling and field plantation and establishment of mass extraction system</li> </ul> <p><b>2. Achievements</b></p> <p>(1) Industrializing products : 17 patent application for 1 registration (1 case in progress), 1 technology transfer (2 case in progresses), 1 technical valuation, 1 technical certification, 4 final products, and total turnover : 203 millions</p> <p>(2) Scientific products : 5 SCI journal publications, 13 KCI journal publication, 48 conference presentation, 33 technical guidances; 23 manpower cultivation (1 Post-doctor, 5 doctors, 14 masters, 3 bachelors), 2 policy utilizations, 25 promotions-exhibitions, 4 reports, 5 awards, and 3 private organizations</p>				
<p><b>Expected Contribution</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Development of outstanding anti-aging commodity using Korean traditional herb for fostering a Gyeongnam anti-aging industry</li> <li>○ International industrialization of food and medicinal commodity developed using Korean traditional herb</li> <li>○ Pioneering a new market with Korean traditional herb based functional beverage</li> <li>○ Industrialization through technology licensing</li> <li>○ Useful reference for clinical trials of a Korean traditional herb products</li> <li>○ Technical advance in the field of food science</li> <li>○ Scientific profiling of novel anti-aging materials</li> <li>○ Creating a higher value-added business using Korean traditional herbs</li> <li>○ Harmonious growth of primary, secondary and tertiary industries</li> <li>○ Rapid growth of anti-aging industry based on Sancheong and Gyeongnam</li> <li>○ Growth to a global company in traditional herb industry</li> <li>○ Accelerating Commercialization by Establishment of BM</li> </ul>				
<p><b>Keywords</b></p>	<p>medicinal plants in Mt. Jiri</p>	<p>food processing</p>	<p>lifestyle diseases</p>	<p>business model</p>	<p>sixth industrialization</p>

## < CONTENTS >

Chapter 1. Introduction .....	1
Chapter 2. The status of domestic and foreign technical development .....	15
Chapter 3. Contents and results of study .....	23
Chapter 4. Attainment of Objectives and Contribution .....	383
Chapter 5. Applications of the Results .....	391
Chapter 6. Scientific and Technological information from Abroad .....	395
Chapter 7. Security grade of R&D result .....	397
Chapter 8. Facilities and Equipments. ....	397
Chapter 9. Safety Management of Lab. ....	397
Chapter 10. Typical research performance in R&D subject .....	402
Chapter 11. Other things .....	403
Chapter 12. Reference .....	421

<Attachment> Statement their own evaluation

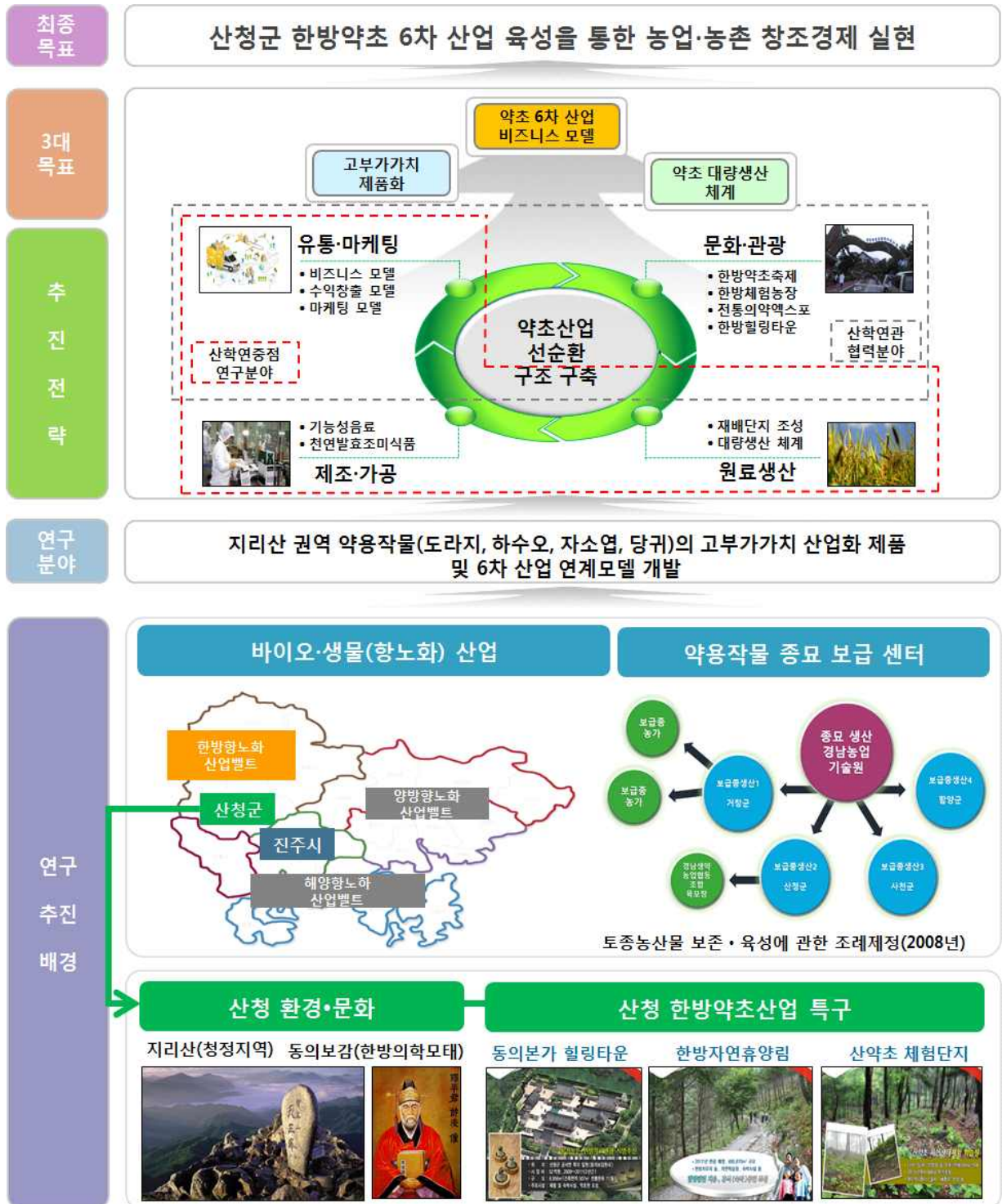
## 〈 목 차 〉

제1장. 연구개발과제의개요 .....	1
제2장. 국내외 기술개발 현황 .....	15
제3장. 연구수행 내용 및 결과 .....	23
제4장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	383
제5장. 연구결과의 활용계획 등 .....	391
제6장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	395
제7장. 연구개발성과의 보안등급 .....	397
제8장. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황 .....	397
제9장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	397
제10장. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	402
제11장. 기타사항 .....	403
제12장. 참고문헌 .....	421

〈별첨〉 자체평가의견서

## 제1절 연구개발의 목적

1. 최종목표 : 산청군 한방약초 6차 산업육성을 통해 농촌·농업 창조경제 실현(그림 1.1)



【그림 1-1. 본 연구의 목표 및 연구 배경】

## 2. 세부목표

### 가. 정성적 목표

- (1) 약용작물/약용버섯(도라지, 하수오, 영지 등) 활용 천연소스/조미 제품화 기술 개발
- (2) 약용작물 활용 기능성 음료/드링크 제품화 기술 개발
- (3) 약용작물/약용버섯의 비만/고지혈증/당뇨 개선효과
- (4) 약용작물 활용 제품의 영양특수성분 표준화 및 관능평가
- (5) 토종 약용작물(하수오, 당귀 등)의 유전자원 수집, 판별, 보존 및 보급 체계 구축
- (6) 약용작물 기반 기능성 대사체 대량추출 및 표준화
- (7) 산청군 한방약초를 기반으로 하는 6차 산업 비즈니스 모델 제시
- (8) 산청군 한방약초를 기반으로 하는 지속적 수익창출 비즈니스 모델 제시
- (9) 약용작물 활용 가공제품의 마케팅 모델 제시
- (10) 산청군 한방약초 6차 산업 육성을 위한 산·학·연·관 네트워크 구축

### 나. 정량적 목표 (사업종료 후 3년)

- (1) 사업화 지표

특허출원 8건과 등록 8건, 기술거래 4건, 제품화 4건, 기술인증 2건

- (2) 연구기반 지표

SCI급 논문 10편, KSCI급 논문 18편, 학술대회 발표 21건, 교육지도 9건, 인력양성 10명, 정책활용 3명, 홍보전시 20건

## 제2절 연구개발의 필요성

### 1. 지역산업생태계와 연계한 농업 6차 산업 육성 필요

#### 가. 농업 가치사슬(value-chain)의 변화

- 가치사슬(value-chain)이란?

- 농산물 유통에서 상품의 부가가치가 생성되는 흐름

- 과거 소매시장 중심의 관행적인 농산물 유통에서는 농산물 상품의 가치사슬이 생산→도매→소매 과정을 통해 전개

- 농·식품 융합 교육을 통한 농업 가치사슬 수직계열화

#### 나. 지역산업생태계란

- 창조경제를 이끌어갈 창·융합산업의 육성을 위해서는 이러한 생태계가 형성될 필요

- 지역산업의 생태계는 일정 지역 공간 내에서의 산업 생태계로서 중핵업종 중심의 가치사슬 구조를 근간으로 기업 간 연계구조와 혁신 자원 및 활동이 유기적으로 결합하고, 지역경제 권역 내의 다양한 부문들과 상호작용하는 동태적 진화발전 시스템

- 지역연고산업 육성방향의 변화 : 고용 창출을 위한 지역연고산업 육성

- 지역산업의 개편 방향 : 일자리 창출 중심의 지역사업으로 개편

### 다. 농업의 6차 산업화 필요성

○ 농업 6차산업은 농촌에 존재하는 모든 유·무형의 자원을 바탕으로 농업(1차산업)과 식품·특산품 제조·가공(2차산업) 및 유통·판매, 문화·체험·관광 서비스(3차산업) 등을 복합적으로 연계함으로써 새로운 부가가치 창출

■ 현 정부 140개 국정과제 중 『농림축산업의 미래성장산업화』를 위한 농림축산업의 6차 산업화 요구 증대

■ 6차 산업 활성화를 위한 시스템 구축 등 체계적인 사업방향 설정이 중요

■ 지역 특성에 따른 농업의 개별전략 수립과 지속가능한 관리 및 인력육성 측면에서 대학의 역할이 대두

○ 농업·농촌의 6차산업화 추진을 통해 2017년까지

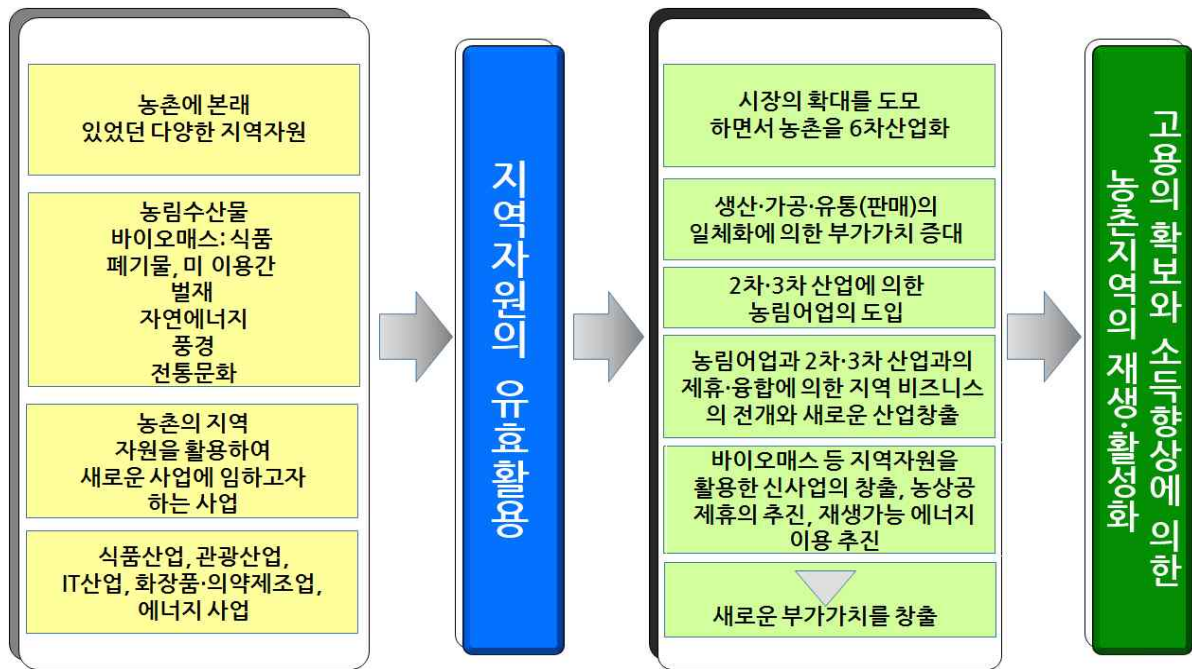
■ 매출액 100억원 이상의 6차산업화 주체 1,000개 육성

■ 농가의 농외소득 연평균 증가율 7.5% 달성

■ 고령화·여성 등을 위한 농촌지역 일자리 매년 5천개 창출을 목표

○ 이를 위해, 성장단계별 차별화된 맞춤형 지원체계 구축, 지역 네트워크 강화, 인적·제도적 기반 구축 추진

○ 농·식품 6차 산업화 목표(그림 1-2)



【그림 1-2. 농·식품 산업화 목표】 (자료: 농업 6차산업화의 정책방향, 황수철, 2013년)

⇒ 농업 가치사슬화를 통한 농업 융복합 지향을 위해서 지역산업과 밀접한 지역대학의 역할이 중요한 위치를 차지하며 이를 위해 지역대학과의 연계가 필요

### 2. 약용작물 활용성 증대를 위한 건강지향적 제품 개발이 필요

#### 가. 사회적 웰빙인 LOHAS(Lifestyle of Health and Sustainability) 트렌드 확산

○ 건강과 삶의 질 향상을 추구하는 웰빙(well-being) 문화는 2000년대 이후 우리나라 사회와



산업 전반에 걸쳐 큰 영향을 미쳤으며, 식품 시장을 이끌어가는 가장 중요한 트렌드가 되어 왔음

○ 최근 개인적인 건강뿐만 아니라 지속가능성을 중요시하는 사회적 웰빙인 LOHAS 트렌드가 점차 확산되고 있음

○ 이러한 LOHAS 트렌드는 웰빙에 비해 더 많은 산업 분야에 영향을 미치고 있으며, 특히 농업 및 식의약 산업과 매우 밀접한 관련 있음. LOHAS 확산은 농업 및 식품 산업을 녹색성장의 중요한 산업으로 인식하는 계기가 되고 있으며, 농업 및 식품 산업의 패러다임을 변화시킬 수 있음

#### **나. 생활습관병(대사증후군) 환자의 증가에 따른 건강기능성 제품 요구가 증대**

○ 고도의 경제성장과 의학의 발달에 따른 고령화 및 식생활 패턴의 변화에 의한 성인병(동맥경화, 암, 당뇨병, 치매, 대사증후군) 환자가 증가함에 따라 세계적으로 건강기능성 제품에 대한 관심이 급격히 증가하고 있음

○ 세계 기능성 식품 시장은 2008년 1,200억 \$ (160조원) 규모로 지속적으로 성장하였으며, 향후 2013년에는 1,750억 \$ 까지 성장할 것으로 전망되고 있음

○ 미국의 식품분야 동향 조사 전문회사인 Sloan Trends & Solutions에서 세계 400대 식품업체를 대상으로 기능성식품 연구개발 동향을 조사한 결과, 항고혈압, 항비만, 혈당조절, 정신건강, 노인성 질환(치매 등) 예방 및 미용분야의 기능성식품 비중이 높은 것으로 조사되었음

○ 일본은 초고령화 사회의 도래로 인해 건강에 대한 관심이 매우 높으며, 이로 인해 소비자 1인당 건강기능식품의 지출 비용은 전 세계에서 가장 높고, 건강유지와 질병 예방 차원에서 건강기능식품을 소비하고 있음

○ 중국은 소득수준의 증가, 건강에 대한 관심 고조, 노령인구 증가에 따라 보건의료의 성장이 점차 예상되고 있으며, 특히 여성, 어린이, 중년, 고령 인구를 중심으로 보건의료 소비가 이루어지고 있음. 보건의료 전문연구조사(2009)에 따르면, 건강식품을 사용하는 주 연령층에 대한 질문에 응답자의 63.5%가 노년층이며 국내에서 생산된 제품이나 외국 수입제품보다 중국 전통 의약품(Traditional Chinese Medicine)을 더 선호하는 것으로 나타났음

#### **다. 국내 기능성식품 연구개발은 생활습관병 개선 원료 및 제품 개발이 활발**

○ 단일 기능성 성분에서 두 가지 이상의 복합적인 기능성 역할을 할 수 있는 제품이 등장하고 있으며 시장의 확대, 식품업계의 진출과 더불어 다이어트 제품 및 야채 섭취 보조제품 등 다양한 건강기능식품이 등장하는 등 패러다임이 변화하고 있음.

○ 개별 인정형 건강기능식품의 성장 요인은 건강 향상 제품에 대한 소비 수요 증대, 일본 방사능 유출, 환경오염, 자외선 등으로 인한 면역기능이나 피부건강, 대사증후군에 대한 소비자 관심 증가 등의 이유로 풀이되며 기존에 존재하는 원료에서 벗어나 치료 효능을 가진 개별 인정형 원료가 발견되면 신규시장을 창출할 수 있는 잠재적 가능성이 내재되어 있어 대기업들이 개별 인정형 원료를 찾는데 주력하고 있음

■ 소비자 요구에 따른 새로운 기능성 원료를 사용한 ‘개별인정형’ 건강기능식품도 꾸준한 성장세임.

■ 2011년도 개별인정형 건강기능식품 중 간 건강 제품이 531억원 생산액을 기록하며 1위를 차지하였으며, 그 다음으로 ▲면역기능에 도움을 주는 제품(178억원) ▲관절/뼈건강 제품(153억원) ▲피부건강제품(100억원) ▲체지방감소 관련 제품(78억원) 순임

■ 구입자의 제형별 시장구조를 보면, 정제형(57.7%), 액상/음료 제형(39.0%), 연질캡슐(21.8%)순으로 구입하였음. 금액 기준으로 보면, 액상/음료 제형(39.4%), 정제형(33.2%), 연질캡슐(11.0%)순으로 나타났음.

■ 유통채널별 시장구조를 보면, 소비자들은 주로 방문판매(33.4%)를 통해 구입하며, 건강기능식품 전문판매점(26.3%), 약국(15.8%)을 통해 구입하였음. 금액 기준으로 보면, 건강기능식품 전문판매점(29.6%), 방문판매(23.9%), 다단계 판매(11.0%)순으로 나타났음.

○ 비만은 흔히 만병의 근원이라 표현하는데 지난해 우리 국민 4명 가운데 약 1명은 비만인 것으로 조사되어 심각한 사회문제로 대두되고 있음.

■ 최근 국민건강영양조사에 따르면 20~29세의 초고도비만율이 1998년도 0.17%에서 2010년 1.63%로 늘어 10배 이상 증가됐음.

■ 2011년 우리나라 15~18세 청소년 비만율이 세계 1위를 기록하고 10~14세 소아비만아 이들도 또한 질병에 시달릴 확률이 미국보다 더 높다는 발표가 있었음.

○ 전 세계적으로 비만 인구가 늘고 있으며 미국과 유럽에서는 비만 인구가 전 국민의 절반을 넘어서며, 중국 및 인도 등에서도 비만 인구가 지속적으로 증가하고 있는 실정.

■ 이에 따라 비만치료제 시장도 확장세이며 2011년 약 10억 달러(약 1조 1,180억원) 규모였던 비만치료제 시장이 2018년에는 10배 이상 커진 105억 달러(약 11조 7,000억원)대로 성장할 것이라고 보고

○ 만성적인 대사 장애로 인하여 내당능 장애(당뇨의 전 단계, 공복 혈당이 100 mg/dL보다 높은 상태), 고혈압, 고지혈증, 비만, 심혈관계 죽상동맥 경화증 등의 여러 가지 질환이 한 개인에게서 한꺼번에 나타나는 것을 대사증후군이라고 함

■ 대사증후군의 임상적인 중요성은 그 관련인들이 죽상경화증에 의한 문제인 뇌졸중, 심장질환 등, 우리나라의 사망 원인 2,3,4,7,9위를 차지하는 질환들 (2006년 통계청 자료 74,165명)이 포진하고 있다는 점이며 이들을 종합하면 사망 원인 1위인 암 (65,909명)을 능가하는 상황임

■ 제2형 당뇨, 심혈관 질환, 고혈압, 비알콜성지방간, 관절염, 천식과 여러 형태의 암 발병율이 비만 증가율과 유사하게 같이 증가하고 있음은 우려할 만한 사항임

■ 국민건강보험공단이 30세 이상 건강검진 수검자를 대상으로 대사증후군 위험요인 보유자를 분석한 결과 연령이 높아질수록 위험요인을 많이 갖고 있었다고 보고함

○ 한방약초는 항고혈압, 항염증, 항산화, 항종양작용, 면역 기능촉진, 간세포 보호 등의 다양한 생리활성을 가지고 있는 우수한 약용 및 식품소재임

⇒ 본 연구에서는 지리산 권역 약용작물(도라지, 하수오, 자소엽, 당귀)로부터 염증 및 비만 유발 인자들을 직접적으로 저해하여 생활습관병(대사성증후군)인 비만, 당뇨, 심혈관계, 알츠하이머(치매) 질환의 위험성을 미리 예방하고 항염증, 항혈전, 항당뇨 및 항비만 타겟 기능성 천연 조미 및 음료 제품을 개발하여 산청군 한방약초 6차 산업 육성을 위한 기틀을 마련하고자 함

### 3. 국가균형발전을 위한 지역산업과 연계한 수출거점 지역인 식품산업 육성이 필요

#### 가. 도, 시·군 지자체의 사업지원 의지

○ 경상남도 토종농산물 보존·육성에 관한 조례제정 (2008년 조례 제 3317호)

■ 경상남도는 2008년 국내에서 유일하게 『경상남도토종농산물 보존·육성에 관한조례』를

제정하여 조상대대로 재배하여 우리고유의 토종농산물의 보존을 위한 지원제도 마련

- 전문가로 구성된 “토종종자 확인단”의 활동으로 경남지역내 토종 농산물의 재배농가 및 재배면적 등의 현황 파악

- 향후 오래전부터 자가 종자를 채종하여 재배하여 온 것으로 추정되는 약용작물에도 확대 시행할 필요성이 있음

- 농업자원관리원 경남지소에는 다양한 종류의 토종 농산물 자원을 확보하고 있으며 향후 이를 지정농가에서 증식하여 희망농가에 보급하기 위한 시스템을 구상 하고 있음

- 그러나 현재까지는 토종 또는 재래종을 과학적이고 체계적인 분석인 시스템의 부재로 어려움을 겪고 있어 이에 대한 연구의 확대가 절실함

- 경상남도 약용작물산업 육성 및 지원 조례 제정(2011년 조례 제 3677호)(그림 1.16)

- 도내에서 생산되는 약용작물의 안정적인 생산기반을 조성하고 고품질의 약용작물 생산을 지원함으로써 농업인의 소득 증대를 도모하는데 필요한 사항을 규정함을 목적으로 본 조례를 제정함

- 이를 추진하기 위하여 경남농업기술원은 농촌진흥청으로부터 5년간 60억(도비 30, 국비 30)을 지원하여 주요약용작물의 종자생산 확대기술 개발을 추진 중에 있음

- 경남농업기술원의 약용작물 종묘 보급 센터 건립(안의 약초시험장)

- 안의 약초시험장에 농림부가 지원하는 약용작물 종묘보급센터가 현재 건립중에 있으며,

- 경남권역의 지리산을 중심으로 한 길경, 산양삼, 오미자, 감국, 둥글레 등의 주요 약용작물의 종묘보급시스템을 구축할 예정임

- 이를 통하여 고품질 약용도라지의 단지화, 명품화를 추진할 계획이며, 농가에서는 육묘, 종자의 구입비가 현저히 줄어 농가소득 증가에 크게 기여 할 것임

- 약용작물 종묘 보급 센터 설립 후 공급 계획

- 산청군 경남생약농업협동조합 설립(2006)

- 농림축산식품부로부터 경상남도 생약농업협동조합 설립 인가

- 국내 최대 약초수매전문기관으로 정착

#### 나. 지식기반시대의 도래로 경제활동 패러다임 변화

- 지역의 잠재역량을 극대화하는 방향으로 정책이 수립되고 이루어지고 있음

- 산청군에서는 (재)산청한방약초연구소를 필두로 하여 의욕적으로 한방약초 관련 산업을 육성 정책에 따라 현재 일본 및 미국 수출 판로를 모색하고 있으며 일부 성과를 달성하였음

- 본 연구 지역인 경남의 경우 부산항, 마산항, 충무항 등의 항만이 존재하여 수출이 용이하며 특히 대일 수출에 거점지역으로 장류를 비롯한 발효식품이 대부분 일본으로 수출되고 있는 현 시점에서 지리적 조건 및 운송비 절감 등의 장점을 최대한 살릴 수 있는 경남지역 기반 기업의 식품산업 육성이 필요함

- 세계의 지구촌화가 가속화되면서 세계시장이 우리 식품을 수출 할 수 있는 기회가 많아졌고 특히 국력신장과 몇 년 전부터 불고 있는 한류 열풍은 한국식품의 세계화에도 큰 역할을 할 수 있을 것으로 예상되므로 일본, 중국을 뿐만 아니라 구미, 유럽 등에 수출할 수 있는 가능성이 강화되면서 안전성이 확보된 한방약초를 이용한 새로운 형태의 수출형 발효식품 혹은 건강지향 음료개발이 절실히 필요한 실정임

- 본 참여기업인 몽고식품(주)은 경남 창원에 위치하여 109년간 한국 장류산업을 이끌어 가

고 있었으며, 부수적으로 몽고유통회사(주)와 미국, 독일 및 중국 등의 해외지사를 보유하고 있어 수출에 용이함

○ 또한 (주)자연애제약은 경남 산청에 위치하여 한방약초를 소재로 건강기능식품음료를 생산하는 업체로 국내의 다양한 판로와 중국, 일본, 미국 수출판로 확보하고 있음

#### 다. 경남지역의 핵심 전략산업

○ 경남 핵심 전략산업 고도화 추진 현황(경상남도, 2013)

■ 향노화·바이오통 ‘경남 5+1 핵심 전략산업’에 포함 : 기반구축, 기술개발역량, 기업지원, 연계협력사업의 4대사업 분야 30개 세부사업에 국비 1,896억원 등 총 5,175억원의 예산을 투입하는 3단계 로드맵 수립

■ 경상남도가 새로운 미래 성장동력으로 추진해온 ‘향노화산업 클러스터 조성’ 사업 발표

■ 한방, 양방, 해양 등 세 방향으로 향노화를 산업화하고 서·북부권과 남해안 지역 발전 촉진을 목표로 추진

■ 연구개발과 사업화 기반구축을 위해 1단계(2014~2016)부터 생산기반을 확충하고 관광단지 조성하는 2단계(2017~2019), 대규모 복합단지를 조성하고 안정적 제품 공급이 가능한 3단계(2020~2022)로 추진

⇒ 지리산 권역 약용작물의 유전자원 확보와 보존 기술 확보와 이들의 대량생산 체계 구축, 한방 약용작물을 활용한 기능성 천연조미 및 음료는 109년 전통 경남대표 향토기업 몽고식품(주)과 (주)자연애제약에서 안정적으로 생산하여 일본을 비롯한 해외 수출 상품 개발과 6차 산업 육성을 위하여 본 연구는 필요함

### 4. 산청군은 한방약초 6차 산업화를 위한 조성 완료

#### 가. 산청 한방약초산업 추진현황 (그림 1-3)



- 1999년 21세기 산청비전 - 한방특화사업 반영
- 2001년 한방약초축제 개최·동의보감촌 조성 (문화체육관광부)
- 2005년 한방의료클러스터 조성 (보건복지부)
- 2005년 특구·신활력지역 지정 (지식경제부, 농림수산식품부)
- 2006년 경남생약농업협동조합 설립 (농림수산식품부)
- 2008년 산청한방약초연구소 사업선정 (지식경제부)
- 2009년 한방휴양림, 산약초타운, 산약초재배단지 조성 (산림청)
- 2010년 2013산청세계전통의약엑스포 유치 (보건복지부)
- 2013년 2013산청세계전통의약엑스포 개최

【그림 1-3. 산청 한방약초산업 추진경과】

## 나. 산청 한방힐링산업(6차 산업) 육성

### ○ 엑스포를 활용한 종합계획 수립과 국제 경쟁력 제고

■ 산청 엑스포는 약초한방 특화사업의 성과를 총화하고 행사 이후 동의보감촌을 한방의료 관광 중심으로 활성화

- 엑스포 이후, 동의보감촌의 글로벌 브랜드 전략 필요
- 장기적이고 지속적인 수입원 창출 대안 필요
- 지역의 타 산업과 연계하는 종합계획 수립 필요
- 전문인력 유치를 통한 대비가 필요
- 개별적 성과물을 일괄적으로 패키징하고 **One-stop** 통합브랜드 마케팅 추진필요
- 1차 농축산업을 비농업분야인 문화·관광·자연자원까지 확대하는 1·2·3차 산업 융복합

전략 수립 필요

### ○ 킬러 콘텐츠 개발로 홍보 강화

- 한방약초산업 분야 중 산청군을 대표하는 ‘대표 약초’ 발굴
- 대표 약초를 중심으로 한 부가 상품 출시와 브랜드마케팅 필요
- 약재로서의 약초에서 생활용품으로서의 ‘약초’ 로 인식 전환
- 약초차, 약초음료, 약초제과·제빵 등 약초소비를 확산하는 대중 소비재 상품 개발
- 약초를 이용한 헬스케어 프로그램의 개발로 지역홍보와 연계

### ○ 약초관련 지역의 관광지화 : 약초 관련 단지의 관광지화 필요

### ○ 통합 브랜드 개발 및 디지털 유통시스템 구축

- 생활용품과 여행상품을 홍보하고 유통할 통합브랜드 필요
- 해외 수요를 고려한 자연주의 전통한방생활용품 B.I 개발
- 관광객들에게 판매할 수 있는 약초 관련 기념품 개발
- 온라인쇼핑몰 구축을 통해 전국 어디서나 구매할 수 있도록 유도
- 약초연구소에서 개발된 제품의 상품디자인 및 판매망 구축

### ○ 통일된 사업관리 및 홍보마케팅 전문 인력 구축

- 지역의 생산기반을 고려한 개발과 전문 인력 육성 필요
- 육성사업 이후의 재정자립을 위한 물적 토대 마련
- 소비자 트렌드 및 니즈 조사를 통한 마케팅 수행
- 지속적이고 안정적 비즈니스 모델 수립

⇒ 산청군은 1999년부터 한방약초를 특구산업으로 지정한 이래 한방약초 생산 기반 조성(1차 산업), 한방약초 가공 산업 육성(2차 산업), 동의보감 브랜드 마케팅 육성(3차 산업), 한방약초축제와 2013전통세계의약엑스포를 통하여 한방약초 산업 메카로서 자리매김하였음. 1차 생산 및 3차 체험·축제의 관광분야는 기반을 구축하였으나, 상대적으로 2차 가공분야의 경우 단순 소포장 혹은 가공품으로 고부가가치 제품 개발을 통한 산청군 대표 브랜드 개발이 절실히 필요하며 이에 따른 생산-가공-유통의 6차 산업화 비즈니스 모델과 수익창출 모델 개발이 필요함

### 제3절 연구개발 범위

#### 1. 1차년도 : 2014년 7월 29일 ~ 2015년 7월 28일

세부과제명	세부연구목표	가중치 (%)	연구개발 수행범위
제1세부 : 지리산 권역 약용작물 복합추출물 활용 천연소스·조미 제품화 기술 및 6차 산업 네트워크 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 고초균 그룹 균주 선발 · 동정</li> <li>■ 약초복합추출물의 최적화</li> </ul>	30	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ <i>B. subtilis</i> group 선발 · 동정</li> <li>- 고초균 선발 및 혈전용해능/항균력 확인</li> <li>■ 한방약용작물의 최적 추출조건 및 혼합비율 선정</li> <li>- 추출물 제조(최소 5조건 이상) 최적 혼합비율 선정</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 콩발효물 제조</li> <li>■ 천연소스/조미 시제품화</li> </ul>	40	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 콩발효물 및 이를 이용한 스투크 제조</li> <li>- 콩발효물 제조, 특성 및 기능성 검증</li> <li>- 콩발효물 건조 및 추출·농축 후 스투크 제조</li> <li>■ 약용작물 추출물 이용 천연소스 및 조미료 제품화</li> <li>- 2종 이상의 소스류 제조 공정 개발 및 제품화</li> <li>- 1종 이상의 조미료 제조 공정 개발 및 제품화</li> <li>- 제품의 영양성분, 기능성 등 분석, 관능평가</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 6차 산업 육성을 위한 네트워크 구축 및 홍보·마케팅 지원</li> </ul>	30	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 산학연관민 정기 교류회 : 2회</li> <li>■ 정책 자문회 및 세미나 : 각 1회</li> <li>■ 축제 등을 통해 홍보·마케팅 지원: 2회 이상</li> </ul>
제2세부 : 지리산 권역 약용작물 복합추출물 활용 기능성 음료·드링크 제품화 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 선정된 약용작물 (하수오, 자소엽)의 추출 및 혼합 최적화 연구</li> </ul>	40	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 물과 발효주정을 이용하여 유효성분의 추출</li> <li>■ <i>In vitro</i> test ; 항산화, 항당뇨, 항비만 효과 측정</li> <li>■ 약용작물 추출물 최적의 혼합비율 조합 선정</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 약용작물 복합추출물의 음료 개발을 위한 최적화 연구</li> </ul>	20	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 생약추출물 혼합물의 항산화 활성 측정</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 약용작물 복합추출물의 최적 발효조건 확립</li> </ul>	20	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 발효기간별 최적 복합약용작물의 발효조건 확립</li> <li>■ 기간별 약용작물 복합발효액의 항산화활성 측정</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 음료(1-2) 개발을 위한 최적의 혼합 레시피 개발</li> </ul>	20	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 음료(1-2)개발을 위한 최적의 혼합 레시피 개발</li> <li>■ 제조공정화 및 제품화</li> </ul>
제3세부 : 지리산 권역 약용작물 복합추출물 활용 제품의 표준화 및 관능평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 제조 조건별 및 제품의 영양성분(일반성분, 아미노산, 지방산, 비타민, 폴리페놀 물질) 검토</li> </ul>	30	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 생산 조건별 영양 기능성 성분 탐색으로 최적 생산 조건 제시</li> <li>■ 각 제품의 원료에 대한 영양성분 결과 제시</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 제품의 휘발성 향기성분 분석</li> </ul>	20	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 각 제품의 원료에 대한 향기성분 검토</li> <li>■ 생산 조건별 최적 향기성분 공정 조건 제시</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 가공 중 유해화학물질 분석</li> </ul>	20	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 유해화학물질(벤조피렌) 분석</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 패널을 이용한 제품의 소비자 선호도 조사를 통해 제품의 기호성 탐색</li> </ul>	30	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 나이, 성별에 따른 제품의 선호도를 분석하여 제품의 효능에 적합한 소비층 제시</li> </ul>

세부과제명	세부연구목표	가중치 (%)	연구개발 수행범위
제4세부 : 지리산 권역 자생 토종 약용작물의 판별 마커 및 보존 기술 개발	■ 유전자원 확보 및 보존체계 구축	30	■ 농촌진흥청과 각도의 농업기술원을 중심으로 하수오, 당귀, 천궁 등의 표준 시료 계통 수집 ■ 영양체 기내보존 체계 구축 중 (학술대회발표 1건)
	■ 유사약용작물의 종·속간 구분용 분자생물학적 마커 개발	70	■ 혼·오용으로 문제가 되고 있는 이엽우피소와 백수오에 관한 기존의 마커와 다른 염록체 계통 SNP마커이용 판별 기술개발 ■ HRM curve 분석기술을 이용한 판별 기술 개발 ■ 국내 토종 장백도라지의 판별마커개발 (특허출원완료 1건)
제5세부 : 지리산 권역 약용작물 활용 6차 산업 및 수익창출 모델 개발	■ 산청군 한방약초 재배 및 가공에 대한 산업구조 분석	50	■ 소비자 욕구 조사 및 산업구조분석 ■ 가치사슬 분석 및 산업지도 작성
	■ 산청군 한방약초를 기반으로 하는 새로운 비즈니스 모델 제시	30	■ 약용작물 산업분석을 통한 블루오션 분야 연구와 새로운 비즈니스 모델 제시
	■ 산청군 한방약초 재배 농민 및 가공업체 재직자 역량강화 교육	20	■ 6차산업 비즈니스모델 사례 교육
제1협동 : 지리산 권역 약용작물 복합추출물의 생활습관성 질환 개선 효과 검정	■ 약용버섯 추출물과 약용작물 복합추출물의 세포주 안전성 검정	20	■ HepG2 및 3T3L1 세포주에서 MTT 및 RTCA 방법을 통해 세포독성 유발 용량 확인
	■ 약용버섯 추출물의 세포주 효능 검정	40	■ HepG2 및 3T3L1 세포주에서 AMPK와 ACC의 활성화 및 GLUT4 발현에 대한 효능 분석
	■ 약용작물 복합추출물의 세포주 효능 검정	40	■ HepG2 및 3T3L1 세포주에서 AMPK와 ACC의 활성화 및 GLUT4 발현에 대한 효능 분석
제2협동 : 지리산 권역 약용작물의 대량생산 및 표준화	■ 화합물 구조 분석	20	■ 4개 약용작물(도라지, 하수오, 자소엽, 당귀)의 시료확보 ■ 유기용매를 이용한 분획물 조제 ■ 기기분석에 의한 구조동정 실시
	■ 한방천연물 library 및 profiling 구축	20	■ 시료 조제 및 추출물 제조 ■ 기기분석(분석조건 확립, 분석)
	■ 지표물질 정성·정량 분석	20	■ 4개 약용작물(도라지, 하수오, 자소엽, 당귀)의 시료조제 ■ 기기분석에 의한 정량분석
	■ 기능성대사체 선별	20	■ 4개(당귀, 도라지, 백수오, 자소엽) 약용작물 대상 추출 ■ 기기분석(분석조건 확립, UPLC Q-TOP 분석)
	■ 약용작물 육묘장 및 시험재배	20	■ 약용작물 대상 종근 및 종자 확보 및 식재

2. 2차년도 : 2015년 7월 29일 ~ 2016년 7월 28일

세부과제명	세부연구목표	가중치 (%)	연구개발 수행범위
제1세부 : 지리산 권역 약용작물 복합추출물 활용 천연소스·조미 제품화 기술 및 6차 산업 네트워크 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 식·약용버섯균사체 선별</li> <li>■ 콩발효물 제조</li> <li>■ 천연소스/조미 시제품화</li> </ul>	70	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 식·약용버섯균사체 선별</li> <li>- 식·약용버섯균사체 및 생육조건 검토</li> <li>■ 콩발효물 및 이를 이용한 스탁 제조</li> <li>- 콩발효물 제조, 특성 및 기능성 검증</li> <li>- 콩발효물 건조 및 추출·농축 후 스탁 제조</li> <li>■ 약용작물 추출물 이용 천연소스 및 조미료 제품화</li> <li>- 2종 이상의 소스류 제조 공정 개발 및 제품화</li> <li>- 1종 이상의 조미료 제조 공정 개발 및 제품화</li> <li>- 제품의 영양성분, 기능성 등 분석, 관능평가</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 6차 산업 육성을 위한 네트워크 구축 및 홍보·마케팅 지원</li> </ul>	30	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 산학연관민 정기 교류회 : 4회</li> <li>■ 정책 자문회 및 워크숍 : 1회 이상</li> <li>■ 축제 등을 통해 홍보·마케팅 지원: 2회 이상</li> </ul>
제2세부 : 지리산 권역 약용작물 복합추출물 활용 가능성 음료·드링크 제품화 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 선정된 약용작물 (도라지 및 엉겅퀴)의 유효성분 추출 및 혼합 최적화 연구</li> </ul>	40	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 물과 발효주정을 이용하여 유효성분의 추출</li> <li>■ <i>In vitro</i> test ; 항고혈압, 간보호, 항산화, 항당뇨, 항비만 효과 측정</li> <li>■ 약용작물 추출물 최적의 혼합비율 조합 선정</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 약용작물 복합추출물의 음료개발을 위한 최적화 연구</li> </ul>	20	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 생약추출물 혼합물의 항산화 및 항당뇨활성 측정</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 약용작물 복합추출물의 최적 발효조건 확립</li> </ul>	20	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 발효기간별 최적 복합약용작물의 발효조건 확립</li> <li>■ 기간별 약용작물 복합발효액의 생리활성 측정</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 음료(3-4) 개발을 위한 최적의 혼합레시피 개발</li> </ul>	20	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 음료(3-4)개발을 위한 최적의 혼합레시피 개발</li> <li>■ 제조공정화 및 제품화</li> </ul>
제3세부 : 지리산 권역 약용작물 복합추출물 활용 제품의 표준화 및 관능평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 제조 조건별 및 제품의 영양성분(일반성분, 아미노산, 지방산, 비타민, 폴리페놀 물질) 검토</li> </ul>	30	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 생산 조건별 영양 기능성 성분 탐색으로 최적 생산 조건 제시</li> <li>■ 각 제품의 원료에 대한 영양성분 결과 제시</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 제품의 휘발성 향기성분 분석</li> </ul>	20	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 각 제품의 원료에 대한 향기성분 검토</li> <li>■ 생산 조건별 최적 향기성분 공정 조건 제시</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 가공 중 유해화학물질 분석</li> </ul>	20	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 유해화학물질(벤조피렌) 분석</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 패널을 이용한 제품의 소비자 선호도 조사를 통해 제품의 기호성 탐색</li> </ul>	30	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 나이, 성별에 따른 제품의 선호도를 분석하여 제품의 효능에 적합한 소비층 제시</li> </ul>



세부과제명	세부연구목표	가중치 (%)	연구개발 수행범위
제4세부 : 지리산 권역 자생 토종 약용작물의 판별 마커 및 보존 기술 개발	■ 우수약용작물의 육묘 보급시스템 구축	20	■ 백수오, 꾸지뽕, 당귀, 천궁 등 주요 계통 자원 지속적 수집 ■ 기내 및 종자 보존
	■ 유사종 종/속 구별 RAPD 마커 개발	10	■ SNP분석용 계통별 염기서열 정보 분석 ■ trnL-trnF, matK, ITS 유전자별 판별 마커 개발 집중
	■ SNP 기술을 이용한 분자생물학적 바코드 개발	35	■ ARMS-PCR 기술, HRM분석 기술 등을 통한 상기 계통 판별 마커 개발 및 특허 출원 : 꾸지뽕(중국종, 한국종), 백수오와 이엽우피소, 당귀계통(세발당귀, 참당귀, 일당귀)
	■ 생리생태학적, 생화학적 판별 마커 개발	35	■ 종간 또는 계통간 교잡종의 조사(백수오와 이엽우피소간), 중국종과 한국 계통간의 꾸지뽕 ■ 이들의 혼합비율 추정 ■ 교잡종을 이용한 형태학적, 생태학적 비교분석 등
제5세부 : 지리산 권역 약용작물 활용 6차 산업 및 수익창출 모델 개발	■ 산청군 한방약초를 기반으로 하는 스토리 발굴과 커뮤니티 지도 개발	40	■ 커뮤니티 지도를 기반으로 한 지속적 수익창출 모델 제시
	■ 산청군 한방약초를 기반으로 하는 지속적 수익창출 비즈니스 모델 제시	30	■ 다양한 비즈니스모델 사례 연구를 통한 최적의 수익 모델에 대한 연구
	■ 산청군 한방약초 재배 농민 및 가공업체 재직자 역량강화 교육	30	■ 비즈니스모델 캔버스를 활용한 신사업 개발 및 지속적 수익창출을 위한 교육
제1협동 : 지리산 권역 약용작물 복합추출물의 생활습관성 질환 개선 효과 검증	■ 동물모델에서 약용버섯 추출물의 비만, 지방간 및 인슐린저항성 개선 효능평가 및 기전 연구	50	■ 고지방식이 동물모델에서 식이섭취량과 체중증가의 상관성 분석, 지방조직 및 간조직의 무게 분석, 간조직 내 지질축적 및 혈중 ALT, AST, ALP 분석 ■ 고지방식이 동물모델에서 AMPK와 ACC의 활성화 및 GLUT4 발현에 대한 효능 분석, 혈중 지질지표 분석 ■ 고지방식이 동물모델에서 공복혈당, ITT, GTT 분석
	■ 동물모델에서 약용작물 복합추출물의 비만, 지방간 및 인슐린저항성 개선 효능평가 및 기전 연구	50	■ 고지방식이 동물모델에서 식이섭취량과 체중증가의 상관성 분석, 지방조직 및 간조직의 무게 분석, 간조직 내 지질축적 및 혈중 ALT, AST, ALP 분석 ■ 고지방식이 동물모델에서 AMPK와 ACC의 활성화 및 GLUT4 발현에 대한 효능 분석, 혈중 지질지표 분석 ■ 고지방식이 동물모델에서 공복혈당, ITT, GTT 분석
제2협동 : 지리산 권역 약용작물의 대량생산 및 표준화	■ 약용작물 부위별/재배시기별 기능성대사체 분석	80	■ 6개(당귀, 도라지, 하수오, 이엽우피소, 백수오, 자소엽) 약용작물 대상 추출 ■ 기기분석(분석조건 확립, UPLC Q-TOF 분석) ■ 약용작물 부위별/재배시기별 화합물 Marker 분석
	■ 약용작물 육묘장 및 시험재배	20	■ 약용작물 대상 종근 및 종자확보 및 식재

3. 3차년도 : 2016년 7월 29일 ~ 2017년 7월 28일

세부과제명	세부연구목표	가중치 (%)	연구개발 수행범위
제1세부 : 지리산 권역 약용작물 복합추출물 활용 천연소스·조미 제품화 기술 및 6차 산업 네트워크 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 젓산균 그룹 균주 선발·동정</li> <li>■ 콩발효물 제조</li> <li>■ 천연소스/조미 제품화</li> </ul>	70	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 젓산균 균주 선발·동정                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 젓산균 선발</li> <li>- 생균제제능/항산화능 확인</li> </ul> </li> <li>■ 콩발효물 및 이를 이용한 스투크 제조                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 콩발효물 제조, 특성 및 기능성 검정</li> <li>- 콩발효물 건조 및 추출·농축 후 스투크 제조</li> </ul> </li> <li>■ 약용작물 추출물 이용 천연소스 및 조미류 제품화                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 2종 이상의 소스류 제조 공정 개발 및 제품화</li> <li>- 1종 이상의 조미류 제조 공정 개발 및 제품화</li> <li>- 제품의 영양성분, 기능성 등 분석, 관능평가</li> </ul> </li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 6차 산업 육성을 위한 네트워크 구축 및 홍보·마케팅 지원</li> </ul>	30	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 산학연관민 정기 교류회 : 4회</li> <li>■ 정책 자문회 및 워크숍 : 1회 이상</li> <li>■ 축제 등을 통해 홍보·마케팅 지원: 2회 이상</li> </ul>
제2세부 : 지리산 권역 약용작물 복합추출물 활용 기능성 음료·드링크 제품화 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 약용작물(1~5)의 음료류 개발을 위한 최적추출 조건 확립</li> </ul>	50	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 약용작물(도라지, 하수오, 자소엽, 당귀, 영경귀)의 추출방법 및 조건의 최적화</li> <li>■ 추출물의 기능성 생리활성 검정</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 약용작물(1~5) 추출물의 최적 배합조건 확립</li> </ul>	20	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 약용작물 추출물의 최적 배합조건 확립</li> <li>■ 약용작물 복합추출물의 기능성 검정</li> <li>■ 혼합음료의 생리활성 최적화 조건 확립</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 음료(5-7)개발을 위한 최적의 혼합 레시피 개발</li> </ul>	30	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 음료(5-7)개발을 위한 최적의 혼합 레시피 개발</li> <li>■ 최적 음료 첨가물 선정</li> <li>■ 소비자 대상 관능평가 및 영양성분 분석</li> </ul>
제3세부 : 지리산 권역 약용작물 복합추출물 활용 제품의 표준화 및 관능평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 제조 조건별 및 제품의 영양성분(일반성분, 아미노산, 지방산, 비타민, 폴리페놀 물질) 검토</li> </ul>	30	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 생산 조건별 영양 기능성 성분 탐색으로 최적 생산 조건 제시</li> <li>■ 각 제품의 원료에 대한 영양성분 결과 제시</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 제품의 휘발성 향기성분 분석</li> </ul>	20	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 각 제품의 원료에 대한 향기성분 검토</li> <li>■ 생산 조건별 최적 향기성분 공정 조건 제시</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 가공 중 유해화학물질 분석</li> </ul>	20	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 유해화학물질(벤조피렌) 분석</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 패널을 이용한 제품의 소비자 선호도 조사를 통해 제품의 기호성 탐색</li> </ul>	30	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 나이, 성별에 따른 제품의 선호도를 분석하여 제품의 효능에 적합한 소비층 제시</li> </ul>

세부과제명	세부연구목표	가중치 (%)	연구개발 수행범위
제4세부 : 지리산 권역 자생 토종 약용작물의 판별 마커 및 보존 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 우수약용작물 육묘 보급을 통한 농가소득 증대</li> </ul>	20	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 우수약용작물 육묘 보급시스템 구축 : 경남농업기술원 약용자원연구소, 경남한방약초연구소 등과의 협력체계 구축을 통한 농가소득 증대</li> <li>■ 기내 배양 시스템 구축 : 유용유전자원의 기내증식 및 부정근 배양 조건 확립</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 자생 토종약초의 기원 판별을 위한 분자생물학적 마커 개발</li> </ul>	80	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 핵내 ITS 및 엽록체(trnL-trnF, mat K)유전자의 SNP를 이용한 국내 자생 토종 약용작물의 판별 마커 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 농가에서 수집한 백수오의 진위여부 판별(SCI 논문 발표 1건)</li> <li>- 참당귀, 세발당귀, 중국당귀, 일당귀, 구당귀의 판별 마커 개발 (특허 출원 2건)</li> <li>- 국내 및 중국 자생 꾸지뽕의 판별 기술 개발(특허 출원 1건)</li> <li>- 국내자생, 캐나다, 유럽 등에서 수집한 엉겅퀴의 기원판별 기술 개발(특허출원 1건)</li> </ul> </li> <li>■ HRM 패턴 분석기술을 이용한 국내자생 토종 약용작물의 판별 및 혼입여부 분석 기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 참당귀, 세발당귀, 중국당귀, 일당귀, 구당귀의 기원 판별 및 혼입여부 판별 기술 확립(논문 준비중)</li> <li>- 꾸지뽕(국내자생, 중국계통), 엉겅퀴(국내자생, 캐나다, 유럽)의 기원 판별 혼입여부 판별 기술 확립(논문 준비중)</li> </ul> </li> </ul>
제5세부 : 지리산 권역 약용작물 활용 6차 산업 및 수익창출 모델 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 산청군 한방약초에 대한 강화된 브랜드 마케팅 제시</li> </ul>	70	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 브랜드별 스토리텔링 기법 적용 연구</li> <li>■ 소셜 미디어를 활용한 홍보 마케팅 모델 연구</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 산청군 한방약초 재배 농민 및 가공업체 재직자 역량강화 교육</li> </ul>	30	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 브랜드별 스토리텔링 기법 적용 및 소셜 미디어를 활용한 홍보 마케팅 교육</li> </ul>
제1협동 : 지리산 권역 약용작물 복합추출물의 생활습관성 질환 개선 효과 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 적하수오 추출물의 세포주 안전성 검증</li> </ul>	20	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ HepG2 세포주에서 MTT 및 RTCA 방법을 통해 세포 독성 유발 용량 확인</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 적하수오 추출물의 세포주 효능 검증</li> </ul>	30	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ HepG2 세포주의 FFA 유발 지방축적모델에서 간세포 내 지질축적 및 중성지방 함량 변화 분석</li> <li>■ AMPK, ACC와 SREBP-1의 활성화 및 GLUT4 발현에 대한 효능 분석</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 동물모델에서 적하수오 추출물의 비만, 지방간 및 인슐린저항성 개선 효능평가 및 기전 연구</li> </ul>	50	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 고지방식이 동물모델에서 식이섭취량과 체중증가의 상관성 분석, 지방조직 및 간조직의 무게 분석, 간조직 내 지질축적 및 중성지방 함량 변화 분석</li> <li>■ 고지방식이 동물모델에서 AMPK, ACC와 SREBP-1의 활성화 및 GLUT4 발현에 대한 효능 분석</li> <li>■ 고지방식이 동물모델에서 공복혈당 및 ITT, GTT 분석</li> </ul>
제2협동 : 지리산 권역 약용작물의 대량생산 및 표준화	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 대량추출체계 확립 및 표준화</li> </ul>	80	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 약용작물의 scale-up 추출 연구</li> <li>■ 경남생약농업협동조합 농축추출라인 이용 대량 추출</li> <li>■ 대량추출공정 확립을 위한 추출물 표준화</li> <li>■ 소재의 안정성 확보(잔류농약, 지표성분 함량 등)</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 재배단지 조성</li> </ul>	20	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 약용작물 대상 종근 및 종자확보 및 재배단지 조성</li> </ul>

## 제1절 국내·외 6차산업화 현황

### 1. 국내 6차산업화 현황

#### 가. 농업 6차산업화 사례

○ 6차 산업화는 수평적 다각화로서 지역복합경영, 수직적 다각화로서 6차 산업화, 농공상연대, 프랜차이즈 등 다양한 형태가 존재

■ 영농조합법인의 프랜차이즈가 최근 활발하게 전개되고 있다. 수직적 다각화는 농업 생산(1차 산업), 특산품 가공(2차 산업), 농산물 유통·관광·교류(3차 산업) 등으로 비즈니스 영역의 확장을 말하며, 단계별로 다양한 모델을 개발

○ 문경시는 농업기술센터의 교육사업과 가공·창업 지원을 통해 지역특산물인 오미자 가공과 판매는 물론 관광체험까지 연계함으로써 1천억 원의 농가소득을 창출

○ 임실군 치즈마을의 경우에도 낙농업 중심의 평범한 농촌마을에서 치즈가공, 외식, 관광 등을 연계해 연간 7만2천 명의 방문객을 유치하는 대표적인 체험관광 명소로 탈바꿈

○ 농촌진흥청이 6차 산업화 성공모델로 꼽는 두 지역은 실제로 농가소득 증대와 함께 일자리 창출, 지역 활성화를 실현했다는 평가

#### 나. 산청 한방약초 6차 산업화 인프라 구축현황

○ 한방약초산업 현황 (그림 2-1)



【그림 2-2. 한방약초산업 현황】

○ 2013산청세계전통의약엑스포 (그림 2-3)

**세계 유일 공중보건의서 UNESCO 세계기록유산, 동의보감 발간 400주년 기념!**

시 기	2013. 9. 6 ~ 10. 20 (45일간)
장 소	동의보감촌 / 한방의료클러스터 등
주 제	미래의 더 큰 가치, 전통의약
주 최	보건복지부 / 경상남도 / 산청군 공동
행사내용	전시행사, 체험행사, 학술행사 등
참 가 국	중국, 일본 등 36개국 이상
관람객수	216만명 (외국인 7.2만명)
성 과	동의보감촌 등 엑스포 관련 시설의 관광자원화 지역경제 활성화 및 주민소득 증대 3년 주기로 개최 협의 중



【그림 2-3. 2013산청세계전통의약엑스포 실적】

○ 산청 한방약초산업 추진사업 (그림 2-4)

- 산청한방의료클러스터 조성
- 한방제약 산업단지 조성
  - 유치업종 : 한방 / 제약 / 건강식품 등
- 한방약초중소기업 연구마을 조성
  - 기업유치목표 : 30개 기업(20개 기업 유지)
- 지리산 특산 희귀약초 대량증식기지 구축
- 밤머리재 터널개설 공사
- 지리산 산청 케이블카 설치
  - 지리산의 4계절 관광자원화 및 생태보존



【그림 2-4. 산청 한방약초산업 추진사업】

## 2. 국외 6차산업화 현황

### 가. 다기능농업에 주목한 유럽연합 모델

○ 유럽연합은 지속가능성에 방점을 찍고 농업농촌정책을 펴고 있음

■ 유럽연합의 경우 △현재의 글로벌 푸드시스템에서 농업 부가가치를 창출하는 일은 한계가 있다는 인식에서 △다기능농업 기반의 농촌개발 패러다임이 등장했으며 △로컬 푸드시스템 구축이라는 명확한 목표 설정이 이뤄졌다. 이에 따라 △주류 시스템의 통합이 아닌 지역차원의 수평적 네트워킹을 바탕으로 한 대안적 가치사슬 형성에 초점을 맞추고 △지방정부, 시민사회, 시장의 삼각협업체제 구성에 집중. 아울러 △종합계획(food plan)에 입각한 계획적, 체계적 실행을 중시하며 특히 △소비자와 생산자 간 신뢰형성을 바탕으로 도시먹을거리계획(urban food planning)을 수립해 추진(황수철 박사)

### 나. 중국의 6차산업화

○ 중국에서 6차산업화는 ‘농업의 산업화경영’을 말한다. 이는 시장개방에 대응해 마케팅 능력이 높은 기업의 주도하에서 영세 농가를 조직화해 생산·가공·판매를 일체화함으로써 경쟁력을 향상하고 시장교섭력을 증진해 농공 간 균형발전을 도모하는 것을 목적

■ 식품제조회사를 중심으로 한 농외기업과 영세농가의 수직적 결합이 중심으로 우리나라의 계열화와 모양새가 비슷하다고 볼 수 있음

■ 농외기업과 농가간의 계약관계는 이익 증대를 목적으로 하되, 손익을 공유하고 위험을 분담하는 거래다. 주로 축산부문이나 채소산지에서 활발하게 전개

### 다. 일본의 6차산업화

○ 일본은 시장개방의 진전 속에서 농촌지역 생존전략의 일환으로 자생적으로 6차산업화를 진행되어 그 효과가 인정돼 정책적인 지원을 받으며 확산되는 추세를 보이고 있음

■ 농업구조개선은 대규모 경영의 경우 개별경영으로 규모 확대를 통해 경쟁력을 갖출 수 있으나 영세규모의 고령·여성농가의 경우 규모 확대는 기대하기 어렵기 때문에 대안으로 조직화를 유도할 수 있는 6차산업화가 시작됨

■ 일본 역시 농업이 가지는 1차 산업(생산)의 기반 위에서 2차 산업(가공), 3차 산업(서비스업)으로 비즈니스를 확대하는 방식으로 주체는 여성이나 고령 농업인, 작목반 또는 마을 영농 등 다양한 주체가 활발히 활동을 하고 있음

■ 우리나라의 6차 산업화는 일본의 6차 산업화와 상당부분 닮아있음

## 제2절 제품 생산 및 시장현황

### 1. 국내 제품생산 및 시장현황

#### 가. 소스 시장현황

○ 국내 소스 시장은 스파게티 소스, 굴 소스, 돈까스 소스, 바비큐 소스 등 총 18개의 상온, 냉장 소스 제품을 모두 합해 연간 약 1200억원 규모인 것으로 추산

○ 소스 시장은 성장가능성이 높아 소비자 트렌드 변화를 제품에 반영하면 성공 하기 쉬운 사업이라고 본다. 조미료, 김치, 장류 등 전통 가공식품과는 달리 소비자 트렌드가 빠르게 변화하고 성장 잠재력이 있는 시장이며 한 발 빠른 대응으로 시장을 선도해오는 2016년 소스시장 매출 450억원, 점유율 40%를 달성할 것"이라고 목표(링크아즈텍, 2013년)

○ 시장조사기관 링크아즈텍이 밝힌 '2013년 소스시장에서 점유율' 자료에 따르면 대상은 시장 점유율 28%, 매출 315억원을 기록해 처음으로 동종업계 1위에 오름, 이로써 그동안 1위를 지켜온 오뚜기는 점유율 25.4%를 기록하며 2위로 밀려남

○ 국내 소스시장 현황을 살펴보면 지난 2007년까지 오뚜기가 39.9%의 압도적인 점유율로 1위를 고수해 왔다. 같은 해 대상의 시장 점유율은 11.4% 수준을 기록했고, 2009년에는 처음으로 20%대를 돌파했다. 2012년에는 오뚜기보다 0.1% 뒤진 27.5%까지 점유율로 양강 구도를 형성했고, 지난해에는 2.6% 앞선 점유율 28%를 기록해 30년만에 선두 자리에 올랐다. 대상은 프리미엄 제품의 출시와 맛의 다변화를 성공 요인으로 꼽았다. 대상 관계자는 "소스시장은 조미료, 김치, 장류 등 전통 가공식품과는 달리 소비자 트렌드가 빠르게 변화하는 시장"이라며 "2016년 소스시장 매출 450억원, 점유율 40% 달성을 목표로 선두기업으로서 입지를 다지겠다"고 말함

## 나. 조미료 시장현황

○ MSG의 기초 원료인 원당과 당밀은 국내 생산이 어렵기 때문에 대부분 수입에 의존

○ 연도별 수입량의 변화는 크지 않고 수입단가의 인상으로 인해 매년 수입액이 증가하는 것으로 나타남

○ 발효조미료 생산실적은 지난 2009년까지 감소하다가 2010년 이후 다시 증가

○ 이는 소비자 단체를 중심으로 한 MSG 퇴출운동의 전개로 소비 둔화가 지속됐지만, 이후 합계와 업계가 나서 MSG의 인체 무해성을 주장하면서 소비자 기피심리가 완화된 결과로 풀이

○ 국내 발효조미료 생산 실적의 감소는 발효조미료의 수출 감소와 수입량 증가 현상을 불러올 수 있는데 동시에 주요 생산업체들의 눈길을 해외로 돌리게 했다. 대상은 지난해 기준 인도네시아와 베트남 법인의 매출액 합산액이 1985억원이며, CJ제일제당도 지난 2007년 중국시장에 진출해 지난해 기준 약 393억원의 매출을 올리고 있음

○ 특히 복합조미료와 발효조미료로 양분된 시장에 자연조미료라는 새로운 영역이 개척되면서 각 업체 간의 경쟁구도가 변하고 있다. 자연조미료 시장은 소비자의 MSG 기피 심리와 웰빙 열풍이 맞물린 결과다. CJ제일제당이 2007년 '산들애'를 내놓고 자연조미료 시장을 개척하자 대상도 같은 해 '맛선생'을 출시하며 맞불을 놓았다. 2010년 '연두'를 선보인 샘표식품은 후발주자로 나섰음에도 불구하고 가파른 매출 상승으로 자연조미료 시장의 다크호스로 떠오르고 있다. 다수의 전문가들은 소비자들의 웰빙 열풍과 맞물려 자연조미료 시장이 더욱 확대될 것으로 전망

○ 조미료의 유통 및 판매 구조는 일반 식품의 유통 구조와 크게 다르지 않다. 채널별 비중은 체인슈퍼(SSM)의 판매 비중이 37.6%로 가장 높았고 할인점과 일반 식품점이 뒤를 이었음

○ 국내 조미료 시장의 전체 규모는 약 6268억원이며 B2B물량이 약 72%로 비중이 높다. 가정용 조미료 시장은 지난해 기준 약 1755억원으로 발효조미료 493억원, 복합조미료 731억원, 자연조미료 530억원임

○ 업체별 시장점유율은 CJ제일제당이 지난해 기준 전체 시장의 54.7%(약 960억원)를, 대상

이 39.6%(약 694억원)으로 두 업체가 94.3%를 기록하고 있다. 한편 소비자 조사 결과 조미료를 구입할 때 주 정보원은 TV광고가 가장 많았으며 식품관 내의 광고, 주변 지인 소개 순이었다. 조미료 구입속성에서는 구성 원재료(44.9%)와 맛(43.3%)이 비슷한 수치를 보였다

○ 조미료 구매 시 선호하는 용량은 전 연령대에서 200g용량이 27.6%의 응답률로 가장 높았고 40대와 50대는 200g을 각각 22.5%, 22.9%로 꼽아 큰 용량을 선호했다. 조미료를 선물용으로 구입한 이들은 전체 응답자 중 16.9%였고 이 중 62.1%는 자연조미료를 구입(식품산업통계정보).

○ 농림축산식품부는 1일 발표한 ‘가공식품 세분시장 현황 보고서’에 따르면, 자연조미료 구매 고객이 전체 수요의 46.6%에 달하는 것으로 나타났다. 이어 복합조미료 45.3%, 발효조미료 6.1%, 순

○ 특히 앞으로 자연조미료만 사겠다는 응답이 76.9%에 달해 식품에 대해 소비자 인식이 변한 것을 확인할 수 있음

### 라. 음료 시장현황

○ 2012년 국내 음료시장은 전년비 6.2% 성장한 3조7,527억원 규모로, 탄산음료, 스포츠음료, 생수 등의 판매액이 늘어난 것으로 나타남

○ 지난해 국내 음료시장은 3조7,527억원 규모로, 전년대비 6.2% 성장한 것으로 나타났다. 품목별로는 탄산음료·스포츠음료·생수·음용차·초코드링크는 전년대비 판매액이 증가한 반면, 두유·음용식초·과일음료·채소음료의 판매액은 감소

○ 최근 농림축산식품부와 한국농수산식품유통공사가 발간한 ‘2013 가공식품 세분화 시장 보고서 : 과채음료편’에 따르면, 지난해 전체 음료 중 탄산음료 판매액은 9,522억원으로 전년보다 6.5% 증가했으며, 음료시장 내에서 가장 높은 25.4%를 점유한 것으로 조사

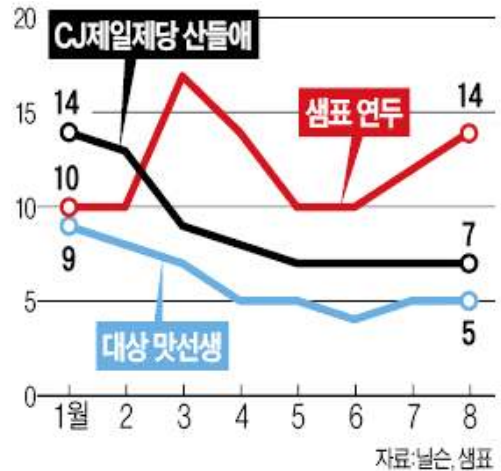
○ 스포츠음료 판매액은 전년대비 25.1% 증가한 5,429억원, 생수는 7.6% 증가한 4,894억원, 음용차는 16.8% 증가한 2,854억원을 기록

○ 과일음료 판매액은 전년대비 2.3% 감소한 7,688억원, 채소음료는 0.4% 감소한 1,543억원을 달성했다. 과채음료의 지속적인 판매액 하락은 이온 음료, 비타민 음료, 홍삼 등 건강친화적인 음료 출시에 따른 것으로 분석

○ 국내 과일·채소 음료류 출하액은 2011년 기준 8,697억원 규모로, 이는 전년 출하액 9,419억원 대비 7.7% 감소한 수치

○ 닐슨 소매점 판매액 지수 기준 2012년 과채음료 시장의 판매액 규모는 전년대비 2.0% 감소한 9,231억원이며, 과일음료는 7,688억원, 채소음료는 1,543억원 규모

○ 판매량 규모는 전년대비 3.5% 감소한 357,553톤으로, 과일음료 305,689톤, 채소음료는 51,864톤이 판매됐다(자료: 닐슨 소매점 판매액지수)



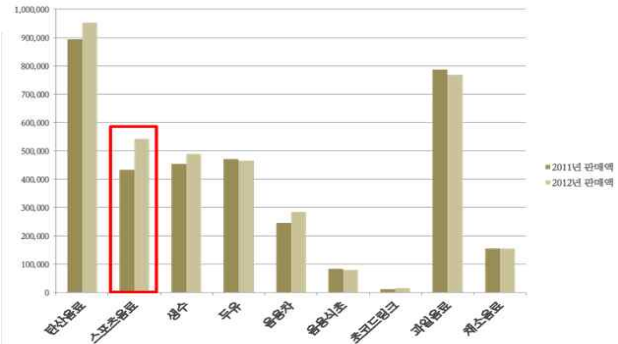
【그림 2-5. 천연조미료 브랜드별 매출 현황 (자료: 닐슨, 샘표, 2013년)】



(판매액 : 백만원, 성장률/점유율 : %, 증감 : %p)

구분	품목	판매액			점유율		
		2011년	2012년	성장률	2011년	2012년	증감
음료류	탄산음료	694,166	952,242	6.5	25.3	25.4	0.1
	스포츠음료	434,143	542,903	25.1	12.3	14.5	2.2
	생수	454,695	489,400	7.6	12.9	13.0	0.2
	두유	471,107	465,144	-1.3	13.3	12.4	-0.9
	음용차	244,377	285,442	16.8	6.9	7.6	0.7
	음용식초	82,709	79,723	-3.6	2.3	2.1	-0.2
	초코드링크	11,555	14,790	28.0	0.3	0.4	0.1
	과일음료	787,152	768,777	-2.3	22.3	20.5	-1.8
	체소음료	154,901	154,316	-0.4	4.4	4.1	-0.3
합계		3,534,826	3,752,735	6.2	100.0	100.0	0.0

[음료류 판매액 현황]



【그림 2-6. 음료류 판매액 및 점유율 현황】

## 2. 국외 제품생산 및 시장 현황

### 가. 소스 시장현황

#### ○ 미국 소스 시장현황 :

■ 경기침체로 가정에서 요리하는 경향이 증가함으로 요리용 소스와 마리네이드 소스가 미국 시장에서 성장세를 보였다. 하지만 2012년 경기가 부분적으로 회복되면서 상당수의 소비자가 외식으로 선회하고 가정 외에서 먹는 식사의 수가 늘었다. 이로 인해 상반기 요리용 소스와 마리네이드 소스의 슈퍼마켓 매출이 부정적인 영향을 입었다. 하지만 외식을 통해 새로 알게 된 풍미를 결국 가정 요리에 응용하게 될 것이라고 보여짐

■ 이국적인 소스는 미국 소스 매출의 19%를 차지하고 2010년에는 7억천2백만불을 기록했다. 또 2008~2010년에는 매출이 8% 성장했다. 각종 간장류 제품을 보유한 키코망 상표는 이국적인 소스 목록의 제일 주자로 모든 이국적인 소스 매출의 24%를 차지한다. 또 2005년 이래 이 항목은 다양한 면모의 성장세를 보였는데, 민텔의 예측으로는 향후 5년간 이국적인 소스 분야는 탄탄하게 성장해 2015년에는 매출이 8억8천만불 선이 될 것으로 보임

■ 한편 바베큐 소스 매출의 18%는 FDMx에서 이뤄지는데 액수로는 6억6천만불로 2008~2010년 보다 11% 증가했다. 민텔은 이 액수가 2015년에 이르면 거의 8억불 선이 될 것으로 예측함

■ 또 식당 메뉴에서 정기적으로 등장하는 횡수도 늘고 있다. 민텔의 메뉴 인사이트에 따르면 바베큐 소스는 식당 메뉴에 등장하는 소스나 국물(stock) 중 그 순위가 8위에서 5위로 상승했다. 2007~2010년 사이 제품의 숫자도 38%가 증가해서 2010년에는 1,274개였다. 맛의 범위도 달콤한 것부터 짭짤한 것까지 있고 매운 맛, 특 쏘는 맛 등 셀 수 없이 많은 변종이 가능함

■ 따라서 이런 경향을 최대한 이용하기 위해 식당에서나 볼 수 있었던 고급 바베큐 소스를 개발한다면 가정 요리사들을 겨냥한 마케팅이 가능할 것이다. 그리고 미국인들은 메뉴에서 늘 다양한 것을 원하는 경향이 있어 한국 소스가 미국인의 입맛을 사로잡을 기회는 아직 충분함

### 나. 조미료 시장현황

#### ○ 중국, 조미료 고급화로 수입 조미료시장 유망 :

- 소득 증가로 조미료 소비 늘어 간장, 참기름, 식초 등 고급화 추세 뚜렷
- 중국산 조미료 가격 오르면서 수입산과 가격격차 줄어... 시장 진출 호기

■ 시장조사기관 칸타월드패널(Kantar Worldpanel)에 따르면, 2013년 중국의 조미료 판매액이 2012년 대비 10% 늘어나는 등 안정적인 성장세를 보임

■ 조미료 매출 증가율 10%에 가격 인상이 37%를 기여하고 소비자 증가가 27% 기여한 것으로 나타남

■ 중국 조미료시장이 성장하는 것은 일반 가정의 소비 수준 제고, 요식업과 식품제조업 발전과 연관

■ 이외에 라면·과자·감자칩·육제품·냉동식품 생산기업이 조미료시장 발전에 중요한 역할

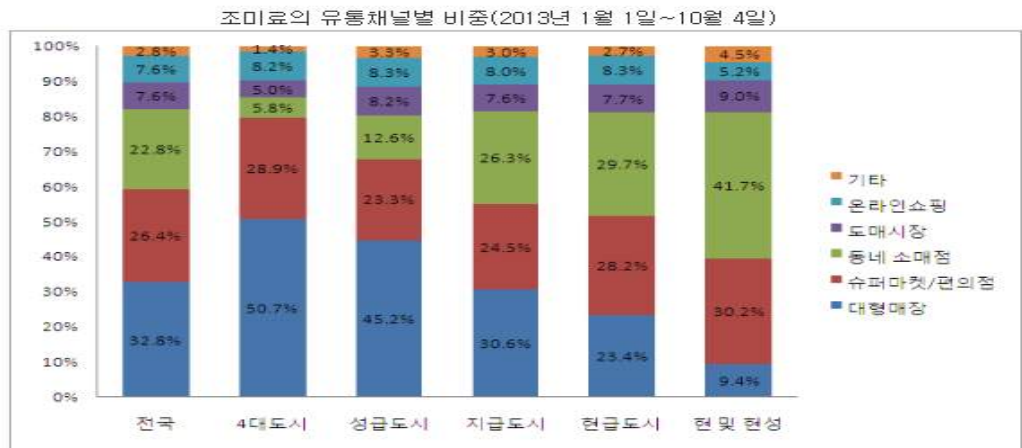
■ 카레, 깨소스, 굴소스 소비 크게 늘어

■ 전통 중국요리(중화요리)에 사용되는 조미료는 베이징, 상하이, 청두에서의 판매액 증가율이 20%를 넘어

섬

■ 대형매장과 슈퍼마켓이 주요 유통채널이나 온라인 판매 빠르게 늘어

■ 조미료는 주로 대형매장, 슈퍼마켓, 편의점에서 유통되며, 이들 유통채널의 매출 비중이 전체의 60% 이상을 차지함



【그림 2-7. 조미료의 유통채널별 비중 (자료원 : 銷售與市場, 2014년 1월)】

■ 현재 온라인에서의 식품 판매액이 연간 60% 증가하는 등 급증세를 보이고 있으며 조미료 판매액 증가율은 이보다 훨씬 높은 125%에 달한다.<조미료의 유통채널별 비중(2013년 1월 1일~10월 4일)>

○ 프리미엄 건강제품이 대세인 ‘프랑스’ 음료시장 :

#### 다. 음료 시장현황

○ 식물성 단백질 음료시장이 급부상하는 ‘중국’ :

■ 중국 국가통계국에 따르면 2012년 중국 음료시장의 연간 매출액은 4716억 위안으로 식품 음료산업 분야별 시장에서 가장 많은 매출을 올렸는데 2003년부터 연평균 20.8%씩 증가하고 있다. 중국 소비자들의 음료 선택기준은 맛, 건강, 브랜드의 순서이며, 품종별로 보면 탄산음료 생산이 감소하는 반면, 과즙 야채즙 등 건강음료의 생산량은 지속적으로 증가하는 추세

○ 프리미엄 건강제품이 대세인 ‘프랑스’ 음료시장 :

■ 프랑스 농업부의 자료에 따르면 프랑스 내 청량음료시장은 꾸준히 증가해 2010년 330억 유로에 달했다. 2012년에는 2011년 대비 탄산을 함유하지 않은 과일음료시장이 18%, 차 음료시장이 17% 증가했다. 소비자들이 탄산음료보다 당도가 낮고, 좀 더 가볍고 건강한 음료를 찾는다는 것인데 이러한 소비자 트렌드 맞춰서 조금 더 비싸더라도 더 신선하고 품질이 좋은 원료를 사용하는 프리미엄 제품이 대세를 이루고 있음

○ ‘태국’ 건강과 다이어트에 도움되는 제품 인기 :

■ 태국 음료 시장은 2011년 기준 매출액과 수량 측면에서 6%의 성장을 보였으며, 매출 성

장을 주도한 제품분야는 생수, 과일주스, RTD차 등이다. 음료수시장은 2240억 바트인데, 이 중에서 가장 큰 비중을 차지하는 제품분야는 탄산음료로 2011년 기준 1185억 바트의 매출을 보였으며, 그 다음으로 판매가 많이 된 제품은 생수, 스포츠 및 에너지 드링크, RTD차 등으로 나타남

■ 많은 아시아 국가에서 차는 지속적으로 인기가 높는데 이는 태국도 예외는 아니며 가장 인기가 높은 차 종류는 녹차류이며 최근 에너지 드링크에도 차의 향기를 가미해 성공하고 있다. 또한 태국소비자들이 건강에 대한 관심이 급증함에 따라 100%천연주스시장이 형성되기 시작했다 2009년에만 천연주스시장이 84%의 고속성장을 기록

○ 천연, 유기농 음료가 인기인 ‘호주’ :

■ 인구의 60%이상이 과체중 또는 비만으로 알려져 있는데 최근에는 유기농 과일이나 야채 등의 천연재료를 소재로 한 건강음료가 소비자들의 주목을 받고 있는데 IBIS World보고서에 따르면 호주의 천연 과일음료시장 규모는 3억 2800만 오스트레일리아 달러로 추정되며 최근들어 더욱 더 붐을 조성하고 있다. 이 천연음료시장의 주요 고객은 주로 10~30대 젊은 세대들이며 이들 고객이 전체 천연음료시장의 64%를 점유

○ 신경안정 기능성 음료가 인기몰이 중인 ‘미국’ :

■ 미국에서는 지난 몇 년간 에너지 드링크 제품의 인기에 가려 큰 인기를 누리지 못했던 신경안정 기능성 음료가 최근 미국 음료시장에서 두각을 나타내기 시작했다, 소비자들의 스트레스가 상승할 때 마시면 긴장, 스트레스 완화, 수면유도효과가 있는 Anti-Energy제품에 관심이 고조

■ 지난 몇 년 간 에너지 드링크 제품의 전성시대였지만 부작용으로 위기를 맞고 있다. 에너지 드링크계 대박상품인 5hour Energy와 지난 4년간 발생한 13명 사망, 33명 입원 사건이 밀접한 관련이 있다는 민원이 FDA에 접수되었는데 이제품이 카페인 농축샷으로 건강상 위험에 대해 우려의 목소리가 있었기에 소비자들의 경각심이 고조되는 추세이다. 이런 에너지 드링크와 반대성격을 띠는 신개념 신경안정 기능성 음료가 부상하고 있어 향후 다른브랜드에서도 제품 출시에 적극적으로 나서 경쟁이 치열해질 전망

■ 현재 국내에서도 에너지 음료 시장이 확대되고 있는 시점인데 미국, 독일과 같은 해외에서 에너지 드링크에 대한 부작용 사례가 나오는 변화에 민감하게 반응할 필요가 있다. 국내에서도 제품 개발에 있어 다각도적인 시장분석과 소비자의 니드를 지속적으로 파악해 제품을 개발해야 할 필요성이 있고, 글로벌 트렌드를 파악하고, 한 발 앞선 제품 개발로 해외시장 진출을 모색해야 하지 않을까 생각

## 제1절 연구개발 추진전략, 추진체계 및 추진일정

## 1. 연구개발 추진전략

## 가. 추진전략

○ 농산물 생산이라는 제1차 산업부터 제2차, 제3차 산업을 융합하고 어울려 우리 농업을 제6차 산업이라는 새로운 틀로 바꾸자는 것이 정부의 정책임

■ 현재 우리농촌은 농가소득 정체, 고령화 등으로 활력이 떨어지고 있음

■ 그러나 교통과 통신의 발달, 주5일제 수업, 농업과 농촌 가치에 대한 인식 전환 등으로 소비자의 농촌에 대한 관심이 커지고 있음

⇒ 6차 산업화를 통해 농가소득 증대, 일자리 창출과 지역경제 활성화, 공동체 회복, 도시와 농촌이 상생하는 계기를 마련할 수 있음

○ 한방 약용작물은 다양한 생리활성을 지닌 polyphenol성 화합물들이 풍부하며, 특히 2차대사산물(기능성대사체)은 개체의 생존을 위해 또는 표현 기능을 위해 만들어지고 소멸됨

■ 기능성대사체는 다양한 기능성을 가지고 있으며 한방약초의 경우 약리효능이 우수한 것으로 알려지고 있음

○ FTA, 나고야 의정서 체결 등으로 국내 제품 원가상승 요인 발생이 되고 있음

■ 한-미, 한-중 FTA 체결, 생물다양성협약 제10차 ‘유전자원 접근 및 이익분배(ABS)에 관한 나고야 의정서’ 채택 등으로 국내 농·식품산업은 아주 큰 피해산업으로 분류

■ 이에 대한 국가 차원의 대응방안이 필요한 시점에 농업·농촌의 창조경제 실현을 위한 6차 산업 육성과 토종 종자에 대한 수집, 보존 및 재배기술이 활용을 위한 ‘Golden seed project’ 를 국가 정책으로 진행하고 있음

○ 본 연구 전략은 산청군 약초 생산자단체, 경남지역 국립대학, 향토기업, 연구소 및 산청군의 산·학·연·관·민 구성으로 이들 기관의 긴밀한 협조관계를 통해 연구를 추진하고자 함

■ 주관대학(경남과학기술대학교)과 참여기업[몽고식품(주)와 자연애영농조합법인] :

- 천연소스, 천연조미, 음료 및 드링크를 개발하며 이들에 대한 제품 표준화와 소비자 관능평가를 통해 사업 진행 중 제품화 실시를 목표로 진행

- 지리산 권역(경남지역)의 토종 약초 유전자원 확보 및 보존 기술 개발과 수입산과 국산의 원산지 판별 바이오 마커 개발을 통한 우수한 약초 종자를 보존하고 육묘 보급 체계를 확립하여 재배기술의 표준화와 대량화 기술 개발로 진행할 예정

- 한편 산청군 한방약초 6차산업 모델과 이를 통한 수익창출 모델 개발로 진행하고 이와 더불어 산청군 한방산업과와 공동으로 산청한방약초축제 및 동의보감 브랜드 마케팅 사업(경남과학기술대학교+산청군)을 통해 6차산업 육성을 위한 네트워크 구성과 홍보·마케팅을 지원할 예정

■ 1협동기관(경상대학교 의과대학원) :

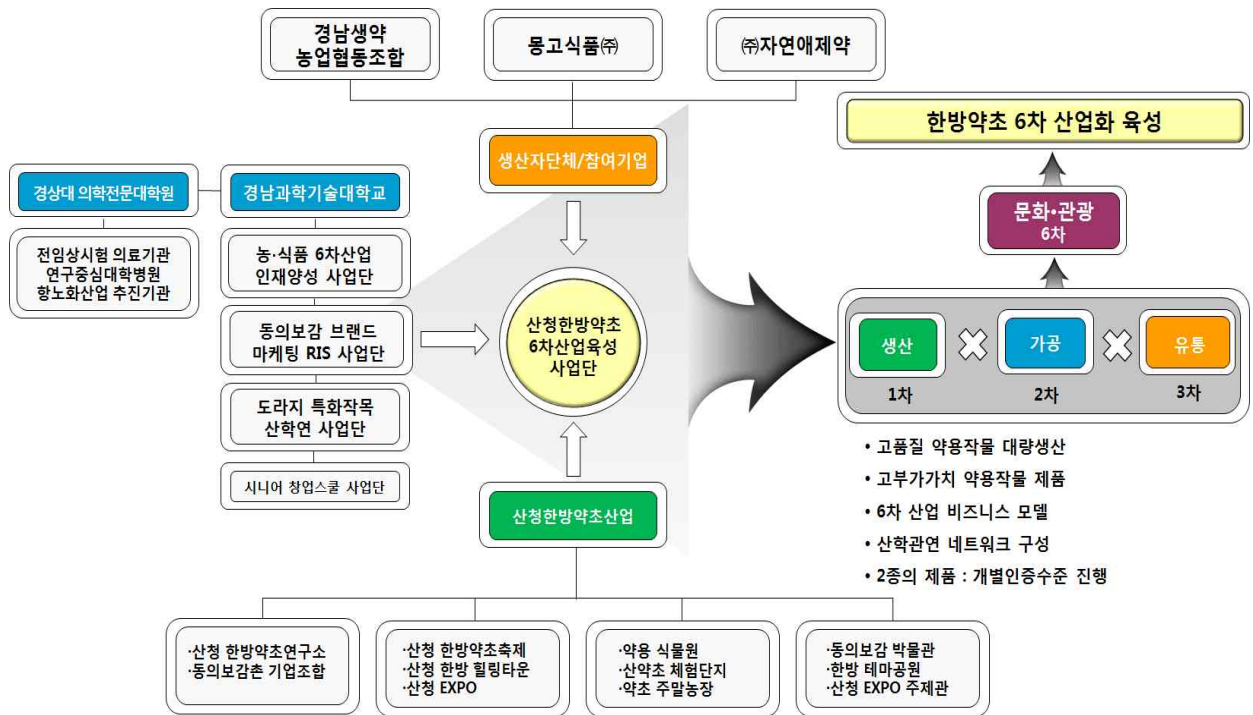
- 한방 약용작물 추출물에 대한 생활습관병 개선효과를 검증하여 한방 약용작용의 과학적인 효능 자료 확보로 진행할 예정

■ 2협동기관(산청한방약초연구소)과 생산자단체(경남생약협동조합) :

- 한방소재의 한약재의 대사산물을 분리 및 구조분석하고 이들을 바탕으로 대사산물의 프 로파일링을 구축을 통해 우수한 약용작물의 소재와 재배방법과 시기 등의 과학화·표준화 및 기 능성 제품 중심 원료보급을 위한 기능성 소재 대량추출체계 확립 및 표준화와 안정성 연구를 수행

- 경남생약협동조합의 1,820㎡ 규모(480,000본/회)의 육모장과 10,035 ㎡규모의 재배단지를 적 극 활용하여 시범단지를 통한 고부가가치 한방 약용작물의 보급과 대량생산 시스템 확립으로 진행

○ 산청군 한방약초 6차 산업 육성을 위한 모델 개발과 네트워크 구축을 위해 산·학·연·관·민 정기적인 교류회와 농식품부 정책부서와 자문회를 연 4회 및 1회 이상 개최하여 최종 산청군 한방약초 6차 산업 육성을 실현



【그림 3-1. 본 연구의 추진전략】

나. 한방약초 6차 산업화 추진전략

○ 산청군 한방약초 6차 산업 육성 전략은 아래 그림처럼 산·학·연·관·민 모두가 유기적인 관계를 구성하고 연차별로 진행할 것임

○ 몽고식품(주)과 자연애영농조합법인은 기존 판로 및 신규 판로를 이용하여 본 연구 개발 제품에 대한 판로를 지속적으로 모색할 것이며, 기존 축제와 홍보·마케팅 사업을 지원

○ 또한 산청군의 다양한 한방약초산업의 기반을 6차 산업 육성에 적극 활용할 것이며, 원료 생산-가공식품-유통-마케팅-문화·관광의 순환적 체계를 구축하여 추진할 것임

○ 산청군 한방약초 6차 산업화 단계별 추진 전략

■ 1단계(생산) : 고품질 한방 약용작물 재배단지 조성

- 산청군과 경남생약협동조합의 한방약초 재배단지 조성
- 한방 약용작물의 재배단지 확대 및 재배기술 보급
- 한방 약용작물의 활용성 증대를 위한 대량생산(추출) 기술 확립

- 2단계(가공) : 약용작물 활용 제품 개발 및 효능 검증, 제품 양산 계획 수립
  - 한방 약용작물 활용 제품의 공정 최적화 및 시제품 제조
  - 한방약초 첨가 장류의 생활습관병(항당뇨, 항비만, 고혈압) 개선 효과 확인
  - 시제품의 소비자 반응 테스트
  - 대량생산 체계 확립
  - 지적재산권 확보, 상표 디자인 및 등록
  - 생산라인을 이용한 제품 생산
- 3단계(유통, 마케팅, 문화·관광) : 한방약초 6차 산업 활성화
  - 산청군 한방약초 6차 산업 육성을 위한 비즈니스 모델 개발
  - 마케팅, 홍보/판매 전략 수립 및 지원
  - 기존 판매점 및 대리점을 이용한 제품 판매, 신규 판매라인 개척
  - 기존 한방약초 기반을 이용한 농촌체험, 관광 등의 상품 개발과 확장



【그림 3-2. 연구의 실용화 및 산업화 전략】

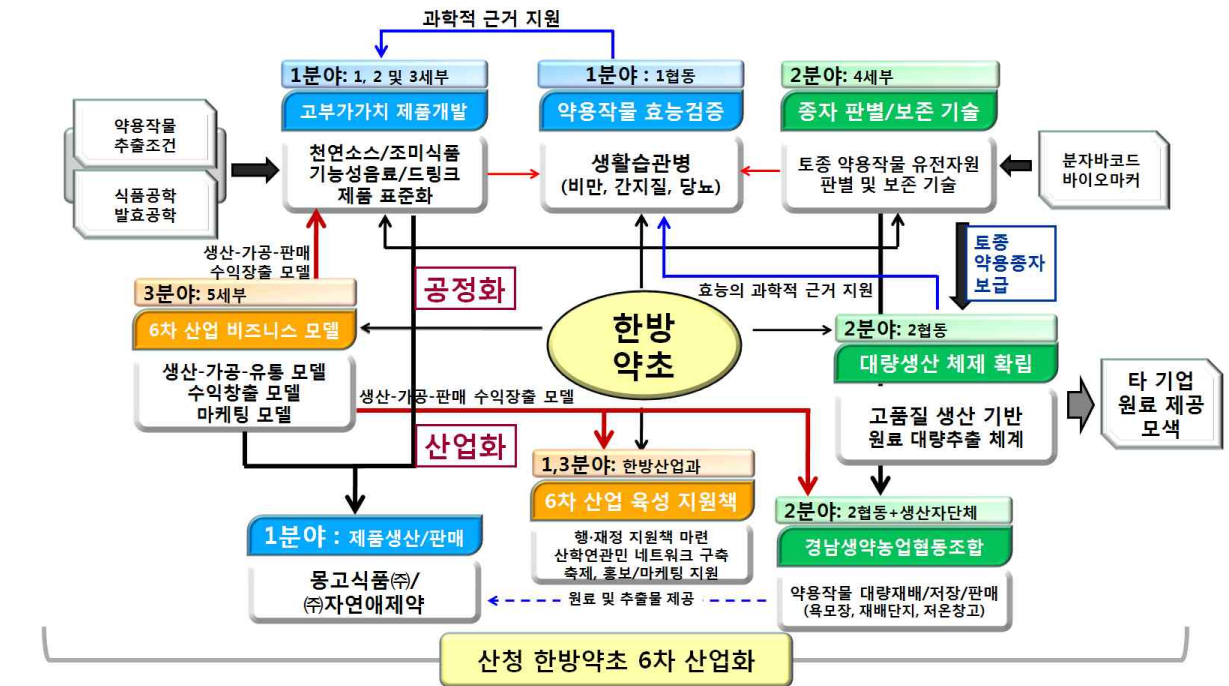
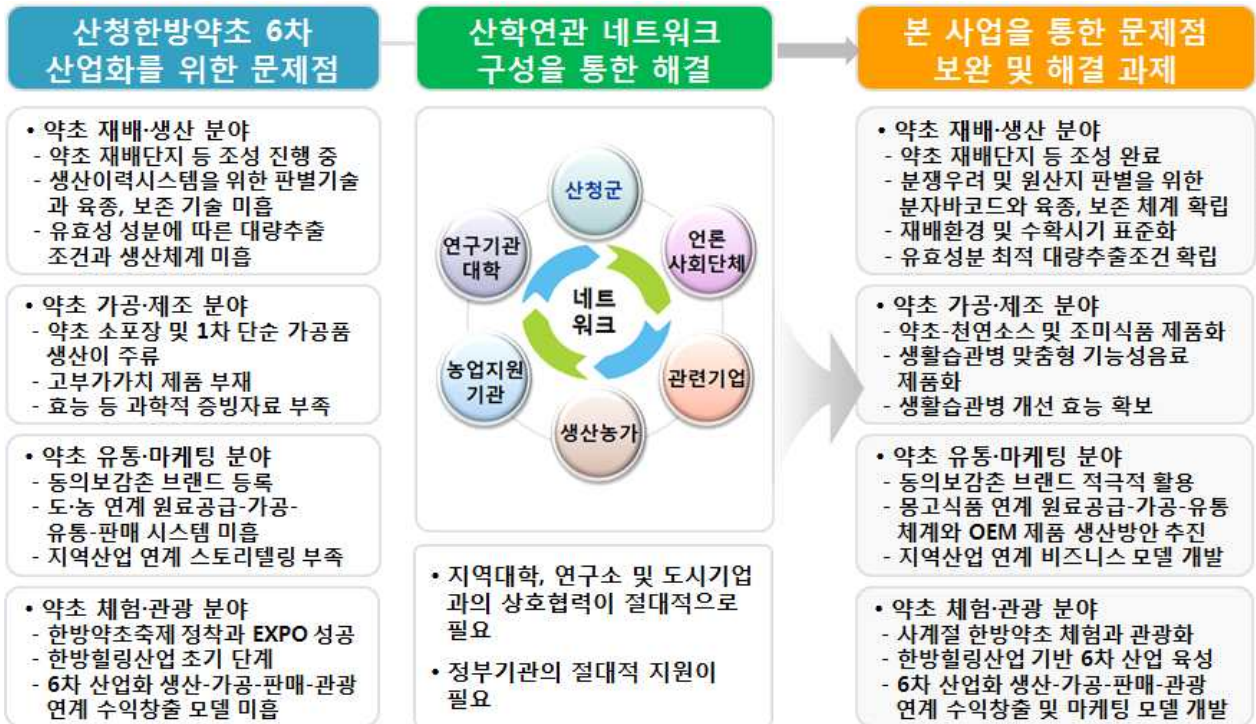
## 2. 연구개발 추진체계

○ 본 연구는 FTA 발효와 친환경 농·축산물 수요 증가에 따른 범정부차원의 정책이 추진 중이며, ABS 나고야의정서(2010년)에 의한 한국 토종 생물유전자원의 중요성이 부각되는 시점에 따른 한국 토종 약용작물의 유전자원 확보, 보존 및 대량생산 체계 구축과 한방약초를 이용한 생활습관병(대사증후군) 개선과 안전성이 확보된 제품 개발로 한국 토종 생물유전자원에 대한 활용성을 극대화하고자하는 연구이기도 함

○ 본 연구는 대표 청정지역인 지리산 권역에서 생산되는 한방약초의 6차 산업화 육성이라는 독창성 및 차별성이 있으며, 아래 그림과 같이 추진할 계획임(그림 3.3)

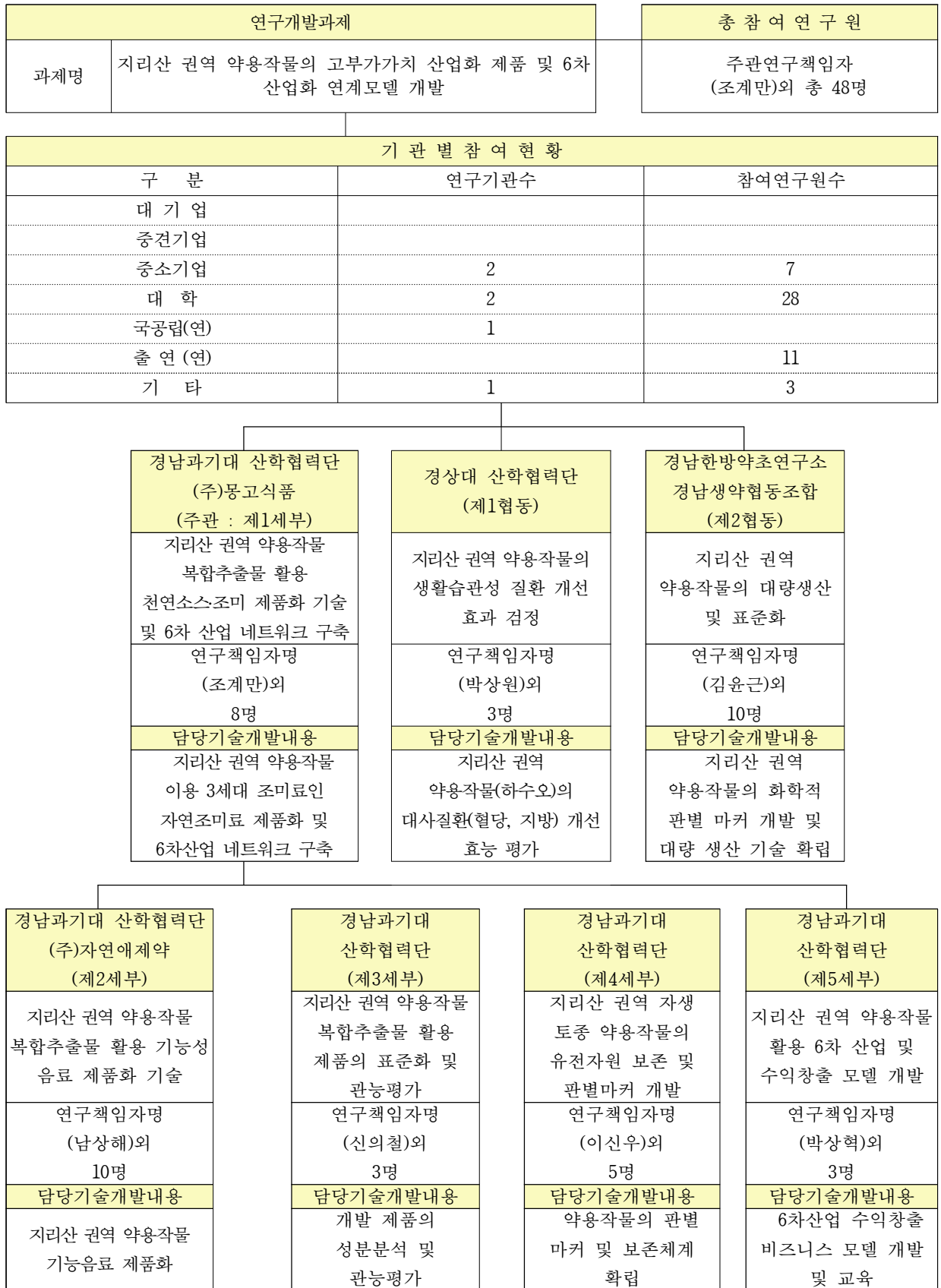
- 문제점 파악 : 산청한방약초 6차 산업화를 위한 문제점을 진단
- 문제해결 방안 제시 : 산학연관 네트워크 구성

■ 문제해결 제시 : 산청한방약초 6차 산업화를 위한 문제점 해결(본 사업 진행 방향)



【그림 3-3. 산청 한방약초의 6차 산업화 추진계획】

○ 연구개발 추진체계도는 아래와 같음 (그림 3.4)



【그림 3-4. 연구개발 추진체계도】



### 3. 연구개발 추진일정

#### 가. 제1세부

1차년도 (2014.07-2015.07)																
일련 번호	연구내용	추진 일정 (월 단위)												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7			
1	고초균 그룹 균주 선 발·동정														169,500	조계만 (경남과기대 산학협력단)
2	약초복합추출물의 최적화															
3	발효물 제조/천연소스/조 미 시제품화															
4	6차산업 네트워크 구축															
2차년도 (2015.07-2016.07)																
일련 번호	연구내용	추진 일정 (월 단위)												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7			
1	식·약용버섯균사체 선발														169,500	조계만 (경남과기대 산학협력단)
2	발효물 제조															
3	천연소스/조미 시제품화															
4	6차산업 네트워크 구축															
3차년도 (2016.07-2017.07)																
일련 번호	연구내용	추진 일정 (월 단위)												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7			
1	조미료 제조 발효용 유 산균 선발														169,500	조계만 (경남과기대 산학협력단)
2	발효물 제조															
3	천연소스/조미 (시)제품화															
4	6차산업 네트워크 구축															

#### 나. 제2세부

1차년도 (2014.07-2015.07)																
일련 번호	연구내용	추진 일정 (월 단위)												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7			
1	약용작물(1~2)의 음료류 개발을 위한 최적추출조 건 확립														124,500	남상해 (경남과기대 산학협력단)
2	약용작물(1~2) 추출물의 최적 발효조건 확립															
3	음료(1)개발을 위한 최 적의 혼합 레시피 개발															

2차년도 (2015.07-2016.07)																
일련 번호	연구내용	추진 일정 (월 단위)												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7			
1	약용작물(3-4)의 음료류 개발을 위한 최적추출조건 확립														124,500	남상해 (경남과기대 산학협력단)
2	약용작물(3-4) 추출물의 최적 배합조건 확립															
3	음료(II)개발을 위한 최적의 혼합 레시피 개발															
3차년도 (2016.07-2017.07)																
일련 번호	연구내용	추진 일정 (월 단위)												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7			
1	약용작물(1-5)의 음료류 개발을 위한 최적추출조건 확립														124,500	남상해 (경남과기대 산학협력단)
2	약용작물(1-5) 추출물의 최적 배합조건 확립															
3	음료(III)개발을 위한 최적의 혼합 레시피 개발															

#### 다. 제3세부

1차년도 (2014.07-2015.07)																
일련 번호	연구내용	추진 일정 (월 단위)												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7			
1	제품의 영양성분 및 특수성분 검토														38,000	신의철 (경남과기대 산학협력단)
2	제품의 휘발성 향기성분 분석															
3	제품의 위해성성분 분석															
4	소비자 선호도 조사를 통해 제품의 기호성 탐색															
2차년도 (2015.07-2016.07)																
일련 번호	연구내용	추진 일정 (월 단위)												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7			
1	제품의 영양성분 및 특수성분 검토														38,000	신의철 (경남과기대 산학협력단)
2	제품의 휘발성 향기성분 분석															
3	제품의 위해성성분 분석															
4	소비자 선호도 조사를 통해 제품의 기호성 탐색															

3차년도 (2016.07-2017.07)															
일련 번호	연구내용	추진 일정 (월 단위)											연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6			7
1	약용작물의 일반 및 기능성 성분 검토													38,000	신의철 (경남과기대 산학협력단)
2	약용작물의 휘발성 향기 성분 분석 및 후각검사														
3	제품의 위해성 성분 분석(벤조피렌 분석)														
4	소비자 선호도 조사를 통해 제품의 기호성 탐색														

라. 제4세부

1차년도 (2014.07-2015.07)															
일련 번호	연구내용	추진 일정 (월 단위)											연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6			7
1	유전자원 확보 및 보존 체계 구축													59,000	이신우 (경남과기대 산학협력단)
2	분쟁우려 약용작물의 판별 마커 개발														
2차년도 (2015.07-2016.07)															
일련 번호	연구내용	추진 일정 (월 단위)											연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6			7
1	우수약용작물의 육묘보급 시스템구축													59,000	이신우 (경남과기대 산학협력단)
2	유사종 중/속 구별 RAPD 마커 개발														
3	SNP 기술을 이용한 분자생물학적 바코드 개발														
4	생리생태학적, 생화학 적 판별 마커 개발														
3차년도 (2016.07-2017.07)															
일련 번호	연구내용	추진 일정 (월 단위)											연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6			7
1	우수약용작물의 육묘보급 시스템구축													59,000	이신우 (경남과기대 산학협력단)
2	SNP 기술을 이용한 분자생물학적 바코드 개발														
3	SNP 기술을 이용한 분자생물학적 판별 기술의 현장적용 실험														
4	약용작물의 기내배양체를 이용한 항균성 및 항산화성 조사														

마. 제5세부

1차년도 (2014.07-2015.07)																
일련 번호	연구내용	추진 일정 (월 단위)												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7			
1	산청군 한방약초 재배 및 가공에 대한 산업구조 분석														44,000	박상혁 (경남과기대 산학협력단)
2	산청군 한방약초를 기반으로 하는 새로운 비즈니스 모델 제시															
3	산청군 한방약초 재배 농민 및 가공업체 재직자 역량강화 교육															
2차년도 (2015.07-2016.07)																
일련 번호	연구내용	추진 일정 (월 단위)												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7			
1	최적의 수익모델에 대한 연구														44,000	박상혁 (경남과기대 산학협력단)
2	신사업 개발 및 지속적 수익 창출을 위한 교육															
3	브랜드별 스토리텔링 기법 적용 연구															
3차년도 (2016.07-2017.07)																
일련 번호	연구내용	추진 일정 (월 단위)												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7			
1	산청군 한방약초에 대한 강화된 브랜드 마케팅 제시														44,000	박상혁 (경남과기대 산학협력단)
2	산청군 한방약초 재배 농민 및 가공업체 재직자 역량강화 교육															

마. 제1협동

1차년도 (2014.07-2015.07)																
일련 번호	연구내용	추진 일정 (월 단위)												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7			
1	HepG2 세포주에서 세포독성 분석 및 단백질양상 확인														70,000	김현준 (경상대 산학협력단)
2	약초복합/영지버섯 추출물의 고지혈증 및 비만 개선효과 평가															
2차년도 (2015.07-2016.07)																
일련 번호	연구내용	추진 일정 (월 단위)												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7			
1	약초복합/영지버섯 추출물의 지방간 개선효과 평가														70,000	박상원 (경상대 산학협력단)

3차년도 (2016.07-2017.07)																
일련 번호	연구내용	추진 일정 (월 단위)												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7			
1	하수오의 비만/고지혈증, 지방간 및 고혈당증 개선 효능 평가														70,000	박상원 (경상대 산학협력단)

사. 제2협동

1차년도 (2014.07-2015.07)																
일련 번호	연구내용	추진 일정 (월 단위)												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7			
1	약용작물(버섯)소재 대사물질 라이브러리 구축														95,000	김윤근 (경남한방 약초연구소)
2	지표성분 정량/ 정성분석															
3	한방약용작물의 육모 육성															
2차년도 (2015.07-2016.07)																
일련 번호	연구내용	추진 일정 (월 단위)												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7			
1	약용작물의 환경에 따른 기능성 대사체 분석														95,000	김윤근 (경남한방 약초연구소)
2	약용작물의 선발 및 profiling 구축															
3	한방약용작물의 시험재배 (육묘장 등)															
3차년도 (2016.07-2017.07)																
일련 번호	연구내용	추진 일정 (월 단위)												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7			
1	대량추출체계확립														95,000	김윤근 (경남한방 약초연구소)
2	안정성 및 원료보급 위한 대량생산 표준화															
3	한방약용작물의 시험재배															

## 제2절 지리산 권역 약용작물 복합추출물 활용 천연소스·조미 제품화 기술 및 6차 산업 네트워크 구축 [제1세부, 경남과학기술대학교 산학협력단]

### 1-1. 1차년도 연구수행 방법

#### 가. 영지버섯의 이화학적 특성 및 생리활성

##### (1). 재료, 시약 및 기기

(가) 실험 재료 및 시약 : 본 실험에 사용한 건조 영지버섯(*Genoderma Lucidum*)은 전라북도 임실군 임실영지버섯영농조합법인으로부터 제공받아 사용하였다. 수용성 비타민(thiamine, riboflavin 및 niacin), Folin-Cialteu phenol, diethylene glycol, 2-deoxyribose, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt(ABTS), TPTZ(2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine), *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside(*p*-NPG) 및 *p*-nitrophenyl-butyrate(*p*-NPB)는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase 및 pancreatic lipase 역시 Sigma-Aldrich Co.에서 구입하여 사용하였고 Megazyme Kit(Mushroom and Yeast  $\beta$ -glucan Assay Procedure K-YBGL)은 Megazyme International Ireland사(Bray, Wicklow, Ireland)에서 구입하였다. HPLC-grade H<sub>2</sub>O, methanol, acetonitrile 및 glacial acetic acid는 Fisher Scientific(Fairlawn, NJ, USA)에서 구입하였다. 이 외에 분석을 위한 시약은 필요에 따라 특급 혹은 1급을 구입하여 사용하였다.

(나) 기기 : 분광광도계는 Spectronic 2D(Spectronic 2D, Thermo Co., California, CL, USA)을 사용하여 측정하였다. Gas chromatography(GC)는 Agilent GC 7890 series(Agilent Co., Australia)을 사용하였고, high pressure liquid chromatography(HPLC)는 Agilent HPLC 1200 series(Agilent Co., Australia)를 이용하였다. 한편 inductively coupled plasma spectrometer(ICP)는 iCAP6300 Duo ICP spectrometer(Thermo Scientific, London, UK)을 사용하였다.

##### (2) 성분 분석

① 일반성분 분석 : 식품공전의 일반성분 분석법(14)에 준하여 실시하였다.

② 아미노산과 지방산 분석 : 아미노산 분석은 Cho 등(12)의 방법을 약간 변경하여 수행하였다. 시료 100 mg을 정확히 시험관에 칭량하고 여기에 6 N-HCl을 3 mL 가하여 110°C 에서 24 시간 동안 산 가수분해 시킨 후 아미노산 자동분석기(Hitachi L-8900, Tokyo, Japan)를 이용하여 분석하였다. 지방산 분석은 Shin 등(15)의 방법에 준하여 수행하였다. 지방산 전처리는 각각의 버섯 분말 1 g에 0.5 N 메탄올성 NaOH 3 mL를 가해 100°C 의 heating block을 이용하여 약 10분간 가온하여 지방산과 글리세롤을 가수분해 시킨 후 GC를 이용하여 분석하였다.

③ 무기질 분석 : 식품공전의 무기질 분석법(14)에 준하여 ICP로 분석하였다.

④  $\beta$ -glucan 분석 : 영지버섯의  $\beta$ -glucan 함량은 Megazyme Kit를 이용하여 분석하였다.

⑤ 수용성 비타민 분석 : 식품공전의 비타민 분석법(14) 준하여 HPLC(Agilent Co.)로 분석하였다.

① 추출물 제조 : 영지버섯 분말 10 g에 30%, 50%, 70% 및 95% 에탄올을 200 mL씩 가하

여 40℃ 및 70℃에서 4시간 동안 600 rpm 속도를 유지하여 추출하였다. 동일한 조건으로 2회 반복 후 추출하여 모은 후 여과지(No. 2, Whatman, Tokyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan)로 여과하여 모은 후 여과액을 감압농축기(EYELA, Tokyo, Rikakikai Co., Japan)를 이용하여 60℃에서 감압 농축하여 추출물을 얻었다.

② 총 phenolics 분석 : 총 phenolics 함량은 Folin-Denis법을 약간 변형하여 측정하였다. 추출물 0.5 mL를 시험관에 분주하고 25% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 0.5 mL를 첨가하여 3분간 정치시켰다. 그 후 2 N Folin-Ciocalteu phenol 용액 0.25 mL 첨가 및 혼합한 다음 30℃에서 1시간 동안 발색시켰다. 발색된 시료는 750 nm에서 분광광도계(Spectronic 2D)를 사용하여 흡광도를 측정하였고, gallic acid를 이용하여 작성한 표준 검량곡선으로부터 값을 산출하였다.

③ 총 flavonoids 분석 : 총 flavonoids 함량은 Davis법으로 측정하였다. 즉 각각의 추출물 0.5 mL를 대조구 및 시험용액으로 두 개의 시험관에 취하고 여기에 diethylene glycol 1.0 mL 및 1 N-NaOH 0.01 mL를 가하여 37℃ 항온수조에서 1시간 방치시켰다. 그 후 분광광도계(Spectronic 2D)를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였고, rutin을 이용하여 작성한 표준 검량곡선으로부터 값을 산출하였다.

#### ④ 생리활성 확인 :

㉠ 라디칼 소거활성 측정 : DPPH 라디칼 소거능은 Hwang 등(18)의 방법에 따라 측정하였고, ABTS 라디칼 소거능 역시 Hwang 등(18)의 방법과 동일하게 측정하였다. Hydroxyl 라디칼 소거능은 10 mM FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O-EDTA 0.2 mL, 10 mM 2-deoxyribose 0.2 mL, 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.2 mL 및 농도별 추출물 1.4 mL를 혼합하고 37℃에서 4시간 동안 반응시켰다. 이 혼합액에 1% thiobarbituric acid와 2.8% trichloroacetic acid를 각각 1 mL를 가하여 100℃에서 20분간 가열하여 발색 및 냉각시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 라디칼 소거활성의 음성대조구는 시료 대신에 추출용매를 취하였으며 시료용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

㉡ 탄수화물 및 지방 분해효소 저해활성 측정 :  $\alpha$ -Glucosidase와 pancreatic lipase 저해활성은 p-nitrophenol법을 기초로하여 분석하였고,  $\alpha$ -Amylase 저해활성은 DNS법을 기초로하여 분석하였다. 모든 효소 저해능의 음성대조구는 시료 대신에 추출용매를 취하였으며 시료용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

## 나. 하수오의 기능성 물질 확인 및 인지 개선 효과

### (1) 재료 및 기기

(가) 실험 재료, 시약, 기기 및 세포주

① 실험 재료 및 시약 : 하수오(*Polygoni Multiflora Radix*) 및 법제 하수오(Processed *Polygoni Multiflora Radix*, PPMR)는 2011년 경상남도 산청군 생초면에서 3년간 재배하여 수확하여 하수오를 공급받았고 법제 하수오는 증자, 막걸리와 검정콩 삶은 물 법제를 통하여 건조한 것을 산청군 지리산하수오영농조합법인에서 공급받아 사용하였다. 총 phenolics 및 라디칼 소거활성 등의 분석을 위한 시약은 상기에 기술한 것을 동일하게 사용하였다. 산화적 스트레스를 유도하기 위해 사용한 sodium nitroprusside(SNP)는 Wako Co.(Tokyo, Japan)에서 구입하였고 pyrogallol, 3-morpholinopyridone(SIN-1) 및 A $\beta$ 25-35는 Sigma-Aldrich사에서 구입하여 사용하였고, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 Junsei(Junsei Chemical Co., Tokyo, Japan)사 사용하였다. 세포생존율과 ROS 생성률 측정을 위한 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,3-diphenyl tetrazolium bromide(MTT), dimethyl

sulfoxide(DMSO)와 2'7'-dichlorofluorescin diacetate(DCF-DA)는 Sigma사 제품을 구입하였다.

② 기기 : 분광광도계 및 HPLC 등 역시 상기에 기술한 동일한 기기를 사용하였고, NMR은 Bruker AM 500 spectrometer(Bruker Corp., Billerica, Massachusetts, USA)를 사용하였고, EI-MS는 JEOL JMS-700 mass spectrometer(JEOL, Tokyo, Japan)을 사용하였다. 화합물의 분석을 위한 column은 Lichrophore 100 RP C18 column(4.6×250 mm, 5 μm, Merck & Co., Kenilworth, NJ, USA)을 사용하였다.

③ 세포주 : LLC-PK<sub>1</sub> pocrine renal epithelial cell은 ATCC(Solon, Ohio, USA)에서 분양받았고 세포배양을 위한 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM)과 fetal bovine serum (FBS)는 Invitrogen Co.(Grand Island, NY, USA)에서 구입하여 사용하였다.

(나) 기능성 물질 분리 및 구조·동정 : 분리 및 구조, 동정은 다음 Fig. 1-1-1과 같은 방법으로 분리 및 확인하였다.

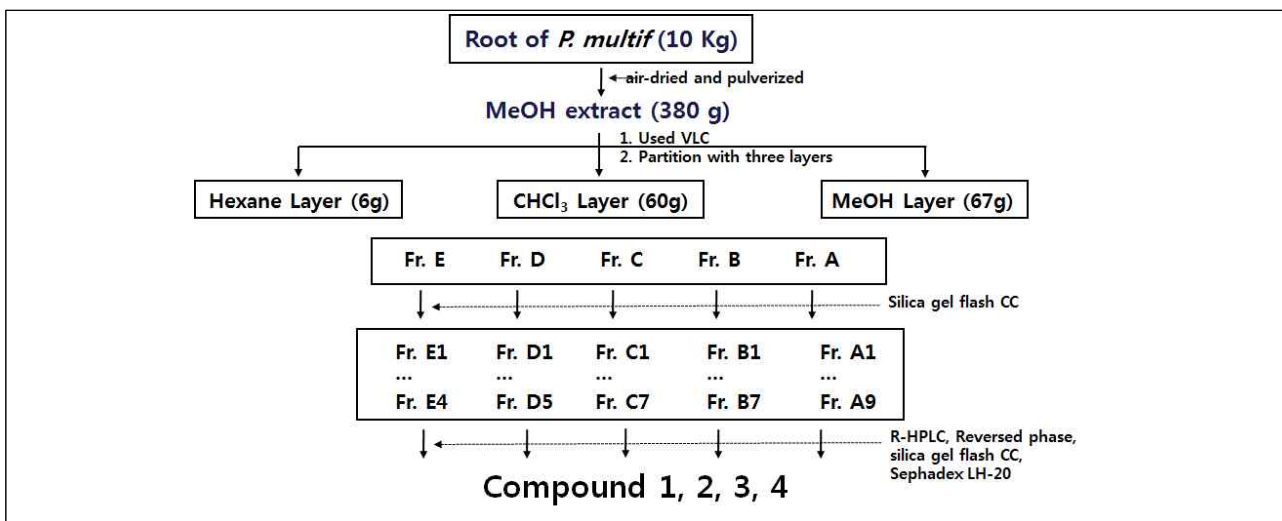


Fig. 1-1-1. Isolation diagram of compounds 1, 2, 3, and 4 from *Polygoni Multiflori Radix*.

(다) 법제 하수오의 기능성 물질 함량 분석

① 추출물 제조 : 건조 법제 하수오 20 g에 메탄올 400 mL을 가하여 320 rpm에서 12시간 추출하였고 동일한 과정을 3회 반복한 후 여과지(No. 2, Whatman, Tokyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)로 여과하여 모은 후 여과액을 감압농축기(EYELA, Tokyo, Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 50°C에서 감압 농축하여 메탄올 추출물을 얻었다. 농축된 시료는 추출용매인 메탄올로 녹여 각각 10, 25 및 50 μg/mL 농도로 제조하여 라디칼 소거능 및 산화적 스트레스 개선 효과를 확인하였다.

② HPLC 분석 : 법제 하수오 메탄올 추출물의 기능성 물질 분석은 Liang 등(19)의 분석법을 변형하여 High Press Liquid Chromatogram(HPLC, Agilent 1200 series, Agilent Co., Forest Hill, Vic, Australia)로 분석하였다.

(라) *In vitro* 상에서 라디칼 소거 효과 : 상기에 기술된 방법대로 수행하였다.

(마) Cellular system에서 산화적 스트레스 개선 효과 확인

① 세포 배양 : LLC-PK<sub>1</sub> cell은 100 units/mL의 penicillin-streptomycin(PS)와 5% FBS가 함유된 DMEM을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 배양된 세포는 1~2일에 한 번 배양액을 바꾸어 주면서 배양하여 세포분화가 최대에 도달하였을때 phosphate buffered saline으로 세포를 세척한 후 0.05% trypsin과 0.02% EDTA 혼합액으로 부착된 세포를 분리한 뒤 원



심 분리하여 세포를 모은 다음 세포를 재분산 후 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

② Cell viability 측정 : 세포가 confluence 상태가 되면 96 well culture plate에 LLC-PK<sub>1</sub> cell을  $1 \times 10^4$  cells/mL로 분주하여 2시간 배양한 후 산화적 스트레스 유발 물질인 250  $\mu$ M pyrogallol, 500  $\mu$ M SNP 및 1 mM SIN-1를 처리하여 24시간 배양하였다. 산화적 스트레스 유발 후 시료를 농도별로 처리하여 다시 24시간 배양한 뒤 5 mg/mL의 MTT solution을 각 well에 주입하여 37°C에서 4시간 동안 재배양한 후 생성된 formazan 결정을 빛을 차단한 상태에서 DMSO에 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 다. *Bacillus subtilis* group 선발 · 동정 및 청국장 특성 확인

### (1) 재료 및 방법

(가) 실험 재료 및 시약 : 청국장 베이스 소스 제조를 위하여 신규 *Bacillus subtilis* 그룹 분리를 위한 시료는 참여기업인 몽고식품(주)으로부터 된장과 간장을 제공받아 사용하였다. 총 phenolics 및 라디칼 소거활성 등의 분석을 위한 시약은 상기에 기술한 것을 동일하게 사용하였다. 청국장 제조를 위한 콩 시료 중 새단백콩은 농촌진흥청 남부작물부(구, 기능성작물부)에서 공급받아 사용하였고, 유기농 백태콩은 마산카톨릭농업협동조합에서 구입하여 사용하였다.

(나) 배지 : *Bacillus subtilis* 그룹 및 식품위해미생물 배양배지로는 Tryptic soy(TS, Difco, Becton Dickinson Co., MD, USA)를 사용하였고, 형질전환 등의 미생물 확인을 위한 배양배지로는 Luria-Bertani(LB, Difco, Becton Dickinson Co., MD, USA)를 사용하였다.

(다) 기기 : 분광광도계 및 HPLC 등 역시 상기에 기술한 동일한 기기를 사용하였고, 이소플라본 화합물의 분석을 위한 column은 Lichrophore 100 RP C18 column(4.6×250 mm, 5  $\mu$ m, Merck & Co., Kenilworth, NJ, USA)을 사용하였다.

### (2) *B. subtilis* 그룹의 청국장 가공 적성 확인

(가) 청국장 제조 및 발효 : 정선된 콩을 흐르는 물에 3회 수세하여 상온에서 12시간 동안 침지시킨 후 약 30분간 물 빼기를 하고 stainless 발효용기(30 cm×30 cm×10 cm)에 수침콩 1,000 g과 여주 분말을 0%, 1.0%(10 g, w/w), 2.5%(25 g, w/w) 및 5.0%(50 g, w/w) 담아 고압증기 멸균기로 121°C에서 30분간 증자하였다. 증자한 콩을 40°C로 냉각시킨 후 TS 액체배지에 48시간 배양한 *B. subtilis* CSY191 균주를 2.5%(v/w) 접종하여 37±2°C의 배양기에서 72시간 발효시켜 청국장을 제조하였다.

(나) 기호성 평가 : 관능평가는 관능평가의 목적, 시료 등에 대해서 우선 시험자들에게 사전 인지시킨 후 1차적인 관능평가가 실시를 통하여 최종 선별력이 우수한 경남과학기술대학교 식품과학부 학생 30명을 대상으로 ‘매우 좋다 5점, 좋다 4점, 보통이다 3점, 나쁘다 2점 및 매우 나쁘다 1점’으로 하는 5점 척도법으로 평가하였다.

(다) 총 phenolics 및 이소플라본 분석 :

① 추출물 제조 : 시료 추출은 Hwang 등(13)의 방법에 준하여 추출하였다. 즉, 동결건조 분말 1 g에 10배의 50% 메탄올을 가하고 상온에서 12 h 추출하였다. 추출물은 0.45  $\mu$ m membrane filter (Dismic-25CS, Toyoroshikaisha Ltd., Tokyo, Japan)로 여과하여 총 phenolics와 isoflavone 함량 및 항산화 활성 측정을 위한 시료로 사용하였다.

① 총 phenolics 함량 : 상기에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

② 이소플라본 함량 : Isoflavone 함량 분석은 Cho 등(20)의 방법에 준하여 HPLC로 분석하였다.

③ 항산화 활성 분석 : 항산화 활성은 상기에 기술된 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능 및 FRAP 환원력을 측정하였다.

### (3) 균주 2TDJ15와 MGD02 동정

(가) 생육 및 생화학 시험 : 생육 특성은 배양온도(10-50°C), pH (3-11) 및 NaCl 농도(0-14%)에서 확인하였고 생화학적 특성은 API50 NE kit (BioMeriux, Marcy-l'Étoile, France)를 사용하여 당 이용성을 측정하였다.

(나) MIDI(균체 지방산) 분석 : 세포 지방산 조성은 MIDI Microbial Identification System (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) 방법에 따라 전처리 후 지방산을 분석하였다. 지방산 분석은 gas chromatography(model 7890, Hewlett Packard) 및 phenylmethyl silicone fused silica capillary column (25m×0.2mm, Hewlett Packard)을 사용하였다.

(다) 16S rRNA 염기서열 분석 :

① 미생물 배양 및 genomic DNA 분리 : 각각의 균을 TS 액체배지에 접종한 후 24시간 배양하고 균체를 수집한 후 Genomic DNA Purification Kit(Intron, Suwon, Korea)에 기술된 대로 미생물의 genomic DNA를 분리하였다.

② PCR 및 16S rRNA 염기서열 분석 : 상기에서 분리한 genomic DNA를 주형으로 하여 16S rDNA를 PCR로 증폭하였다. 증폭은 94°C에서 1분간 변성, 50°C에서 30초간 풀림, 72°C에서 1분 30초 신장으로 30 cycle로 수행되었고, 염기서열은 PRISM Ready Reaction Dye terminator/primer cycle sequencing kit를 사용한 dideoxy chain termination method를 이용하여 분석하였다. 16S rDNA 염기서열은 BLAST network service와 the nonredundant DNA sequence database를 제공하는 미국 국립생물정보센터(NCBI)에서 얻은 다른 균종의 것과 정렬하였다. 세균 16S rDNA 상동성 정도는 alignment를 통해 산출하였고 진화적 거리도 계산하였다.

## 라. 약용작물의 복합추출물 제조

### (1) 재료 및 방법

(가) 실험 재료 및 시약 : 본 실험에 사용한 자소엽(PF, *Perilla frutescens* var. *acuta* KVDO), 당귀(AG, *Angelica gigas*), 도라지(PG, *Platycodon grandiflorum*) 및 백수오(CW, *Cynanchum wilfordii*)는 경남생약농업협동조합으로부터 건조 상태로 구입하여 사용하였다. 총 phenolics 및 라디칼 소거활성 등의 분석을 위한 시약은 상기에 기술한 것을 동일하게 사용하였다.

(나) 기기 : 분광광도계 및 HPLC 등 역시 상기에 기술한 동일한 기기를 사용하였고, phenolic acids와 flavonols 화합물의 분석을 위한 column은 X-Bridge™ C18 column(4.6×250 mm, 5 μm, Waters Co., USA)을 사용하였다.

### (2) 약용작물(자소엽, 당귀, 도라지 및 백수오)의 복합추출물 제조

(가) 약용작물의 복합추출물 비율 설정 및 전처리 : 자소엽, 당귀, 도라지, 백수오를 세절하여 준비하고, 약용작물의 구입가격을 고려하여 3가지 조건으로 설정한 후 복합추출물 제조를 위해 각각 분쇄기로 분쇄하여 분말을 제조하였다.

(나) 생리활성 검정용 복합추출물 제조 : 2세부과제의 약용작물 최적추출 조건 약간 변형하여 복합추출물을 제조하였다. 약용작물 복합분말 10 g에 70% 에탄올 200 mL씩 가하여 최종 20배 희석한 것을 70°C에서 5시간 동안 600 rpm 속도를 유지하여 추출하였다. 동일한 조건으로 2회 반복 추출하여 모은 후 여과지(No. 2, Whatman, Tokyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo,

Japan)로 여과하였다. 여과액은 감압농축기(EYELA, Tokyo, Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 60℃에서 감압 농축하여 추출물을 얻었다.

(다) 분석용 추출물 제조 : 각각의 시료 5 g에 70% 발효주정을 10배 분량인 10 mL를 첨가하여 70℃에서 5시간 동안 600 rpm 속도를 유지하여 추출한 후 0.45  $\mu$ m membrane filter로 여과하여 총 phenolics, 총 flavonoids 및 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였다.

### (3) *In vitro* 상에서 생리활성 검정

(가) 라디칼 소거능 측정 : 상기 기술된 바와 동일하게 수행하였다.

(나) 탄수화물 및 지방 가수분해효소 저해활성 : 상기 기술된 바와 동일하게 수행하였다.

### (4) 기능성 물질 분석

(가) 총 phenolics 및 총 flavonoids 분석 : 상기에 기술된 바와 동일하게 수행하였다.

(나) Phenolic acid 및 flavonol 분석 : Phenolic acid와 flavonol 물질 분석은 Cho 등(2011)의 분석법을 변형하여 High Press Liquid Chromatogram(HPLC, Agilent 1200 series, Agilent Co., Forest Hill, Vic, Australia)로 분석하였다.

## 마. 약용작물 추출물 이용 천연소스류 제조 공정 확립

### (1) 재료 및 기기

(가) 실험 재료 및 시약 : 국산 대두는 경상남도 밀양시 소재 농촌진흥청 남부작물부(구 기능성작물부)에서 공급받은 새단백콩을 공급받아 사용하였고, 유기농 햇콩은 마산카톨릭농협에서 구입하여 사용하였다. 매실청은 6월에 수확한 청매실과 백설탕을 1:1로 섞어 실온에서 3개월간 삼투압 침출 후, 매실을 제거하고 침출액을 1년간 숙성시킨 것을 사용하였다. 밀가루(박력분), 황설탕, 올리브유((주) CJ제일제당, Korean), 후추, 2배 식초((주)오뚜기식품, Korean), 식염(정제염, (주)한주, 로즈마리, 타임, 월계수잎(에스피, Turkey)은 시판품을 구입하여 사용하였다.

(나) 기기 : 분광광도계 및 HPLC 등 역시 상기에 기술한 동일한 기기를 사용하였다.

### (2) 약용작물 복합추출물 혼합 브라운소스의 제조 및 품질 특성

(가) 청국장 제조 : 청국장 소스를 제조하기 전에 우선 소스류의 원료인 청국장 제조를 실시하였다. 청국장 제조는 유기농 백태를 12 시간 물에 침지하여 원료콩 무게의 2.5배가 되도록 하였다. 이후 물기를 뺀 후 121℃에서 1시간 증자 및 냉각시킨 후 미리 배양한 *B. amyloilquefaciens* 2TDJ15 및 MGD02 및 이들의 혼합배양액(2TDJ15+MGD02)을 접종시켜 starter를 제조하였으며 starter를 이용하여 각각의 균주별 청국장을 3일간 발효시켜 제조하였다. 제조한 각각의 청국장은 50℃에서 2-3일간 열풍건조하여 냉장실에 보관하면서 필요에 따라 사용하였다.

(나) 청국장 스탁 제조 : 청국장 스탁의 제조는 2TDJ15, MGD02 및 이들 혼합균주를 이용하여 제조한 각각의 건조 청국장 1 kg에 대하여 3 L의 물을 가하여 100℃에서 끓을 때까지 열을 가하였다. 한번 끓은 후에는 중불로 낮추어 1시간동안 저어가며 열수추출을 진행하였다. 이후에 다시 동등한 양의 물을 첨가하여 1시간동안 저어가며 열수추출을 진행하였고 마지막에는 2 L의 물을 가하여 상기 방법과 동일하게 진행하였으며 최종 4 L가 되게끔 정수기 물로 정용하여 제조를 완료하였다.

(다) 청국장 소스 제조 : 균주별로 제조한 각각의 청국장 스탁 400 mL에 부재료인 설탕, 소금, 와인, 당근, 셀러리, 루, 양파, 토마토 페이스트를 같이 첨가하고 100℃에서 끓인 후 각각의 청국장 소스들을 채에 걸러내어 최종적으로 청국장 소스를 제조하였다. 이 후 경남과학기술대

학교 식품과학부 학부생들을 기준으로 제조한 소스에 대하여 맛, 향, 식감 등의 관능평가를 진행하였다.

(라) 이화학적 특성

① pH, 산도, 및 염도 : pH는 pH meter (model 3510, Jenway, Essex, UK)를 사용하여 측정하였다. 총산은 중화적정법, 염도 측정은 염도계를 이용하였다.

② 단백질 정량 : 단백질 정량은 Biuret법을 이용하여 측정하였다.

③ 생리활성물질 분석

㉠ 추출물 제조 : 각각의 청국장 건조 분말 1 g에 10배의 메탄올을 가하고 상온에서 12시간 추출하였다. 추출물은 원심 분리하여 얻은 상등액을 0.45  $\mu$ m membrane filter(Dismic-25CS, Toyoroshikaisha, Ltd, Tokyo, Japan)로 여과하여 일부는 총 phenolics 및 isoflavone 함량 측정에 사용하였고 나머지 추출물은 추출용매로 녹여 각각 0.25, 0.50 및 1.0 mg/mL 농도로 제조하여 라디칼 소거활성 및 탄수화물과 지방 분해효소 저해활성 평가에 사용하였다.

㉡ 총 phenolics 및 총 flavonoids 함량 측정 : 상기에 기술된 방법대로 수행하였다.

㉢ Isoflavone, phenolic acids와 flavonols 함량 분석 : 상기에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

㉣ *In vitro* 상에서 생리활성 검정 : 상기에 기술된 방법대로 수행하였다.

(마) 약용작물 복합추출물 혼합 청국장 브라운소스의 제조

① 소스 제조 : 1차적으로 관능적으로 우수한 균주 2TDJ15로 제조한 청국장 스탁 400 mL에 부재료인 설탕, 소금, 와인, 당근, 샐러리, 루, 양파, 토마토 페이스트를 같이 첨가하고 100°C에서 끓인 후 각각의 청국장 소스들을 체에 걸러내어 최종적으로 청국장 소스를 제조하고 여기에 약용작물 복합추출물(가용성고형분 함량: 3 °brix)을 0%, 10% 및 20% 첨가하여 혼합하여 100°C에서 30분간 열처리 이 후 냉각하여 경남과학기술대학교 식품과학부 학부생들을 기준으로 제조한 소스에 대하여 맛, 향, 식감 등의 관능평가를 진행하였다.

② 이화학적 특성, 생리활성물질 분석 및 항산화 활성 : 상기에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

**바. 약용작물 추출물 이용 천연조미료 제조공정 확립**

**(1) 재료 및 기기**

(가) 실험 재료 및 시약 : 본 실험에 사용한 활성글루텐(vital gluten)과 천일염은 시중에서 구입하였으며 다래는 경남 사천 소재 영농조합법인 오름주사에서 필요에 따라 제공받아 사용하였다.

(나) 기기 : 분광광도계 및 HPLC 등 역시 상기에 기술한 동일한 기기를 사용하였다.

**(2) 활성글루텐 가수분해물 제조**

(가) 활성글루텐 가수분해물 처리 조건 확립 : 키위주스, 반응온도, 반응시간, 활성글루텐 함량을 고려하여 활성글루텐 가수분해물 최적 전처리 조건을 확립하였다.

(나) 24시간 효소 처리에 따른 단백질 분해능 확인 : 24시간 효소 처리에 따른 단백질 분해능 측정으로는 활성글루텐 30 g에 15% 소금물을 65 mL씩 첨가 및 정용하였다. 여기에 키위주스 5 mL씩 첨가하여 최종 5%가 되게끔 제조하여 40°C의 수욕상에서 효소 처리하여 0, 6, 12, 및 24시간 처리 반응물에 대해 각각 121°C에서 15분 살균하여 반응물의 묽어짐 정도를 육안으로 관찰하였다.

(다) 이화학적 특성 및 유리아미노산 분석 : 상기에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

### (3) 균주별 청국장 스탁과 활성글루텐 가수분해물 이용 조미료 제조

(가) 조미료 제조 : 제조된 청국장 균주별 스탁을 사용하여 물, 20% 활성글루텐, 콩고간장, 물엿을 아래의 조건과 같이 동량 넣고 이에 무, 양파, 마늘 및 사과를 혼합하고 분쇄한 후 첨가하고 최종적으로 균주별 스탁을 각각 달리하여 마지막으로 넣어준 후 강불에서 끓고 난 후 약불에서 30분간 저어주면서 끓였다. 이후 식혀 치즈크로스로 고형분을 걸러준 후 균주별 조미료로 준비하였다.

(나) 이화학적 특성, 생리활성물질 및 항산화 활성 분석 : 상기 소스 제조에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

### (4) 약초당추출발효액 이용 조미료 제조

(가) 조미료 제조 : 산야초 발효액 첨가별 조미료는 아래의 Table 2와 비율로 제조하였다. 즉, 앞의 균주별 조미료와 같은 방법으로 재료를 준비하였으며, 그 중 스탁은 MGD02와 2TDJ15 혼합균주로 제조한 조미료가 대체적인 평가에서 우수하여 MGD02와 2TDJ15 혼합균주 청국장 스탁을 사용하였고 물엿 대신 실험구에서는 약초-당추출발효액(이하 약초발효액)을 첨가하여 조미료를 제조하였다. SS 100%는 물엿 200mL를 넣었고 SS 75%+FHSE 25%는 물엿 150 mL와 약초 발효액 50 mL를 넣었으며 SS 50%+FHSE 50%는 물엿 100 mL와 산야초 발효액 100 mL를 넣어 앞의 균주별 조미료와 동일한 방법으로 제조하였다.

(나) 이화학적 특성, 생리활성물질 및 항산화 활성 분석 : 상기 소스 제조에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

## 사. 약용작물 함유 청국장 브라운소스 및 자연조미료의 관능평가 및 시제품 제조

### (1) 실험방법

실험에 사용된 샘플은 Brown 소스와 조미료가 사용되었다. Brown 소스의 경우 약용식물 추출물을 10%와 20%를 함유하여 소스를 제조하였고, 조미료의 경우는 마리오자임의 함유를 25%와 50%의 함유량을 통해 소비자들의 선호도를 조사하였다. 본실험은 숙련된 10명의 20대 남녀(남 4명, 여 6명)를 대상으로 실시하였고, 테스트를 실시하기 전 소스와 조미료에 들어간 재료를 panel들에게 설명하여 알레르기 증상이 일어나지 않도록 하였다. 평가는 9점법을 사용하여, 각 항목에 따라 가장 강도가 낮은 점수를 1점으로 하여 높은 강도의 향이나 맛을 인식하였을 때 9점 까지 부여할 수 있도록 준비하였다.

## 1-2. 1차년도 연구결과

### 가. 영지버섯의 이화학적 특성 및 생리활성 결과 및 고찰

#### (1) 영지버섯의 성분 함량

(가) 일반성분 함량 : 원형영지버섯 및 녹각영지버섯의 일반성분을 분석한 결과는 Table 1과 같았다. 탄수화물 함량은 원형이 78.09%와 녹각이 61.20%로 일반성분 중 대부분을 차지하였다. 수분은 큰 차이 없이 평균 10.1% 이었고 조지방 함량 역시 버섯 형태에 따른 큰 차이를 보이지는 않았다. 한편 조단백질의 경우에는 원형영지버섯은 9.86% 있었으며, 녹각영지버섯은 25.34%로 원형보다는 2.3배 이상 높았으며, 조회분은 원형영지버섯이 0.87%와 녹각영지버섯이

1.33%을 함유하고 있었다(Table 1-1-1).

**Table 1-1-1. Comparison of proximate properties of two different *Genoderma Lucidum***

Contents <sup>1)</sup> (g/100 g)	Type of fruiting body	
	Round	Nokgak
Moisture	10.09±0.50	10.11±0.51
Crude ash	0.87±0.04	1.33±0.07
Crude fat	1.09±0.05	2.02±0.10
Crude protein	9.86±0.49	25.34±1.27
Carbohydrate	78.09±3.90	61.20±3.06

<sup>1)</sup>All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

(나) 아미노산 함량 : 건조 원형영지버섯 및 녹각영지버섯의 아미노산을 분석한 결과는 **Table 1-1-2**에 보는 것처럼, 총 아미노산 함량은 원형영지버섯이 43.40 mg/g 있었고 녹각영지버섯이 63.84 mg/g으로 조단백질 함량과 동일하게 녹각영지버섯이 높았다.

**Table 1-1-2. Comparison of amino acid compositions of two different *Genoderma Lucidum***

Amino acids <sup>1)</sup> (mg/g)	Type of fruiting body	
	Round	Nokgak
Non-essential amino acids		
Aspartic acid	3.47±0.44	5.54±0.60
Serine	2.30±0.36	3.15±0.42
Glutamic acid	3.64±0.40	5.63±0.65
Proline	1.85±0.11	2.56±0.19
Glycine	2.21±0.38	3.11±0.26
Alanine	2.60±0.32	3.89±0.39
Cystine	nd <sup>2)</sup>	nd
Tyrosine	nd	nd
Arginine	1.63±0.19	2.65±0.46
Total	17.70±0.89	26.53±1.33
Essential amino acids		
Threonine	2.45±0.35	3.61±0.45
Valine	11.90±0.38	17.18±1.36
Isoleucine	2.77±0.31	4.62±0.92
Leucine	2.84±0.16	4.14±0.44
Phenylalanine	2.32±0.37	3.16±0.23
Lysine	2.51±0.27	3.28±0.33
Histidine	0.91±0.10	1.32±0.21
Methionine	nd	nd
Total	25.70±1.29	37.31±1.87

<sup>1)</sup>All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

<sup>2)</sup>nd: not detected.

(다) 지방산 함량 : 원형영지버섯의 주요 지방산은 불포화지방산인 linoleic acid가 47.56%와 oleic acid가 32.91% 있었고, 녹각영지버섯은 linoleic acid가 75.68%로 지방산의 대부분을 차지하였으며 원형영지버섯의 주요 지방산인 oleic acid는 6.21% 있었고, 영지 및 녹각 모두 불포화 지방산이 약 80% 이상을 차지하였다(**Table 1-1-3**).

(라) 영지버섯의 무기질 함량 : 원형 및 녹각영지버섯이 함유하고 있는 무기질을 분석한 결과는 **Table 1-1-4**와 같았다. 원형영지버섯의 주요 무기질은 칼슘이 137.173 mg/g과 칼륨이 116.50 mg/g이었다. 녹각영지는 칼륨이 184.36 mg/g 및 인이 170.90 mg/g로 원형과는 미네랄의 분포도가 약간 차이가 있었다.

**Table 1-1-3. Comparison of fatty acid compositions of two different *Genoderma Lucidum***

Fatty acids <sup>1)</sup> (% weight)	Type of fruiting body	
	Round	Nokgak
Saturated fatty acids		
Myristic (C14:0)	1.61±0.08	3.35±0.17
Palmitic (C16:0)	13.50±0.68	9.44±0.47
Behenic (C22:0)	0.35±0.02	0.36±0.02
Tricosylic (C23:0)	0.37±0.02	0.70±0.04
Lignoceric (C24:0)	0.54±0.03	0.43±0.02
Total	16.37±0.98	14.28±1.02
Unsaturated fatty acids		
<i>cis</i> -Vaccenic (C18:1n7)	2.95±0.15	3.55±0.18
Oleic (C18:1n9)	32.91±1.65	6.21±0.31
Linoleic (C18:2n6)	47.56±2.38	75.68±3.78
$\alpha$ -Linolenic (C18:3n3)	0.21±0.01	0.28±0.01
Total	83.63±5.22	85.72±5.16

<sup>1)</sup>All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

**Table 1-1-4. Comparison of mineral compositions of two different *Genoderma Lucidum***

Contents <sup>1)</sup> (mg/100 g)	Type of fruiting body	
	Round	Nokgak
Iron	0.91±0.05	1.37±0.07
Sodium	14.52±0.73	64.15±3.21
Calcium	137.73±6.89	24.27±1.21
Potassium	116.50±5.83	184.36±9.22
Magnesium	28.42±1.42	47.44±2.37
Phosphorus	90.86±4.54	170.90±8.55
Total	388.94±19.45	492.49±24.62

<sup>1)</sup>All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

(마) 영지버섯의  $\beta$ -glucan 및 수용성 비타민 함량 : 원형 및 녹각영지버섯의  $\beta$ -Glucan 및 수용성 비타민 함량을 분석한 결과는 **Table 1-1-5**와 같았다.  $\beta$ -glucan 함량은 원형영지버섯이 34.15 g/100 g 있었고 녹각영지버섯은 30.07 g/100 g으로 비슷한 수준 있었다(Table 5). 비타민 B<sub>3</sub>은 원형영지버섯이 1.78 mg/100 g, 녹각영지버섯이 1.81 mg/100 g로 수용성 비타민 중 65.7%와 56.9%를 차지하였다.

**Table 1-1-5. Comparison of  $\beta$ -Glucan and vitamin compositions of two different *Genoderma Lucidum***

Contents <sup>1)</sup>	Type of fruiting body	
	Round	Nokgak
$\beta$ -Glucan (g/100 g)	34.15±5.45	30.07±5.03
Soluble vitamin (mg/100 g)		
Vitamin B <sub>1</sub>	0.23±0.01	0.26±0.01
Vitamin B <sub>2</sub>	0.70±0.04	1.11±0.06
Vitamin B <sub>3</sub>	1.78±0.09	1.81±0.09
Total	2.71±0.11	3.18±0.15

<sup>1)</sup>All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

## (2) 영지버섯의 생리활성

(가) 영지버섯 추출물의 총 phenolics 및 총 flavonoids 함량 : 원형 및 녹각영지버섯의 에탄올 추출조건별 총 phenolics 및 총 flavonoids 함량은 추출온도 40°C가 70°C보다 총 phenolics 및 총 flavonoids 함량이 약간 높았으나 커다란 차이를 보이지는 않았고, 70% 에탄올 추출조건에서 높은 함량을 나타내었다. 총 flavonoids 함량은 총 phenolics 함량과는 달리 원형영지버섯

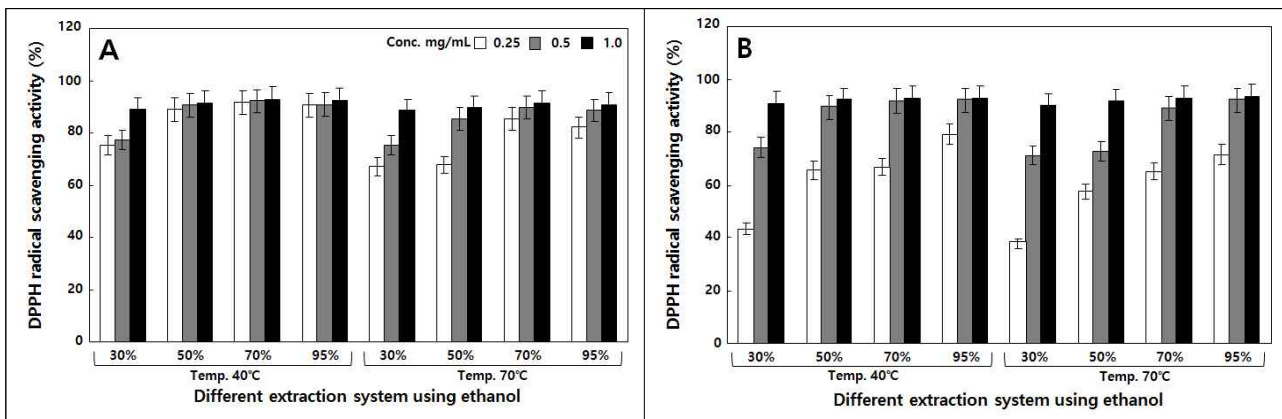
과 녹각영지버섯 거의 비슷한 함량을 보였다. 원형 및 녹각영지버섯의 40°C-70% 에탄올 추출물에서 각각 0.32 mg/g을 나타내었고 70°C-70% 에탄올 추출물에서 각각 0.27 mg/g과 0.21 mg/g으로 커다란 차이를 보이지 않았다(Table 1-1-6).

**Table 1-1-6. Comparison of total phenolic and total flavonoids contents of two different *Genoderma Lucidum* according to different extract system of ethanol**

Different extraction system using ethanol	Type of fruiting body			
	Round		Nokgak	
	Temp. 40°C	Temp. 70°C	Temp. 40°C	Temp. 70°C
Total phenolics contents <sup>1)</sup> (mg/g)				
30%	5.86±0.29	4.81±0.24	1.29±0.06	1.10±0.06
50%	7.36±0.37	7.21±0.36	1.37±0.07	1.22±0.06
70%	10.44±0.52	9.09±0.45	1.43±0.07	1.27±0.06
95%	8.55±0.43	7.93±0.40	0.96±0.05	0.72±0.04
Total flavonoids contents (mg/g)				
30%	0.17±0.01	0.14±0.01	0.18±0.01	0.10±0.01
50%	0.23±0.01	0.21±0.01	0.26±0.02	0.15±0.01
70%	0.32±0.02	0.27±0.02	0.32±0.02	0.21±0.02
95%	0.25±0.02	0.23±0.01	0.24±0.01	0.16±0.01

<sup>1)</sup>All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

(나) 라디칼 소거 효과 : 처리농도가 증가할수록 증가하였고, 40°C가 70°C 보다는 소거능이 약간 높았으며, 원형영지버섯이 녹각영지버섯보다 소거능이 우수하였다. DPPH 라디칼 소거활성은 원형영지버섯 추출물의 0.25 mg/mL 처리 시 40°C-70% 추출물에서는 91.51%, 70°C-70% 추출물에서는 85.38% 있었고(Fig. 1-1-2A), 녹각영지버섯 추출물의 0.25 mg/mL 처리 시 40°C-70% 추출물 66.74%, 70°C-70% 추출물 45.74% 있었다(Fig. 1-1-2B). ABTS와 hydroxyl 라디칼 소거활성 역시 DPPH 라디칼 소거활성과 유사하였다.



**Fig. 1-1-2. Comparison of DPPH radical scavenging activity of two different *Genoderma Lucidum* according to different extract system of ethanol.** All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

(다) 탄수화물 및 지방 분해효소 저해효과 : α-glucosidase 저해활성은 40°C가 70°C 보다는 활성이 약간 높았으며, 원형영지버섯이 녹각영지버섯보다 저해활성이 약간 높았다. 원형영지버섯 추출물의 경우 70% 추출 조건에서 다른 추출 조건보다 저해활성이 높았다(Fig. 1-1-3A). 녹각영지버섯 추출물의 경우 추출 에탄올 농도가 증가하여 95% 추출 조건에서 가장 저해활성이 높았다(Fig. 1-1-3B). α-Amylase 저해활성은 농도 의존적으로 저해활성이 증가하였고, 원형영지버섯이 녹각영지버섯보다는 활성이 낮았다. Pancreatic lipase 저해활성은 40°C가 70°C 보다는 활성이 약간 높았으며, 원형영지버섯이 녹각영지버섯보다 저해활성이 큰 차이가 없었다. 원형



영지버섯 추출물의 경우 70% 추출 조건에서 다른 추출 조건보다 저해활성이 높았다(Fig. 1-1-4A). 한편 녹각영지버섯 추출물의 경우 추출 에탄올 농도가 증가할수록 저해활성이 증가하여 95% 추출 조건에서 가장 저해활성이 높았다(Fig. 1-1-4B).

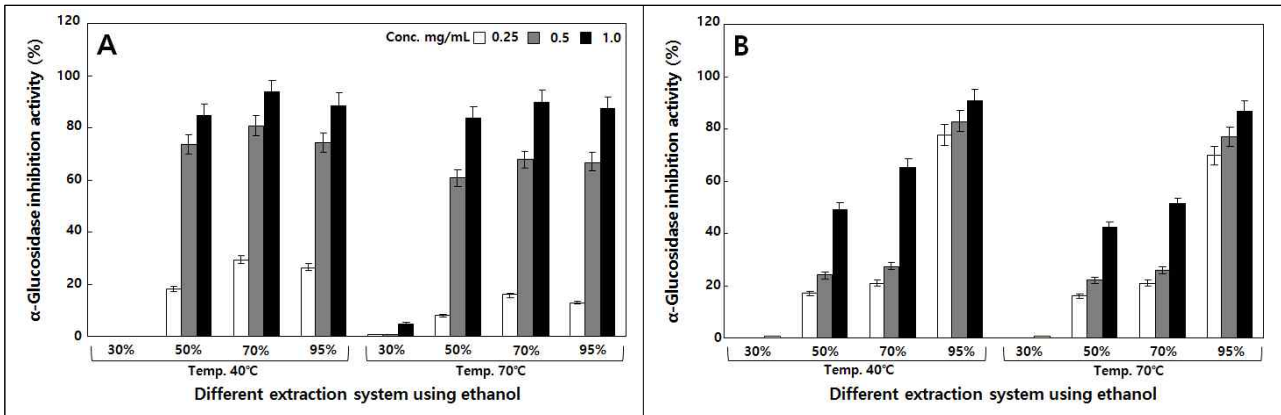


Fig. 1-1-3. Comparison of hydroxyl radical scavenging activity of two different *Genoderma Lucidum* according to different extract system of ethanol. All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

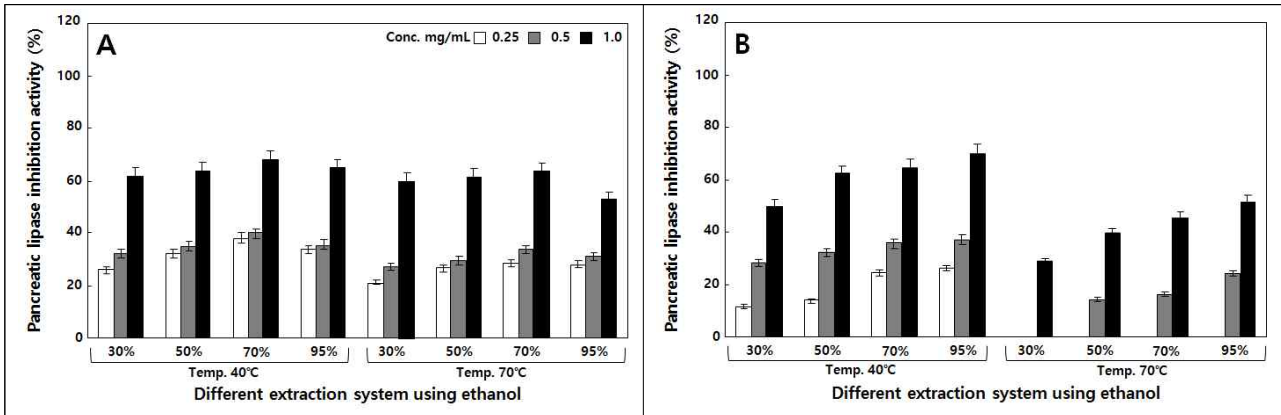


Fig. 1-1-4. Comparison of hydroxyl radical scavenging activity of two different *Genoderma Lucidum* according to different extract system of ethanol. All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

#### 나. 하수오의 기능성 물질 확인 및 산화적 스트레스 개선 효과

##### (1) 하수오로부터 기능성 물질 분리 및 구조·동정

하수오로부터 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene 2-O-β-D-glucoside, emodin, chrysophanol 및 rhein을 분리 및 구조·동정하였다.

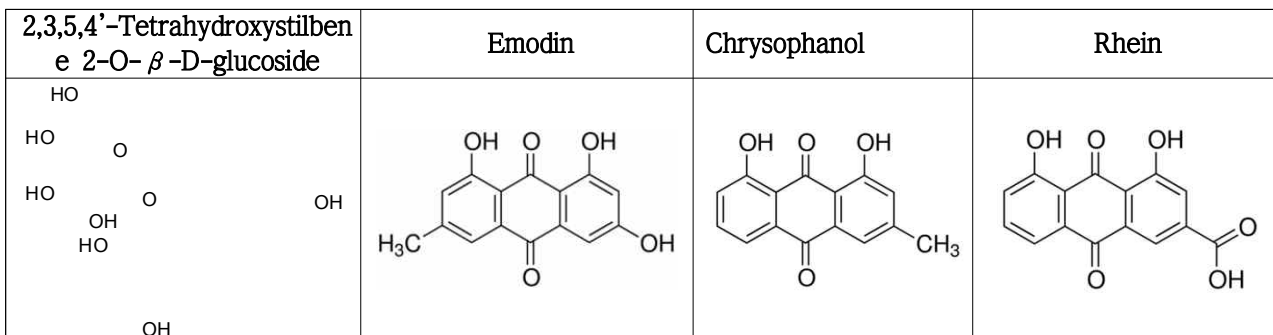


Fig. 1-1-5. Chemical structure of compound 1, 2, 3 & 4

## (2) 법제 하수오 추출물의 기능성 물질 함량

HPLC 분석 결과, 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene 2-O-β-D-glucoside, emodin, chrysophanol 및 rhein이 확인되었으며(Fig. ?), 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene 2-O-β-D-glucoside은 115.02 mg/kg으로 주 화합물로 확인되었고 그 다음으로 emodin이 0.38 mg/kg, chrysophanol이 0.11 mg/kg 및 rhein이 0.03 mg/kg 순으로 확인되었다(Table ?).

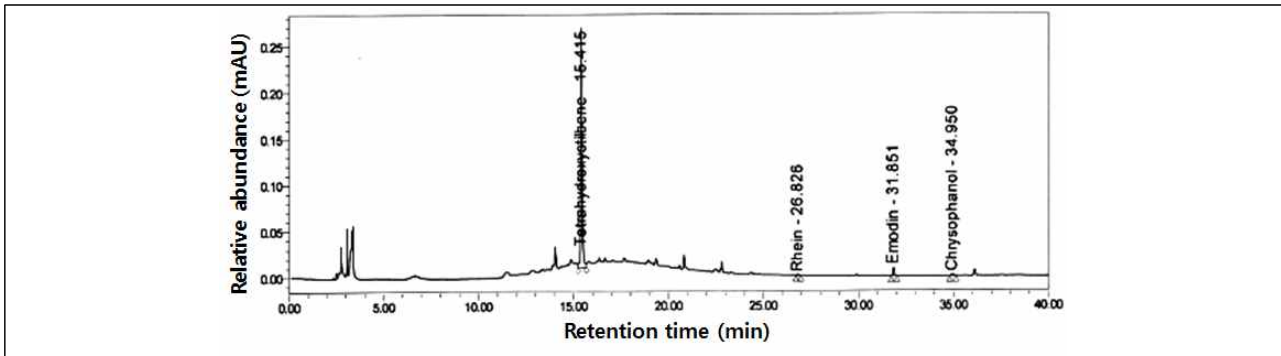


Fig. 1-1-6. Typical HPLC chromatograms of the MeOH extract from processed *Polygoni Multiflori Radix*.

Table 12. Biological compound contents of the MeOH extract from processed *Polygoni Multiflori Radix*

Compounds	Contents (mg/kg)
2,3,5,4' -Tetrahydroxystilbene 2-O-β-D-glucoside	115.02 ± 3.6
Emodin	0.38 ± 0.02
Chrysophanol	0.11 ± 0.01
Rhein	0.03 ± 0.00

<sup>1)</sup>Values are presented as the mean ± SD of triplicate determinations.

## (3) 법제 하수오 추출물의 라디칼 소거능

(가) DPPH 라디칼 소거능 : 법제 하수오 메탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과, 처리 농도가 증가할수록 활성은 유의적으로 활성은 증가하였으며 50 μg/mL의 처리 농도에서 48.4%의 라디칼 소거능을 보였다(Fig. 1-1-7A).

(나) ABTS 라디칼 소거능 : 법제 하수오 메탄올 추출물의 ABTS 라디칼 소거능을 살펴 본 결과, 처리 농도가 증가함에 따라 라디칼 소거능이 증가하였으며, 50 μg/mL 처리 시 57.9%의 ABTS 라디칼 소거능을 나타내었다(Fig. 1-1-7B).

(다) Hydroxyl 라디칼 소거능 : 법제 하수오 메탄올 추출물의 hydroxyl 라디칼에 대한 소거능을 측정한 결과, 10 μg/mL의 낮은 농도에서 70% 이상의 라디칼 소거능을 보였으며 농도 의 존적으로 hydroxyl 라디칼 소거능이 증가하여 우수한 효과를 나타내는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 14C).

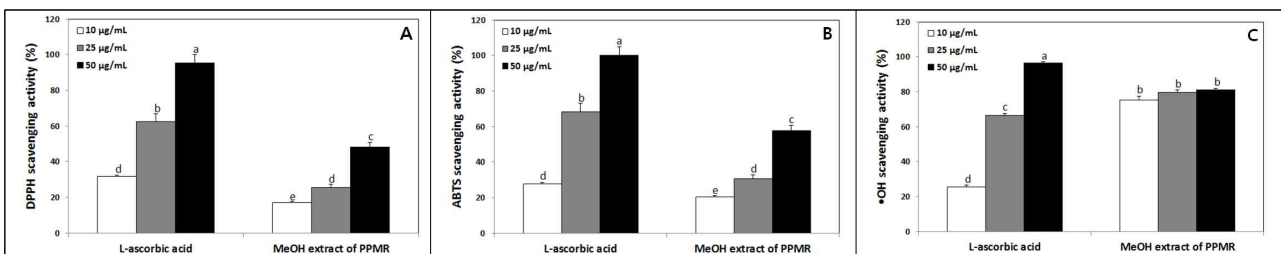


Fig. 1-1-7. DPPH (A), ABTS (B), and Hydroxyl (C) radical scavenging activities of the MeOH extract from processed *Polygoni Multiflori Radix*.

**(4) 법제 하수오 추출물의 LLC-PK<sub>1</sub> cell에서 산화적 스트레스 개선 효과**

(가) Pyrogallol에 의한 산화적 스트레스 개선 효과 : Pyrogallol만을 처리하여 O<sub>2</sub><sup>-</sup>가 유발된 control군의 경우 70.2%의 세포 생존율을 보인 반면 하수오 시료를 처리하였을 때 농도가 10, 25 및 50 μg/mL로 증가할수록 세포 생존율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 50 μg/mL 농도에서 80% 이상의 세포 생존율을 보임으로 낮은 농도에서도 O<sub>2</sub><sup>-</sup>에 대한 세포 보호 효과가 뛰어난 것을 확인할 수 있었다(Table 1-1-7).

**Table 1-1-7. Effect of the MeOH extract from processed *Polygoni Multiflori Radix* on the viability of LLC-PK<sub>1</sub> cells treated with pyrogallol**

Treatment (μg/mL)	Cell viability <sup>1)</sup> (%)
10	74.8±1.4 <sup>c</sup>
25	75.7±4.2 <sup>c</sup>
50	82.1±1.9 <sup>b</sup>
Pyrogallol-treated control	69.4±3.2 <sup>c</sup>
Normal	100.0±2.8 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>Values are presented as the mean ± SD of triplicate determinations.

(나) SNP에 의한 산화적 스트레스 개선 효과 : SNP만을 처리한 control군은 세포 생존율이 68.3%로 감소하여 산화적 스트레스에 의한 세포 손상을 확인할 수 있었고, 25 μg/mL 이상의 시료 처리군에서 80% 이상의 세포 생존율을 나타내어 낮은 농도에서도 NO에 대한 세포 보호 효과가 뛰어난 것을 확인할 수 있었다(Table 1-1-8).

**Table 1-1-8. Effect of the MeOH extract from processed *Polygoni Multiflori Radix* on the viability of LLC-PK<sub>1</sub> cells treated with SNP**

Treatment (μg/mL)	Cell viability <sup>1)</sup> (%)
10	75.1±2.3 <sup>c</sup>
25	85.3±2.8 <sup>b</sup>
50	89.1±3.1 <sup>b</sup>
SNP-treated control	68.3±2.2 <sup>d</sup>
Normal	100.0±1.8 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>Values are presented as the mean ± SD of triplicate determinations.

(다) SIN-1에 의한 산화적 스트레스 개선 효과 : SIN-1만을 처리한 control군은 60.5%로 세포 생존율이 낮아졌고 하수오 메탄올 추출물의 처리 농도가 증가할수록 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가하는 양상을 나타냈다. 25 및 50 μg/mL 농도를 처리하였을 때 각각 72.0%와 76.6%의 세포 생존율을 나타내는 것을 확인하여 ONOO<sup>-</sup>에 대한 직접적인 소거능을 통해 산화적 스트레스 개선 효과를 보이는 것으로 사료된다(Table 1-1-9).

**Table 1-1-9. Effect of the MeOH extract from processed *Polygoni Multiflori Radix* on the viability of LLC-PK<sub>1</sub> cells treated with SIN-1**

Treatment (μg/mL)	Cell viability <sup>1)</sup> (%)
10	64.6±1.8 <sup>c</sup>
25	72.5±3.9 <sup>b</sup>
50	77.6±2.4 <sup>b</sup>
SIN-1-treated control	60.4±3.5 <sup>c</sup>
Normal	100.0±2.2 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>Values are presented as the mean ± SD of triplicate determinations.

다. 소스 혹은 조미료 제조용 *B. subtilis* 그룹 선발 및 동정

(1) 신규 *B. subtilis* 그룹의 청국장 발효 특성

(가) 생균수 및 악취 정도 : 16S rRNA에 염기서열 분석 결과 동일한 균주로 확인된 균주들 중 대표 균주들만 선택하여 청국장을 제조하여 생균수와 청국장의 이취정도를 살펴본 결과 균의 생육정도 및 이취가 가장 약한 것은 균주 MGD02로 기존에 확보된 균주 2TDJ15와 함께 청국장 베이스 소스와 조미료 제조를 위한 균주로 최종 선택하였다.

Table 1-1-10. Comparison of viable cell number and order on *cheonggukjang* with *B. subtilis* groups

Isolates	Viable cell numbers (log cfu/mL)	Order	
		Ammonia (mg/g)	Sensory
<b>Doenjang</b>			
MGD01	9.49	208.43	4.88
<b>MGD02</b>	<b>13.13</b>	<b>77.52</b>	<b>3.63</b>
MGD03	9.29	206.86	4.62
MGD04	11.71	136.91	4.35
MGD05	11.31	114.10	4.03
MGD06	10.95	110.10	3.99
MGD07	11.35	101.67	4.05
MGD08	11.18	140.08	4.42
MGD09	12.47	106.72	4.12
MGD10	11.85	112.77	4.19
<b>Kanjang</b>			
MGK01	12.63	103.08	4.10
MGK02	11.80	87.91	3.84
MGK03	11.20	122.21	4.21
MGK04	12.03	121.64	4.17
MGK05	8.79	273.63	4.97
MGK06	12.99	97.69	4.06
MGK07	12.05	103.45	4.11
MGK08	11.63	130.64	4.23

<sup>1)</sup>Values are presented as the mean ± SD of triplicate determinations.

(나) 항산화 활성 : 18 종의 균주로 발효한 청국장의 항산화 활성을 살펴본 결과 비교균주로 사용한 *Bacillus natto*와 유사하거나 높은 균주는 MGD02와 MGD020로 확인되었다(Fig. 1-1-8).

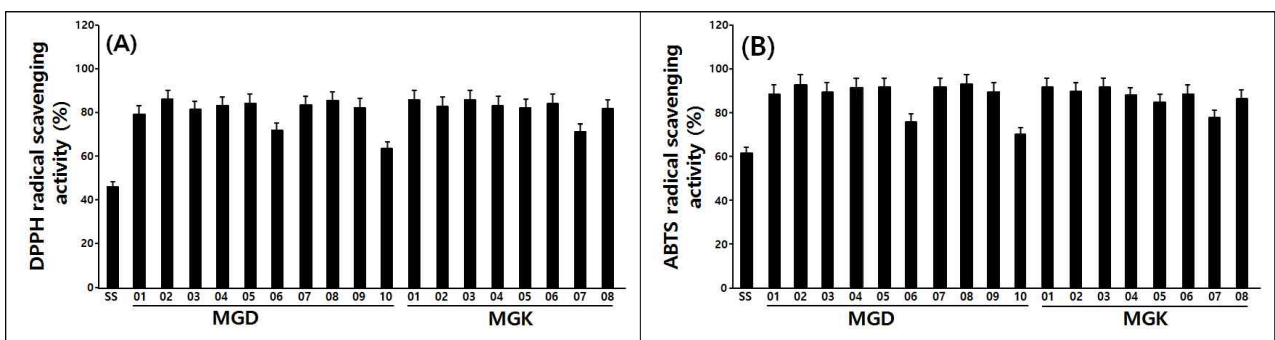


Fig. 1-1-8. Effect of antioxidant activity on *cheonggukjang* with *B. subtilis* groups. A; DPPH, B; ABTS.

(나) GABA, 총 phenolics 및 isoflavone 함량

① 가바(GABA) : 18 종의 균주로 발효한 청국장의 총 phenolics 함량을 살펴본 결과 MGD02와 MGD07 균주가 GABA 생성력이 우수하였다(Fig. 1-1-9).

② 총 phenolics : 18 종의 균주로 발효한 청국장의 총 phenolics 함량을 살펴본 결과 비교 균주로 사용한 *Bacillus natto*와 유사하거나 높은 균주는 항산화 활성이 동일하게 MGD02와 MGD020로 확인되어 청국장의 항산화 활성은 총 phenolics 함량과 밀접한 관련이 있는 것으로 판단되었고(Fig. 1-1-10).

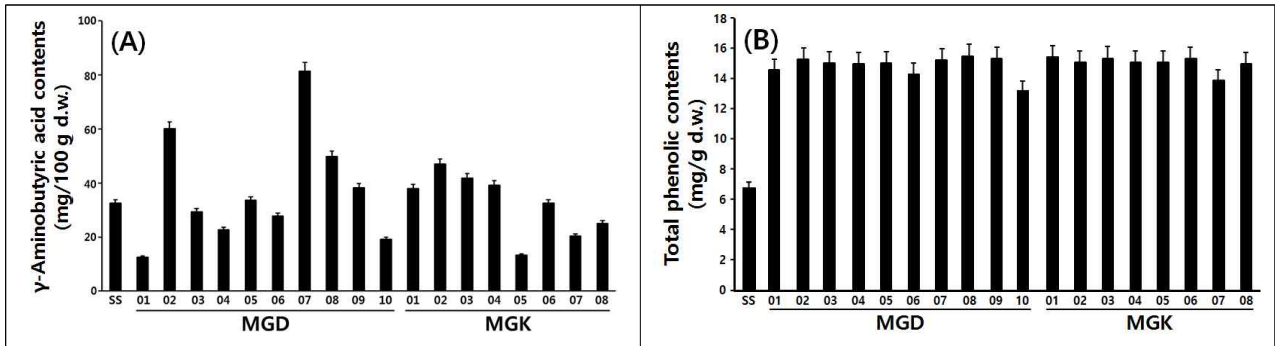


Fig. 1-1-10. Comparison of total phenolic contents on *cheonggukjang* with *B. subtilis* groups. A; GABA, B; Total phenolics.

③ Isoflavone : 발효하지 않은 증자콩(대조구)보다는 청국장이 총 이소플라본 함량은 감소하였고 대조구는 glycoside 형태의 이소플라본이 주 화합물 있었으며, 발효 72시간 이후 청국장은 aglycone 함량이 증가하였다.

Table 1-1-11. Comparison of 12 isoflavone contents on *cheonggukjang* with *B. subtilis* groups

Strains	Isoflavone contents <sup>1)</sup> ( $\mu$ g/g)												Totals
	Glycosides			Malonylglycosides			Acetylglycosides			Aglycones			
	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzin	Glycitin	Genistin	
SS	519.37	201.51	527.85	113.52	40.18	149.78	nd	17.20	nd	12.55	70.41	8.64	1,661.01
MGD01	157.61	202.20	242.02	149.71	39.79	226.27	nd	5.92	nd	204.63	26.58	62.24	1,316.97
MGD02	202.95	265.71	204.55	120.79	72.49	134.91	nd	7.88	3.94	225.84	30.18	26.75	1,295.99
MGD05	171.22	294.93	230.66	117.64	86.18	167.10	nd	16.14	nd	219.26	45.03	51.54	1,399.70
MGD07	205.20	192.98	274.79	226.41	82.85	249.82	7.28	8.77	4.39	334.61	25.34	53.35	1,665.79
MGD08	167.28	213.95	222.18	239.56	92.19	259.93	5.68	8.25	4.13	239.78	39.23	23.61	1,515.77
MGD19	335.11	294.91	436.02	128.27	63.30	165.87	nd	7.82	3.91	176.44	36.45	16.23	1,664.33
MGD020	237.06	257.44	288.79	107.11	75.33	116.65	nd	7.29	3.65	358.93	38.19	32.71	1,523.15
MGD021	119.34	248.07	124.57	199.27	73.97	224.21	4.82	9.08	4.54	251.46	32.94	6.06	1,298.33
MGD023	153.55	223.24	138.36	157.10	78.53	161.40	20.13	11.03	nd	334.60	66.48	8.69	1,353.11
MGD027	237.51	249.89	273.98	177.50	66.79	222.08	nd	7.48	3.74	220.76	22.61	14.91	1,497.25
MGK01	299.92	276.10	248.22	125.52	68.08	139.46	nd	8.77	4.39	253.67	37.16	20.86	1,482.15
MGK03	352.30	218.54	254.23	197.10	73.97	243.37	nd	9.40	4.70	150.83	31.32	23.62	1,559.38
MGK05	226.90	318.13	260.71	119.10	59.33	137.15	nd	9.75	4.87	203.40	42.67	23.44	1,405.45
MGK08	266.31	240.35	298.65	131.52	90.14	147.16	nd	11.33	5.67	252.95	42.85	19.75	1,506.68
MGK14	273.29	160.38	201.45	78.69	38.81	131.52	nd	5.09	2.55	176.12	41.44	84.61	1,193.95
MGK18	350.27	205.01	259.70	142.86	71.81	155.45	nd	9.90	4.95	308.36	39.22	25.28	1,572.81
MGK19	194.29	210.20	275.59	197.85	61.67	233.38	0.04	6.85	3.43	275.20	29.70	12.25	1,500.45
MGK21	328.97	263.93	306.74	154.05	57.91	210.00	nd	1.55	0.77	138.08	35.34	22.29	1,519.63

<sup>1)</sup>All values are presented as the mean $\pm$ SD of triplicate determination

<sup>2)</sup>nd: not detected

## (2) 균주 Ja-8과 MGD02 동정

(가) 형태학적, 생육학적 및 생화학적 특성 : 형태학적 관찰은 그람 염색 후 현미경으로 관찰한 결과 그람 양성의 막대 모양의 전형적인 바실러스(*Bacillus*) 속의 균주 형태 있었다. 한편 균주 2TDJ15는 그람양성균으로 생육온도는 45°C, 염농도 14%, pH는 3 ~ 11에서 생육이 가능하였다. 한편 *Bacillus* 전형적인 이당류 형태인 당을 대부분 이용하였고, 그 결과 *Bacillus subtilis* 혹은 *Bacillus amyloliquefaciens*와 99.7% 상동성을 나타내었다. 균주 MGD02 균주는 생육가능온도는 20 ~ 45°C 이었고, 생육 pH는 3.0 ~ 9.0였으며, 생육가능 염농도는 ~8%임을 확인할 수

있었다. 생화학적 특성을 살펴본 결과, 글리세롤을 포함하는 17 종의 탄소원을 자화할 수 있었고, 통성혐기성의 바실러스 속 균주로 추정되었다.

Table 1-1-12. Phenotypic characteristics of strains Ja-8 and MGD02

Characteristics	Reaction		Characteristics	Reaction	
	2TDJ15	MGD02		2TDJ15	MGD02
Morphology			Galactose	-	-
Shape	Rod	Rod	D-Glucose	+	+
Gram stain	+	+	D-Fructose	+	+
Cell dimension	0.5-10 $\mu$ m	0.5-10 $\mu$ m	D-Mannose	+	+
Physiological properties			L-sorbose	-	-
Growth at temperature			Rhamnose	-	-
10°C	-	-	Dulcitol	-	-
25°C	++	w	Inositol	+	-
30°C	++	+	Mannitol	+	-
35°C	+	+	Sorbitol	+	-
40°C	+	+	$\alpha$ Methyl-D-mannoside	-	-
45°C	+	+	$\alpha$ Methyl-D-glucoside	+	-
50°C	-	+	N Acetyl glucosamine	-	+
55°C	-	-	Amygdaline	+	+
Growth in NaCl		-	Arbutine	+	+
0%	++	+	Esculine	+	+
2%	+++	+	Salicine	+	+
4%	+++	w	Cellobiose	+	+
6%	+++	w	Maltose	+	+
8%	++	w	Lactose	+	+
10%	++	-	Melibiose	-	-
12%	W	-	Saccharose	+	+
14%	W	-	Trehalose	-	+
Growth at pH			Inuline	-	-
3	++	w	Melezitose	-	-
5	++	+	D-Raffinose	+	+
7	++	+	Amidon	+	-
9	++	w	Glycogene	+	-
11	W	-	Xylitol	-	-
Carbohydrates			$\beta$ -Gentidiose	-	+
Control	-	-	D-Turanose	-	-
Glycerol	+	+	D-Lyxose	-	-
Ertythritol	-	-	D-Tagatose	-	-
D-Arabinose	-	-	D-Fucose	-	-
L-Arabinose	+	-	L-Fucose	-	-
Ribose	+	+	D-Arabitol	-	-
D-Xylose	-	-	L-Arabitol	-	-
L-Xylose	-	-	Gluconate	-	-
Adonitol	-	-	2 ceto-gluconate	-	-
$\beta$ Methyl-xyloside	-	-	5 ceto-gluconate	-	-

Symbol: +, positive reaction; -, negative reaction; w, weak reaction.

(나) 균체 지방산 조성 : 균주 2TDJ15는 전형적인 *Bacillus* 지방산 조성인 C15:0 ISO 및 C15:0 ANTEISO 각각 31.52%와 46.79% 분포하고 있으며, 라이브러리와 비교한 결과 *Bacillus megaterium*과 0.671의 값을 나타내었다(Table 1-1-13).

Table 1-1-13. Fatty acid methyl ester composition (%) of strains Ja-8 and MGD02

Fatty acids	Contents (%)	
	2TDJ15	MGD02
Straight-chain saturated		
C14:0 ISO	5.75	1.33
C14:0	1.90	1.38
C15:0 ISO	31.52	15.97
C15:0 ANTEISO	46.59	42.71
C15:0	1.37	-
C16:0 ISO	2.70	3.16
C16:0	3.47	12.06
C15:0 ISO 3OH	-	0.45
C15:0 2OH	-	0.42
C17:0 ISO	2.52	6.91
C17:0 ANTEISO	3.30	11.59
C18:0	-	1.44
Mono-unsaturated		
16:1 w11c	0.88	1.16
C17:1 ISO w10c	0.38	-
C18:3 w6c (6,9,12)	0.57	-
<b>Summed feature 2*</b>	0.46	-

\*Summed features represent of two or three fatty acids that could not be separated by GC with the Microbial Identification (MIDI). Summed feature 2 contained one or more of following fatty acids: C16:1 iso I or C14:0 3OH

(다) 16S rRNA 염기서열 상동성 : BLASTN (nucleotidenucleotide BLAST) 데이터베이스를 통해 두 균주 모두 바실러스 아밀로리퀴페시언스 균주들과 99%의 높은 상동성을 나타낸다는 것을 확인하였다(Fig. 1-1-11).

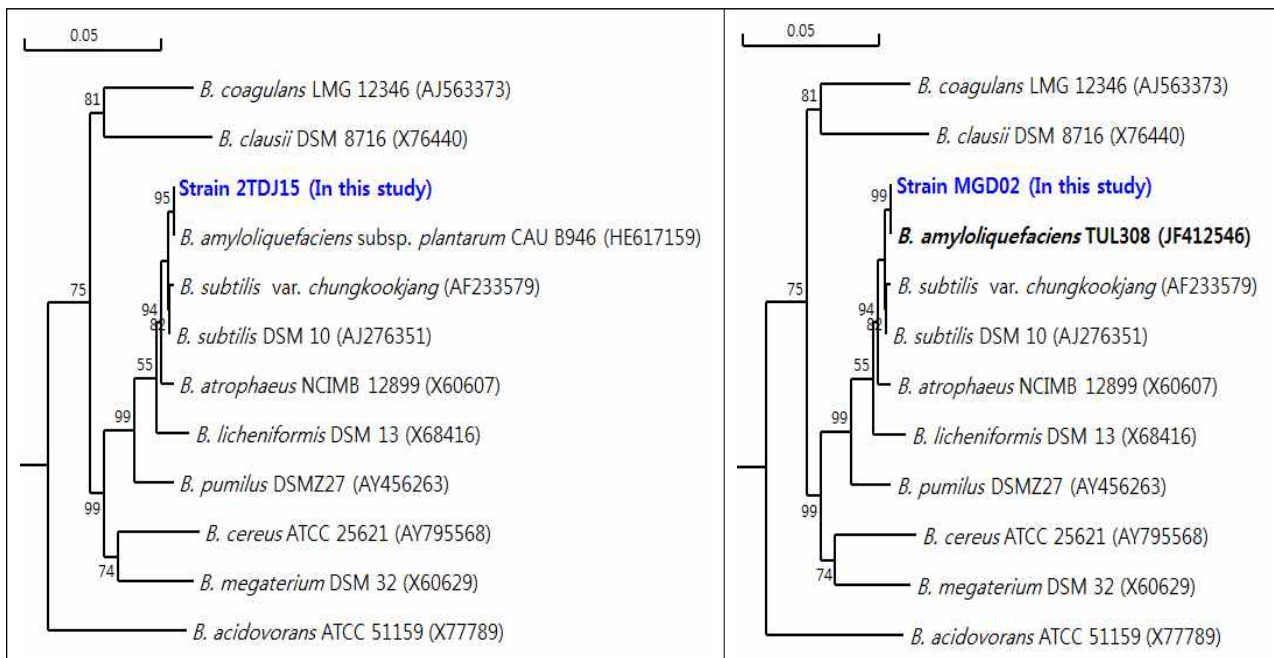


Fig. 1-1-11. Phylogenetic tree of strains 2TDJ15 and MGD-2 and other closely related *Bacillus* sp. based 16S rRNA gene sequences.

## 라. 약용작물의 복합추출물 제조 결과 및 고찰

### (1) 약용 복합추출물의 항산화 활성

(가) DPPH 라디칼 소거 활성 : DPPH 라디칼 소거능의 경우 복합추출물의 농도가 증가할수록 라디칼 소거능 역시 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 1-1-12A).

(나) ABTS 라디칼 소거 활성 : ABTS 라디칼 소거능 역시 자소엽 비율이 높은 추출물일수록 그 활성은 증가하였다(Fig. 1-1-12B).

(다) Hydroxyl 라디칼 소거 활성 : 복합추출물의 농도가 증가할수록 증가하였으며 고농도(1 mg/g)에서는 50%-23.42%, 60%-31.55%, 및 70%-38.03%의 소거능을 나타내었다(Fig. 1-1-12C).

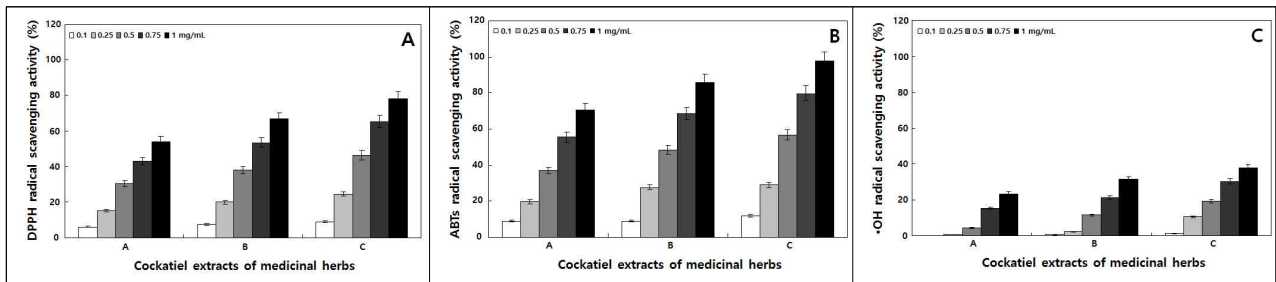


Fig. 1-1-12. Comparison of DPPH (A), ABTS (B) and hydroxyl (C) radical activities of cockatiel extracts of medicinal herbs. A, PF:AG:PG:CW = 5:2.5:2:0.5; B, PF:AG:PG:CW = 6:2:1.5:0.5; and C, PF:AG:PG:CW = 7:1.5:1:0.5.

### (2) 약용 복합추출물의 $\alpha$ -glucosidase 및 pancreatic lipase 저해 활성

(가)  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성 : Fig. 1-1-13A에 보는 바와 같이  $\alpha$ -glucosidase 저해능은 자소엽 60% 추출물보다 70% 추출물에서 약간 더 우수하였다.

(나) Pancreatic lipase 저해 활성 : Pancreatic lipase 저해능은 자소엽 함량이 증가할수록 활성이 증가하였다.

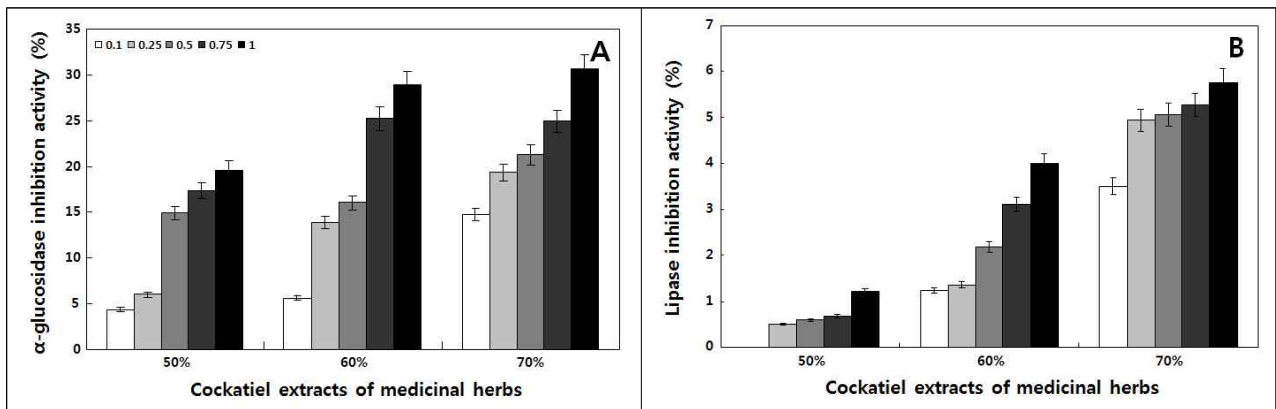


Fig. 1-1-13. Comparison of DPPH (A), ABTS (B) and hydroxyl (C) radical activities and FRAP assays (D) of cockatiel extracts of medicinal herbs. A, PF:AG:PG:CW = 5:2.5:2:0.5; B, PF:AG:PG:CW = 6:2:1.5:0.5; and C, PF:AG:PG:CW = 7:1.5:1:0.5.

### (3) 복합추출물의 생리활성물질 함량

(가) 총 phenolics 함량 : 자소엽이 50%가 들어간 A 조건의 복합추출물은 12.66 mg/g의 총 phenolics를 함유하고 있었으며 자소엽 60%는 13.19 mg/g을 함유하고 있었다. 자소엽 70%의 복합추출물은 13.69 mg/g으로 대체적으로 자소엽 첨가량이 많을수록 총 phenolics 함량이 높아지는 경향을 나타내었다.

(나) 총 flavonoids 함량 : 총 flavonoids 함량도 총 phenolics 함량과 동일하게 1.65 mg/g(A),



1.70 mg/g(B), 및 1.93 mg/g(C)으로 자소엽 첨가량이 많을수록 그 함량이 증가하였으나 phenolics 함량보다는 낮은 것으로 나타났다.

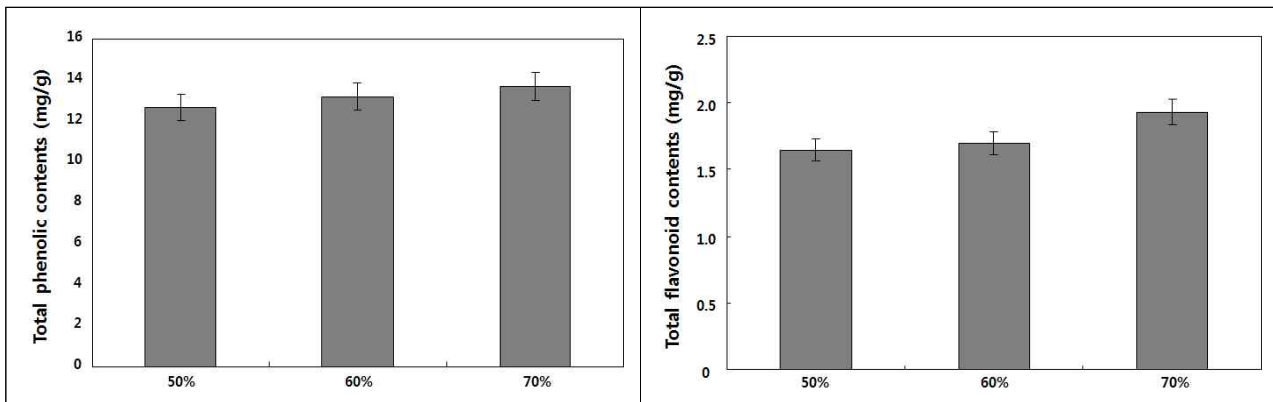


Fig. 1-1-14. Comparison of total phenolic and total flavonoid contents of cockatiel extracts of medicinal herbs. 50%, PF:AG:PG:CW = 5:2.5:2:0.5; 60%, PF:AG:PG:CW = 6:2:1.5:0.5; and 70%, PF:AG:PG:CW = 7:1.5:1:0.5.

(다) Phenolic acids 함량 : 자소엽 함량이 증가할수록 총 phenolic acids의 함량은 증가하는 경향을 보였으며, 그 중에 gallic acid, protocatechuic acid, chlorogenic acid 및 vanilic acid가 증가하였다(Table 1-1-14).

(라) Flavonols 함량 : 자소엽 함량이 증가할수록 총 flavonol 화합물의 함량은 증가하는 경향을 보였으며, 그 중에 epigallocatechin, catechin, gallic acid gallate, rutin 및 naringin 함량이 증가하였다(Table 1-1-15).

Table 3-1-?. Comparison of phenolic acid contents of cockatiel extracts of medicinal herbs

Contents ( $\mu\text{g/g}$ ) <sup>2)</sup>	Samples <sup>1)</sup>		
	50%	60%	70%
Gallic acid	23.44	59.78	92.84
Protocatechuic acid	54.23	80.11	128.46
Chlorogenic acid	213.47	228.20	234.59
<i>p</i> -Hydrobenzoic acid	212.95	216.16	231.64
Vanilic acid	187.66	211.66	240.54
<i>trans</i> -Cinnamic acid	27.90	20.34	24.51
Total	719.65	816.25	952.58

<sup>1)</sup>Samples: 50%, PF:AG:PG:CW = 5:2.5:2:0.5; 60%, PF:AG:PG:CW = 6:2:1.5:0.5; and 70%, PF:AG:PG:CW = 7:1.5:1:0.5. <sup>2)</sup>Value indicated the mean's of three replication ( $n=3$ ). <sup>3)</sup>nd: not detected.

Table 1-1-15. Comparison of flavonol contents of cockatiel extracts of medicinal herbs

Contents ( $\mu\text{g/g}$ ) <sup>2)</sup>	Samples <sup>1)</sup>		
	50%	60%	70%
Epigallocatechin	130.73	169.43	197.27
Catechin	170.00	185.76	213.96
Vanilin	31.43	20.31	29.27
Rutin	24.89	43.66	67.84
Catechin gallate	141.85	154.30	143.21
Naringin	84.35	100.08	133.04
Naringenin	67.36	57.74	42.65
Total	650.61	731.28	827.24

<sup>1)</sup>Samples: 50%, PF:AG:PG:CW = 5:2.5:2:0.5; 60%, PF:AG:PG:CW = 6:2:1.5:0.5; and 70%, PF:AG:PG:CW = 7:1.5:1:0.5. <sup>2)</sup>Value indicated the mean's of three replication ( $n=3$ ). <sup>3)</sup>nd: not detected.

## 마. 약용작물 추출물 이용 천연소스류 제조공정 확립

### (1) 균주별 청국장 품질특성

(가) 이화학적 특성 : 수침 및 증자콩의 pH는 6.51-6.75 수준이었고 산도는 0.1% 정도였다. 환원당은 수침콩에서 0.63 g/L 수준으로 가장 낮았는데 이는 수침 과정 중 수용성 성분인 당의 소실인 것으로 판단되었다. 한편 MGD02 균주로 제조한 청국장의 경우 pH는 5.88, 산도는 0.12%이었고 환원당 및 단백질 함량은 각각 2.15 g/L 및 41.43 mg/mL를 함유하고 있었다. 전체적으로 pH와 산도는 유사한 수준이었으며 단백질 함량은 2TDJ15 균주로 제조한 청국장에서 49.68 mg/mL로 가장 높음을 확인하였다. 이 외 갈변도 역시 크게 다른 점은 나타나지 않았고 모두 유사한 것으로 나타났다(Table 1-1-16).

Table 1-1-16. Comparison of pH, acidity, salinity, and protein contents of *cheonggukjang* by single and mixed starters

Sample	Contents <sup>2)</sup>					
	pH	Acidity (%, as lactic acid)	Browning degree (420 nm)	Reducing sugar (g/L)	Salinity (%)	Protein (mg/mL)
Soaking	6.75	0.01	1.38	0.63	0.01	33.48
Steaming	6.51	0.01	2.10	1.89	0.01	26.42
MGD02	5.88	0.12	1.91	2.15	1.65	41.43
2TDJ15	5.79	0.13	2.16	3.24	0.99	49.68
MGD02+2TDJ15	5.73	0.14	2.00	1.57	0.85	37.15

<sup>2)</sup>All values are means of determinations in three independent experiments.

(나) 총 phenolics 및 flavonoids 함량 측정 : 총 phenolics 함량은 수침콩보다는 증자콩이 약간 더 많은 함유량을 나타내었고 균주별로 제조한 청국장에서는 MGD02 균주로 제조한 청국장에서 2.67 mg/g으로 가장 높았으며 2TDJ15 및 이들의 혼합으로 제조한 청국장은 각각 2.39 및 2.64 mg/g이었다(Fig. 1-1-15A). Flavonoids 함량 역시 phenolics와 같은 경향으로 측정되었으며 수침콩(0.04 mg/g)보다 증자콩(0.22 mg/g)이 높은 함유량을 나타내었다. 또한 MGD02 균주로 제조한 청국장이 0.77 mg/g으로 가장 높았으며 2TDJ15 균주로 제조한 청국장에서 0.50 mg/g으로 약간 낮은 함유량을 보였다(Fig. 1-1-15B).

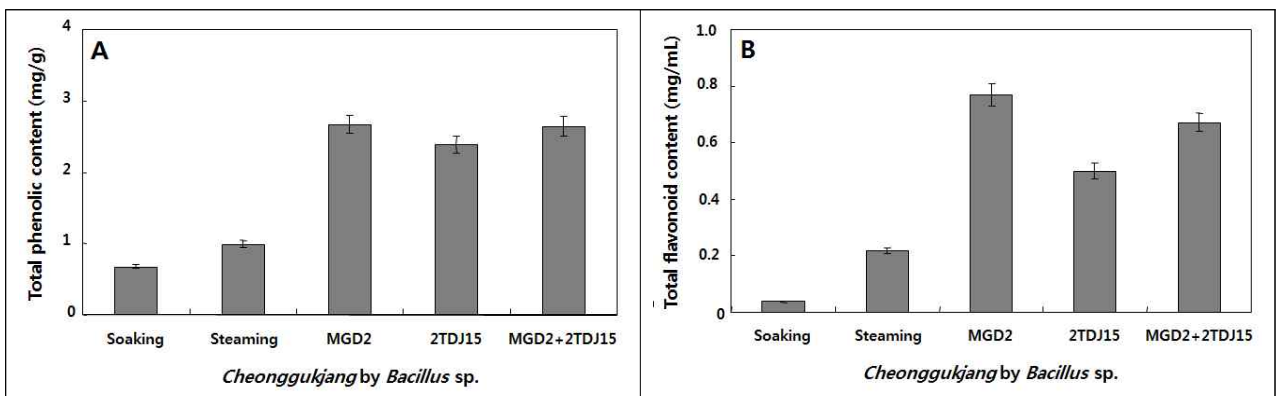


Fig. 1-1-15. Comparison of total phenolics (A) and flavonoids (B) contents of cheonggukjang by single and mixed starters.

(다) Isoflavone 함량 측정 : 각각의 균주별로 제조한 원료 청국장과 수침콩 및 증자콩에서는 공통적으로 총 12가지 형태의 화합물 중 8개의 isoflavone 화합물이 검출되었다. 증자콩에서는 acetyldaidzin이 미량으로 검출되었으며 균주별로 제조한 원료 청국장의 경우 malonyldaidzin

이 공통적으로 미량 검출되었다(Table 1-1-17). 한편 MGD02 및 2TDJ15의 혼합균주를 이용한 청국장에서는 acetylglycitin 및 acetylgenistin이 추가적으로 미량 검출되었다. 또한 총 isoflavone 함량은 수침콩이 1933.01  $\mu\text{g}$ 으로 가장 높게 검출되었고 그 뒤를 이어 수침콩에서 1854.29  $\mu\text{g}$ 으로 높은 수치를 나타내었다. 이로써 균주별로 제조한 청국장의 경우 미생물 발효에 의해 배당체 형태 감소에 따른 비배당체 증가가 이루어짐을 알 수 있었다. 특히 비배당체인 aglycone (daidzein, glycitein, 및 genistein) 함량은 MGD02(625.62  $\mu\text{g}$ ), 2TDJ15(477.28  $\mu\text{g}$ ), MGD02+2TDJ15(373.67  $\mu\text{g}$ )균주 순으로 높게 측정이 되었다(Table ?). 또한 수침콩의 주요 isoflavone 화합물은 peak 4번인 malonyldaidzin (131.91  $\mu\text{g}$ )과 8번인 malonylgenistin (864.96  $\mu\text{g}$ )이었고 증자콩에서는 peak 1번인 daidzin (638.94  $\mu\text{g}$ )과 3번인 malonylgenistin (709.11  $\mu\text{g}$ )인 것으로 나타났다(Table 1-1-17 및 Fig. 1-1-16A-B). 하지만 수침 및 증자콩과는 다른 결과를 나타낸 균주별 원료 청국장에서는 MGD02, 2TDJ15, 및 혼합균주의 경우 주요 isoflavone 화합물로는 peak 9번인 daidzein과 12번 genistein인 것으로 나타났다(Fig. 1-1-16C~E). MGD02는 daidzein과 genistein이 각각 390.83 및 202.64  $\mu\text{g}$ 이었고, 2TDJ15는 335.71 및 103.06  $\mu\text{g}$ 이었다. 마지막 혼합균주의 경우 258.66 및 91.39  $\mu\text{g}$ 이 존재하는 것으로 측정되었다. 한편 비배당체 중 오직 glycitein만은 증가하는 경향을 나타내지 않았으며 수침콩 및 증자콩과 비교하였을 시 오히려 함량이 더 낮은 것으로 나타났다. 이러한 이유는 비배당체로의 전환이 daidzein과 genistein 위주로 이루어진 것으로 사료되었다.

Table 1-1-17. Comparison of isoflavone contents of cheonggukjang by single and mixed starters

Contents <sup>1)</sup> ( $\mu\text{g/g}$ )	Cheonggukjang by <i>Bacillus</i> sp.				
	Soaking	Steaming	MGD02	2TDJ15	MGD02+2TDJ15
Glycosides					
1. Daidzin	146.22	638.94	181.16	171.29	127.50
2. Glycitin	121.95	262.51	195.59	253.89	139.79
3. Genistin	503.16	709.11	198.77	206.72	122.02
Total	771.34	1610.56	575.52	631.89	389.31
Malonylglycosides					
4. Daidzin	131.91	42.82	tr <sup>2)</sup>	tr	tr
5. Glycitin	4.84	21.58	46.71	79.79	57.28
6. Genistin	864.96	59.13	27.79	34.75	28.61
Total	1001.72	123.53	74.50	114.54	85.89
Acetylglycosides					
7. Daidzin	10.56	tr	105.94	98.43	44.69
8. Glycitin	5.93	2.48	11.12	12.74	tr
9. Genistin	2.96	1.24	5.56	6.37	tr
Total	19.45	3.72	122.61	117.54	44.69
Aglycones					
10. Daidzein	67.49	20.74	390.83	335.71	258.66
11. Glycitein	7.33	78.75	32.15	38.50	23.61
12. Genistein	65.69	16.99	202.64	103.06	91.39
Total	140.51	116.48	625.62	477.28	373.67
Total isoflavones	1933.01	1854.29	1398.25	1341.25	893.55

<sup>1)</sup> All values are presented as the mean  $\pm$  SD of triplicate determination.

<sup>2)</sup> tr: trace (<0.002  $\mu\text{g/g}$ ).

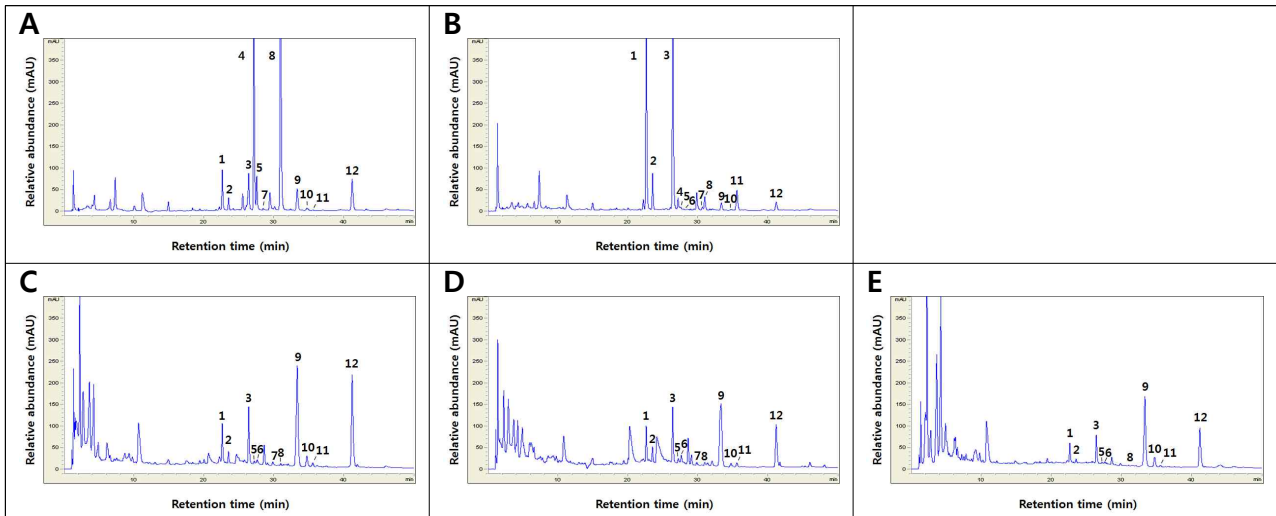


Fig. 1-1-16. Typical HPLC chromatogram of isoflavone extracts in cheonggukjang. A; soaking, B; steaming, C; MGD02, D; 2TDJ15, and E; MGD02+2TDJ15. 1; daidzin, 2; glycitin, 3; genistin, 4; malonyldaidzin, 5; malonyglycitin, 6; acetyldaidzin, 7; acetylglycitin, 8; malonylgenistin, 9; daidzein, 10; acetylgenistin, 11; glycitein, and 12; genistein.

(라) 항산화 활성 : DPPH 라디칼 소거활성 측정 결과 수침콩에서는 0.25 mg/g 농도에서 라디칼 소거활성이 없었으며 증자콩은 동일 농도에서 9.12%의 라디칼 소거활성을 나타내었다. MGD02의 경우 1.0 mg/g 농도에서 88.22%로 청국장 중 가장 높은 라디칼 소거활성을 나타냈으며 2TDJ15 균주가 동일 농도에서 66.21%로 조금 낮은 수치를 나타내었다. 한편 혼합균주의 경우에는 84.57%로 비교적 높은 활성을 나타내었고 공통적으로 추출물의 처리농도가 높아짐에 따라 농도의존형으로 증가하는 추세를 나타내었다(Fig. 38A). ABTS 라디칼 소거활성 역시 DPPH와 마찬가지로 농도의존적으로 증가하는 경향을 동일하였다. 수침콩 및 증자콩의 경우 저농도(0.10 mg/g)에서는 라디칼 소거활성이 나타나지 않았으며 중간농도인 0.50 mg/g에서는 각각 10.03 및 22.36%를 나타내었다. 청국장의 경우에는 저농도에서부터 고농도까지 라디칼 소거활성이 있는 것으로 측정되었고 이 역시 MGD02를 이용한 청국장에서 0.50 mg/g 농도 처리 시 86.82%의 높은 ABTS 라디칼 소거활성을 보였다(Fig. 38B).  $\cdot\text{OH}$  라디칼 소거활성 역시 여러 라디칼 소거활성과 수치는 약간 다르게 측정되었으나 ABTS와 경향이 완벽히 일치한 것으로 나타났다. 즉, 수침콩과 증자콩에서는 저농도 처리 시 소거활성이 없었고 중간농도에서부터 활성이 측정되어졌다. MGD02의 경우에는 증자콩과 비교하였을 시 고농도에서 2배 이상 소거활성 차이가 났으며 74.13%로 청국장 중에서는 가장 높은 것으로 나타났다. 한편 2TDJ15는 62.41%를, 혼합균주는 68.29%의 라디칼 소거활성을 나타내었다(Fig. 38C).

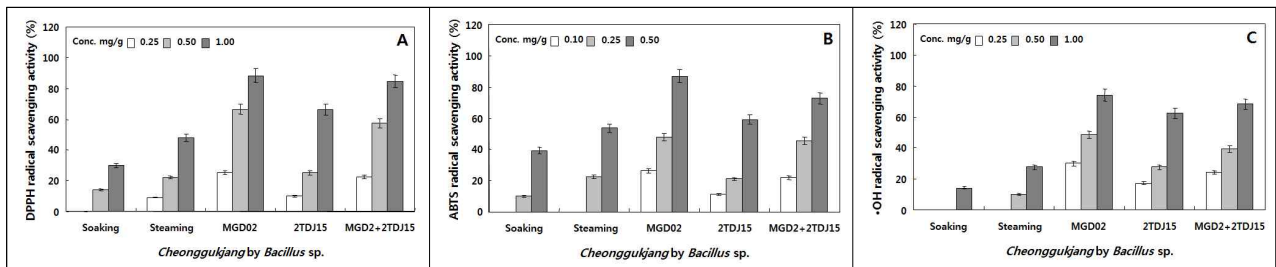


Fig. 1-1-17. Comparison of DPPH (A), ABTS (B), and  $\cdot\text{OH}$  (C) radical scavenging activity and FRAP (D) assay of cheonggukjang by single and mixed starters.

**(2) 균주별 청국장 스탁의 품질특성**

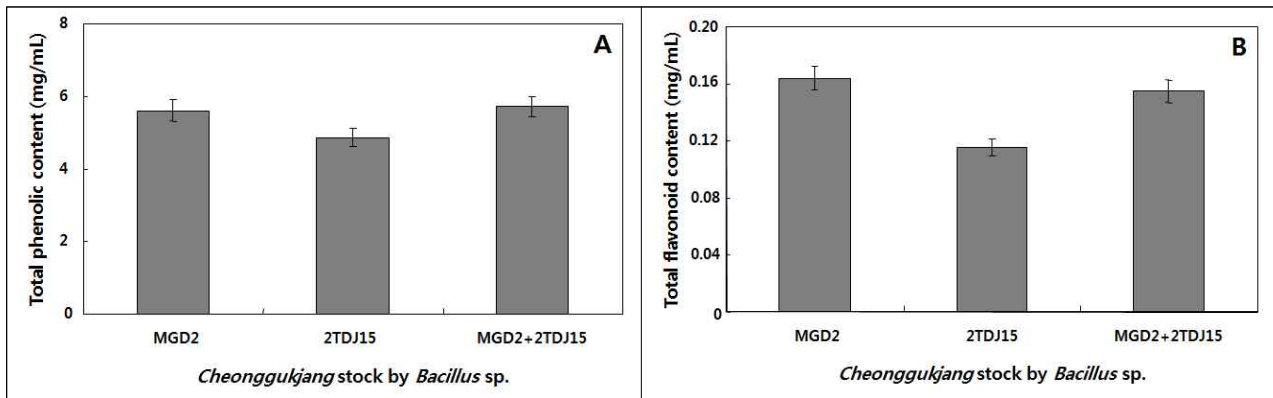
(가) 이화학적 특성 : pH는 전체적으로 모두 유사한 수치를 나타내었고 5.81~6.66 수준이었다. 산도 역시 pH 감소에 따라 약간씩 증가하였고 혼합균주를 이용한 청국장 스탁에서 0.14%의 산도를 나타내었다. 갈변도는 MGD02 균주를 이용한 스탁에서 2.42로 가장 짙었으며 환원당은 2TDJ15 균주를 이용한 스탁에서 2.70 g/L를 함유하고 있었다. 염도는 0.80~1.15% 수준이었고 단백질 함량은 MGD02의 경우 23.86 mg/mL로 측정되었고 2TDJ15 균주는 26.86 mg/mL를, 혼합균주를 이용한 스탁은 22.89 mg/mL를 함유하고 있었다(Table 3-1-?).

**Table 1-1-18. Comparison of pH, acidity, salinity, and protein contents of cheonggukjang stock**

Sample	Contents <sup>1)</sup>					
	pH	Acidity (% lactic acid)	Browning degree (420nm)	Reducing sugar (g/L)	Salinity (%)	Protein (mg/mL)
MGD02	5.81	0.11	2.42	2.00	1.05	23.86
2TDJ15	6.66	0.05	1.20	2.70	0.80	26.86
MGD02+2TDJ15	5.83	0.14	1.35	1.51	1.15	22.89

<sup>1)</sup>All values are means of determinations in three independent experiments.

(나) 총 phenolics 및 flavonoids 함량 : 총 phenolics 함량은 모든 스탁에서 큰 차이없이 유사한 함량을 나타내었다. MGD02의 경우 5.61 mg/mL를 함유하고 있었고 2TDJ15는 4.86 mg/mL를, 혼합균주를 이용한 스탁에서는 5.72 mg/mL로 사실상 별다른 차이는 없는 것으로 나타났다(Fig. 1-1-18A). 총 flavonoids 함량 역시 total phenolics와 경향은 같았으나 그 함량 차이는 존재하는 것으로 나타났다. 즉 MGD02가 0.16 mg/mL로 가장 높았지만 이들 간의 유의적 차이는 없는 것으로 판단하였다(Fig. 1-1-18B).



**Fig. 1-1-18. Comparison of total phenolics (A) and flavonoids (B) contents by cheonggukjang stocks.**

(다) Isoflavone 함량 : 각각의 균주별로 제조한 청국장 스탁에서는 공통적으로 총 12가지 화합물(daidzin, glycitin, genistin, malonyl-daidzin, glycitin, genistin, acetyl-daidzin, glycitin, genistin, daidzein, glycitein, 및 genistein) 중 malonyldaidzin, acetylglycitin, 및 acetylgenistin을 제외한 9가지의 isoflavone 화합물이 검출되었다. 한편 2TDJ15 및 혼합균주를 이용한 청국장에서는 acetylglycitin 및 acetylgenistin이 추가적으로 미량 검출되었다. 또한 총 isoflavone 함량은 2TDJ15균주를 이용한 스탁에서 304.73  $\mu\text{g}$ 으로 가장 높게 검출되었고 그 뒤를 이어 MGD02에서 299.91  $\mu\text{g}$ 이 검출되었고 혼합균주의 경우에는 226.74  $\mu\text{g}$ 을 나타내었다(Table 48). 한편 비배당체인 aglycone에 속하는 daidzein, glycitein, 및 genistein의 함량은 MGD02(122.19  $\mu\text{g}$ ), 2TDJ15(103.58  $\mu\text{g}$ ), MGD02+2TDJ15(120.34  $\mu\text{g}$ )균주 순서로 높은 것으로 나타났다(Table 48). 특히 MGD02는 daidzein과 genistein이 각각 76.78 및 38.59  $\mu\text{g}$ 이었고, 2TDJ15는 각각 73.59 및

25.50  $\mu\text{g}$ 이었다. 마지막 혼합균주를 이용한 청국장 스탁의 경우 73.59 및 40.86  $\mu\text{g}$ 으로 측정되었다. 추가적으로 비배당체 중 glycitein의 경우 여러 isoflavone 화합물과는 다르게 큰 변화가 없는 것으로 나타났다.

Table 1-1-19. Comparison of isoflavone contents of various cheonggukjang stocks

Contents <sup>1)</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )	Cheonggukjang stock by <i>Bacillus</i> sp.		
	MGD02	2TDJ15	MGD02+2TDJ15
Glycosides			
1. Daidzin	46.95	46.40	25.96
2. Glycitin	45.79	62.26	28.02
3. Genistin	51.94	45.15	26.44
Total	144.68	153.81	80.42
Malonylglycosides			
4. Daidzin	tr <sup>2)</sup>	tr	tr
5. Glycitin	12.04	11.10	11.06
6. Genistin	5.81	5.53	5.45
Total	17.85	16.63	16.51
Acetylglycosides			
7. Daidzin	13.88	30.72	9.47
8. Glycitin	0.87	tr	tr
9. Genistin	0.44	tr	tr
Total	15.19	30.72	9.47
Aglycones			
10. Daidzein	76.78	73.59	74.60
11. Glycitein	6.82	4.49	4.88
12. Genistein	38.59	25.50	40.86
Total	122.19	103.58	120.34
<b>Total isoflavones</b>	<b>299.91</b>	<b>304.73</b>	<b>226.74</b>

<sup>1)</sup> All values are presented as the mean  $\pm$  SD of triplicate determination.

<sup>2)</sup> tr: trace( $<0.002 \mu\text{g/g}$ ).

(라) 항산화 활성 : DPPH 라디칼 소거활성 결과로는 MGD02 균주를 이용한 스탁에서 0.25 mg/mL 처리 시 39.1%의 라디칼 소거활성을 나타내었고 처리 농도가 높아질수록 75.14 및 90.17%의 우수한 소거활성을 나타내었다. ABTS 라디칼 소거활성 역시 DPPH와 마찬가지로 처리 농도가 높아질수록 증가하는 경향은 동일하였다.  $\cdot\text{OH}$  라디칼 소거활성 역시 청국장 스탁 추출물의 처리 농도가 높아질수록 라디칼 소거활성이 비례적으로 증가하였고 MGD02의 경우 1.0 mg/mL 처리 시 78.34%를 나타내었다.

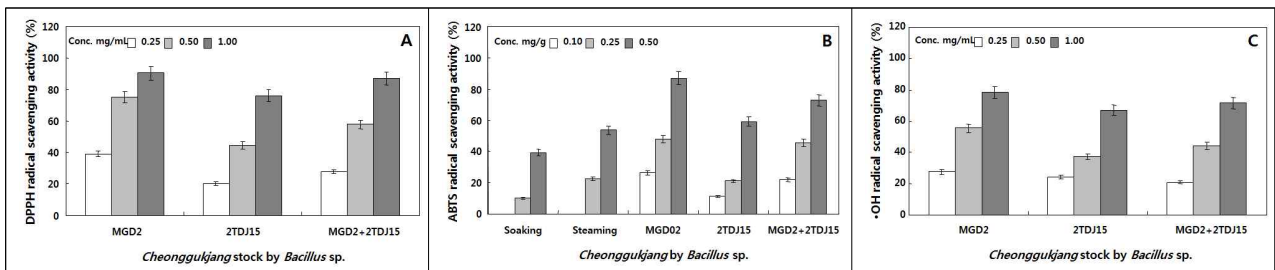


Fig. 1-1-19. Comparison of DPPH (A), ABTS (B), and  $\cdot\text{OH}$  (C) radical scavenging activity and FRAP (D) assay by cheonggukjang stocks.

### (3) 균주별 청국장 브라운소스의 품질특성

(가) 이화학적 특성 : 청국장 소스의 pH는 4.89-5.40으로 약간 낮은 수준이었고 산도는 2TDJ15 균주를 이용한 청국장 소스에서 0.12%로 가장 높게 나타났다. 환원당은 혼합균주 이용 청국장 소스에서 2.79 g/L 가장 낮은 것으로 측정되었다. 한편 MGD02 균주 이용 청국장 소스

에서의 환원당 및 단백질 함량은 각각 3.78 g/L 및 25.92 mg/mL를 함유하고 있었고 단백질 함량은 혼합균주 이용 소스에서 32.45 mg/mL로 가장 높음을 확인하였다. 이 외 갈변도 역시 크게 다른 점은 나타나지 않았고 모두 유사한 것으로 나타났다.

Table 1-1-19. Comparison of pH, acidity, salinity, and protein contents of cheonggukjang sauces

Sample	Contents <sup>2)</sup>					
	pH	Acidity (%, lactic acid)	Browning degree (420nm)	Reducing sugar (g/L)	Salinity (%)	Protein (mg/mL)
MGD02	5.40	0.07	1.07	3.78	0.70	25.92
2TDJ15	4.92	0.12	1.78	5.18	0.45	27.29
MGD02+2TDJ15	4.89	0.10	1.14	2.79	0.60	32.45

<sup>1)</sup>All values are means of determinations in three independent experiments.

(나) 총 phenolics 및 flavonoids 함량 : 총 phenolics 함량은 MGD02와 혼합균주 이용 소스에서 큰 차이 없이 유사하였고 각각 5.06 및 4.94 mg/mL로 MGD02 이용 소스가 약간 더 많은 함량을 나타내었다(Fig. 1-1-20A). 한편 2TDJ15 이용 소스는 3.49 mg/mL를 나타내 이들 중에서는 가장 낮은 함량을 나타내었다. 총 flavonoids 함량은 total phenolics와 유사한 경향을 나타내었으며 MGD02 이용 소스가 혼합균주 이용 소스보다 함량이 좀 더 높은 것으로 측정되었다(Fig. 1-1-20B).

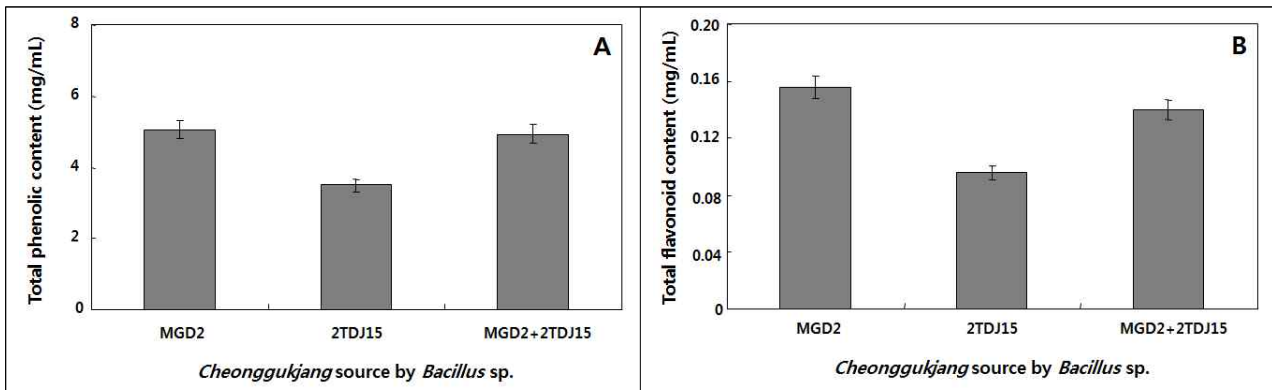


Fig. 1-1-20. Comparison of total phenolics (A) and flavonoids (B) contents in cheonggukjang sauces.

(다) Isoflavone 함량 : 총 isoflavone 함량은 2TDJ15균주 이용 청국장 소스에서 171.48  $\mu$ g으로 가장 높게 검출되었고 그 뒤를 이어 혼합균주에서 142.15  $\mu$ g이 검출되었고 MGD02의 경우에는 129.03  $\mu$ g을 나타내었다(Table 1-1-20). 한편 비배당체인 daidzein, glycitein, 및 genistein의 함량은 2TDJ15(69.03  $\mu$ g), MGD02+2TDJ15(61.37  $\mu$ g), MGD02(54.93  $\mu$ g), 균주 순서로 높은 것으로 나타났다(Table 1-1-20).

(라) 항산화 활성 : DPPH 라디칼 소거활성 결과로는 MGD02 균주를 이용한 소스에서 0.25 mg/mL 처리 시 43.03%의 라디칼 소거활성을 나타내었으나 처리 농도가 높아질수록 0.5 mg/mL 및 1.0 mg/mL 처리 시 각각 79.95 및 94.26%의 우수한 소거활성을 나타내었다(Fig. 1-1-21A). 2TDJ15 균주를 이용한 소스에서도 비슷한 결과를 나타내었는데 저농도에서는 24.95%를 나타내었고 중간농도에서 55.11%를 나타내었고, 고농도에서는 88.70%를 나타내었다. 한편 혼합균주 이용 청국장 소스는 1.0 mg/mL 농도 처리 시 93.08%의 우수한 라디칼 소거활성을 나타내었고 공통적으로 추출물의 처리농도가 높아짐에 따라 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 1-1-21A). ABTS 라디칼 소거활성 역시 DPPH와 마찬가지로 처리 농도가 높아질수록 증가하는 경향은 동일하였으며 MGD02는 저농도에서 33.11%의 낮은 라디칼 소거활성 나타내었지만 중간농도인

0.25 mg/mL에서는 76.66%로 증가하였다. 또한 0.5 mg/mL 처리 시에는 93.80%로 청국장 소스 중에서는 가장 우수한 활성을 나타내었다(Fig. 1-1-21B). 한편 2TDJ15 및 혼합균주를 이용한 청국장 소스에서도 고농도 처리 시 각각 72.39%와 83.61%의 우수한 소거활성을 나타내었다. •OH 라디칼 소거활성도 DPPH 및 ABTS와 동일한 결과를 보였다(Fig. 1-1-21C).

Table 1-1-20. Comparison of isoflavone contents in various cheonggukjang sauces

Contents <sup>1)</sup> (μg/mL)	Cheonggukjang sauce by <i>Bacillus</i> sp.		
	MGD02	2TDJ15	MGD02+2TDJ15
<b>Glycosides</b>			
1. Daidzin	20.05	28.38	13.19
2. Glycitin	22.65	28.42	46.14
3. Genistin	20.23	30.14	12.44
Total	62.93	86.94	71.77
<b>Malonylglycosides</b>			
4. Daidzin	nd <sup>2)</sup>	nd	nd
5. Glycitin	3.86	4.90	3.50
6. Genistin	4.53	4.85	3.20
Total	8.39	9.75	6.71
<b>Acetylglycosides</b>			
7. Daidzin	2.16	3.17	0.87
8. Glycitin	0.41	1.73	0.96
9. Genistin	0.21	0.86	0.48
Total	2.78	5.76	2.31
<b>Aglycones</b>			
10. Daidzein	38.02	43.81	38.27
11. Glycitein	2.15	3.48	1.66
12. Genistein	14.76	21.74	21.44
Total	54.93	69.03	61.37
<b>Total isoflavones</b>	<b>129.03</b>	<b>171.48</b>	<b>142.15</b>

<sup>1)</sup>All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

<sup>2)</sup>nd: not detected.

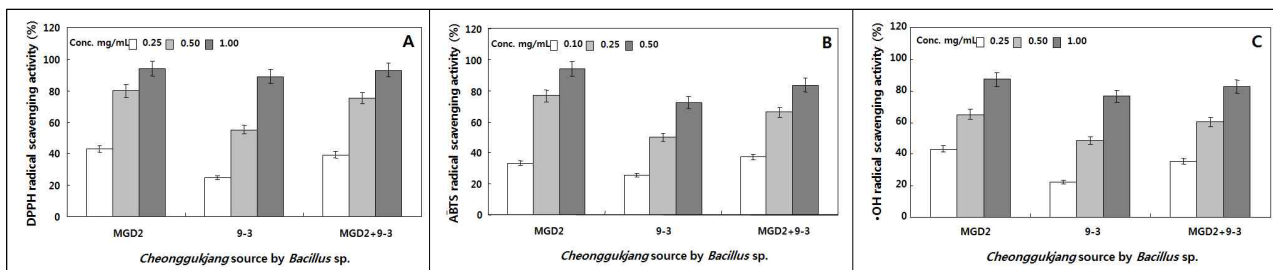


Fig. 1-1-21. Comparison of DPPH (A), ABTS (B), and •OH (C) radical scavenging activities and FRAP (D) assay in cheonggukjang sauces.

#### (4) 약용복합추출물 첨가 청국장 브라운소스의 품질특성

(가) 이화학적 특성 : 청국장 소스의 관능평가 결과 맛, 향, 색감 등의 기호도가 우수하게 나타났던 2TDJ15 균주 이용하여 약용복합추출물 첨가한 청국장 브라운소스를 제조하여 측정된 이화학적 특성 결과는 Table 1-1-21와 같았다. 약재를 첨가하지 않은 청국장 소스의 pH는 5.15 수준이었고 산도는 0.08%로 측정되었고 모든 소스에서 유사한 수치로 나타났다. 갈변도는 약재 10% 첨가 소스가 1.68로 가장 짙은색을 나타내었고 환원당 역시 27.19 g/L로 가장 높게 측정되었다. 염도는 0.75~0.90% 사이로 나타났으며 단백질 함량은 약재를 첨가하지 않은 경우 33.04 mg/mL, 10% 첨가 시 38.56 mg/mL로 가장 높았고 20% 첨가 시에는 26.92 mg/mL를 함유하고 있었다.



Table 1-1-21. Comparison of pH, acidity, salinity, and protein contents in cheonggukjang sauce with cockatiel extracts of medicinal herbs

Content (%)	Contents <sup>2)</sup>					
	pH	Acidity (%, lactic acid)	Browning degree (420nm)	Reducing sugar (g/L)	Salinity (%)	Protein (mg/mL)
0	5.15	0.08	1.09	26.11	0.90	33.04
10	5.12	0.07	1.68	27.19	0.75	38.56
20	5.12	0.07	1.24	25.57	0.80	26.92

<sup>1)</sup>All values are means of determinations in three independent experiments.

(나) 총 phenolics 및 flavonoids 함량 : 총 phenolics 함량은 약재를 첨가하지 않은 경우 3.99 mg/mL 수준이었고 10% 첨가 시에는 3.79 mg/mL를, 20%의 경우에는 3.94 mg/mL를 나타내었으나 큰 차이는 나타나지 않았다(Fig. 1-1-22A). 한편 총 flavonoids 함량은 총 phenolics와 유사한 경향을 나타내었으며 약재 첨가에 따라 조금씩 증가하는 경향을 나타내었다. 약재를 첨가하지 않은 경우 0.09 mg/mL 수준이었고 10% 첨가 시에는 0.12 mg/mL를 나타내었으며 20%의 경우에는 0.14 mg/mL 수준으로 측정되었다(Fig. 1-1-22B).

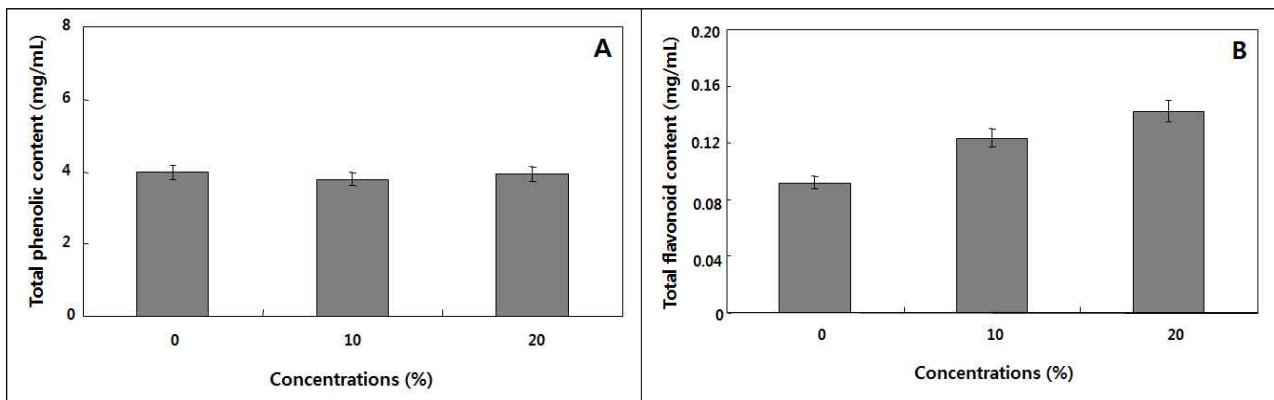


Fig. 1-1-22. Comparison of total phenolics (A) and flavonoids (B) contents in cheonggukjang sauce with cockatiel extracts of medicinal herbs.

(다) Isoflavone 함량 : 총 isoflavone 함량은 약재 20% 첨가 청국장 소스에서 193.67  $\mu$ g으로 가장 높게 검출되었고 그 뒤를 이어 약재를 첨가하지 않은 청국장 소스에서 172.00  $\mu$ g이 검출되었고 10% 첨가 시에는 145.13  $\mu$ g을 함유하고 있었다. 한편 비배당체인 daidzein, glycitein, 및 genistein의 함량은 20%(76.54  $\mu$ g), 0%(67.32  $\mu$ g), 10%(59.18  $\mu$ g) 약재를 첨가한 순서대로 높게 측정이 되었다. 특히 약재를 첨가하지 않은 경우는 daidzein과 genistein이 각각 45.80 및 19.16  $\mu$ g이었고, 10% 첨가 시 각각 40.60 및 59.18  $\mu$ g이었다. 마지막 약재를 20% 첨가하여 제조한 청국장 소스의 경우 47.97 및 18.14  $\mu$ g으로 측정되었다(Table 1-1-22).

(라) Phenolic acids 및 flavonols 함량 : 총 phenolic acids 화합물 함량은 약초복합추출물 함량이 첨가할수록 증가하였고, 주요 화합물은 chlorogenic acid이 검출되었으며 각각의 식물성 소스에서의 함량은 18.61  $\mu$ g/mL, 52.45  $\mu$ g/mL 및 74.07  $\mu$ g/mL 있었고, 주요 flavonols로 Naringin이 검출되었으며 각각의 식물성 소스에서의 함량은 64.19  $\mu$ g/mL, 237.94  $\mu$ g/mL 및 318.19  $\mu$ g/mL 있었다(Table 1-1-23).

Table 1-1-22. Comparison of isoflavone contents in cheonggukjang sauce with cockatiel extracts of medicinal herbs

Contents <sup>1)</sup> (μg/mL)	Concentrations (%)		
	0	10	20
Glycosides			
1. Daidzin	24.11	21.87	24.91
2. Glycitin	35.00	30.13	39.80
3. Genistin	24.35	21.85	25.21
Total	83.47	73.84	89.92
Malonylglycosides			
4. Daidzin	4.92	3.32	nd
5. Glycitin	11.93	5.74	15.78
6. Genistin	4.36	3.04	11.43
Total	21.21	12.10	27.21
Aglycones			
10. Daidzein	45.80	40.60	47.97
11. Glycitein	2.36	2.67	10.42
12. Genistein	19.16	15.91	18.14
Total	67.32	59.18	76.54
Total isoflavones	172.00	145.13	193.67

<sup>1)</sup> All values are presented as the mean±SD of triplicate determination. <sup>2)</sup> nd: not detected.

Table 1-1-23. Comparison of isoflavone contents in cheonggukjang sauce with cockatiel extracts of medicinal herbs

Contents (μg/mL)	Concentrations (%)		
	0	10	20
Phenolic acids			
Gallic acid	19.05	21.78	39.40
Protocatechuic acid	11.39	30.21	52.37
Chlorogenic acid	18.61	52.45	74.07
<i>p</i> -Hydrobenzoic acid	4.36	17.08	34.94
Vanilic acid	6.05	10.91	22.32
<i>p</i> -Coumaric acid	1.98	8.28	14.24
Vertaric acid	2.41	9.78	18.64
<i>t</i> -Cinnamic acid	0.88	4.94	8.30
Total	64.73	155.43	264.28
Flavonols			
Epigallocatechin	9.17	37.02	58.33
Epigallocatechin gallate	3.48	9.25	10.68
Vanilin	0.74	4.49	7.60
Rutin	1.48	9.99	15.98
Catechin gallate	tr	2.65	5.11
Naringin	42.47	86.04	117.64
Quercetin	3.98	9.31	10.28
Naringenin	2.87	79.19	92.57
Total	64.19	237.94	318.19

<sup>1)</sup> All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

(마) 항산화 활성 : DPPH 라디칼 소거활성은 약재를 첨가한 양이 높을수록 활성도 비례적으로 높아지는 경향을 나타내었다. 약재 첨가 0%의 경우 0.25 mg/mL 처리 시 라디칼 소거활성이 없었으나 처리 농도가 높아질수록 0.5 mg/mL 및 1.0 mg/mL 처리 시 각각 29.03 및 64.84%의 활성을 나타내었다(Fig. 1-1-23A). 20%의 약재를 첨가한 청국장 소스는 1.0 mg/mL 농도 처리 시 81.72%의 가장 우수한 라디칼 소거활성을 나타내었고 공통적으로 추출물의 처리농도가

높아짐에 따라 농도의존적으로 증가하는 경향이였다(Fig. 1-1-23A). ABTS 라디칼 소거활성 역 시 DPPH와 마찬가지로 처리 농도가 높아질수록 증가하는 경향은 동일하였으며 10% 및 20%의 약재를 첨가한 경우 고농도 처리 시 각각 74.65%와 82.54%의 우수한 소거활성을 나타내었다(Fig. 1-1-23B).  $\cdot$ OH 라디칼 소거활성도 DPPH 및 ABTS와 동일하게 약재를 첨가한 양이 증가 할수록 라디칼 소거활성 또한 점차 증가하는 결과를 보였고 20% 약재 첨가 시 1.0 mg/mL 처 리 시 58.18%를 나타내었다(Fig. 1-1-23C).

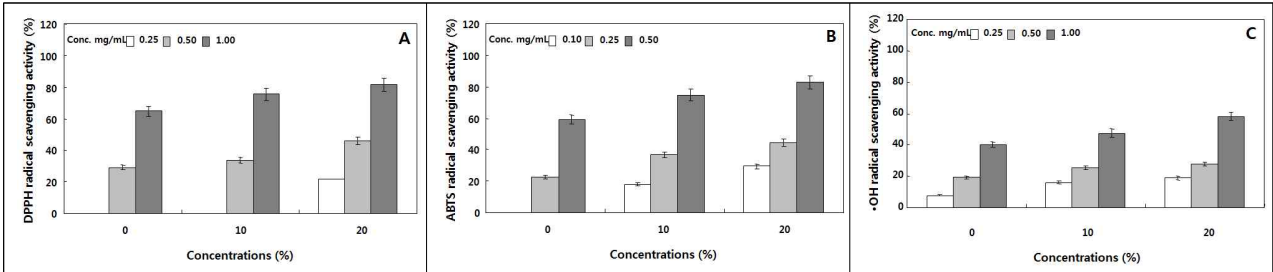


Fig. 1-1-23. Comparison of DPPH (A), ABTS (B), and  $\cdot$ OH (C) radical scavenging activities and FRAP (D) assay on cheonggukjang sauce with cockatiel extracts of medicinal herbs.

## 바. 약용작물 추출물 이용 천연조미료 제조공정 확립

### (1) 활성글루텐 가수분해물 제조조건 확립

(가) 키위과즙 첨가량에 따른 단백질 분해능 확인 : 반응 전 활성글루텐은 12.09 mg/mL의 단백질과 7.23 mg/100 mL을 함유하고 있었다. 그러나 효소 반응 후 단백질 함량과 glutamic acid는 키위과즙 첨가량이 증가할수록 증가하였으며, 키위과즙을 4% 첨가구는 단백질 함량은 16.49 mg/mL 및 glutamic acid 함량은 202.16 mg/100 mL을 나타내었다(Table 1-1-24).

Table 1-1-24. Comparison of pH, acidity, salinity, protein, and glutamic acid contents in 10% gluten hydrolysis broth according to kiwi addition volumes

Kiwi addition volumes (% , v/v)	Contents <sup>2)</sup>				
	pH	Acidity (% , lactic acid)	Salinity (% , NaCl)	Protein (mg/mL)	Glutamic acid (mg/100 mL)
반응 전 0	5.69	0.01	13.05	12.09	7.23
반응 후 0	5.74	0.02	12.43	12.17	9.84
반응 후 1	5.61	0.02	12.40	13.03	49.08
반응 후 2	5.42	0.03	12.01	14.96	102.30
반응 후 4	5.16	0.04	10.61	16.49	202.16

<sup>1)</sup>All values are means of determinations in three independent experiments.

(나) 반응 온도에 따른 단백질 분해능 확인 : 단백질 함량과 glutamic acid 함량은 반응온도와 비례적으로 증가하는 것으로 측정되었고 최종 40°C에서 반응하였을 시 16.37 mg/mL 및 123.84 mg/100 mL을 함유하고 있었다(Table 1-1-25).

(다) 반응 시간에 따른 단백질 분해능 확인 : 키위과즙을 최종 부피에 4% 만큼 첨가하여 0 ~4시간 효소 반응 후의 결과는 Table 4에 나타낸바와 같았다. 이전의 결과와 마찬가지로 pH는 반응 시간이 길어질수록 점차적으로 감소하였으며 4시간 후에는 4.94 수준으로 반응 전 5.08 수준에 비해 약간 감소하였다. 산도는 효소 반응 4시간째 0.04%이었고 염도는 11.82%를 나타내었다. 단백질과 glutamic acid 함량 역시 반응시간과 비례적으로 증가하여 최종 15.02 mg/mL과 199.10 mg/100 mL을 나타내었다(Table 1-1-26).

Table 1-1-25. Comparison of pH, acidity, salinity, protein, and glutamic acid contents in 10% gluten hydrolysis broth according to reaction temperatures

Reaction temperature (°C)	Contents <sup>2)</sup>				
	pH	Acidity (% lactic acid)	Salinity (% NaCl)	Protein (mg/mL)	Glutamic acid (mg/100 mL)
20	5.15	0.03	12.00	14.15	76.63
30	5.05	0.04	11.61	15.51	84.40
40	5.02	0.04	11.40	16.37	123.84
50	4.94	0.05	11.80	15.79	126.45

<sup>1)</sup>All values are means of determinations in three independent experiments.

Table 1-1-26. Comparison of pH, acidity, salinity, protein, and glutamic acid contents in 10% gluten hydrolysis broth according to reaction times

Reaction time (h)	Contents <sup>2)</sup>				
	pH	Acidity (% lactic acid)	Salinity (% NaCl)	Protein (mg/mL)	Glutamic acid (mg/100 mL)
0	5.08	0.02	12.40	12.15	93.65
1	5.18	0.03	11.60	13.57	98.49
2	4.97	0.04	12.06	14.28	115.05
4	4.94	0.04	11.82	15.02	199.10

<sup>1)</sup>All values are means of determinations in three independent experiments.

(라) 활성글루텐 함량에 따른 단백질 분해능 확인 : 활성글루텐 5 g을 첨가하였을 때보다는 30 g을 첨가한 경우에 pH가 4.94로 가장 낮은 수준을 보였으며 산도 역시 0.04%로 가장 높게 측정이 되었다. 염도는 활성글루텐 함량이 5 g일 때 12.41%로 가장 높았으며 10 g의 경우 11.60%, 20 g의 경우 12.00%를 나타내었고 30 g의 경우 11.80%를 나타내었고 활성글루텐 함량과 반응시간에 따른 염도의 차이는 크게 나타나지 않았다. 단백질과 glutamic acid 함량은 당연한 결과로써 활성글루텐 함량이 가장 많은 30 g일 때 20.45 mg/mL 및 251.75 mg/mL을 나타내었다(Table 1-1-27).

Table 1-1-27. Comparison of pH, acidity, salinity, protein, and glutamic acid contents in 5 to 30% gluten hydrolysis broth according to vital gluten volumes

Vital gluten volumes (% w/v)	Contents <sup>2)</sup>				
	pH	Acidity (% lactic acid)	Salinity (% NaCl)	Protein (mg/mL)	Glutamic acid (mg/100 mL)
5	5.08	0.02	12.41	13.43	154.67
10	5.18	0.03	11.60	14.43	143.67
20	4.97	0.04	12.00	16.94	205.21
30	4.94	0.04	11.80	20.45	215.75

<sup>1)</sup>All values are means of determinations in three independent experiments.

## (2) 처리 후 열처리에 따른 성상

(가) 열처리 후 성상 : 활성글루텐 함량은 30%로 고정하고 최종 부피의 5% 만큼의 키위 주스를 첨가하여 24시간 동안 반응시킨 후 121°C에서 15분간 살균처리 한 결과 성상은 Fig. 1-1-24와 같았다. 반응 6시간까지는 살균 후 밀가루 반죽형태의 겔이 형성되었고 12시간 이후에는 겔이 형성되지 않는 것을 확인할 수 있었다.



Fig. 1-1-24. Photograph of the heat treated 30% gluten hydrolysis broths.

(나) 열처리 후 특성 : 활성글루텐 함량은 30%로 고정하고 최종 부피의 5% 만큼의 키위 주스를 첨가하여 24시간 동안 반응시킨 후 121°C에서 15분간 살균처리 후 이화학적 특성은 Table 1-1-28과 같았다. 반응 전(0 시간)의 pH, 산도, 염도, 및 단백질 함량은 각각 5.45, 0.03%, 7.45%, 및 15.58 mg/mL를 나타내었고 반응 6시간 후에는 pH가 약간 감소하여 5.24 수준을 나타내었고 산도는 동일하게 측정되었다. 염도 및 단백질 함량은 조금씩 증가하여 각각 9.15% 및 17.45 mg/mL를 나타내었다. 반응 12시간째에는 pH의 경우 큰 변화는 없었으나 산도는 급격히 증가하여 0.21%를 나타내었다. 이는 단백질 분해에 따른 아미산도가 영향을 미친 것으로 사료되었으며 염도는 8.90%로 약간 감소한 수치였으나 큰 차이는 없었다. 단백질은 좀 더 증가하여 18.33 mg/mL를 나타내었다. 반응 24시간째에는 동일한 산도를 나타내었고 단백질 함량 역시 약간 증가하여 18.73 mg/mL를 함유하고 있었다(Table 71).

Table 1-1-28. Comparison of pH, acidity, salinity, and protein contents in the heat treated 30% gluten hydrolysis broth according to reaction times

Reaction time (h)	Contents <sup>2)</sup>				
	pH	Acidity (% lactic acid)	Salinity (% NaCl)	Protein (mg/mL)	Glutamic acid (mg/100 mL)
0	5.45	0.03	7.45	15.58	2.80
6	5.24	0.03	9.15	17.45	41.24
12	5.25	0.21	8.90	18.33	74.02
24	5.20	0.21	9.65	18.73	111.23

<sup>1)</sup>All values are means of determinations in three independent experiments.

### (3) 청국장 스탁과 활성글루텐 가수분해물 이용하여 제조한 조미료의 특성

(가) 이화학적 특성 : MGD2, 2TDJ15 및 MGD2+2TDJ15의 pH는 5.04~5.29 수준이었고 산도는 0.07~0.09%로 측정되었고 모든 조미료가 비슷한 수준을 나타내었다. 갈변도는 1.13~1.54

수준으로 이중 9-3에서 1.54로 가장 높았으며 환원당은 27.56~27.76 g/L으로 비슷한 수준이었다. 염도는 2.17~2.25%로 비슷한 수준을 나타내었으며 단백질 함량역시 28.29~29.15 mg/mL로 비슷한 수준을 나타내었다.

Table 1-1-29. Comparison of pH, acidity, brix, browning degree, reducing sugar, salinity and protein in seasoning according to different *cheonggukjang* stocks

Samples	Contents <sup>2)</sup>					
	pH	Acidity (% as lactic acid)	Browning degree (420nm)	Reducing sugar (g/L)	Salinity (%)	Protein (mg/mL)
MGD02	5.04	0.09	1.13	27.76	2.17	28.86
2TDJ15	5.29	0.07	1.54	27.56	2.25	28.29
MGD2+2TDJ15	5.29	0.07	1.36	27.66	2.25	29.15

<sup>1)</sup>All values are means of determinations in three independent experiments.

(나) 총 phenolics 및 flavonoids 함량 : MGD02 균주 첨가 조미료의 총 phenolics 함량은 1.18 GAE mg/mL 이었으며, 균주 2TDJ15 균주 첨가 조미료는 1.04 GAE mg/mL, MGD02+2TDJ15 혼합 균주를 혼합한 MGD2+2TDJ15 균주는 1.12 GAE mg/mL의 함량을 나타내었다. MGD02 균주 첨가 조미료의 총 phenolics 함량이 가장 높았으며, 다음으로 MGD02+2TDJ15, 2TDJ15 순 있었다(Fig. 1-1-25A). 총 flavonoids 함량은 Fig. 1-1-25B와 같았다. MGD02 균주 첨가 조미료의 총 flavonoids 함량은 0.17 mg/mL 이었으며, 균주 2TDJ15 균주 첨가 조미료는 0.15 mg/mL, MGD02+2TDJ15는 0.17 mg/mL의 함량을 나타내었다. MGD02 균주 첨가 조미료와 MGD02+2TDJ15 균주의 총 flavonoids 함량은 유의적인 차이가 없었으며, 다음으로 2TDJ15 순 있었다.

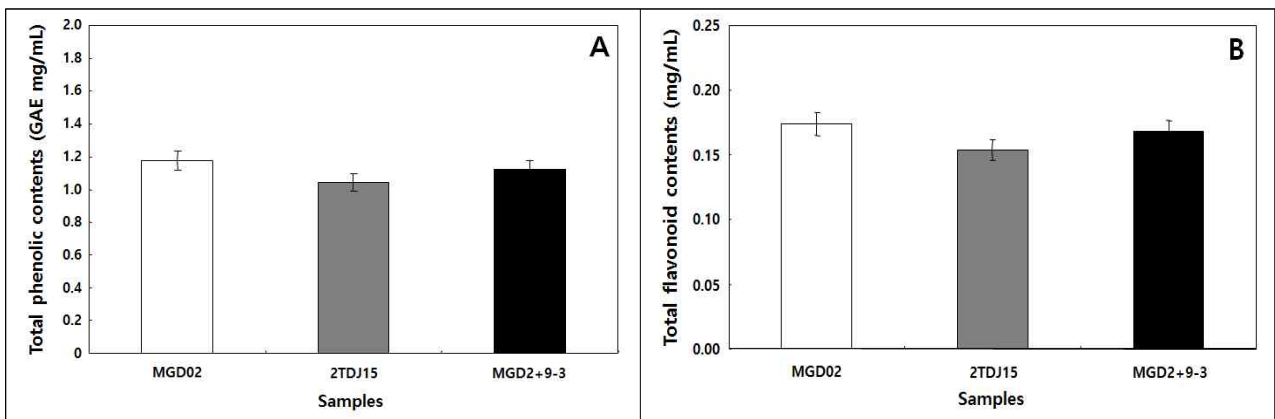


Fig. 1-1-25. Comparison of total phenolics (A) and flavonoids (B) contents in seasoning according to different *cheonggukjang* stocks.

(라) Isoflavone 함량 : 조미료의 isoflavone 함량에 관한 결과는 Table 1-1-30에 나타내었다. 모든 조미료에서는 공통적으로 총 12가지 화합물(daidzin, glycitin, genistin, malonyl-daidzin, glycitin, genistin, acetyl-daidzin, glycitin, genistin, daidzein, glycitein, 및 genistein) 중 acetyldaidzin, acetylglycitin, 및 acetylgenistin이 검출되지 않아 총 9가지의 isoflavone 화합물이 검출되었다. MGD02 균주를 이용한 조미료에서는 총 isoflavone 함량이 74.45  $\mu$ g으로 가장 높게 검출되었고 그 뒤를 이어 2TDJ15 균주 이용 조미료에서 71.80  $\mu$ g이 검출되었고 이들 혼합 균주 이용 조미료에서는 64.79  $\mu$ g으로 약간 낮은 함유량을 나타내었다. 한편 비배당체인 daidzein, glycitein, 및 genistein의 함량은 MGD02(14.47  $\mu$ g), 2TDJ15(13.94  $\mu$ g), MGD2+2TDJ15(12.53  $\mu$ g) 순서대로 높은 함량을 나타내었다.

Table 1-1-30. Comparison of isoflavone contents by cheonggukjang in seasoning according to different *cheonggukjang* stocks

Contents <sup>1)</sup> ( $\mu\text{g/g}$ )	Cheonggukjang sauce by <i>Bacillus</i> sp.		
	MGD2	9-3	MGD2+9-3
<b>Glycosides</b>			
1. Daidzin	15.62	13.22	11.79
2. Glycitin	17.78	21.91	25.29
3. Genistin	11.25	9.05	6.79
Total	44.64	44.19	43.88
<b>Malonylglycosides</b>			
4. Daidzin	2.97	2.99	3.36
5. Glycitin	6.73	6.37	0.97
6. Genistin	5.63	4.32	4.05
Total	15.34	13.67	8.39
<b>Aglycones</b>			
10. Daidzein	9.30	10.52	8.50
11. Glycitein	2.45	1.15	1.32
12. Genistein	2.72	2.28	2.71
Total	14.47	13.94	12.53
<b>Total isoflavones</b>	<b>74.45</b>	<b>71.80</b>	<b>64.79</b>

<sup>1)</sup> All values are presented as the mean $\pm$ SD of triplicate determination.

(라) 항산화 활성 : 군주별 조미료의 DPPH 라디칼 소거활성 측정 결과 Fig. 1-1-26A와 같았다. 시료 0.5 mg/g 처리 시 95.16~95.58% 수준으로 큰 차이를 보이지 않았지만 95.58%를 나타낸 MGD02가 활성이 가장 높았으며 시료 처리량 0.25 mg/g 처리 시 52.51~60.85% 수준으로 MGD02가 60.85% 활성이 가장 높았다. 또한 시료 0.1 mg/g 처리 시 35.40~40.22% 수준으로 시료간에 큰 차이를 보이지 않았지만 마찬가지로 MGD02가 40.22%로 활성이 가장 높았다. 모든 시료 처리량에 따라 MGD02 시료에서 가장 높은 활성을 보였으며 반면 SS 100% 시료에서 가장 낮은 활성을 나타내었다. ABTS 라디칼 소거활성 측정 결과 Fig. 1-1-26B와 같았다. 시료 0.25 mg/g 처리 시 95.28~98.80% 수준으로 유의적인 차이를 보이지 않았지만 98.80%를 나타낸 MGD02가 활성이 가장 높았으며 시료 처리량 0.1 mg/g 처리 시 85.49~88.35% 시료간의 차이가 크지 않았으며 이 중 MGD02가 88.49%로 활성이 가장 높았다. 또한 시료 0.05 mg/g 처리 시 52.25~58.80% 수준이었으며 0.25 및 0.1 mg/g 처리와 마찬가지로 MGD02가 58.80%로 가장 높은 활성을 보였다.  $\cdot\text{OH}$  라디칼 소거활성 측정 결과 Fig. 1-1-26C와 같았다. 시료 1 mg/g 처리 시 90.15~92.11% 수준으로 큰 차이를 보이지 않았지만 92.11%를 나타낸 MGD02가 활성이 가장 높았다. 시료 처리량 0.5 mg/g 처리 시 79.59~83.37%수준으로 MGD02가 83.37%로 활성이 가장 높았다. 또한 시료 0.25 mg/g 처리 시 62.18~65.25% 수준이었으며 0.25 및 0.1 mg/g 처리와 마찬가지로 MGD02가 65.25%로 가장 높은 활성을 보였다.

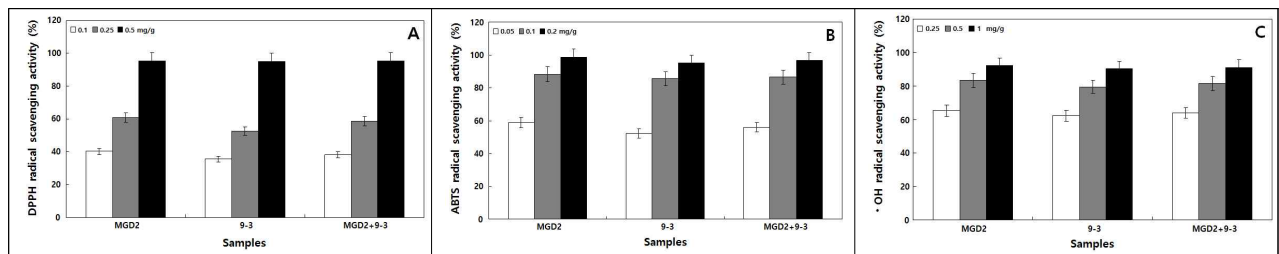


Fig. 1-1-26. Comparison of DPPH (A), ABTS (B), and  $\cdot\text{OH}$  (C) radical scavenging activity in seasoning according to different *cheonggukjang* stocks.

**(4) 약초-당추출발효액 첨가 조미료의 특성**

(가) 이화학적 특성 : SS 100%, SS 75%+FHSE 25% 및 SS 50%+FHSE 50%의 pH는 5.10~5.29 수준이었고 산도는 0.07~0.08%로 측정되었고 모든 조미료가 비슷한 수준을 나타내었다. 갈변도는 1.38~1.42 수준이었고, 환원당은 24.16~27.76 g/L로 산야초 발효액 첨가량이 증가할수록 감소하는 경향을 나타내었다. 염도는 2.19~2.23%로 비슷한 수준을 나타내었으며 단백질 함량 역시 28.44~28.76 mg/mL로 비슷한 수준을 나타내었다(Table 1-1-27).

Table 1-1-27. Comparison of pH, acidity, brix, browning degree, reducing sugar, salinity and protein in seasoning according to SS (starch syrup) and FHSE (Fermentation of herb-sugar extracts) ratio

Samples	Contents <sup>2)</sup>					
	pH	Acidity (% as lactic acid)	Browning degree (420nm)	Reducing sugar (g/L)	Salinity (%)	Protein (mg/mL)
SS 100%	5.29	0.07	1.38	27.76	2.19	28.76
SS 75%+FHSE 25%	5.18	0.07	1.41	26.56	2.23	28.49
SS 50%+FHSE 50%	5.10	0.08	1.42	24.16	2.22	28.44

<sup>1)</sup>All values are means of determinations in three independent experiments.

(나) 총 phenolics 및 flavonoids 함량 : 산야초 발효액을 첨가하지 않은 SS 100%인 조미료의 총 phenolics 함량은 1.16 GAE mg/mL 이었으며, 산야초 발효액이 25% 첨가된 SS 75%+FHSE 25% 조미료는 1.30 GAE mg/mL, 산야초 발효액이 50% 첨가된 SS 50%+FHSE 50% 조미료는 1.22 GAE mg/mL의 함량을 나타내었다. 산야초 발효액이 25% 첨가된 SS 75%+FHSE 25% 조미료의 총 phenolics 함량이 가장 높았으며, 산야초 발효액을 첨가하지 않은 SS 100%인 조미료의 총 flavonoids 함량은 0.18 mg/mL 이었으며, 산야초 발효액이 25% 첨가된 SS 75%+FHSE 25% 조미료는 0.20 mg/mL, 산야초 발효액이 50% 첨가된 SS 50%+FHSE 50% 조미료는 0.19 GAE mg/mL의 함량을 나타내었다. 유의적인 차이는 없었으나, 산야초 발효액이 25% 첨가된 SS 75%+FHSE 25% 조미료의 총 flavonoids 함량이 가장 높았으며, 다음으로 SS 50%+FHSE 50%, SS 100% 순 있었다(Fig. 1-1-31).

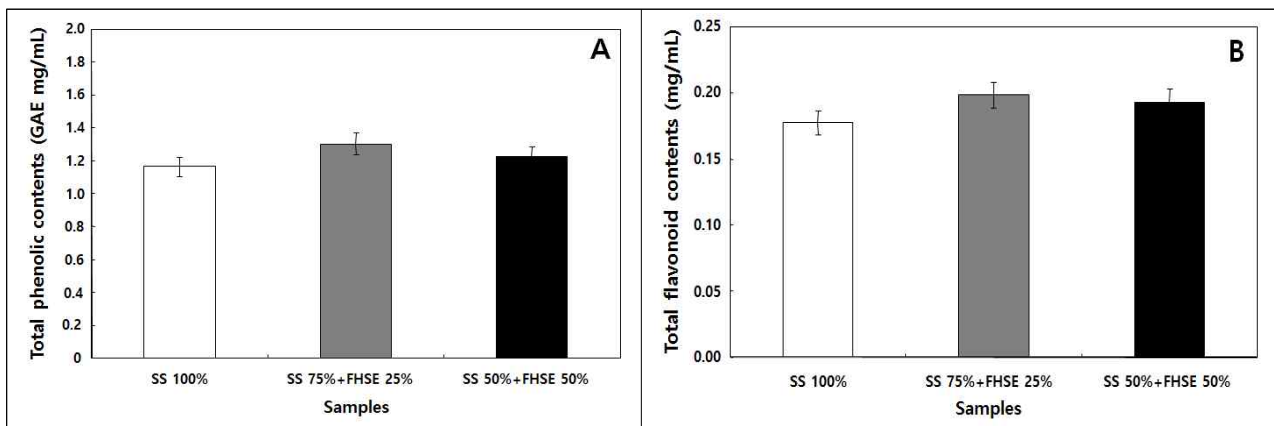


Fig. 1-1-31. Comparison of total phenolics (A) and flavonoids (B) contents in seasoning according to SS (starch syrup) and FHSE (Fermentation of herb sugar-extracts) ratio.

(다) Isoflavone 함량 : 산야초 발효추출물을 첨가하지 않은 대조구의 경우 총 isoflavone 함량은 73.84  $\mu$ g으로 가장 높게 검출되었고 그 뒤를 이어 산야초 발효추출물을 25% 첨가하였을



시 65.84  $\mu\text{g}$ 이 검출되었고 50% 첨가하여 제조한 조미료에서는 64.25  $\mu\text{g}$ 으로 약간 낮은 함유량을 나타내었으나 큰 유의적 차이는 없는 것으로 판단되었다. 한편 비배당체인 daidzein, glycitein, 및 genistein의 함량은 발효추출물의 첨가하지 않은 경우 15.40  $\mu\text{g}$ 이었고, 산야초 발효추출물을 50% 첨가 시 13.94  $\mu\text{g}$ 을 나타내었다. 한편 25% 첨가 시에는 12.71  $\mu\text{g}$ 을 나타내었다(Table 1-1-28).

Table 1-1-28. Comparison of isoflavone contents in seasoning according to SS (starch syrup) and FHSE (Fermentation of herb sugar-extracts) ratio

Contents <sup>1)</sup> ( $\mu\text{g/g}$ )	Concentrations (%)		
	SS 100%	SS 75%+FHSE 25%	SS 50%+FHSE 50%
Glycosides			
1. Daidzin	12.57	11.76	12.85
2. Glycitin	24.35	22.41	19.84
3. Genistin	7.75	6.51	7.62
Total	44.67	40.68	40.30
Malonylglycosides			
4. Daidzin	3.97	3.64	4.48
5. Glycitin	5.36	4.75	0.97
6. Genistin	4.43	4.07	4.44
Total	13.77	12.46	9.89
Aglycones			
10. Daidzein	10.40	8.53	9.51
11. Glycitein	1.59	1.30	1.46
12. Genistein	3.40	2.87	3.08
Total	15.40	12.71	14.06
Total isoflavones	73.84	65.84	64.25

<sup>1)</sup> All values are presented as the mean $\pm$ SD of triplicate determination.

(다) 항산화 활성 : DPPH 라디칼 소거활성 측정 결과 Fig. 1-1-31A와 같았다. 시료 0.5 mg/g 처리 시 96.67~98.80% 수준으로 큰 차이를 보이지 않았지만 98.80%를 나타낸 SS 75%+FHSE 25%가 활성이 가장 높았으며 시료 처리량 0.25 mg/g 처리 시 63.29~70.08% 수준으로 SS 75%+FHSE 25%가 70.08% 활성이 가장 높았다. ABTS 라디칼 소거활성 측정 결과 Fig. 1-1-31B와 같았다. 시료 0.25 mg/g 처리 시 98.30~99.22% 수준으로 유의적인 차이를 보이지 않았지만 99.22%를 나타낸 SS 75%+FHSE 25%가 활성이 가장 높았으며 시료 처리량 0.1 mg/g 처리 시 88.88~89.67% 시료간의 차이가 크지 않았으며 이 중 SS 75%+FHSE 25%가 89.67%로 활성이 가장 높았다.  $\cdot\text{OH}$  라디칼 소거활성 측정 결과 Fig. 1-1-31C와 같았다. 시료 1 mg/g 처리 시 92.18~93.22% 수준으로 큰 차이를 보이지 않았지만 94.11%를 나타낸 SS 75%+FHSE 25%가 활성이 가장 높았으며, 시료 처리량 0.5 mg/g 처리 시 82.33~84.61% 시료간의 차이가 크지 않았으며 이 중 SS 75%+FHSE 25%가 84.61%로 활성이 가장 높았다.

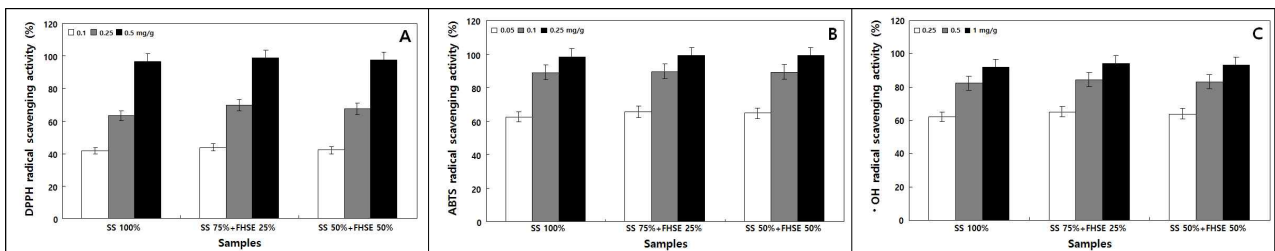


Fig. 1-1-31. Comparison of DPPH (A), ABTS (B), and  $\cdot\text{OH}$  (C) radical scavenging activity and FRAP (D) assay in seasoning according to SS (starch syrup) and FHSE (Fermentation of herb sugar-extracts) ratio.

## 사. 약용작물 함유 청국장 브라운소스 및 조미료의 관능평가

### (1) 약용작물 함유 청국장 브라운소스 및 조미료의 관능평가

(가) 브라운소스에 대한 관능평가 : 약용작물의 첨가량이 증가함에 따라 청국장 향에 대한 인식이 감소하였으나 감칠맛(savory taste)에 대한 감각은 다소 낮게 인식되었다. 단맛은 약용식물 10%에서 가장 우수하다고 평가되었고, 쓴맛은 약용식물의 첨가량이 가장 높은 20%에서 가장 높게 나타났다.

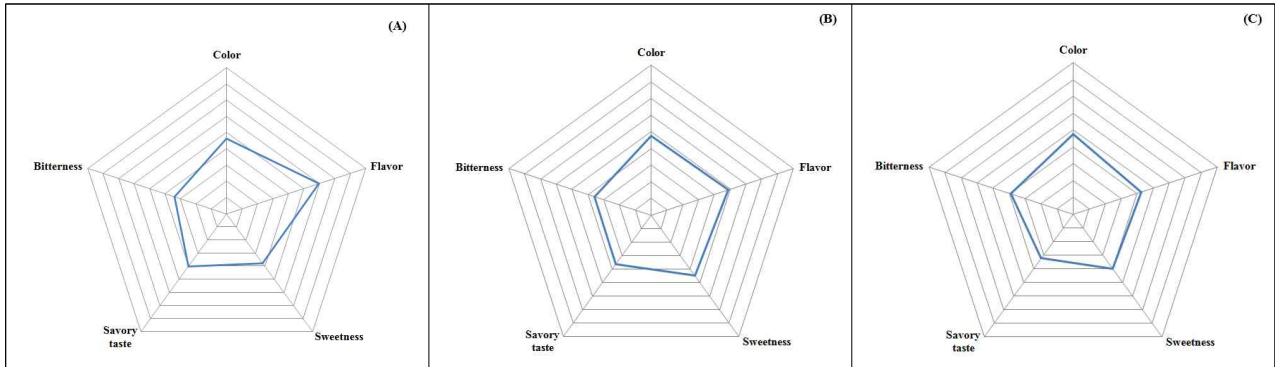


Fig. 1-1-32. Sensory characteristics in brown sauce with medicinal herbs. (A) 0% medicinal herbs, (B) 10% medicinal herbs, and (C) 20% medicinal herbs, respectively.

(나) 조미료에 대한 관능평가 : 약초-당추출발효액 무첨가 조미료를 기준으로 약초-당추출발효액의 첨가량을 살펴보았을 때 마리오자임의 첨가에도 색은 오히려 밝게 나타났으며, 단맛과 감칠맛이 오히려 감소하는 효과를 보였다. 50% 마리오자임 첨가에 비해 25% 마리오자임 함유 조미료에서 더욱 높은 감칠맛을 보였고, 단맛과 쓴맛은 50%에서 더욱 높게 인식되었다.

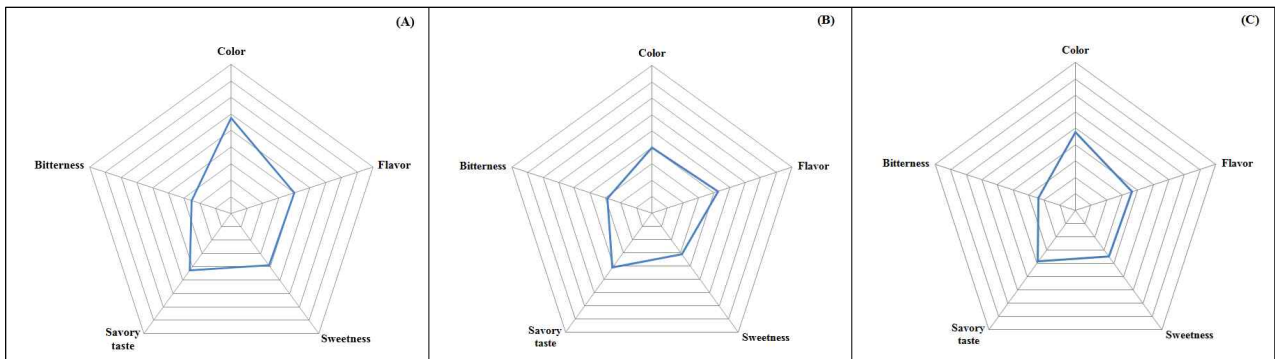


Fig. 1-1-33. Sensory characteristics in seasoning with *mariozyme*. (A) 0% *mariozyme*, (B) 25% *mariozyme*, and (C) 50% *mariozyme*, respectively.

## 아. 6차 산업 육성을 위한 네트워크 구축 및 홍보·마케팅 지원

### (1) 지리산권 약용작물 6차산업화 심포지엄 및 워크숍 개최

(가) 지리산권 약용작물 6차산업화 전략 심포지엄

① 연제 : 지리산권 농업의 새로운 가치창출을 위한 6차 산업화 전략 심포지엄

② 내용 : 농업 6차산업화의 개념과 경남항노화 산업과 6차산업 및 지리산권 6차산업 진행팀의 사례 발표

③ 성과 : 6차산업에 대한 정확한 개념을 파악할 수 있었고 서부경남(지리산권)의 다양한 인프라가 구축의 필요성, 네트워크 구성의 중요성 및 다양한 서부경남 자원을 활용한 6차산업 비즈니스모델 개발이 필요함을 공감

(나) 지리산권 약용작물 6차산업화 생태계 네트워크 구축 워크숍

① 연제 : 지리산권역 6차산업 육성을 위한 네트워크 구성 워크숍

② 강연내용 : 지리산권역 6차산업 비전과 전략, 기업가정산과 지역생태계 등

③ 성과 : 6차산업에 대한 정확한 개념을 파악할 수 있었고 산청관내 한방약초 관련 기업의 지역생태계 구성을 위한 첫 시도

(다) 산청한방약초의 6차산업화 전략과 비전 워크숍

① 연제 : 지리산권역 약용작물의 고부가가치 제품 및 6차 산업화 모델 개발

② 내용 : 농업·농촌 6차산업화 개념과 경남6차산업화센터 소개, 지리산권 약용작물 이용 고부가가치 전략화, 지리산권 약용작물의 보존, 증식 및 판별 기술 등

③ 성과 : 경남6차산업화의 방향과 지원책 분야를 파악할 수 있었고 최근 이슈가된 백수오 등을 비롯한 분쟁 우려 약용작물의 판별 방법과 지리산권 분포 약용작물 중 산업화가 가능한 소재 등을 파악을 있으며, 산청한방약초의 6차산업화 전략과 방향 모색의 시초가 됨

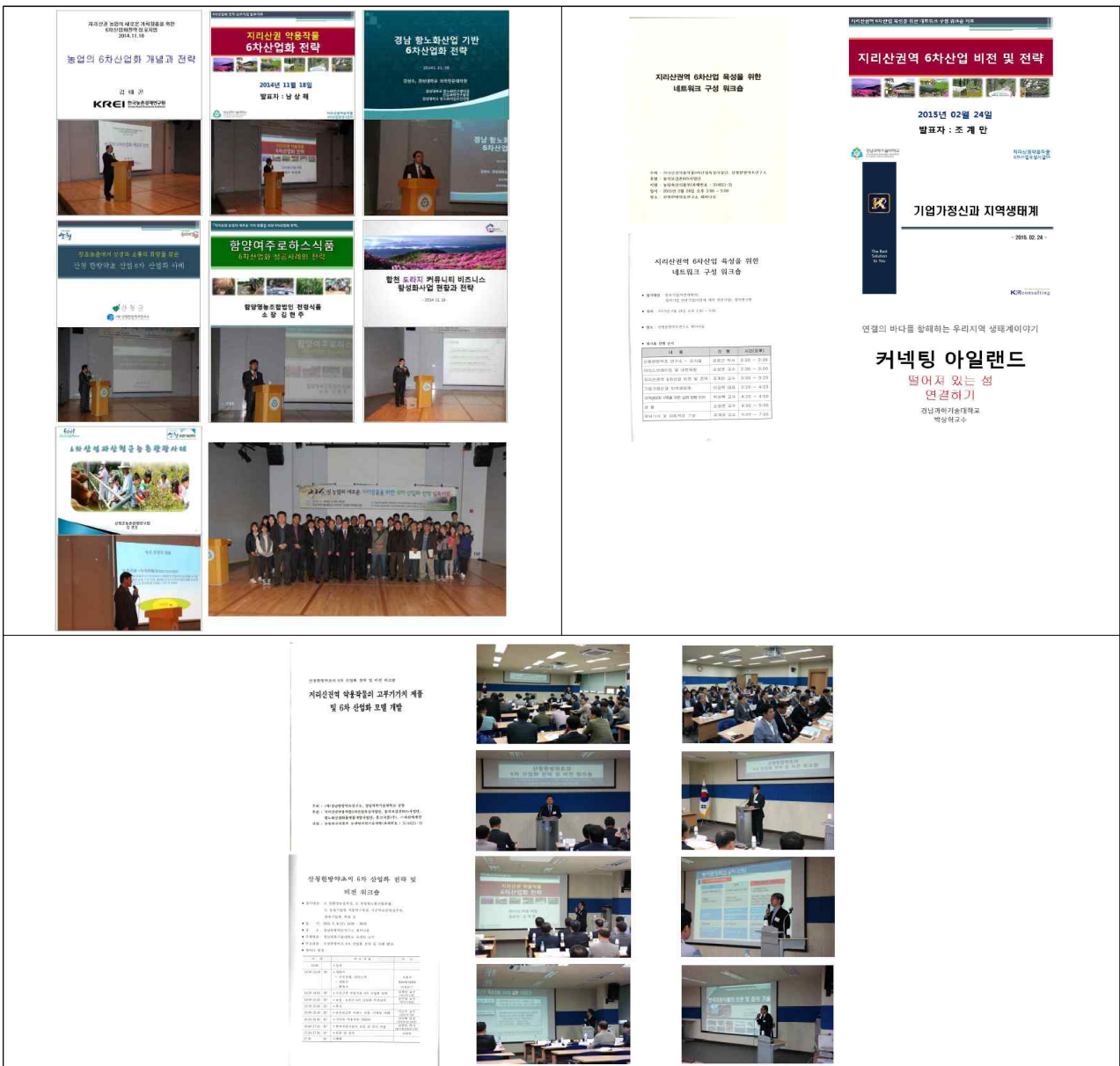


Fig. 1-1-34. 1<sup>st</sup> Symposium of 6<sup>th</sup> Industrialization (2014. 11. 18), 1<sup>st</sup> Workshop of 6<sup>th</sup> Industrialization (2015. 02. 24), and 2<sup>nd</sup> Workshop of 6<sup>th</sup> Industrialization (2015. 05. 08).

**(2) 지리산권 약용작물 6차산업화 홍보 및 전시회**

(가) 홍보 : 사업팀 및 향후 비전 소개

- ① 주간인물 : 2014년 농림축산식품연구개발사업 선정 “경남을 대표하는 스타상품을 기대하다” (2014년 8월)
- ② 이슈메이커 : “스타상품 만들어 농업·농촌 창조경제 실현에 앞장설 것” (2014년 12월)
- ③ 파워코리아 : “약용작물의 6차산업화, 경남대표 ‘스타상품’ 개발에 힘쓸 터” (2015년 5월)

(나) 박람회 기획 및 전시회 참가

- ① 박람회 주제관 기획 및 제품 전시 : 진주 국제농식품박람회
  - ㉞ 주제 : 진주 국제농식품박람회의 6차산업 주제관을 기획 및 제품 전시
  - ㉞ 내용 : 현 정부의 농촌·농업 창조경제인 6차산업을 주제로 6차산업의 일반적인 개념과 서부경남의 명산인 지리산(산청), 덕유산(함양) 및 가야산(합천)의 약용작물 중심으로 6차산업 육성 주제관 기획, 산청군 (주)자연애제약, 함양군 함양영농조합법인 및 합천군 도라지사업단 관련 제품 전시
- ② 박람회 전시 : Feel 경남 특산물 박람회
  - ㉞ 주제 : 2014 Feel 경남 특산물 박람회 제품 전시 및 홍보
  - ㉞ 내용 : 생도라지 및 도라지 가공품 전시 및 홍보, 판매, 도라지차 시음회 진행



Fig. 1-1-35. Participation and exhibition of 2014 Jinju International Agri-Food Expo (2014.11.05.-11.09) and Participation and exhibition of 2014 Gyeongnam feel Specialties Exposition (2014.11.13.-11.16)

**(3) 기타 : 6차산업 및 농·식품 개발 등의 교육, 과제활용 담당관과 과제협의**

(가) 6차산업 및 농·식품 개발 등의 교육

순번	강의 내용	일 시	장 소	교육 대상
1	항노화바이오산업의 기본이해 : 항노화산업과 6차산업	2015년 3월 9일 (월요일)	경상남도 인재개발원	경상남도 도청 및 시/군 지자체 공무원
2	2015 시니어 기술창업스쿨 : 농식품 가공기술 6차산업 창업과정	2015년 5월 18일 (월요일) 2015년 5월 20일 (수요일)	경남과학기술대학교	경남과학기술대학교 시니어창업스쿨 수강생
3	귀농대학 강의 : 6차산업과 농산물 이용 발효식품 제조	2015년 5월 28일 (목요일)	경상대학교	경상대학교 최영농자교육생
4	경남과기대 창업대학원 : 농식품 상품기획 및 개발	2015년 3월 ~ 2015년 6월	경남과학기술대학교	경남과학기술대학교 창업대학원 석사과정 6차산업 전공반

(나) 과제활용 담당관과 과제협의

순번	협의 내용	일 시	장 소	과제활용 담당관
1	제품화를 통한 3년 이내 산업화와 기업과 농가의 이익창출 방향으로 진행	2015년 4월 28일 (수요일)	농림축산식품부 (세종시)	농림축산식품부 남동일

**2-1. 2차년도 연구수행 방법**

**가. 약용작물의 기능성 차 제조를 위한 볶음처리 조건 확립**

(1) 재료

본 실험에 사용한 당귀(*Angelica gigas*), 도라지(*Platycodon grandiflorum*), 및 백수오(*Cynanchum wilfordii*)는 건조상태로 경남생약협동조합으로부터 제공받아 사용하였다. 한방약용작물의 추출 용매로는 발효주정을 사용하였다. 시약과 기기는 1차년도와 동일하였다.

(2) 약용작물(당귀, 도라지, 백수오) 볶음처리

(가) 최적 볶음처리 조건 선정 : 볶음처리를 위해 우선 당귀, 도라지, 및 백수오를 세절기를 이용하여 적당한 크기와 모양으로 세절하였다. 이 후 각각의 약용작물인 당귀, 도라지, 및 백수오 50 g씩 선별하여 150℃에서 10분과 20분 간격으로 볶음처리 하였고 같은 방법으로 200℃에서 10분과 20분씩 볶음 처리를 한 후 실험을 진행하였다(Fig. 1).

(나) 생리활성물질 분석 :

(1) 추출물 제조 : 약용작물 볶음처리 조건별 분말 10 g에 70% 발효주정을 200 mL씩 가하여 40℃에서 4시간 동안 600 rpm 속도를 유지하여 추출한 후 동일한 조건으로 2회 반복 추출하여 모은 후 여과지(No. 2, Whatman, Tokyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)로 여과하여 모은 후 여과액을 감압농축기(EYELA, Tokyo, Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 60℃에서 감압 농축하여 추출물을 얻었다.

(2) 총 phenolics, phenolic acids 및 flavonols 함량 분석 : 1차년도에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

(다) *In vitro* 상에서 생리활성 검정

① 라디칼 소거활성 및 소화효소 저해활성 측정 : 1차년도에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

② 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 처리에 따른 DNA 보호효과 : TE buffer(10 mM Tris-Cl and 1 mM EDTA)를 이용하여 분리한 플라스미드 DNA 0.5 μL와 추출물 10 μL를 혼합한 후 20 μL Fenton's 시약(100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.1 mM acetic acid and 1.6 mM FeCl<sub>3</sub>)을 첨가하여 혼합한다. 이후 30°C에서 1시간 반응시켰다. 이때 음성 대조구는 DNA 2 μL에 D.W 20 μL를, 양성 대조구는 DNA 2 μL에 시료추출용매 10 μL를 혼합하여 Fenton's 시약 10 μL 첨가하였고 실험구는 DNA 20 μL에 시료 10 μL 혼합액에 Fenton's 시약 10 μL 첨가하여 사용하였다. 이 반응물에 loading dye 10 μL를 첨가하여 단단히 굳힌 1% 아가로오스에 최종 20 μL를, size mark는 4 uL를 로딩하여 50 V에서 1시간 20분간 전기영동 하여 DNA 밴드를 확인하였다.

## 나. 진균류 이용 활성글루텐 발효물 및 이를 이용한 약초조미료 제조

### (1) 재료

본 실험에 사용한 활성글루텐과 천일염은 시중에서 구입하였으며 다래는 경남 사천 소재 영농조합법인 오름주사에서 필요에 따라 제공받아 사용하였다. 한편 조미료 제조를 위한 재료인 무, 마늘, 양파 및 사과는 대형마트에서 구입하여 사용하였고, 간장과 물엿은 참여기업은 몽고식품(주)에서 공급받아 사용하였다.

### (2) 활성글루텐 가수분해 발효물의 특성 분석

(가) 활성글루텐 가수분해물 제조 및 발효 :

① 가수분해물 제조 : 활성글루텐 400 g에 15% 염수 1,600 mL을 가하여 수화시킨 후 키워 과즙을 100 mL(5%, v/v) 첨가하여 40°C에서 24시간 반응시켜 가수분해물을 제조하고 120°C에서 15분간 살균하여 균사체 발효를 위한 활성글루텐 가수분해물을 준비하였다.

② 종균배양 및 발효 : 본 실험에 사용한 진균류는 *Asperigillus oryzae*, *Rhizopus oryzae*, *Tricholoma matsutake*(송이버섯 균사체) 및 *Polyozellus multiplex*(까지버섯 균사체) 한 plate를 10% 쌀-액체배지 100 mL에 접종하여 25°C에서 5일간 배양하여 종균을 준비하였다. 미리 준비한 활성글루텐 가수분해물에 종균배양액을 5%(v/v) 접종하여 60일간 발효하면서 10일마다 시료를 채취하여 일부는 이화학적 특성 분석에 사용하였고, 일부 동결하여 보관하였다.

(나) 이화학적 특성 및 유리아미노산 분석 : 1차년도에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

(다) 생리활성 분석 : 1차년도에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

### (3) 약용작물 추출물 첨가 활성글루텐 가수분해 발효물의 천연조미료 제조

(가) 조미료 제조 :

① 청국장 스탁 제조 : 청국장 스탁의 제조는 2TDJ15 균주를 이용하여 제조한 각각의 건조 청국장 1 kg에 대하여 3 L의 물을 가하여 100°C에서 끓을 때까지 열을 가하였다. 한번 끓은 후에는 중불로 낮추어 1시간동안 저어가며 열수추출을 진행하였다. 이후에 다시 동등한 양의 물을 첨가하여 1시간동안 저어가며 열수추출을 진행하였고 마지막에는 2 L의 물을 가하여 상기 방법과 동일하게 진행하였으며 최종 4 L가 되게끔 정수기 물로 정용하여 제조를 완료하였다.

② 조미료 제조 : 청국장 스탁, 물, 몽고간장, 물엿을 아래의 조건과 같이 동량 넣고 이에 무, 양파, 마늘 및 사과를 혼합하고 분쇄한 후 첨가하고 최종적으로 활성글루텐 발효물을 각각 달리하여 마지막으로 넣어준 후 강불에서 끓고 난 후 약불에서 30분간 저어주면서 끓였다. 이후 식혀 치즈크로스로 고형분을 걸러준 후 여기에 약용작물 복합추출물(가용성고형분 함량: 3 °brix)을 10% 첨가하여 조미료를 제조하였다.

- (나) 이화학적 특성 및 유리아미노산 분석 : 1차년도에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.
- (다) 생리활성 분석 : 1차년도에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.
- (라) 생리활성물질 분석 : 1차년도에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

#### 다. 송이균사체 이용 콩발효물 및 이를 이용한 식물성 자연조미료 제조

##### (1) 재료

본 실험에 사용한 콩은 2015년 함양군에서 직접 재배한 우람콩을 사용하였고, 새싹삼은 약 30일간 재배된 것을 사천시 소재 (유.농)드림팜에 공급받아 사용하였다.

##### (2) 송이균사체 콩발효물의 특성 분석

(가) 콩발효물 발효 : 우람콩을 수세한 후 12시간 수침하고 물기를 제거한 후 폴리에틸렌 용기에 각각 1,000 g씩 담아 120℃에서 30분간 증자한 후 30±1℃로 냉각시켜 종균 배양한 송이버섯균사체 배양액을 5% (v/w)접종하였다. 콩 고체발효는 25℃에서 8일간 발효를 시켜 50℃에서 건조한 후 분쇄하여 분말로 제조하여 사용하였다.

(나) 유효성분 및 생리활성 분석 : 1차년도에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

##### (3) 새싹삼 물김치 제조

(가) 물김치 발효 : 물 4L에 밀가루 50 g을 첨가하여 100℃에서 5분간 끓여지며 밀가루를 풀어준 뒤 상온에서 식힌다. 열무와 새싹삼을 각각 4시간동안 10%의 소금물에 침지한다. 열무와 새싹삼을 2번 씻어 낸 후 1시간 동안 탈수한다. 소금과 설탕(50g), 마늘, 양파(50g), 생강, 배(25g)씩 첨가하고 절인 열무와 새싹삼을 넣은 후 밀가루 풀을 넣는다. 제조된 새싹삼물김치는 25도에서 하루 숙성시킨 후 냉장보관(8도)한다.

(나) 유효성분 및 생리활성 분석 : 1차년도에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

##### (4) 콩발효물과 물김치 이용 식물성 자연조미료 제조

(가) 조미료 제조 :

① 콩발효물 스탁 제조 : 콩발효물 스탁의 제조는 송이균사체를 이용하여 제조한 콩발효물 1 kg에 대하여 3 L의 물을 가하여 100℃에서 끓을 때까지 열을 가하였다. 이후 과정은 청국장 스탁 제조과정과 동일하게 수행하였다. 대조구로 증자콩분말로 동일하게 제조하였다.

② 조미료 제조 : 콩발효물 스탁, 물, 콩고간장, 물엿을 아래의 조건과 같이 동량 넣고 이에 무, 양파, 마늘 및 사과를 혼합하고 분쇄한 후 첨가하고 최종적으로 새싹삼 물김치를 넣어준 후 강불에서 끓고 난 후 약불에서 30분간 저어주면서 끓였다.

(나) 이화학적 특성 및 유리아미노산 분석 : 1차년도에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

(다) 생리활성 분석 : 1차년도에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

## 2-2. 2차년도 연구결과

### 가. 약용작물의 기능성 차 제조를 위한 볶음처리 조건 확립 결과 및 고찰

#### (1) 당귀의 볶음처리에 따른 특성

(가) 총 phenolics, 총 flavonoids 및 갈변도 :

① 총 phenolics 함량 : 당귀를 볶음처리 하지 않은 원료의 경우에는 12.72 mg/g 이었고 150℃에서 10분과 20분 볶음처리의 경우 각각 13.57와 13.73 mg/g이었다. 200℃의 경우에는 10

분 볶음처리 시 13.75 mg/g이었고, 20분 처리 시에는 13.79 mg/g으로 수치상으로 가장 높았으나 이들의 차이는 거의 없었다.

② 총 flavonoids 함량 : 당귀를 볶음처리 하지 않은 원료의 경우에는 0.63 mg/g 이었고 볶음 온도와 시간이 증가할수록 총 flavonoids 함량이 증가하여 200°C-20 min에서 약 2배 증가한 1.35 mg/g 있었다.

③ 갈변도 : 당귀의 갈변도는 온도와 시간이 높은 200°C-20분 처리 시 가장 갈변도 값이 높았다. 이는 100°C 이상의 고온에 의한 마이알 반응 결과로 판단되었다.

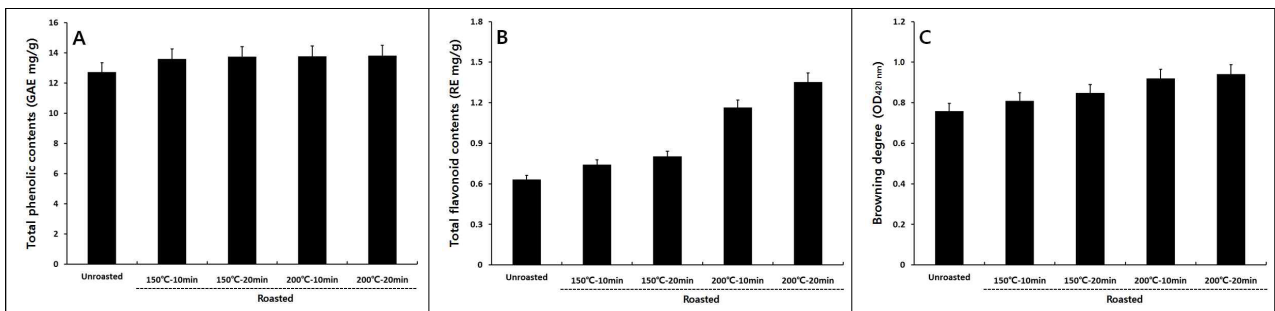


Fig. 1-2-1. Comparison of total phenolic (A) and flavonoid (B) contents and browning degree (C) by *Angelica gigas* of according to roasting.

(나) Phenolic acids 및 flavonoids 구성 화합물 :

① Phenolic acids 함량 : 볶음처리에 따른 당귀 추출물의 총 phenolic acids 함량은 Table 1-2-1과 같았다. 볶음처리를 하지 않은 원료와 비교 하였을 시 볶음 온도가 높을수록 chlorogenic acid, vanilic acid, ferulic acid 함량이 증가하는 것으로 나타났다.

② Flavonols 함량 : Flavonoids 함량 역시 phenolic acids와 유사한 것으로 나타났다(Table 1-2-2). 즉, 볶음 온도가 높을수록 flavanol 함량은 증가하였다. 220°C 에서 20분 볶음 처리를 한 경우 epigallocatechin은 7.68  $\mu$ g/g, rutin은 8.32  $\mu$ g/g, naringenin은 11.75  $\mu$ g/g으로 증가하였다. 한편 총 flavanol 함량 역시 220°C 에서 20분 볶음 처리 한 경우 35.28  $\mu$ g/g으로 가장 높은 것으로 나타났다.

Table 1-2-1. Phenolic acid contents of *Angelica gigas* Nakai roasted

Contents ( $\mu$ g/g) <sup>2)</sup>	Unroasted	Roasted			
		150-10	150-20	200-10	200-20
Gallic acid	nd	nd	nd	nd	nd
Protocatechuic acid	tr	tr	tr	nd	nd
Chlorogenic acid	149.10	320.08	466.73	464.29	531.97
<i>p</i> -Hydrobenzoic acid	nd	nd	nd	nd	nd
Vanilic acid	97.94	67.16	94.22	230.44	162.70
<i>p</i> -Coumaric acid	nd	nd	nd	nd	nd
Ferulic acid	454.78	391.98	510.71	590.04	724.74
Venturic acid	nd	nd	nd	nd	nd
<i>trans</i> -Cinnamic acid	6.04	4.42	5.66	4.45	5.85
Total	707.86	783.64	1,077.32	1,289.22	1,425.26

<sup>1)</sup>Samples were roasted to temperature (°C) and time (min). <sup>2)</sup>Value indicated the mean's of three replication (n=3). <sup>3)</sup>nd: not detected. <sup>4)</sup>tr: trace(< 0.002  $\mu$ g/g).



Table 1-2-2. Flavonoid contents of *Angelica gigas* Nakai roasted

Contents ( $\mu\text{g/g}$ ) <sup>2)</sup>	Unroasted	Roasted			
		150-10	150-20	200-10	200-20
Epigallocatechin	7.07	7.64	7.44	7.42	7.68
Catechin	nd	nd	nd	nd	nd
Epicatechin	nd	nd	nd	nd	nd
Epigallocatechin gallate	nd	nd	nd	nd	nd
Vanilin	nd	nd	nd	nd	nd
Rutin	7.01	7.32	7.56	8.12	8.32
Catechin gallate	nd	nd	nd	nd	nd
Naringin	5.06	5.27	5.16	5.24	5.24
Quercetin	nd	nd	nd	nd	nd
Naringenin	8.82	11.38	11.31	11.62	11.75
Formonoetin	2.24	2.23	2.52	2.26	2.29
Total	31.7	33.84	33.99	34.66	35.28

<sup>1)</sup>Samples were roasted to temperature (°C) and time (min). <sup>2)</sup>Value indicated the mean's of three replication (n=3). <sup>3)</sup>nd: not detected.

(다) 라디칼 소거능 및 환원력 측정 :

① DPPH : 원료 당귀에 비해서 볶음 온도와 시간이 증가할수록 활성이 약간씩 증가하는 경향을 나타내었으나, 커다란 차이는 없었다(Fig. 1-2-2A).

② ABTS : 농도 증가에 따른 라디칼 소거능 증가와 더불어 볶음 온도와 시간에 따른 차이가 있었으나 큰 차이는 없었다. 한편 이들의 ABTS 라디칼 소거능은 1 mg/g 농도 처리 시 평균 79.02%로 비교적 우수하였다(Fig. 1-2-2B).

③ Hydroxyl :  $\cdot\text{OH}$  라디칼 소거능의 결과에서는 다른 두 라디칼 기작과는 다르게 농도 의존형으로 라디칼 소거능이 증가하는 했지만 다소 낮은 경향으로 측정되었다. 특히 0.25 및 0.50 mg/g의 이 두 농도에서는 차이가 없었고 1.0 mg/g 농도에서만 라디칼 소거능이 비교적 우수한 것으로 측정되었다(Fig. 1-2-2C).

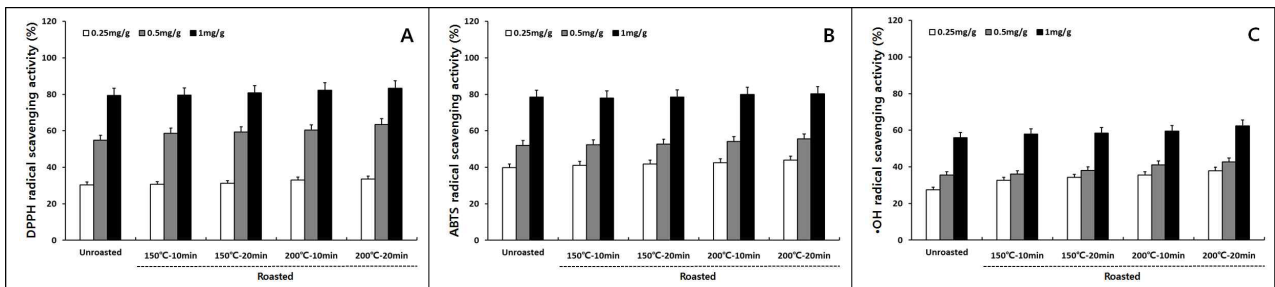


Fig. 1-2-2. Comparison of antioxidant activity by *Angelica gigas* of according to roasting. A; DPPH, B; ABTS, C; and  $\cdot\text{OH}$  radical scavenging activity.

(라) 탄수화물 및 지방분해 효소 저해능 측정 :

①  $\alpha$ -Amylase 저해능 : 활성은 Fig. 4A에 나타내었으며 이 또한 원료 추출물에 비해 점진적으로 증가하였고 최종 200°C-20분 볶음처리한 추출물이 우수하였다. 하지만 이들 간의 큰 차이는 보이지 않는 것으로 최종 판단하였다(Fig. 1-2-3A).

②  $\alpha$ -Glucosidase 저해능 : 라디칼 소거능과는 다르게 볶음 온도와 시간에 따라 점차적으로 증가하는 추세로 나타났고 200°C에서 20분 볶음처리 한 당귀 추출물이 가장 우수하였다 (Fig. ?A). 특히 0.25 mg/g에서는 10.86%, 0.50 mg/g에서는 18.91%, 1.0 mg/g의 경우에는 36.00%를 나타내어 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 1-2-3B).

③ **췌장- lipase 저해능** : 저농도에서 고농도에 이르기까지 농도 의존적 분해효소 저해능을 보인  $\alpha$ -glucosidase 및  $\alpha$ -amylase 저해능과는 달리 0.25 mg/g과 0.50 mg/g에서는 거의 유사한 저해능을 나타내었고 오직 1.0 mg/g의 농도 처리 시에만 분해효소 저해능의 차이를 보였고 200°C-20분 볶음처리 한 추출물이 26.05%로 가장 우수하였다(Fig. 1-2-3C).

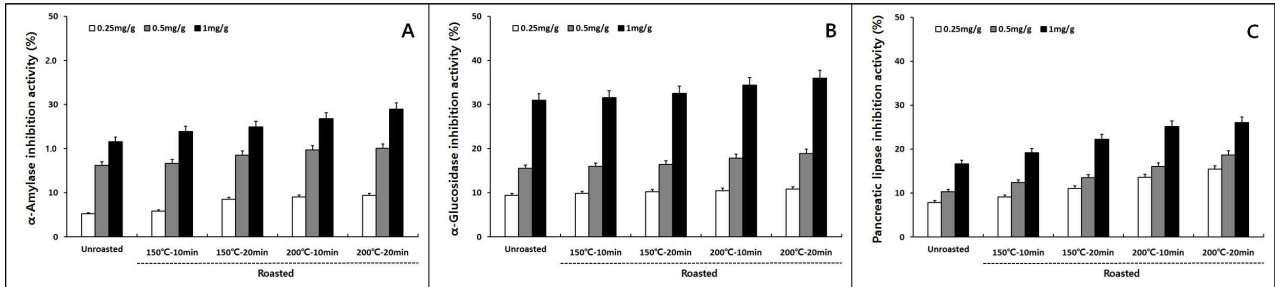


Fig. 1-2-3. Comparison of hydrolysis enzyme inhibition activity by *Angelica gigas* according to roasting. A;  $\alpha$ -glucosidase B;  $\alpha$ -amylase, and C; pancreatic lipase inhibition activity.

(마) 볶음처리에 따른 당귀 추출물의 DNA 보호효과 확인 : 당귀 및 볶음 처리별 당귀 추출물의 과산화수소 처리 즉 산화적 처리에 대한 DNA 보호효과가 전혀 나타나지 않았다.

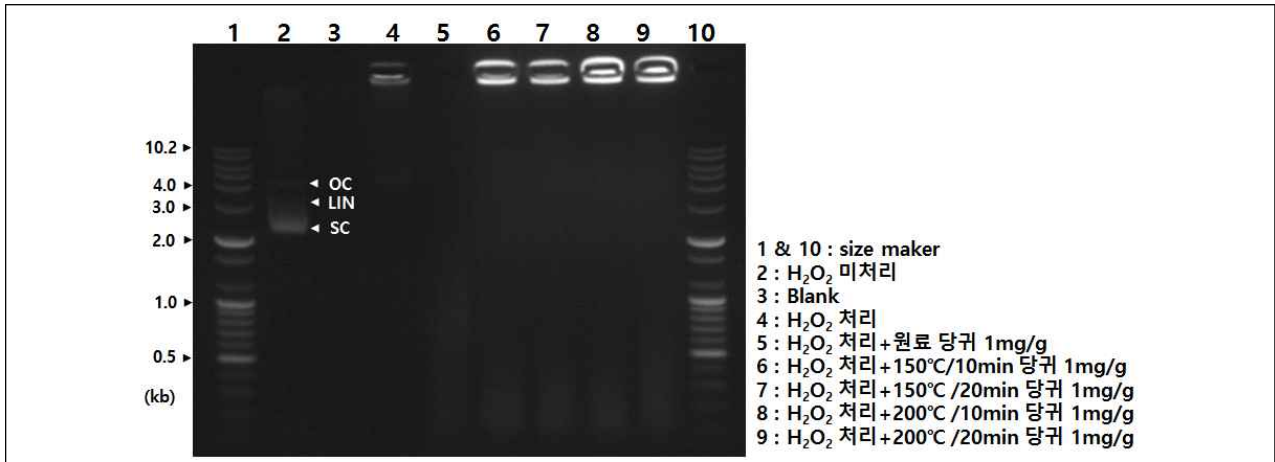


Fig. 1-2-4. Agarose gel electrophoresis of damaged DNA induced by the oxidative effect of *Angelica gigas* according to roasting.

## (2) 도라지의 볶음처리에 따른 특성

(가) 총 phenolics, 총 flavonoids 및 갈변도 :

① **총 phenolics** : 도라지를 볶음처리 하여 측정된 결과와 동일한 양상을 나타내었는데, 즉 볶음 온도와 시간에 따른 차이는 크게 나타나지 않았다. 하지만 볶음처리 하지 않은 도라지 (12.71 mg/g)에 비해서는 온도와 시간 증가에 따른 약간의 증가가 있었고 200°C에서 20분 볶음 처리한 경우 14.01 mg/g으로 가장 높게 측정되었다(Fig. 1-2-5A).

② **총 flavonoids** : 총 phenolics 함량과 마찬가지로 볶음 온도와 시간이 증가할수록 그 함량 차이가 확실히 있는 것으로 측정되었다. 즉, 원료인 도라지에서는 0.46 mg/g, 150°C-10분 처리 시 0.56 mg/g, 150°C-20분 처리 시 0.65 mg/g, 200°C-10분 처리 시 0.97 mg/g이었으며, 200°C-20분 처리 시에는 1.17 mg/g으로 열처리에 의한 총 flavonoids 함량 증가가 명확히 나타났다(Fig. 1-2-5B).

③ **갈변도** : 갈변 변화를 측정된 결과 원료 도라지에 비해 온도와 시간이 증가할수록 갈변 역시 비례하게 일어났는데 이는 마이알 반응에 의한 것으로 판단하였다(Fig. 1-2-5C).

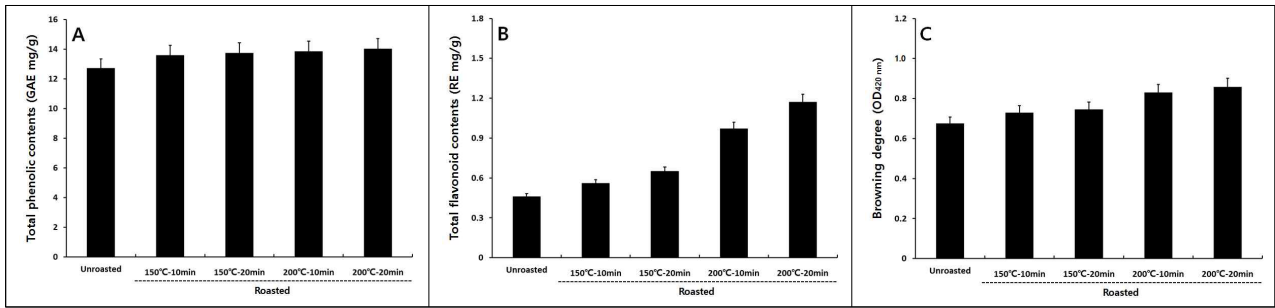


Fig. 1-2-5. Comparison of total phenolic and flavonoid contents and browning degree by *platycodon grandiflorum* of according to roasting. A; total phenolics, B; total flavonoid contents and C; browning degree.

(나) Phenolic acids 및 flavonoids 구성 화합물 :

① Phenolic acids 함량 : 도라지의 주요 phenolic acids는 chlorogenic acid인 것으로 나타났다. 볶음처리를 하지 않은 원료 도라지는 458.09  $\mu\text{g/g}$ 이었으나 볶음 처리 중에 조금씩 증가하였으며 220°C에서 20분 볶은 결과 668.13  $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 많이 증가하였다(Table 1-2-3).

② Flavonoids 함량 : flavanol 함량은 결과적으로 원료 도라지와 볶음 도라지에서 거의 없는 것으로 나타났다(Table 1-2-3). 이들 중 주요 flavanol은 catechin이었고 phenolic acids 결과와 유사하게 볶음 온도와 시간이 높을수록 증가하였다. 한편 총 flavanol 함량은 200°C 20분의 경우 3.71  $\mu\text{g/g}$ 이었다.

Table 1-2-3. Phenolic acid contents of *Platycodon grandiflorum* roasted

Contents ( $\mu\text{g/g}$ ) <sup>2)</sup>	Unroasted	Roasted			
		150-10	150-20	200-10	200-20
Gallic acid	nd	nd	nd	nd	nd
Protocatechuic acid	17.19	40.02	38.94	55.46	60.11
Chlorogenic acid	458.09	519.42	532.57	647.16	668.13
<i>p</i> -Hydrobenzoic acid	nd	nd	nd	nd	nd
Vanilic acid	31.12	33.38	30.18	51.40	63.29
<i>p</i> -Coumaric acid	nd	nd	nd	nd	nd
Ferulic acid	nd	nd	nd	nd	nd
Ventaric acid	nd	nd	nd	nd	nd
<i>trans</i> -Cinnamic acid	4.13	4.51	4.80	7.05	7.63
Total	510.53	597.33	606.49	761.07	799.16
Epigallocatechin	nd	nd	nd	nd	nd
Catechin	1.89	2.17	3.02	3.00	3.22
Epicatechin	nd	nd	nd	nd	nd
Epigallocatechin gallate	0.44	0.27	0.27	0.28	0.22
Vanilin	nd	nd	nd	nd	nd
Rutin	0.03	nd	nd	nd	nd
Catechin gallate	0.20	0.25	0.22	0.26	0.21
Naringin	0.01	0.03	0.02	nd	nd
Quercetin	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Naringenin	0.04	0.05	0.04	0.03	0.02
Formonoetin	0.04	nd	nd	0.03	0.03
Total	2.66	2.78	3.58	3.61	3.71

<sup>1)</sup>Samples were roasted to temperature (°C) and time (min). <sup>2)</sup>Value indicated the mean's of three replication (n=3). <sup>3)</sup>nd: not detected.

(다) 라디칼 소거능 및 환원력 측정 :

① DPPH : DPPH 라디칼 소거능의 경우에 1 mg/g 처리 시에 평균 78.01%의 우수한 소거능을 나타내었다(Fig. 1-2-6A). 한편 볶음 온도와 시간에 따른 변화는 조금씩 있었으나 큰 차이는 없었다.

② ABTS : ABTS 결과 역시 DPPH와 아주 유사한 경향을 나타내었다(Fig. 1-2-6B).

③ Hydroxyl : •OH 라디칼 소거능의 경우에는 DPPH 및 ABTS와 전체적인 경향은 비슷하게 측정되었으나 다소 낮은 소거능을 보였고 저농도 즉 2.5 및 5.0 mg/g 농도 처리 시에는 대부분 29% 내외의 낮은 소거능을 보인 반면 오직 1.0 mg/g 농도 처리 시에서만 52% 내외의 라디칼 소거능이 있음으로 결과가 나타났다(Fig. 1-2-6C).

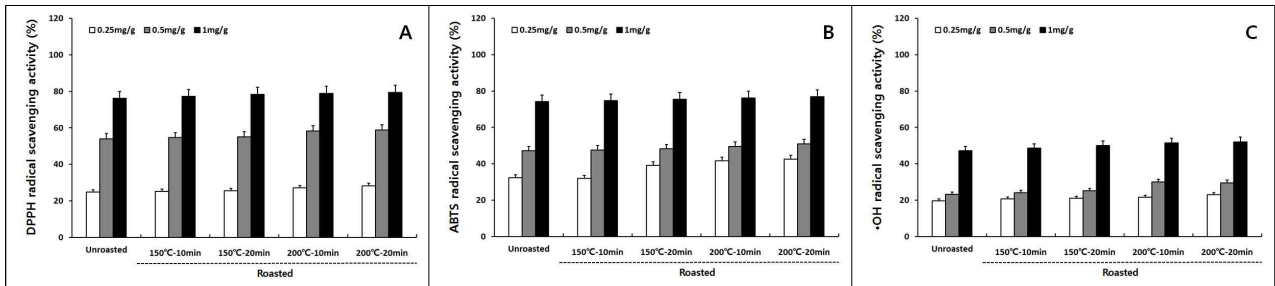


Fig. 1-2-6. Comparison of antioxidant activity by *platycodon grandiflorum* of according to roasting. A; DPPH, B; ABTS, C; and •OH radical scavenging activity.

(라) 탄수화물 및 지방분해 효소 저해능 측정 :

①  $\alpha$ -Amylase 저해능 :  $\alpha$ -amylase 저해활성은 200°C-20분 처리 시 동일한 농도에서 23.89%로  $\alpha$ -glucosidase보다는 조금 못 미치는 수준이었다(1-2-7A).

②  $\alpha$ -Glucosidase 저해능 :  $\alpha$ -glucosidase 저해활성 측정에서 가장 높은 효소 저해능이 나타났으며, 200°C-20분 볶음 처리와 1 mg/g 농도 처리 시 31.04%로 가장 높은 것으로 나타났다(1-2-7B).

③ 췌장-lipase 저해능 : 지방 분해효소 저해능 측정에서는 2.5 및 5.0 mg/g의 농도에서는 저해능이 매우 미약한 수준이었고 1.0 mg/g 농도에서는 200°C-20분 처리 시 최종 18.82%를 나타내었다(1-2-7C).

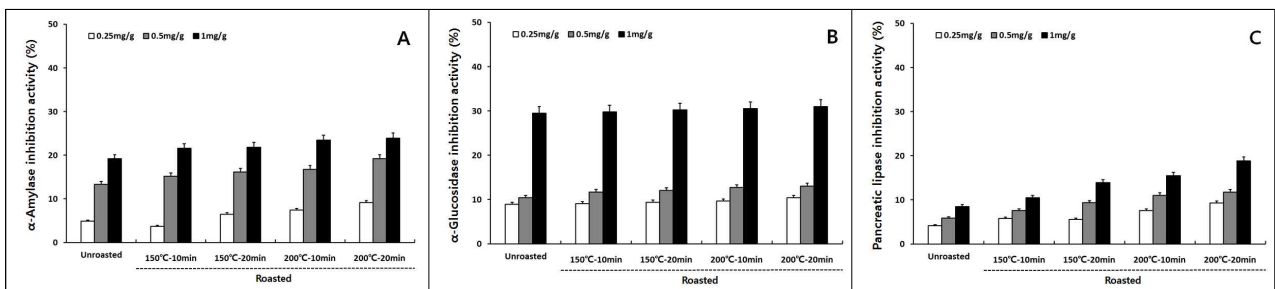


Fig. 1-2-7. Comparison of hydrolysis enzyme inhibition activity by *Platycodon grandiflorum* of according to roasting. A;  $\alpha$ -glucosidase B;  $\alpha$ -amylase, and C; pancreatic lipase inhibition activity.

(마) 볶음처리에 따른 도라지 추출물의 DNA 보호효과 확인 :

도라지 및 볶음 처리별 도라지 추출물의 과산화수소 처리 즉 산화적 처리에 대한 DNA 보호효과는 관찰되었으며, 전기영동 패턴 결과를 살펴본 결과 150°C-10분 처리 시에는 도라지 추출물보다 DNA 보호효과 약간 낮았으나, 그 외 처리구에서는 높은 DNA 보호효과를 나타내었다(Fig. 1-2-8).

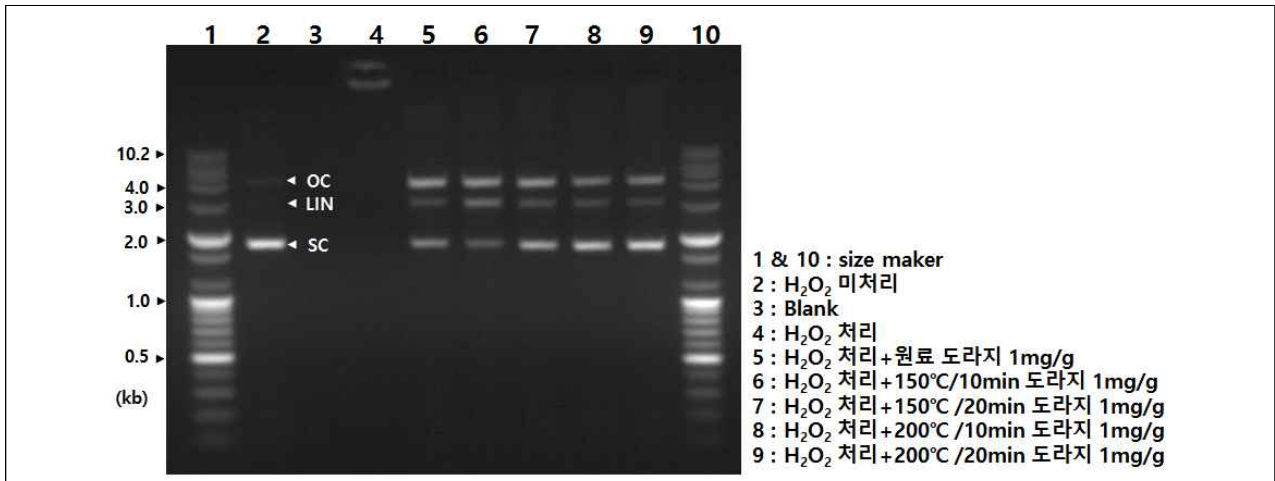


Fig. 1-2-8. Agarose gel electrophoresis of damaged DNA induced the productive effect of *Platycodon grandiflorum* of according to roasting.

(3) 백수오의 볶음처리에 따른 특성

(가) 총 phenolics, 총 flavonoids 및 갈변도 :

① 총 phenolics : 총 phenolics 함량은 13.91 mg/g(건도라지) → 14.57 mg/g(200°C-20분)로 약간 증가하였다(Fig. 10A).

② 총 flavonoids : 총 flavonoids 함량 역시 1.56 mg/g(건도라지) → 1.64 mg/g(200°C-20분)로 약간 증가하였다(Fig. 10B).

③ 갈변도 : 갈변도는 당귀 및 도라지와 같은 양상으로 고온에 의한 갈변변화를 관찰할 수 있었다(Fig. 10C).

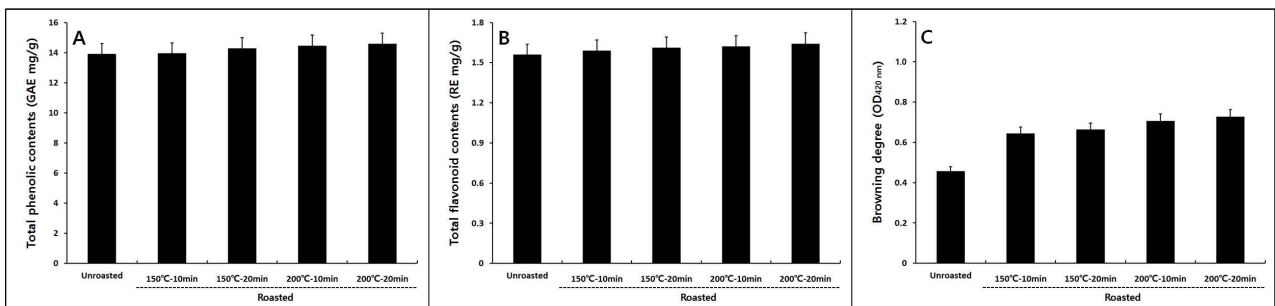


Fig. 3-2-7. Comparison of total phenolic and flavonoid contents and browning degree by *Cynanchum wilfordii* of according to roasting. A; total phenolics, B; total flavonoid contents and C; browning degree.

(나) Phenolic acids 및 flavonoids 구성 화합물 :

① Phenolic acids 함량 : 당귀와 도라지와는 달리 백수오의 경우에는 대부분의 phenolic acid 화합물들이 검출되었다(Table 1-2-4). 가장 높은 함량을 보인 화합물은 chlorogenic acid 였으며 볶음 처리를 하지 않은 백수오에서는 155.39 μg/g이었으나 220°C 20분 볶음 처리 시 604.49 μg/g으로 크게 증가하였다. 한편 공통적으로 gallic acid, *p*-Hydrobenzoic acid *p*-coumaric acid, ventaric acid는 검출되지 않았다.

② Flavonoids 함량 : Flavonol 화합물은 공통적으로 rutin 화합물이 검출되지 않았으며 전체적으로 미량인 것으로 나타났다. 하지만 phenolic acids와 같이 볶음 온도와 처리시간이 높을 수록 flavonol 화합물 역시 서서히 증가하였다(Table 1-2-4).

Table 1-2-4. Phenolic acid contents of *Cynanchi Wilfordii Radix* (KHP) roasted

Contents ( $\mu\text{g/g}$ ) <sup>2)</sup>	Unroasted	Roasted			
		150-10	150-20	200-10	200-20
Gallic acid	nd	nd	nd	nd	nd
Protocatechuic acid	18.74	13.74	27.53	59.95	79.48
Chlorogenic acid	155.39	224.91	209.70	435.52	604.49
<i>p</i> -Hydrobenzoic acid	nd	nd	nd	nd	nd
Vanilic acid	75.34	60.43	94.58	123.53	122.89
<i>p</i> -Coumaric acid	nd	nd	nd	nd	nd
Ferulic acid	121.07	110.78	133.69	149.17	173.87
Venturic acid	nd	nd	nd	nd	nd
<i>trans</i> -Cinnamic acid	11.26	9.53	12.73	14.66	16.60
Total	381.8	419.39	478.23	782.83	997.33
Epigallocatechin	0.31	0.33	0.48	0.64	0.68
Catechin	0.23	0.36	0.35	0.34	0.44
Epicatechin	0.02	0.06	0.11	0.08	0.07
Epigallocatechin gallate	0.01	0.03	0.02	0.03	0.09
Vanillin	nd	nd	nd	0.06	0.05
Rutin	nd	nd	nd	nd	nd
Catechin gallate	0.04	nd	nd	nd	nd
Naringin	0.01	0.03	0.01	0.01	0.04
Quercetin	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Naringenin	0.12	0.16	0.19	0.19	0.17
Formonoetin	0.03	0.03	0.02	0.02	nd
Total	0.78	1.01	1.19	1.38	1.55

<sup>1)</sup>Samples were roasted to temperature (°C) and time (min). <sup>2)</sup>Value indicated the mean's of three replication (n=3). <sup>3)</sup>nd: not detected.

(다) 라디칼 소거능 및 환원력 측정 :

① DPPH : DPPH 라디칼 소거능은 농도가 높아짐에 따라 그리고 볶음 온도와 시간 증가에 따른 라디칼 소거능은 커다란 차이가 없었다. 그 중 200°C 에서 20분간 볶음 처리 한 백수오 추출물이 라디칼 소거능이 가장 우수하였고 DPPH의 경우 34.88%(0.25 mg/g), 63.94%(0.5 mg/g), 87.52%(1.0 mg/g)를 나타내었다(Fig. 1-2-9A).

② ABTS 및 •OH : ABTS 라디칼 소거능 역시 농도 의존적으로는 증가하였으나, 47.04%(0.25 mg/g), 73.60%(0.5 mg/g), 87.07%(1.0 mg/g)의 라디칼 소거능이 있었다(Fig. 1-2-9B). 한편 •OH(Fig. 1-2-9C) 역시 볶음온도와 처리 시간에 따라 증가하였다.

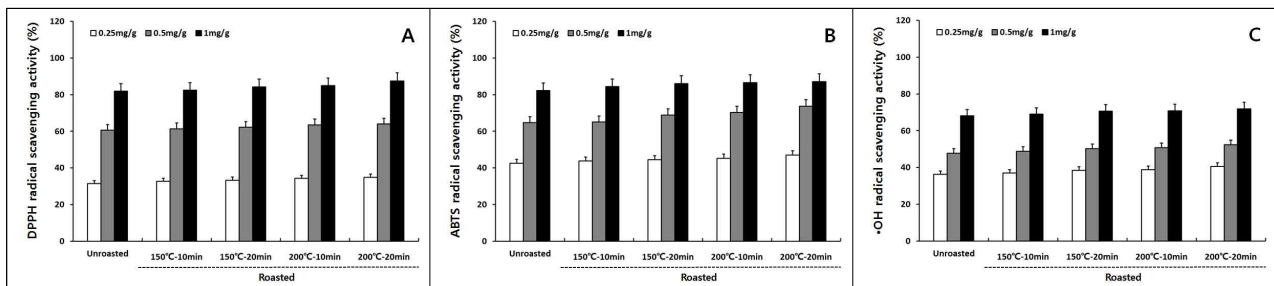


Fig. 1-2-9. Comparison of antioxidant activity by *Cynanchum wilfordii* of according to roasting. A; DPPH, B; ABTS, C; and •OH radical scavenging activity.

(라) 탄수화물 및 지방분해 효소 저해능 측정 :

①  $\alpha$ -Amylase 저해능 :  $\alpha$ -amylase 저해능 측정 결과 원료 백수오에 비해 온도와 볶음 처리 시간이 길어질수록 점진적으로 저해능이 있는 것으로 나타났다. 특히 1.0 mg/g 농도 처리

시에는 200℃-20분의 경우 30.46%의 효소 억제능이 있는 것으로 확인되었다(Fig. 1-2-10A).

②  $\alpha$ -Glucosidase 저해능 :  $\alpha$ -glucosidase 저해능 측정에서는 0.25 mg/g 농도 처리 시에는 10% 내외의 아주 저조한 저해능을 나타내었으며 0.5 mg/g 농도 처리 시 평균 20.32%( $\alpha$ -glucosidase)의 저해능을 나타내었고 1.0 mg/g 농도에서는 평균 33.81%를 나타내었다(Fig. 1-2-10B).

③ 췌장- lipase 저해능 : 지방 분해효소 저해능은 상기 기술된 탄수화물 분해효소 저해능과 유사한 경향으로 200℃-20분 처리 한 백수오 추출물이 우수한 것으로 나타났으나 저해능이 22.57%(1.0 mg/g)로 다소 저조한 것으로 나타났다(Fig. 1-2-10C).

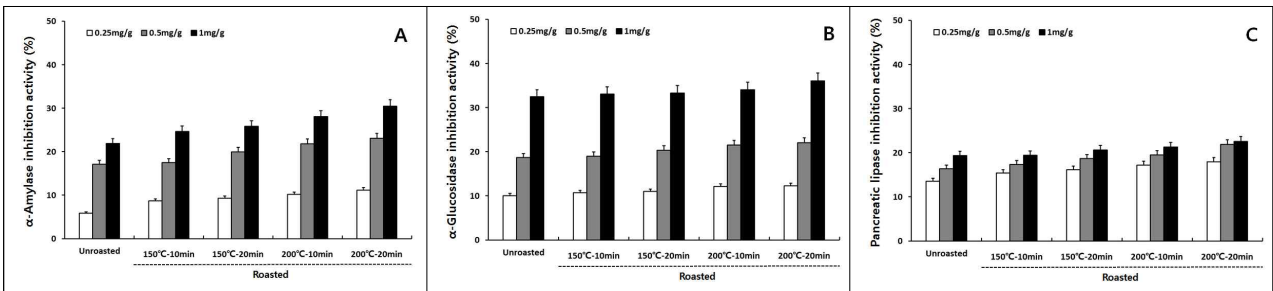


Fig. 1-2-10. Comparison of hydrolysis enzyme inhibition activity by *Cynanchum wilfordii* of according to roasting. A;  $\alpha$ -glucosidase B;  $\alpha$ -amylase, and C; pancreatic lipase inhibition activity.

(마) 볶음처리에 따른 백수오 추출물의 DNA 보호효과 확인 :

백수오 및 볶음 처리별 백수오 추출물의 과산화수소 처리 즉 산화적 처리에 대한 DNA 보호효과는 관찰한 결과, 건백수오와 150℃ 백수오 추출물에서는 DNA 보호효과가 나타나지 않았으며, 200℃에서는 약간의 DNA 보호효과를 나타내었다(Fig. 1-2-11).

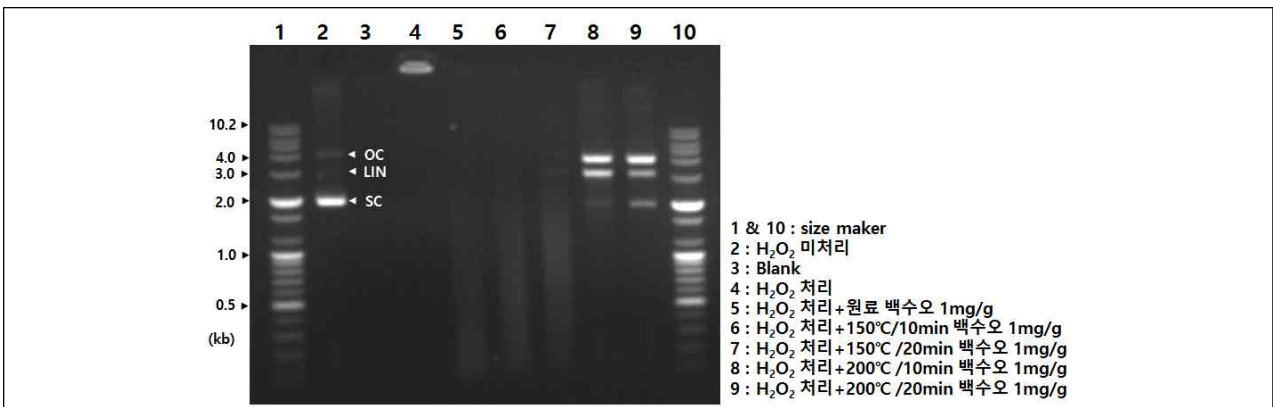


Fig. 1-2-11. Agarose gel electrophoresis of damaged DNA induced the productive effect of *Cynanchum wilfordii* of according to roasting.

## 나. 진균류 이용 활성글루텐 발효물 및 이를 이용한 약초조미료 제조

### (1) 활성글루텐 가수분해 발효물의 특성

(가) 이화학적 특성 변화 :

① pH : 발효 후 pH는 감소하였고(Asp.: pH 5.53 (0 d) → 5.19 (60 d) 및 Rhi.: pH 5.11 (0 d) → 4.4 (60 d)), 버섯균사체 2종은 발효가 진행됨에 따라 지속적으로 감소하였다(송이: pH 6.05 (0 d) → 4.99 (60 d) 및 까치: pH 6.03 (0 d) → 4.36 (60 d)) (Table 1-2-5).

② 산도 : 발효 후 산도는 증가하였고(Asp.: 0.88% (0 d) → 1.34% (60 d); Rhi.: 1.01% (0 d) → 1.34% (60 d); 송이: 0.70% (0 d) → 1.32% (60 d) 및 까치: 0.81% (0 d) → 4.36 (60 d)) (Table

1-2-5).

③ 염도 : 20% 활성글루텐 가수분해물 진균 발효 중 염도는 모두 진균류에서 발효 초기 약 17%에서 발효 60일째 약 20%로 변화하였다(Table 1-2-5).

④ 총 단백질 : 20% 활성글루텐 가수분해물 진균 발효 중 총 단백질 함량은 발효 0일째 23.34 mg/ml (Rhi) ~ 26.98 mg/ml (Asp)에서 발효가 진행됨에 따라 감소한 후 발효 60일째 약간 증가하여 12.19 mg/m (Rhi) ~ 14.05 mg/ml (송이버섯) 있었다(Table 1-2-5).

⑤ Glutamic acid : 감칠맛을 나타내는 glutamic acid는 발효 전 각각 478.96 mg/100 ml, 307.10 mg/100 ml, 445.22 mg/100 ml 및 304.76 mg/100 ml에서 1377.40 mg/100 ml, 978.72 mg/100 ml, 1813.08 mg/100 ml 및 1802.56 mg/100 ml으로 증가하였다(Table 1-2-5).

Table 1-2-5. Change of physicochemical properties during the fermentation of 20% vital wheat gluten hydrolysis broth

Strains	Fermentation time (day)	Contents <sup>1)</sup>				
		pH	Acidity (% lactic acid)	Salinity (% NaCl)	Protein (mg/ml)	Glutamic acid (mg/100 mL)
<i>Aspergillus oryzae</i>	0	5.53	0.88	17.50	26.98	478.96
	60	5.19	1.46	20.50	18.06	1377.40
<i>Rhizopus oryzae</i>	0	5.11	1.01	18.50	23.34	307.10
	60	4.44	1.34	17.50	12.19	978.72
<i>Tricholoma matsutake</i>	0	6.05	0.70	15.00	25.73	445.22
	60	4.99	1.32	19.50	14.05	1813.08
<i>Polyozellus multiplex</i>	0	6.03	0.81	17.00	26.94	304.76
	60	4.36	1.45	20.50	12.64	1802.56

<sup>1)</sup>All values are means of determinations in three independent experiments.

(나) 총 phenolics 함량 변화 : 20% 활성글루텐 제조 후 4종류의 진균류(Asp. oryzae, Rhi. oryzae, 송이버섯, 및 까치버섯 균사체)를 접종하여 60일 동안 발효시킨 조미료의 total phenolics 함량은 Fig. ?와 같았다. 초기 함량은 모두 0.60 mg/g으로 동일하였고 발효 20일까지는 큰 변화가 없는 것으로 나타났다. 발효 30일부터는 조금씩 증가하여 60일째 0.613(Asp. oryzae), 0.615(Rhi. oryzae), 0.617(송이버섯), 및 0.618(까치버섯) mg/g이었다(Fig. 1-2-12A).

(다) 라디칼 소거활성 변화 :

① DPPH 라디칼 소거활성 변화 : DPPH 라디칼 소거활성은 발효가 진행됨에 따라 모두 활성이 뚜렷하게 증가하였다. 발효 초기에는 까치버섯 균사체로 발효시킨 조미료에서 41.07%로 가장 높게 나타났으며 발효 60일째 역시 72.34%로 까치버섯 균사체 조미료가 활성이 가장 우수하였다(Fig. 17). 이외 Asp. oryzae는 52.76%, Rhi. oryzae는 57.18%, 송이버섯 균사체는 67.49%로 비교적 우수한 DPPH 라디칼 소거활성을 나타내었다(Fig. 1-2-12B).

② ABTS 라디칼 소거활성 변화 : ABTS 라디칼 소거활성은 Asp. oryzae로 발효시킨 조미료가 가장 낮았으며 발효 60일째 55.45%를 나타내었다. 한편 송이버섯과 까치버섯 균사체로 발효시킨 조미료가 가장 우수하였으며 DPPH와 마찬가지로 발효가 진행됨에 따라 그 활성은 조금씩 증가하였다. 발효 60일째 송이버섯 균사체는 62.92%를 나타내었고 까치버섯 균사체는 83.99%로 가장 우수한 것으로 나타났다(Fig. 1-2-12C).

③ Hydroxyl 라디칼 소거활성 변화 : •OH 라디칼 소거활성은 발효 60일 동안 Asp. 및 Rhi. oryzae, 그리고 송이버섯 균사체 조미료는 활성이 유사하게 나타났으며 까치버섯 균사체 조미료가 가장 우수하였다. 까치버섯 균사체 조미료는 발효 30일째 75.55%로 급격히 증가하였고 발효 과정 중 서서히 증가하여 60일째에는 83.99%의 우수한 라디칼 소거활성을 나타내었다



(Fig. 1-2-12D).

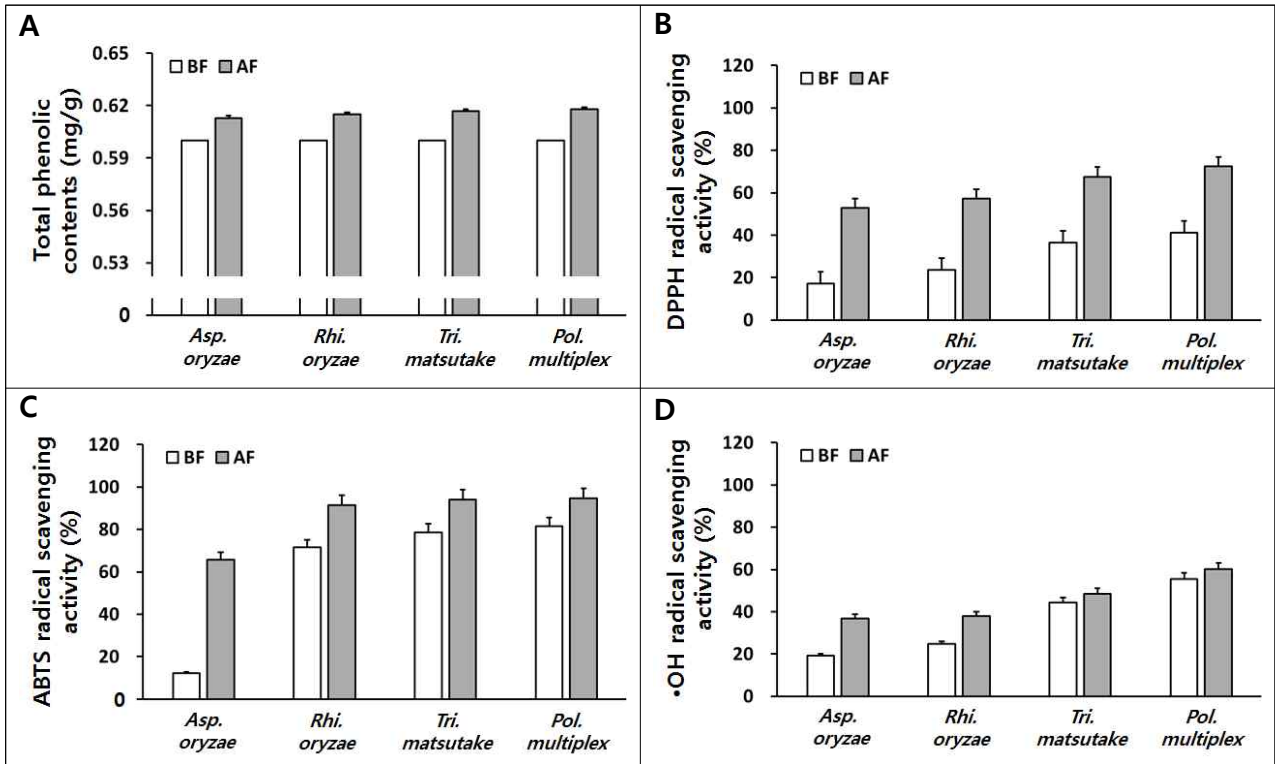


Fig. 1-2-12. Changes of total phenolic contents (A) and DPPH (B), ABTS (C), and hydroxyl (D) radical scavenging activities during the vital wheat gluten fermentation with *Asp. oryzae*, *Rhi. oryzae*, *Tri. matsutake*, and *Pol. multiplex*, respectively.

(라) 소화효소 저해활성 변화 :

①  $\alpha$ -Glucosidase 저해활성 변화 : 발효 전에는 활성이 없었으나, 발효 후 효소 저해활성이 조금씩 나타났으며 까치버섯 균사체 조미료가 67.49%로 가장 우수하였다(Fig. 1-2-13A).

② Pancreatic lipase 저해활성 변화 : 역시 발효 전에는 활성이 전혀 없었으나, 발효 후에 활성이 나타났으며 67.49%로 까치버섯 균사체 조미료가 가장 우수하였다(Fig. 1-2-13B).

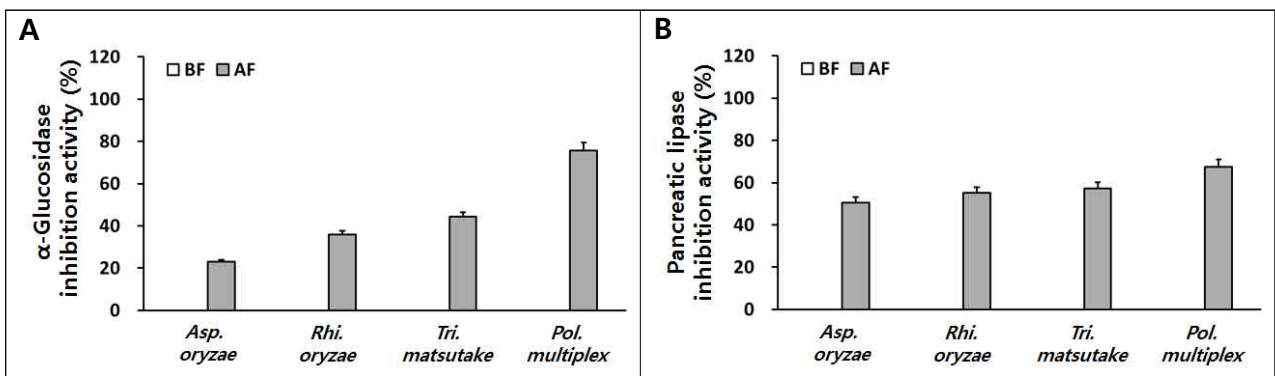


Fig. 1-2-13. Change of  $\alpha$ -glucosidase (A) and pancreatic lipase (B) inhibition activities during the vital wheat gluten fermentation with *Asp. oryzae*, *Rhi. oryzae*, *Tri. matsutake*, and *Pol. multiplex*, respectively.

(2) 활성글루텐 발효물 이용 약초조미료의 특성

(가) 이화학적 특성 :

① pH : 활성글루텐 발효물에 약초를 첨가하여 제조한 조미료의 이화학적 특성은 Table ? 와 같았다. pH는 진균류 종류에 따른 차이는 크게 없었으며 4.71에서 4.93 수준이었다.

② 산도 :산도는 pH 수치에 비례하였고 약초를 첨가하지 않은 *Rhi. oryzae* 및 송이버섯 균사체 이용 활성글루텐 조미료가 0.70%로 가장 높은 산미를 나타내었다.

③ 염도 :염도는 약초를 첨가한 까치버섯 균사체 이용 활성글루텐 조미료가 2.52%로 가장 낮았고 약초를 첨가하지 않은 *Asp. oryzae* 및 *Rhi. oryzae* 이용 활성글루텐 조미료가 3.80%로 가장 높았다.

④ 환원당 : 환원당의 경우에는 약초 첨가 유무에 따른 차이는 없었고 24.21 mg/ml에서 26.12 mg/ml 수준이었다.

⑤ 갈변도 : 갈변도는 복합약초추출물 첨가 조미료가 약간 높은 것으로 나타났다.

⑥ 단백질 : 단백질 또한 전체적으로 유사한 함량을 나타내었으며 13.20 mg/ml에서 15.17 mg/ml 수준이었다.

⑦ Glutamic acid : 비필수 아미노산 중 주요 아미노산은 glutamic acid인 것으로 나타났다. 약초를 첨가하지 않고 *Asp. oryzae*로 발효시킨 활성글루텐 조미료가 1855.13 mg/100 g으로 가장 높았다.

Table 1-2-6. Comparison of physicochemical properties on natural seasoning of the fermentation of 20% vital wheat gluten without cockatiel extracts of medicinal herbs (CEMH) and with 10% CEMH

Strains	Contents <sup>1)</sup>						
	pH	Acidity (%, lactic acid)	Salinity (%, NaCl)	Reducing sugar (mg/mL)	Brown degree (OD <sub>420 nm</sub> )	Protein (mg/mL)	Glutamic acid (mg/100 mL)
<b>Non cockatiel extracts of medicinal herbs</b>							
<i>Asp oryzae</i>	4.83	0.61	3.80	25.43	1.33	13.68	1855.13
<i>Rhi. oryzae</i>	4.72	0.70	3.80	24.21	1.44	14.65	1685.32
<i>Tri. matsutake</i>	4.72	0.70	3.00	25.66	1.28	13.20	1597.19
<i>Pol. multiplex</i>	4.89	0.52	2.80	25.32	1.42	15.17	1768.03
<b>Cockatiel extracts of medicinal herbs</b>							
<i>Asp oryzae</i>	4.88	0.61	2.85	25.87	1.47	13.68	1726.68
<i>Rhi. oryzae</i>	4.75	0.63	2.69	25.01	1.55	14.65	1502.21
<i>Tri. matsutake</i>	4.71	0.65	2.64	26.12	1.40	13.20	1550.56
<i>Pol. multiplex</i>	4.93	0.59	2.52	25.58	1.53	15.17	1550.41

<sup>1)</sup>All values are means of determinations in three independent experiments.

(나) 생리활성 물질 :

① 총 phenolics : 약재조미료의 total phenolics 함량을 측정한 결과 공통적으로 약재를 첨가 하지 않은 조미료보다는 함량이 높았다. 가장 많은 함량을 보인 조미료는 0.74 mg/g으로 까치버섯 균사체였으나 약재 첨가 유무에 따른 차이는 없는 것으로 나타났다.

② Isoflavone 화합물 : 약초-조미료의 isoflavone 화합물은 배당체 형태인 glycosides 및 malonylglycosides 그룹과 비배당체 형태인 aglycones 그룹이 검출되었고 acetylglycosides 그룹은 검출되지 않았다. Glycosides인 daidzin, glycitin, genistin 함량은 전체적으로 약초를 첨가하지 않은 조미료가 좀 더 많은 것으로 나타났다. 하지만 이들간의 큰 유의적 차이는 없었으며 total isoflavone 함량은 *Asp. oryzae* 이용 활성글루텐 조미료가 85.02 μg/g으로 가장 높았다 (Table 1-2-7).

③ Phenolic acids 및 flavonols 화합물 : Phenolic acids 및 flavonols 함량을 분석한 결과는 Table 1-2-8과 같았다. 전체적인 결과로는 약초를 첨가하였을 때 phenolic acid 화합물들이 크게 증가하였다. Gallic acid 함량은 까치버섯 균사체 약초-조미료가 23.44 mg/100 g으로 가장

높았다. Chlorogenic acid 역시 까치버섯 균사체 약초-조미료가 108.58 mg/100 g으로 가장 높았고 Asp. oryzae 약초-조미료는 104.26 mg/100 g으로 약초-조미료 중에서는 두 번째로 높았다. Flavonol 함량 역시 약초를 첨가하였을 경우에 높아진 것으로 나타났다.

Table 1-2-7. Comparison of isoflavone contents in seasoning of the fermentation of 20% vital wheat gluten without cockatiel extracts of medicinal herbs (CEMH) and with 10% CEMH

Contents <sup>D</sup> (mg/100 g)	Samples							
	<i>A. oryzae</i>		<i>R. oryzae</i>		<i>Tri. matsutake</i>		<i>Pol. multiplex</i>	
	0%	10%	0%	10%	0%	10%	0%	10%
<b>Glycosides</b>								
1. Daidzin	14.92	14.42	13.80	14.47	12.94	11.94	13.00	12.81
2. Glycitin	21.23	20.06	20.07	21.06	18.79	16.55	16.54	15.97
3. Genistin	8.16	7.90	8.27	16.23	6.39	5.24	6.11	5.72
Total	44.31	42.39	42.15	51.75	38.12	33.73	35.66	34.50
<b>Malonylglycosides</b>								
4. Daidzin	9.05	nd	10.09	nd	9.85	7.42	8.23	7.99
5. Glycitin	7.27	8.53	9.58	9.98	8.82	5.58	8.26	8.54
6. Genistin	6.34	4.36	4.07	4.32	4.94	1.39	4.63	5.57
Total	22.66	12.89	23.74	14.30	23.61	14.39	21.13	22.11
<b>Aglycones</b>								
10. Daidzein	12.97	8.22	9.39	7.78	6.40	4.93	6.84	6.35
11. Glycitein	1.47	1.90	1.34	0.12	0.12	0.12	0.99	1.88
12. Genistein	3.60	3.44	3.95	3.60	2.49	2.21	3.07	2.47
Total	18.04	13.56	14.69	11.50	9.01	7.26	10.89	10.70
<b>Total isoflavones</b>	<b>85.02</b>	<b>68.83</b>	<b>80.58</b>	<b>77.56</b>	<b>70.74</b>	<b>55.38</b>	<b>67.68</b>	<b>67.30</b>

<sup>D</sup> All values are presented as the mean±SD of triplicate determination. <sup>2)</sup> nd: not detected.

Table 1-2-8. Comparison of phenolic acid and flavonol contents in seasoning of the fermentation of 20% vital wheat gluten without cockatiel extracts of medicinal herbs (CEMH) and with 10% CEMH

Contents <sup>D</sup> (mg/100 g)	Samples							
	<i>A. oryzae</i>		<i>R. oryzae</i>		<i>Tri. matsutake</i>		<i>Pol. multiplex</i>	
	0%	10%	0%	10%	0%	10%	0%	10%
<b>Phenolic acids</b>								
Gallic acid	2.96	18.51	2.96	20.11	2.96	15.03	2.96	23.44
Protocatechuic acid	nd	28.46	nd	29.22	nd	20.12	nd	30.24
Chlorogenic acid	nd	104.26	nd	99.87	nd	89.45	nd	108.58
<i>p</i> -Hydrobenzoic acid	2.33	38.11	2.33	40.21	2.33	37.46	2.33	41.32
Vanillic acid	nd	13.56	nd	14.37	nd	11.35	nd	13.87
<i>p</i> -Coumaric acid	nd	10.18	nd	9.45	nd	11.01	nd	11.23
Ferulic acid	nd	2.33	nd	3.02	nd	3.12	nd	2.97
Venturic acid	1.79	18.47	1.79	19.87	1.79	15.47	1.79	20.32
<i>trans</i> -Cinnamic acid	nd	1.60	nd	1.24	nd	1.19	nd	1.87
Total	7.08	235.48	7.08	237.36	7.08	204.2	7.08	253.84
<b>Flavonols</b>								
Epigallocatechin	nd	11.22	nd	13.24	nd	8.42	nd	14.03
Catechin	nd	tr	nd	tr	nd	tr	nd	tr
Epicatechin	nd	tr	nd	tr	nd	tr	nd	tr
Epigallocatechin gallate	nd	9.84	nd	9.78	nd	7.52	nd	10.32
Vanillin	1.21	9.44	1.21	10.02	1.21	10.02	1.21	11.21
Rutin	nd	3.43	nd	4.01	nd	2.34	nd	4.01
Catechin gallate	nd	tr	nd	tr	nd	tr	nd	tr
Naringin	nd	27.93	nd	28.42	nd	25.87	nd	30.11
Quercetin	nd	24.87	nd	25.67	nd	22.43	nd	24.21
Naringenin	nd	5.30	nd	6.21	nd	4.32	nd	5.27
Formonoetin	nd	tr	nd	tr	nd	tr	nd	tr
Total	1.21	92.03	1.21	97.35	1.21	80.92	1.21	99.17
<b>Totals</b>	<b>8.29</b>	<b>327.51</b>	<b>8.29</b>	<b>334.71</b>	<b>8.29</b>	<b>285.12</b>	<b>8.29</b>	<b>353.01</b>

<sup>D</sup> All values are presented as the mean±SD of triplicate determination. <sup>2)</sup> nd: not detected.

(다) 라디칼 소거활성 변화 :

① DPPH 라디칼 소거활성 변화 : DPPH 라디칼 소거활성은 일반적으로 약재 첨가 시에 약 10% 가량 더 높은 것으로 측정이 되었다. *Asp. oryzae* 약초 첨가 조미료는 66.53%를 나타내었고 *Rhi. oryzae*는 71.06%, 송이버섯 균사체는 62.46%였으며 까치버섯 균사체는 81.53%로 가장 우수한 DPPH 라디칼 소거활성을 보였다(Fig. 1-2-14A).

② ABTS 라디칼 소거활성 변화 : ABTS 라디칼 소거활성 역시 까치버섯 균사체 조미료에 약재를 10% 첨가 하였을 시 85.76%의 우수한 활성을 나타내었다. 한편 *Asp. oryzae* 약재첨가 조미료는 62.59%로 가장 낮았으며 *Rhi. oryzae* 약재첨가 조미료는 67.40%로 비교적 우수한 ABTS 라디칼 소거활성을 나타내었다(Fig. 1-2-14B).

③ Hydroxyl 라디칼 소거활성 변화 :  $\cdot\text{OH}$  라디칼 역시 약재를 첨가했을 때 소거활성이 좀더 우수하였고 *Asp. oryzae* 조미료는 62.59%, *Rhi. oryzae* 조미료는 67.40%, 송이버섯 균사체 조미료는 58.27%, 까치버섯 균사체 조미료는 78.50%로 가장 우수하였다(Fig. 1-2-14C).

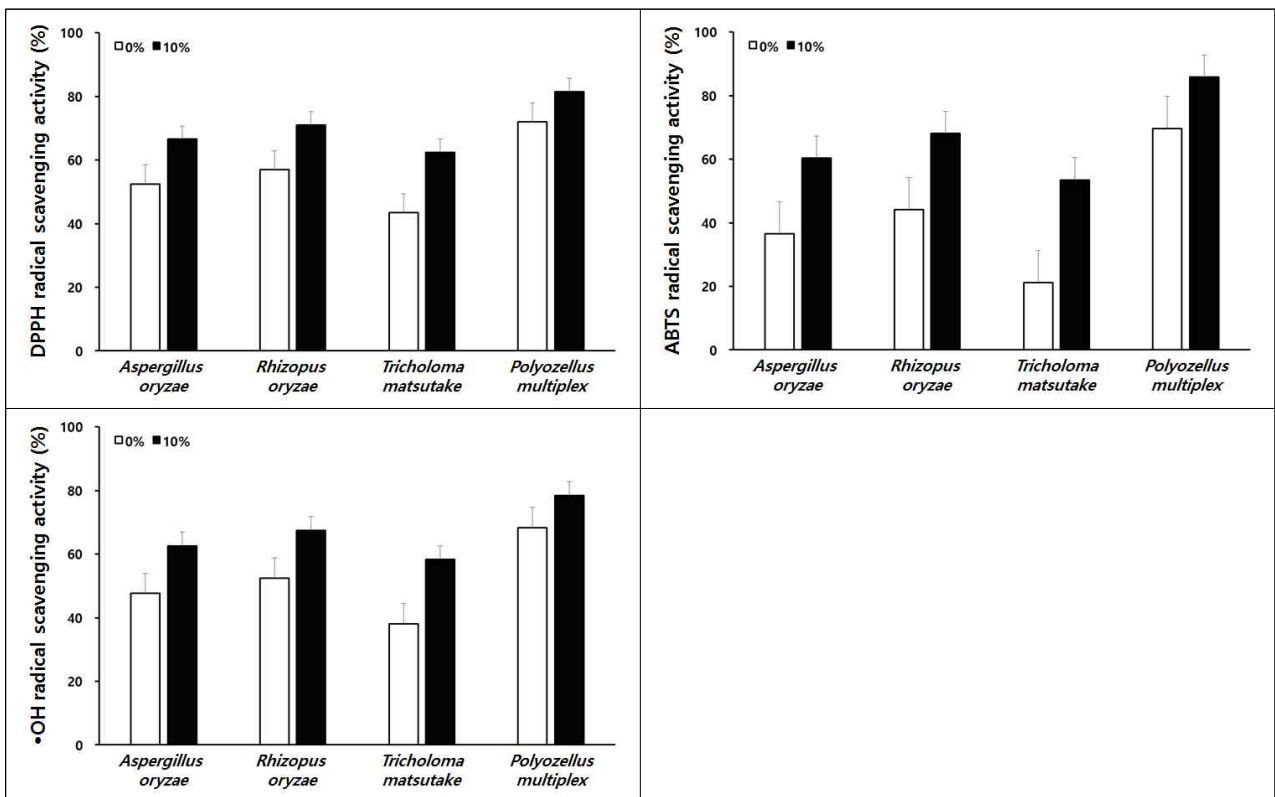


Fig. 1-2-14. Comparison of DPPH (A), ABTS (B), and hydroxyl (C) radical scavenging activities on natural seasoning of the fermentation of 20% vital wheat gluten without cockatiel extracts of medicinal herbs (CEMH) and with 10% CEMH.

(라) 소화효소 저해활성 변화 :

①  $\alpha$ -Glucosidase 저해활성 변화 : 탄수화물 소화효소( $\alpha$ -glucosidase) 저해활성 역시 까치버섯 균사체 조미료가 가장 우수하였고 약재를 첨가한 경우 65.73%를 나타내었다. 한편 송이버섯 균사체 조미료는 46.02%로 가장 낮은 효소 저해활성을 나타내었다(Fig. 1-2-15A).

② Pancreatic lipase 저해활성 변화 : 4종류의 조미료에서 모두 지방분해 효소 저해활성이 있는 것으로 나타났다. 약재를 첨가하지 않은 경우에는 평균 47.79%였으나 약재를 첨가한 경우 평균 59.06%로 약간 상승한 것으로 나타났다(Fig. 1-2-15B).

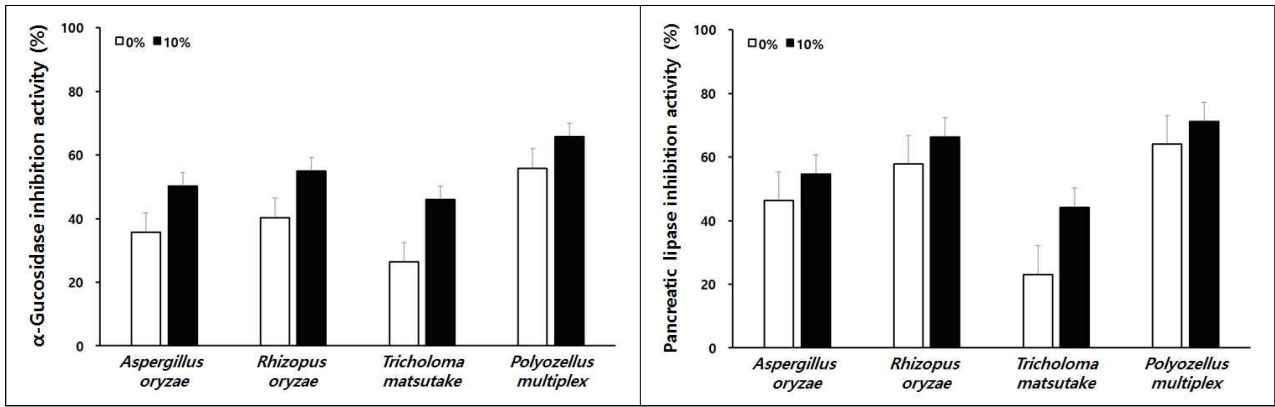


Fig. 1-2-15. Comparison of  $\alpha$ -glucosidase (A) and pancreatic lipase (B) inhibition activity on natural seasoning of the fermentation of 20% vital wheat gluten without cockatiel extracts of medicinal herbs (CEMH) and with 10% CEMH.

다. 송이버섯 균사체 이용 콩발효물 및 이를 이용한 식물성 자연조미료 제조

(1) 식용버섯균사체 이용 콩발효물의 특성

(가) 발효 : 송이버섯 균사체를 콩에 접종하여 8일간 발효시킨 결과이다.



Fig. 1-2-16. The photograph of soybean solid-fermentative processing.

(나) Glutamic acid와 isoflavone 함량 : Glutamic acid는 발효 후에 약 5배 증가하여 798.17 mg/100 g 있었다(Table 1-2-9). 발효 전 콩의 주요 isoflavone은 당과 결합한 형태인 glycosides (peak 1, 2, 3) 그룹이었고 식용버섯 균사체 발효물들의 주요 isoflavone은 당과 분리된 aglycones (peak 4, 5, 6) 즉, 비배당체 그룹인 것으로 나타났다. 송이버섯 균사체 발효물의 경우 daidzein의 경우 585.03  $\mu\text{g/g}$ 이었고 glycitein은 177.04  $\mu\text{g/g}$ , genistein은 385.89  $\mu\text{g/g}$  있었다. 한편 발효전 콩은 배당체 화합물(glycoside)가 82.0%와 비배당체 화합물(aglycone)이 18.0%로 발효가 진행됨에 따라 비배당체 화합물이 증가하였다(Table 1-2-9 & Fig. 1-2-17).

Table 1-2-9. Comparison of proximate analysis in the solid-state fermentation of soybean

Contents <sup>1)</sup> (mg/100 g)	Unfermented soybean	Fermented soybean
Glutamic acid	138.17	798.17

<sup>1)</sup> All values are presented as the mean $\pm$ SD of triplicate determination.

Table 1-2-10. Comparison of isoflavone contents in the solid-state fermentation of soybean

Contents <sup>1)</sup> ( $\mu\text{g/g}$ )	Unfermented soybean	Fermented soybean
<b>Glycosides</b>		
1. Daidzin	587.59	66.45
2. Glycitin	224.89	62.42
3. Genistin	675.71	90.06
Total	1,488.19	218.93
<b>Aglycones</b>		
4. Daidzein	188.48	585.03
5. Glycitein	30.36	177.04
6. Genistein	108.37	385.89
Total	327.21	1,147.96
<b>Total isoflavones</b>	<b>1,815.4</b>	<b>1,366.89</b>

<sup>1)</sup>All values are presented as the mean $\pm$ SD of triplicate determination.

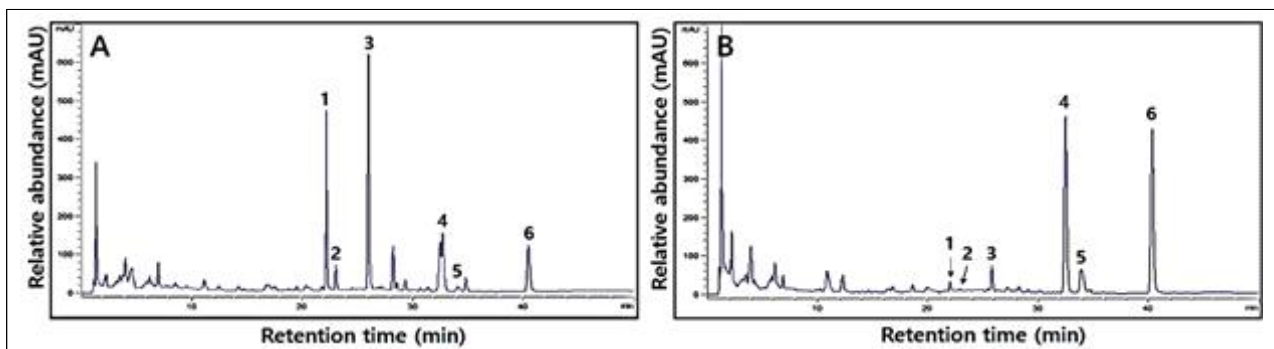


Fig. 1-2-17. HPLC chromatogram of six isoflavone derivatives in the solid-state fermentation of soybean. A, Unfermented soybean; and B, fermented soybean with *Tri. matsutake*. 1, Daidzin; 2, Glycitin; 3, Genistin; 4, Dadzein; 5, Glycitein; and 6, Genistein.

(다) DPPH 라디칼 소거활성 및  $\alpha$ -glucosidase 저해활성 : 발효 전보다는 발효 후에 모두 활성이 증가하였다. 추출물 1 mg/ml 처리 시 DPPH 라디칼 소거활성은 원료콩은 72.33%를 나타내었고 송이버섯 균사체 콩발효물은 89.13% 있었고,  $\alpha$ -glucosidase는 발효전 콩은 34.99%, 송이버섯 균사체는 93.41% 있었다(Fig. 1-2-18).

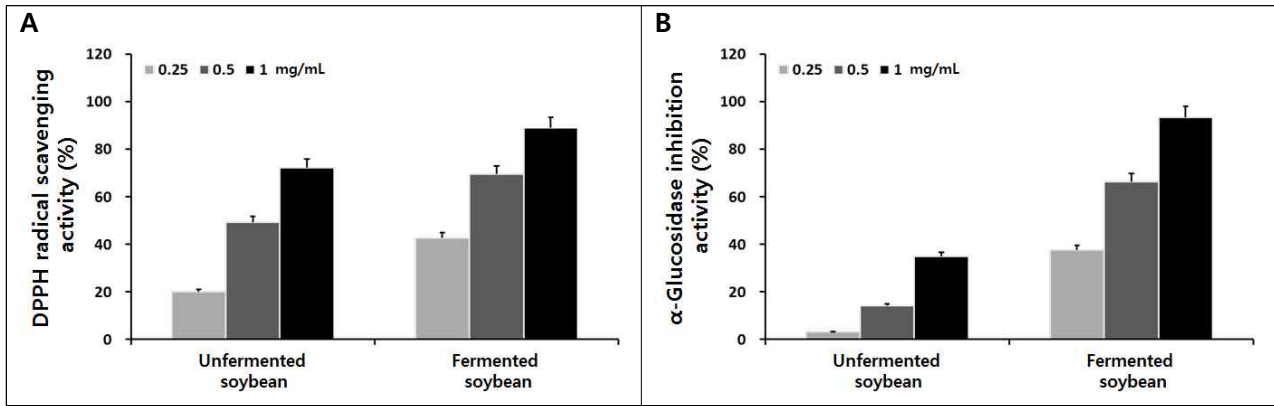


Fig. 1-2-18. Comparison of DPPH radical (A) and  $\alpha$ -glucosidase inhibition (B) activities on treated with the solid-state fermentation of soybean

## (2) 새싹삼 물김치의 특성

(가) 이화학적 특성 : pH는 발효가 진행됨에 따라 감소하였고, 이에 상응하여 산도는 증가하였다. 또한 염도는 거의 변화가 없었으며, 환원당은 감소하였고, 생균수는 발효 3일째 최대치를 나타낸 후 감소하였다(Table 1-2-11).

Table 1-2-11. Change of pH, acidity, salinity, reducing sugar, and viable cell numbers in the state fermentation of mulkimchi with sprouting ginseng

Addition volume (%)	Fermentation time (day)	Contents <sup>1)</sup>				
		pH	Acidity (% lactic acid)	Salinity(%)	Reducing sugar (g/L)	Viable cell numbers (log cfu/mL)
0	0	6.28	0.18	4.60	7.1	6.19
	1	4.24	0.74	4.50	6.4	8.89
	2	4.01	0.50	4.30	5.2	10.44
	3	3.99	0.38	4.30	5.2	12.44
	6	3.95	0.67	4.40	5.3	11.52
	9	3.91	0.71	4.30	5.3	10.62
20	0	6.30	0.20	5.40	5.5	5.61
	1	4.07	0.74	5.30	5.2	8.62
	2	4.02	0.50	5.30	6.0	10.77
	3	3.94	0.47	5.20	5.8	12.48
	6	3.91	0.70	5.10	6.0	11.53
	9	3.91	0.7	4.70	6.0	10.48
40	0	6.14	0.16	4.50	6.5	5.86
	1	4.18	0.61	4.40	5.8	8.82
	2	4.01	0.52	4.01	5.4	10.97
	3	3.92	0.45	4.60	5.5	12.96
	6	3.93	0.65	4.40	5.5	11.77
	9	3.93	0.70	4.50	5.6	10.81

<sup>1)</sup>All values are means of determinations in three independent experiments.

(나) 총 phenolics 및 flavonoids 함량 : 새싹삼 첨가비율이 증가할수록 총 phenolics과 flavonoids 함량이 증가하였고, 발효 전보다는 발효 후에 함량이 증가하였다(Fig. 1-2-19).

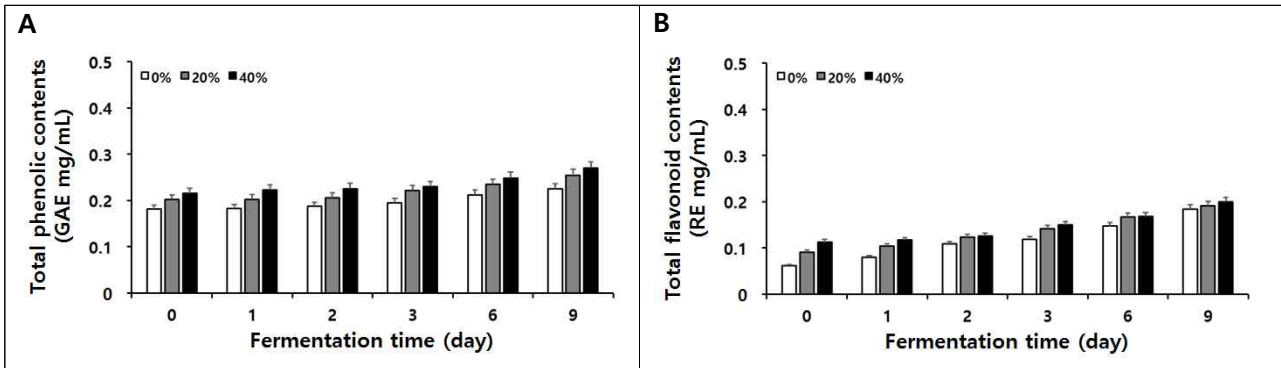


Fig. 1-2-19. Change of DPPH radical (A) and  $\alpha$ -glucosidase inhibition (B) activities on treated with the state fermentation of mulkimchi with sprouting ginseng

(나) DPPH 라디칼 소거활성 및  $\alpha$ -glucosidase 저해활성 : 새싹삼 첨가비율이 증가할수록 총 phenolics과 flavonoids 활성이 증가하였고, 발효 전보다는 발효 후에 활성이 증가하였다(TFig. 1-2-20).

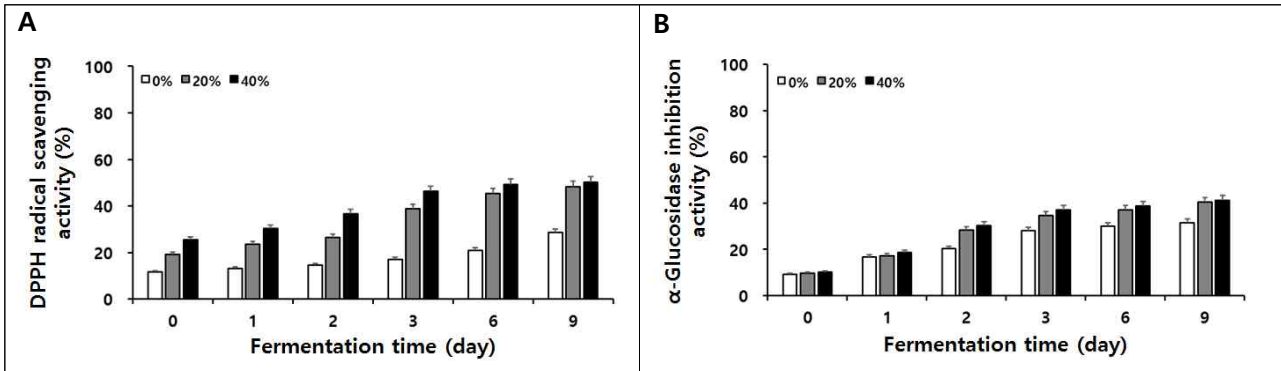


Fig. 1-2-20. Comparison of DPPH radical (A) and  $\alpha$ -glucosidase inhibition (B) activities on treated with the state fermentation of mulkimchi with sprouting ginseng

### (3) 식물성 자연조미료의 특성

(가) 이화학적 특성 : 증자콩 스탁으로 제조한 조미료보다 송이버섯 균사체 콩발효물 스탁으로 제조한 조미료가 pH와 갈변도는 낮았고, 산도, 염도, 환원당, 단백질 및 glutamic acid 함량이 높았다(Table 1-2-12).

Table 1-2-12. Comparison of pH, acidity, salinity, reducing sugar, brown degree, protein, and glutamic acid on natural seasoning

Samples	Contents <sup>1)</sup>						
	pH	Acidity (% lactic acid)	Salinity (%)	Reducing sugar (g/L)	Brown degree (OD <sub>420 nm</sub> )	Protein (mg/mL)	Glutamic acid (mg/100 mL)
UFS	5.59	0.65	6.59	2.08	3.135	22.12	999.33
FS	5.14	0.86	6.78	2.36	3.078	31.28	1462.33

<sup>1)</sup>All values are means of determinations in three independent experiments.

(나) 총 phenolics 및 flavonoids 함량 : 증자콩 스탁으로 제조한 조미료보다 송이버섯 균사체 콩발효물 스탁으로 제조한 조미료가 총 phenolics와 flavonoids 함량이 높았다(Table 1-2-13).



Table 1-2-13. Comparison of total phenolic and flavonoid contents on natural seasoning

Samples	Contents <sup>1)</sup>	
	Total phenolics (mg/g)	Total flavonoids (mg/g)
Unfermented soybean	0.74	16.46
Fermented soybean	0.86	17.67

<sup>1)</sup>All values are means of determinations in three independent experiments.

(다) 생리활성 : 증자콩 스탁으로 제조한 조미료보다 송이버섯 균사체 콩발효물 스탁으로 제조한 조미료가 DPPH, ABTS와 hydroxyl 라디칼 소거활성 및  $\alpha$ -glucosidase 저해활성이 높았다(Fig. 1-2-21).

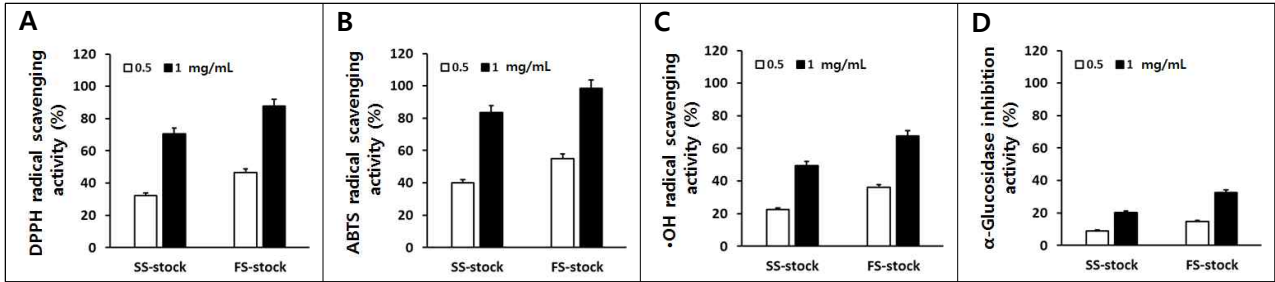


Fig. 2-2-33. Comparison of DPPH (A), ABTS (B), and hydroxyl (C) radical and  $\alpha$ -glucosidase inhibition (D) activities on treated with natural seasoning

#### 아. 6차 산업 육성을 위한 네트워크 구축 및 홍보·마케팅

##### (1) 지리산권 약용작물 6차산업화 심포지엄, 워크숍 개최 및 초청 강연

(가) 경남한방약초연구소의 6차산업화 전략 및 비전 워크숍

① 연계 : 지리산권역 약용작물 6차산업 육성을 위한 협력 및 발전 방안

② 내용 : 지리산권역 약용작물의 6차산업화를 위하여 대학, 연구소 및 기업의 협력 방안 모색과 경남항노화산업 연계 6차산업 육성 방안

③ 성과 : 지리산권 약용작물의 고부가가치를 위해서 산학연 연계 구축이 필요하며, 더 나아가 산청군 및 경남 항노화산업 연계를 통해 시너지 효과 낼 수 있는 방안 도출, 경남일보 등 다수의 언론에 워크숍 홍보

(나) 지리산권 약용작물 6차산업화 심포지엄

① 연계 : 청년창업을 6차산업으로

② 내용 : 농업 베이스 창업을 위한 준비과정 및 창업방법, 펀딩 및 투자유치와 실제 청년 농업6차산업 창업 사례에 대해서 강연

③ 성과 : 실업률이 대한민국 건국 이래 최대로서 특히 청년 실업 심각한 가운데, 농업을 베이스로 한 창업을 위한 기본 개념과 학생들에게 희망의 메시지를 전달





Fig. 1-2-23. 6차산업 관련 세미나 및 포럼 6차산업 주제 발표 및 사업단 홍보 AND 경남 향노화포럼 6차산업 관련 주제 발표 (2016.03.31., 서경방송 생방송 진행).

(2) 지리산권 약용작물 6차산업화 홍보 및 전시회

(가) 홍보 : 사업팀 및 향후 비전 소개

① 시사매거진 2580 : 경남과기대 조계만 교수, 스타 상품 개발해 약초 산업에 이바지 하 고파 (2015년 8월)

(나) 백수오·이엽우피소 구별 분자마커 개발 : 경남도민신문 등 다수 (2015년 3월 30일)

① 제목 : ‘농업기술원, 백수오·이엽우피소 구별 분자마커 개발 성공 경남농업기술원 한 은의 연구사와 경남과기대 이신우 교수팀’ 등 다수

② 내용 : 경상남도농업기술원(이하 경남농기원)은 지난 29일 “한은희 경남농기원 연구사 와 이신우 경남과학기술대 농학·한약자원학부 교수가 공동으로 농림축산식품부, 농생명산업기 술개발사업의 지원을 받아 하수오·백수오·이엽우피소 이 세 식물 중에 대한 판별 분자 마커 를 개발하는데 성공했다”며 “이 과정에서 많은 수의 샘플들을 대상으로 판별 실험을 수행한 결과를 국제학술지인 ‘Molecular Biology Reports(43호)’에 게재했다”고 밝힘

(다) 박람회 기획 및 전시회 참가

① 박람회 전시회 : 2015 미래건강 경남 향노화산업 콘퍼런스

㉠ 주제 : (재)경남한방약초 연구소 - 2015 미래건강 경남 향노화산업 콘퍼런스 부서 설 치 및 홍보

㉡ 내용 : 한방 향노화 거점 연구기관 지정에 따른 연구소 소개 및 연구소-기업 공동으로 개발한 제품 등 전시 및 홍보

② SN S 홍보 : 촌놈날다 시즌4 - 크리에이티브촌라이프

㉠ 주제 : 슬기롭고 창의적인 6인의 시골생활 노하우

㉡ 내용 : 귀농 6인의 시골생활 노하우 공개 및 토크



Fig. 1-2-24. 『백수오·이엽우피소 구별 분자마커 개발』 SCI 논문 게재 내용 홍보 (2016년 3월)



Fig. 1-2-25. 경남한방약초연구소 홍보 및 개발 제품 전시 AND 『귀농 6인의 시골생활 노하우 공개 및 토크』를 통한 사업단 홍보

(3) 산청 향노화 산업 발전을 위한 군민 대토론회 : 서경방송 등 다수

(가) 제목 : ‘산청 향노화 산업 발전을 위한 군민 대토론회’ 등 다수 (2016년 5월 25일)

(나) 내용 : 산청군청 대회의실에서 관내 기업, 기관/단체, 주민 등 150여명이 참석하여 ‘산청 향노화산업 어떻게 발전시킬까’ 라는 주제로 산청 한방향노화산업 가능성, 향노화 기업유치를 위한 기반조성과 인근 시군과의 차별화된 경쟁력, 지역 향노화 자원 활용 가능성 등에 대해 패널 4인의 토론과 군민 질의응답 순으로 진행



Fig. 1-2-26. 『산청 향노화 산업 발전을 위한 군민 대토론회』 관련 홍보 (2016년 5월)

(4) 기타 : 6차산업 및 농·식품 개발 등의 교육 및 현장견학

순번	강의 내용	일시	장소	교육 대상
1	경남과기대 식품과학부 산업체·연구소 취업특강	2015년12월1일	공동실험실습관 아톰홀	경남과기대 식품과학부 재학생
2	2016 시니어 기술창업스쿨 : 농식품 가공기술 6차산업 창업과정 (3회)	2016년 2월 ~ 2015년 3월	창업지원단 교육장	경남과기대 시니어창업스쿨 수강생
3	여주6차산업-HACCP공장 현장견학	2015년11월25일	함양영농조합 법인	경남과기대 식품과학부 재학생



Fig. 1-2-27. 6차산업 및 농·식품 개발 등의 교육 및 현장견학

### 3-1. 3차년도 연구수행 방법

#### 가. 가바(GABA) 생성 생균제 유산균 선발 및 동정

##### (1) 균주 분리 및 GABA 전환율 확인

(가) 분리 : GABA 생성 젖산균 선발하기 위해 기존에 김치, 식물추출발효음료 및 막걸리 등의 발효식품으로부터 분리하여 보관해둔 500여종의 젖산균으로부터 GABA 생성 젖산균을 확인하였다.

(나) GABA 전환율 확인 :

① MSG (Monosodium glutamic acid) : MRS 액체배지에 GABA 전구물질인 MSG를 각각 0.05% 및 0.1%가 되게끔 첨가하여 미리 배양한 젖산균 배양액을 2.5% 접종하여 30℃에서 48시간 배양하였다. 48시간 배양 후 배양액 1 ml를 시험관에 취하고 여기에 증류수 4 ml를 첨가하여 60℃에서 1시간 가수분해를 진행하였다. 그 후 lithium citrate buffer(pH 2.2)를 1 ml 첨가하여 4℃에서 2시간 방치시켜 단백질 침전 과정을 실시하였다. 여과지로 여과한 후 얻은 여액을 60℃에서 감압 농축하여 농축물을 제조하였다. 여기에 lithium citrate buffer 2 ml에 녹여 아미노산 자동분석기(Hitachi L-8900, Tokyo, Japan)를 이용하여 분석하였다.

② 활성글루텐 : 활성글루텐 60 g에 증류수 300 mL을 조금씩 넣어가며 용해시킨 후 키위즙 5%를 첨가하고 37℃에서 24시간 효소 처리를 진행하여 5% 활성글루텐을 제조하였다. 이후 미리 배양한 젖산균 배양액을 2.5%씩 접종하여 30℃에서 48시간 배양하였다. 이후 과정은 MSG

에 측정된 방법과 동일하게 진행하였다.

③ 대두단백질 : 활성글루텐 30 g에 증류수 300 mL을 조금씩 넣어가며 용해시킨 후 키워즙 5%를 첨가하고 37°C에서 24시간 효소 처리를 진행하여 5% 대두단백질을 제조하였다. 이후 미리 배양한 젖산균 배양액을 2.5%씩 접종하여 30°C에서 48시간 배양하였다. 이후 과정은 MSG에 측정된 방법과 동일하게 진행하였다.

## (2) 생균제능 확인

(가) 산 및 인공위액산 내성 : 산 내성은 pH를 2.0, 2.5, 3.0으로 조정된 50 ml MRS 액체 배지를 사용하였으며 인공위액산 내성 역시 pH를 2.0~3.0으로 조정된 후 펩신 1.0%를 첨가한 50 ml MRS 액체배지를 사용하였다. 각각의 배지에 미리 배양한 균주들을 2.5% 농도로 접종한 후 37°C에서 4시간 정치 배양시켜 배양 직후와 그리고 2시간과 4시간째 MRS 평판배지에 도말 접종하여 생균수를 측정하였다. 생존율은 초기 균의 농도와 MRS 평판배지 상에 형성된 젖산균의 집락수 비율을 비교하여 계산하였다.

(나) 담즙산 내성 : 담즙산 내성은 상기 기술된 인공위액산과 동일한 MRS 액체배지에서 3시간 배양한 후 1~4%의 담즙산이 함유된 MRS 액체배지에 접종하여 37°C에서 48시간 배양한 후 생균수를 측정하였다.

## (3) 생리활성 확인

(가) 유산균 동결건조 분말 및 추출물 제조 : 유산균 동결건조 분말 제조는 우선 MRS 액체 배지(50 mL)에 각각의 유산균을 2.5% 접종하여 30°C에서 48시간 1차 배양한 후 새로운 MRS 액체배지(500 mL × 4)에 2차 계대배양을 72시간 실시하였다. 이 후 각각의 유산균 배양액을 원심분리 후 상등액을 버리고 유산균 균체를 회수하였다. 이 후 멸균증류수로 3회 세척하고 동결건조하여 최종적으로 순수한 유산균 균체를 회수 및 제조하였다. 유산균 균체 동결건조 분말의 추출물 제조하였다.

(나) 라디칼 소거활성 : 상기 기술된바와 같이 동일하게 진행하였다.

(다) 소화효소 저해활성 : 상기에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

## (4) 균주 동정

GABA 생성 젖산균의 동정은 형태학적, 생육학적, 생화학적 및 분자유전학적 방법을 이용하여 동정하였다. 실험방법은 1차년도 *Bacillus* 균주의 동정 방법과 동일하게 수행하였다.

## 나. WCP02 균주를 이용한 천연발효조미료 제조 및 발효특성

### (1) 발효물 제조

(가) 재료 및 배지 : 활성글루텐, 천일염 및 다래는 상기와 동일하게 사용하였고, 콩 시료 중 새단백콩은 농촌진흥청 남부작물부(구, 기능성작물부)에서 공급받아 사용하였고, 유기농 백태콩은 마산카톨릭농업협동조합에서 구입하여 사용하였다. 젖산균 배양배지로는 lactobacilli MRS broth(MRS, Difco, Becton Dickinson Co., MD, USA)를 사용하였고, 형질전환 등의 미생물 확인을 위한 배양배지로는 Luria-Bertani(LB, Difco, Becton Dickinson Co., MD, USA)를 사용하였다.

(나) 콩알 메주 및 활성글루텐 가수분해물 제조 : 상기와 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

(다) 활성글루텐 가수분해물 제조 : 상기와 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

(라) 종균배양 및 발효 : 최종 선발한 *Lac. brevis* WCP02 균주를 맥아추출 액체배지에서 종균배양을 하였다. 한편 미리 준비한 가수분해물에 종균배양액을 5%(v/v) 접종하여 30일간 발효

하면서 10일마다 시료를 채취하여 일부는 이화학적 특성 분석에 사용하였고, 일부 동결하여 보관하였다.

## (2) 이화학적 특성

pH, 산도 및 유리아미노산 측정은 상기에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

## (3) 생리활성물질 분석

(가) 추출물 제조 : 각각의 발효액 5 mL에 동량의 95% 발효주정을 가하여 상온에서 12시간 추출하였다. 추출물은 원심 분리하여 얻은 상등액을 0.45  $\mu$ m membrane filter(Dismic-25CS, Toyoroshikaisha, Ltd, Tokyo, Japan)로 여과하여 일부는 총 phenolics, 라디칼 소거활성 및 탄수화물과 지방 분해효소 저해활성 평가에 사용하였다.

(나) 총 phenolics 함량 측정 : 상기에 기술 방법에 동일하여 수행하였다.

(4) 생리활성 분석 : 항산화 활성과 소화효소 저해활성은 상기에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

## 다. 여주혼합과채-콩발효물 제조

### (1) 재료 및 발효

(가) 재료: 여주는 함양영농조합법인(함양군), 시금치는 남일영농조합법인(남해), 토마토는 농산물도매유통장(진주시), 콩은 함양농협(함양군)에서 구입하여 사용하였다.

(나) 발효: 각각의 재료(여주:시금치:토마토:불린콩 = 1:1:1:1)로 준비한 후 재료의 동량으로 무게로 정제수를 가하여 믹서기를 사용하여 여주혼합과채 주스를 제조한 후 121°C에서 15분간 살균처리하고 상온까지 냉각한 후 선발 젖산균을 접종하여 35°C에서 발효시켰다.

① 균주별 특성: 준비한 여주혼합과채 주스에 *Lac. plantarum* P201과 선발 3종의 가바(GABA) 생성 젖산균을 5%(단독) 혹은 각각 2.5%(혼합) 접종하여 35°C에서 72시간 발효시켰다.

② 온도별 특성: 준비한 여주혼합과채 주스에 *Lac. plantarum* P201과 가바(GABA) 생성 젖산균 BMK184를 각각 2.5%(혼합) 접종하여 20°C, 25°C, 30°C, 35°C 및 40°C에서 72시간 발효시켰다.

③ 시간별 특성: 준비한 여주혼합과채 주스에 *Lac. plantarum* P201과 가바(GABA) 생성 젖산균 BMK184를 각각 2.5%(혼합) 접종하여 0, 12, 24, 36, 48, 60 및 72시간 발효시켰다.

### (2) 이화학적 특성

pH, 산도, 유리아미노산 및 생균수 측정은 상기에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

### (3) 생리활성물질 분석

(가) 추출물 제조 : 여주혼합과채 젖산발효물의 추출은 동결건조 분말 1 g에 10배의 80% 메탄올을 가하고 상온에서 12시간 추출하였다. 이 후 원심분리 하여 얻은 추출물은 0.45  $\mu$ m membrane filter(Dismic-25CS, Toyoroshikaisha, Ltd, Tokyo, Japan)로 여과하여 제조한 후 본 실험에 사용하였다.

(나) 총 phenolics와 총 flavonods 함량 : 상기에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

(4) 생리활성 : 상기에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

## 라. 생물공정기술(유산발효 포함) 적용 활성도라지 제조

### (1) 활성도라지 제조

도라지는 충청도 5년근을 구입하여 사용하였다. 원료, 증자, 발효, 및 숙성 도라지 제조 :

충청도 5년근 도라지는 흙과 각종 이물질을 제거하기 위해 흐르는 물에 충분히 세척하여 물기를 완전 제거하였다. 증자 도라지는 1.5 kg을 100℃에서 1시간 쪄낸 후 55℃에서 2일간 열풍건조 하였다. 발효 도라지는 미리 배양한 젖산균 배양액 5%와 설탕 2%를 첨가하여 증자 도라지에 접종한 후 30℃에서 1주일 발효시켰다. 이후 55℃에서 2일간 열풍건조 하였다. 한편 젖산발효-숙성 도라지는 젖산발효 도라지를 70℃에서 1주일 숙성시켰고 숙성 도라지는 증자 도라지를 70℃에서 1주일 숙성시켜 55℃에서 3일간 건조하여 분쇄시켜 분말을 제조한 후 냉동실에 보관하면서 실험에 사용하였다(Fig. 1-3-1).

(2) 이화학적 특성 : pH 및 산도는 상기에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.



Fig. 1-3-1. Photograph of bio-processing steps of fermentive and ripening balloon flower

### (3) 생리활성물질 분석

(가) 추출물 제조 : 각각의 발효액 5 mL에 동량의 80% 발효주정을 가하여 상온에서 12시간 추출하였다. 추출물은 원심 분리하여 얻은 상등액을 0.45  $\mu$ m membrane filter(Dismic-25CS, Toyoroshikaisha, Ltd, Tokyo, Japan)로 여과하여 일부는 총 phenolics, 라디칼 소거활성 및 탄수화물과 지방 분해효소 저해활성 평가에 사용하였다.

(나) 총 phenolics 및 flavonoids 함량 측정 : 상기에 기술 방법에 동일하여 수행하였다.

(4) 생리활성 분석 : 상기에 기술 방법에 동일하여 수행하였다.

## 마. 천연 액상조미료 및 천연 소스의 (시)제품화 (참여기업 : 몽고식품)

### (1) 액상조미액 제조방법 개발

(가) 과일 착즙액을 이용한 액상조미액 제조공정의 개발 : 과일에 함유된 단백질 분해효소를 이용한 액상조미액의 개발을 목적으로 단백질 분해효소가 함유되어 있는 것으로 잘 알려진 키위 및 파인애플 착즙액을 이용하였다. 액상조미액 제조를 위한 단백질 공급원으로서 기존의 액상조미료를 생산하고 있는 타업체의 정보를 토대로 활성글루텐을 사용하였다. 물(수돗물)을 121℃로 20분간 멸균하여 냉각한 후 활성글루텐의 농도가 20%가 되게 첨가하고 키위 착즙액 3%, 파인애플 착즙액 3%를 각각 첨가하여 Shaking incubator에서 50℃에서 90spm의 조건으로 24시간 분해하였다. 활성글루텐에 물을 첨가한 후 멸균하는 방법이 아닌 냉각된 멸균수에 활성글루텐을 첨가한 것은 활성글루텐과 물을 함께 넣은 후 멸균 시 활성글루텐이 뭉쳐(고무화) 분해가 용이하지 않다는 점과 일반 수도수에 활성글루텐을 첨가하여 실험 시 미생물 오염



에 의해 장시간 분해가 어렵다는 예비실험의 결과를 토대로 고안되어졌다. 과일 착즙액에 의한 단백질의 분해 정도는 반응 상등액에 함유된 총질소와 아미노태질소(아미노산 레벨까지의 분해)를 분석하여 판명하였다.

(나) 시판 산업용 효소를 이용한 액상조미액 제조공정의 개발 : 과일 착즙액에 의한 액상조미액의 실험 결과, 단백질 분해능이 현저히 떨어지는 것이 확인됨에 따라 시판되고 있는 산업용 효소인 Maxazyme, Flavourzyme, Alcalase, Promod 를 이용한 활성글루텐 단백질 분해능을 검토하고자 하였다. 단백질 분해능 실험은 활성글루텐 20%용액에 효소 제조사가 제시한 최적 사용농도를 참조로 하여 Maxazyme 0.03%, Flavourzyme 0.7%, Alcalase 0.1%, Promod 0.2%를 각각 첨가한 후 50℃에서 24시간 분해하였다.

(다) 액상조미액 개발을 위한 제조조건의 확립

① 반응온도 및 원료에 따른 단백질 분해능 : 조미액의 산업적 생산에 주로 이용되는 식물성 단백질 소재는 고단백의 콩(탈지대두)과 소맥 유래의 활성글루텐을 주로 사용되고 있다. 이에 본 연구에서는 단백질 공급원으로 증자 탈지대두와 활성글루텐을 이용하여 반응온도에 따른 단백질 분해능을 검토하고자 하였다. 상기 실험에서 얻어진 결과를 토대로 키위와 파인애플의 착즙액을 이용한 시험구에서는 단백질 분해능을 높이기 위해 그 첨가량을 3%에서 5%로 상향 조정하였으며 효소제는 Flavourzyme과 Promod를 상기 실험과 동일한 농도로 첨가하여 30℃와 50℃에서 24시간 동안 분해하였다.

② 반응시간에 따른 단백질 분해능 검토 : 반응온도 및 단백질 공급원 원료가 선정됨에 따라 분해 시간에 따른 단백질 분해능을 검토하였다. 상기와 동일한 조건으로 50℃에서 24시간, 72시간 반응하여 그 상등액을 단백질 분해능 시험에 이용하였다.

③ 활성글루텐 분해 조미액의 관능검사 : 효소제를 활용한 활성글루텐 분해능 시험에서 총질소 및 아미노태질소 함량이 일정 수준 향상됨에 따라 이들 분해 산물들에 대한 자체 관능검사를 실시하였다.

## (2) 활성글루텐 분해물의 관능적 향상을 위한 공정 개발

(가) 염을 이용한 활성글루텐 분해물의 관능 향상 공정 개발 : 발효에 의한 양조간장제조 및 염산을 이용한 산분해간장 제조 시 분해산물에서 쓴맛이 발생하지 않는다는 사실에 근거로 소금 첨가에 의한 활성글루텐 분해산물의 쓴맛에 대한 관능적 개선을 검토하였다.

(나) Flavourzyme과 간장 제국물(메주)을 이용한 액상조미액의 개발 : 염수를 첨가한 효소분해 활성글루텐 산물의 관능검사 결과, 효소 분해에 의해 생성되는 쓴맛을 현저히 개선할 수 있었으나 일부 쓴맛의 잔류와 감칠맛이 부족한 것으로 판단되었다. 이에 간장제조공정을 응용하여 감칠맛의 향상과 효소분해에 의해 생성되는 쓴맛을 해결하고자 하였다.

## (3) 천연 액상조미료 개발

① 제조공정 : 최근 건강에 대한 소비자의 관심 증가와 편리성을 겸비한 액상조미료의 시장이 증대됨에 따라 몽고식품(주)는 본 연구를 통해 액상조미료의 개발을 진행하였다. 상기에서 개발한 액상조미 소재에 대한 관능적 평가 결과, 산업적 활용에는 아직 미흡한 것으로 판단되어 야채 및 건어물 육수에 간장원액 및 굴추출물 등을 혼합한 액상조미료 시제품을 제조하였다.

② 액상조미료 시제품의 관능검사 : 당사에서 개발한 액상조미액과 타사에서 시판 중인 액상조미료에 대한 요리 전문가의 관능평가를 위해 쿠킹클래스 강사에게 요리를 통한 관능검사를 의뢰하였다.

#### (4) 불고기 전골 소스의 개발

본 연구를 통해 우리나라 전통요리의 하나인 불고기 전골용 소스의 제조공정 및 배합비를 자체적으로 개발하고자 하였다. 당사 간장 제품을 주요 베이스로 과일추출액 및 마늘 농축액을 첨가한 불고기 전골 소스의 배합비를 자체 관능평가를 통해 확립하였다(배합비 비공개). 배합, 살균 여과의 제조공정을 확립한 후 시제품을 제조하여 그 이화학적 분석과 최종 관능 평가를 실시하였다. 관능평가의 공정성을 위해 요리 전문가에게 소스자체의 맛 평가 및 음식 요리 후 요리에 대한 맛의 평가를 의뢰하였다.

### 3-2. 3차년도 연구결과

#### 가. 가바(GABA) 생성 생균제제 유산균 선발 및 동정

##### (1) 가바(GABA) 생성 유산균 선발 및 전환율 확인

(가) 가바(GABA) 생성 유산균 분리 : 기존에 실험실에서 김치, 식물추출발효음료 및 막걸리 등으로부터 분리하여 보관해둔 약 500여종의 젖산균으로부터 GABA를 생성하는 10종의 젖산균을 확인(Fig. 1-3-2)하였다.

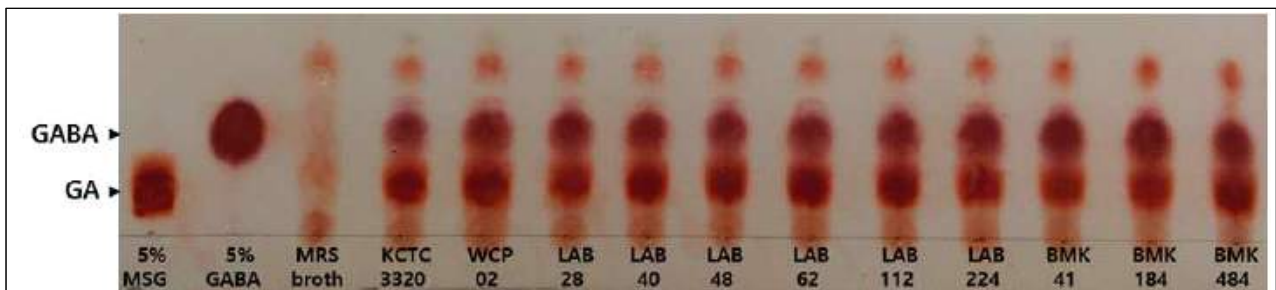


Fig. 1-3-2. Typical TLC profiling of glutamic acid (GA) and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA).

(나) 가바(GABA) 생성 유산균의 기질별 GABA 생성능 확인 :

① 글루탐산 기질 : 0.1% MSG 첨가 시에는 0.05%보다 전환율이 다소 증가하는 경향을 나타내었다. 초기 glutamic acid 함량은 1182.30 mg/100 ml 있었으며 배양 60시간째 공시균주의 경우 39.27 mg/100 ml 있었고, 발효가 진행됨에 따라 대부분의 glutamic acid를 감소하였으나 GABA는 560.12 mg/100 ml 있었으며 이때 전환율은 93.45%로 아주 우수하였다. WCP02 균주는 glutamic acid는 29.58 mg/100 ml, GABA는 572.23 mg/ml로 전환율 95.08%로 가정 우수하였다. 이러한 결과로 MSG 농도가 높다하더라도 GABA 생성에는 한계가 있는 것으로 판단하였다.

② 활성글루텐 기질 : 생균제제능이 가장 우수한 WCP02 균주는 glutamic acid 함량은 4.08 mg/100 ml 있었고, GABA 함량은 23.58 mg/100 ml으로 전환율은 85.25%로 11종의 유산균 가장 높은 전환율이 나타내었다. 이외 물김치에서 분리한 BMK41, BMK184 및 BMK484 균주들 역시 전환율이 80% 이상으로 높은 전환율을 나타내었다(Table 1-3-2).

③ 대두단백질 기질 : 분공시균주(KCTC3320)은 glutamic acid 함량은 135.56 mg/100 ml 있었고, GABA 함량은 193.43 mg/100 ml으로 전환율은 58.79%로 있었다. 한편 생균제제능이 가장 우수한 WCP02 균주는 glutamic acid 함량은 108.89 mg/100 ml 있었고, GABA 함량은 197.19 mg/100 ml으로 전환율은 64.42%로 11종의 유산균 중 두번째로 높은 전환율을 나타내었다(Table 1-3-2 & Fig. 1-3-3). 이외 물김치에서 분리한 BMK41, BMK184 및 BMK484 균주들 역시 전환율

이 60% 이상으로 그중 BMK41 균주는 66.33%로 유산균 중 가장 높은 전환율을 나타내었다.

Table 1-3-1. Conversion rate of lactic acid bacteria isolated under MSG substrates

Isolates	Contents <sup>1)</sup> (mg/100 ml) / Conversion rate <sup>2)</sup> (%)					
	0.05% MSG			0.1% MSG		
	GA	GABA	Rate (%)	GA	GABA	Rate (%)
NIM <sup>3)</sup>	844.58	42.86	-	1182.30	35.30	-
KCTC3320	66.65	581.43	89.72	39.27	560.12	93.45
<b>WCP02</b>	<b>43.72</b>	<b>629.79</b>	<b>93.51</b>	<b>29.58</b>	<b>572.23</b>	<b>95.08</b>
LAB28	236.62	479.56	66.96	192.33	474.53	71.16
LAB40	97.17	586.30	85.78	52.91	602.76	91.93
LAB48	81.08	588.88	87.90	48.66	531.00	91.61
LAB62	98.73	577.21	85.39	129.48	596.46	82.16
LAB112	107.39	609.92	85.03	80.61	573.88	87.68
LAB224	101.58	578.41	85.06	48.74	613.36	92.64
BMK41	120.97	576.27	82.65	124.77	583.66	82.39
BMK184	131.69	558.92	80.93	132.68	512.82	79.44
BMK484	78.65	530.70	87.09	83.03	597.54	87.80

<sup>1)</sup>All values are means of determinations in three independent experiments.

<sup>2)</sup>GABA conversion rate were determined using the following equation: % GABA = GABA/(GA+GABA) × 100: GA, glutamic acid, GABA,  $\gamma$ -aminobutyric acid.

<sup>3)</sup>NIM, not incubation microorganism.

Table 1-3-2. Conversion rate of lactic acid bacteria isolated under gluten and soy-protein substrates

Strains	Contents <sup>1)</sup> (mg/100 ml) / Conversion rate <sup>2)</sup> (%)					
	5% Gluten			5% Soy-protein		
	GA	GABA	Rate (%)	GA	GABA	Rate (%)
NIM <sup>3)</sup>	25.73	1.12	-	250.69	27.09	-
KCTC3320	4.08	23.58	85.25	135.56	193.43	58.79
<b>WCP02</b>	<b>4.83</b>	<b>23.47</b>	<b>82.93</b>	<b>108.89</b>	<b>197.19</b>	<b>64.42</b>
LAB28	6.71	18.56	73.45	115.64	169.08	59.07
LAB40	9.07	24.01	72.58	61.39	141.56	69.75
LAB48	8.07	24.92	75.54	123.18	197.65	61.61
LAB62	12.13	21.34	63.76	142.36	189.06	57.05
LAB112	9.17	23.68	72.09	113.28	200.65	63.92
LAB224	10.39	18.91	64.54	117.54	195.98	62.51
BMK41	6.43	35.28	84.58	88.48	174.29	66.33
BMK184	6.78	32.11	82.56	120.29	189.19	61.13
BMK484	5.94	24.84	80.70	113.78	185.29	61.96

<sup>1)</sup>All values are means of determinations in three independent experiments.

<sup>2)</sup>GABA conversion rate were determined using the following equation: % GABA = GABA/(GA+GABA) × 100: GA, glutamic acid, GABA,  $\gamma$ -aminobutyric acid.

<sup>3)</sup>NIM, not incubation microorganism.

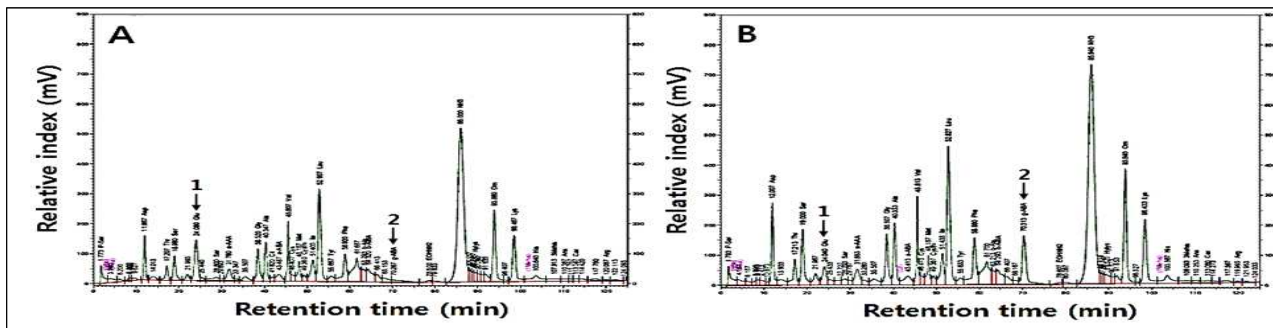


Fig. 1-3-3. AAA chromatogram of glutamic acid and GABA in the soy-protein broth by *Lac. brevis* WCP02. A, Soy-protein broth without LAB; and B, Soy-protein broth with *Lac. brevis* WCP02. 1, Glutamic acid; and 2,  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA).

## (2) 가바(GABA) 생성 유산균의 생존능력 확인

(가) 인공위액산 내성 : WCP02 균주는 배양 2시간째 44.43%에서 배양 4시간째 39.64%로 약간 감소한 것으로 나타나 인공위액산에 대한 내성을 획득한 것으로 추정하였다. pH 2.5에서는 LAB 112 균주들 제외한 나머지 젖산균들은 모두 생존율이 우수하였다. pH 3.0의 환경에서는 모든 젖산균들이 배양 2시간째와 4시간째 생존수의 변화가 크게 없는 것으로 나타났다. 한편 WCP 02(102.244%) 및 BMK 484(105.19%) 균주는 배양 4시간째 오히려 생존수가 증가하는 것으로 나타났다(Table 1-3-3).

Table 1-3-3. Survival of lactic acid bacteria isolated under artificial gastric acidic conditions

Isolates	Survival rate <sup>1)</sup> (%) / Incubation time (hr)					
	pH 2.0		pH 2.5		pH 3.0	
	2	4	2	4	2	4
KCTC 3320	15.27	nd <sup>2)</sup>	49.51	33.48	94.05	94.86
<b>WCP02</b>	<b>44.43</b>	<b>39.64</b>	<b>50.68</b>	<b>35.18</b>	<b>98.86</b>	<b>102.24</b>
LAB 28	42.52	38.27	46.97	33.02	94.74	96.65
LAB 40	36.59	32.54	48.21	33.85	95.65	92.77
LAB 48	nd	nd	49.38	34.47	91.64	88.62
LAB 62	18.30	11.42	50.11	35.22	94.14	90.56
LAB 112	nd	nd	nd	nd	96.91	91.46
LAB 224	nd	nd	28.88	27.41	97.52	95.32
BMK 41	nd	nd	93.24	93.80	105.65	94.29
BMK 184	nd	nd	88.61	91.43	101.32	85.42
BMK 484	24.30	nd	90.26	108.07	93.91	105.19

<sup>1)</sup>Each isolated strains was tested in triplicate for its tolerance in artificial gastric acidified MRS broth. <sup>2)</sup>nd, not detected.

(나) 담즙산 내성: WCP02 균주는 51.26%로 가장 우수하였다. 한편 pH 3.0에서는 BMK 41, 184, 484 균주는 모두 사멸하였고 나머지 젖산균들은 우수한 생존율을 나타내었다(Table 1-3-4).

Table 1-3-4. Survival of lactic acid bacteria isolated under bile acidic conditions

Isolates	Survival rate <sup>1)</sup> (%)		
	pH 2.0	pH 2.5	pH 3.0
KCTC3320	nd <sup>2)</sup>	49.58	79.59
<b>WCP02</b>	<b>nd</b>	<b>51.26</b>	<b>86.25</b>
LAB28	nd	38.98	74.54
LAB40	nd	42.10	61.22
LAB48	nd	nd	60.09
LAB62	nd	nd	59.25
LAB112	nd	nd	49.65
LAB224	nd	nd	66.66
BMK41	nd	nd	nd
BMK184	nd	nd	nd
BMK484	nd	nd	nd

<sup>1)</sup>Each isolated strains was tested in triplicate for its tolerance in artificial gastric acidified MRS broth with bile acid.

<sup>2)</sup>nd, not detected.

## (3) 가바(GABA) 생성 유산균의 생리활성 확인

(가) 라디칼 소거활성 :DPPH 라디칼 소거활성은 WCP02 균주 분말에서 112.39%로 가장 우수하게 나타났으며 BMK184(67.99%) 균주 분말들은 50%가 넘는 비교적 우수한 라디칼 소거활

성을 나타내었다. 한편 *Lac. plantarum* 균주인 P1201 분말 또한 99.93%의 우수한 라디칼 소거 활성을 나타내었다. ABTS 라디칼 소거활성은 평균 98%의 라디칼 소거활성을 나타내었고 hydroxyl 라디칼은 평균 39%의 소거활성을 나타내었다(Fig. 1-3-4).

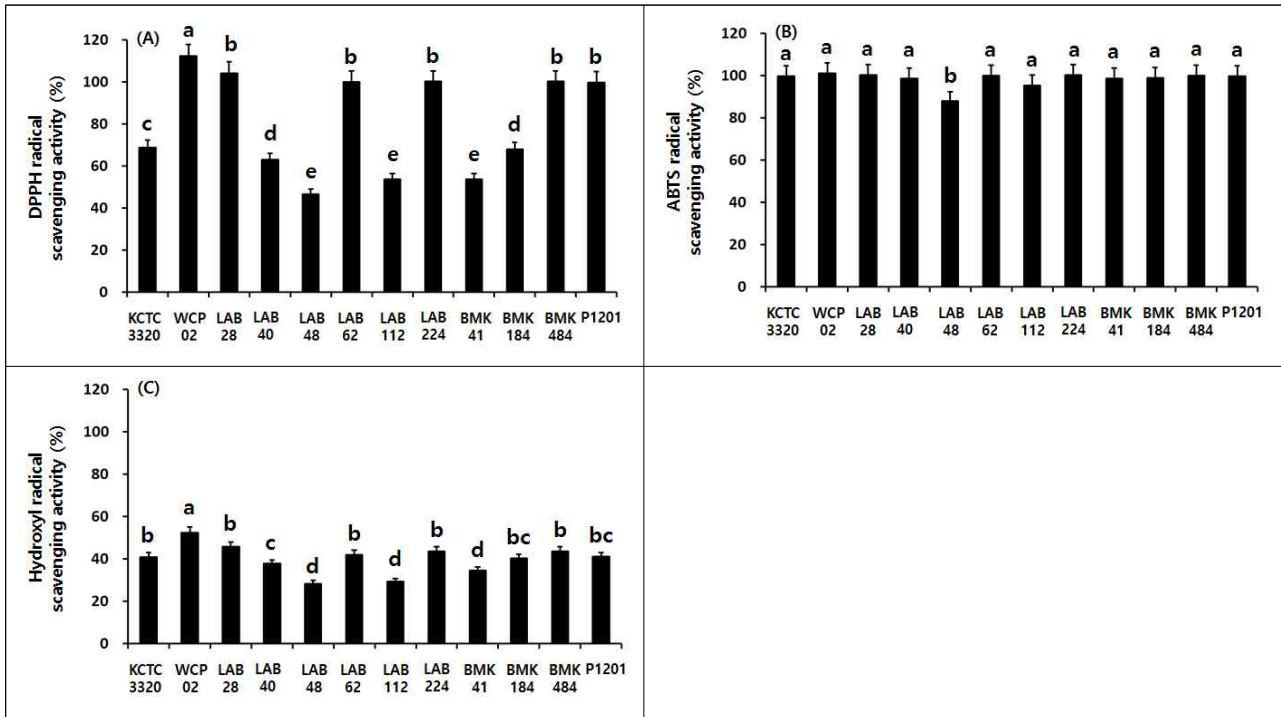


Fig. 1-3-4. Comparison of DPPH (A), ABTS (B), and hydroxyl (C) radical scavenging activity of the various cell freezing powders.

(나) 소화효소 저해활성 : 탄수화물 분해효소인  $\alpha$ -glucosidase 저해활성은 WCP02 및 BMK184 균주 동결건조 분말에서 4.19%로 이들 중 가장 높게 측정되어졌으나 평균 3.55%로 아주 낮은 저해활성을 나타내었다. 한편 지방분해효소인 lipase 저해활성은 29.24%로 WCP02 균주 동결건조 분말에서 가장 높게 측정되었다(Fig. 1-3-5).

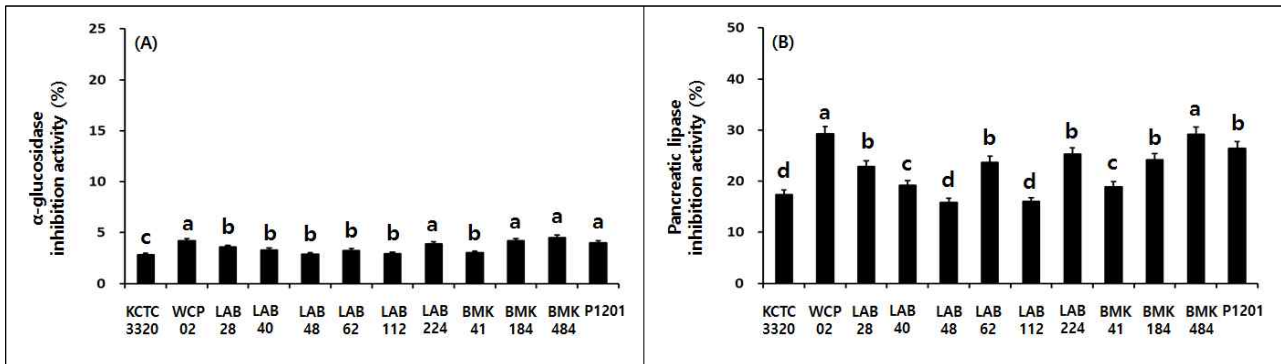


Fig. 1-3-5. Comparison of  $\alpha$ -glucosidase (A) and pancreatic lipase (B) inhibition activity of the various cell freezing powders.

### (3) 가바(GABA) 생성 유산균 WCP02 및 BMK184 균주의 동정

(가) 형태학적 및 생화학적 특성 : 그람 양성세균 간균으로 생육특성은 10 ~ 40°C 사이의 온도에서는 생육이 활발하였고 내염성은 6%까지는 생육이 가능하였다. pH 3.0 배양 조건에서는 생육 활성이 약하였으나 5, 7, 9, 11 조건에서는 생육이 활발하였다. 생화학적 특성인 당 이용성 결과, WCP02 균주는 L-arbinose, ribose, D-xylose, galactose, D-fructose, D-glucose,  $\alpha$

-methyl-D-glucoside, esculine, maltose, melibiose, gluconate를 이용할 수 있었고 BMK184 균주는 이외에도 2 ceto-gluconate와 5 ceto-gluconate 역시 이용하였다(Table 1-3-5).

Table 1-3-5. Phenotypic characteristics of *Lac. brevis* WCP02 and BMK184 strains

Characteristics	Reaction		Characteristics	Reaction	
	WCP02	BMK184		WCP02	BMK184
<b>Morphology</b>			Ribose	+	+
Shape	Rod	Rod	D-Xylose	+	+
Gram stain	+	+	L-Xylose	-	-
Cell dimension	2-8 $\mu$ m	2-8 $\mu$ m	Adonitol	-	-
<b>Physiological properties</b>			$\beta$ -Methyl-xyloside	-	-
Aerobic growth	+	+	Galactose	+	+
Growth at			D-Glucose	+	+
10°C	w	w	D-Fructose	+	+
20°C	+	+	D-Mannose	-	-
25°C	+	+	L-sorbose	-	-
30°C	+	+	Rhamnose	-	-
35°C	+	+	Dulcitol	-	-
40°C	+	+	Inositol	-	-
50°C	w	-	Mannitol	-	-
Growth in NaCl			Sorbitol	-	-
0%	+	+	$\alpha$ Methyl-D-mannoside	-	-
2%	+	+	$\alpha$ Methyl-D-glucoside	+	+
4%	+	+	N Acetyl glucosamine	+	+
6%	+	+	Amygdaline	-	-
8%	-	w	Arbutine	-	-
10%	-	-	Esculine	+	+
pH			Salicine	-	-
3	w	-	Cellobiose	-	-
5	+	+	Maltose	+	+
7	+	+	Lactose	-	-
9	+	+	Melibiose	+	+
11	+	+	Saccharose	-	-
<b>Carbohydrates</b>			Trehalose	-	-
Control	-	-	Inuline	-	-
Glycerol	-	-	Melezitose	-	-
Erythritol	-	-	D-Raffinose	-	-
D-Arabinose	-	-	Amidon	-	-
L-Arabinose	+	+	Glycogene	-	-
Xylitol	-	-	L-Fucose	-	-
$\beta$ -Gentiobiose	-	-	D-Arabitol	-	-
D-Turanose	-	-	L-Arabitol	-	-
D-Lyxose	-	-	Gluconate	+	+
D-Tagatose	-	-	2 ceto-gluconate	-	+
D-Fucose	-	-	5 ceto-gluconate	-	+

\* Symbol: +, positive reaction; -, negative reaction; w, weak reaction.

(나) 균체 지방산의 화학적 조성 및 16S rRNA 염기서열 확인 : GABA 생성 유산균 WCP02 및 BMK184 균체의 지방산 조성은 포화 지방산에서는 palmitic acid (C16:0)가 32.37%로 가장 많은 비율을 차지하였고 이어서 11,12-mithylene hexadecanoic acid (C19:0 CYCLO)가 17.16%로 두 번째 높은 비율을 차지하였다. 불포화 지방산에서는 oleic acid w9c (C18:1)가 4.14%로 가장 많은 비율을 차지하였으며 이 외 불포화 지방산들은 0.26~0.95%를 차지하고 있었다(1-3-6). 16S rRNA 분석결과, 두 균주 모두 *Lactobacillus brevis*와 99% 상동성을 나타내었다.

Table 1-3-6. Fatty acid methyl ester composition (%) of WCP02 and BMK184 strains

Fatty acid	Contents	
	WCP02	BMK184
<b>Straight-chain saturated</b>		
C12:0	0.17	0.13
C14:0	3.22	2.42
C16:0	32.37	32.42
C16:0 3OH	0.16	-
C17:0 CYCLO	0.16	-
C17:0 2OH	0.68	0.67
C18:0	1.54	1.49
C19:0 ISO	0.95	-
C19:0 CYCLO w8c	17.16	21.23
C20:0	0.51	0.24
<b>Mono-unsaturated</b>		
C18:1 w7c 11-methyl	0.34	0.43
C18:1 w9c	4.14	5.51
C19:1 ISO	0.95	0.92
C19:1 ISO I	-	0.31
C20:1 w7c	0.29	0.23
C20:2 w6,9c	0.26	-
<b>Sum In Feature*</b>		
3	3.62	3.34
7*	14.51	10.55
8*	19.93	19.97

\*Summed features represent of two or three fatty acids that could not be separated by GC with the Microbial Identification (MIDD). Summed feature 3 : C15:0 ISO 20H/C16:1w7c; Summed feature 7 : C19:0 CYCLO w10d/C19w6; and Summed feature 8 : C18:1 w7c.

#### 나. WCP02 균주를 이용한 천연발효조미료 제조 및 발효특성

##### (1) 이화학적 특성 변화

(가) pH : 3가지 발효 기질들은 모두 공통적으로 발효가 진행됨에 따라 pH 수치가 조금씩 감소하여 20% 활성글루텐은 발효 30일째 5.00이었으며 10% 활성글루텐+10% 콩알메주는 5.09, 20% 콩알메주 기질은 5.34를 나타내었다(Table 1-3-7).

(나) 산도 및 염도 : 산도는 증가하였으며 20% 활성글루텐 기질이 1.35%로 가장 높은 산미를 나타내었으며, 염도는 발효 후 7.23 ~ 7.70%로 발효가 진행됨에 따라 조금씩 증가하였다 (Table 1-3-7).

Table 1-3-7. Change of physicochemical properties during the fermentation of 20% vital wheat gluten (VWG), 10% VWG+10% SM, and 20% SM with *Lac. brevis* WCP02

Samples		Contents <sup>1)</sup>			
		pH	Acidity (%, as lactic acid)	Salinity (%, as NaCl)	Protein (mg/ml)
AG	BF	5.35	0.80	6.98	26.98
	AF	5.00	1.35	7.23	28.82
AG+soybean	BF	5.78	0.98	6.40	25.09
	AF	5.09	1.19	7.70	35.24
Soybean	BF	6.11	0.87	6.11	29.09
	AF	5.34	1.12	7.30	27.35

<sup>1)</sup>All values are means of determinations in three independent experiments.

(다) 수용성단백질 : 단백질 함량은 20% 콩알메주의 경우 발효 30일째 약간 감소하여 27.35

mg/ml를 나타내었으나 20% 활성글루텐과 10% 활성글루텐+10% 콩알메주는 각각 28.32 mg/ml 및 35.24 mg/ml로 증가하였다(Table 1-3-7).

(라) 글루탐산(GA)와 가바(GABA) : 가수분해물의 발효 전후 글루탐산과 가바 함량을 분석한 결과는 발효 후에 글루탐산 함량은 감소하였고, 이에 상응하여 가바 함량은 증가하였다. 활성글루텐만을 발효시킨 경우 발효 후 글루탐산과 가바 함량은 각각 336.9 mg/100 mL과 342.56 mg/100 mL 있었고 콩-메주의 경우 422.01 mg/100 mL과 1365.24 mg/mL 있었고 혼합의 경우 458.95 mg/100 mL과 1129.44 mg/mL 있었다(Table 1-3-8).

Table 1-3-8. Change of amino acid contents during the fermentation of 20% vital wheat gluten (VWG), 10% VWG+10% SM, and 20% SM with *Lac. brevis* WCP02

Contents <sup>D</sup> (mg/100 mL)	Samples					
	20% Gluten		10% Gluten+10% soy-meju		20% Soy-meju	
	BF	AF	BF	AF	BF	AF
Glutamic acid	559.68	336.90	1305.44	458.95	1709.39	422.01
$\gamma$ -aminobutyric acid	11.92	342.56	24.63	1129.44	31.57	1365.24
Total amino acids	6084.48	9189.46	10747.65	13946.25	10718.38	13672.42

<sup>D</sup> All values are presented as the mean $\pm$ SD of triplicate determination.

(2) 생리활성물질 및 생리활성 변화

(가) Isoflavones : 발효 초기 10% 활성글루텐+ 10% 콩알메주의 daidzein 및 genistein 함량은 각각 37.27  $\mu$ g/g 및 20.58  $\mu$ g/g이었다. 발효 60일째에는 각각 33.88  $\mu$ g/g과 20.58  $\mu$ g/g으로 약간 감소한 것으로 나타났다. 20% 콩알메주 조미료는 발효 0일째 daidzein과 genistein 함량이 각각 74.26  $\mu$ g/g 및 43.83  $\mu$ g/g이었으나 발효 60일째에는 70.90  $\mu$ g/g과 40.66  $\mu$ g/g으로 이 역시 약간 감소하였다(Table 1-3-9).

Table 1-3-9. Change of isoflavone contents during the fermentation of 20% vital wheat gluten (VWG), 10% VWG+10% soy-meju (SM), and 20% SM with *Lac. brevis* WCP02

Contents <sup>D</sup> ( $\mu$ g/g)	Samples					
	20% Gluten		10% Gluten+10% soy-meju		20% Soy-meju	
	BF	AF	BF	AF	BF	AF
<b>Glycosides</b>						
Daidzin	nd	nd	11.13	16.92	7.06	4.88
Glycitin	nd	nd	31.62	23.55	27.05	14.17
Genistin	nd	nd	9.43	10.22	15.83	13.12
Total	nd	nd	52.18	50.69	49.94	32.17
<b>Aglycones</b>						
Daidzein	nd	nd	40.47	37.43	77.62	82.50
Glycitein	nd	nd	6.79	6.50	12.78	12.96
Genistein	nd	nd	24.29	21.91	46.47	47.82
Total	nd	nd	71.55	65.84	136.87	143.28
<b>Totals</b>	nd	nd	123.73	116.53	186.81	175.45

<sup>D</sup>All values are presented as the mean $\pm$ SD of triplicate determination. <sup>2</sup>nd: not detected.

(나) 총 phenolics : 발효 초기에는 0.95~1.05 mg/g 수준이었으며 발효가 진행됨에 따라 서서히 증가하였다. 발효 30일째 각각 1.03(20% AG), 1.17(10% AG+10% SM), 1.17(20% SM) mg/g 수준을 나타내었다(Fig. 1-3-6A).

(다) DPPH 라디칼 소거활성 : DPPH 라디칼 소거활성은 20% 활성글루텐의 경우에만 발효 과정 중 조금씩 증가하였고 발효 60일째 72.69를 나타내었다. 10% 활성글루텐과 10% 콩알메주를 혼합한 조미료와 20% 콩알메주 조미료의 경우는 발효에 따라 아주 조금씩 증가하였다. 발



호 60일째 각각 96.00%와 92.60%로 10% 활성글루텐과 10% 콩알메주를 혼합한 조미료가 조금 더 우수하였다(Fig. 1-3-6B).

(라) ABTS 라디칼 소거활성 : 20% 활성글루텐과 20% 콩알메주 조미료는 발효 과정 중 큰 변화가 없었다. 10% 활성글루텐과 10% 콩알메주를 혼합한 경우에는 발효 30일째 약간 증가하여 82.28%의 우수한 라디칼 소거활성을 나타내었다(Fig. 1-3-6C).

(마) Hydroxyl 라디칼 소거활성 :  $\cdot\text{OH}$  라디칼도 ABTS와 동일한 경향을 나타내었다. 20% 활성글루텐은 발효 30일째 45.78%로 가장 낮았으며 10% 활성글루텐+10% 콩알메주는 71.22%로 가장 우수하였다. 한편 20% 콩알메주는 65.38%를 나타내었다(Fig. 1-3-6D).

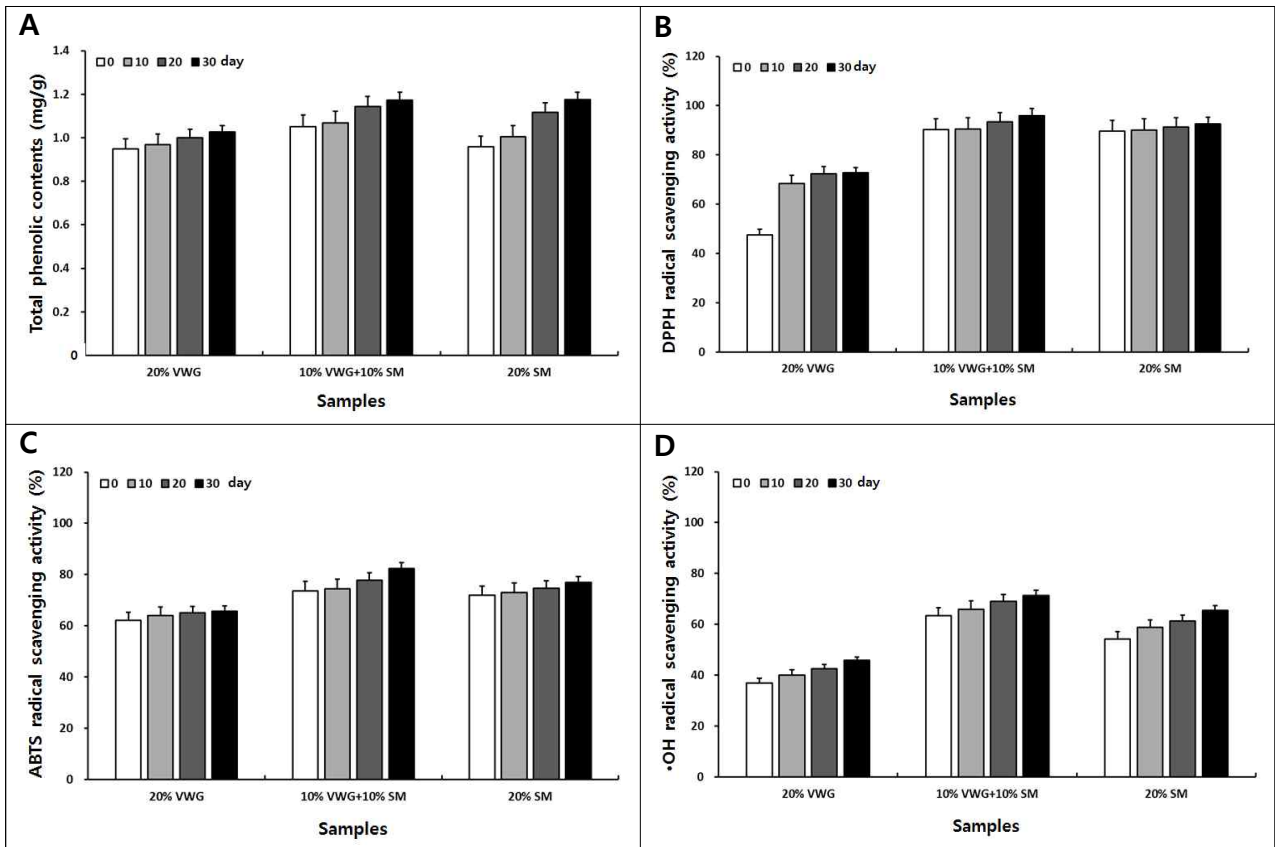


Fig. 1-3-6. Change of DPPH radical scavenging activity during the fermentation of 20% vital wheat gluten (VWG), 10% VWG+10% soy-meju (SM), and 20% SM with *Lac. brevis* WCP02.

(바)  $\alpha$ -Glucosidase 저해활성 : 20% 활성글루텐 조미료는  $\alpha$ -Glucosidase 효소 저해활성이 발효 초기부터 20일째까지는 나타나지 않았고 발효 30일째 1.69%로 아주 낮게 나타났다. 한편 10% 활성글루텐+10% 콩알메주 조미료는 발효 과정 중 서서히 증가하여 발효 30일째 30.51%를 나타내었고 20% 콩알메주는 25.30%를 나타내었다(Fig. 1-3-7A).

(사) Pancreatic lipase 저해활성 :  $\alpha$ -Glucosidase 저해활성과는 달리 lipase 저해활성은 20% 활성글루텐 조미료에서도 발효 과정 중 큰 변화는 없었으나 발효 30일째 17.03%를 나타내었다. 20% 콩알메주는 발효과정 중 조금씩 증가하여 23.77%의 지방분해 효소 저해활성을 나타내었고 혼합 조미료는 27.54%를 나타내었다(Fig. 1-3-7B).

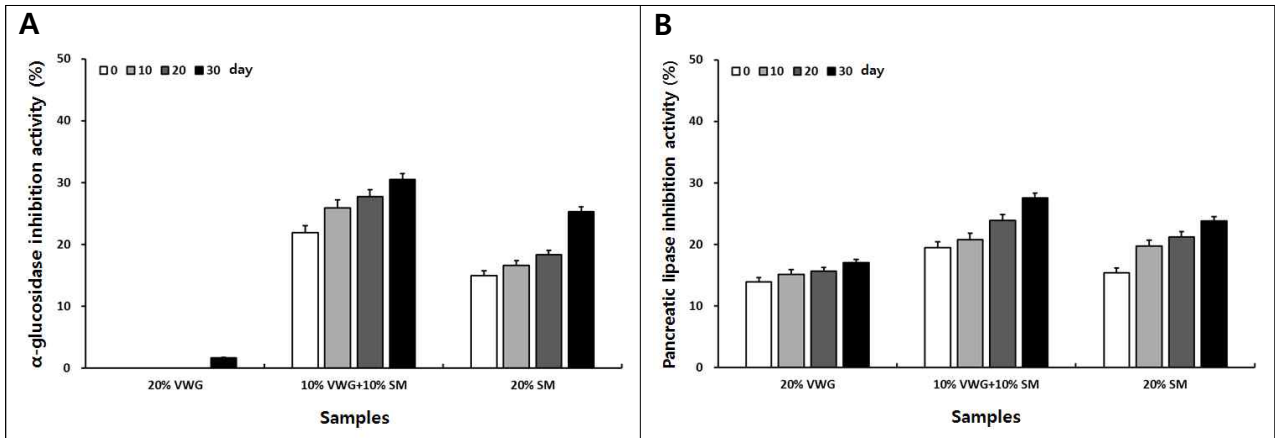


Fig. 1-3-7. Change of  $\alpha$ -glucosidase (A) and pancreatic lipase (B) inhibition activity during the fermentation of 20% vital wheat gluten (VWG), 10% VWG+10% soy-meju (SM), and 20% SM with *Lac. brevis* WCP02.

#### 다. 여주혼합과채-콩발효물의 특성

##### (1) 최적 발효조건 확립 : 최적 유산균 선발

###### (가) 이화학적 특성 및 GABA 함량 비교

① pH 및 산도: 유산균 단독 배양의 경우에는 P1201 균주가 pH가 3.56으로 가장 낮았으며 산도는 이에 따라 1.12%로 가장 높은 산미를 형성하였다. 혼합 종균을 이용한 경우에는 P1201+BMK184에서 3.75의 pH를 나타내었고 산도 역시 0.97% 있었다.

② 생균수: 생균수는 P1201+BMK184 혼합 종균이 14.31 log cfu/mL로 가장 많았으며 단독 배양의 경우에는 11.24 log cfu/mL로 BMK 184 균주가 가장 적은 것으로 나타났으나 이들 간의 큰 차이는 없었다.

③ 가바(GABA) 함량: 유산균을 배양하지 않은 경우 GABA 함량은 181.16 mg/100 mL로 나타났다. P1201 균주의 경우 170.82 mg/100 mL로 대조구보다 약간 낮은 수치를 나타내었다. 한편 *Lac. plantarum* P1201와 *Lac. brevis* BMK184의 혼합종균의 경우 GABA 함량은 224.12 mg/100 mL로 가장 높았다.

Table. 1-3-10. 유산균 단독 및 혼합 종균 이용 여주혼합과채 젖산발효음료의 이화학적 특성

Strains	Contents*			
	pH	Acidity (%, as lactic acid)	Viable cells (log cfu/mL)	GABA (mg/100 mL)
NIM**	5.53	0.25	nd***	181.16
P1201	3.56	1.12	12.69	170.82
BMK41	4.33	0.52	13.35	203.61
BMK184	4.18	0.56	11.24	202.31
BMK484	4.35	0.54	12.53	212.81
P1201+BMK41	3.83	0.90	13.12	201.95
P1201+BMK184	3.75	0.97	14.31	224.12
P1201+BMK484	4.01	0.83	13.36	197.39

\*All values are presented as the mean  $\pm$  SD of triplicate determination. \*\*NIM: Non incubation microorganism.

###### (나) DPPH 라디칼 소거활성 및 $\alpha$ -glucosidase 저해활성 확인

① DPPH 라디칼 소거활성: 유산균 배양을 하지 않은 경우 44.69%였으나 P1201 단독 배양 시에는 58.10%로 DPPH 라디칼 소거활성이 증가하였다. 혼합종균의 경우에는 P1201+BMK184

배양 시 56.68%로 가장 우수하였다(Fig. 1-3-8A).

②  $\alpha$ -Glucosidase 저해활성:  $\alpha$ -Glucosidase 저해활성은 P1201이 43.98%로 가장 우수하였고 대조구(40.94%) 또한 우수한 저해활성을 나타내었다. 라디칼 소거활성과 마찬가지로 혼합종균을 이용하였을 시에는 P1201+BMK184가 42.90%로 가장 우수하였다(Fig. 1-3-8B).

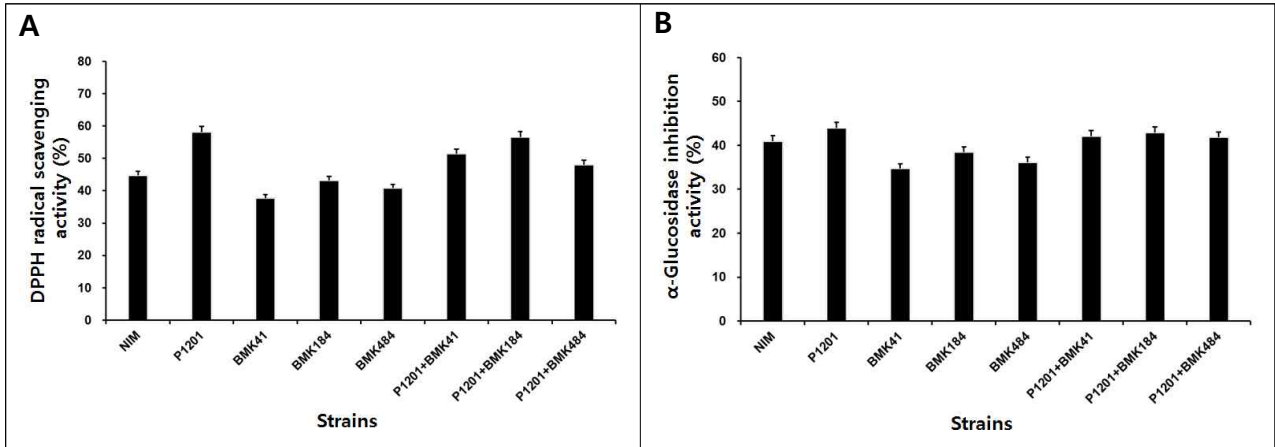


Fig. 1-3-8. 유산균 단독 및 혼합 종균 이용 여주혼합과채 젖산발효음료의 항산화 활성. A, DPPH radical scavenging activity and B,  $\alpha$ -glucosidase inhibition activity.

## (2) 최적 발효조건 확립 : 최적 발효온도 확인

(가) 이화학적 특성 및 GABA 함량 비교

① pH 및 산도: pH는 발효 온도에 따른 차이는 크게 없는 것으로 나타났다. 20-25°C에서는 pH가 4.25-4.24였으며 40°C에서는 3.29로 가장 낮게 나타났다. 산도 역시 40°C에서 발효시킨 경우 1.19%로 가장 높은 산미를 형성하였다(표 10).

② 생균수: 생균수는 발효가 진행됨에 따라 모두 증가하는 추세로 나타났다(표 10).

③ 가바(GABA): GABA 함량은 35°C에서 211.08 mg/100 mL로 가장 높게 나타나 GABA 생성 측면에서는 35°C가 최적의 발효온도인 것으로 판단된다.

Table 1-3-10. 발효온도에 따른 여주혼합과채 젖산발효음료의 이화학적 특성

Fermentation temperature (°C)	Contents*			
	pH	Acidity (% as lactic acid)	Total viable cells (log cfu/mL)	GABA (mg/100 mL)
20	4.25	0.49	13.19	170.89
25	4.24	0.54	13.97	172.10
30	4.02	0.79	12.67	183.79
35	3.92	1.13	13.65	211.08
40	3.29	1.19	10.94	141.50

\*All values are presented as the mean  $\pm$  SD of triplicate determination.

(나) DPPH 라디칼 소거활성 및  $\alpha$ -glucosidase 저해활성 확인

① DPPH 라디칼 소거활성: DPPH 라디칼 소거활성은 발효 온도가 높아질수록 증가하여 각각 27.60%, 30.32%, 36.95%, 44.42%로 나타났고 40°C에서는 약간 감소하여 39.28%의 소거활성을 나타내었다(Fig. 1-3-9A).

②  $\alpha$ -Glucosidase 저해활성: 20°C와 25°C는 각각 37.94%, 38.47%로 거의 유사한 탄수화물 분해 효소 저해능을 나타내었고 30°C에서는 이보다는 좀 더 증가하여 41.60%의 저해능을 나타내었다. 특히 35°C에서는 48.03%로 가장 우수한  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 나타내었다(Fig.

1-3-9B).

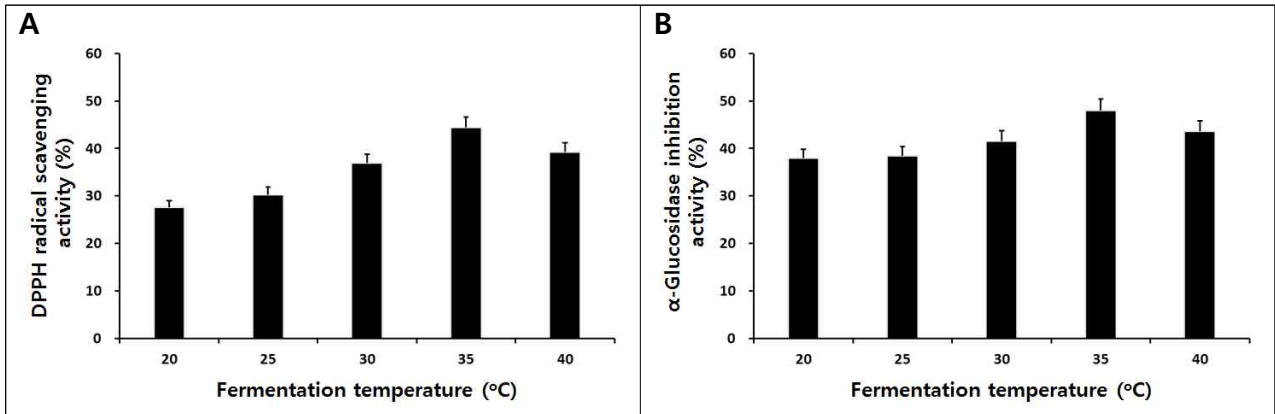


Fig. 1-3-9. 발효온도에 따른 여주혼합과채 젖산발효음료의 항산화 활성. A, DPPH radical scavenging activity and B,  $\alpha$ -glucosidase inhibition activity.

### (3) 최적 발효조건 확립 : 최적 발효시간 확인

(가) 이화학적 특성 및 GABA 함량 비교

① pH 및 산도: 발효가 진행될수록 pH는 점차적으로 감소하여 발효 72시간째는 3.82를 나타내었다. 산도는 발효 초기에 0.43%를 나타내었으나 pH 감소에 따라 조금씩 증가하여 발효 72시간째에는 1.26%를 나타내었다.

② 생균수: 생균수 역시 발효가 진행됨에 따라 증가하여 발효 72시간째 13.03 log cfu/g으로 최대 세포수를 나타내었다.

③ 가바(GABA) 함량: GABA는 발효가 진행됨에 따라 조금씩 증가하여 발효 0시간째에는 230.81 mg/100 mL에서 발효 12시간째 244.63 mg/100 mL, 발효 24시간째 258.84 mg/100 mL, 발효 36시간째 268.11 mg/100 mL, 발효 48시간째 274.76 mg/100 mL을 나타내었으나, 발효 72시간째에는 247.43 mg/100 mL로 약간 감소하였다.

Table 1-3-11. 발효시간에 따른 여주혼합과채 젖산발효음료의 이화학적 특성

Fermentation time (hr)	Contents*			
	pH	Acidity (% as lactic acid)	Total viable cells (log cfu/mL)	GABA (mg/100 mL)
0	5.04	0.43	8.13	230.81
12	4.41	0.45	9.43	244.63
24	4.26	0.49	9.65	258.84
36	4.09	0.77	9.09	268.11
48	4.01	0.79	12.50	270.63
60	3.91	1.15	13.19	274.76
72	3.82	1.26	13.03	247.43

\*All values are presented as the mean  $\pm$  SD of triplicate determination.

(나) DPPH 라디칼 소거활성 및  $\alpha$ -glucosidase 저해활성 확인

① DPPH 라디칼 소거활성: DPPH 라디칼 소거활성은 발효 초기부터 발효 36시간째까지는 증가하는 하였으나 큰 변화는 없는 것으로 나타났다. 이후 발효 48시간째 54.03%로 조금 증가하였고 60시간째 58.10%로 최대치를 나타낸 후에 52.31%로 약간 감소하였다(Fig. 1-3-10A).

②  $\alpha$ -Glucosidase 저해활성: 당 분해효소 저해활성은 발효 초기에 38%로 나타났고 발효 12시간째에는 42%로 증가하였다. 이후에도 꾸준히 증가하였고 발효 72시간째에는 약간 감소하

여 최종 47%의 저해활성을 나타내었다(Fig. 1-3-10B).

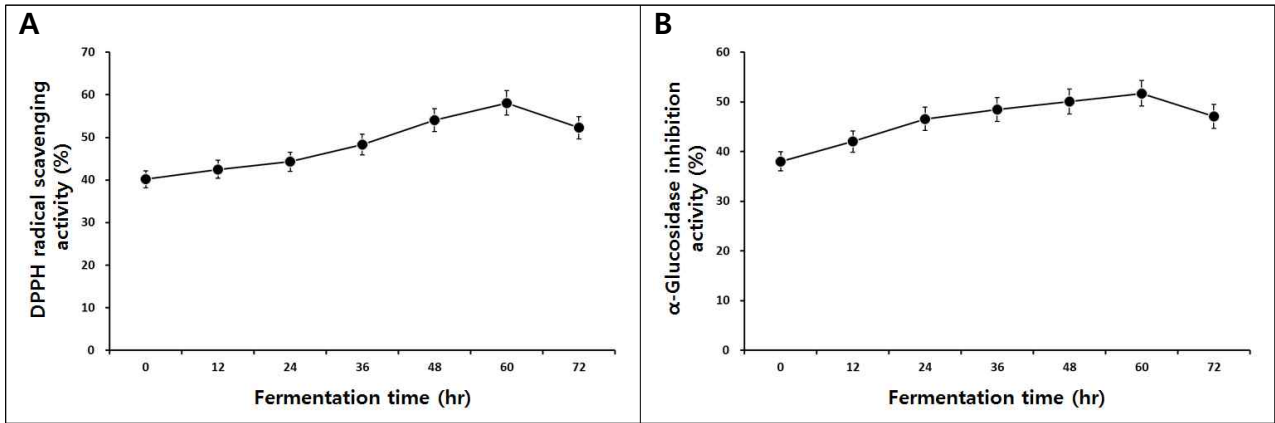


Fig. 1-3-10. 발효시간에 따른 여주혼합과채 젖산발효음료의 항산화 활성. A, DPPH radical scavenging activity and B,  $\alpha$ -glucosidase inhibition activity.

### 라. 생물공정기술(유산발효 포함) 적용 활성도라지 제조

#### (1) 이화학적 특성

(가) pH : 도라지의 pH를 측정한 결과 Fig. 1-3-11A와 같았다. 원료 도라지의 pH는 6.07이었으며 증자 도라지는 이보다 좀 낮은 5.26으로 측정되어졌다. 발효 도라지는 4.02로 나타났으며 이는 젖산생성에 기인한 것으로 추정하였다. 젖산발효-숙성 도라지는 3.71로 가장 낮게 나타났고 숙성 도라지는 4.21이었다.

(나) 산도 : 산도는 0.14%(원료 도라지), 0.17%(증자 도라지), 0.39%(젖산발효 도라지), 0.64%(젖산발효-숙성 도라지), 0.34%(숙성 도라지)로 pH 수치에 비례하여 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 1-3-11B).

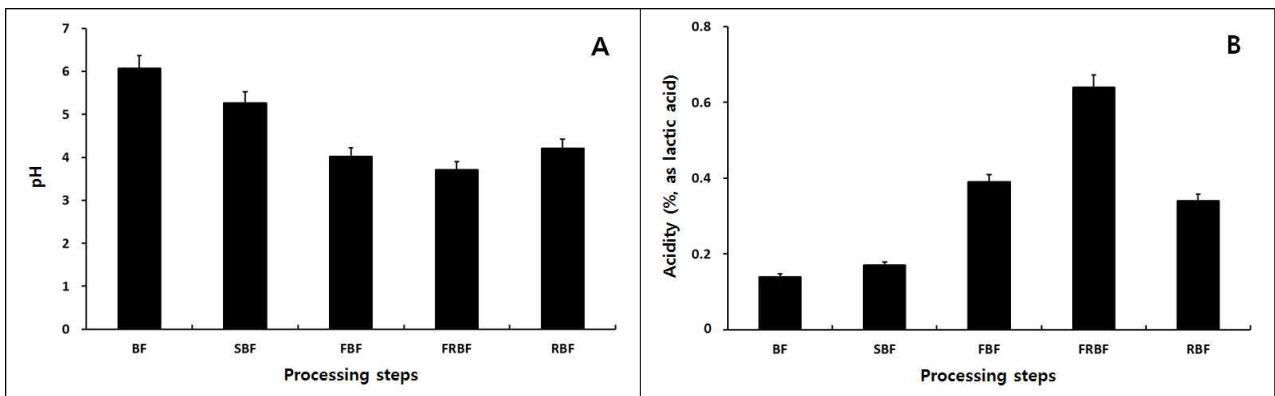


Fig. 1-3-11. Change of pH (A) and acidity (B) on bio-processing steps of fermentive and ripening balloon flower.

#### (2) 생리활성물질

(가) 총 phenolics : 도라지의 총 phenolics 함량은 원료 도라지가 0.53 mg/g으로 함량이 가장 적었으며 숙성 도라지가 0.62 mg/g으로 가장 높았으며, 가공 중 증가는 하였으나 이들 간의 큰 차이는 없는 것으로 나타났다(Fig. 1-3-12A).

(나) 총 flavonoids : 총 flavonoids 함량을 측정한 결과 원료와 증자 도라지의 경우에는 각각 0.11 및 0.16 mg/g의 아주 적은 양이 측정되어졌으나 발효와 숙성 처리를 함에 따라 조금씩 증가하여 젖산발효 도라지는 0.37 mg/g을 나타내었고 젖산발효-숙성 도라지는 0.59 mg/g을 나타

내었다. 한편 숙성 도라지는 0.89 mg으로 가장 높은 것으로 나타났다(Fig. 1-3-12B).

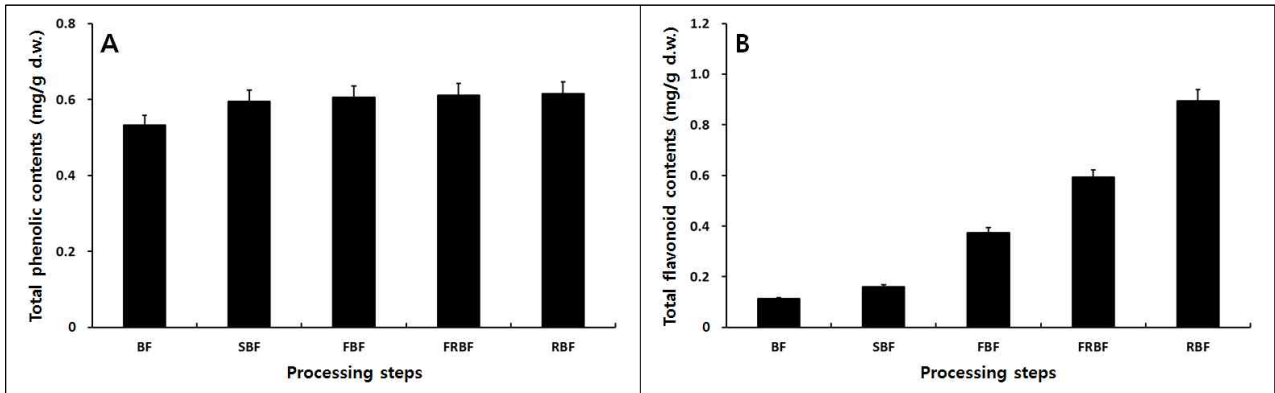


Fig. 1-3-12. Change of total phenolic (A) and total flavonoid (B) contents on bio-processing steps of fermentive and ripening balloon flower.

### (3) 라디칼 소거활성 및 소화효소 저해활성

(가) DPPH 라디칼 소거활성 : 각각의 도라지 추출물을 0.25, 0.5, 1.0 mg/g 농도 처리하여 DPPH 라디칼 소거활성을 측정한 결과는 Fig. 1-3-13A와 같았다. 라디칼 소거활성은 총 flavonoids 함량과 결과가 일치하였다. 원료 도라지의 경우 1.0 mg/g 농도 처리 시 21.94%를 나타내었고 증자 도라지는 35.91%를, 젖산발효 도라지는 73.97%, 젖산발효-숙성 도라지는 84.72%를 나타내었고 숙성 도라지는 86.51%로 가장 우수한 활성을 나타내었다.

(나) ABTS 라디칼 소거활성 : ABTS 라디칼 소거활성 역시 DPPH 라디칼과 경향이 일치하였다. 0.25 mg/g 농도 처리 시에는 3.22%(원료; BF), 6.58%(SBF; 증자 도라지), 12.98%(FBF; 젖산발효 도라지), 46.34%(FRBF; 젖산발효-숙성 도라지), 52.46%(RBF; 숙성 도라지)를 나타내었다. 한편 추출물의 농도가 높아짐에 따라 농도 의존적으로 라디칼 소거활성이 증가하였다(Fig. 1-3-13B).

(다)  $\cdot$ OH 라디칼 소거활성 : OH 라디칼 소거활성 또한 농도 의존적으로 증가하였고 숙성 도라지가 1 mg/g 처리 시에 47.59%로 가장 높았다(Fig. 1-3-13C).

(라)  $\alpha$ -Glucosidase 저해활성 : 증자 도라지는 0.5 mg/g 농도에서 5.23%를 나타내었다. 한편 1.0 mg/g 농도 처리 시에는 각각 5.04%(원료; BF), 16.01%(SBF; 증자 도라지), 33.75%(FBF; 젖산발효 도라지), 46.46%(FRBF; 젖산발효-숙성 도라지), 47.59%(RBF; 숙성 도라지)를 나타내었다 (Fig. 1-3-14A).

(마) Pancreatic lipase 저해활성 : 원료와 증자 도라지의 경우 모든 농도에서 저해활성이 없는 것으로 나타났다. 젖산발효 도라지는 0.25 mg/g 농도 처리 시 1.22%의 아주 낮은 저해활성을 보였고 젖산발효-숙성 도라지는 7.84%, 숙성 도라지는 이보다 좀 더 높은 9.86%를 나타내었다. 한편 농도가 높아질수록 저해활성 역시 증가하였고 숙성 도라지 추출물이 1.0 mg/g 처리 시 32.51%로 지방분해 효소 저해활성이 가장 우수하였다(Fig. 1-3-14B).

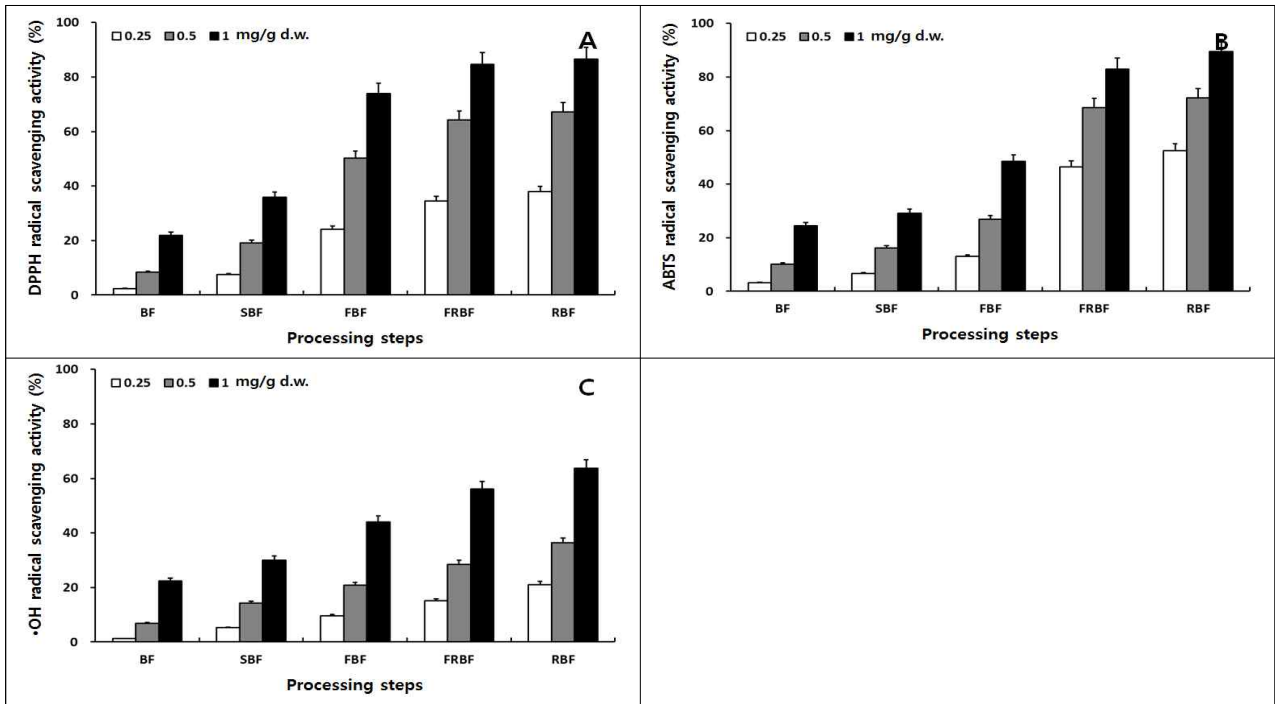


Fig. 1-3-13. Change of DPPH (A), ABTS (B), and hydroxyl (C) radical scavenging activities on bio-processing steps of fermentive and ripening balloon flower.

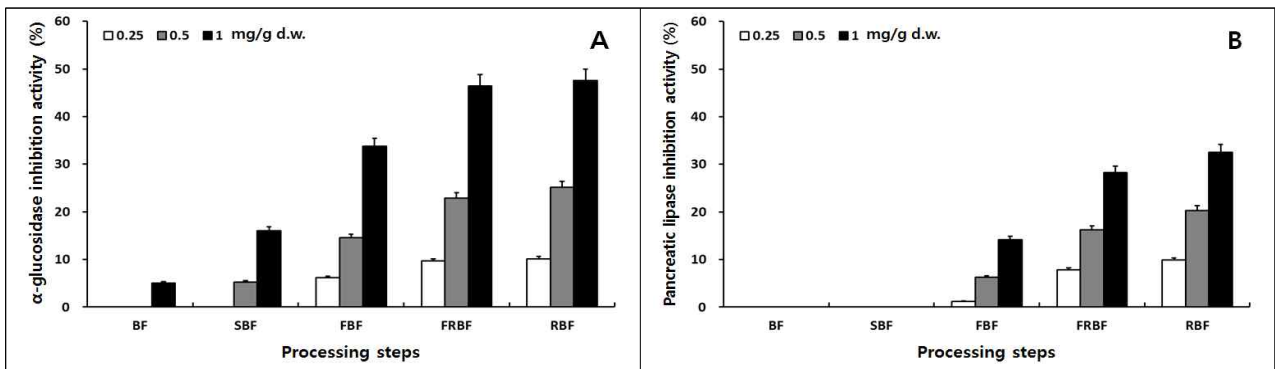


Fig. 1-3-14. Change of α-glucosidase (A) and pancreatic lipase (B) inhibition activities on bio-processing steps of fermentive and ripening balloon flower.

#### 마. 천연 액상조미료 및 천연 소스의 (시)제품화 (참여기업 : 몽고식품)

##### (1) 액상조미액 제조방법 개발

(가) 과일 착즙액을 이용한 액상조미액 제조공정 : 총질소의 함량은 대조구 0.26%, 키위 착즙액 3% 첨가 시험구 1.83%, 파인애플 3% 첨가 시험구 2.16%의 함량을 보였으며 아미노태질소의 경우, 대조구 28.0 mg%, 키위첨가 시험구 70.7 mg%, 파인애플 첨가 시험구는 114.1 mg%의 결과를 보였다(Table 1-3-12). 대조구에 비해 키위 첨가 시험구에서 총질소 및 아미노태질소의 함량이 증가하였으며 키위 첨가구보다 파인애플 첨가구에서 그 분해능이 우수한 것으로 판명되었다. 염산을 이용한 활성글루텐 또는 탈지대두의 산분해 시 총질소 함량이 2.4-2.7%, 아미노태질소의 경우에는 1,500mg% 이상인 것으로 사전 예비실험을 통해 확인되어졌다. 따라서 과일착즙액을 이용한 활성글루텐의 단백질 분해능은 상당히 미미한 것으로 판명되었으며 이를 이용한 산업화는 비효율적이라는 것을 확인 할 수 있었다.

**Table 1-3-12. 단백질 분해효소를 함유한 과일 착즙액의 단백질 분해능**

시험군	활성글루텐 20%	
	총질소(W/V%)	아미노태질소(mg%)
대조구	0.26	28.0
키위 3%	1.83	70.7
파인애플 3%	2.16	114.1

(나) 시판 산업용 효소를 이용한 액상조미액 제조과정 : 단백질 분해능을 반응 상등액의 총질소 및 아미노태질소 함량으로 분석한 결과, **Table 1-3-13**에서 보여주는 것과 같이 Maxazyme<Alcalase<Promod<Flavourzyme 순의 분해능을 보였다. Flavourzyme 분해산물의 총질소 및 아미노태질소의 함량은 각각 2.51%, 793.8mg%로 최적 반응조건의 개발 유무에 따라 산업화 가능성을 확인할 수 있었다. 이에 이후 실험에서는 단백질 분해능이 우수한 Flavourzyme 과 Promod를 이용하여 제조공정을 개발코자 하였다.

**Table 1-3-13. 시판용 단백질 분해효소에 의한 단백질 분해능**

시험군	활성글루텐 20%	
	총질소(W/V%)	아미노태질소(mg%)
대조구	0.24	27.4
Maxazyme	2.34	150.5
Flavourzyme	2.51	793.8
Alcalase	2.34	233.1
Promod	2.45	474.6

(다) 액상조미액 개발을 위한 제조조건 :

① 반응온도 및 원료에 따른 단백질 분해능 : 그 결과 **Table 1-3-14**에서 보여주는 바와 같이 단백질 분해능은 대조구 < 키위 < 파인애플 < Promod < Flavourzyme 순의 분해능을 보였으며 증자한 탈지대두보다 활성글루텐에서 높게 나타났다.

**Table 1-3-14. 원료 및 반응온도 (30℃)에 따른 단백질 분해능**

시험군	활성글루텐 20% (30℃, 24hr)		탈지대두 20% (30℃, 24hr)	
	총질소(W/V%)	아미노태질소 (mg%)	총질소(W/V%)	아미노태질소 (mg%)
대조구	0.25	-	0.24	-
키위 5%	2.26	-	0.51	-
파인애플 5%	2.40	51.8	0.59	23.1
Flavourzyme	2.45	440.3	0.79	226.8
Promod	2.38	153.3	0.65	133.7

상기 실험을 통해 30℃의 반응조건에서의 단백질 분해능은 예상보다 현저히 떨어지는 것을 알 수 있었다. 이에 반응온도를 50℃로 상향 조정하여 실험을 진행하였다. 그 결과 **Table 1-3-15**에서 보여주는 것과 같이 모든 시험구에서 30℃의 반응조건보다 50℃의 반응조건에서 단백질 분해능이 개선되어 지는 것을 알 수 있었다. 가장 우수한 단백질 분해능을 나타내는 Flavourzyme의 경우, 30℃에서 총질소와 아미노태질소의 함량이 각각 2.45%, 440.3mg%인 반면 50℃에서는 각각 2.54%, 798.0mg%로 현저히 증가됨을 알 수 있었다. 또한 본 실험을 통해 단백질 공급원이 탈지대두보다는 활성글루텐을 이용한 실험에서 높은 단백질 분해산물을 얻을 수 있다는 것을 알 수 있었다. 이에 이후 실험은 활성글루텐을 이용하여 50℃에서 진행하기로 결정하였다.



**Table 1-3-15. 원료 및 반응온도 (50℃)에 따른 단백질 분해능**

시험군	활성글루텐 20% (50℃, 24hr)		탈지대두 20% (50℃, 24hr)	
	총질소(W/V%)	아미노태질소 (mg%)	총질소(W/V%)	아미노태질소 (mg%)
대조구	0.26	2.82	0.14	27.3
키위 5%	2.15	99.4	0.37	65.1
파인애플 5%	2.18	132.3	0.53	78.4
Flavourzyme	2.54	798.0	0.80	308.7
Promod	2.43	470.8	0.68	173.6

② 반응시간에 따른 단백질 분해능 : 반응온도 및 단백질 공급원 원료가 선정됨에 따라 분해 시간에 따른 단백질 분해능을 검토하였다. 상기와 동일한 조건으로 50℃에서 24시간, 72시간 반응하여 그 상등액을 단백질 분해능 시험에 이용하였다. 그 결과 **Table 1-3-16**에서 보여주는 바와 같이 72시간 분해 시 단백질 분해능이 현저히 개선됨을 알 수 있었다. Flavourzyme의 경우 24시간 분해 시 아미노태질소 함량이 728.7mg%에서 997.5mg%로 상승하였으며 Promod의 경우에도 아미노태질소 함량이 399.0mg%에서 777.0mg%로 상승하였다. 그 외 키위 및 파인애플 첨가구에서도 24시간 보다 72시간 시험구에서 아미노태질소가 상승하는 결과를 얻었으나 산업화를 위한 단백질 분해능에는 미치지 못했다. 이에 이후 실험은 Flavourzyme과 Promod을 이용하여 진행하기로 하였다.

**Table 1-3-16. 분해시간에 따른 단백질 분해능**

시험군	활성글루텐 20% (50℃, 24hr)		활성글루텐 20% (50℃, 72hr)	
	총질소(W/V%)	아미노태질소 (mg%)	총질소(W/V%)	아미노태질소 (mg%)
대조구	0.32	-	2.34	85.4
키위 5%	2.31	39.2	2.43	170.8
파인애플 5%	2.38	72.1	2.35	193.2
Flavourzyme	2.70	728.7	3.15	997.5
Promod	3.09	399.0	2.58	777.0

③ 활성글루텐 분해 조미액의 관능검사 : 그 결과 Flavourzyme과 Promod 분해산물의 경우 일정한 감칠맛을 유지하였으나 쓴맛이 발생하여 조미료 소재로서는 활용이 곤란한 것으로 판명되었다. 이러한 결과는 효소에 의한 단백질 분해과정에서 쓴맛을 내는 펩타이드의 발생이 그 원인으로 추측되어졌다. 실제로 문헌에 의하면 유청 단백질을 효소 분해 시 쓴맛이 나는 것으로 알려져 있다. 이에 쓴 맛을 개선할 방법을 고안될 필요성이 대두 되어졌다.

**(2) 활성글루텐 분해물의 관능적 향상을 위한 공정 개발**

(가) 염을 이용한 활성글루텐 분해물의 관능 향상 공정 : Flavourzyme, Promod 등의 효소제는 염에 의해 그 활성이 저해되는 것으로 알려져 있으므로 효소활성의 저해를 최소화할 수 있는 소금량을 10%(효소활성의 80% 유지 가능)로 산정하여 20% 활성글루텐에 10%의 멸균 염수를 첨가하여 50℃에서 분해 실험을 실시하였다. 분해시간에 따른 활성글루텐의 분해능이 향상되고 그 결과, 감칠맛 등의 관능적 개선이 예측됨으로 분해시간에 따른 활성글루텐 분해능 실험을 실시하였다. 그 결과 **Table 1-3-17**에서 보여주는 바와 같이 Promod에 의한 단백질 분해능은 분해 14일째에 아미노태질소의 함량이 779.1mg%로 최고를 보였으며 10일째에는 772.7mg%였다. Flavourzyme의 경우, 단백질 분해능은 분해 10일째에 1,042.3mg%로 최고치를 보였으며 14일째는 1,029mg%로 오히려 줄어드는 결과를 보였으나 커다란 차이는 보이지 않았다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 효소제를 이용한 활성글루텐의 분해는 Flavourzyme을 이용하

여 50℃에서 10일간 분해하는 것이 가장 효율적인 것으로 판명되어졌다.

**Table 1-3-17. 염을 첨가한 반응조건에서 분해시간에 따른 단백질 단백질 분해능**

시험군	아미노태질소(mg%)		
	7일	10일	14일
Promod	609.7	772.7	779.1
Flavourzyme	909.3	1,042.3	1,029.7

효소분해 활성글루텐 산물의 관능적 개선을 위해 염을 첨가한 효소분해 활성글루텐 산물을 제조한 후 관능검사를 실시하였다. 그 결과, 효소분해 산물에서 생성된 쓴맛이 염을 첨가한 효소분해 산물에서 현저히 개선됨을 알 수 있었다. 그러나 효소분해에 의한 활성글루텐 분해물의 쓴맛이 염 첨가로 완전히 해결되지 않아 조미액 소재로서의 활용에는 문제가 있는 것으로 판단되었다. 또한 조미액에서의 중요한 맛의 척도인 감칠맛도 염산을 이용한 산분해 산물보다 떨어지는 것으로 확인되어졌다.

(나) Flavourzyme과 간장 제국물(메주)을 이용한 액상조미액 : 10%의 소금을 함유한 활성글루텐 반응액에 0.7%의 Flavourzyme를 첨가하여 50℃에서 7일간 반응시킨 후 2.5%의 간장 제국물(메주)를 첨가하여 동일조건으로 3일간 추가 반응시켰다. 대조 시험구로서는 2.5%의 간장 제국물(메주) 대신 0.7%의 Flavourzyme을 추가로 첨가하여 제조하였다. 그 결과 **Table 1-3-18**에서 보여주는 것과 같이 활성글루텐의 분해 산물인 아미노태질소의 함량이 1,311.5mg%로 향상됨을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 염산을 이용한 활성글루텐의 산분해 시 얻어지는 아미노태질소 함량(1,500mg%)에 근접한 결과였다. Flavourzyme을 첨가한 대조구의 아미노태질소 함량은 1,097.9mg%였다. 이들 분해산물들에 대해 관능검사를 실시한 결과 대조구에 비해 감칠맛과 쓴맛이 개선됨을 알 수 있었으나 관능적 평가에서 활성글루텐 산분해 산물보다는 감칠맛 떨어지고 아주 미묘한 쓴맛이 잔류하는 것으로 평가되었다. 따라서 감칠맛의 보완과 쓴맛의 완전한 개선을 위해 단백질 분해 조건의 최적화 및 유산균, 효모를 이용한 발효기술의 접목에 관한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료되어진다.

**Table 1-3-18. 시판용 효소 및 간장 출국곡자(메주)를 이용한 단백질 분해능**

시험군	아미노태질소(mg%) (활성글루텐 20%, 소금 10%)	
	2일	10일
Fla 0.7%+Fla 0.7%(7일)	861.0	1,097.9
Fla 0.7%+제국물 2.5%(7일)	997.5	1,311.5

\*Fla: Flavourzyme

\*\*제국물: *Aspegillus oryzae*를 증자 탈지대두+볶음 소맥에 접종하여 44시간 배양 후 얻어진 간장 제국물(메주)

(다) 제조공정 결론 : 본 연구를 통해 활성글루텐을 이용한 조미액제조 방법을 다음과 같이 확립하였다.

① 액상조미액 제조를 위한 식물성 단백 소재는 활성글루텐이 가장 유용하였으며 활성글루텐의 함량은 20%가 가장 적합하였다

② 활성글루텐 단백질의 효율적인 분해를 위해서는 시판용 효소제인 Flavourzyme이 가장 적합하였다.

③ Flavourzyme을 이용한 활성글루텐 단백질의 효소분해 시 생성되는 쓴맛의 보완을 위해서는 10%의 염수를 사용하는 것이 효과적이었다.

④ Flavourzyme을 이용한 효소분해 시 생성되는 쓴맛과 감칠맛의 향상을 위해서는

Flavourzyme와 간장 제국물(메주)을 혼용 사용하는 것이 가장 적합하였다.

⑤ 최종적으로 활성글루텐을 이용한 액상조미액의 제조조건은 10%의 염을 함유한 20% 활성글루텐 수용액에 0.7%의 Flavourzyme을 첨가한 후, 50℃에서 7일간 교반 반응시킨 후 간장 출국물(메주)을 2.5% 첨가하여 3일간 추가 분해하는 것이 유용한 것으로 판명되어졌다.

⇒ 본 연구를 통해 액상조미액 제조기술의 기초적 공정은 상기와 같이 확립되었으나 액상조미료 소재사업을 위해서는 액상조미액의 관능적 개선이 필요할 것으로 확인되어졌다. 이에 미생물 발효기술 및 반응조건 최적화 연구가 추가적으로 진행될 필요성이 있을 것으로 사료된다.

### (3) 천연 액상조미료 개발

(가) 액상조미료의 제조공정 확립 : 본 보고서에서는 기업 비밀을 위한 상세 배합비 및 제조공정을 비공개하고자 한다.

- ① 무, 양파, 건새우, 버섯 등을 이용한 천연 육수의 제조
- ② 상기 천연 육수에 양조간장원액, 글추출물, 당류 등의 혼합
- ③ 90℃에서 살균 후 여과 및 포장

(나) 액상조미료의 시제품 제조 및 관능 평가 :

① 액상조미료의 시제품 제조 : 상기에서 확립한 제조공정에 따라 천연 육수를 활용한 액상조미료 시제품을 제조하였다(Fig. 3-3-?). 본 연구에서 제조된 시제품의 이화학적 분석 결과는 표 8에서 보여주는 바와 같으며 본 결과는 추후 액상조미료 상품화 시 제품의 기준 규격 활용될 계획이다.



Fig. 1-3-15. 액상조미료 시제품 사진

Table 1-3-19. 액상조미료 시제품의 이화학적 분석 결과

	총질소(W/V%)	Brix(%)	pH	염도(W/V%)
액상조미료	0.57	30.12	5.19	14.85

② 액상조미료 시제품의 관능검사 : 본 연구를 통해 제조된 액상조미료의 관능검사를 자체적으로 실시하였다. 그 결과 Table 1-3-20에서 보여주는 것과 같이 맛과 염도에서 좋은 평가를 받았다. 그 결과, 타사 제품과 비교 시 잡냄새가 없고 식재료 본연의 맛을 살리면서 요리의 맛을 향상시킬 수 있는 것으로 평가되었다. 또한 적합한 사용량은 탕이나 국을 끓일 때 2-3스푼의 비율로 첨가 시 요리에 적합한 것으로 평가되었다. 단, 해당 시제품의 경우 제품 바닥의 침

전물이 일부 발생하는 문제점이 있다는 조언을 통해 추후 제조공정 시 여과 방법을 재확립할 필요성이 대두 되었다. 이에 제조공정의 재검토를 통한 제조공정의 확립 후 액상조미료 제품을 상품화할 계획이다.

Table 1-3-20. 액상조미료 시제품의 자체 관능검사 결과

No.	맛 평가	염도	색상	향
1	*2.5	2	2	2
2	2	3	2	2
3	3	3	2	2
4	3	3	2.5	2
5	2	2	2	2.5
6	2.5	2	2.5	2
7	2	3	2	2.5
8	2	3	2.5	2
9	3	2	2	2
10	2	2	2.5	2
종합	24	25	22	21
평균	2.4	2.5	2.2	2.1

\*관능검사 점수는 우수 3점, 무난 2점, 부족 1점의 척도로 판정됨.

#### (4) 불고기 전골 소스의 개발

(가) 불고기 전골 소스(몽고 육수 불고기 쏘스)의 이화학적 분석 : 본 연구에서 개발된 불고기 전골 소스의 이화학적 분석 결과는 Table 1-3-21과 같다. 이들 분석 결과는 추후 제품화될 불고기 전골 소스(몽고 육수 불고기 쏘스)의 제품 기준 규격으로 활용할 계획이다.

Table 1-3-21. 불고기 전골 소스(몽고 육수 불고기 쏘스)의 이화학적 분석

	총질소(W/V%)	Brix(%)	pH	염도(W/V%)
액상조미료	0.38	30.24	4.57	5.4

(나) 불고기 전골 소스(몽고 육수 불고기 쏘스)의 관능검사 : 개발된 불고기 전골 소스(몽고 육수 불고기 쏘스)의 관능검사 결과, Table 1-3-22에서 보여주는 것과 같이 맛, 염도, 색상, 향에서 우수한 평가의 결과를 얻을 수 있었다. 또한 본 연구이 항목에는 들어가지 않았으나 요리의 편리성에서 좋은 평가를 받았다. 그 결과 맛의 베이스가 훌륭하여 불고기 전골 소스의 한정 짓기 보다는 육류용 육장소스로 활용해도 좋다는 평가를 받았다. 불고기 전골 요리 시 레시피는 소고기:소스:물을 1:1:2의 비율로 넣고 버섯, 양파 등의 야채를 넣어 요리하는 것이 가장 적합할 것 같다는 추천을 받았으며 개인 취향에 따라 참기름, 다진 마늘을 추가로 넣을 것을 추천 받았다.

Table 1-3-22. 불고기 전골 소스(몽고 육수 불고기 쏘스) 시제품의 자체 관능검사 결과

No.	맛 평가	염도	색상	향
1	*2	2	2	2
2	2.5	2	2	2
3	3	3	3	3
4	3	3	2.5	3
5	3	3	3	3
6	3	3	2	2
7	3	2	2	3
8	3	2	3	3
9	2	3	2	3
10	3	2	3	3
종합	27.5	25	24.5	27
평균	2.75	2.5	2.45	2.7

\*관능검사 점수는 우수 3점, 무난 2점, 부족 1점의 척도로 판정됨.

(다) 몽고 육수 불고기 쏘스의 상품화 : 본 연구에서 개발된 불고기 전골 소스의 배합비 및 제조방법으로 그림 2와 같이 몽고 육수 불고기 쏘스를 상품화하였다(Fig. 1-3-16). 현재 몽고식품(주) 전국 70개 대리점을 통한 마트 입점 및 판매를 추진 중에 있다. 또한 자회사인 몽고 아메리카를 통한 미국 수출도 진행 중에 있다. 이후 국제 식품박람회 전시 등을 통해 중국, 일본 등의 해외 시장도 개척 예정에 있다.



Fig. 1-3-16. 몽고 육수 불고기 소스

### 마. 6차 산업 육성을 위한 네트워크 구축 및 홍보·마케팅

#### (1) 지리산권 약용작물 6차산업화 심포지엄 개최 및 초청 강연

##### (가) 지리산권역 약용작물의 6차산업 고부가가치 전략 심포지엄

##### ① 연제 : 지리산권역 약용작물의 6차산업 고부가가치 전략

② 내용 : 지리산권역 약용작물의 6차산업 고부가가치화를 위하여 약용작물 생산 방향(1차 산업), 제품의 고부가가치 전략(발효기술 및 건강기능식품) 및 경남 향노화웰니스관광 연계방안에 대해서 전문가의 발표와 토론

③ 성과 : 지리산권 약용작물의 고부가가치를 위해서 1차 약용작물 생산 활성화, 2차 제품의 고부가가치 가공기술 개발 및 더 나아가 산청군 및 경남 향노화산업 연계된 웰니스관광 프

로그램 적극 개발 등의 방안 도출, 경남일보 등 다수의 언론에 워크숍 홍보



Fig. 1-3-17. 6차산업 관련 심포지엄 및 사업단 홍보 (2016.10.08.).

(나) 6차산업 관련 각종 심포지엄, 세미나 및 포럼 연계 발표를 통한 네트워크 구축

① 2016년 함양여주 고도화 전략을 위한 심포지엄 주제발표 (함양군 농정기획과) : 향노화 연계 함양여주 6차산업화 방안

② 거창군 향노화산업 발전포럼 주제발표 (거창군) : 경남의 미래전략산업인 향노화산업가 연계한 거창군의 농특산물을 활용한 고부가가치 식품 및 향노화 관광 연계 상품 개발 전략과 6차산업 연계 방안 등에 대해서 발표



Fig. 1-3-18. 6차산업 관련 심포지엄 (2016.08.05.) 및 포럼 6차산업 주제 발표 (2016.09.07.)

(2) 지리산권 약용작물 6차산업화 홍보 및 전시회

(가) 홍보 : 도라지 상품 개발

① 경남 MBC 뉴스테스크 : 경남 한방향노화 전략약초 도라지 이용 고부가가치 식품 개발

(나) 홍보 : 백수오·이엽우피소 구별 기술

① YTN Science : ‘진짜와 가짜, 과학으로 밝힌다’ 제목으로 하수오·백수오·이엽우피소 이 세 식물 중에 대한 판별 분자 마커를 이용한 구별 방법 인터뷰



Fig. 1-3-19. 도라지 상품 개발 (2017.08) 및 백수오·이엽우피소 구별 기술 방송 인터뷰 (2016.11)

(다) 박람회 기획 및 전시회 참가

① 박람회 전시회 : 2016 미래건강, 경남 향노화산업 콘퍼런스

㉠ 주제 : (재)경남한방약초 연구소 - 2016 미래건강 경남 향노화산업 콘퍼런스 부서 설치 및 홍보

㉡ 내용 : 한방 향노화 거점 연구기관 지정에 따른 연구소 소개 및 연구소-기업 공동으로 개발한 제품 등 전시 및 홍보

② 박람회 전시회 : 2016 진주국제농식품 박람회

㉠ 주제 : (재)경남한방약초 연구소 - 2016 진주국제농식품박람회 부서 설치 및 홍보

㉡ 내용 : 한방 향노화 거점 연구기관 지정에 따른 연구소 소개 및 연구소-기업 공동으로 개발한 제품 등 전시 및 홍보

③ 박람회 전시회 : 2016 향노화산업박람회&시니어 박람회

㉠ 주제 : (재)경남한방약초 연구소 - 2016 향노화산업박람회&시니어 박람회 부서 설치 및 홍보

㉡ 내용 : 한방 향노화 거점 연구기관 지정에 따른 연구소 소개 및 연구소-기업 공동으로 개발한 제품 등 전시 및 홍보



Fig. 1-3-20. 2016 경남 향노화산업 콘퍼런스, 진주국제농식품 박람회 및 향노화산업박람회&시니어 박람회 참가 및 홍보

(4) 기타 : 6차산업 및 농·식품 개발 등의 교육

순번	강의 내용	일시	장소	교육 대상
1	2016 향노화바이오 교육과정 (식품분야 중심으로)	2016년 7월 6일	경상남도 인재개발원	각 지자체 공무원
2	2016 6차산업 창업스쿨 (향노화 연계 6차산업 분야)	2016년 7월 8일	경남6차산업지원 센터 (한국국제대학교)	경남6차산업지원센터 창업스쿨 수강생
3	2016년 시니어창업스쿨 (농식품 가공분야)	2016년 9월 ~ 2016년 10월	경남과기대 시니어창업센터	경남과기대 시니어창업스쿨 수강생
4	2016년 시니어창업스쿨 (향노화산업 분야)	2016년 10월 ~ 2015년 11월	경남과기대 시니어창업센터	경남과기대 시니어창업스쿨 수강생
5	경상대학교 농식품유통과정 (향노화 연계 6차산업 분야)	2017년 7월 23일	경상대학교 농식품유통사업단	경상대학교 농식품유통과정 수강생



# 제3절 지리산 권역 약용작물 복합추출물 활용 기능성 음료·드링크 제품화 기술 [제2세부, 경남과학기술대학교 산학협력단]

## 1-1. 1차년도 연구수행 방법

### 가. 약용작물의 음료개발을 위한 최적화 연구

#### (1) 재료 및 방법

##### (가) 생약 재료, 시약 및 기기

① 실험재료 및 시약; 본 과제 of 총괄 차원에서 논의 결과, 4종의 약용작물이 선정되었으며, 선정된 약용작물은 도라지(*Platycodon grandiflorus*; PG), 하수오(*Cynanchi wilfordii* Radix; CW), 자소엽(*Perilla sikokiana*; PS) 및 당귀(*Angelica gigas* Nakai; AG) 등이었다. 이 약용작물은 산청군 생약조합으로부터 구입하여 사용하였다. Folin-Cialteu phenol, diethylene glycol, 2-deoxyribose, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt(ABTS), *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside(*p*-NPG) 및 *p*-nitrophenyl-butyrate(*p*-NPB)는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase 및 pancreatic lipase 역시 Sigma-Aldrich Co.에서 구입하여 사용하였다.

② 기기; 생리활성 및 항산화 활성 검정에는 분광광도계(Shimadzu UV-1201)를 사용하여 측정하였다.

##### (나) 약용작물의 추출방법 및 조건

① 발효주정 이용 약용작물 추출; 4종의 선정된 생약재료 600 g (dry weight)에 대하여 0, 50, 및 95% 발효주정 6 L의 추출용매를 가하여 준비된 조건에 따라 추출하였다(Table 1 참조). 이 후 환류냉각기를 부착하여 2회 이상 반복 추출하였으며 여과액을 모으고 60°C 이하에서 진공농축하였다.

Table 1. Extraction conditions of selected medicinal plants

Medicinal plants	Used amounts (g)	Extraction			Remarks
		AF95	AF50	AF0	
PG(당귀)	600	60~65°C 5시간	70~80°C 5시간	90~95°C 10시간	
CW(백수오)	600				
PS(자소엽)	600				
AG(도라지)	600				

\*; Alcoholic fermentation (발효주정)

##### (다) 기능성성분 추출 최적화 조건

#### ① 기능성 지표물질의 정량분석

㉞ 총 phenolics 함량; 총 phenolics 함량은 Folin-Denis법을 약간 변형하여 측정하였다. 추출물 0.5 ml를 시험관에 분주하고 25% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 0.5 ml를 첨가하여 3분간 정치시켰다. 그 후 2 N Folin-Ciocalteu phenol 용액 0.25 ml 첨가 및 혼합한 다음 30°C에서 1시간 동안 발색시켰다. 발색된 시료는 분광광도계(Shimadzu UV-1201)를 사용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였고 gallic acid를 이용하여 작성한 표준 검량곡선으로부터 값을 산출하였다.

㉟ 약용식물별 지표물질분석; 약용식물별 기능성성분 추출조건을 최적화하기 위하여 각각의

지표물질을 분석하고자 한다. 즉 각각의 지표물질에 대한 표준물질을 구하여 HPLC 또는 GC로서 농도별로 검량선을 작성하고 추출용매의 조건별 분석결과치를 비교하여 판단하고자 한다. 즉 당귀는 Nodakenin과 Decursin, 백수오는 4-Hydroxyacetophenon과 2,4-Dihydroxyacetophenon, 자소엽은 Rosmarinic acid 그리고 도라지는 Platycodin D와 Platycoside A를 분석하고자 한다.

(라) 추출물의 기능성 생리활성 검정

① DPPH free radical 소거활성; 전자공여능 측정은 Blois의 방법에 따라서 각 시료의 DPPH (1,1-diphenyl- 2-picrylhydrazyl)에 대한 수소공여 효과로 측정하였다. 시료를 농도별로 희석하여 시료 40  $\mu$ l와 1.5 mM DPPH용액 160  $\mu$ l를 섞은 후, 37°C에서 30분 동안 반응시킨 다음 microplate reader (BioTek EL800)를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능(Electron donating ability, EDA)은 EDA (%) = (대조구 흡광도 - 시료첨가구 흡광도) / 대조구 흡광도  $\times$  100으로 계산하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조그룹과 흡광도차를 비교하여 free radical의 소거활성을 백분율로 나타내었다.

② ABTS cation radical 소거활성; ABTS 라디칼 소거능 역시 Hwang 등의 방법과 동일하게 측정하였다. 2.45 mM  $K_2S_2O_8$  5 ml과 7 mM ABTS  $\cdot^+$  5 ml를 혼합한 후 암실에서 16시간 가량 방치시켜 ABTS 라디칼을 형성시킨 후 732 nm에서 대조구의 흡광도 값이  $0.7 \pm 0.02$ 가 되도록 조절한 ABTS 용액 0.9 ml과 농도별 추출물 0.1 ml를 첨가하여 3분간 정치시켜 microplate reader (BioTek EL800)를 사용하여 732 nm에서 흡광도를 측정하였다.

③ FRAP (ferric reducing antioxidant power) 활성; 환원력은 FRAP (Ferric Reducing / Antioxidant Power)법으로 측정하였다. FRAP 시약은 acetate buffer (30 mM, pH 3.6), TPTZ 시약(10 mM in 40 mM HCl) 및  $FeCl_3$  용액(20 mM in DW)을 10:1:1의 부피 비율로 혼합하여 조제하였으며, 37°C에서 15분간 반응시켰다. 시료 50  $\mu$ l와 FRAP 시약 950  $\mu$ l를 시험관에 분주한 후 37°C에서 15분간 반응시키고 microplate reader (BioTek EL800)를 사용하여 590 nm에서 흡광도를 측정하였다.

④  $\alpha$ -Glucosidase 저해활성;  $\alpha$ -Glucosidase 저해활성은 각 추출물 50  $\mu$ l,  $\alpha$ -glucosidase (0.5 unit/ml) 효소용액 50  $\mu$ l, 200 mM 인산나트륨 완충용액(pH 6.8) 50  $\mu$ l를 혼합하여 37°C에서 10분간 예비반응 시켰다. 이 후 인산나트륨 완충용액(pH 6.8)에 녹인 p-NPG (5 mM) 100  $\mu$ l를 가하여 다시 37°C에서 10분 반응시켰다. 이 반응액에  $Na_2CO_3$  (100 mM) 0.75 ml를 가해 최종 반응을 정지시킨 후 microplate reader (BioTek EL800)를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다(2).

⑤  $\alpha$ -Amylase 저해활성; 각 추출물 50  $\mu$ l를 시험관에 분주한 후  $\alpha$ -amylase (1.0 unit/ml) 효소용액 50  $\mu$ l와 200 mM 인산나트륨 완충용액(pH 6.8) 50  $\mu$ l를 첨가하여 37°C에서 10분간 예비반응을 시켰다. 이 반응액에 200 mM 인산나트륨 완충용액(pH 6.8)에 녹인 1% 전분용액을 0.25 ml를 가하여 다시 37°C에서 10분간 반응 시켰다. 이후에는 0.5 N NaOH 및 30% 타르타르산나트륨칼륨을 용해한 48 mM DNS 시약을 0.25 ml 첨가하여 100°C에서 20분간 끓여 발색 및 냉각시킨 후 microplate reader (BioTek, EL800, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(마) 3T3-L1 지방전구세포의 분화억제활성

① 3T3-L1 세포배양과 분화; 3T3-L1지방전구세포의 배양은 1% penicillin-streptomycin (P/S Gibco Co, Gaithersburg, MD, USA) 과 10% bovine calf serum (BCS) 이 첨가된 DMEM을 사용하여 37°C, 5%  $CO_2$  조건에서 배양하였다. 배양은 3일 간격으로 하고, 세포는 100 mm  $\phi$  plate 바닥에 70% 정도에서 phosphate buffered saline (PBS) 로 세척한 후, 0.25% trypsin-EDTA 용액

을 넣어 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 3분간 정지 후 세포를 탈착시켜 계대배양하여 유지하였다. 3T3-L1 지방전구세포를 분화 유도하기 위하여 세포를 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% P/S가 첨가된 DMEM을 이용하여 6-well plate의 각 well에  $0.8 \times 10^5$  cells/well로 분주하고 2일 후 배지를 교환하여 3-4일째에 세포가 완전히 융합상태가 되게 하였다. 융합상태에서 10% FBS와 MDI solution (0.5 mM 3-iso-butyl-1-methylxanthine, 1  $\mu$ M dexamethasone, 10  $\mu$ g/ml insulin)를 처리하여 분화를 유도하였다. 이때 시료가 지방 세포분화에 미치는 영향을 관찰하기 위해 시료를 농도별로 함께 처리하였다. 분화 유도 3일 후, 배지를 시료, 10% FBS, 1% P/S, 10  $\mu$ g/ml insulin이 포함된 DMEM으로 교환하였고 분화 유도 6일째부터는 2일에 한번씩 10% FBS와 1% P/S가 포함된 DMEM으로 교환하여 세포를 분화시켰다. 분화유도시약(DMI solution)을 처리한 후, 3T3-L1 세포의 지방세포 분화과정을 나타내었다.

② 세포생존율 측정(MTT assay); 시료에 대한 세포생존율은 MTT [3-(4,5-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] colorimetric assay(9) 방법으로 실험하였다. 세포는  $2 \times 10^3$  cell/100  $\mu$ l 의 농도로 96-well plate에 분주하고 24시간 배양 후 배지를 제거하였다. 여기에 새로운 Dubelco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco Co, Gaithersburg, MD, USA) 100 $\mu$ l에 농도별로 희석한 시료를 각각 첨가하여 24시간 배양한 다음 5 mg/ml로 제조한 MTT (Sigma Co, St. Louis, MO, USA)용액 10  $\mu$ l를 각 well에 첨가하고 4시간동안 배양하였다. 배양 종료 후 상등액을 제거하고 각 well에 200  $\mu$ l의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 microplate reader (BioTek EL800, USA)로서 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = 100 - (A - B) / A \times 100$$

(A : 대조군의 흡광도, B : 시료처리군의 흡광도)

③ Oil Red O 염색; Oil Red O staining은 분화 유도 7-9일째 된 세포를 사용하여 실시하였다. 10% FBS DMEM을 제거한 뒤, 세포를 PBS로 2번 세척하고, 10% formalin 500  $\mu$ l 넣어 5분간 고정시킨 후 제거한다. 다시 10% formalin을 1 ml 넣어 1시간 동안 고정한 다음 D-PBS로 2번 세척하였다. 세척된 세포는 세포내 생성된 지방구와 특이적으로 반응하는 Oil Red O (Sigma Co, St Louis, MO, USA)로 1시간 동안 염색하였다. 염색 후, 염색액을 제거하고 D-PBS를 이용해 4번 세척한 다음 증류수를 well에 채우고 현미경으로 관찰하였다. 중성지방의 정량은 증류수를 제거하고 완전히 마른 well에 100% isopropyl alcohol을 2 ml 첨가하여 Oil-Red O를 다시 용출시킨 후 microplate reader (BioTek, EL800, USA)로서 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Lipid accumulation (\%)} = 100 - (A - B) / A \times 100$$

(A : 대조군의 흡광도, B : 시료처리군의 흡광도)

## 나. 약용작물 추출물의 최적 발효조건 확립

### (1) 재료 및 방법

(가) 생약 재료, 시약 및 기기

① 실험재료, 시약, 및 기기; 이전 연구결과와 동일한 재료와 시약 및 기기를 사용하여 연구 수행하였다.

(나) 약용작물 복합추출물(ME)의 조제

② 약용작물 조합 선정: 4종의 약용식물 추출물에 대한 항산화 효과, 항당뇨 효과 및 항비

만 효과 등을 시험한 결과를 바탕으로 Table 2와 같이 생약복합추출물의 조합 3종을 선정하였다.

Table 2. Preparation of mixture extracts (ME) from used medicinal plants

Sample of mixtures	Mixing ratio of extracts (%)				Target physiologically functions	
	PG	CW	PS			AG
	AF95	AF95	AF95	AF50		AF95
ME-1	70	10	10		10	Anti-diabetic
ME-2		50		50		Anti-oxidant
ME-3			50		50	Anti-obesity

(다) 약용작물 복합추출물의 발효

① 약용작물 복합추출물(ME)의 발효; 본 연구에서 조합한 복합추출물 중에서 1차 년도에 개발하려는 음료는 복합추출물 ME-1 (항산화 효과)을 기반으로 한 항산화 음료를 개발하기로 하였다. 따라서 복합추출물 ME-1 (CW-AF95 : PS-AF50 = 1 : 1)을 발효시켜 그 효과를 높일 수 있는 방안을 연구하였다.

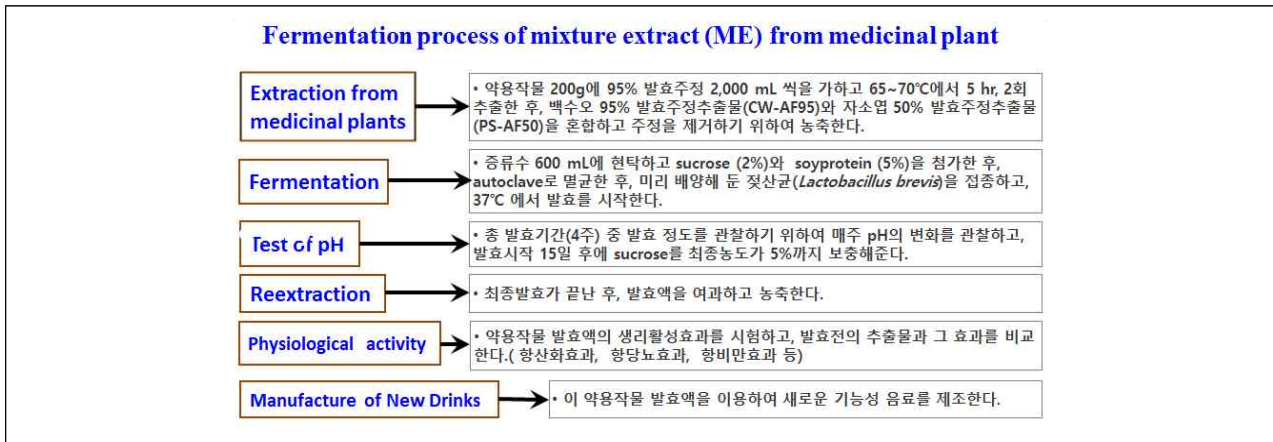


Fig. 1. Fermentation process of mixture extracts (ME) from medicinal plants.

복합추출물 ME-1의 발효과정은 Fig. 2-1-1에 나타내었다. 즉 백수오와 자소엽 각각 200 g 에 95% 발효주정 또는 50% 발효주정을 2,000 ml씩을 가하고 65~70°C에서 5 hr, 2회 추출한 후, 백수오 추출물(CW-AF95)와 자소엽 추출물(PS-AF50)을 혼합하고 농축하였다. 이 농축액에 증류수 600 mL을 가하여 현탁하고 sucrose (2%)와 soyprotein (5%)을 첨가하고 autoclave로 멸균한 후, 미리 배양해 둔 젖산균(*Lactobacillus brevis*)을 접종하고, 37°C에서 발효를 시작하였다. 총 발효기간(4주)중에 발효 정도를 관찰하기 위하여 매주 pH의 변화를 관찰하고, 발효시작 15일 후에 sucrose를 최종농도가 5%까지 보충해 주었다. 최종발효가 끝난 후, 발효액을 여과하고 농축하여 약용작물 발효액(MEF-1)을 만들었다. 그리고 이 발효액의 생리활성효과를 시험하였으며, 발효전의 추출물과 효과를 비교하였다.

(라) 약용작물 복합추출물 및 발효액의 항산화활성

- ① DPPH free radical 소거활성; 이전과 동일한 방법으로 수행하였다.
- ② ABTS cation radical 소거활성; 이전과 동일한 방법으로 수행하였다.
- ③ FRAP (ferric reducing antioxidant power) 활성; 이전과 동일한 방법으로 수행하였다.

(마) 약용작물 복합추출물 및 항당뇨활성 비교

- ① α-Glucosidase 저해활성; 이전과 동일한 방법으로 수행하였다.

②  $\alpha$ -Amylase 저해활성; 이전과 동일한 방법으로 수행하였다.

## 다. 음료(1-2)개발을 위한 최적의 혼합 레시피 개발

### (1) 재료 및 방법

(가) 음료류 개발을 위한 최적의 혼합 recipe 개발

① 약용작물 복합추출물(ME) 또는 발효액(MEF) 및 첨가물 조성; 약용작물 복합추출물(ME) 또는 복합추출물 발효액(MEF)을 함유한 기능성 향산화 음료는 주성분인 약용작물 복합추출물(ME-2)과 이것의 발효액(MEF-2)을 따로 제작하기로 하였다. 이른바 「추출음료」와 「발효음료」로 구분되는 것이다. 기본적으로 모든 음료에는 1회 음용량에 대하여 약용작물의 추출물의 함유량과 향산화효과의 상승과 함께 음료의 맛을 개선하도록 하려고 한다. Water soluble dietary fiber (수용성 식이섬유)는 적정량 함유되도록 하여 대장운동을 원활히 할 수 있도록 하여 배변활동을 도울 수 있도록 하고, 포도당에 비하여 혈당지수(GI; glycemic index)가 낮은 올리고당(isomalto-oligosaccharide 및 fructo-oligosaccharide)을 사용하여 비피더스 등의 장내미생물의 생육을 활발하게 하여 대장기능을 개선하는데 도움이 되도록 할 예정이다. 또한 불규칙한 식생활로 인하여 부족하기 쉬운 비타민과 필수아미노산을 더하여 보완코자 하며, 인체 내에서 세포막의 주성분을 이루며 물과 기름을 섞이게 하는 유화제로서의 작용으로 인해 혈관벽에 흡착된 콜레스테롤을 용해하여 혈액의 순환을 돕는 것으로 알려진 대두 lecithin과 오메가-3 지방산을 함유하도록 하여 그 효과를 높이고자 한다.

## 1-2. 1차년도 연구결과

### 가. 약용작물의 음료개발을 위한 최적화 연구

#### (1) 약용작물의 지표 물질 분석

(가) 총 phenolics 함량; 총 페놀화합물의 함량은 당귀의 물추출물(AF), 백수오와 도라지의 95% 발효주정추출물(AF95) 그리고 자소엽은 50% 발효주정추출물(AF50)에서 가장 많았다. 이에 따른 향산화 효과에서도 유사한 결과를 나타내었다.

Table 3. Total phenolics contents of extracts from medicinal plants according to different extracted conditions

Medicinal plants	AF95	AF50	AF0
PG(당귀)	15.01±0.43	10.73±0.20	19.57±0.92
CW(백수오)	15.74±0.69	11.27±0.58	14.38±0.27
PS(자소엽)	10.57±0.40	39.37±3.46	26.89±1.11
AG(도라지)	19.73±2.32	9.68±0.16	10.98±0.44

All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

(나) 약제별 지표물질 분석; 최적의 추출조건을 선정하기 위하여 본 실험에서 행한 추출조건별로 지표물질을 분석하였다. 지표물질로서 당귀는 nodakenin 및 decursin을, 백수오는 4-hydroxyacetophenon, 및 2,4-dihydroxyacetophenon을 분석하였는데, 모두 95% 발효주정 추출물에서 월등히 많은 추출수율을 보였다. 한편 도라지의 platycodon D는 95% 주정에서 platycoside A는 물(주정 0%)에서 가장 높은 함량이 분석되었다. 그러나 자소엽의 경우에는

50% 발효주정추출물에서 rosmarinic acid의 함량이 가장 많았다. 추출조건에 따른 지표물질의 함량도 총 페놀과 같은 추출 양상을 보였다.

Table 4. Content of marked compounds of extracts ( $\mu\text{g/ml}$ ) from medicinal plants according to extracted conditions

Medicinal plants	Marked compounds	$\mu\text{g/ml}$			Remarked
		AF95 <sup>1)</sup>	AF50	AF0	
PG(당귀)	Nodakenin	83.77	30.28	9.10	
	Decursin	214.95	4.63	nd <sup>2)</sup>	
CW(백수오)	4-Hydroxyacetophenon	7.56	1.14	0.91	
	2,4-Dihydroxyacetophenon	11.50	1.16	0.80	
PS(자소엽)	Rosmarinic acid	4.73	9.15	5.17	
AG(도라지)	Platycodin D	25.30	18.30	6.21	
	Platycoside A	0.37	5.39	8.27	

<sup>1)</sup> Alcoholic fermentation 95%, <sup>2)</sup> Not detected

### (3) 추출물의 기능성 생리활성 검정

(가) DPPH free radical 소거활성; 4종의 생약 추출물에 대한 DPPH free radical scavenging activity는 도라지, 당귀 및 백수오의 경우, 95% 발효주정추출물(AF95)을 1000 ppm의 농도로 처리하였을 때, 각각  $25.90 \pm 0.74 \sim 64.08 \pm 1.78\%$ ,  $40.59 \pm 0.24 \sim 85.65 \pm 4.29\%$  및  $32.83 \pm 1.00 \sim 89.81 \pm 0.23\%$ 으로 가장 높았다. 한편 자소엽은 50% 발효주정추출물(1000 ppm)에서  $77.51 \pm 0.18\%$ 로서 가장 높은 억제활성을 나타내었으며, 95% 발효주정추출물(1000 ppm)에서는  $66.01 \pm 1.07\%$ 로서 활성이 다소 낮게 나타났다. 특히 백수오 발효주정 95% 추출물의 경우에는  $\alpha$ -tocopherol 및 BHA의 활성과 거의 같은 정도로 높았다.

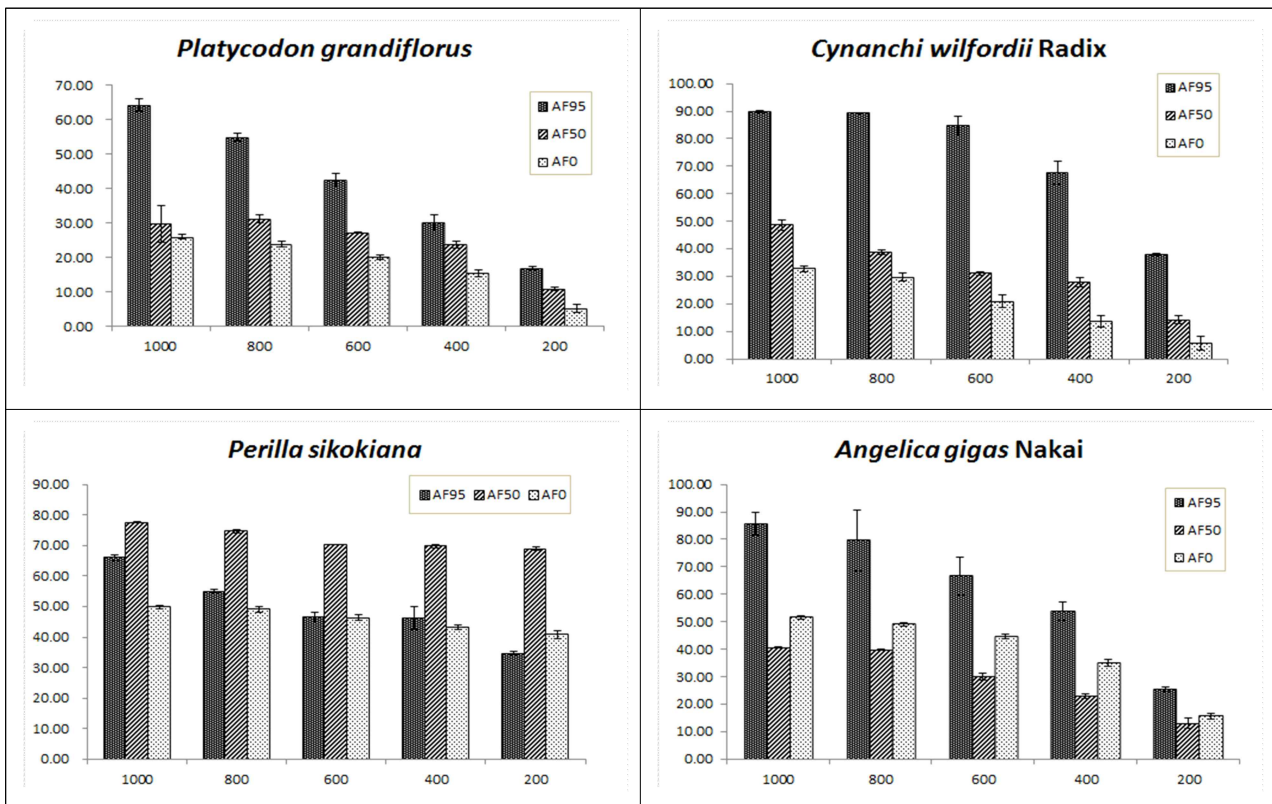


Fig. 2-1-?. DPPH free radical scavenging activities of extracts from medicinal plants according to different extracted conditions. All values are presented as the mean  $\pm$  SD of triplicate determination.

(나) ABTS free radical 소거활성; 4종의 생약 추출물에 대한 ABTS cation radical scavenging activity는 도라지, 당귀 및 백수오의 경우, 95% 발효주정 추출물(AF95)을 100 ppm의 농도로 처리하였을 때, 각각  $23.98 \pm 1.90 \sim 58.30 \pm 0.71\%$ ,  $19.85 \pm 2.16 \sim 80.20 \pm 2.86\%$  및  $24.38 \pm 1.01 \sim 50.81 \pm 0.83\%$ 으로서 가장 높았다. 한편 자소엽은 50% 발효주정 추출물(100 ppm)에서  $75.00 \pm 1.78\%$ 로서 가장 높은 억제활성을 나타내었으며, 95% 발효주정추출물(100 ppm)에서는  $56.99 \pm 6.01\%$ 로서 활성이 다소 낮게 나타났다. 특히 백수오 95% 발효주정 추출물(CW-AF95)의 경우에는  $\alpha$ -tocopherol 및 BHA 활성의 90% 정도를 나타내었다.

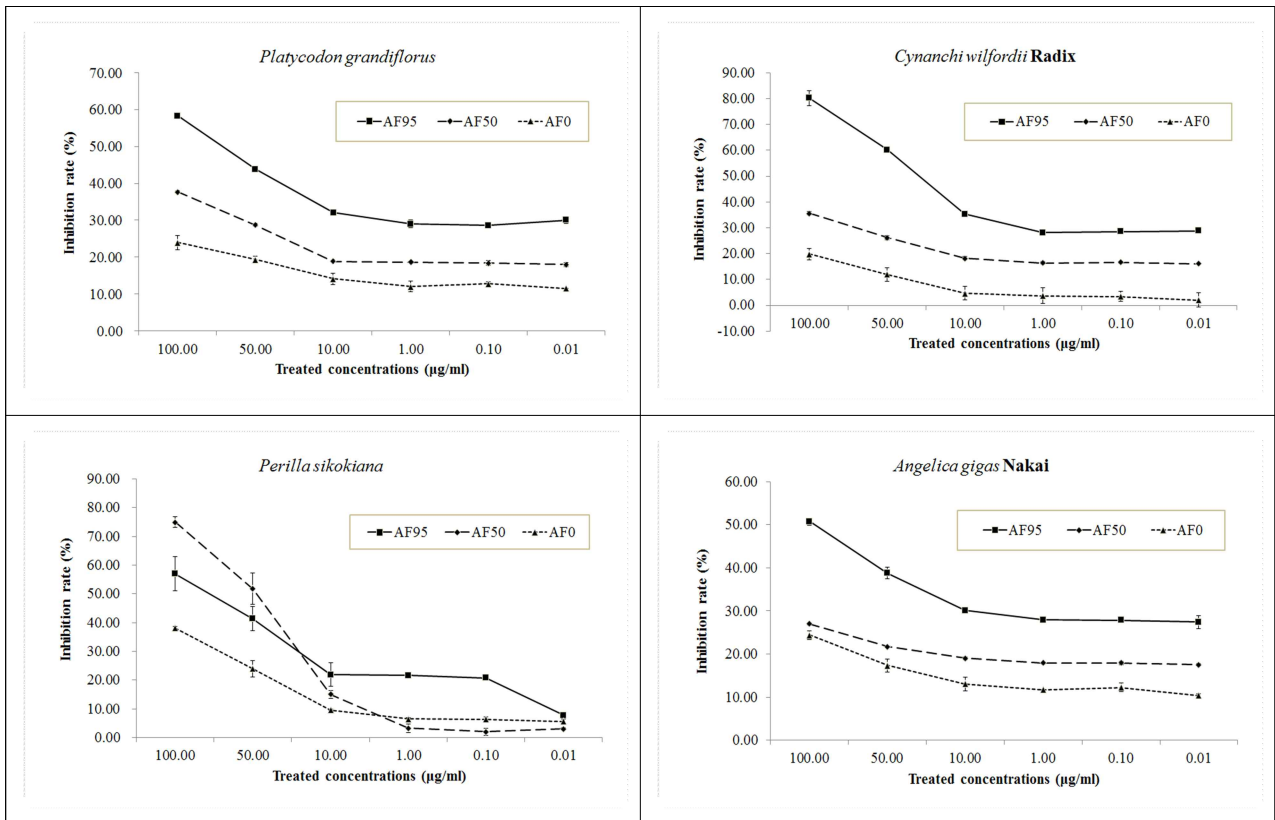


Fig. 3. ABTS cation radical scavenging activities of extracts from medicinal plants according to different extracted conditions. All values are presented as the mean  $\pm$  SD of triplicate determination.

(다) FRAP (ferric reducing antioxidant power) 활성;

4종의 생약 추출물에 대한 FRAP (Ferric reducing antioxidant power) activity는 도라지, 당귀 및 백수오의 경우, 95% 발효주정 추출물(AF95)을 1000 ppm의 농도로 처리하였을 때 각각  $7.79 \pm 0.07 \sim 15.89 \pm 0.57\%$ ,  $16.538 \pm 0.18 \sim 28.16 \pm 0.50\%$  및  $7.05 \pm 0.13 \sim 23.80 \pm 0.41\%$ 으로서 대체로 낮은 활성이었으나 모든 실험구에서 가장 높았다. 한편 자소엽은 50% 발효주정 추출물(PS-AF50)에서  $89.86 \pm 1.60\%$ 로서 가장 높은 억제활성을 나타내었으며, 95% 발효주정 추출물(PS-AF95)에서도  $65.47 \pm 2.15\%$ 의 비교적 다른 생약재보다 높은 활성을 나타내었다.

(라)  $\alpha$ -Glucosidase 및  $\alpha$ -amylase 저해활성; 4종의 생약 추출물에 대한  $\alpha$ -glucosidase 저해활성은 전체적으로 비교적 낮게 나타났다. 약용식물의 종류나 추출방법에 관계없이 20% 중반을 나타내었다. 그러나 positive control로 사용하였던 acarbose의 경우에도  $26.48 \pm 0.18\%$  이었으므로, 이와 비교하면 그리 낮은 활성은 아니라고 할 수 있으나, 전반적인 효소의 활성이나 실험방법, 조건 등을 다시 점검해 보아야 할 것으로 사료되었다. 그러나 4종의 생약 추출물에

대한  $\alpha$ -amylase의 억제활성은 전체적으로  $56.14 \pm 3.35 \sim 62.97 \pm 0.82\%$ 로 나타났다. 이는  $\alpha$ -glucosidase의 억제활성보다는 훨씬 높게 나타났다. 추출방법에 따라서는 크게 변화를 보이지 않았다. 또한 acarbose의 활성과 거의 유사한 정도로 억제하였다.

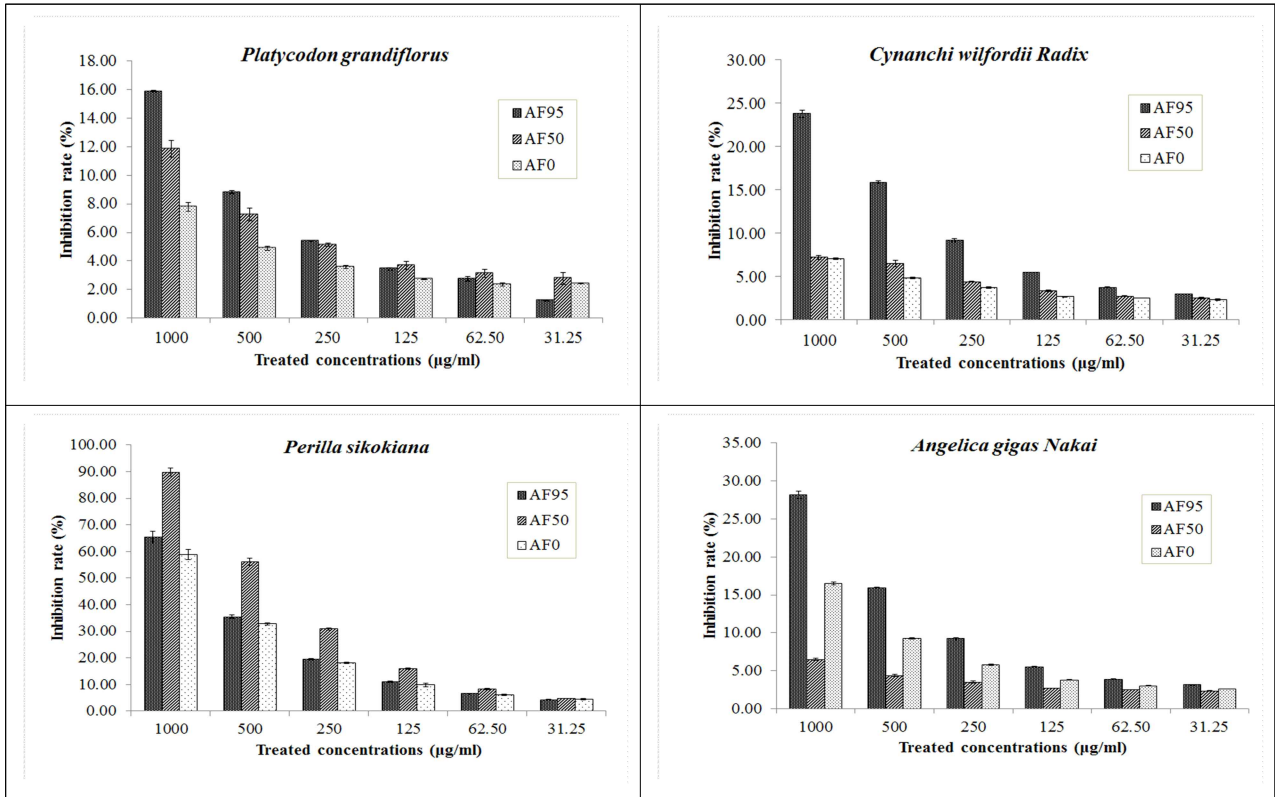


Fig. 4. FRAP (Ferric reducing antioxidant power) activities of extracts from medicinal plants according to different extracted conditions. All values are presented as the mean  $\pm$  SD of triplicate determination.

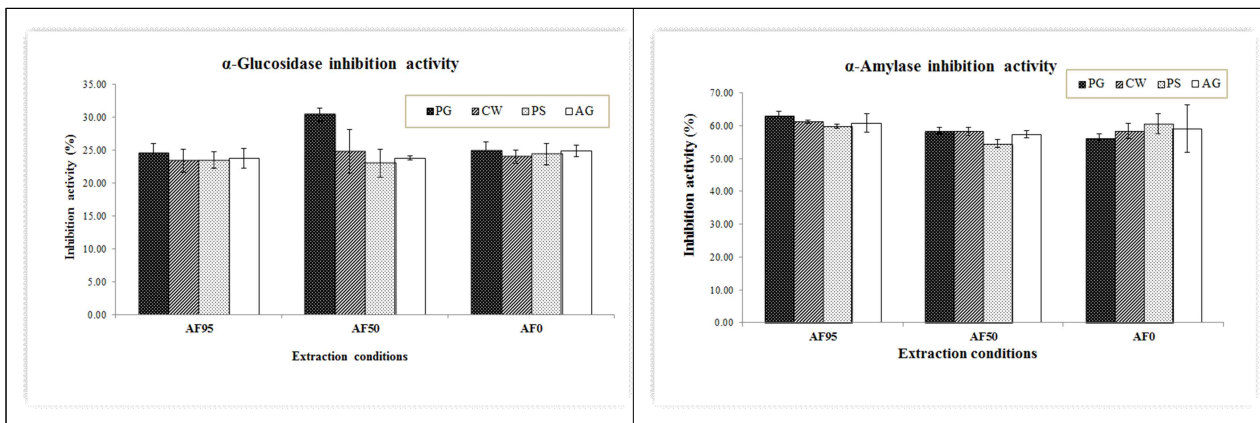


Fig. 5.  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibition activities of extracts from medicinal plants according to different extracted conditions. All values are presented as the mean  $\pm$  SD of triplicate determination.  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibition activity of each sample and acarbose was measured at 0.2 mg/ml.



**(3) 3T3-L1 지방전구세포의 분화억제활성**

(가) 3T3-L1 세포배양과 분화;

세포배양과 분화는 Fig. 6에 나타난 바와 같다.

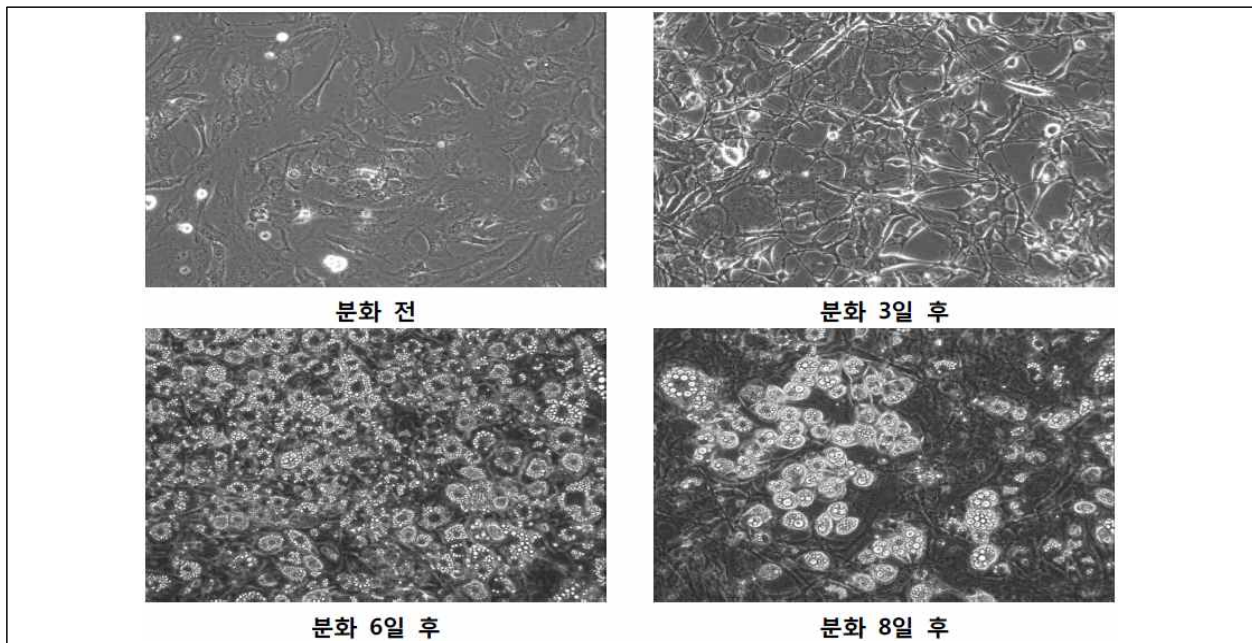


Fig. 6. Cell Differentiation of 3T3-L1 adipocyte cells. Cell differentiation was induced with DMI (D; 0.25 mM dexamethasone, M; 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthin, I; 10 µg/ml insulin).

(나) 세포생존을 측정(MTT assay);

4종의 약용식물 추출물에 대한 세포생존율을 MTT assay에 의하여 실험한 결과를 Table 5에 나타내었다.

Table 5. Effects of extracts from medicinal plants on cell viability in 3T3-L1 adipocytes by MTT assay

Medicinal plants & extraction conditions		Cell viability <sup>1)</sup> (%)					Remarks
		100	80	60	40	20	
PG (당귀)	AF95	67.52±1.67 <sup>2)</sup>	68.25±1.67	79.56±1.26	84.31±1.09	90.51±0.63	
	AF50	91.12±1.49	90.83±6.68	92.55±6.95	97.99±9.91	100.29±5.53	
	AF0	87.57±4.51	88.11±8.28	99.73±0.81	98.11±8.58	104.60±10.73	
CW (백수오)	AF95	72.26±3.95	72.99±1.67	83.58±2.76	81.75±4.42	85.77±4.42	
	AF50	89.69±2.16	100.86±9.19	101.43±0.86	102.01±0.5	104.59±1.79	
	AF0	89.19±6.12	92.97±6.3	98.38±10.58	105.14±6.9	108.38±15.48	
PS (자소엽)	AF95	74.82±1.26	77.37±2.28	82.12±2.9	79.56±1.67	89.78±2.9	
	AF50	89.97±7.8	90.26±6.02	92.26±10.82	98.57±9.89	95.13±6.22	
	AF0	88.11±7.31	92.97±6.55	93.51±4.47	105.95±19.53	101.35±17.78	
AG (도라지)	AF95	67.15±1.26	74.45±1.09	85.04±2.76	89.42±2.76	91.24±2.28	
	AF50	64.18±8.44	64.47±13.4	83.38±2.48	87.68±9.11	91.69±9.73	
	AF0	81.35±8.44	83.51±13.4	84.60±2.48	92.97±9.11	99.73±9.73	

<sup>1)</sup> The 3T3-L1 adipocytes were incubated for 24 hr in DMEM media with different concentration of extract from 4 medicinal plants. The cell viability was determined using MTT assay. <sup>2)</sup> Values are expressed as mean±SD (n=3).

모든 추출물에서 95% 발효주정 추출물을 100~20 ppm의 농도로 처리하였을 경우, 당귀 ( $67.52 \pm 1.67 \sim 90.51 \pm 0.63\%$ ), 백수오( $72.26 \pm 3.95 \sim 85.77 \pm 4.42\%$ ), 자소엽( $74.82 \pm 98.57\%$ ) 및 도라지 ( $67.15 \pm 1.26 \sim 91.24 \pm 2.28\%$ )로서 고농도로 처리하였을 경우에는 다소의 세포독성이 나타난 것으로 보였다. 그러나 50% 또는 0% 발효주정 추출물을 처리한 경우에는 도라지 50% 추출물의 경우를 제외하고는 세포의 생육에 문제가 없는 것으로 나타났다. 따라서 95% 발효주정 추출물은 60 ppm이하의 농도를 사용하여 지방전구세포(3T3-L1) 분화억제실험에 적용하여야 할 것으로 사료되었다.

(다) Oil Red O 염색; 지방분화전구세포(3T3-L1)에 분화유도시약(DMI solution)을 처리하고, 여러 가지 조건으로 추출한 4종의 약용식물 추출물을 적용하여 분화의 억제 정도를 실험하였다. 그리고 분화된 지방의 정도를 알아보기 위하여 Oil red O 염색시약을 이용하여 염색한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 또한 염색된 지방세포에 일정량의 isopropanol을 가하여 염색된 oil red O를 용해시킨 후 흡광도를 측정하여 분화된 세포에 축적된 지방의 양을 측정하여 비만이 진행된 정도 또는 억제된 정도를 알아보려고 하였으며 그 결과를 Table 6 및 Fig. 8에 나타내었다. 즉 95% 발효주정(AF95), 50% 발효주정(AF50) 및 물(AF0)을 처리하였을 경우, 당귀 ( $54.58 \pm 1.96$ ,  $67.23 \pm 0.28$  및  $65.53 \pm 0.4\%$ ), 백수오( $53.72 \pm 0.9$ ,  $59.14 \pm 4.49$  및  $57.43 \pm 1.06\%$ ), 도라지( $58.00 \pm 2.11$ ,  $81.83 \pm 1.93$  및  $68.19 \pm 0.88$ )에서는 AF50에서 약간 효과가 높게 나타났다. 그러나 자소엽( $31.09 \pm 1.04$ ,  $66.90 \pm 1.18$  및  $72.60 \pm 1.49\%$ )에서는 AF0에서 지방축적 억제효과가 크게 나타났다.

Table 6. Inhibitory effects on lipid accumulation of extracts from medicinal plants according to different extracted conditions

Medicinal plants	Extracted conditions	Inhibition of lipid accumulation (%) <sup>1)</sup>	Remarks
PG(당귀)	AF95	$54.58 \pm 1.96$ <sup>2)</sup>	
	AF50	$67.23 \pm 0.28$	
	AF0	$65.53 \pm 0.4$	
CW(백수오)	AF95	$53.72 \pm 0.9$	
	AF50	$59.14 \pm 4.49$	
	AF0	$57.43 \pm 1.06$	
PS(자소엽)	AF95	$31.09 \pm 1.04$	
	AF50	$66.90 \pm 1.18$	
	AF0	$72.60 \pm 1.49$	
AG(도라지)	AF95	$58.00 \pm 2.11$	
	AF50	$81.83 \pm 1.93$	
	AF0	$68.19 \pm 0.88$	

<sup>1)</sup> Inhibition activity of lipid accumulation of each sample was measured at 100 µg/mL.

<sup>2)</sup> All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

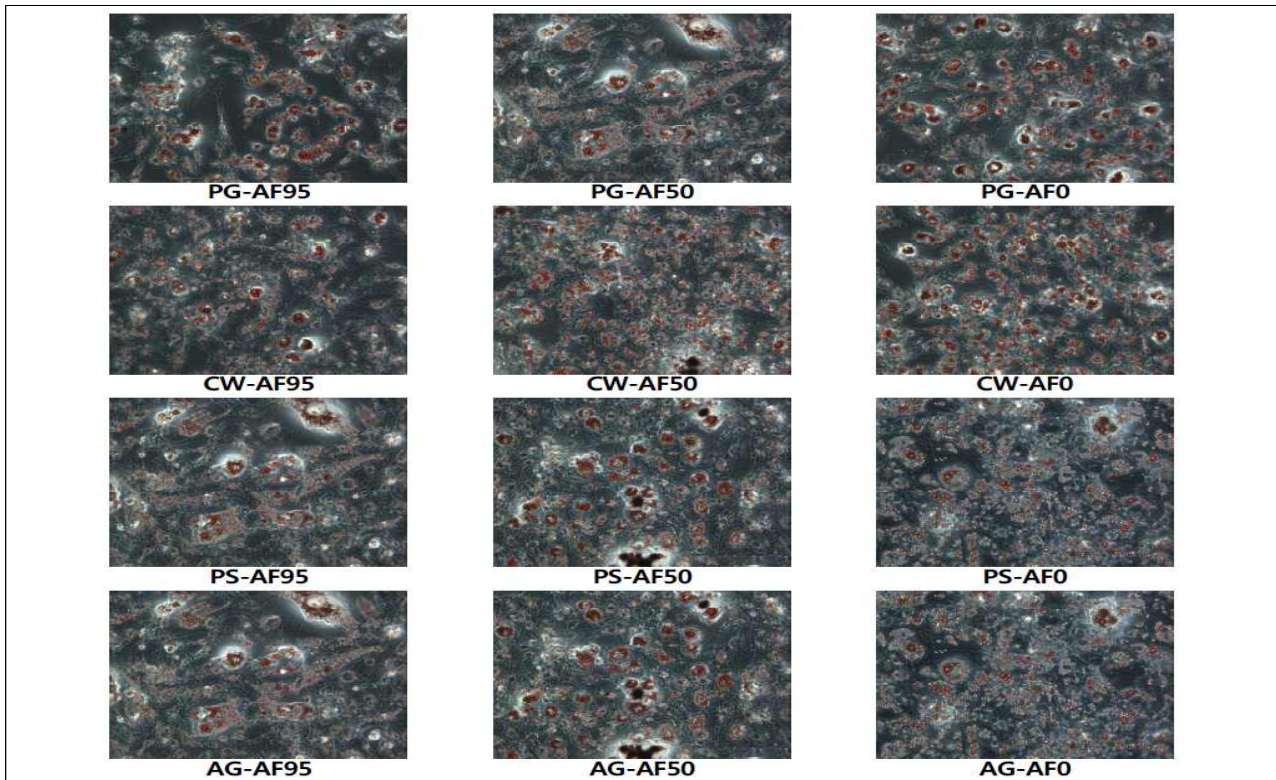


Fig. 7. Oil red stained lipid droplets in 3T3-L1 adipocyte cells.

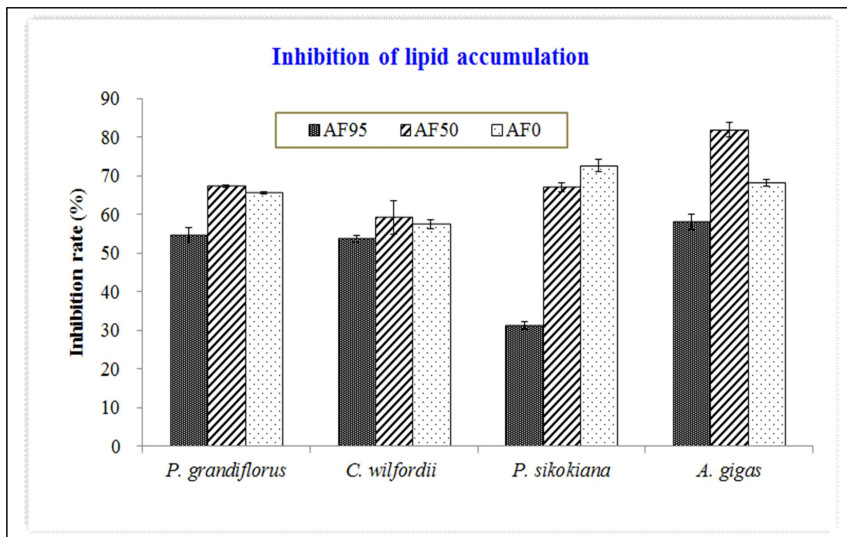


Fig. 8. Inhibitory effects on lipid accumulation of extracts from medicinal plants according to different extracted conditions. All values are presented as the mean  $\pm$  SD of triplicate determination.

## 나. 약용작물 추출물의 최적 발효조건 확립

### (1) 약용작물 복합추출물(ME)의 생리활성

(가) DPPH, ABTS free radical 소거활성 및 FRAP 환원력; Table 2에서와 같이 조합한 3종의 복합추출물(ME)에 대한 항산화실험 결과를 Fig. 9에 나타내었다. 본 연구의 전 단계 실험에서 예상했던 바와 같이 ME-2에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 즉 ME-2 복합추출물 1000 ppm을 처리하였을 때 DPPH는  $58.96 \pm 0.80\%$ , ABTS는  $84.32 \pm 0.15\%$  그리고 FRAP는  $72.73 \pm 0.14\%$ 의 활성을 나타내었다. 반면에 ME-1과 ME-3 복합추출물 1000 ppm을 처리하였을 경우에는, DPPH는 각각  $33.22 \pm 3.57$ 과  $43.89 \pm 4.02\%$ , ABTS는 각각  $87.37 \pm 0.29$ 와  $86.186 \pm 0.82\%$  그리고

FRAP는 각각  $41.76 \pm 0.46$ 과  $59.26 \pm 0.23\%$ 의 활성을 나타내었다. ABTS의 경우는 1000 ppm의 고농도에서는 3가지의 복합추출물의 활성이 비슷하였으나, ME-2가 500, 250, 125, 62.5 및 31.25 ppm의 농도로 처리하였을 때에도 여전히 가장 높은 활성을 유지하였다.

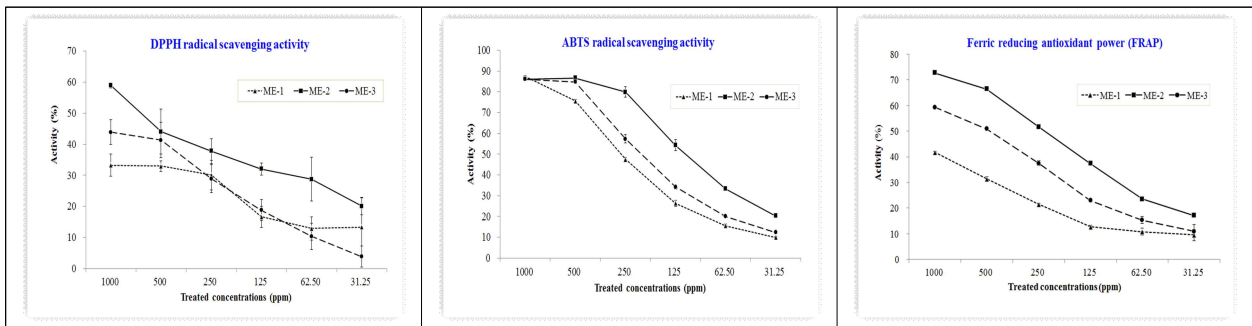


Fig. 9. Antioxidant activities of mixture extracts(ME) from medicinal plants according to different extracted conditions. All values are presented as the mean $\pm$ SD of triplicate determination.

## (2) 약용작물 복합추출물(ME)의 항당뇨활성

(가)  $\alpha$ -Glucosidase &  $\alpha$ -Amylase 억제활성: Table 2에서와 같이 조합한 3종의 복합추출물(ME)에 대한  $\alpha$ -Glucosidase 및  $\alpha$ -Amylase 억제활성실험 결과를 Fig. 10에 나타내었다. 본 연구의 전 단계 실험에서 예상했던 바와 같이 ME-1에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 즉 ME-1 복합추출물을 1000, 500, 250, 125, 62.5 및 31.25 ppm을 처리하였을 때, 각각  $22.94 \pm 2.00$ ,  $14.80 \pm 0.15$ ,  $11.51 \pm 1.45$ ,  $9.98 \pm 1.85$ ,  $11.43 \pm 6.46$  및  $5.59 \pm 1.93\%$ 의 억제활성을 보였다. 이는 positive control로 사용된 acarbose의 억제활성보다는 상당히 낮게 나타났으나 3종의 복합추출물 중에서는 가장 높은 활성을 보인 것이었다.

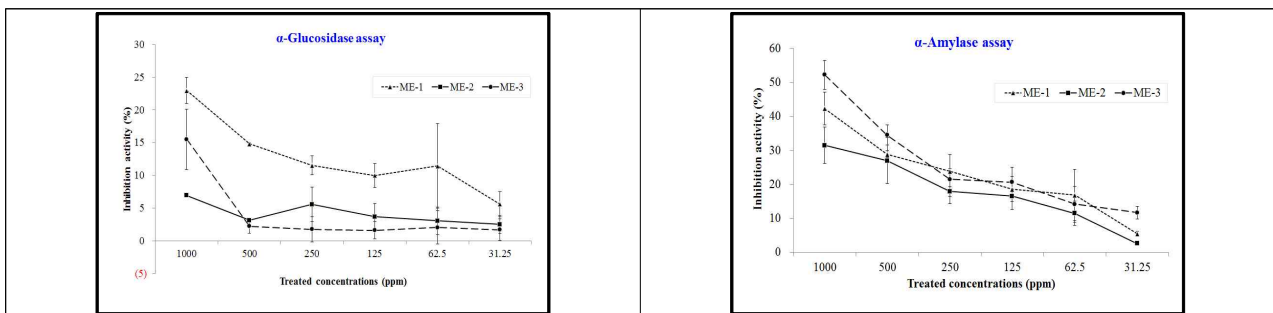


Fig. 10.  $\alpha$ -Glucosidase &  $\alpha$ -Amylase inhibition activities of mixture extracts(ME) from medicinal plants according to different extracted conditions. All values are presented as the mean $\pm$ SD of triplicate determination.

## (3) 약용작물 발효액의 항산화활성 비교

(가) DPPH, ABTS free radical 소거활성 및 FRAP 환원력; Fig. 11은 약용작물 추출물과 추출물의 발효액에 대한 항산화활성을 비교한 것이다. 대체로 발효 전에 비하여 발효 후에 오히려 활성이 낮아지는 결과가 나타났다. 이는 발효를 위하여 첨가한 sucrose와 soyprotein의 영향 또는 충분하게 발효가 이루어지지 않았기 때문인 것으로 사료되었다. 뿐만 아니라 발효 전의 복합추출물(ME-2)과 발효 후의 복합추출물(MEF-2)의 항산화활성의 비교에서도 발효 후에 활성이 다소 낮아진 결과를 얻어서 좀 더 발효조건에 대하여 심사숙고하여야 할 것으로 사료되었다.

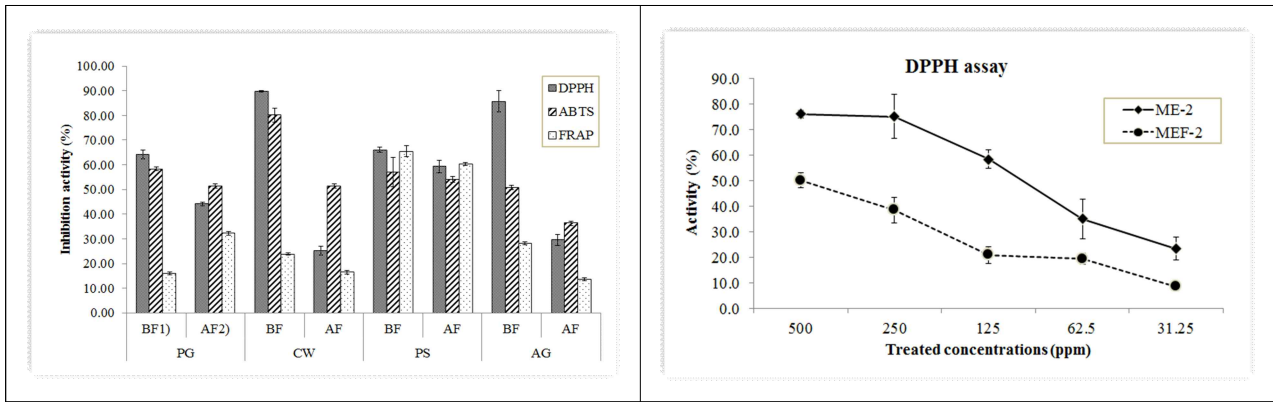


Fig. 11. Comparisons of antioxidant activities of extracts of medicinal plants between before and after fermentation. All values are presented as the mean±SD of triplicate determination. Inhibition activity of antioxidant activities was measured at AF95 (100 ppm). <sup>1)</sup> BF; before fermentation, <sup>2)</sup> AF; after fermentation

### 다. 음료(I)개발을 위한 최적의 혼합 레시피 개발

#### (1) 음료류 개발을 위한 최적의 혼합 recipe 개발

(가) 약용작물 복합추출물(ME) 또는 발효액(MEF) 및 첨가물 조성; 약용작물 복합추출물(ME) 또는 복합추출물 발효액(MEF)을 함유한 기능성 향산화 음료의 성분혼합표는 Table 7과 같이 하였다. 즉 음료의 주성분인 약용작물 복합추출물(ME-2)과 이것의 발효액(MEF-2)을 따로 제작하기로 하였다. 이른바 「추출음료」와 「발효음료」로 구분되는 것이다. 기본적으로 모든 음료에는 1회 음용량에 대하여 약용작물 2 g의 추출물이 함유되도록 하였으며, blueberry 농축액(66 brix)과 apple 농축액(66 brix)를 각각 1~2 g씩을 더하여 berry류에 많이 함유된 안토시아닌 등의 polyphenol에 의한 항산화효과의 상승과 함께 음료의 맛을 개선하도록 하였다.

Table 7. Recipes of functional beverage using ME-2 and MEF-2 from medicinal plants

Ingredients	unit	ME-2 (WS-A)	MEF-2 (WS-B)	Remarks
ME-2	ml	2	-	100 ml / 100 g
MEF-2	ml	-	2	100 ml / 100 g
Fiber sol-2	g	10	10	Dietary fiber, 85%
BB concentrate	g	1	2	Blueberry conc., 66 brix
AP concentrate	g	1	1	Apple conc., 66 brix
FT oligo당	g	5	5	fructo oligosaccharide
IM oligo당	g	10	10	Isomalto oligosaccharide
Vit. mixture	g	0.02	0.02	Vitamin 9 mixture
EAA-mixture	g	0.02	0.02	Es. amino acid 8 mixture
Soybean lecithin	g	0.01	0.01	
Purified fish oil	g	0.03	0.03	DHA 7%, powder
Citric acid	g	0.2	0.2	
Malic acid	g	0.02	0.02	
Calcium lactate	g	0.3	0.3	
Sub-total		29.6	30.6	
정제수	g	70.40	69.40	
합계	g	100	100	

※ This compositions of functional beverage may change after sensory test.

Water soluble dietary fiber (수용성 식이섬유)는 성인 1일 권장량의 17% (4.25 g)과 34% (8.5 g)가 함유되도록 하여 대장운동을 원활히 할 수 있도록 하여 배변활동을 도울 수 있도록

하였으며, 포도당에 비하여 난소화성이기 때문에 혈당지수(GI; glycemic index)가 낮은 올리고당(isomalto-oligosaccharide 및 fructo-oligosaccharide)을 사용하여 비피더스 등의 장내미생물의 생육을 활발하게 하여 대장기능을 개선하는데 도움이 되도록 하였다. 또한 불규칙한 식생활로 인하여 부족하기 쉬운 비타민 9종 믹스와 필수아미노산 8종 믹스를 더하여 이를 보완코자 하였으며, 인체 내에서 세포막의 주성분을 이루며 물과 기름을 섞이게 하는 유화제로서의 작용으로 인해 혈관벽에 흡착된 콜레스테롤을 용해하여 혈액의 순환을 돕는 것으로 알려진 대두 lecithin 과 오메가-3 지방산을 함유한 정제어유(purified fish oil)를 더하여 그 효과를 높이고자 하였다.

(나) 제조공정도 : 음료의 제조공정은 Fig. 12에 나타내었다.

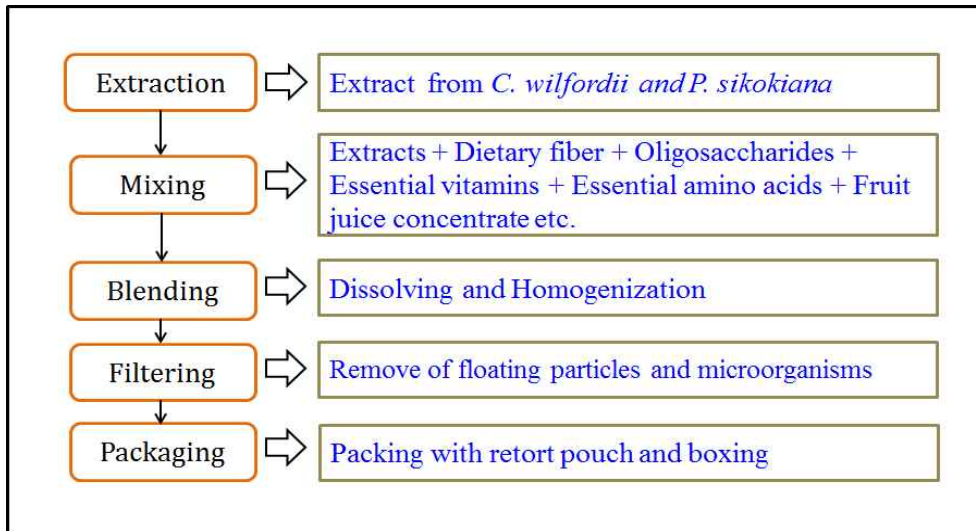


Fig. 12. Schematic diagram for manufacturing of physiologically functional drinks.

즉 백수오 100 g에 대하여 2 L의 95% 발효주정을 가하여 60~65℃ 추출물(CW-AF95)과 자소엽 50% 발효주정추출물(PS-AF50)을 등량 혼합하고 Table 7에 나타낸 바와 같이 과즙농축액, 수용성 식이섬유, 올리고당, 9종의 필수비타민, 8종의 필수아미노산, 대두레시틴, 정제어유, 기타 첨가물들을 혼합하고 용해시킨 후에 균질화하였다. 그리고 비용해성 부유물질 또는 잔존 미생물을 제거하기 위하여 초미세 filtering 과정을 거친 후에 내열 retort pouch에 100 ml씩을 담아 밀봉하였다.

(다) 시제품 및 영양성분분석 : Fig. 13은 음료의 성분 혼합표(Table 7)에 따라 제작한 음료의 시제품이다. 즉 백수오와 자소엽의 혼합추출물을 이용한 음료의 시제품을 retort pouch에 담아 포장한 것이다.



선정된 약용작물은 도라지(*Platycodon grandiflorus*, PG), 하수오(*Cynanchi wilfordii* Radix; CW), 자소엽(*Perilla sikokiana*, PS), 당귀(*Angelica gigas* Nakai; AG) 및 엉겅퀴(*Cirsium japonicum*, CJ) 등 5종으로 하였다. 이들 약용식물 중에서 당해년도에 제2세부과제에서는 도라지와 엉겅퀴를 중심으로 실시하였다.

## 나. 약용작물의 음료개발을 위한 최적화 연구

### (1) 약용작물의 추출방법 및 조건

#### (가) 생약재료

① 도라지(*Platycodon grandiflorus*, PG); 산청군 생약협동조합으로부터 2~3년산을 구입하여 사용하였다.

② 엉겅퀴(*Cirsium japonicum*, CJ); 제천한방약초(충북 제천 소재, ☎ 043-644-8098) 및 동이약초(서울특별시 동대문구 소재, ☎ 02-957-8798) 등에서 국내산 엉겅퀴 전초를 구입하여 사용하였다. 한방에서는 엉겅퀴의 지상부를 대계초(大薊草), 뿌리를 대계근(大薊根)이라 부르며 피를 차게 하고 출혈을 멎게 하여 어혈을 없애고 조그마한 종기를 제거하는 효능이 있는 약재로 알려져 있으나, 주로 대계근을 사용하고 대계초는 나물로 무쳐서 먹기도 한다.

③ 서양엉겅퀴(*Silybum marianum*, SM); 평택약초농원(경기도 평택 소재)에서 건초 및 뿌리를 구입하여 사용하였다. 서양엉겅퀴는 국내산 엉겅퀴와의 비교를 위하여 사용하였다. 서양엉겅퀴는 흰무늬엉겅퀴, milk thistle 등으로 알려져 있으며, 주로 지상부를 간기능의 개선에 사용하고 뿌리는 사용하지 않는다.



Fig. 15. Photographs of *Cirsium japonicum* and *Silybum marianum* (milk thistle).

#### (나) 추출용매

추출용매는 발효주정(alcoholic fermentation, AF)과 정제수를 사용하였다. 추출용매의 조합은 발효주정과 정제수를 각각 100:0 (AF100), 70:30 (AF70), 50:50 (AF50) 및 0:100 (AF0)의 비율로 섞어서 사용하였다.

#### (다) 추출방법 및 조건

엉겅퀴, 서양엉겅퀴의 지상부(leaf & stem) 및 지하부(root) 및 도라지 건조생약재료 각각 600 g (dry weight)에 대하여 추출용매 6 L의 추출용매를 가하여 Table 2-1에 나타난 조건과 같이 환류냉각기를 부착하여 2회 이상 반복 추출하였다. 추출 후 여과액을 모으고 60°C 이하에서 진공농축하였으며, 각각 추출물의 무게를 측정하고 사용한 약용작물의 량에 대한 비율로 추출 수율을 환산하였다.



Table 8. Extraction conditions against selected medicinal plants

Medicinal plants	Parts	Amounts (g)	Extraction temperature & time			Remarks
			AF100	AF70 & AF50	AF0	
영경귀 ( <i>C. japonicum</i> )	Stem & Leaf	600	60~65°C 5시간	70~80°C 5시간	90~95°C 10시간	각각 6 L의 추출용매를 사용하여 2회 반복 추출하였음.
	Root					
서양영경귀 ( <i>S. marianum</i> )	Stem & Leaf					
	Root					
도라지 ( <i>P. grandiflorus</i> )	Root					

## (2) 기능성 성분 분석에 의한 추출 최적화

### (가) 재료 및 방법

① **Minerals**; AOAC (Association of official analytical chemists) 공정법에 준하여 실시하였다.

② **Total phenolics content**; 1차 년도와 동일한 방법으로 수행하였음.

③ **Amino acids content**

#### ㉞ **Structural amino acids**;

시료의 전처리는 Jang 등의 방법에 따라 하였다. 각각의 시료 분말 100 mg과 6 N HCl 2 ml을 screw cap tube에 넣고 110±1°C의 heating block에서 24시간을 두어 가수분해하였다. 그 뒤 가수분해물을 원심분리(15,000 rpm, 4°C, 15 min)하고, 상등액을 따로 evaporating flask에 취하여 rotary vacuum evaporator로서 농축시키면서 잔존하는 Cl<sub>2</sub> gas를 완전히 제거시켰다. 그리고 각각의 evaporating flask에 2 ml씩의 Na-citrate (pH 2.2) buffer를 가하여 완전히 녹이고, 0.2 µm membrane filter로서 여과하여 amino acids 분석을 위한 시료로 하였다. Structural amino acids의 분석을 위한 기기는 L-8900 (Hitachi co., Japan)을 이용하였다. 이때 elution buffer의 flow rate는 35 ml/hr, column의 온도는 47°C에서 88°C까지 점진적으로 상승시켰다. 또한 분리된 structural amino acids의 reaction reagent는 ultrasolve에 녹인 ninhydrin과 hydrindantin을 사용하였으며, flow rate는 25 ml/hr, reaction coil의 온도는 135°C로 하였다. Detector는 440 nm에서 imino acids (secondary amino acids)를 570 nm에서 amino acids (primary amino acids)를 검출하였다.

#### ㉟ **Free amino acids**;

시료의 전처리는 Chun 등의 방법에 따라 하였다. 즉 시료 분말 5 g에 70% ethanol 100 ml을 가하고 30분간 shaking한 후에 원심분리(12,000 rpm, 10 min)하고 상등액을 취하였다. 이 과정을 2회 더 반복하여 상등액을 합하였다. 이 상등액은 20% trichloro acetic acid (TCA) 15 ml을 가하여 4°C 냉장고에서 16~24시간 동안 방치하여 단백질을 침전시키고 원심분리하여 제거하였다. 다시 남은 상등액에 100 ml의 *n*-hexane을 가하여 잘 흔들고 정치하여 지용성 물질(hexane 분획물)을 제거하였다. 그리고 남은 수용액 층을 40°C 이하에서 감압·농축하였다. 농축액은 0.2 M Li-citrate buffer (pH 2.2)용액으로 용해한 후 0.2 µm membrane filter로서 여과하여 아미노산 자동분석기(Hitachi L-8900)로 분석하였다. 표준물질로는 각각의 standard amino acid의 농도를 2 nmol/20 µl로 조정하여 사용하였다. 분석에 사용되는 column은 free amino acid 분석전용으로서 anion exchange column (4.6 mm × 200 mm)을 사용하였으며, 분석이 진행됨

에 따라 점차적으로 anion의 강도를 높여주었고 최종적으로 0.4 M NaOH를 흘려 반응을 종료시키고 regeneration하는 과정을 거치게 하였다.

#### ④ Analysis of silymarin compounds;

영정퀴로부터 silymarin의 추출은 다음과 같이 하였다. 먼저 국내산 영정퀴와 서양영정퀴 시료분말 10 g을 정밀하게 칭량하고 n-hexane에 4시간 동안 침지하여 탈지하였다. 이어서 silymarin compounds를 추출하기 위하여 ethyl acetate로서 8시간 동안 soxhlet extractor를 이용하여 추출하였다. 이 ethyl acetate 용액을 50°C 이하의 rotary vacuum evaporator로서 감압 농축하여 silymarin compounds (soft yellow powder)을 추출하였다. 이렇게 얻은 silymarin compounds를 methanol에 1 mg/ml의 농도로 녹여 membrane filter로서 여과한 후에 HPLC로서 분석하였다. Reference solution을 만들기 위하여 표준 silybinin (Sigma, USA)을 정확히 칭량하여 methanol에 녹여 0.004, 0.02 및 0.2 mg/ml의 용액으로 만들었으며, 검량곡선은 silybinin용액의 농도와 silybinin A 와 silybinin B의 peak area의 합과의 관계를 근거로 작성하였다. Silymarin표준용액은 silymarin (Sigma S0292, USA)로서 0.7 mg/ml의 methanol 용액을 조제하고, 해당 분석조건에서의 silymarin 중의 flavonolignan 성분들의 chromatographic pattern으로 결정하였다. HPLC는 Agilent 1200을 사용하였으며 분석조건은 Nucleosil C18 (150 × 4.6 mm, I.D. 5 µm) column을, mobile phase solvent는 methanol:water (50:50, v/v), isocratic 모드로서 flow rate는 1 ml/ml이었으며, detection은 UV 288 nm로서 분석시간은 1개의 시료 당 20분이 소요되었다.

#### (3) 생약추출물의 항산화 활성

##### (가) 재료 및 방법

- ① DPPH free radical 소거활성; 1차 년도와 동일한 방법으로 수행하였음.
- ② ABTS cation radical 소거활성; 1차 년도와 동일한 방법으로 수행하였음.
- ③ FRAP (ferric reducing antioxidant power) 활성; 1차 년도와 동일한 방법으로 수행하였음.

#### (4) 생약추출물의 항당뇨 활성

##### (가) 재료 및 방법

- ①  $\alpha$ -Glucosidase 저해활성; 1차 년도와 동일한 방법으로 수행하였음.
- ②  $\alpha$ -Amylase 저해활성; 1차 년도와 동일한 방법으로 수행하였음.

#### (5) 간세포 보호효과

##### (가) 재료 및 방법

##### ① 간세포 및 세포배양;

인체 정상 간세포(human liver cells, ATCC® CCL-13™, Chang) 또는 흰쥐 정상 간세포(mouse liver normal cell, BNL CL.2)를 불활성화 한 fetal bovine serum (FBS) 10%와 1.0% penicillin-streptomycin이 첨가된 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 배지에서 37°C 및 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양한다.

##### ② 추출물의 세포 독성 측정(MTT);

시료에 대한 세포생존율은 MTT {3-(4,5-methyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenylte trazolium bromide} colorimetric assay 방법으로 실험하였다. 세포는  $1.25 \times 10^5$  cell/200 µl의 농도로 96-well plate에 분주하고 24시간 배양 후 배지를 제거하였다. 여기에 새로운 Dubelco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco Co, Gaithersburg, MD, USA) 200 µl에 농도별로 희석한 시료를 각각 첨가하여 24시간 배양한 다음 5 mg/mL로 제조한 MTT (Sigma Co, St. Louis,

MO, USA)용액 20  $\mu$ l를 각 well에 첨가하고 4시간동안 배양하였다. 배양종료 후 상등액을 제거하고 각 well에 100  $\mu$ l의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 ELISA reader (Molecular devices Co, Santa Clara, California, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

③ **추출물의 t-BHP에 의한 세포의 손상으로부터 간세포보호 효과 측정;** 세포 독성 및 간세포 보호효과는 MTT; [3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide; Sigma-Aldrich Co.] 환원 방법을 이용하여 세포의 생존율을 측정하였다. 흰쥐 정상 간세포(mouse liver normal cell, BNL CL.2)를 48-well plates에  $7 \times 10^3$  cells/well 농도로 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후, 각 시료를 최종 농도(0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mg/ml)가 되도록 세포에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 MTT 용액(5.0 mg/ml)을 가하고 37° C에서 4시간 더 배양하여 MTT를 환원시켜 생성된 formazan이 배지에 떨어져 나가지 않도록 배지를 조심스럽게 제거하였다. DMSO를 200  $\mu$ l 분주하여 20분 동안 혼합한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. t-BHP (tert-Butyl hydroperoxide)에 의한 산화적 손상에 대한 세포보호 효과를 관찰하기 위하여, 흰쥐 정상 간세포(mouse liver normal cell, BNL CL.2)를 48-well plates에  $7 \times 10^3$  cells/ml 농도로 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후 각 시료를 최종 농도(0.01, 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml)가 되도록 세포에 한 시간 전 처리한 후 t-BHP(최종 농도 80  $\mu$ M)를 첨가하고 24시간 더 배양하였다. 이후 MTT assay로 세포의 생존율을 측정하였다.

④ **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 따른 세포 생존율;** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 따른 생약 추출물의 간세포 보호효과는 MTT assay를 이용하여 측정한다. 간세포를 24 well plate에  $5 \times 10^4$  cells/ml로 분주하여 24시간 동안 배양한 후, 배지를 제거하고 phosphate-buffered saline (PBS)로 2회 세척한 다음 생약 추출물(100  $\mu$ g/ml) 1 ml을 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 산화적 스트레스를 일으키기 위하여 0.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 를 처리한 후, 2시간 동안 배양한 다음 이후 MTT assay로 세포의 생존율을 측정한다. 세포생존율은 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하고 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시한다.

⑤ **알코올 처리에 따른 세포 생존율;** 에탄올 처리에 따른 생약 추출물의 간세포 보호효과는 MTT assay를 이용하여 측정한다. 간세포를 24 well plate에  $5 \times 10^4$  cells/ml로 분주하여 20시간 동안 배양하고, 3% FBS를 함유한 배지로 교환하여 생약 추출물(100  $\mu$ g/ml)을 처리하고 1시간 후 300 mM 알코올을 처리하여 24시간 배양한다. 5일간 같은 방법으로 세포에 생약 추출물과 알코올을 처리한 다음 이후 MTT assay로 세포의 생존율을 측정한다. 세포생존율은 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하고 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시한다.

#### (6) 전지방세포(3T3-L1 adipocytes)의 분화억제에 의한 항비만 효과

##### (가) 재료 및 방법

- ① 세포 생존율 측정 (MTT assay); 1차 년도와 동일한 방법으로 수행하였음.
- ② 3T3-L1 세포배양과 분화; 1차 년도와 동일한 방법으로 수행하였음.
- ③ Oil Red O 염색; 1차 년도와 동일한 방법으로 수행하였음.

#### (7) ACE (angiotensin converting enzyme) 활성 억제에 의한 항고혈압효과

ACE저해 활성은 Cushman 등의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉 조효소액은 rabbit lung acetone powder (Sigma, USA) 1 g에 0.3 M NaCl을 함유한 0.1 M sodium borate buffer (pH 8.3) 5 ml의 농도로 4°C에서 24시간 추출한 후, 4°C 4,000 rpm에서 40분간 원심분리하여 상등액을 ACE 조효소액으로 사용한다. 기질은 0.3 M NaCl이 함유된 0.1 M sodium borate buffer

(pH 8.3)에 HHL (hippuryl-histidyl-leucine)을 5 mg/ml (w/v)의 농도로 녹인 후 기질로 사용한다. ACE 저해활성은 시료 50  $\mu$ l에 ACE조효소액 50  $\mu$ l를 가한 다음 37°C에서 5분간 예비반응 시킨 후, 기질 50  $\mu$ l를 가한 후 다시 37°C에서 1시간 반응 시킨다. 1 N HCl 150  $\mu$ l로 반응을 정지시키고 ethyl acetate 750  $\mu$ l 가한 후, 1분간 교반하고 4°C, 5,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후 상등액 500  $\mu$ l를 얻는다. 이 상등액을 120°C에서 30분간 완전히 건조시켜 MeOH 2 ml을 넣은 후 228 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 다. 도라지 및 영경귀 복합추출물의 조제 및 생리활성

### (1) 복합추출물의 조제

도라지(*P. grandiflorus*) 및 영경귀(*C. japonicum*)의 복합 추출물은 각각의 일반성분 함량과 flavanolignan 화합물의 함유량과 이들의 추출물에 대한 항산화효과, 항당뇨효과, 간세포 보호 효과, 항 비만효과 및 항고혈압활성 등을 시험한 결과를 바탕으로 Table 9와 같이 3종의 생약의 복합추출물 조합을 선정하였다. 즉 2차 년도에서의 복합생약추출물의 조합은 항산화 및 간세포 보호효과에 주안점을 두고 음료를 개발할 목적으로 조합하였다. 1차년도에 사용하였던 자소엽(*P. sikokiana*)과 백하수오(*C. wilfordii* R.)를 제외하고 도라지(*P. grandiflorus*)와 새로 선정된 생약재인 영경귀(*C. japonicum*)의 주정추출물의 조합을 배합비율을 달리하여 3종의 복합추출물을 선정하였다. 선정 이유는 다음과 같다. 영경귀(*C. japonicum*)는 서양영경귀(*S. marianum*)에 비하여 총 페놀함량은 약 80% 함유하고 있으며, 펠수아미노산(지상부와 뿌리에서 71.80 mg/g)과 유리아미노산(13.07 mg/g)을 함유하고 있었다. 한편 영경귀의 지상부와 뿌리에서 silymarin compounds는 각각 211.49 와 165.39  $\mu$ g/g으로서 서양영경귀의 지상부의 195.27  $\mu$ g/g 보다 월등히 함량이 많았다. 항산화 활성은 DPPH radical 소거능은 83.48~88.95%로 서양영경귀(84.39~88.39%)와 유사하였으며, ABTS 활성은 83.88~85.03%로서 서양영경귀(70.28~80.75%)보다 약간 우수하였다. 그러나 FRAP 활성은 90.74~92.92%로서 서양영경귀(94.64~95.70%)보다는 약간 낮았으나 90% 이상의 비교적 높은 활성을 나타내었다.  $\alpha$ -Glucosidase 저해활성은 54.87~58.47%로서 서양영경귀(38.76~68.35%)와 비교해서 뿌리는 국내산 영경귀가 우수하였다.  $\alpha$ -Amylase 저해활성은 37.50~50.69%로서 서양영경귀(15.97~56.25%)와 비교해서 비슷하였으나 뿌리는 국내산 영경귀가 우수하였다. 간세포 보호효과에서도 *t*-BHP, hydrogen peroxide 및 ethanol에 의하여 손상된 간세포의 보호효과는 영경귀 추출물을 200  $\mu$ g/ml 처리하였을 때, 지상부와 뿌리에서 각각 239.83과 163.78%, 43.25와 37.36% 및 86.54와 59.14%의 보호효과를 나타내었다. 이는 서양영경귀의 효과와 비교하여 보면 hydrogen peroxide에 의한 손상된 간세포에서는 약간 낮았으나, *t*-BHP 및 ethanol에 의한 손상된 간세포에서는 높은 활성을 나타내었다. 한편 영경귀의 항고혈압효과는 지상부와 뿌리의 55.37과 44.04%로서 서양영경귀의 45.18과 56.55%와 거의 비슷하였으나, 지상부는 서양영경귀보다 약간 높았고 뿌리는 약간 낮았다. 이와 같은 결과는 국내산 영경귀가 여러 가지의 생리활성면에서 현재 간장보호용으로 많이 사용되고 있는 서양영경귀에 비하여 손색이 없는 우수한 건강 기능성 식품소재가 될 수 있을 것으로 생각되었으므로 이 연구에서는 국내산 영경귀(*Cirium japonicum*)와 1차 년도에 연구소재였던 도라지(*Platycodon grandiflorus*)를 소재로 복합추출물을 만들어 기능성 음료로 개발하고자 하였다.

Table 9. Preparation of mixture extracts (ME) from *P. grandiflorus* and *C. japonicum*

Mixtures of extract	Mixing ratio of extracts (%)		Remarks
	<i>P. grandiflorus</i>	<i>C. japonicum</i>	
	AF100	AF100	
ME-P7C3	70	30	
ME-P5C5	50	50	
ME-P3C7	30	70	

### (3) 복합추출물의 발효

본 연구에서 Table 9와 같이 조합한 복합추출물 중에서 항산화활성이 약간 우수한 ME-P5C5 (PG-AF100 : CJ-AF100 = 1 : 1)를 기반으로 한 간세포보호 및 항산화 음료를 개발하기로 하였다. 따라서 복합추출물 ME-P5C5 (도라지와 엉겅퀴의 혼합비율이 50:50)를 발효시켜 그 효과를 높일 수 있는 방안을 찾고자 하였다. 복합추출물 ME-P5C5의 발효는 엉겅퀴와 도라지 200 g씩에 발효주정을 4 L씩을 가하고 65~70°C에서 5 hr, 2회 추출하여 여과하고 농축하였다. 이 농축액에 증류수 600 ml을 가하여 현탁하고 sucrose (2%)와 soyprotein (5%)을 첨가하고 autoclave로 멸균한 후, 미리 배양해 둔 젖산균(*Lactobacillus brevis*)을 접종하고, 37°C에서 발효를 시작하였다. 총 발효기간(4주)중에 발효 정도를 관찰하기 위하여 매주 pH의 변화를 관찰하고, 발효시작 15일 후에 sucrose를 최종농도가 5%까지 보충해 주었다. 최종발효가 끝난 후, 발효액을 여과하고 농축하여 약용작물 발효액(MEF-P5C5)을 만들었다. 그리고 이 발효액의 생리활성효과를 시험하였으며, 발효전의 추출물과 효과를 비교하였다.

## 라. 음료의 개발을 위한 최적의 혼합 recipe 개발

### (1) 복합추출물 및 첨가물 조성

약용작물 복합추출물을 함유한 기능성 항산화 음료의 성분혼합표를 만들기 위하여 기본적으로 모든 음료에는 1회 음용량에 대하여 약용작물 5 g에 해당하는 복합추출물이 함유되도록 하며, blueberry 농축액(66 brix) 또는 apple 농축액(66 brix)를 각각 일정량 더하여 berry류에 많이 함유된 안토시아닌 등의 polyphenol에 의한 항산화효과의 상승과 함께 음료의 맛을 개선한다. Water soluble dietary fiber (수용성 식이섬유)는 성인 1일 권장량의 34% (8.5 g)가 함유되도록 하여 대장운동을 원활히 할 수 있도록 하여 배변활동을 도울 수 있도록 하며, 포도당에 비하여 난소화성이기 때문에 혈당지수(GI; glycemic index)가 낮은 올리고당(isomaltooligosaccharide 및 fructooligosaccharide)을 사용하여 비피더스 등의 장내미생물의 생육을 활발하게 하여 대장기능을 개선하는데 도움이 되도록 한다. 또한 불규칙한 식생활로 인하여 부족하기 쉬운 비타민 9종 믹스와 필수아미노산 8종 믹스를 더하여 이를 보완코자 한다.

## 2-2. 2차년도 연구결과

### 가. 지리산권역 약용작물의 선정

2차년도에는 선정된 5종의 약용작물을 중에서 도라지(*Platycodon grandiflorus*, PG)와 엉겅퀴(*Cirsium japonicum*, CJ)를 중심으로 실시하였다.

## 나. 약용작물의 음료개발을 위한 최적화 연구

### (1) 추출수율

추출용매의 조합과 추출시간, 온도 등을 달리하여 추출한 후, 추출수율은 발효주정 원액(AF100)을 그대로 사용하였을 경우, 영경귀의 지상부에서 13.66%, 지하부에서 11.37%, 서양영경귀의 지상부에서 16.37%, 지하부에서 6.41% 및 도라지의 18.45%로서 가장 높았으며 추출물의 주정 함유량이 낮을수록 추출수율은 낮아졌다. 뿐만 아니라 총 페놀 함량, 항산화효과(DPPH, ABTS, FRAP activity) 등을 검토해 본 결과, 모든 항목에서 AF100에서 가장 우수하였다. 따라서 이후의 실험결과는 주정 원액추출물(AF100)로 추출하여 실험하였다.

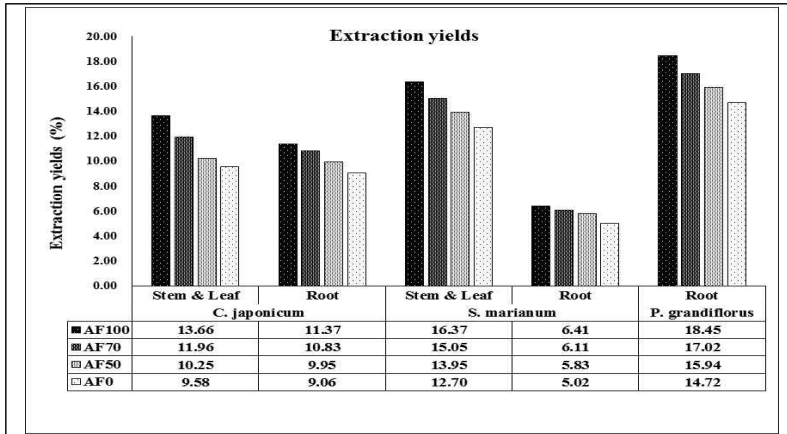


Fig. 16. Extraction yields of selected medicinal plants about different extraction conditions. All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

### (2) 기능성 성분 분석에 의한 추출 최적화

(가) Minerals; 영경귀, 서양영경귀 및 도라지의 mineral 함량을 측정한 결과는 다음과 같았다.

Table 10. Content of minerals in *C. japonicum*, *S. marianum* and *P. grandiflorus*.

Minerals	Contents of mineral elements (mg/g)				
	<i>C. japonicum</i>		<i>S. marianum</i>		<i>P. grandiflorus</i>
	Stem & Leaf	Root	Stem & Leaf	Root	Root
P	0.86±0.02	1.19±0.03	0.34±0.01	3.75±0.02	15.23±0.53
S	1.81±0.03	2.67±0.05	1.84±0.04	2.09±0.01	2.25±0.32
K	31.04±0.39	11.78±0.22	39.83±0.41	19.11±0.21	18.36±0.38
Ca	8.15±0.16	6.21±0.12	11.81±0.10	10.02±0.11	12.33±0.65
Fe	-	0.11±0.00	-	0.08±0.02	3.21±0.29
Mg	2.14±0.01	2.87±0.01	3.64±0.08	3.35±0.03	5.43±0.04
Mn	-	0.06±0.01	-	0.01±0.01	1.07±0.04
Zn	-	0.02±0.01	-	0.04±0.01	0.93±0.15
Al	-	1.01±0.02	-	0.74±0.01	0.35±0.06
Na	0.24±0.01	0.26±0.01	2.0±0.05	4.27±0.01	4.37±0.21
Total	44.24±0.62	26.18±0.47	59.46±0.69	43.46±0.44	63.53±2.67

All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

즉 영경귀와 서양영경귀의 지상부에는 총 함량이 44.24±0.62 및 59.46±0.69 mg/ml, 지하부에는 26.18±0.47 및 43.46±0.44 mg/g이 함유되어 있었다. 도라지에는 63.53±2.67 mg/g 함유되어 있었다. 영경귀에는 K, Ca, Mg, S, P의 순이었으며, 서양영경귀에는 K, Ca 다음으로 Mg, Na, S (뿌리에서는 Na, P, Mg, S)의 순으로 많이 함유하고 있었다. 한편 도라지에는 K, Ca, P, Mg, Na, Fe, S의 순으로 많이 함유되어 있었다.

(나) Total phenolics content; 총 페놀 함량은 서양영경귀의 지상부와 뿌리에 각각 122.46±4.27과 107.06±5.25 mg/g으로 국내산 영경귀의 97.22±5.52과 85.32±3.06 mg/g 보다

많았다. 한편 도라지에는  $66.70 \pm 4.11$  mg/g으로 상대적으로 영경귀보다 적게 함유되어 있었다. 총 페놀의 함량은 항산화활성과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있으며 실제로 본 연구에서의 항산화활성에서도 총 페놀의 함량과 비례적인 관계를 나타내었다.

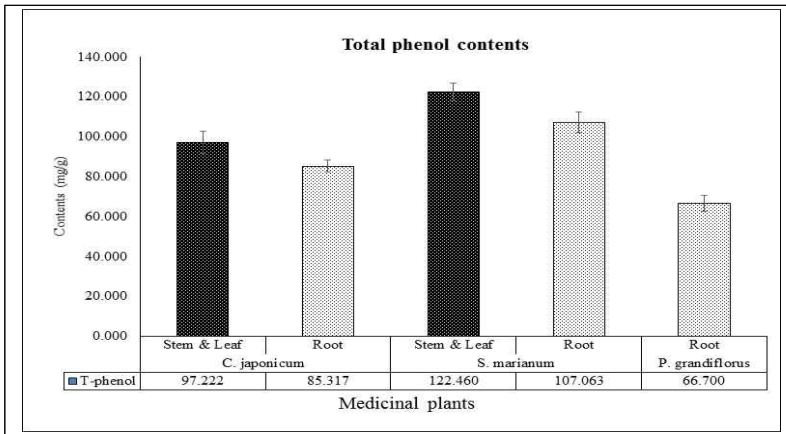


Fig. 17. Contents of total phenol in *C. japonicum*, *S. marianum* and *P. grandiflorus*. All values are presented as the mean  $\pm$  SD of triplicate determination.

(다) Amino acid contents

① Structural amino acids; 구성아미노산은 시료에 존재하는 단백질을 구성하는 아미노산으로서 시료의 단백질 함량과 비례한다고 할 수 있다.

Table 11. Structural amino acid contents of *C. japonicum* and *S. marianum*

Structural amino acids	Content of structural amino acids (mg/g)			
	<i>C. japonicum</i>		<i>S. marianum</i>	
	Stem & Leaf	Root	Stem & Leaf	Root
Aspartic acid	13.55	15.21	21.09	9.11
Threonine*	5.99	3.33	8.66	3.44
Serine	5.87	3.12	8.14	3.76
Glutamic acid	15.74	7.94	21.68	7.84
Proline	9.53	4.40	10.33	3.59
Glycine	7.08	3.14	9.57	3.71
Alanine	7.86	3.63	10.89	4.03
Valine*	7.36	3.70	10.42	3.99
Methionine*	1.79	1.03	2.63	1.00
Isoleucine*	6.11	3.13	8.57	3.23
Leucine*	10.90	4.75	15.20	5.13
Tyrosine	2.16	1.18	3.80	1.12
Phenylalanine*	7.54	3.66	10.06	3.66
Lysine*	8.05	4.46	11.23	4.71
Histidine	3.07	2.06	4.21	1.89
Arginine	5.90	13.84	9.04	2.95
Total amount	118.48	78.58	165.53	63.17
Total of EAAs**	47.73	24.07	66.78	25.16
Ratio of EAAs	40.28	30.63	40.34	39.83

\*; Essential amino acids, \*\*; EAAs; essential amino acids

그러나 아미노산의 조성은 시료에 함유된 단백질의 품질을 나타내는 기준이 된다고 할 수도 있을 것이다. Table 2-4는 영경귀 및 서양영경귀의 구성아미노산의 조성과 함량을 분석한 결과를 나타낸 것이다. 총 아미노산 함량은 국내산 영경귀의 지상부와 뿌리에서 각각 118.48과 78.58 mg/g, 서양영경귀는 165.53과 63.17 mg/g으로서 지상부에는 서양영경귀가, 뿌리에는 국내산 영경귀에 더 많이 함유되어 있었다. 이는 다른 약용작물과 비교하여 특히 많이 함유된 것은 아니었다. 아미노산

의 개별성분별 함량에서는 지상부는 서양엉겅퀴가 고르게 약간씩 많이 함유되어 있었는데, 특히 많이 함유된 아미노산은 없었다. 그러나 뿌리에서 국내산 엉겅퀴에 aspartic acid와 arginine의 함량이 각각 15.21과 13.84 mg/g으로서 서양엉겅퀴의 9.11과 2.95 mg/g에 비하여 현저하게 많이 함유되어 있었다. 필수 아미노산은 모든 시료에서 7종이 확인되었는데, 그 함유량은 국내산엉겅퀴의 지상부와 뿌리에서 각각 47.73과 24.07 mg/g, 서양엉겅퀴의 지상부와 뿌리에서 각각 66.78과 25.16 mg/g이 함유되어 있었다.

② Free amino acids; 유리아미노산은 단백질이나 펩티드와 같은 결합형 아미노산에 반해 아미노산이 단독분자로 존재하는 상태를 말하며 생체 내에서의 유리아미노산은 아미노기(-NH<sub>2</sub>)와 카르복시기(-COOH)가 해리된 상태로 존재한다.

Table 12. Free amino acid contents of *C. japonicum* and *S. marianum*

Free amino acids	Content of free amino acids (mg/g)			
	<i>C. japonicum</i>		<i>S. marianum</i>	
	Stem & Leaf	Root	Stem & Leaf	Root
Taurine	0.063	-	-	-
o-Phosphoethanolamine	-	-	-	0.060
L-Aspartic acid	0.600	0.305	0.556	0.313
L-Threonine	0.252	0.128	0.461	0.070
L-Serine	0.290	0.087	0.398	0.132
L-Glutamic acid	0.566	0.276	0.459	0.278
L-2-Aminoadipic acid	0.041	-	0.083	0.013
Glycine	0.073	0.029	0.088	0.031
L-Alanine	0.486	0.226	0.785	0.129
L-Citrulline	0.016	0.015	0.009	0.005
DL-2-Amino butyric acid	0.000	0.003	0.014	0.002
L-Valine	0.492	0.119	0.847	0.063
L(-)-Cystine	0.087	0.059	0.023	0.218
L-Methionine	0.098	0.014	0.031	0.003
L-Cystathionine	0.068	-	0.013	-
L-Isoleucine	0.248	0.045	0.455	0.041
L-Leucine	0.361	0.074	0.532	0.046
L-Tyrosine	0.221	0.044	0.178	0.026
L-Phenylalanine	0.382	0.099	0.470	0.078
β-Alanine	0.101	0.065	0.031	0.030
DL-3-Amino isobutyric acid	0.220	0.131	0.014	0.015
4-Amino butyric acid	0.491	0.258	1.032	0.424
2-Amino ethanol	0.056	0.042	0.076	0.044
DL- <i>allo</i> -δ-hydroxylysine	0.005	-	0.005	-
L-Ornithine	0.003	0.005	0.009	-
L-Lysine	0.212	0.116	0.298	0.059
L-1-Methyl histidine	0.011	-	0.057	0.006
L-Histidine	0.069	0.087	0.138	0.043
L-Arginine	0.425	4.908	0.722	0.132
<b>Total</b>	<b>5.937</b>	<b>7.135</b>	<b>7.784</b>	<b>2.261</b>

유리아미노산은 혈중 유리아미노산, 조직유리아미노산(간의 유리아미노산이나 근육의 유리아미노산) 등을 형성하며 맛과 향에 깊은 관련이 있다. Table 2-5는 엉겅퀴 및 서양엉겅퀴의 유리아미노산의 조성 및 함량을 분석한 결과를 나타낸 것이다. Free amino acid의 전체 함량은 국내산 엉겅퀴에는 지상부와 뿌리에서 각각 5.939와 7.135 g/mg, 서양엉겅퀴에는 각각 7.784와 2.261 mg/g이 함유



되어 있었다. 이 결과는 지상부에는 서양엉겅퀴가 많이 함유되어 있으나, 뿌리에는 국내산 엉겅퀴의 뿌리(대계근)에 훨씬 많이 함유되어 있었다. 본 연구에서 분석된 29종의 유리아미노산 중에서 Taurine은 국내산 엉겅퀴의 지상부에만 존재하였고, *o*-Phosphothanolamine은 서양엉겅퀴의 뿌리에만 존재하였다.

(라) Content of flavonolignan components (silymarin); 엉겅퀴의 유효성분으로 알려진 silymarin은 주로 엉겅퀴의 씨앗에 많이 함유되어 있다. Silymarin은 강력한 항산화작용을 하는 flavonoid 복합체인데 이것은 건강한 세포와 조직을 손상시키는 활성산소로부터 보호하는 강력한 항산화제이면서 몸속의 독성물질을 해독하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 silymarin은 간독성, 간 손상을 예방하고 간조직과 간세포를 재생한다는 연구결과가 있다. Table 2-6은 엉겅퀴 및 서양엉겅퀴의 flavonolignan component (silymarin)의 조성과 함량을 분석한 결과를 나타낸 것이다. 국내산 엉겅퀴와 서양엉겅퀴에서 검출된 silymarin의 함량은 지상부와 뿌리에서 각각 21.15와 16.54 mg/g, 19.53과 0 mg/g이었다. 즉 서양엉겅퀴의 뿌리에서는 전혀 검출되지 않았다. 국내산 엉겅퀴는 지상부와 뿌리를 모두 생약재로 사용하는 데 반해서 서양엉겅퀴는 지상부만 사용하고 뿌리는 사용하지 않는 이유가 되기도 하는 것 같은 생각이 들었다. 전체량에서도 국내산 엉겅퀴는 지상부와 뿌리를 합해서 37.69 mg/g이 함유되어 있었으나, 서양엉겅퀴에는 지상부에만 19.53 mg/g이 함유되어 국내산 엉겅퀴보다 훨씬 적은 함량이었다. 그러나 개개의 silymarin compound는 국내산 엉겅퀴에서는 silychristin (1.02 mg/g)과 silydianin (36.67 mg/g) 등 2종류가 검출되었으나, 서양엉겅퀴에서는 silychristin (2.25 mg/g), silydianin (10.23 mg/g), silybin A (1.81 mg/g), silybin B (1.64 mg/g), isosilybin A (1.54 mg/g) 및 isosilybin B (2.06 mg/g) 등 6종의 silymarin 화합물이 검출되었다. 개개의 silymarin 화합물들에 대한 생리활성을 확인 할 수 없었으므로, 국내산 엉겅퀴가 비록 전체 함량이 많았지만 서양엉겅퀴에 비하여 silymarin 화합물의 종류가 다양하지 못하기 때문에 생리적 활성이 우수하다고 말할 수는 없었다.

Table 13. Content of silymarin compounds in *Cirsium japonicum* and *Silybum marianum*

Silymarin compounds	Content of flavonolignan components (mg/g)			
	<i>C. japonicum</i>		<i>S. marianum</i>	
	Stem & Leaf	Root	Stem & Leaf	Root
Silychristin	1.02	-	2.25	-
Silydianin	20.13	16.54	10.23	-
Silybin A	-	-	1.81	-
Silybin B	-	-	1.64	-
Isosilybin A	-	-	1.54	-
Isosilybin B	-	-	2.06	-
Total	21.15	16.54	19.53	-

### (3) 생약추출물의 항산화 활성

(가) DPPH free radical scavenging activity; 국내산 엉겅퀴의 지상부 및 뿌리, 서양엉겅퀴의 지상부 및 뿌리, 도라지의 DPPH free radical 소거활성을 측정된 결과를 Fig. 18에 나타내었다. 즉 추출물을 1 mg/ml 처리하였을 때, 국내산 엉겅퀴 추출물에서 지상부와 뿌리에서 각각  $83.48 \pm 0.49$ 와  $88.95 \pm 0.09\%$ , 서양엉겅퀴 추출물에서는 각각  $84.39 \pm 0.32$ 와  $88.39 \pm 0.18\%$ 로 높은 활성을 나타내었다. 한편 도라지는 1 mg/ml 처리하였을 때,  $63.41 \pm 3.12\%$ 로 엉겅퀴의 활성보다

는 다소 낮았다. 각각의 추출물에 대한 ED<sub>50</sub> values를 환산해 보면, 국내산 영경귀는 지상부와 뿌리의 추출물이 각각 214.54와 178.79 µg/ml이었으며, 서양 영경귀는 각각 102.68과 124.51 µg/ml로서 서양 영경귀가 DPPH radical 소거능이 우수한 것으로 나타났다. 한편 도라지의 ED<sub>50</sub> value는 399.65 µg/ml로 나타나 이들보다는 상당히 낮은 활성이었다.

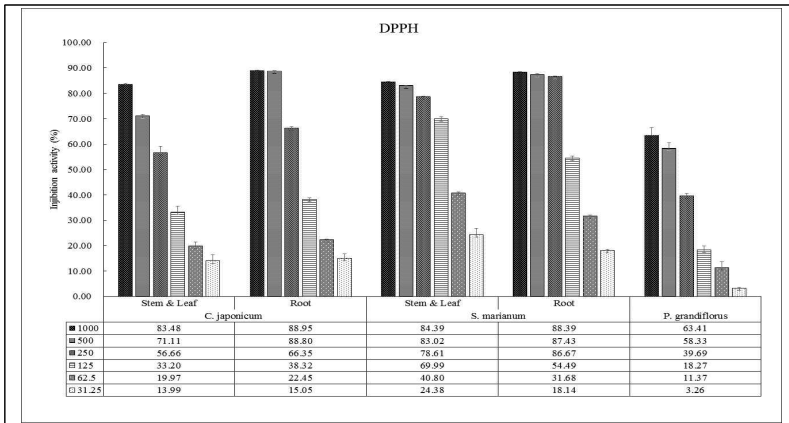


Fig. 18. DPPH free scavenging activities of extracts from *Cirsium japonicum* and *Silybum marianum*. All values are presented as the mean ± SD of triplicate determination.

(나) ABTS radical scavenging activity; 국내산 영경귀의 지상부 및 뿌리, 서양영경귀의 지상부 및 뿌리, 도라지의 ABTS cation radical 소거활성을 측정된 결과를 Fig. 19에 나타내었다. 즉 추출물을 1 mg/ml 처리하였을 때, 국내산 영경귀 추출물에서 지상부와 뿌리에서 각각 83.88 ± 0.48와 85.03 ± 0.13%, 서양영경귀 추출물에서는 각각 70.28 ± 2.80과 80.75 ± 0.23%로 비교적 높은 활성을 나타내었다. 또한 도라지 추출물도 1 mg/ml 처리하였을 때, 58.30 ± 2.13%로 영경귀의 활성보다는 다소 낮았다. 각각의 추출물에 대한 ED<sub>50</sub> values를 환산해 보면, 국내산 영경귀는 지상부와 뿌리의 추출물이 각각 61.91과 74.76 µg/ml이었으며, 서양 영경귀는 각각 47.79와 71.95 µg/ml로서 서양 영경귀의 지상부가 ABTS cation radical 소거능이 우수한 것으로 나타났다. 한편 도라지의 ED<sub>50</sub> value는 575.29 µg/ml로 나타나 이들보다는 상당히 낮은 활성이었다.

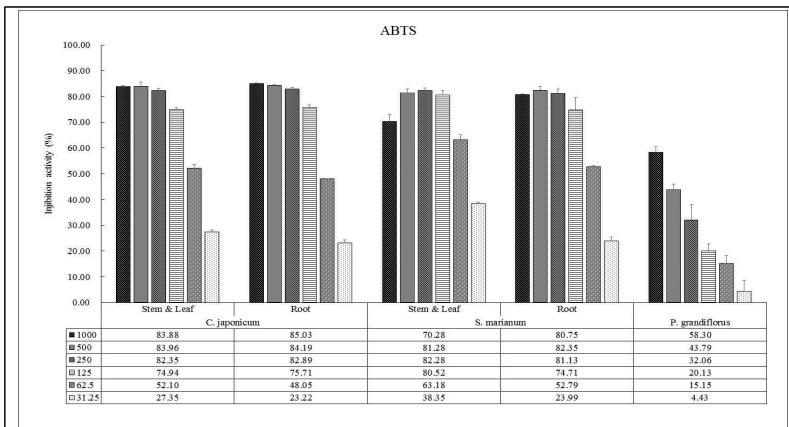


Fig. 19. ABTS cation scavenging activities of extracts from *Cirsium japonicum* and *Silybum marianum*. All values are presented as the mean ± SD of triplicate determination.

(다) FRAP 환원력; 국내산 영경귀의 지상부 및 뿌리, 서양영경귀의 지상부 및 뿌리, 도라지의 FRAP 활성을 측정된 결과를 Fig. 20에 나타내었다. 즉 추출물을 1 mg/ml 처리하였을 때, 국내산 영경귀 추출물에서 지상부와 뿌리에서 각각 93.73 ± 0.33와 92.92 ± 0.08%, 서양영경귀 추출물에서는 각각 95.70 ± 0.01과 94.64 ± 0.14%로 비교적 높은 활성을 나타내었다. 이는 대조군인 Trolox의 0.1 mg/ml로 측정하였을 때와 비슷한 활성이었다. 그러나 도라지 추출물은 1 mg/ml 처리하였을 때, 15.89 ± 2.31%로 영경귀의 활성보다는 매우 낮았다. 각각의 추출물에 대한 ED<sub>50</sub> values를 환산해 보면, 국내산 영경귀는 지상부와 뿌리의 추출물이 각각 143.49와 92.47 µg/ml이었으

며, 서양 엉겅퀴는 각각 51.16과 68.69  $\mu\text{g/ml}$ 로서 서양 엉겅퀴가 국내산 엉겅퀴에 비하여 FRAP 활성이 우수한 것으로 나타났다. 한편 도라지의 ED<sub>50</sub> value는 3438.57  $\mu\text{g/ml}$ 로 나타나 활성이 거의 없는 것으로 나타났다.

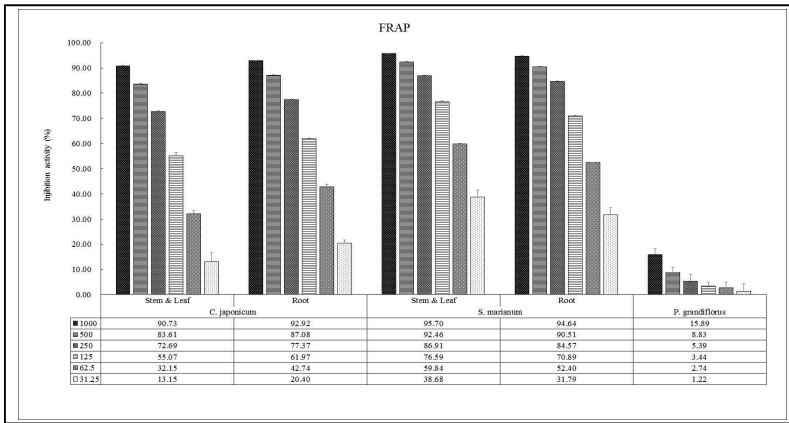


Fig. 20. FRAP (Ferric reducing antioxidant power) activities of extracts from *Cirsium japonicum* and *Silybum marianum*. All values are presented as the mean  $\pm$  SD of triplicate determination.

#### (4) 생약추출물의 항당뇨 활성

(가)  $\alpha$ -Glucosidase 저해활성;

국내산 엉겅퀴와 서양엉겅퀴의 지상부 및 뿌리의  $\alpha$ -Glucosidase 저해활성을 측정한 결과를 Fig. 21에 나타내었다. 추출물을 5 mg/ml 처리하였을 때, 국내산 엉겅퀴는 각각 58.47  $\pm$  3.80과 54.87  $\pm$  3.47%, 서양엉겅퀴는 각각 68.35  $\pm$  1.80과 38.76  $\pm$  1.15%로서 지상부의 경우는 서양엉겅퀴가 가장 활성이 높았으나 뿌리는 국내산 엉겅퀴가 활성이 높았다. 서양엉겅퀴는 지상부만 사용하고 뿌리는 사용하지 않는데 반해서 국내산 엉겅퀴는 지상부와 뿌리를 모두 생약재로 사용하는 이유가 되기도 하는 것 같은 생각이 들었다. 각각의 추출물에 대한 ED<sub>50</sub> values를 환산해 보면, 국내산 엉겅퀴는 지상부와 뿌리의 추출물이 각각 4.08과 4.34 mg/ml이었으며, 서양 엉겅퀴는 각각 3.53과 6.50  $\mu\text{g/ml}$ 로서 서양 엉겅퀴의 지상부 추출물이  $\alpha$ -Glucosidase 저해활성이 가장 우수하고 뿌리가 가장 활성이 낮은 것으로 나타났다. 한편 양성대조군으로 사용된 Acarbose의 ED<sub>50</sub> value는 0.42 mg/ml로 나타나 활성이 거의 없는 것으로 나타났다.

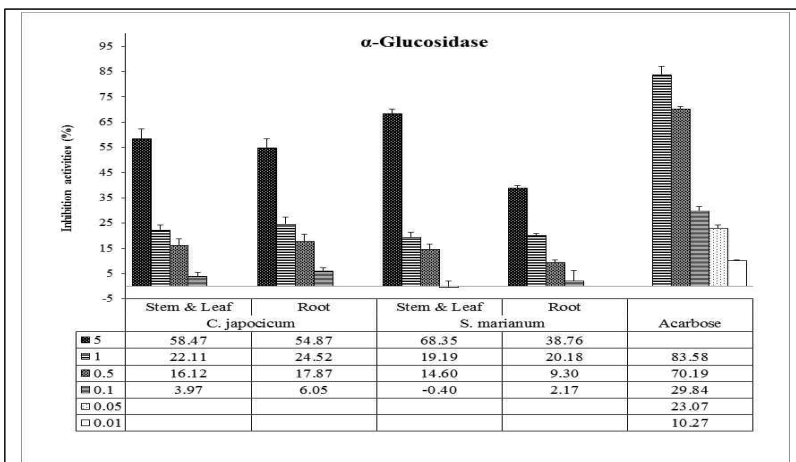


Fig. 21.  $\alpha$ -Glucosidase inhibition activities of extract from *Cirsium japonicum* and *Silybum marianum*.

All values are presented as the mean  $\pm$  SD of triplicate determination.

(나)  $\alpha$ -Amylase 저해활성; 국내산 엉겅퀴와 서양엉겅퀴의 지상부 및 뿌리의  $\alpha$ -Amylase 저해활성을 측정한 결과를 Fig. 22에 나타내었다. 추출물을 1 mg/ml 처리하였을 때, 국내산 엉겅퀴는 각각 50.69  $\pm$  9.55와 37.50  $\pm$  6.36%, 서양엉겅퀴는 각각 56.25  $\pm$  7.32과 15.97  $\pm$  4.34% 활성을 억제하는 것으로 나타났다. 즉 지상부의 경우는 서양엉겅퀴가 가장 활성이 높았으나 뿌리는 국내산 엉겅퀴가 활성이 높았다. 서양엉겅퀴는 지상부만 사용하고 뿌리는 사용하지 않는데 반해서 국

내산 엉겅퀴는 지상부와 뿌리를 모두 생약재로 사용하는 이유가 되기도 하는 것 같은 생각이 들었다. 각각의 추출물에 대한 ED50 values를 환산해 보면, 국내산 엉겅퀴는 지상부와 뿌리의 추출물이 각각 0.92와 1.02 mg/ml이었으며, 서양 엉겅퀴는 각각 0.87과 2.19  $\mu\text{g/ml}$ 로서 서양 엉겅퀴의 지상부 추출물이  $\alpha$ -Glucosidase 저해활성이 가장 우수하고 뿌리가 가장 활성이 낮은 것으로 나타났다. 한편 양성대조군으로 사용된 Acarbose의 ED<sub>50</sub> value는 0.54 mg/ml로 나타나 활성이 거의 없는 것으로 나타났다.

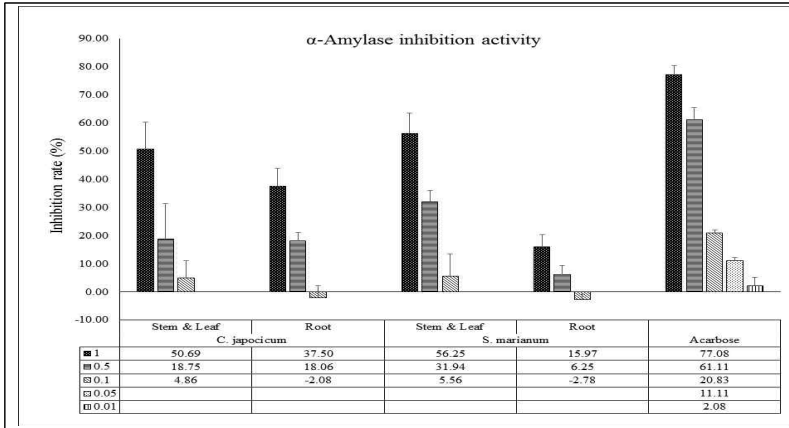


Fig. 22.  $\alpha$ -Amylase inhibition activities of extract from *Cirsium japonicum* and *Silybum marianum*. All values are presented as the mean  $\pm$  SD of triplicate determination.

### (5) 간세포 보호효과

(가) 추출물의 세포 독성 측정(MTT); 세포배양을 통한 생리활성을 확인하려는 실험에서는 추출물이 세포에 대한 직접독성이 없거나 아주 경미하여야 하므로, 간세포 보호작용을 위한 실험을 시행하기 전에 세포생존율을 MTT assay를 통하여 알아보았다(Fig. 23). 즉 본 실험에서 처리한 최대농도인 200  $\mu\text{g/ml}$ 을 mouse liver normal cell (BNL CL.2)에 처리하였을 때의 세포생존율은 국내산 엉겅퀴의 지상부와 뿌리 추출물은 각각  $92.33 \pm 6.34$ 와  $98.03 \pm 13.01\%$ 를 나타내었으며, 서양엉겅퀴의 지상부와 뿌리 추출물은 각각  $99.66 \pm 18.98$ 과  $85.44 \pm 4.65\%$ 의 생존율을 보였다. 이는 대조구의 생존율을 100%로 하였을 때 200  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 국내산 엉겅퀴의 지상부와 뿌리는 92.33과 81.80% 이었으며, 서양엉겅퀴는 각각 81.92와 81.37%에 해당하는 생존율을 나타내었다고 할 수 있었다. 그러나 200  $\mu\text{g/ml}$  농도이상에서 처리하였을 때는 80%이하로 크게 떨어졌다. 따라서 본 실험에서는 국내산 엉겅퀴와 서양엉겅퀴의 부위별 추출물의 시료 처리 농도 200  $\mu\text{g/ml}$ 이하에서 실험을 수행한다면 실험의 결과에 큰 영향이 없을 것으로 판단하였다.

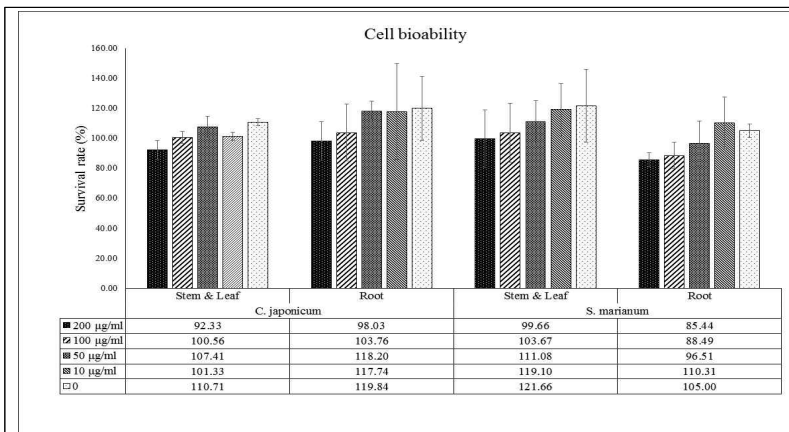


Fig. 23. Survival rates of mouse liver normal cell (BNL CL.2) treated by extracts from *Cirsium japonicum* and *Silybum marianum*. by MTT assay. All values are presented as the mean  $\pm$  SD of triplicate determination.

(나) *t*-BHP에 의한 손상으로부터 간세포보호 효과; *t*-BHP (*tert*-Butyl hydroperoxide)에 의하여 손상된 mouse liver normal cell (BNL CL.2)에 대하여 국내산 엉겅퀴 및 서양엉겅퀴의 지상부 및 뿌리의 추출물을 한 시간 전에 농도별(0.2, 0.1, 0.05, 0.01 mg/ml)로 처리한 후, *t*-BHP를 최종농도가 80  $\mu$ M이 되도록 처리한 후, 24시간 동안 더 배양한 후 간세포의 세포의 보호효과를 Fig. 24에 나타내었다.

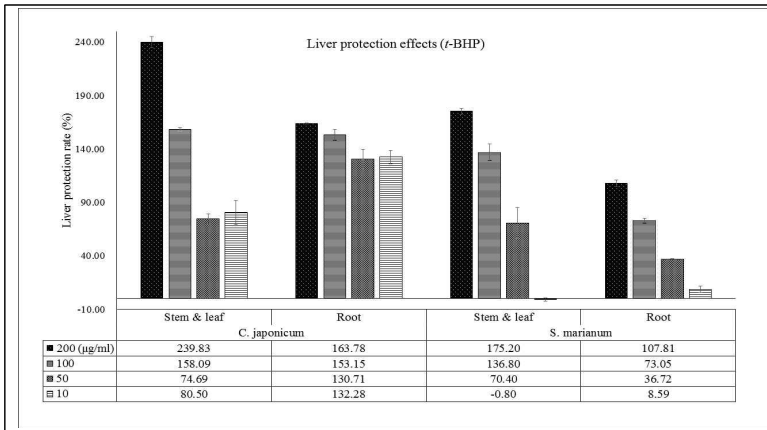


Fig. 24. Effect of liver protection of extract from *Cirsium japonicum* and *Silybum marianum* against mouse liver normal cell (BNL CL.2) treated by *t*-BHP. All values are presented as the mean $\pm$ SD of triplicate determination.

즉 *t*-BHP를 처리하고 시료추출물을 처리하지 않은 것을 대조군(기준)으로 하여 시료추출물을 처리한 군에서 세포의 생존상태를 측정하여 간세포 보호효과로 환산하였다. 그 결과 추출물이 처리되지 않은 세포에 비하여 대체로 처리농도가 높을수록 간세포의 보호효과가 큰 것으로 나타났다. 또한 지상부가 뿌리의 추출물 보다는 다소 높은 효과를 나타내었다. 지상부 추출물의 경우, 처리한 농도에 비례적으로 높은 경향이었으며, 국내산이 239.83 $\pm$ 6.22~80.50 $\pm$ 14.68%로서 서양엉겅퀴의 175.20 $\pm$ 3.46~-0.80 $\pm$ 1.83%보다 높은 효과를 보였으며, 뿌리의 경우에도 국내산이 163.78 $\pm$ 0.68~132.28 $\pm$ 7.86%로서 서양엉겅퀴의 107.81 $\pm$ 3.77~8.59 $\pm$ 3.58%보다 간세포 보호활성이 높게 나타났다. 이는 국내산 엉겅퀴 및 서양엉겅퀴 추출물이 *t*-BHP로 유도된 산화적 스트레스에 대해 간세포 보호효과가 있다고 판단되었고 그 중 국내산 엉겅퀴 지상부 추출물에서 가장 큰 효과를 보인다고 판단되었다.

(다) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 의한 손상으로부터 간세포보호 효과; Mouse liver normal cell (BNL CL.2)를 24 well plate에 5 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/ml로 분주하여 24시간 동안 배양한 후, 배지를 제거하고 phosphate-buffered saline (PBS)로 2회 세척한 다음 생약 추출물을 농도별(0.2, 0.1, 0.05, 0.01 mg/ml)로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 여기에 산화적 스트레스를 일으키기 위하여 0.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하고 2시간 동안 배양한 다음 시료추출물을 처리하지 않은 것을 대조군(기준)으로 하여 시료추출물을 처리한 군에서 세포의 생존상태를 측정하여 간세포 보호효과로 환산하였다. 그 결과 추출물이 처리되지 않은 세포에 비하여 처리농도가 높을수록 간세포의 보호효과가 큰 경향을 나타내었다. 또한 지상부가 뿌리의 추출물 보다는 다소 높은 효과를 나타내었다. 지상부 추출물의 경우, 처리한 농도에 비례적으로 높은 경향이었으며, 서양엉겅퀴가 63.25 $\pm$ 2.49 ~ 26.69 $\pm$ 1.92%로서 국내산의 43.25 $\pm$ 2.30 ~ 11.53 $\pm$ 3.16%보다 다소 높은 효과를 보였으며, 뿌리의 경우에도 서양엉겅퀴가 39.36 $\pm$ 6.30 ~ 27.23 $\pm$ 7.19%로서 국내산의 37.36 $\pm$ 1.75 ~ 23.50 $\pm$ 0.86%보다 간세포 보호활성이 약간 높게 나타났다. 이는 국내산 엉겅퀴 및 서양엉겅퀴 추출물이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 산화적 스트레스에 대해 간세포 보호효과가 있다고 판단되었다.

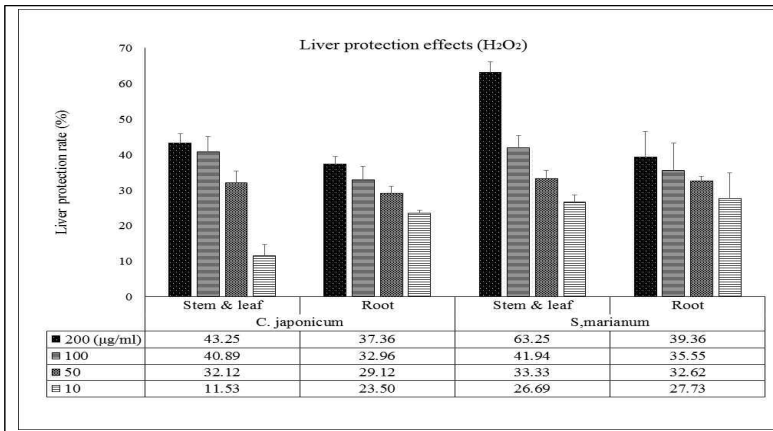


Fig. 25. Effect of liver protection of extract from *Cirsium japonicum* and *Silybum marianum* against mouse liver normal cell (BNL CL.2) treated by Hydroperoxide. All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

(라) 알코올에 의한 손상으로부터 간세포보호 효과처리; Mouse liver normal cell (BNL CL.2) 를 24 well plate에  $5 \times 10^4$  cells/ml로 분주하여 20시간 동안 배양한 후, 3% FBS를 함유한 배지로 교환하고 생약 추출물을 농도별(0.2, 0.1, 0.05, 0.01 mg/ml)로 처리하여 1시간 후 300 mM 알코올을 처리하여 24시간 배양하였다. 계속해서 5일간 같은 방법으로 세포에 생약 추출물과 알코올을 처리한 다음 시료추출물을 처리하지 않은 것을 대조군(기준)으로 하여 시료추출물을 처리한 군에서 세포의 생존상태를 측정하여 간세포 보호효과로 환산하였다. 그 결과 추출물이 처리되지 않은 세포에 비하여 처리농도가 높을수록 간세포의 보호효과가 큰 경향을 나타내었다. 그리고 국내산 엉겅퀴가 서양엉겅퀴에 비하여 상당히 높은 활성을 나타내었으며, 뿌리보다는 지상부의 추출물이 높은 효과를 나타내었다. 즉 지상부 추출물의 경우, 처리한 농도에 비례적으로 높은 경향이었으며, 국내산의  $83.54 \pm 1.15 \sim 12.13 \pm 1.80\%$ 로서 서양엉겅퀴의  $46.12 \pm 3.35 \sim 11.42 \pm 2.86\%$ 보다 훨씬 높은 간보호 효과를 보였으며, 뿌리의 경우에도 국내산의  $59.14 \pm 0.89 \sim 10.70 \pm 3.22\%$ 로서 서양엉겅퀴의  $22.59 \pm 3.62 \sim -4.83 \pm 0.49\%$ 보다 간세포 보호활성이 유의적으로 높게 나타났다. 이는 국내산 엉겅퀴가 서양엉겅퀴에 비하여 ethanol로 유도된 간세포의 손상에 대하여 회복력 또는 보호효과가 있다고 판단되었다.

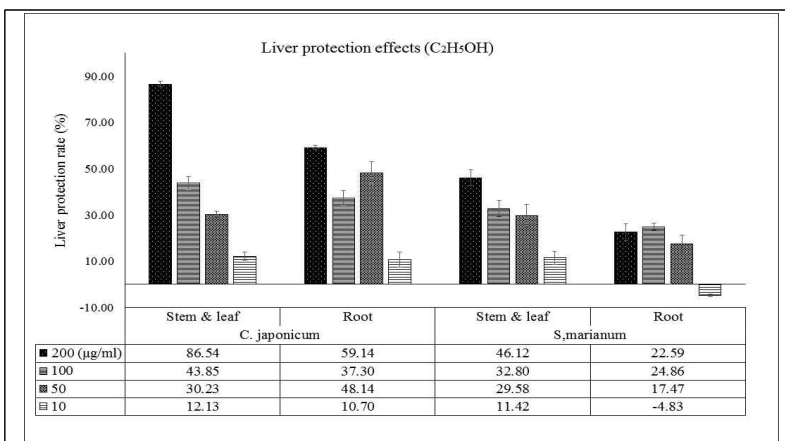


Fig. 26. Effect of liver protection of extract from *Cirsium japonicum* and *Silybum marianum* against mouse liver normal cell (BNL CL.2) treated by ethyl alcohol. All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

## (6) 전지방세포(3T3-L1 adipocytes)의 분화억제에 의한 항비만 효과

### (가) 세포 생존을 측정 (MTT assay);

세포배양을 통한 생리활성을 확인하려는 실험에서는 추출물이 세포에 대한 직접독성이 없거나 아주 경미하여야 하므로, 3T3-L1 adipocyte cell의 분화억제를 통한 항비만효과 실험을 시행하기 전에 세포생존율을 MTT assay를 통하여 알아보았다(Fig. 27). 그 결과 200 µg/ml 농도에서 국내산 엉겅퀴의 지상부와 뿌리는 75.10과 75.22%이었으며, 서양엉겅퀴는 각각 81.54와

72.05%에 해당하는 생존율을 나타내었다고 할 수 있었다. 따라서 본 실험에서는 국내산 영경귀와 서양영경귀의 부위별 추출물의 시료 처리 농도 200 µg/ml이하에서 실험을 수행한다면 실험의 결과에 큰 영향이 없을 것으로 판단하였다.

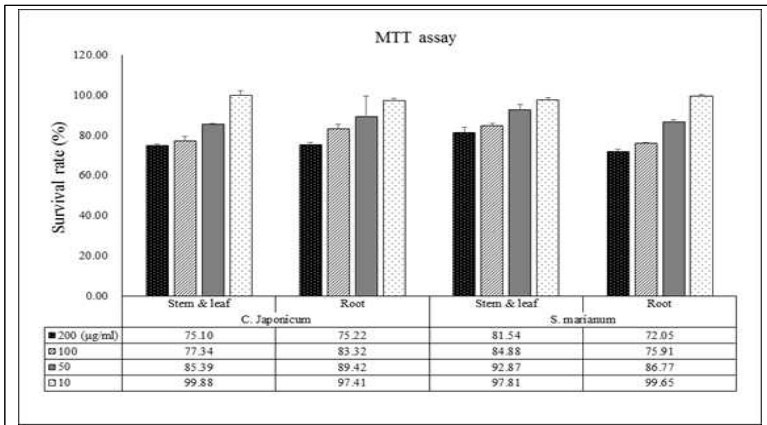


Fig. 27. Survival rates of 3T3-L1 adipocyte cells treated by extracts from *Cirsium japonicum* and *Silybum marianum* by MTT assay. All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

(나) 3T3-L1 세포의 분화억제활성;

지방전구세포(3T3-L1)에 분화유도시약(DMI solution)을 처리하고, 국내산 영경귀와 서양영경귀의 지상부 및 뿌리 추출물이 지방 세포분화에 미치는 영향을 관찰하기 위해 시료를 농도별(200, 100, 50 및 10 µg/ml)로 함께 처리하였다. 지방세포의 분화를 유도한 후, 3T3-L1 지방세포 분화모습을 아래의 Fig. 28에 나타내었다. 여기에 나타낸 사진들은 세포내에 생성된 지방구와 특이적으로 반응하는 Oil red O (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)로 염색한 후 촬영한 것이다. 사진에서 보는 바와 같이 처리농도가 클수록 염색된 지방구가 많이 관찰되는 것을 볼 수 있었다. 또한 염색된 지방세포에 일정량의 isopropanol을 가하여 oil red O에 염색된 지방세포내의 축적된 지방을 용해시킨 후 흡광도를 측정하여 분화된 세포에 축적된 지방의 양을 측정하여 비만이 진행된 정도 또는 억제된 정도를 알아보고자 하였으며 그 결과를 Fig. 29에 나타내었다. 즉 3T3-L1 지방전구세포의 분화억제는 국내산 영경귀 추출물을 농도별로 처리하였을 경우, 지상부는 35.21±0.70~21.56±0.78%, 뿌리는 32.28±0.34~22.69±1.86% 억제하였다. 한편 서양영경귀의 경우 지상부는 25.06±0.98~19.19±0.98%, 뿌리는 19.41±0.98~10.50±2.18% 억제하는 것으로 나타났다. 국내산 및 서양영경귀의 지상부와 뿌리 추출물 모두에서 처리한 농도에 비례하였으나 그리 큰 효과는 나타나지 않았다. 그러나 국내산 영경귀가 서양영경귀에 비하여 약간 억제활성이 높았다.

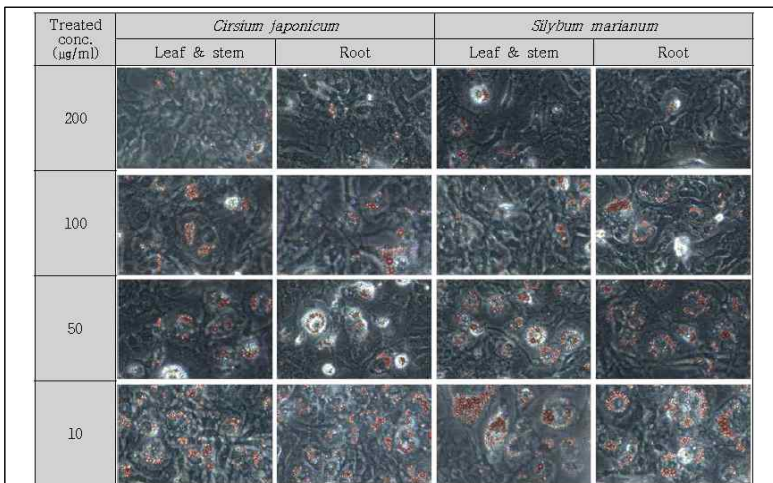


Fig. 28. Cell differentiation of 3T3-L1 adipocyte cells treated by extracts from *Cirsium japonicum* and *Silybum marianum*. Cell differentiation was induced with DMI (D; 0.25mM dexamethasone, M; 0.5mM 3-isobutyl-1-methylxanthin, I; 10 µg/mL insulin).

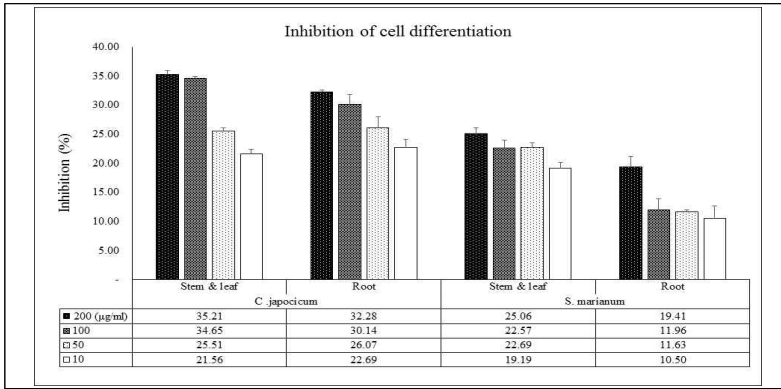


Fig. 29. Inhibition effects on lipid accumulation of extracts from *Cirsium japonicum* and *Silybum marianum*. All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

(7) ACE (angiotensin converting enzyme) 활성 억제에 의한 항고혈압효과

(가) 추출물의 ACE (angiotensin converting enzyme) 활성 저해효과;

ACE (angiotensin converting enzyme) 활성저해효과로서 실험한 국내산 영경귀와 서양영경귀 추출물의 항고혈압 효과를 Fig. 30에 나타내었다. 국내산 및 서양영경귀의 지상부와 뿌리 추출물 모두에서 처리한 농도에 비례하였다. 즉 국내산 영경귀 추출물을 농도별로 처리하였을 경우, 지상부는  $55.37 \pm 2.67 \sim 23.09 \pm 2.38\%$ , 뿌리는  $44.04 \pm 2.33 \sim 23.30 \pm 5.02\%$  억제하였다. 한편 서양영경귀의 경우 지상부는  $45.18 \pm 1.74 \sim 15.06 \pm 6.37\%$ , 뿌리는  $56.55 \pm 2.09 \sim 13.87 \pm 1.31\%$  억제하는 것으로 나타났다. 그러나 효과는 양성대조군으로 사용된 Captopril ( $90.83 \pm 6.77 \sim 48.15 \pm 3.37\%$ )과 Enalapril ( $74.72 \pm 5.57 \sim 26.06 \pm 10.14\%$ )에 비해서는 약 60%정도의 억제효과를 나타낸 것이었다. 그러나 국내산 영경귀는 지상부가 약간 높은 활성을 나타내었으나 서양영경귀는 뿌리의 활성이 약간 높았다.

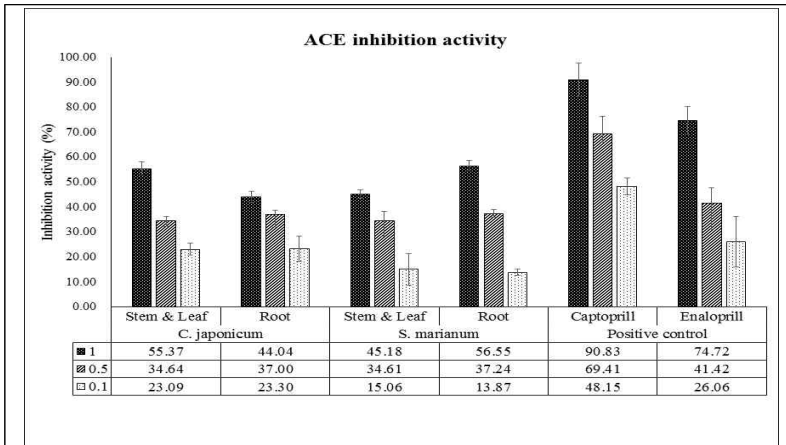


Fig. 30. ACE (angiotensin converting enzyme) inhibition activities of extracts from *Cirsium japonicum* and *Silybum marianum*. All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

다. 도라지 및 영경귀 복합추출물의 조제 및 생리활성

(1) 복합추출물의 항산화 효과

Table 9와 같이 복합추출물에 대한 항산화효과(DPPH, ABTS 및 FRAP 활성)를 측정한 결과 Fig. 31에 나타내었다. 그 결과 복합추출물 ME-P7C3는  $83.29 \pm 2.35$ ,  $85.62 \pm 1.69$  및  $87.77 \pm 5.26\%$ , ME-P5C5는  $90.27 \pm 3.38$ ,  $87.50 \pm 6.05$  및  $94.48 \pm 4.19\%$ , ME-P3C7은  $87.08 \pm 4.47$ ,  $82.29 \pm 3.82$  및  $91.25 \pm 6.23\%$ 의 활성을 나타내었다. 즉 이 3종의 복합추출물 중에서 ME-P5C5 (PG-AF100 : CJ-AF100 = 1 : 1)가 DPPH, ABTS 및 FRAP 활성에서 모두 가장 높은 활성을 나타내었다. 따라서 복합추출물의 발효는 항산화 활성이 가장 우수한 ME-P5C5 (도라지와 영경귀의 혼합비율이 50:50)에 대해서만 진행하기로 하였다.



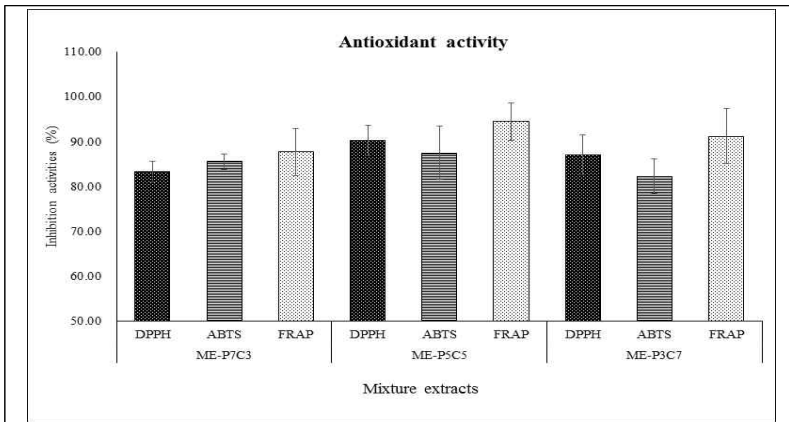


Fig. 31. Comparisons of antioxidant activities of 3 mixture extracts of medicinal plants. All values are presented as the mean±SD of triplicate determination. Inhibition activities of antioxidant effect were measured at 1,000 ppm.

## (2) 복합추출물 및 발효액의 생리활성

Fig. 32는 약용작물 복합추출물과 이것의 발효액에 대한 항산화활성을 비교한 것이다. 대체로 발효 전에 비하여 발효 후에 오히려 활성이 낮아지는 결과가 나타났다. 즉 발효 전에는 DPPH, ABTS 및 FRAP activity가 각각 90.27±3.38, 87.50±6.05 및 94.48±4.19%로서 비교적 높은 활성을 나타내었다. 그러나 발효 후에는 70.05±5.67, 74.55±2.09 및 81.37±3.31%로서 전반적으로 13.11~20.22%p 정도 낮아짐을 알 수 있었다. 이는 발효를 위하여 첨가한 sucrose와 soyprotein의 영향 또는 충분하게 발효가 이루어지지 않았기 때문인 것으로 사료되었다. 이러한 결과는 좀 더 발효조건에 대하여 심사숙고하여야 할 것으로 사료되었다.

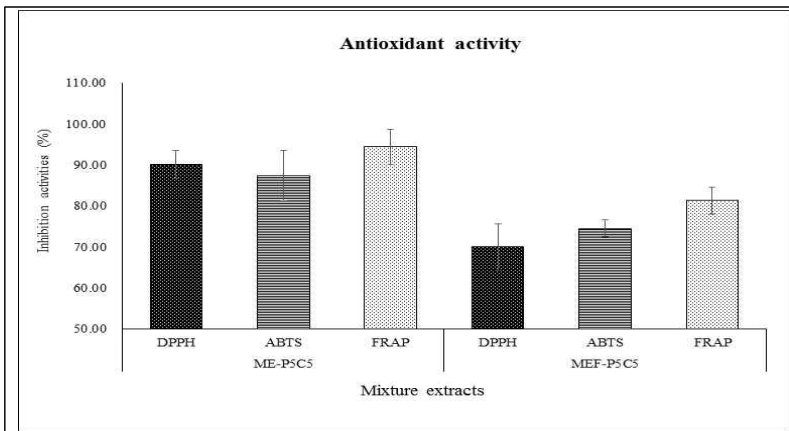


Fig. 32. Comparisons of antioxidant activities of mixture extracts of medicinal plants between before and after fermentation. All values are presented as the mean±SD of triplicate determination. Inhibition activities of antioxidant effect were measured at 1,000 ppm.

## 라. 음료의 개발을 위한 최적의 혼합 recipe 개발

### (1) 복합추출물 및 첨가물 조성

약용작물 복합추출물을 함유한 기능성 항산화 음료의 성분혼합표는 Table 14와 같이 하였다. 기본적으로 모든 음료에는 1회 음용량에 대하여 약용작물 5 g에 해당하는 복합추출물이 함유되도록 하였으며, blueberry 농축액(66 brix) 또는 apple 농축액(66 brix)를 각각 2 g씩을 더하여 berry류에 많이 함유된 안토시아닌 등의 polyphenol에 의한 항산화효과의 상승과 함께 음료의 맛을 개선하도록 하였다. Water soluble dietary fiber (수용성 식이섬유)는 성인 1일 권장량의 34% (8.5 g)가 함유되도록 하여 대장운동을 원활히 할 수 있도록 하여 배변활동을 도울 수 있도록 하였으며, 포도당에 비하여 난소화성이기 때문에 혈당지수(GI; glycemic index)가 낮은 올리고당(isomalto-oligosaccharide 및 fructo-oligosaccharide)을 사용하여 비피더스 등의 장내미생물의 생육을 활발하게 하여 대장기능을 개선하는데 도움이 되도록 하였다. 또한 불규칙한 식생활로 인하여 부족하기 쉬운 비타민 9종 믹스와 필수아미노산 8종 믹스를 더하여 이를 보완

코자 하였다.

Table 14. Recipes of functional beverages using *Cirsium japonicum* and *Platycodon glandiflorus*.

Ingredients	unit	PC-A	PC-B	Remarks
ME-P5C5	ml	5	5	도라지와 영경귀 각각 50 g씩을 섞고, AF100(주정)으로 60-65℃에서 5시간 추출하여 주정을 완전히 농축한 뒤, 정제수 100 ml에 현탁하여 사용함.
Fiber sol-2	g	10	10	Dietary fiber (함유량 85%)
BB concentrate	g		2	Blueberry conc., 66 brix
AP concentrate	g	2		Apple conc., 66 brix
FT oligo당	g	5	5	fructo oligosaccharide
IM oligo당	g	10	10	Isomalto oligosaccharide
Vit. mixture	g	0.02	0.02	Vitamins (9 mixtures)
EAA-mixture	g	0.02	0.02	Essential amino acid (8 mixtures)
Citric acid	g	0.2	0.2	
Malic acid	g	0.02	0.02	
Calcium lactate	g	0.3	0.3	
정제수	g	67.44	67.44	
합계	ml	100	100	

This compositions of functional beverage may change after sensory test.

### (2) 제조공정

음료의 제조공정은 Fig. 33에 나타내었다. 즉 영경귀 및 도라지 복합추출물(PC-A, PC-B)에 Table 2-9에 나타낸 바와 같이 과즙농축액, 수용성 식이섬유, 올리고당, 9종의 필수비타민, 8종의 필수아미노산, 기타 첨가물들을 혼합하고 용해시킨 후에 균질화하였다. 그리고 비용해성 부유물질 또는 잔존 미생물을 제거하기 위하여 초미세 filtering 과정을 거친 후에 내열 retort pouch에 100 ml씩을 담아서 밀봉하였다.

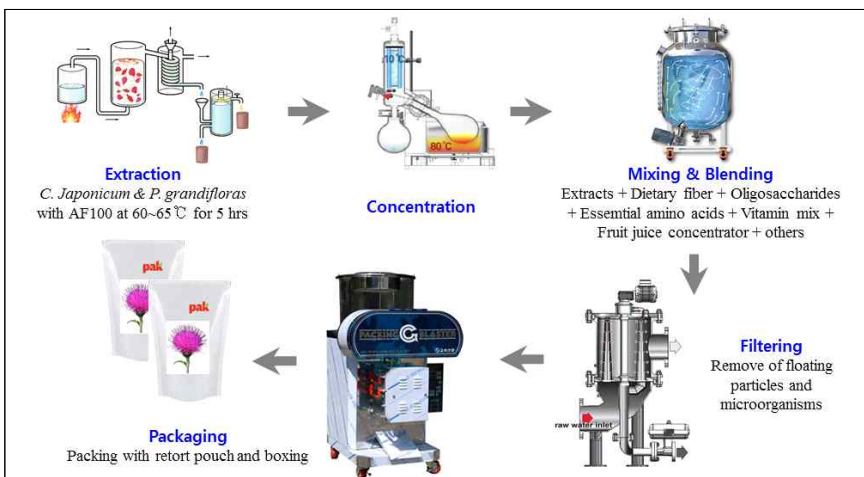


Fig. 33. Manufacturing process of functional beverage using mixture extract from *Cirsium japonicum* and *Platycodon glandiflorus*.

### (3) 시작용품 제작 및 영양성분 분석

Fig. 34는 음료의 성분 혼합표(Table 14)에 따라 제작한 음료의 시작용품이다. 즉 도라지와 국내산 영경귀의 혼합추출물을 이용한 음료의 시작용품을 retort pouch에 담아 포장한 것이다.



Fig. 34. Packed functional beverages using mixture extracts from *C. japonicum* and *P. glandiflorus*.

PC-A		PC-B	
제품명	PC-A	제품명	PC-B
제조일	2018-04-26	제조일	2018-04-26
제조업체	주요한정주식회사	제조업체	주요한정주식회사
유통기한	2019-05-15	유통기한	2019-05-15
원산지	한국	원산지	한국
중량	300g	중량	300g
에너지	33.0g	에너지	33.0g
탄수화물	33.0g	탄수화물	33.0g
지방	0.0g	지방	0.0g
단백질	0.0g	단백질	0.0g
식이섬유	0.0g	식이섬유	0.0g
포화지방산	0.0g	포화지방산	0.0g
트랜스지방	0.0g	트랜스지방	0.0g
총당	0.0g	총당	0.0g
나트륨	0.0mg	나트륨	0.0mg

Fig. 35. Nutrition facts of 2 functional beverages (PC-A and PC-B).

### 3-1. 3차년도 연구수행 방법

#### 가. 지리산권역 약용작물의 선정

3차년도에는 도라지(*Platycodon grandiflorus*, PG), 하수오(*Cynanchi wilfordii* Radix; CW), 자소엽(*Perilla sikokiana*, PS), 당귀(*Angelica gigas* Nakai; AG) 및 영경귀(*Cirsium japonicum*, CJ) 등이

며, 지금까지의 연구결과를 기반으로 하여 항고혈압, 간보호 및 항당뇨효과를 목표로 한 약용작물 혼합물을 만들고 이들의 복합추출물을 이용하여 3종의 기능성음료를 개발하기로 하였다.

## 나. 약용작물의 음료개발을 위한 최적화 연구

### (1) 약용작물의 추출방법 및 조건

#### (가) 생약재료

① 도라지(*Platycodon grandiflorus*, PG), 하수오(*Cynanchi wilfordii* Radix; CW), 자소엽(*Perilla sikokiana*, PS) 및 당귀(*Angelica gigas* Nakai; AG); 잘 건조된 생약을 산청군 생약협동조합으로부터 구입하여 사용하였다.

② 영경귀(*Cirsium japonicum*, CJ); 제천한방약초(충북 제천 소재, ☎ 043-644-8098) 및 동이약초(서울특별시 동대문구 소재, ☎ 02-957-8798) 등에서 국내산 영경귀 전초를 구입하여 사용하였다. 한방에서는 영경귀의 지상부를 대계초(大薊草), 뿌리를 대계근(大薊根)이라 부르며 껍을 차게 하고 출혈을 멎게 하여 어혈을 없애고 조그마한 종기를 제거하는 효능이 있는 약재로 알려져 있으나, 주로 대계근을 사용하고 대계초는 나물로 무쳐서 먹기도 한다.

#### (나) 추출용매 및 생약의 혼합비율

추출용매는 발효주정(alcoholic fermentation, AF)과 정제수를 사용하였다. 추출용매의 조합은 발효주정과 정제수를 같은 비율(1:1, v/v)로 섞어서 사용하였다.

### (2) 활성성분의 기능성 분석에 의한 추출 최적화

#### (가) 생약 복합추출물의 항산화활성

- ① DPPH free radical 소거활성; 1차년도와 동일한 방법으로 수행하였음.
- ② ABTS cation radical 소거활성; 1차년도와 동일한 방법으로 수행하였음.
- ③ FRAP (ferric reducing antioxidant power) 활성; 1차 년도와 동일한 방법으로 수행하였음.

#### (나) 생약 복합추출물의 항당뇨활성

- ①  $\alpha$ -Glucosidase 저해활성; 1차년도와 동일한 방법으로 수행하였음.
- ②  $\alpha$ -Amylase 저해활성; 1차년도와 동일한 방법으로 수행하였음.

#### (다) 생약추출물의 ACE (Angiotensin converting enzyme) 활성 저해능 측정

- ① 조효소액의 조제; 2차년도와 동일한 방법으로 수행하였음.
- ② 기질(substrate)의 조제; 2차년도와 동일한 방법으로 수행하였음.
- ③ ACE 활성 측정; 2차년도와 동일한 방법으로 수행하였음.

#### (라) 생약 복합추출물의 간세포 보호효과

- ① 간세포 및 세포배양; 2차년도와 동일한 방법으로 수행하였음.
- ② 추출물의 세포 독성 측정(MTT); 2차년도와 동일한 방법으로 수행하였음.
- ③ 추출물의 t-BHP에 의한 세포의 손상으로부터 간세포보호 효과 측정; 2차년도와 동일한 방법으로 수행하였음.
- ④ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 따른 세포 생존율; 2차년도와 동일한 방법으로 수행하였음.
- ⑤ 알코올 처리에 따른 세포 생존율; 2차년도와 동일한 방법으로 수행하였음.

## 다. 복합추출물의 조제

### (1) 복합추출물의 최적화 조건 확립

전향에서 실험한 복합추출물의 기능성을 근거로 하여 활성별 최적화조건을 설정한다.

## 라. 음료(Ⅲ)의 개발을 위한 최적의 혼합 recipe 개발

### (1) 음료 개발을 위한 첨가물 선정

약용작물 복합추출물을 함유한 기능성 항산화 음료의 성분혼합표를 만들기 위하여 기본적으로 모든 음료에는 1회 음용량에 대하여 약용작물 5 g에 해당하는 복합추출물이 함유되도록 하며, blueberry 농축액(66 brix) 또는 apple 농축액(66 brix)를 각각 일정량 더하여 berry류에 많이 함유된 안토시아닌 등의 polyphenol에 의한 항산화효과의 상승과 함께 음료의 맛을 개선한다. Water soluble dietary fiber (수용성 식이섬유)는 성인 1일 권장량의 34% (8.5 g)가 함유되도록 하여 대장운동을 원활히 할 수 있도록 하여 배변활동을 도울 수 있도록 하며, 포도당에 비하여 난소화성이기 때문에 혈당지수(GI; glycemic index)가 낮은 올리고당(isomalto-oligosaccharide 및 fructo-oligosaccharide)을 사용하여 비피더스 등의 장내미생물의 생육을 활발하게 하여 대장기능을 개선하는데 도움이 되도록 한다. 또한 불규칙한 식생활로 인하여 부족하기 쉬운 비타민 9종 믹스와 필수아미노산 8종 믹스를 더하여 이를 보완코자 한다.

### (2) 관능평가;

약용작물 복합추출물의 음료(차)로서의 잠재력을 확인하기 위해 관능검사를 실시하였다. 음료의 관능검사는 연령별(20~60대, 각10명씩), 기호성(음료안정성, 냄새, 단맛, 신맛, 색도, 종합평가)에 대한 평가를 아래와 같이 실시하기로 하였으며, 항목별로 5점 평가법으로 실시하여 평가점수의 합으로 판단하였다.

※ 5점 평가법; A; 아주 좋음(9~10), B; 좋음(7~8), C; 보통(5~6), D; 나쁨(3~4), E; 아주 나쁨(1~2)

### (3) 영양성분분석

시제품의 영양성분분석은 (주)한결분석센터에 의뢰하여 분석하였다.

## 3-2. 3차년도 연구결과

### 가. 지리산권역 약용작물의 선정

3차년도에는 도라지(*Platycodon grandiflorus*, PG), 하수오(*Cynanchi wilfordii* Radix; CW), 자소엽(*Perilla sikokiana*, PS), 당귀(*Angelica gigas* Nakai; AG) 및 엉겅퀴(*Cirsium japonicum*, CJ) 등이며, 지금까지의 연구결과를 기반으로 하여 항고혈압, 간보호 및 항당뇨효과를 목표로 한 약용작물 혼합물을 만들고 이들의 복합추출물을 이용하여 3종의 기능성음료를 개발하기로 하였다.

### 나. 약용작물의 음료개발을 위한 최적화 연구

#### (1) 추출용매 및 생약의 혼합비율

추출용매는 발효주정(alcoholic fermentation, AF)과 정제수를 사용하였다. 추출용매의 조합은 발효주정과 정제수를 같은 비율(1:1, v/v)로 섞어서 사용하였다. 생약의 혼합비율은 Table 15와 같은 조건으로 구성하였다. 즉 간보호·항산화효과를 목표로 한 음료는 엉겅퀴를 기본으로 50, 70, 90% 비율로 하고, 당귀와 도라지를 같은 량으로 하였고, 항고혈압·항산화효과를 목표로 한 음료는 백하수오를 기본으로 50, 70, 90% 비율로 하고, 당귀와 도라지를 같은 량으로 하였다. 간보호·항산화효과를 목표로 한 음료는 자소엽을 기본으로 50, 70, 90% 비율로 하고, 당귀와 도라지를 같은 량으로 배합하여 전체를 100으로 맞추어, 50% 주정으로 추출하였다.

Table 15. Mixtures of medicinal plants on different functional effects

Mixtures	영경귀 ( <i>C. japonicum</i> )	백하수오 ( <i>C. wilfordii</i> )	자소엽 ( <i>P. sikokiana</i> )	당귀 ( <i>A. gigas</i> )	도라지 ( <i>P. grandiflorus</i> )	비고
CJ50-AP	50			25	25	항산화 간보호
CJ70-AP	70			15	15	
<b>CJ90-AP</b>	<b>90</b>			<b>5</b>	<b>5</b>	
CW50-AP		50		25	25	항산화 항고혈압
<b>CW70-AP</b>		<b>70</b>		<b>15</b>	<b>15</b>	
CW90-AP		90		5	5	
<b>PS50-AP</b>			<b>50</b>	<b>25</b>	<b>25</b>	항산화 항당뇨
PS70-AP			70	15	15	
PS90-AP			90	5	5	

(2) 활성성분의 기능성 분석에 의한 추출 최적화

(가) 생약 복합추출물의 항산화활성 : 생약 복합추출물의 배합 및 추출조건을 최적화하기 위하여 9종의 복합체에서 공통으로 항산화활성을 조사하였다. 항산화활성은 DPPH 및 ABTS radical 소거능과 FRAP 환원력을 측정하여 Table 16에 나타내었다. DPPH 라디칼 소거활성은 처리농도가 높을수록 대체로 활성이 높아지는 경향을 나타내었다. 한편 1 mg/ml의 농도로 처리하였을 때, 영경귀 기본조합에서는 영경귀가 90%를 함유하였을 경우에  $86.58 \pm 0.11\%$ 로서 가장 높았으며, 백하수오 기본조합에서는 백하수오가 70%이었을 때  $75.09 \pm 1.12\%$ , 자소엽 기본조합에서는 자소엽이 50%이었을 때  $83.76 \pm 0.37\%$ 로 가장 높았다. ABTS 라디칼 소거활성은 대체로 처리농도가 높을수록 활성이 높았으나, 전체적으로 DPPH 활성에 비하여 높은 활성을 보였다. 즉 1 mg/ml의 농도로 처리하였을 때, 영경귀 기본조합에서는 영경귀가 50%를 함유하였을 경우에  $85.91 \pm 0.25\%$ 로서 가장 높았지만 70%와 90% 함유한 경우에도 각각  $85.50 \pm 0.62$ 와  $84.35 \pm 0.14$ 로서 활성에 유의적인 차이는 보이지 않았다. 오히려 250 mg/ml의 낮은 농도에서는 영경귀의 함유량이 많을수록 활성은 높아지는 경향이였다. 백하수오 기본조합에서는 백하수오가 70%이었을 때  $85.17 \pm 0.25\%$ , 자소엽 기본조합에서는 자소엽이 50%이었을 때  $85.01 \pm 0.29\%$ 로 가장 높았다. 그러나 기본조합의 함유량에는 크게 영향이 없을 정도로 고르게 거의 모든 조합에서 비교적 높은 활성을 나타내었다. 한편 FRAP 환원력 활성은 기본조합의 함유량에 따라 뚜렷한 차이가 나타났다. 즉 1 mg/ml 처리하였을 경우, 영경귀 기본조합에서는 90%를 함유하였을 때  $85.90 \pm 0.35\%$ 로 가장 높았고, 백하수오 기본조합에서는 백하수오가 70% 함유되었을 때  $73.12 \pm 0.10\%$ , 자소엽 기본조합에서는 90%의 자소엽을 함유하였을 때  $94.37 \pm 0.01\%$ 로 가장 활성이 높았다. 그러나 자소엽 기본조합의 경우에는 자소엽의 함유량에 따라 유의적인 차이가 나타나지는 않았다.

결론적으로 항산화효과로 본 최적의 약용작물의 조합은 영경귀는 90%, 백하수오는 70% 그리고 자소엽은 50% 함유된 조합에서 가장 높았으나, 70% 및 90% 어느 것이나 높은 항산화활성을 나타내어 어느 것을 선택해도 좋을 것 같았다.

Table 16. Antioxidant activities of mixtures of medicinal plants by DPPH, ABTS and FRAP assay

Treated conc.( $\mu\text{g/ml}$ )		Antioxidant activities (%)										
		<i>C. japonicum</i>			<i>C. wilfordii</i>			<i>P. sikokiana</i>			BHA	Trolox
		50	70	90	50	70	90	50	70	90		
DPPH	1000	74.28 $\pm$ 4.46	86.15 $\pm$ 0.21	86.58 $\pm$ 0.11	45.84 $\pm$ 3.61	75.09 $\pm$ 1.12	50.88 $\pm$ 0.54	83.76 $\pm$ 0.37	74.28 $\pm$ 2.51	66.63 $\pm$ 0.98	92.53 $\pm$ 0.06	
	500	44.79 $\pm$ 1.33	53.88 $\pm$ 0.43	76.78 $\pm$ 0.49	24.88 $\pm$ 3.72	41.97 $\pm$ 0.32	28.54 $\pm$ 1.49	87.56 $\pm$ 0.06	82.35 $\pm$ 0.11	79.28 $\pm$ 0.18	91.44 $\pm$ 0.00	
	250	23.71 $\pm$ 1.00	30.13 $\pm$ 0.21	43.62 $\pm$ 3.74	17.62 $\pm$ 5.77	24.31 $\pm$ 0.92	15.43 $\pm$ 0.83	88.37 $\pm$ 0.00	86.75 $\pm$ 0.78	85.34 $\pm$ 0.74	86.72 $\pm$ 0.22	
	125	13.71 $\pm$ 0.61	14.94 $\pm$ 0.37	23.54 $\pm$ 0.52	14.87 $\pm$ 2.69	11.66 $\pm$ 0.22	9.27 $\pm$ 2.96	61.03 $\pm$ 3.42	88.76 $\pm$ 0.90	88.62 $\pm$ 0.16	63.42 $\pm$ 1.56	
	62.5	6.94 $\pm$ 0.60	7.89 $\pm$ 0.22	11.91 $\pm$ 0.27	7.51 $\pm$ 2.82	5.36 $\pm$ 0.52	4.33 $\pm$ 3.30	49.44 $\pm$ 0.06	74.38 $\pm$ 0.27	87.39 $\pm$ 0.43	35.48 $\pm$ 0.70	
ABTS	1000	85.91 $\pm$ 0.25	85.50 $\pm$ 0.62	84.35 $\pm$ 0.14	83.20 $\pm$ 0.49	85.17 $\pm$ 0.25	82.54 $\pm$ 0.51	85.01 $\pm$ 0.29	84.10 $\pm$ 0.29	83.20 $\pm$ 0.25	82.54 $\pm$ 0.38	
	500	83.94 $\pm$ 0.00	83.69 $\pm$ 0.43	82.95 $\pm$ 0.25	70.10 $\pm$ 3.88	80.89 $\pm$ 2.89	78.75 $\pm$ 0.65	84.51 $\pm$ 0.14	84.18 $\pm$ 0.25	83.69 $\pm$ 0.25	80.89 $\pm$ 0.38	
	250	74.05 $\pm$ 3.00	79.57 $\pm$ 1.45	81.05 $\pm$ 1.17	45.88 $\pm$ 0.99	75.21 $\pm$ 7.52	62.27 $\pm$ 0.57	82.13 $\pm$ 0.14	81.80 $\pm$ 0.38	81.96 $\pm$ 0.43	83.03 $\pm$ 0.29	
	125	48.35 $\pm$ 1.54	55.93 $\pm$ 1.00	73.56 $\pm$ 2.78	37.23 $\pm$ 1.08	46.21 $\pm$ 2.13	37.81 $\pm$ 1.41	84.43 $\pm$ 0.25	83.11 $\pm$ 0.14	82.95 $\pm$ 0.65	81.80 $\pm$ 0.29	
	62.5	27.27 $\pm$ 0.62	30.56 $\pm$ 2.78	47.20 $\pm$ 1.85	20.18 $\pm$ 1.24	24.71 $\pm$ 2.01	19.85 $\pm$ 1.36	83.61 $\pm$ 0.38	84.60 $\pm$ 1.11	82.95 $\pm$ 0.43	74.30 $\pm$ 4.11	
FRAP	1000	79.02 $\pm$ 0.61	79.82 $\pm$ 1.97	85.90 $\pm$ 0.35	59.76 $\pm$ 1.73	73.12 $\pm$ 0.10	56.31 $\pm$ 0.50	93.42 $\pm$ 0.17	94.28 $\pm$ 0.08	94.37 $\pm$ 0.01		94.35 $\pm$ 0.03
	500	64.01 $\pm$ 0.25	69.56 $\pm$ 0.89	77.73 $\pm$ 0.50	44.72 $\pm$ 0.81	61.13 $\pm$ 0.43	40.80 $\pm$ 0.37	89.06 $\pm$ 0.39	93.77 $\pm$ 0.58	94.35 $\pm$ 0.05		90.52 $\pm$ 0.17
	250	46.80 $\pm$ 0.89	48.52 $\pm$ 4.25	65.25 $\pm$ 1.19	27.70 $\pm$ 1.16	43.01 $\pm$ 1.16	25.85 $\pm$ 2.54	80.36 $\pm$ 0.56	90.88 $\pm$ 0.37	92.60 $\pm$ 0.20		79.87 $\pm$ 0.24
	125	25.14 $\pm$ 1.33	29.00 $\pm$ 1.31	44.78 $\pm$ 1.89	14.81 $\pm$ 1.05	25.25 $\pm$ 0.57	13.68 $\pm$ 1.71	67.22 $\pm$ 1.38	84.48 $\pm$ 0.51	87.19 $\pm$ 0.62		73.54 $\pm$ 0.67
	62.5	9.34 $\pm$ 0.24	13.81 $\pm$ 1.32	21.09 $\pm$ 3.22	7.15 $\pm$ 2.96	14.82 $\pm$ 0.21	7.48 $\pm$ 6.63	52.70 $\pm$ 1.14	70.51 $\pm$ 2.26	76.28 $\pm$ 2.00		51.51 $\pm$ 0.75
	31.25		-			-			-			25.15 $\pm$ 1.00

All values are presented as the mean $\pm$ SD of triplicate determination.

(나) 생약 복합추출물의 항당뇨활성 : 항산화활성과 함께 항당뇨활성을 주된 활성으로 목표한 것은 자소엽 기본조합이었다. 따라서 항당뇨활성은 자소엽 기본조합(50, 70 및 90%)에 당귀와 도라지가 각각 동량씩 함유되어 전체가 100이 되게 조합한 것으로 실험하였다. 이에 대한 항당뇨활성은  $\alpha$ -Glucosidase와  $\alpha$ -Amylase의 활성억제 정도를 시험하여 판단하였다.

우선  $\alpha$ -Glucosidase 억제활성은 5 mg/ml 처리하였을 때, 자소엽이 50% 함유된 조합에서 84.48 $\pm$ 2.63%의 억제하여 활성이 가장 높았다. 그리고 자소엽이 50, 70 및 90% 함유되었을 때, 각각의 ED<sub>50</sub>값에서도 0.93, 2.24 및 4.28 mg/ml를 나타내었다. 한편 양성대조군인 Acarbose의 ED<sub>50</sub>값은 0.43 mg/ml이었다.  $\alpha$ -Amylase의 억제활성도 5 mg/ml 처리하였을 때, 자소엽이 50% 함유된 조합에서 82.33 $\pm$ 0.74%의 억제하여 활성이 가장 높았다. 그리고 자소엽이 50, 70 및 90% 함유되었을 때, 각각의 ED<sub>50</sub>값에서도 1.05, 3.93 및 4.91 mg/ml를 나타내었다. 한편 양성대조군인 Acarbose의 ED<sub>50</sub>값은 0.33 mg/ml이었다. 이와 같은 결과는 항산화활성을 감안하여 판단해 보면 자소엽 기본조합에서는 자소엽 함유량 50%, 그리고 당귀와 도라지가 각각 25%씩 함유된 조합(PS50-AP)이 최선의 조합일 것으로 판단되었다.

Table 17. Antidiabetic activities of mixtures of medicinal plants by  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -Amylase inhibition assay

Treated concentrations (mg/ml)		PS50-AP	PS70-AP	PS90-AP	Acarbose
$\alpha$ -Glucosidase	0.01				10.27 ± 1.25
	0.05				23.07 ± 2.24
	0.1	13.19 ± 1.77	2.66 ± 3.11	-0.66 ± 2.86	29.84 ± 2.19
	0.5	30.63 ± 1.60	20.58 ± 1.83	13.27 ± 0.99	64.98 ± 0.21
	1	51.37 ± 1.34	32.75 ± 6.10	20.19 ± 1.52	83.58 ± 1.00
	5	84.48 ± 2.63	67.16 ± 5.79	58.90 ± 7.19	
	ED <sub>50</sub>	0.93	2.24	4.28	0.43
$\alpha$ -Amylase	0.01				10.27 ± 3.82
	0.05				23.07 ± 18.21
	0.1	4.61 ± 4.71	1.72 ± 1.20	-3.10 ± 1.43	29.84 ± 0.79
	0.5	30.83 ± 3.71	18.59 ± 2.18	12.33 ± 1.14	62.47 ± 0.08
	1	48.01 ± 2.02	34.07 ± 3.77	17.94 ± 4.49	83.58 ± 0.68
	5	82.33 ± 0.74	53.09 ± 16.93	56.22 ± 5.94	
	ED <sub>50</sub>	1.05	3.93	4.91	0.33

All values are presented as the mean ± SD of triplicate determination.

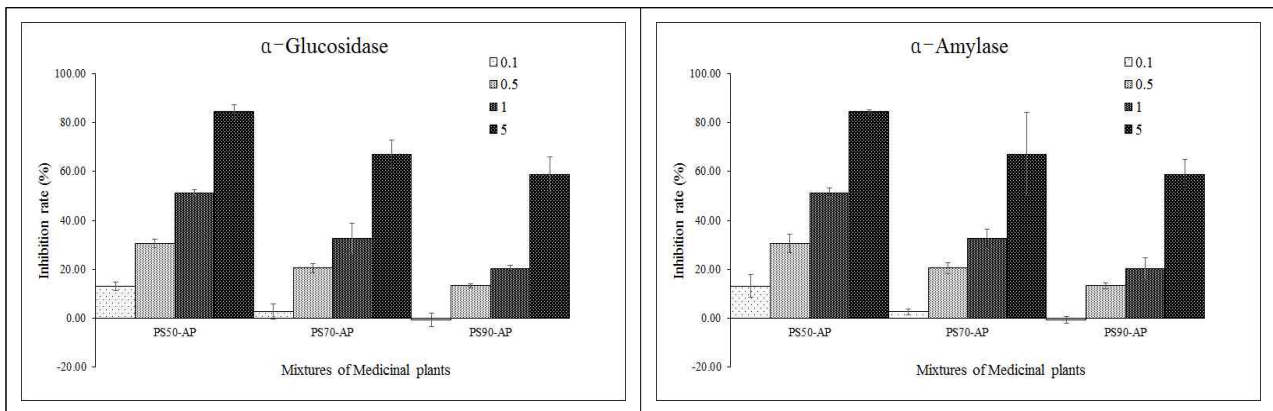


Fig. 36. Antidiabetic activities of mixtures of medicinal plants by  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -Amylase inhibition assay. All values are presented as the mean ± SD of triplicate determination.

(다) 생약 복합추출물의 ACE (Angiotensin converting enzyme) 활성 저해능 : 항산화활성과 함께 항고혈압활성을 주된 활성으로 목표한 것은 백하수오 기본조합이었다. 따라서 항고혈압활성은 백하수오 기본조합(50, 70 및 90%)에 당귀와 도라지가 각각 동량씩 함유되어 전체가 100이 되게 조합한 것으로 실험하였다. 이에 대한 항고혈압활성은 ACE (Angiotensin converting enzyme) 활성 저해능을 시험하여 판단하였다. ACE 억제활성은 백수오를 50% 함유한 기본조합에서는 처리농도가 0.1, 0.5 및 1.0 mg/ml일 경우에 각각 25.46 ± 1.78, 34.00 ± 1.13 및 55.71 ± 2.98% 이었고, 백수오를 70% 함유한 기본조합에서는 처리농도가 0.1, 0.5 및 1.0 mg/ml일 경우에 각각 55.71 ± 2.98, 48.57 ± 1.33 및 75.21 ± 2.22%, 백수오를 90% 함유한 기본조합에서는 처리농도가 0.1, 0.5 및 1.0 mg/ml일 경우에 각각 14.19 ± 4.69, 34.94 ± 1.83 및 47.30 ± 0.68%이었다. 그리고 백하수오가 50, 70 및 90% 함유되었을 때, 각각의 ED<sub>50</sub>값에서도 0.88, 0.45 및 1.03 mg/ml를 나타내었다. 한편 양성대조군인 Captopril®과 Enalapril®의 ED<sub>50</sub>값은 각각 0.14와 0.58 mg/ml인 것을 감안하면 상당히 높은 활성이었다. 이와 같은 결과를 항산화활성을 감안하여 판단해 보면 백하수오 기본조합에서는 백하수오 함유량 70%, 그리고 당귀와 도라지가 각각 15%씩 함유된 조합(CW70-AP)이 최선의 조합일 것으로 판단되었다.



Table 18. ACE (Angiotensin converting enzyme) inhibition activities of mixtures of medicinal plants

Treated concentrations (mg/ml)	CW50-AP	CW70-AP	CW90-AP	Captopril®	Enalapril®
0.1	25.46 ± 1.78	37.26 ± 1.50	14.19 ± 4.69	48.15 ± 3.37	26.06 ± 10.14
0.5	34.00 ± 1.13	48.57 ± 1.33	34.94 ± 1.83	69.41 ± 6.97	41.42 ± 6.22
1	55.71 ± 2.98	75.21 ± 2.22	47.30 ± 0.68	90.83 ± 6.77	74.72 ± 5.57
ED <sub>50</sub> value	0.88	0.45	1.03	0.14	0.58

All values are presented as the mean ± SD of triplicate determination.

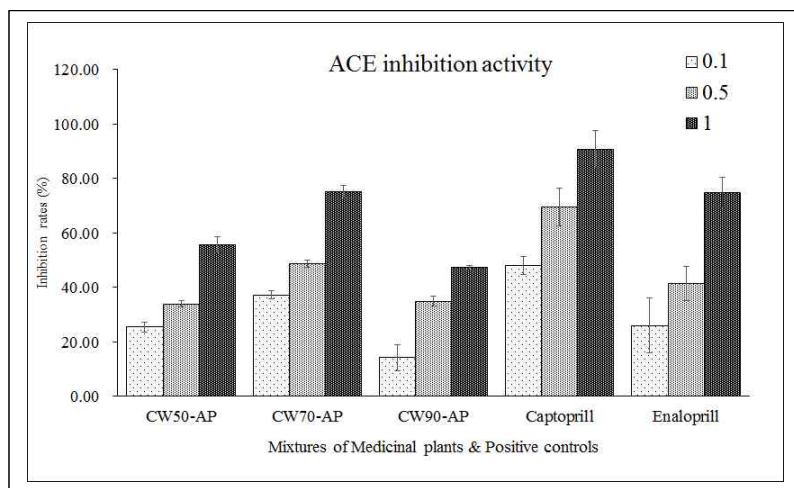


Fig. 37. ACE (Angiotensin converting enzyme) inhibition activities of mixtures of medicinal plants. All values are presented as the mean ± SD of triplicate determination.

(라) 생약 복합추출물의 간세포 보호효과 : 항산화활성과 함께 간보호 활성을 주된 활성으로 목표한 것은 영경귀 기본조합이었다. 따라서 간보호 활성은 영경귀 기본조합(50, 70 및 90%)에 당귀와 도라지가 각각 동량씩 함유되어 전체가 100이 되게 조합한 것으로 실험하였다. 이에 대한 간보호 활성은 흰쥐 정상 간세포(mouse liver normal cell, BNL CL.2)에 대하여 *t*-BHP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 alcohol 을 일정량 처리하여 손상시킨 후에 생약 복합추출물을 처리하여 손상된 세포가 회복되는 효과를 측정하여 결과를 판단하는 것이다.

① 생약 복합추출물의 세포 독성 측정(MTT); 세포배양을 통한 생리활성을 확인하려는 실험에서는 추출물이 세포에 대한 직접독성이 없거나 아주 경미하여야 하므로, 간세포 보호작용을 위한 실험을 시행하기 전에 세포생존율을 MTT assay를 통하여 알아보았다(Fig. 38, Top-left). 즉 본 실험에서 처리한 최대농도인 200 µg/ml을 mouse liver normal cell (BNL CL.2)에 처리하였을 때의 세포생존율은 국내산 영경귀 기본조합에서 영경귀 함유량이 50, 70 및 90%일 경우에 82.82 ± 5.56, 80.26 ± 0.42 및 80.67 ± 0.63%의 생존율을 나타내었다. 따라서 본 실험에서는 영경귀 기본조합 추출물을 200 µg/ml이하의 농도에서 수행한다면 실험의 결과에 큰 영향이 없을 것으로 판단하였다.

② *t*-BHP에 의한 손상으로부터 간세포보호 효과; *t*-BHP (*tert*-Butyl hydroperoxide)에 의하여 손상된 mouse liver normal cell (BNL CL.2)에 대하여 영경귀 기본조합의 생약 복합추출물을 한 시간 전에 농도별(0.2, 0.1, 0.05, 0.01 mg/ml)로 처리한 후, *t*-BHP를 최종농도가 80 µM이 되도록 처리한 후, 24시간 동안 더 배양한 후 간세포의 보호효과를 나타내었다(Fig. 38, Top-right). 즉 *t*-BHP를 처리하고 시료를 처리하지 않은 것을 대조군(기준)으로 하여 생약복합추출물을 처리한 군에서 세포의 생존상태를 측정하여 간세포 보호효과로 환산하였다. 그 결과

생약복합추출물이 처리되지 않은 세포에 비하여 대체로 처리농도가 높을수록 간세포의 보호효과가 큰 것으로 나타났다. 또한 엉겅퀴의 함유량이 높을수록 다소 높은 간세포 생존율을 나타내었다. 이 중에서도 처리농도가 200, 100, 50 및 10  $\mu\text{g/ml}$ 일 때, 엉겅퀴의 함유량이 90%이었을 경우, 각각  $85.82 \pm 2.6$ ,  $63.11 \pm 1.57$ ,  $43.85 \pm 1.27$  및  $40.34 \pm 0.63\%$ 의 세포생존율을 보여 가장 높은 회복력이 나타난 것을 알 수 있었다.

③  $\text{H}_2\text{O}_2$  의한 손상으로부터 간세포보호 효과; Mouse liver normal cell (BNL CL.2)를 24 well plate에  $5 \times 10^4$  cells/ml로 분주하여 24시간 동안 배양한 후, 배지를 제거하고 phosphate-buffered saline (PBS)로 2회 세척한 다음 엉겅퀴 기본조합의 생약 복합추출물을 농도별(0.2, 0.1, 0.05, 0.01 mg/ml)로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 여기에 산화적 스트레스를 일으키기 위하여 0.4 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 처리하고 2시간 동안 배양한 다음 시료를 처리하지 않은 것을 대조군(기준)으로 하여 생약 복합추출물을 처리한 군에서 세포의 생존상태를 측정하여 간세포 보호효과로 환산하였다(Fig. 38, Bottom-left). 그 결과 추출물이 처리되지 않은 세포에 비하여 처리농도가 높을수록 간세포의 보호효과가 큰 경향을 나타내었다. 또한 엉겅퀴의 함유량이 많은 조합일수록 다소 높은 간세포의 회복효과를 나타내었다.

이 중에서도 처리농도가 200, 100, 50 및 10  $\mu\text{g/ml}$ 일 때, 엉겅퀴의 함유량이 90%이었을 경우, 각각  $94.23 \pm 1.59$ ,  $83.54 \pm 3.58$ ,  $80.47 \pm 2.25$  및  $60.38 \pm 1.08\%$ 의 세포생존율을 보여 가장 높은 회복력이 나타난 것을 알 수 있었다.

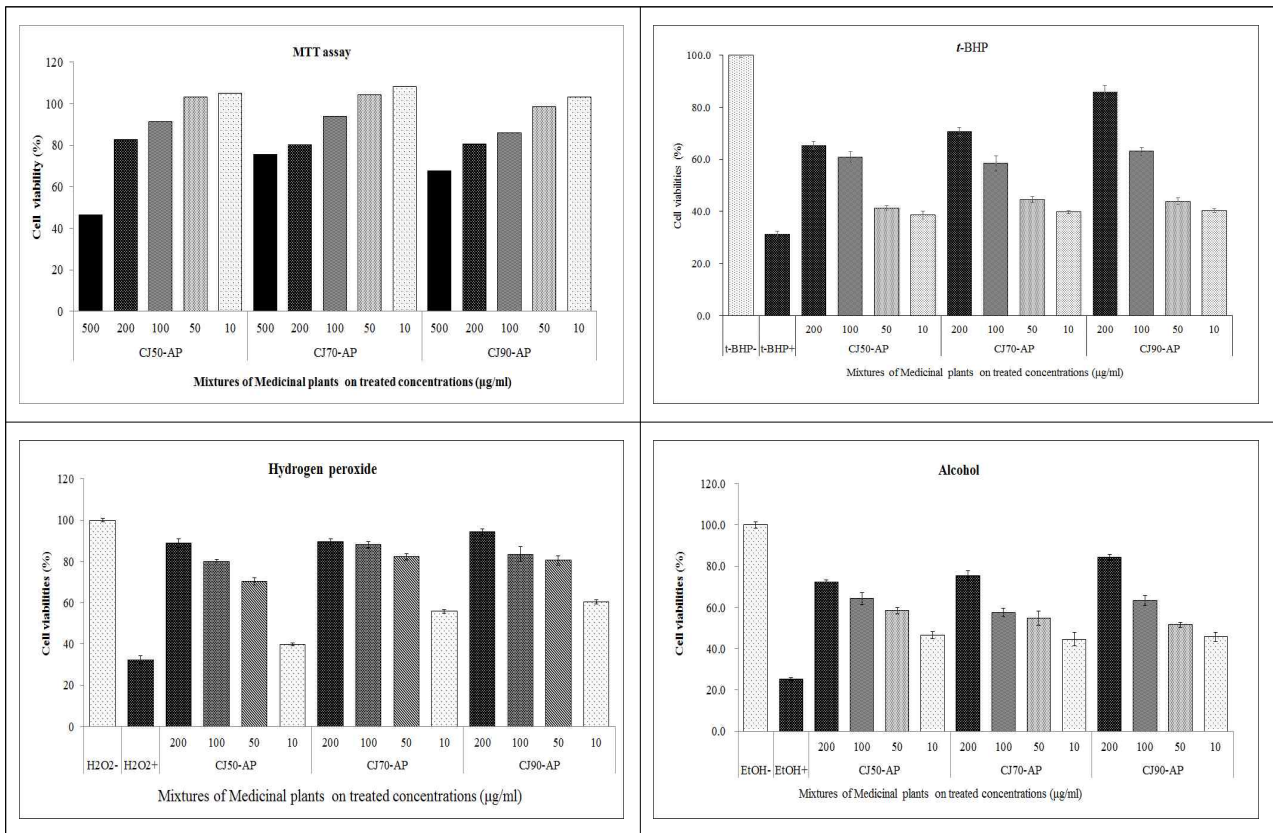


Fig. 38. Cell viabilities of mixtures of medicinal plants against damaged mouse liver cells (BNL CL.2). Top-left; MTT assay, Top-right; cell viability test against damaged by *t*-BHP treatment, Bottom-left; cell viability test against damaged by  $\text{H}_2\text{O}_2$  treatment, Bottom-right; cell viability test against damaged by ethanol treatment, All values are presented as the mean  $\pm$  SD of triplicate determination.

④ 알코올에 의한 손상으로부터 간세포보호 효과처리; Mouse liver normal cell (BNL CL.2)를 24 well plate에  $5 \times 10^4$  cells/ml로 분주하여 20시간 동안 배양한 후, 3% FBS를 함유한 배지로 교환하고 엉겅퀴 기본조합의 생약 복합추출물을 농도별(0.2, 0.1, 0.05, 0.01 mg/ml)로 처리하여 1시간 후 300 mM 알코올을 처리하여 24시간 배양하였다. 계속해서 5일간 같은 방법으로 세포에 생약복합추출물과 알코올을 처리한 다음 생약복합추출물을 처리하지 않은 것을 대조군(기준)으로 하여 시료추출물을 처리한 군에서 세포의 생존상태를 측정하여 간세포 보호효과로 환산하였다(Fig.38, Bottom-right). 그 결과 추출물이 처리되지 않은 세포에 비하여 처리농도가 높을수록 간세포의 보호효과가 큰 경향을 나타내었다. 이 중에서도 처리농도가 200, 100, 50 및 10  $\mu\text{g/ml}$ 일 때, 엉겅퀴의 함유량이 90%이었을 경우, 각각  $84.4 \pm 1.31$ ,  $63.23 \pm 2.39$ ,  $51.54 \pm 1.09$  및  $45.76 \pm 2.19\%$ 의 세포생존율을 보여 가장 높은 회복력이 나타난 것을 알 수 있었다. 이와 같은 결과를 항산화활성을 감안하여 판단해 보면 엉겅퀴 기본 조합에서는 엉겅퀴의 함유량 90%, 그리고 당귀와 도라지가 각각 5%씩 함유된 조합(CJ90-AP)이 최선의 조합일 것으로 판단되었다.

#### 다. 복합추출물의 조제

##### (1) 복합추출물의 최적화 조건 확립

전항에서 실험한 복합추출물의 기능성을 근거로 하여 다음과 같이 활성별 최적화조건을 설정하였다.

Table 19. Preparation of optimum mixtures of medicinal plants

Physiological functions	<i>C. japonicum</i> (엉겅퀴)	<i>C. wilfordii</i> (백하수오)	<i>P. sikokiana</i> (자소엽)	<i>A. gigas</i> (당귀)	<i>P. grandiflorus</i> (도라지)	Mixtures
Liver protection & Oxidation	90	-	-	5	5	CJ90-AP
Anti-hypertention & Oxidation	-	70	-	15	15	CW70-AP
Anti-diabetic & Oxidation	-	-	50	25	25	PS50-AP

#### 라. 음료(Ⅲ)의 개발을 위한 최적의 혼합 recipe 개발

##### (1) 음료 개발을 위한 첨가물 선정;

약용작물 복합추출물을 함유한 기능성 항산화 음료의 성분혼합표를 만들기 위하여 기본적으로 모든 음료에는 1회 음용량(100 ml)에 대하여 약용작물 5 g에 해당하는 복합추출물이 함유되도록 하였다. 즉 blueberry 농축액(66 brix) 또는 apple 농축액(66 brix)를 각각 일정량 더하여 berry류에 많이 함유된 안토시아닌 등의 polyphenol에 의한 항산화효과의 상승과 함께 음료의 맛을 개선하였다. Water soluble dietary fiber (수용성 식이섬유)는 성인 1일 권장량의 34% (8.5 g)가 함유되도록 하여 대장운동을 원활히 할 수 있도록 하여 배변활동을 도울 수 있도록 하며, 포도당에 비하여 난소화성이기 때문에 혈당지수(GI; glycemic index)가 낮은 올리고당(isomaltoligosaccharide 및 fructo-oligosaccharide)을 사용하여 비피더스 등의 장내미생물의 생육을 활발하게 하여 대장기능을 개선하는데 도움이 되도록 하였다. 또한 불규칙한 식생활로 인하여 부족하기 쉬운 비타민 9종 믹스와 필수아미노산 8종 믹스를 더하여 이를 보완코자 하였다.

Table 20. Recipes of functional beverages using extracts of mixed medicinal plants

Ingredients	unit	Beverages			Remarks
		CJ90	CW70	PS50	
CJ90-AP	ml	5			영정귀 90g과 당귀와 도라지 각각 5 g씩을 섞고, AF50(주정50%)으로 65~70℃에서 5시간 2회 추출하여 주정을 완전히 농축한 뒤, 정제수 100 ml에 현탁하여 사용함.
CW70-AP	ml		5		백하수오 70g과 당귀와 도라지 각각 15 g씩을 섞고, AF50(주정50%)으로 65~70℃에서 5시간 2회 추출하여 주정을 완전히 농축한 뒤, 정제수 100 ml에 현탁하여 사용함.
PS50-AP	ml			5	자소엽 50g과 당귀와 도라지 각각 25 g씩을 섞고, AF50(주정50%)으로 65~70℃에서 5시간 2회 추출하여 주정을 완전히 농축한 뒤, 정제수 100 ml에 현탁하여 사용함.
Fiber sol-2	g	10	10	10	Dietary fiber (함유량 85%)
BB conc.	g	2		2	Blueberry conc., 66 brix
AP conc.	g		2		Apple conc., 66 brix
FT oligo당	g	5	5	5	Fructo-oligosaccharide
IM oligo당	g	10	10	10	Isomalto-oligosaccharide
Vit. mixture	g	0.02	0.02	0.02	Vitamins (9 mixtures)
EAA-mixture	g	0.02	0.02	0.02	Essential amino acid (8 mixtures)
Citric acid	g	0.2	0.2	0.2	
Malic acid	g	0.02	0.02	0.02	
Ca-lactate	g	0.3	0.3	0.3	
정제수	g	67.44	67.44	67.44	
<b>합계</b>	<b>ml</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	

※ This compositions of functional beverage may change after sensory test.

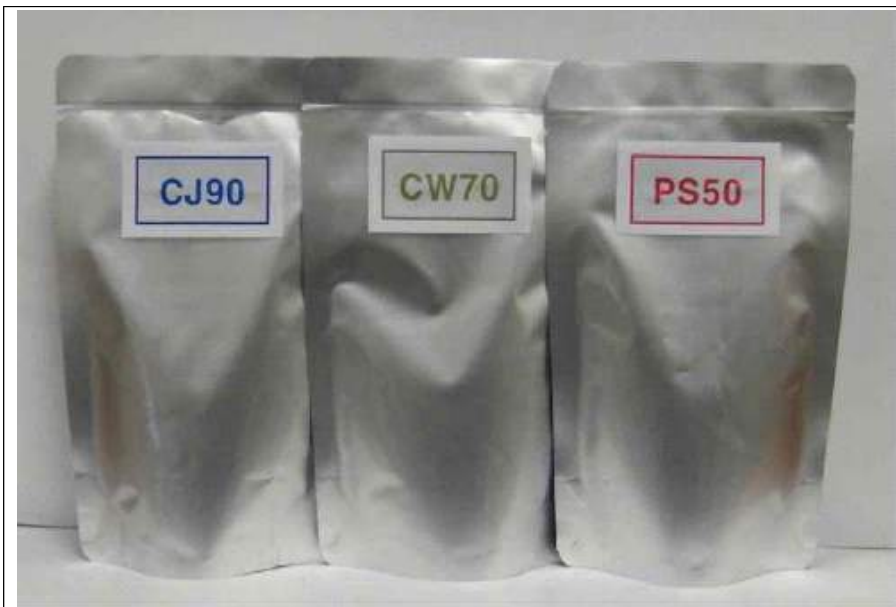


Fig. 39. Photographs of 3 functional beverages make with mixtures of medicinal herbs

(2) 제조과정;

음료의 제조과정은 2차년도와 동일하게 하였다.

(3) 관능평가;

약용작물 복합추출물의 음료(차)로서의 잠재력을 확인하기 위해 관능검사를 실시하였다.

음료의 관능평가는 연령별(20~60대, 각10명씩), 기호성(음료안정성, 냄새, 단맛, 신맛, 색도, 종합평가)에 대한 평가를 아래와 같이 실시하기로 하였다. 그 결과 대체로 영경귀를 기반으로 하여 간보호 기능을 목표로 한 음료(CJ90-AP)는 전체적으로 85.4%의 선호도를 나타내었다. 연령별로는 대체로 연령층이 높을수록 선호도가 높았다. 연령이 높을수록 조사한 모든 항목에서 대체로 낮은 거부감을 보인 것으로 나타났으며, 5% 정도의 생약추출물이 함유된 음료의 특성상 20대의 젊은 층에서 가장 선호도가 낮았다. 그리고 백하수오를 기반으로 하여 항고혈압 효과를 목표로 한 음료(CW70-AP)가 3종의 복합추출물을 활용한 음료 중에서 가장 높은 호감도(87.3%)를 보였다. 연령별 선호도도 나이가 많을수록 낮은 거부감을 나타내었으며, 조사한 전 항목에서 연령이 높을수록 선호도가 높았다. 한편 자소엽을 기반으로 하고 항당뇨 효과에 목표를 둔 음료(PS50-AP)의 경우는 항목에 따라서는 연령에 비례하지는 않았다. 즉 음료안정성과 냄새 등의 항목에서는 연령에 따라 다소 높아지는 경향을 나타내었으나, 감미도, 산미도 및 색도에 대한 선호도는 연령에 따른 뚜렷한 추세를 보이지는 않았다. 대체로 한약재를 이용한 기능성 음료는 기능성을 높이기 위하여 생약추출물의 함유량을 높이면 특유의 냄새와 맛으로 인한 거부감을 나타내고, 반대로 맛과 향 등의 기호성의 개선에 초점을 맞추기 위하여 생약추출물을 적게 함유되도록 하면 음료의 기능성은 떨어질 수밖에 없으므로 적절한 선에서 각각의 함유량을 조절해야 할 것으로 생각되어 졌다. 전체적으로 80.0~87.3% 정도의 비교적 양호한 평가를 해 준 것으로 판단되었다.

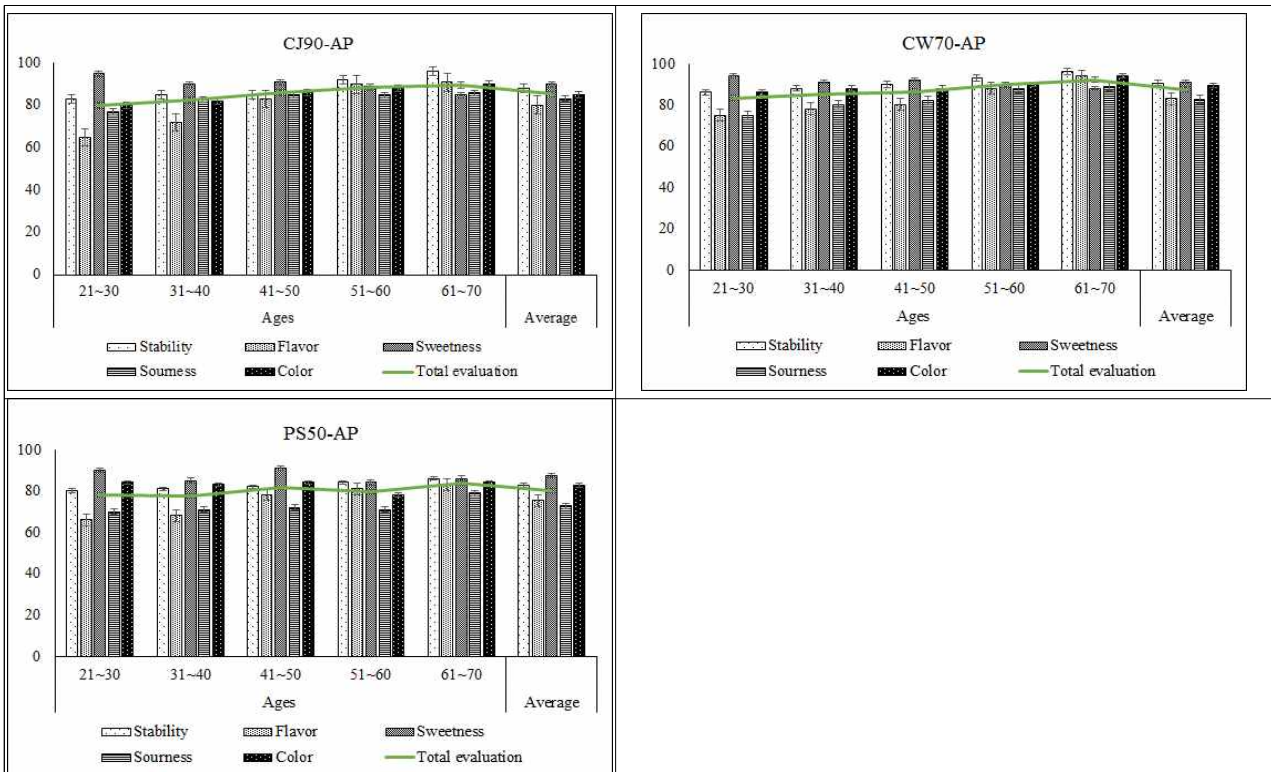


Fig. 40. Sensory evaluation of 3 functional beverages (CJ90-AP, CW70-AP and PS50-AP).

(4) 영양성분분석;

시제품의 영양성분분석은 (주)한결분석센터에 의뢰하여 분석하였다.



Fig. 41. Nutrition facts of 3 functional beverages (CJ90-AP, CW70-AP and PS50-AP).

## 제4절 지리산 권역 약용작물 복합추출물 활용 제품의 표준화 및 관능평가 [제3세부, 경남과학기술대학교 산학협력단]

### 1-1. 1차년도 연구수행 방법

#### 가. 약용작물(백하수오)의 일반 영양성분 및 특수 영양성분 검토

##### (1) 재료 및 방법

(가) 실험재료 및 시약 : 본 연구에서 사용된 백하수오는 산청 생약농업협동조합을 통해 재배된 것을 구입하였으며, 연구에 사용될 백하수오의 검증을 위해 경남과학기술대학교 농학·한약자원학부 정은주 교수를 통해서 감별 받았고, 본 연구에 사용된 백하수오 표본(specimen voucher number: GFS-006)은 경남과학기술대학교 식품과학부 표본실에 보관하였다. 실험에 사용된 백하수오 샘플은 60°C에서 열풍건조 시킨 후 50 mesh 입도로 파쇄하여 연구에 사용하였다. 본 연구에서 사용된 모든 시약과 표준품은 Sigma-Aldrich Company(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Hexane, methanol(CH<sub>3</sub>OH), ethanol chloroform(CHCl<sub>3</sub>)은 HPLC-grade를 사용하였고, anhydrous sodium sulfate(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), n-pentadecane, diethylether, phosphoric acid, hydrochloric acid, Folin-ciocalteu 그리고 sodium chloride(NaCl)는 ACS-grade를 이용하였다. 지방산 조성을 확인하기 위해 Supelco-37 fatty acid methyl ester(FAME) 표준품 및 heptadecanoic acid(C17:0)가 사용되었다.

##### (2) 성분 분석

(가) 일반성분 분석 : 백하수오의 일반성분은 식품공전의 일반성분 분석법에 준하여 실시하였다. 즉, 수분 및 회분 함량은 상압가열건조법과 건열회화법으로 측정하였으며 조지방 및 조단백 함량은 Soxhelt법과 Kjeldahl법으로 측정하였다. 탄수화물 함량은 전체 샘플의 중량에서 상기 각 성분 합계 값을 빼 값을 g/100 g로 표시하였다(1).

(나) 구성아미노산 분석 : 단백질을 구성하는 구성아미노산의 함량을 조사하기 위해 산분해법을 이용하였다. 동결 건조된 샘플 0.1 g을 취하여 3 mL의 6 N HCl과 함께 test tube에 넣고, 10분간 교반을 실시하였다. 교반 후 감압 밀봉한 후 110°C로 가열된 heating block(Thermo Fisher Scientific Co., Rockford, IL, USA)에 24시간 이상 가열하여 가수분해를 실시하였다. 50°C 온도에서 rotary evaporator (R-III, BÜCHI, Postfach, Switzerland)로 산을 제거한 후 sodium dilution buffer로 50 mL 정용한 다음, 1 mL을 취하여 0.2 µm membrane filter로 여과시켜 아미노산 자동분석기(L-8900, Hitachi High Tech, Tokyo, Japan)를 이용하여 정량 분석하였다.

(다) 유리아미노산 분석 : 유리아미노산을 정량하기 위해 샘플 1 g에 ethanol 20mL과 함께 10분간 교반을 실시하였다. 교반 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 하였고, 상층액을 감압농축한 후 25 mL sample dilution buffer로 용해시키고, sulfosalicylic acid 20을 첨가하여, 4°C에서 1시간 동안 방치한 후 다시 3,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후, 0.2 µm membrane filter로 여과시켜 아미노산 자동분석기(L-8900)로 정량 분석하였다. 아미노산 분석조건은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Total and free amino acids in *Cynanchi wilfordii* Radix

Equipment	Total amino acid	Free amino acid
Column	Ion exchange column (#2622PH column) 4.6 mm × 60 mm	Ion exchange column (#2622PF column) 4.6 mm × 60 mm
Column temp.	57°C	30°C ~ 70°C
Flow rate	Buffer : 0.4 mL/min Ninhydrin : 0.35 mL/min	Buffer : 0.35 mL/min Ninhydrin : 0.3 mL/min
Buffer pH range	pH 3.2 ~ 4.9, alkalinity	pH 2.8 ~ 4.1
Wavelength	570 nm, 440 nm	570 nm, 440 nm

(라) 지방산 분석 : 본 연구에 추출된 백하수오 지질의 지방산 조성을 알아보기 위해 6% sulfuric acid(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)을 이용한 유도체화를 실시하였다(2). 약 100 mg의 추출된 지질을 Reacti-vial™ reaction vial(5 mL size, Thermo Fisher Scientific Co., Rockford, IL, USA)에 옮긴 후, 100 μL의 내부표준물질 heptadecanoic acid(C17:0) (1 mg/mL hexane)을 함께 vial에 첨가하였다. 샘플은 2 mL의 transmethylation reagent인 6% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/CH<sub>3</sub>OH을 이용하여 70°C의 온도에서 Reacti-Therm III Heating/Stirring Module (Thermo Fisher Scientific Co., Rockford, IL, USA)을 이용하여 16시간 동안 유도체화 시켰다. 16시간 후 샘플은 실온에 방치하여 냉각시킨 후 1 mL의 물을 첨가하고 1분간 vortex시킨 후 2 mL의 hexane을 첨가하여 1분간 vortex시킨 후 hexane층을 수집하였다. 2 mL의 hexane을 첨가과정을 3번 반복하여 hexane층을 수집한 후 질소가스를 이용하여 hexane을 제거한 후 샘플을 다시 1 mL의 hexane에 녹여 지방산 분석을 위한 실험에 사용하였다. 지방산 분석을 위해서 사용된 gas chromatography는 Agilent Technologies 6890N 장치가 사용되었다. 분석 컬럼은 SP-2560 capillary column (100 m × 0.25 mm i.d., 0.25-μm film thickness; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)이 사용되었고, carrier gas로 helium (2.7 mL/min)이 이용되었다. 주입구 및 검출기 온도는 모두 250°C였으며, split ratio는 50:1이며, 불꽃이온을 위한 수소와 air는 검출기에서 분당 40 mL 과 450 mL이 각각 사용되었다. Oven 온도는 초기 130°C에서 5분간 머문 후 분당 4°C 증가시켜 240°C까지 상승시켜 15분간 유지시켰다. 모든 분석은 3회 반복하여 실시하였다. 분석된 결과는 지방산 표준품을 이용하여 각각의 머무름 시간을 이용하여 동정하였다.

(마) 무기질 분석 : 백하수오의 무기질 함량 분석은 식품공전(3)에 준하여 microwave acid digestion (Titan MPS, Perkin Elmer Co., Waltham, MA, USA)을 이용하여 전처리를 시행하였다. 시료 0.5 g을 정확히 칭량하여 전처리 용기에 넣고, 10 mL의 질산을 가한 후 15분 간 180°C에서 가열하고, 600 W 에너지를 가하여 시료를 분해하였다. 전처리가 완료된 시료의 용기를 100 mL 메스플라스크에 정용하고, 0.45μm 필터를 사용하여 시료를 필터링 한 후 분석용 시료로 사용하였다. 분해된 샘플의 무기질 분석은 유도결합플라즈마 분광광도계/ICP-OES (Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometer, 5300DV, Perkin Elmer Co., Waltham, MA, USA)를 사용하였다.

(바) 총페놀 분석 : 백하수오에 함유된 총페놀 함량은 Folin-Ciocalteu's의 방법(4)에 따라 측정하였다. 시료를 1 mg/mL로 희석시킨 후 그 중 40 μL에 증류수 200 μL를 첨가하여 여기에 2N Folin-Ciocalteu's reagent (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 200 μL를 넣은 후 30초간 혼합하였다. 이 용액에 30% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich Co.) 600 μL와 증류수 160 μL를 가하고 혼합하여 25°C에서 2시간 동안 정치 반응한 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질



로는 gallic acid (Sigma-Aldrich Company)를 사용하여 0-500 µg/mL 농도로 하여 샘플과 동일한 방법으로 분석하여 얻은 검량선으로부터 총 폴리페놀 함량을 산출하였다.

(사) 라디칼 소거능 분석 : 백하수오의 라디칼 소거능은 백하수오의 항산화력을 측정하기 위한 지표로써 사용되었고, 항산화력 측정은 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 이용하여 radical scavenging activity를 이용하여 측정하였다(5). 건조된 백하수오를 농도별(200, 400, 600, 800 µg/mL)로 희석한 후 시료용액 80 µL에 0.2 mM의 DPPH 용액(dissolved in 99% ethanol, Sigma-Aldrich Company) 320 µL를 넣고 교반한 후 37°C에서 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 다음의 식에 대입하여 항산화력을 측정하였다. *Radical scavenging activity(%) = (1 - 시료 첨가구의 흡광도/시료 무첨가구의 흡광도) × 100* 또한 Radical scavenging activity를 토대로 IC<sub>50</sub> (소거능의 50%에 해당하는 샘플의 함량)을 계산하였다.

(아) 비타민 C 분석 : 동결 건조한 시료 1 g에 동량의 10% 메타인산 1 mL을 가하여 현탁 시킨 후, 5% 메타인산 19 mL을 넣어 20 mL로 정용하였다. 이를 1분간 잘 혼합하고 20분간 방치한 후 1000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 취해 HPLC용 0.2 µm membrane filter로 여과하여 HPLC 분석시료로 사용하였다. 컬럼은 µ-bondapack C18을 사용하며, 이동상은 0.05M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : acetonitrile(60 : 40)을 흘려주었다. Flow rate은 1.0 mL/min이며, 시료는 10 µL 주입하여 254 nm 파장에서 측정하였다. 표준물질은 L-ascorbic acid을 사용하여 500-2000 µg/mL의 농도로 용해시켜 분석하였으며, 비타민 C 함량은 건조중량 100 g 당 mg 함량으로 나타내었다.

(자) 수용성 비타민 나이아신(niacin) 분석 : 나이아신 함량은 비색법에 의하여 측정하였는데, 샘플에 aniline 액을 첨가한 후 30°C에서 10분간 방치된 420 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

(카) 지용성 비타민 (tocopherol) 분석 : 백하수오 1 g을 취한 후 80°C 온수 5 mL을 넣어 산화효소를 불활성화 시킨 후 10% ethyl acetate가 첨가된 hexane 용액을 20 mL과 0.01% BHT가 포함된 2-propanol 10 mL, 그리고 5 g magnesium sulfate를 넣고 homogenizer로 2분간 교반하여 여과하였다. Filter cake를 수거하여 추가 20 mL 10% ethyl acetate가 첨가된 hexane 용액과 0.01% BHT가 포함된 2-propanol 5 mL을 첨가하여 homogenizer로 2분간 교반하여 여과하였다. 여과물을 질소를 이용하여 완전히 농축시킨 후 1 mL의 hexane을 첨가하여 형광검출기가 장착된 HPLC를 통해 분석하였다.

#### 나. 약용작물(백수오)의 벤조피렌 분석

(1) 벤조피렌 분석 : 시료 중의 벤조피렌 함량 분석은 식품의약품안전청(2007) “건강기능성 식품(소위 흑삼) 중 benzopyrene 시험법 지침에 근거하여 실험을 실시하였다. 벤조피렌 함량은 시험한 시료를 105°C에서 8시간 건조하여 측정된 수분 함량으로부터 보정된 건조시료의 무게 당 함량으로 계산하여 나타내었다. 세부적 분석절차는 아래 Figure. 4에 나타내었다.

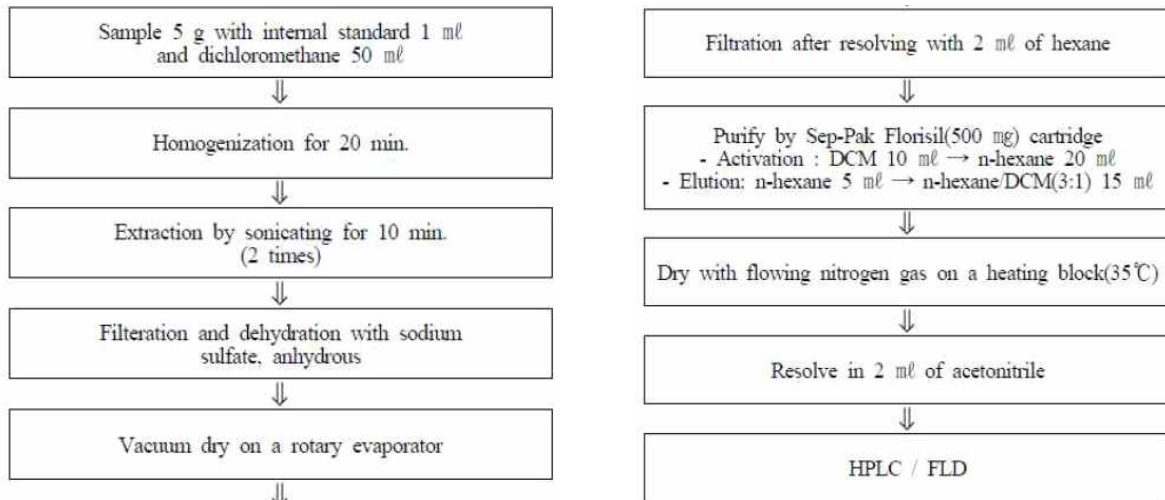


Figure. 4. Diagram of extraction of benzopyrene in *Cynanchi wilfordii* Radix

#### 다. 약용작물(백하수오)의 휘발성 향기성분 및 관능검사

##### (1) 휘발성 향기성분 분석

백하수오의 휘발성 향기성분 포집은 Schultz(13)의 방법에 따라 개량된 연속수증기증류추출 장치(Likens & Nickerson type simultaneous steam distillation and extraction apparatus, SDE)를 이용하였다. 분쇄된 백하수오 100 g에 증류수(초순수) 1,000 mL를 가하여 혼합 한 후 내부표준 물질로 1 mL의 n-pentadecane(1 mg/mL, Sigma-Aldrich Company)를 첨가하여 110°C에서 증류를 실시하고, 포집을 위한 유기용매는 재증류한 n-pentane과 diethylether 혼합용매(1:1, v/v) 100 mL를 사용하여 상압 하에서 3시간 동안 증류를 통한 향기성분과 유기용매의 혼합으로 휘발성 향기성분을 추출하였다. 추출이 끝난 후 이 추출액에 10 g의 무수황산나트륨(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)를 가하여 4°C에서 하룻밤 방치시켜 탈수시키고 n-pentane과 diethylether 혼합용매층은 질소가스를 통해 1 mL까지 농축 후 GC/MS 분석시료로 사용하였다. 농축된 휘발성 성분은 gas chromatography - mass spectrometry(GC/MSD; Agilent 7890A & 5975C, Santa Clara, CA, USA)로 분석 하였다. 향기 성분의 분석은 HP-5MS 칼럼(30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 μm film thickness)을 사용하였다. 이때 분석조건으로 오븐 온도는 40°C에서 5분 머무른 후 200°C까지 분당 5°C의 속도로 승온 시켰으며, injector 온도는 220°C로 하였으며, carrier gas인 helium의 유속은 1.0 mL/min, 그리고 split ratio는 1:10이었다. Total ionization chromatogram(TIC)에서 분리된 각 성분은 mass spectrum library(NIST 12)와 참고문헌을 이용하여 동정하였으며, 각 시료의 향기 성분은 피크 면적과 이를 기준으로 하여 전체 피크면적을 100%로 환산하여 각 성분들이 가지는 피크면적을 상대적인 비율(%)로 나타내었다.

(2) 후각검사 (Olfactory) : GC/MS를 통해 분리된 각각의 휘발성 향기성분은 GC/MSD에 장착된 Olfactory detection port with heated mixing chamber(ODP 3, Gerstel, Linthicum, MD, USA)를 이용하여, 휘발성 물질에 대한 실험자의 후각을 통한 sniffing test를 실시하였다. 개인이 느끼는 후각의 정도 차이와 시간이 경과함에 따른 후각의 민감성이 감소되는 점을 고려하여, 3명의 숙련된 실험자가 동일 실험을 참여하여 각각의 휘발성분들에 대한 강도를 검사하였다.

##### (2) 약용작물의 기능성 식품소재로의 관능검사

(가) 관능검사 : 백하수오의 식음료소재로의 활용 잠재력을 탐구하기 위해 백하수오 5 g과

수돗물 1 L를 섞어 끓인 후 여과하여 식용차를 제조하였다. 제조된 식용차의 관능검사는 경남 과학기술대학교 재학생 15명을 이용하여 15점법을 이용하여 색, 향, 짠맛, 쓴맛, 신맛, 짙은맛, 단맛, 그리고 종합적 선호도를 조사하였다. 백하수오 차에 대한 대조구로 녹차를 사용하였고, 실험에 사용된 녹차는 시중에서 구입 가능한 티백형태의 소비자 구매빈도가 높은 제품을 이용하였다. 백하수오 차의 관능적 평가는 녹차와의 상대적인 비교를 통해 검사하였다. 평가는 15 점 평점법(11-point scaling)으로 평가 : 사전 교육에는 관능검사지에 기재된 각 관능적 특성에 해당하는 용어의 정의 설명도 포함하였다. 제조 조건을 달리한 제품과 한방소재가 없는 대조군을 비교하여 개인적 기호도 영역을 구분하여 평가되었다. 관능 검사자가 한 번에 평가할 수 있는 시료 수를 고려하여 1회당 3종의 시료를 실시하였다. 개별 관능적 특성에 대한 용어 정의는 ‘국립국어원표준국어대사전’에 근거하였다. 평가된 관능적 특성으로는 다음과 같다.

- 색(color) : 매우 옅은 색이다-매우 짙은 색이다.
- 고유의 향(roma) : 향이 고소하며 한약재와 유사한 냄새가 나는 정도
- 이취(off-flavor) : 거부감이 드는 불쾌한 한약재의 냄새
- 단맛(sweetness) : 진한 맛에 대한 맛의 강도
- 쓴맛(bitter aftertaste) : 한약재에 의한 쓴 맛
- 이미(off-taste) : 불쾌한 맛, 특히 한약재에 의한 입안에 부착되는 정도
- 종합적 선호도(overall acceptability) : 모든 부분을 고려한 종합적 선호도

Table 12. Questionnaire of sensory test for *Cynanchi wilfordii* Radix

# 샘플명 : 000	# 참여자 성명 : 000	# 참여자 성별 : O	# 참여자 나이 : 00
① 색(color)			
① 매우 약하다	② 다소 약하다	③ 중간	④ 다소 강하다
⑤ 매우 강하다			
② 샘플의 부유물 정도			
① 매우 약하다	② 다소 약하다	③ 중간	④ 다소 강하다
⑤ 매우 강하다			
③ 고유의 향(roma)			
① 매우 약하다	② 다소 약하다	③ 중간	④ 다소 강하다
⑤ 매우 강하다			
④ 이취(off-flavor)			
① 매우 약하다	② 다소 약하다	③ 중간	④ 다소 강하다
⑤ 매우 강하다			
⑤ 단맛(sweetness)			
① 매우 약하다	② 다소 약하다	③ 중간	④ 다소 강하다
⑤ 매우 강하다			
⑥ 쓴맛(bitter aftertaste)			
① 매우 약하다	② 다소 약하다	③ 중간	④ 다소 강하다
⑤ 매우 강하다			
⑦ 이미(off-taste)			
① 매우 약하다	② 다소 약하다	③ 중간	④ 다소 강하다
⑤ 매우 강하다			
⑧ 종합적 선호도(overall acceptability)			
① 매우 싫다	② 다소 싫다	③ 중간	④ 다소 좋다
⑤ 매우 좋다			

(나) 통계처리 : 백하수오의 영양 및 기능성 성분에 대한 결과는 3반복을 통해 평균값과 평균 편차를 통해서 비교하였고, 관능검사에 사용된 결과는 Microsoft Excel software (version 2010, Microsoft Corp., St. Redmond, WA, USA)를 이용하여 방사형 그래프를 통해 백하수오와 녹차의 관능적 차이를 항목별로 제시하였다.

## 1-2. 1차년도 연구결과

### 가. 일반성분 분석

(1) 일반성분 : 백하수오의 일반성분을 탐색하기 위해, 수분, 조회분, 조단백질 그리고 지질함량을 조사한 결과는 Table 2에 나타내었다. 수분은  $12.70 \pm 0.23$  g/100 g, 조회분  $3.32 \pm 0.16$  g/100 g, 단백질은  $14.57 \pm 0.34$  g/100 g, 지질 함량은  $4.98 \pm 0.09$  g/100 g로 나타났으며, 수분 함량의 경우 1차 열풍 건조된 샘플을 사용한 관계로 실제 수분은 이보다 높을 것으로 예상된다. 탄수화물의 경우  $64.43 \pm 0.54$  g/100 g가 나타났지만, 탄수화물을 제외한 일반성분 값을 빼 나머지를 주로 탄수화물로 간주하는 방법에서 수분이 1차 건조된 상태로 측정되었음을 간주할 때 실제 탄수화물의 함량은 보고 값( $64.43 \pm 0.54$  g/100 g) 이하일 것으로 판단된다. 본 연구에서는 조회분, 단백질, 그리고 지질의 세부적 구성성분을 보고하였다.

Table 2. Proximates in *Cynanchi wilfordii* Radix

Proximates	Contents (g/100 g)
Moisture	$12.7 \pm 0.2$
Ash	$3.3 \pm 0.2$
Protein	$14.6 \pm 0.3$
Lipid	$5.0 \pm 0.1$
Carbohydrate	$64.4 \pm 0.5^b$

Data represents the mean  $\pm$  SD in triplicate.

<sup>b</sup>Total carbohydrate content of foods has been calculated by difference. The other constituents in the sample (moisture, ash, protein, and lipid) are summed and subtracted from the total weight of the sample.

### 나. 성분 분석

(1) 구성 및 유리아미노산 분석 : 백하수오가 가지는 산분해(acid hydrolysis)를 통해 얻은 전체 아미노산의 조성과 단백질을 구성하지 않는 유리아미노산의 조성을 Table 3과 4에 나타내었다. 전체 아미노산에서 필수아미노산 8종은 전체의 31.55%를 차지하였다. 유리아미노산의 경우에는 10.75%를 차지하였다. 아미노산 중 가장 높은 비율을 차지하는 아미노산은 arginine ( $4,343 \pm 36$  mg/100 g)으로써 전체의 30.34%를 차지하는 비율로써, 높은 arginine의 비율을 백하수오를 비롯한 약용작물을 쓴맛을 일으키는 주된 원인으로 알려져 있으며, 그 다음으로 높은 함량을 보이는 glutamic acid ( $1,517 \pm 28$  mg/100 g)는 arginine과는 상반된 맛을 가지고 있으며, 우수한 맛 성분으로 인해 그의 Na염 (monosodium glutamate, MSG)은 조미료로써 이용되는 성분으로 알려져 있다. 필수아미노산 중 leucine, isoleucine, 그리고 phenylalanine은 백하수오의 쓴맛에 기여하는 아미노산이다. 특히 arginine은 유리아미노산에서도 가장 높은 비중(33.77%)을 차지하고 있는 아미노산이다. 백하수오의 유리아미노산 조성에서 arginine 다음으로 높은 비중을 차지하는 아미노산은  $\gamma$ -aminobutyric acid ( $562.60 \pm 19.54$  mg/100 g)로서,  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)는 자연계에 분포하는 비단백질 아미노산의 일종으로 4개의 탄소로 구성되어 있으며, 높은 수용성을 가진 물질이다. GABA로 불리는  $\gamma$ -aminobutyric acid는 여러 가지 생리활성에 기인한다는 보고가 있다. 문헌에서 보고된 약용식물의 GABA 함량을 보면 10종의 생약 추출물 중 천궁, 하수오, 측백엽, 석창포, 원지, 백복신, 가시오가피, 헛개나무 추출물에서 각각  $3.1 \pm 0.1$ ,  $5.4 \pm 0.2$ ,  $1.6 \pm 0.2$ ,  $1.0 \pm 0.2$ ,  $0.7 \pm 0.1$ ,  $0.2 \pm 0.1$ ,  $0.9 \pm 0.1$ ,  $0.9 \pm 0.1$  mg/g 의 GABA 함량을

나타내었다. 본 연구에서 나타난 GABA의 함량은 mg/g 단위로 환산했을 때 5.62 mg/g로서 백하수오의 GABA함량 기존의 약용식물이 가진 함량보다 우수하다고 판단된다(6-10).

Table 3. Total amino acid contents in *Cynanchi wilfordii* Radix

Total amino acid (mg/100 g)	
Essential amino acid	
Lysine	799 ± 22
Methionine	791 ± 20
Leucine	613 ± 19
Phenylalanine	581 ± 14
Valine	478 ± 10
Histidine	451 ± 11
Threonine	426 ± 10
Isoleucine	376 ± 9
Non-essential amino acid	
Arginine	4,343 ± 36
Glutamic acid	1,517 ± 28
Aspartic acid	1,109 ± 24
Cysteine	898 ± 22
Alanine	764 ± 22
Glycine	548 ± 19
Serine	448 ± 17
Tyrosine	170 ± 15
Essential amino acid	4,516 ± 39
Non-essential amino acid	9,796 ± 81
Total amino acid	14,311 ± 121

Data represents the mean ± SD in triplicate.

Table 4. Free amino acid contents in *Cynanchi wilfordii* Radix

Free amino acid (mg/100 g)	
Essential amino acid	
Histidine	59 ± 5
Phenylalanine	57 ± 5
Valine	52 ± 4
Leucine	49 ± 5
Isoleucine	38 ± 4
Threonine	11 ± 1
Non-essential amino acid	
Arginine	832 ± 23
γ -Aminobutyric acid	563 ± 20
Alanine	434 ± 15
Cysteine	98 ± 9
Glutamic acid	83 ± 9
Tyrosine	43 ± 6
Citrulline	38 ± 5
Glycine	35 ± 3
β -Alanine	28 ± 3
α -Aminobutyric acid	21 ± 3
Aspartic acid	15 ± 1
Serine	8 ± 1
Essential amino acid	265 ± 8
Non-essential amino acid	2,199 ± 66
Total amino acid	2,464 ± 79

Data represents the mean ± SD in triplicate.

(3) 지방산 분석 : 백하수오에서 추출한 지질의 지방산 함량은 Table 5에 나타내었고, GC-FID chromatogram은 Figure. 1에 나타내었다. 백하수오 지질이 가지는 지방산에서는 linoleic acid가  $63.74 \pm 0.58\%$ 로써 가장 주된 지방산으로 나타났고, palmitic acid가  $18.71 \pm 0.12\%$ , 그리고 oleic acid가  $7.00 \pm 0.03\%$ 로써 주요한 지방산으로 검출되었다. 특히 linoleic acid와 oleic acid의 함량은 전체의 70%가 넘는 높은 비율을 보이고 있었다. 또한  $\omega$ -3계열의 linolenic acid 역시 검출되어 백하수오의 지방산 조성은 높은 불포화도를 보이고 있어, 영양학적으로 우수한 조성으로 판단된다.

Table 5. Fatty acid profile in *Cynanchi wilfordii* Radix

Fatty acid	Composition (%weight)
Palmitic acid	$18.71 \pm 0.12$
Stearic acid	$2.08 \pm 0.02$
Oleic acid( $\omega$ -9)	$7.00 \pm 0.03$
Linoleic acid( $\omega$ -6)	$63.74 \pm 0.58$
Linolenic acid( $\omega$ -3)	$4.93 \pm 0.03$
Arachidic acid	$1.04 \pm 0.01$
Gondoic acid( $\omega$ -9)	$0.92 \pm 0.02$
Behenic acid	$0.91 \pm 0.02$
lignoceric acid	$0.67 \pm 0.04$
%Saturated fatty acid	$23.41 \pm 0.19$
%Monounsaturated fatty acid	$7.92 \pm 0.04$
%Polyunsaturated fatty acid	$68.67 \pm 0.61$

Data represents the mean $\pm$ SD in triplicate.

크로마토그램을 통해 탄소의 갯수가 16개인 palmitic acid부터 탄소 수 22개를 가진 behenic acid까지 총 9가지 지방산의 분리 및 동정이 이루어졌음을 알 수 있다. 짧은 탄소사슬을 가진 지방산은 검출되지 않았다.

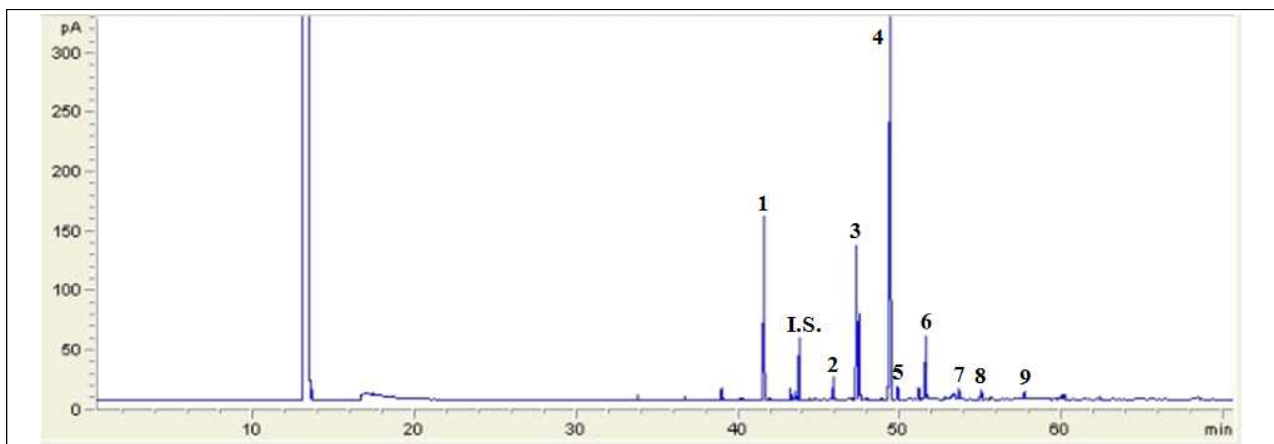


Figure. 1. Chromatogram of fatty acid profile in *Cynanchi wilfordii* Radix (peak 1, palmitic acid; I.S., internal standard; 2, stearic acid; 3, oleic acid; 4, linoleic acid, 5, linoleic acid; 6, arachidic acid; 7, linolenic acid; 8, gondoic acid; 9, behenic acid, respectively.)

(4) 무기질 분석 : 백하수오의 무기질 조성을 측정한 결과는 Table 6에 나타내었다. 무기질은 생물체의 중요한 구성성분으로 유기물질을 구성하는 기본골격 원소인 탄소, 수소, 산소, 질소를 제외한 원소들으로써 광물질이라고 부른다. 백하수오에 존재하는 무기질을 살펴보면, 칼륨이 가장 높은 함량 ( $809 \pm 94$  mg/100 g)을 차지하고 있으며, 전체의 45.46%를 차지하고 있다. 그리고 칼슘 ( $406 \pm 50$  mg/100 g)과 인 ( $272 \pm 29$  mg/100 g), 마그네슘 ( $142 \pm 13$  mg/100 g), 그리고 황

(129±12 mg/100 g)이 주요 무기질 성분으로써 이들 5 가지 무기질이 전체 비율의 98% 이상을 차지하고 있다. 특히 칼륨, 칼슘, 인, 마그네슘은 인체가 하루에 100 mg 이상의 섭취를 요구하는 다량 무기질로써 모두 100 g 중량 대비 요구량을 만족하고 있어, 무기질 함량으로 볼 때 백하수오는 무기질 공급원으로써 잠재력이 있다고 할 수 있다(11).

Table 6. Mineral contents in *Cynanchi wilfordii* Radix

Mineral	Content (mg/100 g)	Percentage (%)
K	809±94	45.46
Ca	406±50	22.83
P	272±29	15.25
Mg	142±13	7.97
S	129±12	7.26
Na	8.52±1.67	0.48
Mn	4.21±0.52	0.24
Al	3.30±0.62	0.19
Fe	3.24±0.49	0.18
Zn	1.74±0.17	0.10
V	0.31±0.04	0.02
Se	0.18±0.10	0.01
Cu	0.11±0.05	0.01
As	0.08±0.04	0.00
Ni	0.06±0.01	0.00
Ti	0.05±0.01	0.00
Total	1780.06±201.54	100.00

Data represents the mean±SD in triplicate.

(5) 총페놀 분석 : 백하수오에 총 페놀 및 플라보노이드 화합물은 천연물에 많이 함유되어 있는 성분으로 이들의 주요 역할은 자유 라디칼을 소거하는 것이라는 연구가 많이 보고되고 있으며, 또한 이러한 페놀성 화합물인 플라보노이드나 페놀산 및 안토시아닌 등의 총량인 총페놀 함량은 DPPH 라디칼 소거활성과 같은 항산화활성에 중요한 인자로 작용을 한다(12). 백하수오 추출물의 총페놀 함량을 측정한 결과 410±10 mg/100 g으로 나타났다(Table 7).

Table 7. Total phenolic contents in *Cynanchi wilfordii* Radix

Sample	Total phenolic content (mg/100 g)
<i>Cynanchi wilfordii</i> Radix	409.60 ± 9.82

Data represents the mean±SD in triplicate.

(6) 라디칼 소거능 분석 : 산화적 스트레스에 대한 효능을 확인하기 위해 백하수오의 항산화력을 확인하기 위한 라디칼 소거능을 측정하였다. DPPH는 짙은 보라색을 띠는 안정한 free radical로서 항산화제에 의해 환원되어 색이 보라색에서 점차 탈색되는데 이러한 원리를 이용하여 다양한 천연소재로부터 항산화성을 검증하는데 이용되고 있다(5). 본 실험에서는 백하수오의 수용성 추출물에 대해서 항산화 효과를 DPPH의 소거활성을 측정하여 비교하였으며 그 결과는 Table 4에 나타내었다. 수용성 백하수오 추출물의 IC<sub>50</sub>(50%의 라디칼소거능의 활성에 필요한 함량)는 1.16±0.09 mg으로 나타났다. Table 8에 나타난 높은 항산화 물질의 함량을 비추어 볼 때 백하수오는 항산화에 유용한 식품소재로서의 잠재력을 가진 것으로 판단된다.

Table 8. Antioxidant capacity in *Cynanchi wilfordii* Radix

Sample	IC <sub>50</sub>
<i>Cynanchi wilfordii</i> Radix	1.16 ± 0.09 mg
Data represents the mean±SD in triplicate.	

(7) 비타민 C 분석 : 백하수오에 함유된 비타민 C의 함량을 살펴본 결과를 Figure. 2와 Table 9에 나타내었다. 백하수오에 함유된 Vitamin C 함량은 100g 당 22.58 mg 으로서 수용성 비타민 C는 콜라겐 및 스테로이드 호르몬 합성에 영양을 미치는 인자로 알려져 있다. 일반적으로 알려진 비타민 C는 동식물에서 모두 합성되지만 사람의 몸에서는 합성이 이뤄지지 않으므로 비타민 C를 식품으로서 섭취해야 하는 비타민이다. 비타민 C는 우수한 항바이러스제다. 항바이러스 작용을 하는 인터페론 생산을 증가시켜 인플루엔자 바이러스 초기 감염 시 면역효과를 가진다.

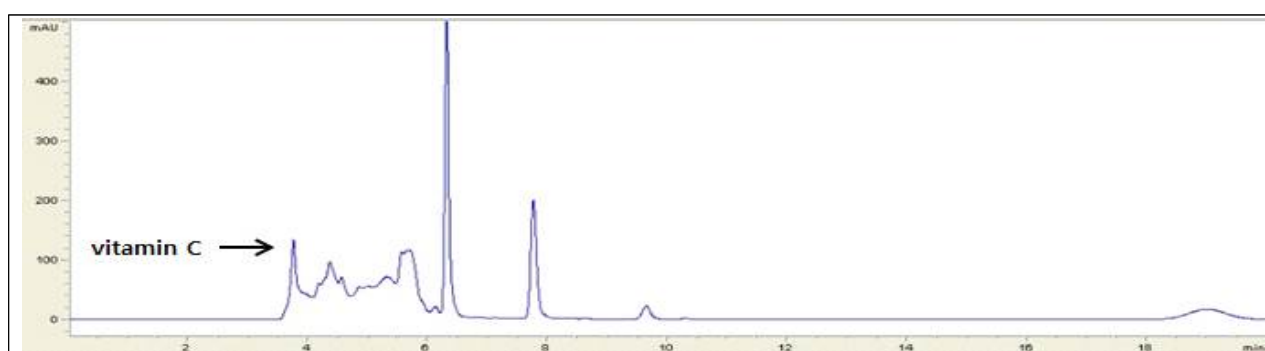


Figure. 2. Chromatogram of vitamin C in *Cynanchi wilfordii* Radix

Table 9. Vitamin C content in *Cynanchi wilfordii* Radix

Sample	Vitamin C content (mg/100 g)
<i>Cynanchi wilfordii</i> Radix	22.58 ± 4.17

Data represents the mean±SD in triplicate.

(8) 수용성 비타민 (나이아신) 분석 : 비색법을 통한 수용성 비타민인 나이아신을 분석하여, Table 10에 나타내었다. 영양성분 database에서 알려진 적하수오에서 알려진 0.5 mg/100 g과 비교해 볼 때 나이아신은 낮은 함량을 보이고 있다.

Table 10. The contents of niacin in *Cynanchi wilfordii* Radix

Sample	Niacin content (mg/100 g)
<i>Cynanchi wilfordii</i> Radix	0.25 ± 0.09

Data represents the mean±SD in triplicate.

(9) 지용성 비타민 (vitamin E) 분석 : 백하수오에 함유된 vitamin E (tocopherol)을 분석한 결과를 Figure. 3에 나타내었다. Tocopherol 표준품을 이용하여 백하수오에 함유된 vitamin E의 이성질체를 정량한 결과는 Table 11에 나타내었다. 가장 높은 함량을 보인 tocopherol은 α-tocopherol 이었으며, 뒤를 이어 γ-tocopherol이 높은 함량을 나타내었으며, β-tocopherol과 δ-tocopherol은 미량으로 존재하였다.



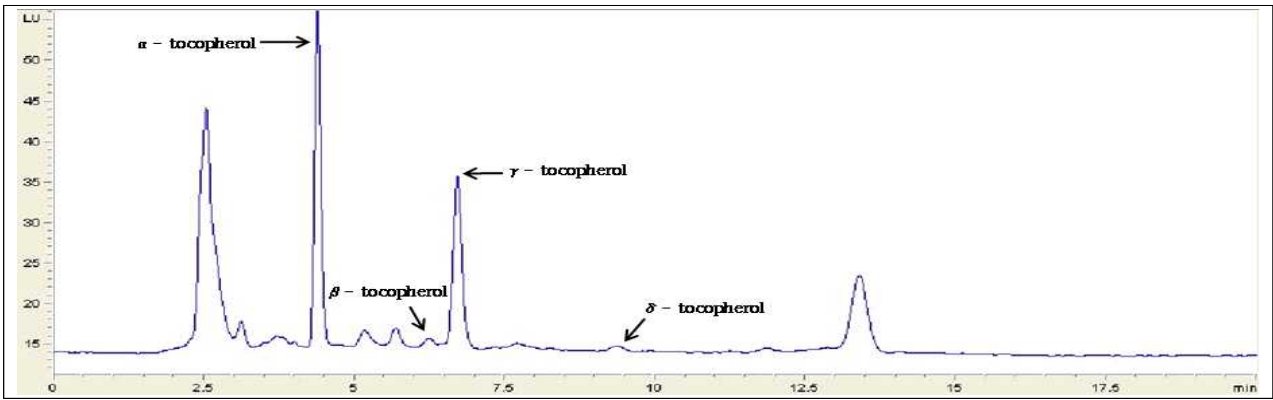


Figure. 3. Chromatogram of vitamin E (tocopherols) in *Cynanchi wilfordii* Radix

Table 11. The contents of Vitamin E in *Cynanchi wilfordii* Radix

Sample	Tocopherol content (mg/100 g)			
	$\alpha$ -tocopherol	$\beta$ -tocopherol	$\gamma$ -tocopherol	$\delta$ -tocopherol
<i>Cynanchi wilfordii</i> Radix	0.18±0.2	0.01±0.0	0.05±0.1	0.01±0.0

Data represents the mean±SD in triplicate.

#### 다. 약용작물(백하수오)의 위해성 성분 검토

(1) 백하수오의 벤조피렌 분석 : 백하수오에 존재하는 벤조피렌을 분석한 결과를 Figure. 5에 나타내었다. 벤조피렌 표준품과의 크로마토그램의 비교를 볼 때 가공하지 않은 백하수오에서는 벤조피렌이 존재하지 않거나 존재하더라도 극히 미량으로 분석한도 (limit of detection) 이하로 판단된다.

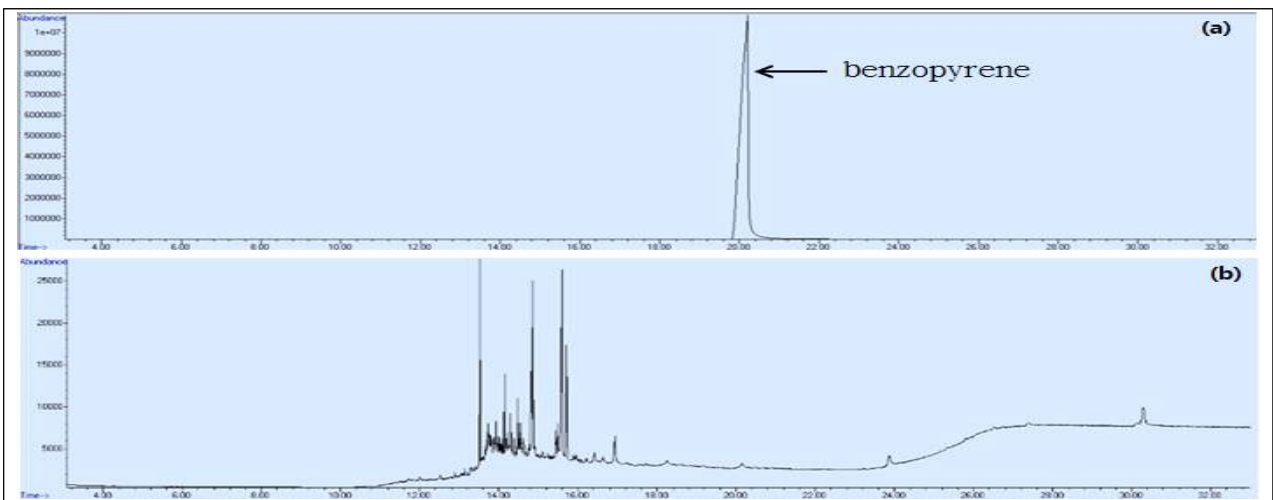


Figure. 5 Chromatogram of benzopyrene in *Cynanchi wilfordii* Radix. (a) benzopyrene standard and (b) *Cynanchi wilfordii* Radix.

#### 라. 약용작물(백하수오)의 휘발성 향기성분 및 관능검사

(1) 휘발성 향기성분 : GC/MS를 이용한 백하수오의 휘발성 성분을 분석한 결과 총 33가지의 휘발성분이 크로마토그램(Figure. 6a)에서 검출되었고, GC/MS library를 통해서 spectrum 패턴을 통해 16가지의 key flavor compounds를 동정하여 Table 13에 나타내었다. 그 중 높은 피크 면적을 보이는 물질은 1-ethoxy propane과  $\beta$ -eudesmol, 그리고 hexadecanoic acid로 나타났다.

$\beta$ -Eudesmol의 경우 sesquiterpene alcohol의 한 종류로써 woody odor를 가진 물질로써 약용식물 주 하나이며, 문헌에 의해 수행된 약용식물인 *Pavonia odorata*의 주요한 향기성분중 하나로 알려져 있다. 백하수오의 쓴맛에 기인하는 주요 물질 중 하나이다(13). 문헌에 의한 휘발성 성분들에 대한 연구를 보면 백하수오의 휘발성 향기성분을 분석한 결과 hexanal(전체 휘발성분의 함량의 55%)이 가장 높은 함량을 나타내었다는 보고가 있다. Hexanal은 녹차잎에 다량 존재하는 풀내음(green note)을 나타내는 C6 화합물로써 세포벽의 주요성분인 불포화 지방산 linoleic acid에서 lipoxygenase pathway에 의한 생합성 경로에 의해 생성된다. 약용식물의 향기성분 추출을 위해 파쇄과정에서 세포가 파괴되어 유리된 chloroplast의 세포벽성분들인 linoleic acid에서 생성된 리놀렌산 과산화물(13-hydroperoxide linoleic acid)가 생성되며, 다시 분해효소에 의해 분해되어 생성된다(14). 본 연구에서는 linoleic acid함량을 전체 지방산 중 63%로 보고되어 (Table 5) linoleic acid가 가지는 과산화물 생성을 예측할 수 있었다. 본 연구에서도 hexanal이 검출되었으나 피크면적으로 비교할 때 소량으로 존재하는 향기성분으로 분석되었다. Eugenol은 clove에서 주로 검출되는 향기성분으로 강한 spicy향을 가지고 있고, 향균성 효과를 보이는 것으로 보고되고 있다. 미량으로서 면실유에 포함된 linoleic acid의 산화 분해생성물로 보고되어 있는 2,4-decadienal이 검출되었다. 2,4-Decadienal은 높은 농도에서 chicken oil odor를 가진 물질로서 희석시에는 grape-fruit odor를 가진다(15).

Table 13. Volatile compounds in *Cynanchi wilfordii* Radix

No.	RT(min)	Compounds	Peak area (x10 <sup>6</sup> )
1	3.27	1-Ethoxy propane	6.62
2	3.38	4-Methyl-2-pentene	0.74
3	3.47	Acetic acid ethyl ester	0.51
4	3.56	3-Heptanol	0.74
5	7.78	Hexanal	0.41
6	9.83	Ethyl benzene	0.26
7	14.24	2-Pentyl furan	0.22
8	23.81	2,4-Decadienal	0.28
9	24.92	Eugenol	0.54
10	31.38	$\delta$ -Selinene	1.32
11	32.05	$\beta$ -Eudesmol	4.25
12	32.38	$\beta$ -Humulene	0.52
13	33.84	3-Butyl phthalide	0.53
14	37.60	Hexadecanoic acid methyl ester	0.45
15	38.57	Hexadecanoic acid	5.24
16	42.68	9,12-Octadecadienoic acid	0.96

RT: Retention time

(2) 후각검사 : GC/MS와 olfactory를 이용하여 실험자의 후각기능을 통해 직접 향을 분석하였고, aroma-gram을 나타내었다 (Figure. 6b). 전체적으로 실험자가 향을 강하게 느끼는 구간은 15분~20분, 23분~28분, 그리고 31~34분 구간으로 나타났다. 첫 구간에서 동정된 향기성분은 fruit-odor를 가진 2-pentyl furan, 두 번째 구간에서 동정된 주된 향기성분은 2,4-decadienal, eugenol이 있었으며, 마지막 구간에서는  $\delta$ -selinene,  $\beta$ -eudesmol,  $\beta$ -humulene 이었다. 상대적인 함량이 높은 hydrocarbon이 검출되는 구간에서의 실험자의 반응은 매우 낮았다.

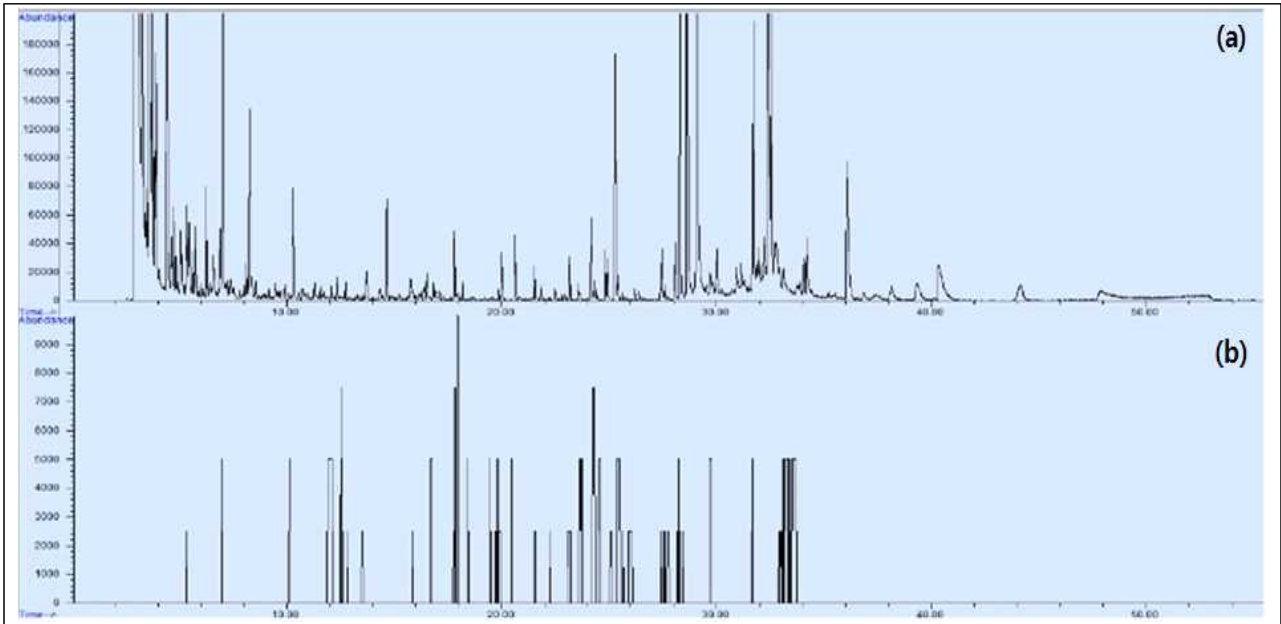


Figure. 6. Chromatogram of volatile compounds and aromagram in *Cynanchi wilfordii* Radix. (a) chromatogram for volatile compounds and (b) aromagram by the sniffing test.

(3) 관능검사 : 백하수오의 음료(차)로서의 잠재력을 확인하기 위해 관능검사를 실시하였고, 차의 기호성을 비교하기 위해 녹차를 비교대상으로 실험을 실시하였다(Figure. 7). 관능적인 부분에서 약용식물의 특징적인 부분인 쓴맛의 강도가 매우 중요한 부분으로 대두 되었다. 8가지 항목을 비교해 볼 때 전체적인 선호도에서는 백하수오차보다는 녹차에 대한 선호도가 높게 나타났다. 녹차와의 비교에서 백하수오차의 색도와 짠맛과 신맛이 녹차보다 더 나은 것으로 나타났다. 짠맛과 단맛의 정도는 기호도가 낮게 나타났다. 선호도가 녹차에 비해 낮은 관능적 부분은 단맛을 줄 수 있는 부재료의 첨가로써 백하수오차가 가지는 단점을 보완해야 할 것으로 판단된다. 백하수오의 부재료와의 부합으로 인해 개선되는 관능성에 대한 시도는 문헌에서도 나타나 있다. 문헌에 의하면 백하수오를 이용한 혼합녹차를 제조한 연구가 보고되어 있는데, 백하수오는 기능성은 우수한 반면 그 맛이 쓰고 떫다 하여 구수한 향이 풍부한 쌀보리를 같이 혼합하여 혼합녹차를 제조하였다. 녹차와 백하수오의 혼합차에서는 백하수오의 향기성분 중 하나인 hexanal과 녹차의 향기성분인 nerolidol 및  $\beta$ -ionone 등의 꽃향으로 관능적 우수성을 부여하였고, 쌀보리차와 백하수오의 혼합에서는 볶은 쌀보리 특유의 구수한 향을 띠는 pyrazine류 및 furan류의 달콤한 향과 백하수오의 향기성분인 풋풋한 향을 띠는 hexanal 및 2-nonenal이 어우러져 향미가 개선되었다고 보고하였다. 참고문헌의 연구에서도 녹차의 향기성분을 보고하면서, 녹차의 주요한 향기성분이 hexanal과 butanal에 기인된다고 보고하였고, 이러한 식물소재의 향기성분들은 재배지역과 채취시기에 따라서 변이가 크다고 보고한 점을 볼 때 백하수오의 휘발성 성분에 의한 맛의 기호도는 재배지역이나 채취시기에 따른 변이가 있을 것으로 판단된다.

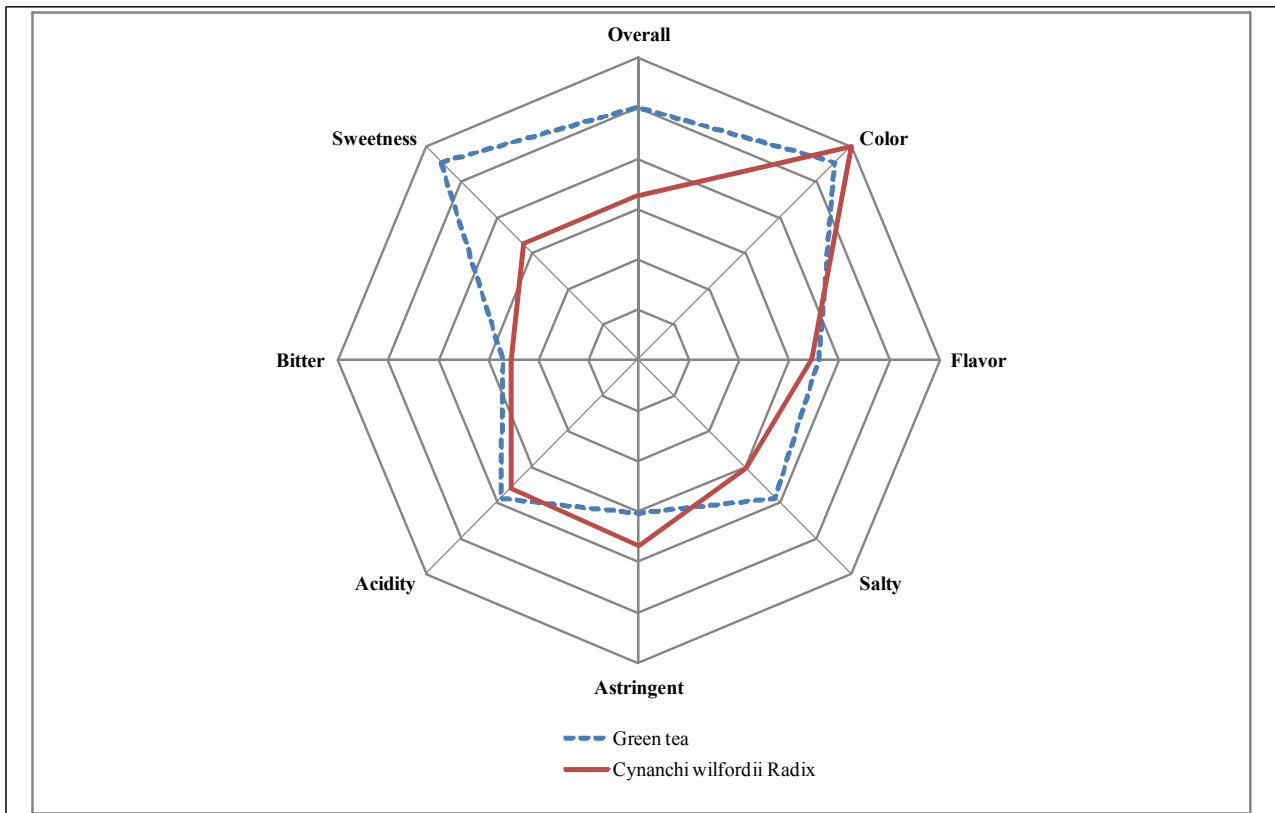


Figure. 7. Consumer acceptance of *Cynanchi wilfordii* Radix. Dot line (---) represents a commercial green tea as control and line (—) represents *Cynanchi wilfordii* Radix.

## 2-1. 2차년도 연구수행 방법

### 가. 약용작물(당귀, 자소엽)의 일반 영양성분 및 특수 영양성분 검토

#### (1) 재료 및 방법

(가) 실험재료 및 시약 : 본 연구에서 사용된 당귀(*Angelica gigas* Nakai)와 자소엽(*Perilla folium*)은 산청 생약농업협동조합을 통해 재배 및 반건조된 것을 구입하였으며, 실험에 사용된 당귀와 자소엽 샘플은 건조기에서 60°C에서 충분히 열풍건조 시켜 수분을 제거한 후 분쇄기와 체를 이용하여 50 mesh 입도로 파쇄하여 연구에 사용하였다. 표준품 및 시약은 1차년도와 동일하게 사용하였다.

(2) 성분 분석 : 1차년도와 동일하게 수행하였다.

### 나. 약용작물(당귀, 자소엽)의 벤조피렌 분석

(1) 벤조피렌 분석 : 1차년도와 동일하게 수행하였다.

### 다. 약용작물(당귀, 자소엽)의 휘발성 향기성분 및 관능검사

(1) 휘발성 향기성분 분석 : 1차년도와 동일하게 수행하였다.

(2) 관능검사 : 1차년도와 동일하게 수행하였다.

## 2-2. 2차년도 연구결과

### 가. 일반성분 분석

(1) 일반성분 : 당귀와 자소엽이 가지는 수분, 조회분, 조단백질 그리고 지질함량에 대한 일반성분을 탐색한 결과는 Table 15에 나타내었다. 당귀와 자소엽의 수분은  $3.20 \pm 0.58$  g/100 g,  $4.50 \pm 0.52$  g/100 g, 조회분  $6.90 \pm 1.21$  g/100 g,  $9.52 \pm 1.07$  g/100 g, 단백질은  $4.50 \pm 0.98$  g/100 g,  $2.89 \pm 0.84$  g/100 g, 지질 함량은  $2.10 \pm 0.11$  g/100 g  $1.05 \pm 0.08$  g/100 g으로 나타났으며, 수분 함량의 경우 1차 열풍 건조된 샘플을 사용한 관계로 실제 수분은 이보다 높을 것으로 예상된다. 탄수화물은 주로 가감법을 통해서 산출이 가능하나 수분이 이미 제거된 상태에서의 측정값이라는 점을 감안할 때 정확한 값이 측정되지 않은 관계로, 본 연구에서는 잔여의 수분, 조회분, 단백질, 그리고 지질의 세부적 구성성분을 보고하였다.

Table 15. Proximates in *Angelica gigas* Nakai and *Perilla folium*

Proximates	<i>Angelica gigas</i> Nakai	<i>Perilla folium</i>
	Contents (g/100 g)	Contents (g/100 g)
Moisture	$3.20 \pm 0.58$	$4.50 \pm 0.52$
Ash	$6.90 \pm 1.21$	$9.52 \pm 1.07$
Protein	$4.50 \pm 0.98$	$2.89 \pm 0.84$
Lipid	$2.10 \pm 0.11$	$1.05 \pm 0.08$

Data represents the mean  $\pm$  SD in triplicate.

### 나. 성분 분석

(1) 구성아미노산 분석 : 당귀가 가지는 산분해(acid hydrolysis)를 통해 얻은 전체 아미노산의 조성을 Table 16, 17, 그리고 Figure 8, 9에 나타내었다. 당귀가 가지는 아미노산의 조성을 보면 필수아미노산의 경우 Lysine과 Leucine의 함량이 우세하였고, 비필수아미노산의 경우에는 Glutamic acid, Arginine, Aspartic acid의 순으로 높은 함량을 보이고 있다. Glutamic acid ( $380.03$  ug/20 uL)는 arginine과는 상반된 맛을 가지고 있으며, 우수한 맛 성분으로 인해 그의 Na염 (monosodium glutamate, MSG)은 조미료로써 이용되는 성분으로 알려져 있다. 필수아미노산 중 leucine, isoleucine, 그리고 phenylalanine은 당귀의 쓴맛에 기여하는 아미노산이다(6). 특히 arginine은 유리아미노산에서도 높은 비중(33.77%)을 차지하고 있는 아미노산이다. 자소엽의 경우 필수아미노산의 경우 Leucine ( $604.84$  ug/ 20 uL)이 가장 우세하게 나타났으며, 그 다음으로 Phenylalanine, Lysine이 나타났다. 비필수아미노산의 경우 Glutamic acid ( $808.34$  ug/ 20 uL)가 가장 높게 나타났으며, Aspartic acid, Alanine, Glycine등이 주요 아미노산으로 검출되었다.

Table 16. Total amino acid contents in *Angelica gigas* Nakai

Total amino acid (ug/20 uL)	
Essential amino acid	
Lysine	202.77
Methionine	7.81
Leucine	150.13
Phenylalanine	109.83
Valine	119.73
Histidine	108.23
Threonine	116.01
Isoleucine	81.63
Non-essential amino acid	
Arginine	321.64
Glutamic acid	380.03
Aspartic acid	220.64
Alanine	148.56
Glycine	123.21
Serine	119.21
Tyrosine	40.70
Essential amino acid	896.14
Non-essential amino acid	1,353.99
Total amino acid	2,250.13

Data represents the mean in triplicate.

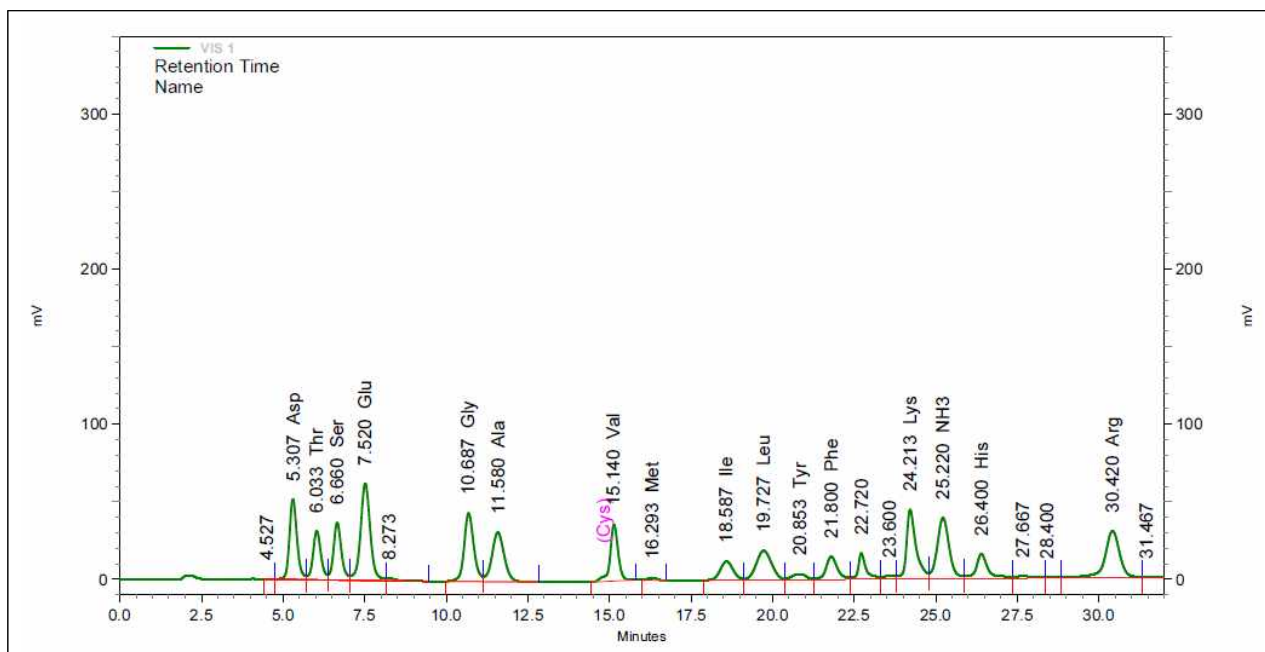


Figure 8. Chromatogram of total amino acids in *Angelica gigas* Nakai

Table 17. Total amino acid contents in Perilla folium

Total amino acid (ug/20 uL)	
Essential amino acid	
Lysine	381.70
Methionine	41.27
Leucine	604.84
Phenylalanine	399.73
Valine	333.13
Histidine	157.61
Threonine	317.19
Isoleucine	269.34
Non-essential amino acid	
Arginine	350.01
Glutamic acid	808.34
Aspartic acid	628.49
Alanine	428.22
Glycine	368.14
Serine	302.78
Tyrosine	197.53
Essential amino acid	2,504.81
Non-essential amino acid	3,083.51
Total amino acid	5,588.32

Data represents the mean in triplicate.

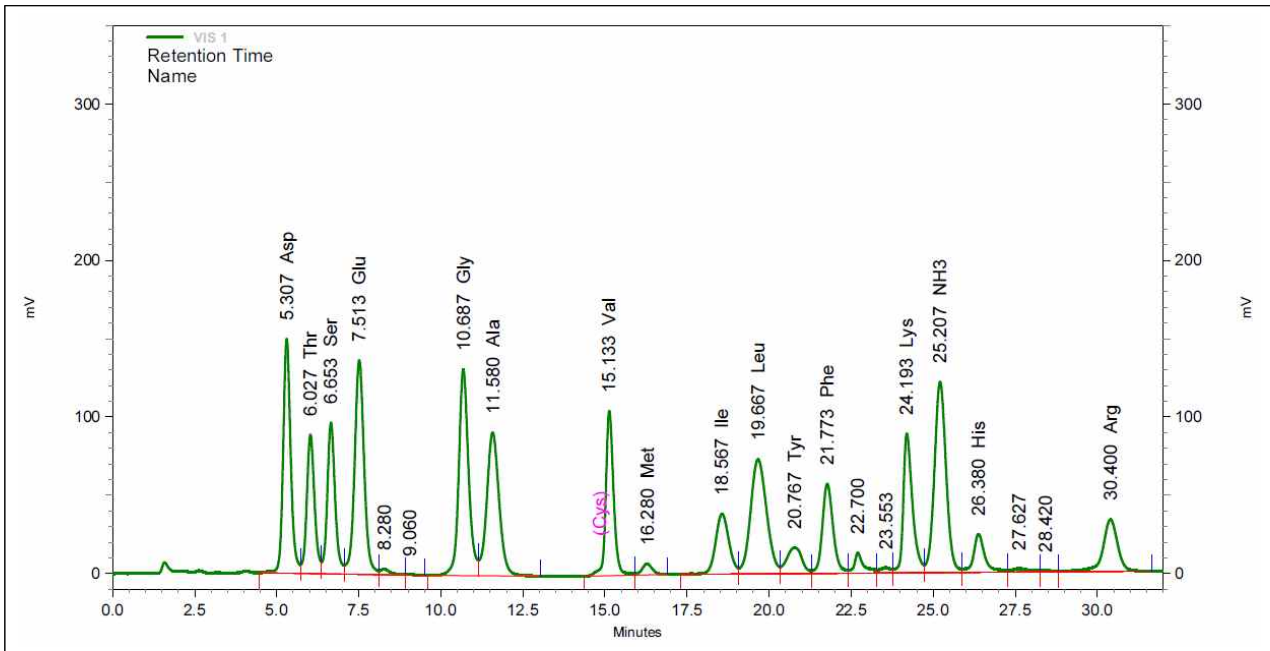


Figure 9. Chromatogram of total amino acids in Perilla folium

(2) 유리아미노산 분석 : 당귀와 자소엽의 유리아미노산 조성을 탐색하여 Table 18와 19 그리고 Figure 10과 11에 나타내었다. 당귀가 지닌 유리아미노산에서는 Valine이 우세한 필수아미노산으로 나타났으며, 비필수아미노산의 경우에는 Alanine,  $\gamma$ -Aminobutyric acid, Arginine이 우세한 비필수아미노산으로 나타났다. 자소엽의 경우 Valine이 우세한 필수아미노산으로 검출되었고, 비필수아미노산의 경우 Alanine과  $\gamma$ -Aminobutyric acid가 우세한 함량을 나타내고 있다. 이 중  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)는 자연계에 널리 분포하는 비단백질 아미노산의 일종으로 4개의





Table 19. Free amino acid contents in Angelica Perilla folium

Free amino acid (ng/ 20 uL)	
Essential amino acid	
Phenylalanine	6.38
Valine	19.51
Leucine	13.19
Isoleucine	10.52
Threonine	7.34
Non-essential amino acid	
$\gamma$ -Aminobutyric acid	75.37
Alanine	81.62
Glutamic acid	7.40
Glycine	5.45
$\beta$ -Alanine	15.14
Aspartic acid	1.61
Serine	8.56
Essential amino acid	56.94
Non-essential amino acid	195.15
Total amino acid	252.09

Data represents the mean in triplicate.

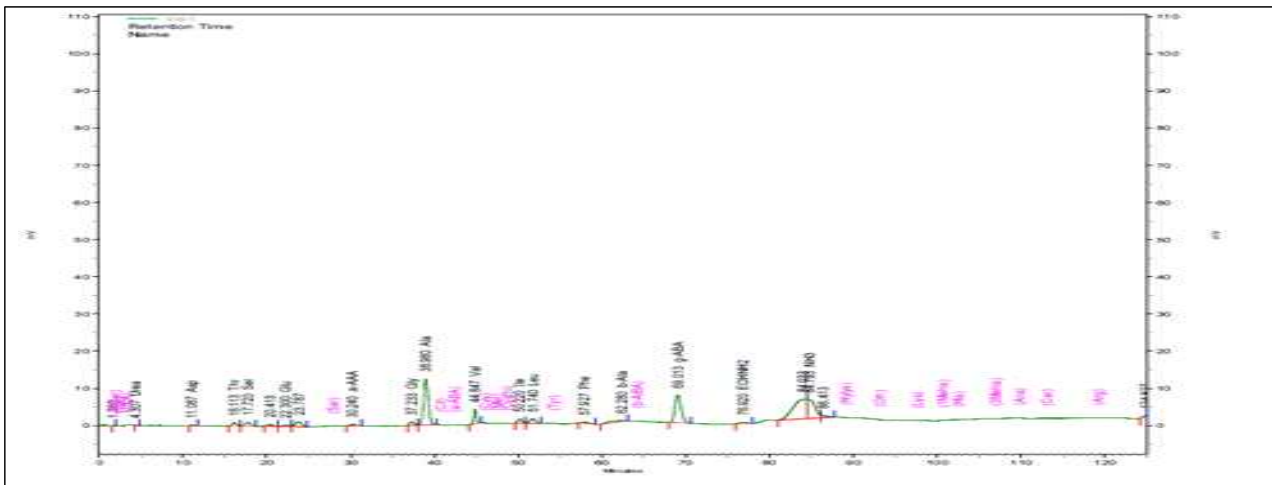


Figure 11. Chromatogram of free amino acids in Perilla folium

(3) 지방산 분석 : 당귀와 자소엽에서 추출한 지방에서 분석한 지방산 조성은 Table 20에 나타내었고, GC-FID chromatogram은 Figure. 12에 나타내었다. 당귀의 지방질이 가지는 지방산에서는 linoleic acid가 64.46%로써 가장 주된 지방산으로 나타났고, palmitic acid가 15.70%, 그리고 oleic acid가 8.29%로써 주요한 지방산으로 검출되었다. 특히 linoleic acid와 oleic acid의 함량은 전체 지방산의 70%가 넘는 높은 비율을 보이고 있었다. 또한  $\omega$ -3계열의 linolenic acid 역시 검출되어 당귀의 지방산 조성은 높은 불포화도를 보이고 있어, 영양학적으로 우수한 조성으로 판단된다. 자소엽의 경우  $\omega$ -3계열의 linolenic acid가 가장 높은 지방산으로써 전체의 48.47%를 차지하였고, palmitic acid와 linoleic acid가 각각 20.78%와 13.13%를 나타내고 있다.

Table 20. Fatty acid profile in *Angelica gigas* Nakai and *Perilla folium*

Fatty acid	Composition (%weight)	
	<i>Angelica gigas</i> Nakai	<i>Perilla folium</i>
Palmitic acid	15.70	20.78
Stearic acid	1.30	3.15
Oleic acid( $\omega$ -9)	8.29	4.65
Linoleic acid( $\omega$ -6)	64.46	13.13
Linolenic acid( $\omega$ -3)	3.99	48.47
Arachidic acid	0.65	1.63
Gondoic acid( $\omega$ -9)	1.69	2.31
Behenic acid	2.06	3.69
lignoceric acid	1.96	1.12

Data represents the mean in triplicate.

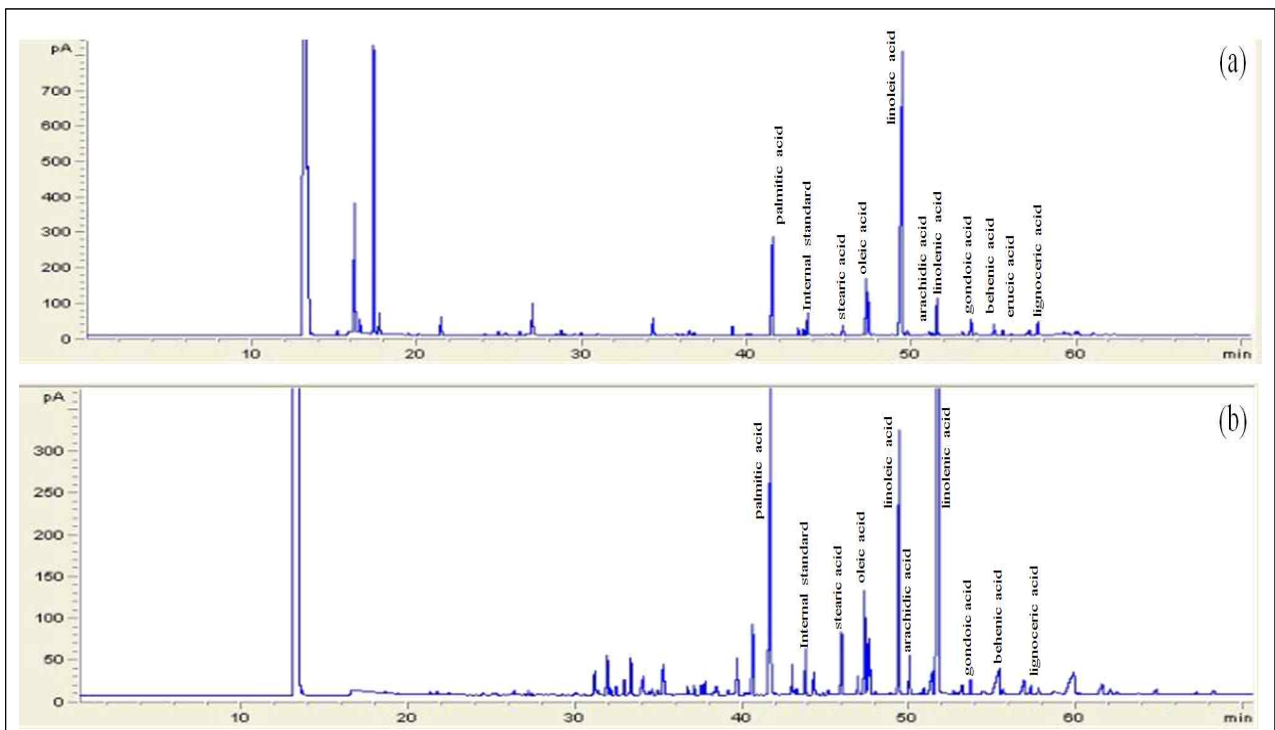


Figure 12. Chromatogram of fatty acid profiles in *Angelica gigas* Nakai and *Perilla folium*

(4) 무기질 분석 : 당귀와 자소엽의 무기질 조성을 측정한 결과는 Table 21에 나타내었다. 무기질은 미량으로 존재하지만 생명체의 중요한 구성성분으로 유기물질을 구성하는 기본골격 원소인 탄소, 수소, 산소, 질소를 제외한 원소들로서 광물질이라고 부른다. 당귀에 존재하는 무기질을 살펴보면, 칼륨이 가장 높은 함량 (16,458.18 mg/kg)을 차지하고 있으며, 그리고 인 (3,774.83 mg/kg)과 칼슘 (3,042.68 mg/kg)이 주요 무기질 성분으로써 나타났다. 자소엽의 경우 칼륨이 가장 높은 함량 (29,948.36 mg/kg)을 차지하고 있으며 칼슘 (9,211.95 mg/kg)이 주요 무기질로 검출되었다. 특히 칼륨, 칼슘, 인은 인체가 하루에 100 mg 이상의 섭취를 요구하는 다량 무기질로써 모두 100 g 중량 대비 요구량을 만족하고 있어, 무기질 함량으로 볼 때 당귀와 자소엽은 무기질 공급원으로써 잠재력이 있다고 할 수 있다(6).

Table 21. Mineral contents in *Angelica gigas* Nakai and *Perilla folium*

Mineral	Composition (mg/kg)	
	<i>Angelica gigas</i> Nakai	<i>Perilla folium</i>
P	3,774.83	2,852.23
S	957.08	1015.25
K	16,458.18	29,948.36
As	0.98	1.23
Ca	3,042.68	9,211.95
Cd	0.25	0.00
Co	0.49	0.00
Cr	2.94	0.00
Cu	17.41	1.97
Fe	753.99	64.18
Mg	2,296.30	2,837.47
Mn	66.23	47.46
Ni	9.08	1.97
Pb	0.00	0.25
Se	2.94	1.72
Ti	22.08	0.98
V	6.87	5.66
Zn	17.41	32.21
Al	1,892.81	22.13
Na	20.11	0.00
Si	824.63	0.00

Data represents the mean in triplicate.

(5) 총페놀 분석 : 당귀와 자소엽에 페놀화합물은 자연계에 많이 존재하는 성분으로 이들의 주요 역할은 유리된 라디칼을 제거하는 것이라는 연구가 보고되고 있으며, 또한 이러한 페놀성 화합물인 플라보노이드나 페놀산 및 안토시아닌 등의 총량인 총 페놀 함량은 DPPH 라디칼 소거활성과 같은 항산화활성에 중요한 인자로 작용을 한다. 당귀와 자소엽의 추출물에서 발견되는 총페놀 함량을 측정된 결과 2.34 g/100 g 및 1.74 g/100 g으로 각각 나타났다(Table 22).

Table 22. Total phenolic contents in *Angelica gigas* Nakai and *Perilla folium*

Sample	Total phenolic content (g/100 g)
<i>Angelica gigas</i> Nakai	2.34
<i>Perilla folium</i>	1.74

Data represents the mean in triplicate.

(6) 라디칼 소거능 분석 : 약용작물의 산화적 스트레스에 대한 효능을 확인하기 위해 당귀와 자소엽의 DPPH를 이용하여 라디칼 소거능을 측정하였다. DPPH는 짙은 보라색을 띠는 안정한 free radical로서 항산화제에 의해 환원되어 최초의 보라색에서 시간이 지날수록 점차 노란색으로 탈색되는데 이러한 기작을 이용하여 다양한 천연소재가 가지는 항산화 활성을 확인하는데 이용되고 있다(5). 본 실험에서는 당귀와 자소엽의 에탄올 용액 추출물에 대해서 항산화 효과를 DPPH의 소거활성을 측정하여 비교하였으며 그 결과는 Table 23에 나타내었다. 수용성 당귀와 자소엽 추출물의 radical 소거능은 각각 28.02%와 23.33%로 나타났다. Table 23에 나타난 높은 항산화 물질의 함량을 비추어 볼 때 당귀와 자소엽은 항산화활성을 가지는 식품소재로서의 잠재력을 가진 것으로 판단된다.

Table 23. Antioxidant capacity in *Angelica gigas* Nakai and *Perilla folium*

Sample	DPPH (%)
<i>Angelica gigas</i> Nakai	28.02
<i>Perilla folium</i>	23.33

Data represents the mean in triplicate.

(7) 비타민 C 분석 : 당귀와 자소엽에 함유된 비타민 C의 함량을 살펴본 결과를 Figure. 13과 Table 24에 나타내었다. 당귀와 자소엽이 가진 Vitamin C 함량은 100g 당 119.74 mg과 87.43 mg 으로써 수용성 비타민 중 하나인 vitamin C는 콜라겐 및 스테로이드 호르몬 합성에 영양을 미치는 인자로 알려져 있다. 일반적으로 알려진 비타민 C는 동식물에서 모두 합성되지만 사람의 몸에서는 합성이 이뤄지지 않으므로 비타민 C를 식품으로서 섭취해야 하는 비타민이다. 비타민 C는 우수한 항바이러스 활성을 가지고 있어 면역체계에 도움이 되는 식품소재가 될 것으로 판단된다.

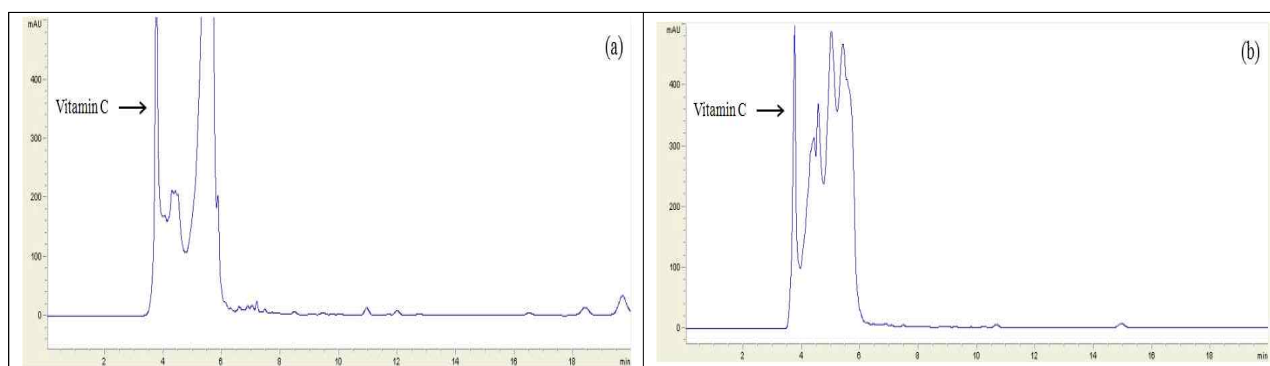


Figure. 13. Chromatogram of vitamin C in *Angelica gigas* Nakai (a) and *Perilla folium* (b)

Table 24. Vitamin C content in *Angelica gigas* Nakai and *Perilla folium*

Sample	Vitamin C content (mg/100 g)
<i>Angelica gigas</i> Nakai	119.74
<i>Perilla folium</i>	87.43

Data represents the mean in triplicate.

(8) 수용성 비타민 (나이아신) 분석 : 비색법을 통한 수용성 비타민인 나이아신을 분석하여, Table 25에 나타내었다. 영양성분 database에서 알려진 당귀에서 알려진 0.3 mg/100 g보다는 높은 함량을 보이고 있다. 자소엽은 당귀보다 낮은 나이아신 함량을 보이고 있으며 0.21 mg/100 g으로 검출되었다.

Table 25. The contents of niacin in *Angelica gigas* Nakai and *Perilla folium*

Sample	Niacin content (mg/100 g)
<i>Angelica gigas</i> Nakai	0.42
<i>Perilla folium</i>	0.21

Data represents the mean in triplicate.

(9) 지용성 비타민 (vitamin E) 분석 : 당귀와 자소엽에 함유된 vitamin E (tocopherol)을 분석한 결과를 Figure. 14에 나타내었다. Tocopherol 표준품을 이용하여 백하수오에 함유된 vitamin E의

이성질체를 정량한 결과는 Table 26에 나타내었다. 당귀에서 가장 높은 함량을 보인 tocopherol은  $\gamma$ -tocopherol (0.32 mg/100 g) 이었으며, 뒤를 이어  $\beta$ -tocopherol이 높은 함량을 나타내었다. 자소엽의 경우  $\alpha$ -tocopherol (0.20 mg/100 g)이 가장 우세한 함량을 나타내었다.

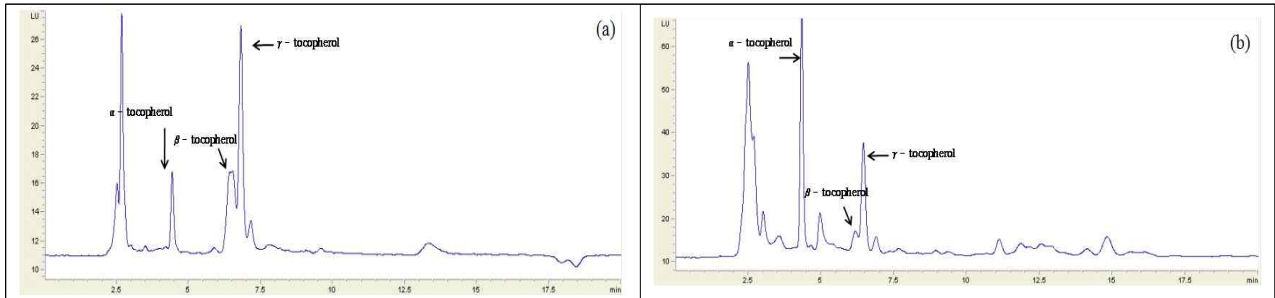


Figure. 14. Chromatogram of vitamin E (tocopherols) in *Angelica gigas Nakai* (a) and *Perilla folium* (b)

Table 26. The contents of Vitamin E in *Cynanchi wilfordii Radix*

Sample	Tocopherol content (mg/100 g)		
	$\alpha$ -tocopherol	$\beta$ -tocopherol	$\gamma$ -tocopherol
<i>Angelica gigas Nakai</i>	0.18	0.23	0.32
<i>Perilla folium</i>	0.20	0.01	0.06

Data represents the mean in triplicate.

#### 다. 약용작물(당귀, 자소엽)의 위해성 성분 검토

(1) 당귀와 자소엽의 벤조피렌 분석 : 당귀와 자소엽에 존재하는 벤조피렌을 분석한 결과를 Table 27에 나타내었다. 벤조피렌 표준품과의 결과를 비교한 결과 당귀와 자소엽에서는 벤조피렌이 존재하지 않거나 존재하더라도 극히 미량으로 분석한도 (limit of detection) 이하로 판단된다. 본 연구에 사용된 당귀와 자소엽은 가공을 거치지 않은 샘플이라 열처리가 없어 벤조피렌이 생성되는 조건에 미치지 못했을 것으로 판단된다.

Table 27. The contents of benzopyrene in *Angelica gigas Nakai* and *Perilla folium*

Sample	Benzopyrene content
<i>Angelica gigas Nakai</i>	not detected
<i>Perilla folium</i>	not detected

Data represents the mean in triplicate.

#### 라. 약용작물(당귀, 자소엽)의 휘발성 향기성분 및 관능검사

(1) 휘발성 향기성분 : GC/MS를 이용한 당귀와 자소엽의 휘발성 성분을 분석한 결과 당귀에서 총 51가지의 휘발성분이 크로마토그램(Figure. 16a)에서 검출되었고, GC/MS library를 통해서 spectrum 패턴을 통해 key flavor compounds를 동정하여 Table 16에 나타내었다. 그 중 높은 피크면적을 보이는 물질은  $\alpha$ -pinene과  $\beta$ -eudesmol로 나타났다.  $\beta$ -Eudesmol의 경우 sesquiterpene alcohol의 한 종류로써 woody odor를 가진 물질로써 약용식물 주 하나이며, Kashima 등(16)에 의해 수행된 약용식물인 *Pavonia odorata*의 주요한 향기성분중 하나로 알려져 있다. 당귀의 쓴맛에 기인하는 주요 물질 중 하나이다. 자소엽의 경우 43개의 휘발성 성분

을 확인하였고, Table 29에 나타내었으며, 크로마토그램은 Figure 17a에 나타내었다. 주요한 향기성분으로 caryophyllene과 methylbenzoate가 주된 성분으로 확인되었다. 소량이지만 hexanal도 검출되었다. 문헌에 의한 휘발성 성분에 대한 연구를 보면에서 알데하이드는 풀내음(green note)을 나타내는 탄소 화합물(ex. hexanal)로써 세포벽의 주요성분인 불포화 지방산 linoleic acid에서 lipoxygenase pathway에 의한 생합성 경로에 의해 생성된다. 약용식물의 향기성분 추출을 위해 파쇄과정에서 세포가 파괴되어 유리된 chloroplast의 세포벽성분들인 linoleic acid에서 생성된 리놀렌산 과산화물(13-hydroperoxide linoleic acid)가 생성되며, 다시 분해효소에 의해 분해되어 생성된다. 본 연구에서는 linoleic acid함량을 전체 지방산 중 64%로 보고되어 (Table 29) linoleic acid가 가지는 과산화물 생성을 예측할 수 있었다.

Table 29. Volatile compounds in *Angelica gigas* Nakai

NO	Compounds	Ret. Time(min)	RI	Area(10 <sup>6</sup> )
1	Isononane	10.303	879.70	36.97
2	Nonane	11.671	919.33	1523.03
3	$\alpha$ -Pinene	12.885	956.85	3835.88
4	Camphene	13.263	967.81	561.51
5	Butylbenzene	13.404	971.82	28.38
6	$\alpha$ -Pyronene	13.941	986.72	284.01
7	Sabinene	14.047	989.59	56.24
8	2- $\beta$ -Pinene	14.160	992.63	181.83
9	(+)-2-Carene	14.310	996.62	3.97
10	$\beta$ -Myrcene	14.617	1006.26	242.38
11	$\alpha$ -Terpinene	14.911	1016.38	13.36
12	1-Phellandrene	15.051	1021.12	139.73
13	(+)-3-Carene	15.227	1027.03	39.47
14	p-Cymene	15.604	1039.45	1.49
15	o-Cymene	15.717	1043.12	132.53
16	Limonene	15.904	1049.13	824.86
17	trans- $\beta$ -Ocimene	16.090	1055.04	53.99
18	cis- $\beta$ -Ocimene	16.425	1065.50	83.04
19	$\gamma$ -Terpinene	16.777	1076.28	56.14
20	2-Methyl-decane	16.861	1078.81	17.79
21	$\alpha$ -Terpinolene	17.693	1104.18	24.68
22	Undecane	18.003	1115.41	235.46
23	cis- $\beta$ -Terpineol	18.783	1142.82	10.31
24	$\alpha$ -Campholenal	18.878	1146.09	53.43
25	Pinocarvone	19.999	1183.38	35.31
26	$\beta$ -Citronellol	20.258	1191.69	34.96
27	Butyl ester hexanoic acid	20.669	1205.75	30.66
28	2-Pinen-4-one	21.399	1233.32	51.33
29	$\alpha$ -Campholenic acid methyl ester	22.139	1260.32	12.36
30	2-Methylbutyl ester hexanoic acid	22.397	1269.52	84.70
31	(S)-(-)-Methyl ester Citronellic acid	22.633	1277.85	39.83
32	Tridecane	23.714	1317.78	502.60
33	$\alpha$ -Ylangene	25.703	1394.05	27.57
34	Copaene	25.832	1398.79	22.28
35	Myrcenylacetat	26.076	1408.92	111.61
36	$\beta$ -elemene	26.236	1415.64	120.46

37	Caryophyllene	26.995	1446.96	80.78
38	$\gamma$ -Elemene	27.281	1458.53	101.15
39	cis- $\beta$ -Farnesene	27.800	1479.22	304.29
40	Zingiberene	28.138	1492.49	22.61
41	trans-7-Pentadecene	28.309	1499.15	35.01
42	$\beta$ -Bisabolene	29.829	1564.47	439.19
43	$\gamma$ -Gurjunene	30.246	1581.85	12.82
44	Elemol	30.787	1604.49	19.00
45	Germacrene B	30.852	1607.43	8.05
46	$\alpha$ -Amorphene	30.996	1613.92	39.68
47	(E,Z)- $\alpha$ -Farnesene	31.509	1636.79	17.73
48	Guaiol	32.218	1667.80	23.54
49	$\gamma$ -Cadinene	32.316	1672.04	6.83
50	$\alpha$ -Selinene	32.399	1675.61	9.31
51	$\gamma$ -Eudesmol	33.623	>1700	2202.64

Table 30. Volatile compounds in *Perilla folium*

NO.	Compounds	Ret. Time(min)	RI	Area(10 <sup>6</sup> )
1	Hexanal	8.168	815.72	4.07
2	2-Hexanal	9.997	871.39	1.33
3	$\alpha$ -Thujene	12.448	943.77	1.50
4	$\alpha$ -Pinene	12.676	950.65	85.11
5	Camphene	13.180	965.43	2.66
6	Benzaldehyde	13.623	977.97	17.82
7	Sabinene	14.017	988.78	16.98
8	2- $\beta$ -Pinene	14.124	991.66	93.37
9	6-Methyl-5-hepten-2-one	14.468	1001.05	12.18
10	$\beta$ -Myrcene	14.576	1004.83	14.57
11	$\alpha$ -Fenchene	15.424	1033.56	0.58
12	D-Limonene	15.950	1050.60	1677.64
13	$\gamma$ -Terpinene	16.765	1075.91	1.25
14	3,5-Octadien-2-one	17.154	1087.57	5.81
15	$\alpha$ -Terpinolene	17.687	1103.96	9.23
16	Linalool	18.068	1117.74	77.70
17	cis-Limonene oxide	19.076	1152.83	3.27
18	3-Cyclohexene-1-methanol	20.871	1213.47	8.57
19	trans-1,2-Dihydroperillaldehyde	21.134	1223.42	19.52
20	Santolina triene	21.640	1242.21	23.14
21	Methylbenzoate	23.606	1313.45	3673.27
22	Bicycloelemene	24.798	1360.11	105.39
23	trans-Shisool	25.326	1380.06	2.55
24	Aromadendrene	25.704	1394.09	4.70
25	$\alpha$ -Copaene	25.828	1398.64	60.44
26	$\beta$ -Bourbonene	26.094	1409.68	22.18
27	$\beta$ -elemene	26.261	1416.68	95.33
28	Alloaromadendrene	26.677	1433.94	14.43
29	Caryophyllene	27.347	1461.18	4582.17
30	$\alpha$ -Humulene	27.934	1484.50	484.69
31	(E)-Farnesene	28.373	1501.63	28.77

32	Germacrene	28.609	1510.72	258.05
33	trans- $\gamma$ -Bisabolene	30.141	1577.49	30.31
34	$\alpha$ -Parchoulene	30.341	1585.77	4.59
35	$\alpha$ -Guaiene	30.633	1597.76	24.29
36	cis- $\gamma$ -Sesquicyclogeraniol	30.766	1603.54	3.70
37	$\alpha$ -Bulnesene	30.893	1609.28	8.02
38	$\alpha$ -Patchoulene	31.650	1643.02	480.22
39	Farnesol	33.444	>1700	9.25
40	d-Nerolidol	33.689	>1700	9.76
41	Alloaromadendrene oxide	34.208	>1700	6.15
42	Valerenol	34.873	>1700	5.94
43	Vulgarol B	36.315	>1700	2.98

(2) 후각검사 : GC/MS와 olfactory를 이용하여 실험자의 후각기능을 통해 직접 향을 분석하였고, aroma-gram을 나타내었다 (Figure. 16b). 전체적으로 실험자가 향을 강하게 느끼는 구간은 17분~22분 구간으로 나타났다. 첫 구간에서 동정된 향기성분은 fruit-odor을 가진 2-pentyl furan, 두 번째 구간에서 동정된 주된 향기성분은 linomene이 인간의 후각에서 가장 강하게 반응하는 피크로 생각되어진다. 상대적인 함량이 높은 hydrocarbon이 검출되는 구간에서의 실험자의 반응은 매우 낮았다. 자소엽의 경우 16분~24분에서 높게 후각인식이 발견되었다. 크로마토그램에서 역시 본 시간대에서 가장 두드러지는 휘발성 성분의 검출이 확인되었고, Caryophyllene와 Methylbenzoate가 함량으로 볼 때 가장 높게 나타났다. 자소엽의 높은 불포화도에 비해서는 휘발성 성분의 함량이 크지 않으며, malodor 역시 눈에 띄는 물질도 확인되지 않았다.

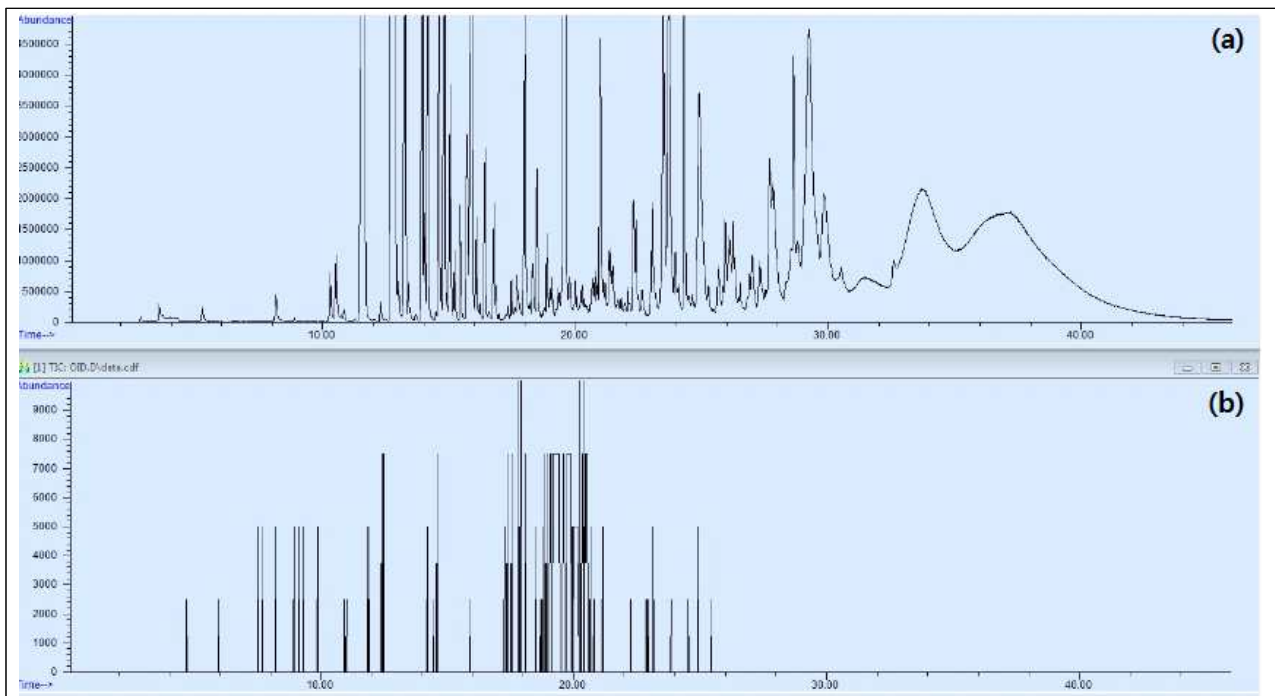


Figure. 16. Chromatogram of volatile compounds and aromagram in *Angelica gigas* Nakai (a) chromatogram for volatile compounds and (b) aromagram by the sniffing test.



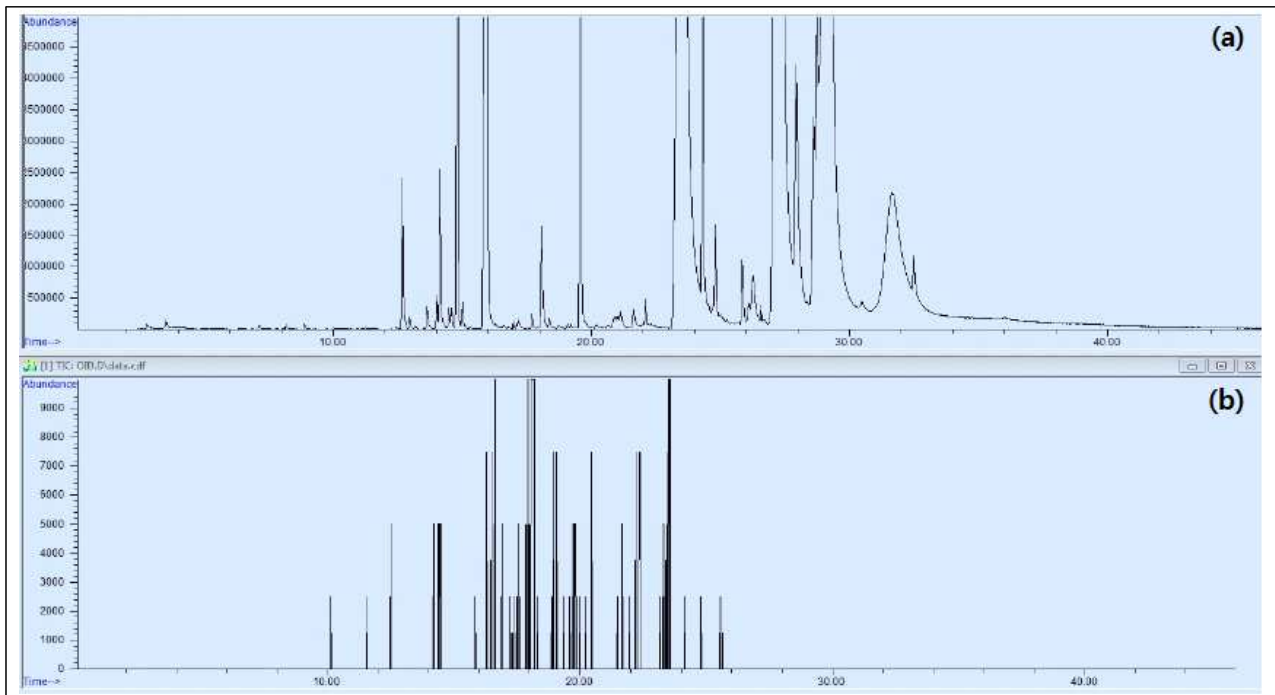


Figure. 17. Chromatogram of volatile compounds and aromagram in *Perilla folium* (a) chromatogram for volatile compounds and (b) aromagram by the sniffing test.

(3) 약용작물의 기능성 식품소재로의 관능검사 : 당귀와 자소엽의 음료(차)로서의 잠재력을 확인하기 위해 관능검사를 실시하였고, 차의 기호성을 비교하기 위해 녹차를 비교대상으로 실험을 실시하였다(Figure. 18). 관능적인 부분에서 약용식물의 특징적인 부분인 쓴맛의 강도가 매우 중요한 부분으로 대두 되었다. 8가지 항목을 비교해 볼 때 전체적인 선호도에서는 당귀보다는 녹차에 대한 선호도가 높게 나타났다(Figure. 18a). 선호도가 녹차에 비해 낮은 관능적 부분은 단맛을 줄 수 있는 부재료의 첨가로써 당귀차가 가지는 단점을 보완해야 할 것으로 판단된다. 당귀를 부재료와의 부합으로 인해 개선되는 관능성에 대한 시도는 차기 연구에서도 진행될 것으로 계획하고 있다. 자소엽은 당귀에 비해서는 관능적인 평가에서 쓴맛이 적게 나타났고, 짠맛과 신맛이 녹차에 비해서 더 나은 수치를 보이고 있다. 또한 짠맛도 낮음을 확인하였으나 단맛에서는 녹차가 더욱 우수한 것으로 응답률을 보이고 있다. 자소엽의 향기성분에서도 일반적으로 녹차에서 느끼는 향기와 비교할 때 큰 거부감이 나타나지 않았다. 문헌의 연구에서도 녹차의 향기성분을 보고하면서, 녹차의 주요한 향기성분이 hexanal과 butanal에 기인된다고 보고하였고, 이러한 식물소재의 향기성분들은 재배지역과 채취시기에 따라서 변이가 크다고 보고한 점을 볼 때 당귀와 자소엽의 휘발성 성분에 의한 맛의 기호도는 재배지역이나 채취시기에 따른 변이가 있을 것으로 판단된다.

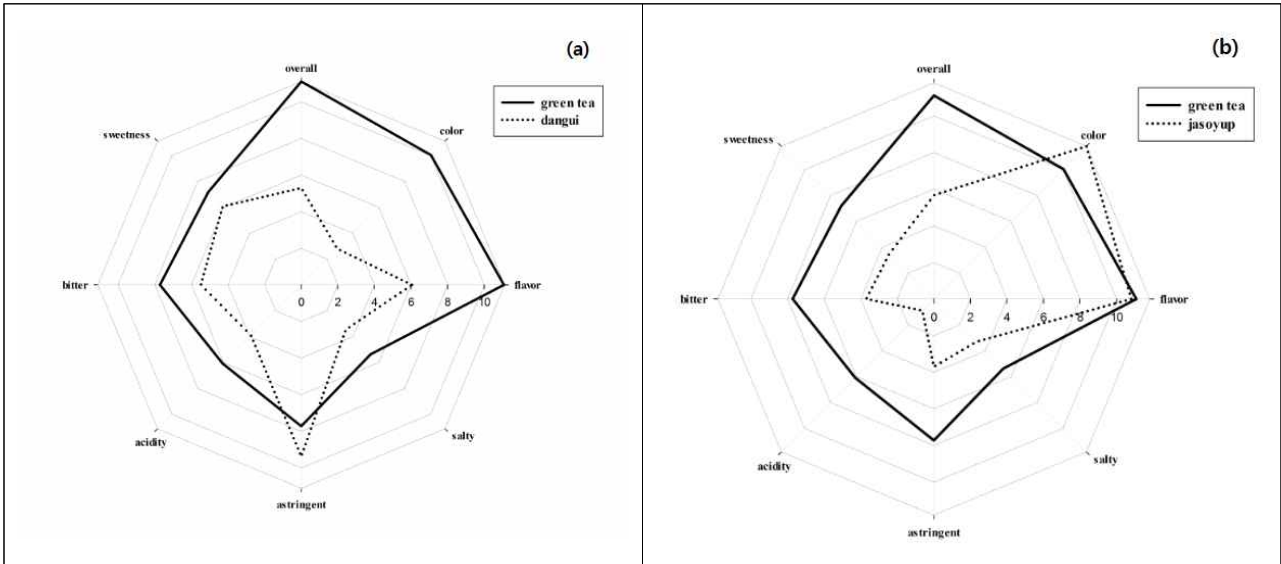


Figure. 18. Consumer acceptance of *Angelica gigas* Nakai (a) *Perilla folium* (b) Dot line (---) represents *Angelica gigas* Nakai (a) *Perilla folium* and line (—) represents a commercial green tea as control

### 3-1. 3차년도 연구수행 방법

#### 가. 열처리 공정에 따른 약용작물의 일반 영양성분 및 특수 영양성분 검토

##### (1) 재료 및 방법

(가) 실험재료 및 시약 : 본 연구에서 사용된 약용식물은 산청 생약농업협동조합을 통해 재배 및 반건조된 것을 구입하였으며, 실험에 사용된 약용식물 샘플은 건조기에서 60°C에서 충분히 열풍건조 시켜 수분을 제거한 후 분쇄기와 체를 이용하여 50 mesh 입도로 파쇄하여 연구에 사용하였다. 표준품 및 시약은 1차년도와 동일하게 사용하였다.

(나) 약용식물 가공처리 : 약용식물을 200°C로 예열된 팬에 볶음처리를 진행하여 2분, 3분, 4분, 그리고 5분간 볶음처리를 행한 샘플을 실험에 사용하였고, 볶음처리를 하지 않은 시료는 대조군으로써 비교하였다.

(2) 성분 분석 : 1차년도와 동일하게 수행하였다.

#### 나. 약용작물(당귀, 자소엽)의 벤조피렌 분석

(1) 벤조피렌 분석 : 1차년도와 동일하게 수행하였다.

#### 다. 약용작물(당귀, 자소엽)의 휘발성 향기성분 및 관능검사

(1) 휘발성 향기성분 분석 : 1차년도와 동일하게 수행하였다.

(2) 관능검사 : 1차년도와 동일하게 수행하였다.

### 3-2. 3차년도 연구결과

#### 가. 성분 분석

(1) 구성아미노산 분석 : 도라지의 볶음처리별 구성아미노산의 구성은 Table 32 및 Figure 33에 나타내었다. 도라지의 아미노산 조성을 보면 glutamic acid가 가장 높은 비율을 차지하고 있고, 그 다음으로 arginine이 차지하고 있다. 열처리에 따른 변화를 볼 때 상대적인 비율을 보면 glutamic acid가 35.61%에서 42.56%까지 증가함을 확인할 수 있었고, arginine이 가장 손실율이 낮게 확인되었다. 영양성분의 분포의 다양함을 볼 때 가공처리에 따른 영양성분의 변화를 확인하는데, 중요한 결과로 판단된다.

Table 32. Structural amino acids in *Platycodon autumnole* Decne.

Structural amino acid(%)	Roasting time(min)				
	0	2	3	4	5
Aspartic acid	7.16	7.17	5.86	7.16	7.56
Threonine	3.40	4.35	4.58	4.09	4.44
Serine	3.92	4.82	6.04	4.56	5.33
Glutamic acid	35.61	44.04	41.10	42.63	42.56
Glycine	2.43	3.35	2.33	3.63	3.74
Alanine	3.70	3.59	2.48	3.88	4.00
Valine	4.94	6.79	11.46	9.56	6.88
Methionine	1.37	0.79	1.21	2.77	0.90
Isoleucine	1.51	2.37	2.06	2.37	2.53
Leucine	3.42	6.21	8.56	6.70	6.62
Phenylalanine	6.23	9.08	10.15	7.10	7.27
Lysine	5.62	1.60	1.40	1.35	1.45
Ammonia	2.69	2.65	2.64	2.29	2.79
Histidine	2.83	0.71	1.80	1.37	2.24
Arginine	15.18	2.49	0.91	0.53	1.70

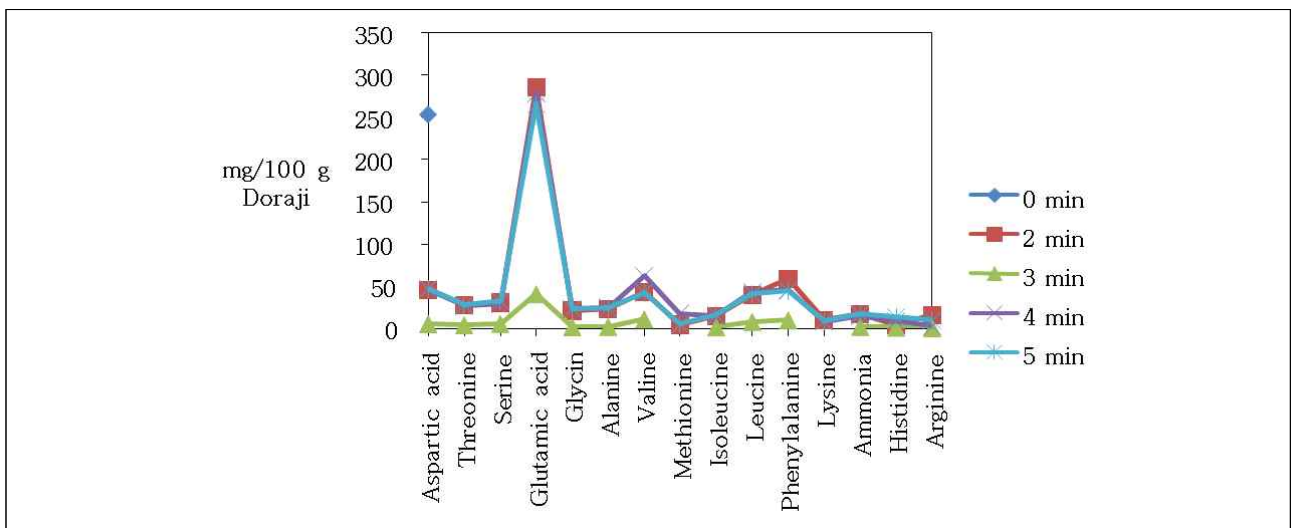


Figure 20. Structural amino acids in *Platycodon autumnole* Decne.

(2) 유리아미노산 분석 : 도라지의 볶음처리별 유리아미노산의 구성은 Table 2 및 Figure 21에 나타내었다. 도라지에 존재하는 유리아미노산을 볼 때 alanine과 arginine이 높은 비율을 차지하고 있었다. 유리아미노산은 일반적으로 단백질을 구성하지 않는 아미노산을 말하며, 자연

계에서 소량으로 존재하는 아미노산을 말한다. 본 연구에서 열처리 후에 존재하는 유리아미노산을 보면 대부분이 열처리 과정에서 제거가 되었으며, ethanolamine과 ammonia 그리고 소량의 glycine만이 존재하였다. 열처리 과정은 대부분의 유리 아미노산을 제거할 수 있는 공정으로 판단된다.

Table 33. Free amino acids in *Platycodon autumnole* Decne.

Free amino acid(%)	Roasting time(min)				
	0	2	3	4	5
Aspartic acid	0.80				
Threonine	7.05				
Serine	5.57		1.36		
Glutamic acid	8.04				
Glycine	1.45	3.85	4.08	2.96	3.73
Alanine	18.21	4.00	2.51		
Valine	10.41		16.95		
Cysteine	5.15				
Methionine	2.64				
Isoleucine	1.92				
Leucine	1.27				
Tyrosine	0.67				
GABA	5.71				
Ethanolamine	10.13	83.69	52.38	73.84	87.20
Ammonia	2.78	8.46	22.71	23.20	9.07
Histidine	1.13				
Arginine	17.05				

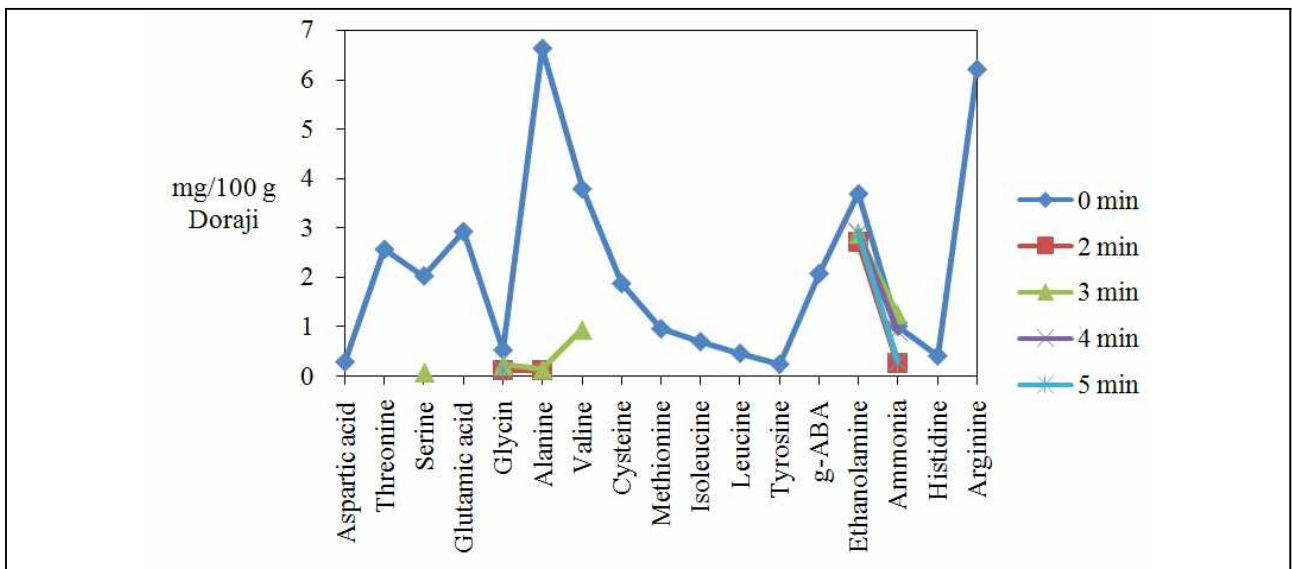


Figure 21. Free amino acids in *Platycodon autumnole* Decne.

(3) Total phenols 분석 : 도라지의 볶음처리별 총페놀함량의 구성은 Table 34 및 Figure 22에 나타내었다. 도라지의 총페놀 함량은 열처리 이전에는 0.02 mg/mL의 함량으로 나타났으며, 볶음처리를 거치는 동안 0.20에서 0.24 mg/mL까지 증가함을 보여주었다. 이러한 증가는 본래 함량의 증가라기보다는 결합된 형태에서 열처리에 의해서 용출되기 쉬운 형태로의 전환으로 인

해 이러한 결과가 나온 것으로 판단된다. 이러한 결과를 통해서 항산화성과 연관이 깊은 총페놀 함량의 증가는 열처리 과정을 통해서 증가시킬 수 있다고 판단된다.

Table 34. Total phenolic compounds in *Platycodon autumnole* Decne.

TPC(mg/mL)	Roasting time(min)				
	0	2	3	4	5
<i>Platycodon autumnole</i> Decne.	0.02 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.21 ± 0.00	0.24 ± 0.00	0.21 ± 0.00

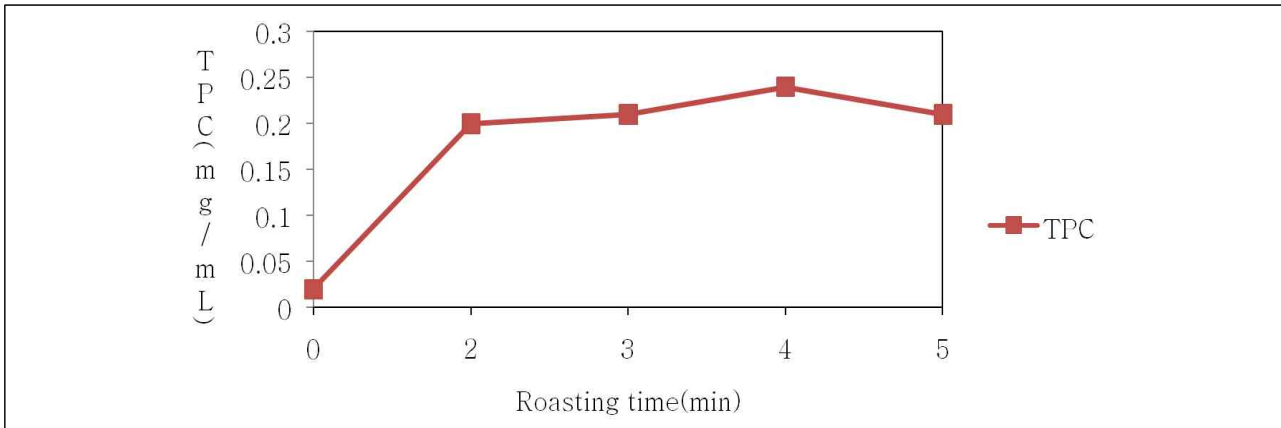


Figure 22. Total phenolic compounds in *Platycodon autumnole* Decne.

(4) 라디칼 소거능 분석 : 도라지의 볶음처리별 라디칼 소거능은 Table 35 및 Figure 23에 나타내었다. 도라지의 라디칼 소거능은 항산화 활성을 의미하는 것으로 DPPH법을 통하여 확인한 결과, 열처리 이전에는 1.51%로 매우 낮은 활성을 나타내었으나, 열처리 이후 18.53%에서 최대 21.56%까지 증가함을 확인할 수 있었다. 이러한 활성의 차이는 앞서 설명한 총페놀 함량의 증가와 유사한 패턴을 보이고 있으며, 총페놀 함량의 증가를 통해서 적절한 열처리를 통해서 항산화 활성이 증가된 식품소재로의 이용이 가능할 것으로 판단된다.

Table 35. Radical scavenging activity in *Platycodon autumnole* Decne.

DPPH(%)	Roasting time(min)				
	0	2	3	4	5
<i>Platycodon autumnole</i> Decne.	1.51 ± 0.63	18.73 ± 0.28	19.92 ± 0.45	21.56 ± 0.34	18.53 ± 0.32

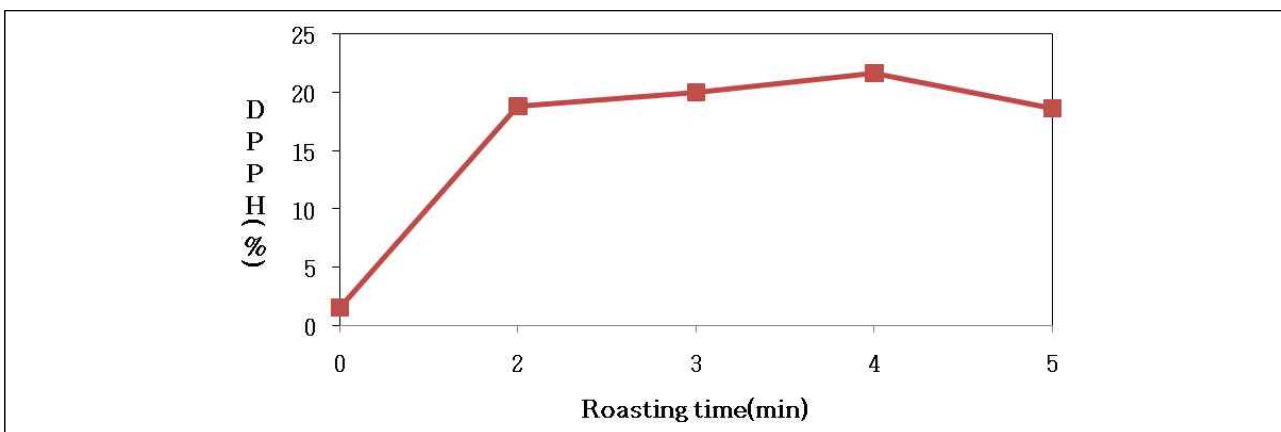


Figure 23. Radical scavenging activity in *Platycodon autumnole* Decne.

(5) 벤조피렌 분석 : 도라지의 볶음처리 전 후의 벤조피렌 함량 분석은 Figure 24에 나타내었다. 벤조피렌은 1급 발암물질로 분류되며 주로 식품의 열처리과정을 통해서 생성되는 경우가 빈번하여, 열처리 식품 및 식품소재에서 매우 중요한 요소로 알려져 있다. 도라지의 경우 열처리 이전의 경우와 열처리 후의 크로마토그램을 확인했을 때 특이한 차이를 발견할 수 없었으며, 이러한 결과를 토대로 볼 때 5분간의 열처리로는 벤조피렌의 생성에 대한 우려는 없다고 판단된다.

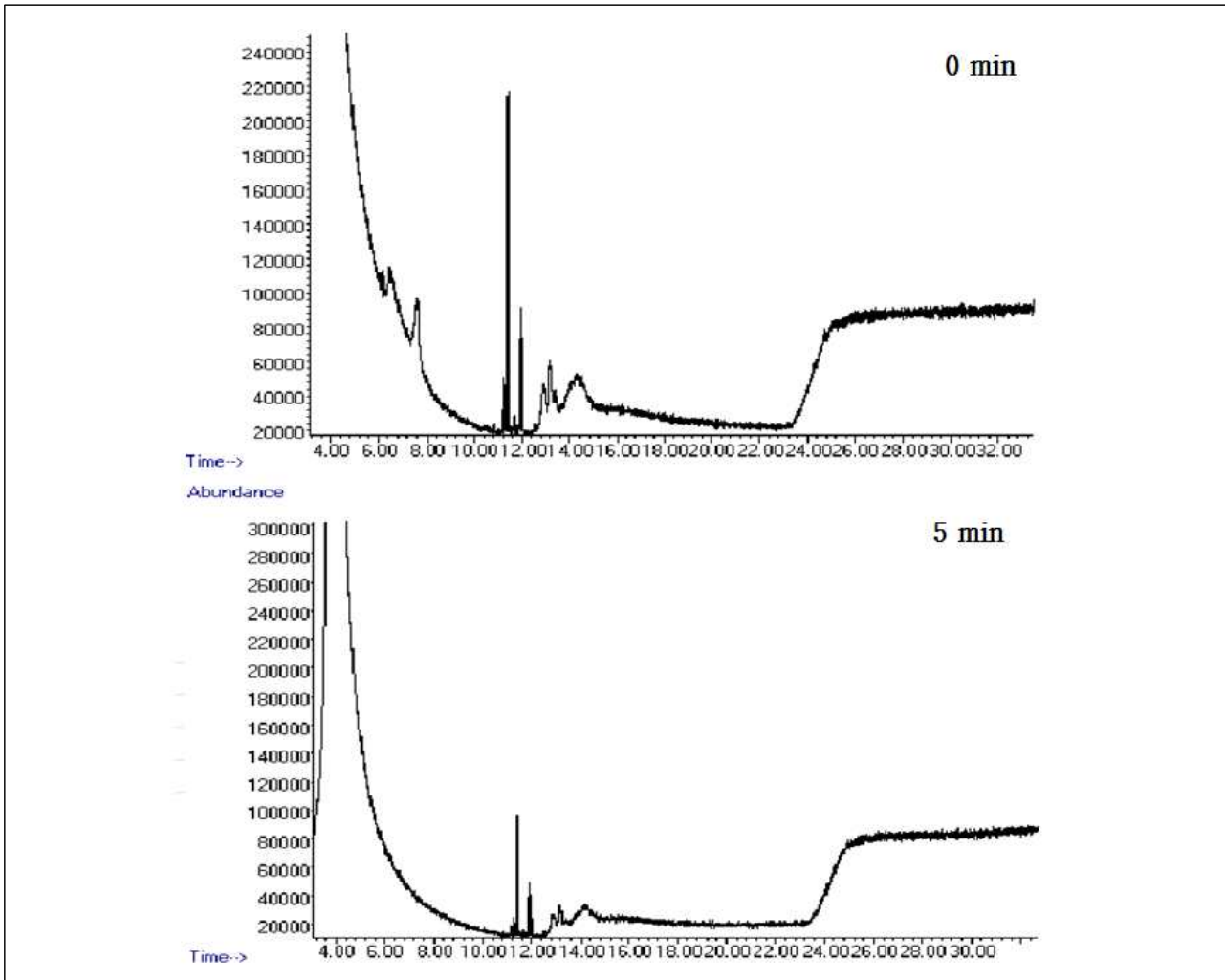


Figure 24. Measurement of benzopyrene content in *Platycodon autumnole* Decne.

(6) 휘발성 향기성분 및 후각검사 (Olfactory) : 도라지의 볶음처리별 휘발성 향기성분 및 후각검사는 Figure 25-29와 Table 36-40에 나타내었다. 열처리 이전의 도라지가 가지는 향기성분을 살펴보면,  $\alpha$ -curcumene이 전체의 18.73%를 차지하고 있으며, tetradecane과 tridecane이 각각 15.19%와 13.41%를 차지하고 있다. Sniffing test에 의해서 확인된 휘발성 성분은 1, 6-octadien-3-ol, nonanal, (+)-2-bornanone, endo-borneol, menthol, dodecane 등이 확인되었다. 높은 비율을 가진  $\alpha$ -curcumene은 sniffing test에서는 확인되지 않았다. 2분간의 열처리 과정을 통해서 확인된 향기성분을 보면 가열전의 향기성분과는 전혀 다른 패턴을 보이는데, 35개의 동정된 향기성분 중 15종이 pyrazine 계열의 물질로 확인되었다. 이러한 pyrazine 계열의 물질은 열처리 과정을 통해서 주로 생성되는 성분이며, 2분간의 열처리를 통해서도 충분히 생성됨을 확인할 수 있었다. 특히 3-ethyl-2, 5-dimethyl-pyrazine은 전체의 22.10%의 비율을 차지하는 물질로 확인되었다. 3분 동안의 열처리를 통해서 확인된 휘발성 성분의 패턴은 2분 동안 진행된 열처리에서 확인된 결

과가 크게 다르지 않았으며, 3-ethyl-2, 5-dimethyl-pyrazine이 전체의 26.67%의 비율을 차지하였다. 그리고 pyrazine 계열의 물질이 아닌 성분은 일부의 hydrocarbon 물질들이 차지하고 있었다. 4분간의 열처리를 통해 확인된 성분에서는 3-ethyl-2, 5-dimethyl-pyrazine이 전체의 23.79%의 높은 비율과 함께 5-hydroxymethylfurfural의 생성이다. 5-hydroxymethylfurfural은 주로 Maillard reaction에서 주로 발생하는 성분으로 Maillard reaction은 당과 단백질의 결합을 통해서 일어나는 식품의 주요한 갈변반응 중 하나로 알려져 있으며, 4분간의 열처리를 통해서 이러한 물질의 함량을 확인할 수 있었다. 5분 동안의 열처리를 통해서 28개의 휘발성 성분이 확인되었고, 이러한 함량은 4분까지의 열처리 과정에서 발생하는 향기성분보다는 적은 수이며, pyrazine 계열의 물질이 대폭 감소하는 결과를 확인하였다. 5-(Hydroxymethyl)-2-furancarboxaldehyde의 물질이 33.56%로 가장 높은 비율을 보였고, aldehyde와 ketone같은 저분자 물질의 형성이 증가하였다. 열처리 시간에 대한 휘발성 향기성분의 결과를 토대로 볼 때 5분 이상의 열처리 과정은 휘발성 성분에 대해서는 긍정적이지 않음을 확인할 수 있었다. 또한 sniffing test에서도 aldehyde와 ketone같은 저분자 물질에서 주로 향기성분이 확인되었다.

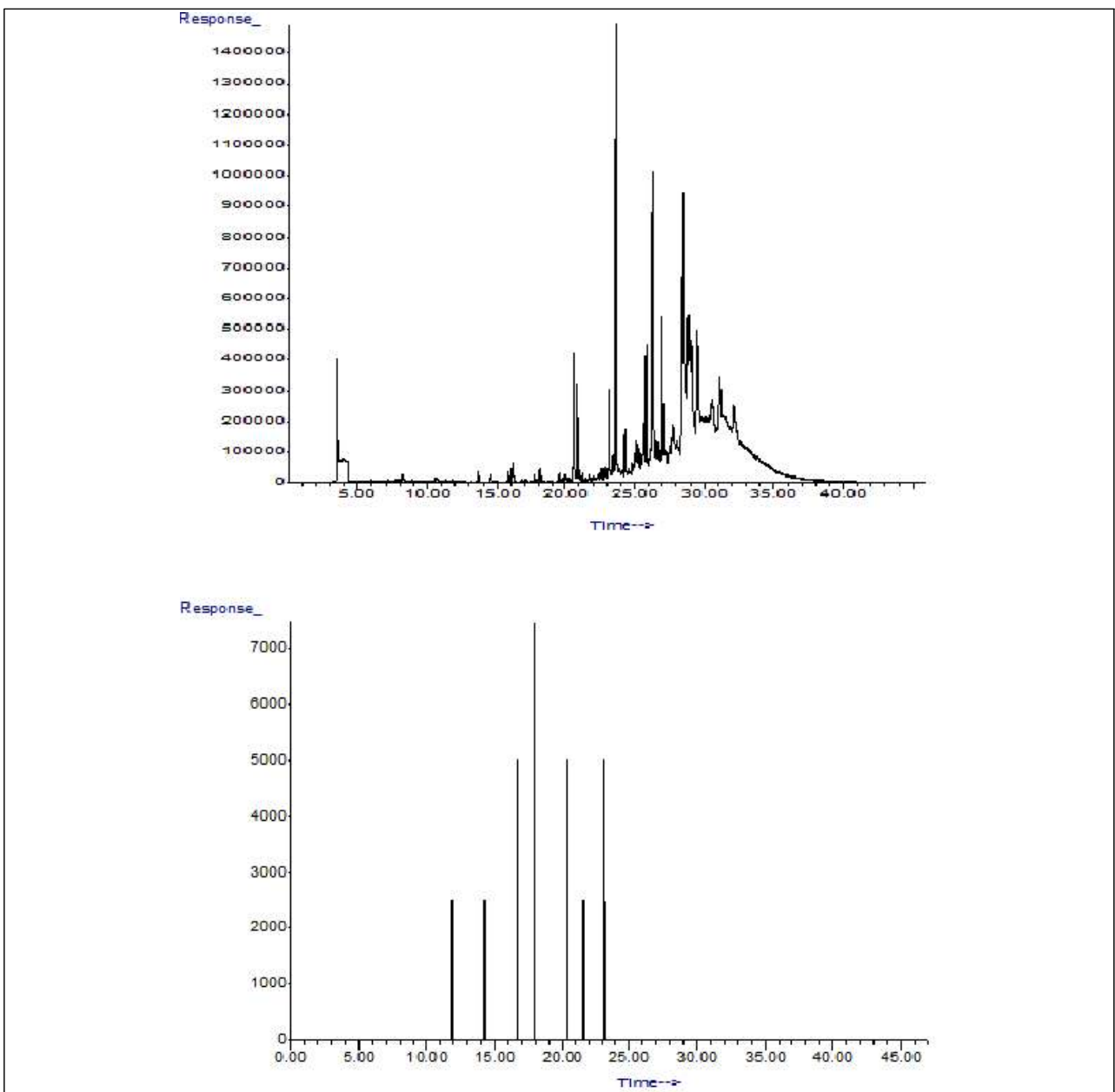


Figure 25. Total ion chromatogram and aroma-gram of *Platycodon autumnole* Decne. at 0 min

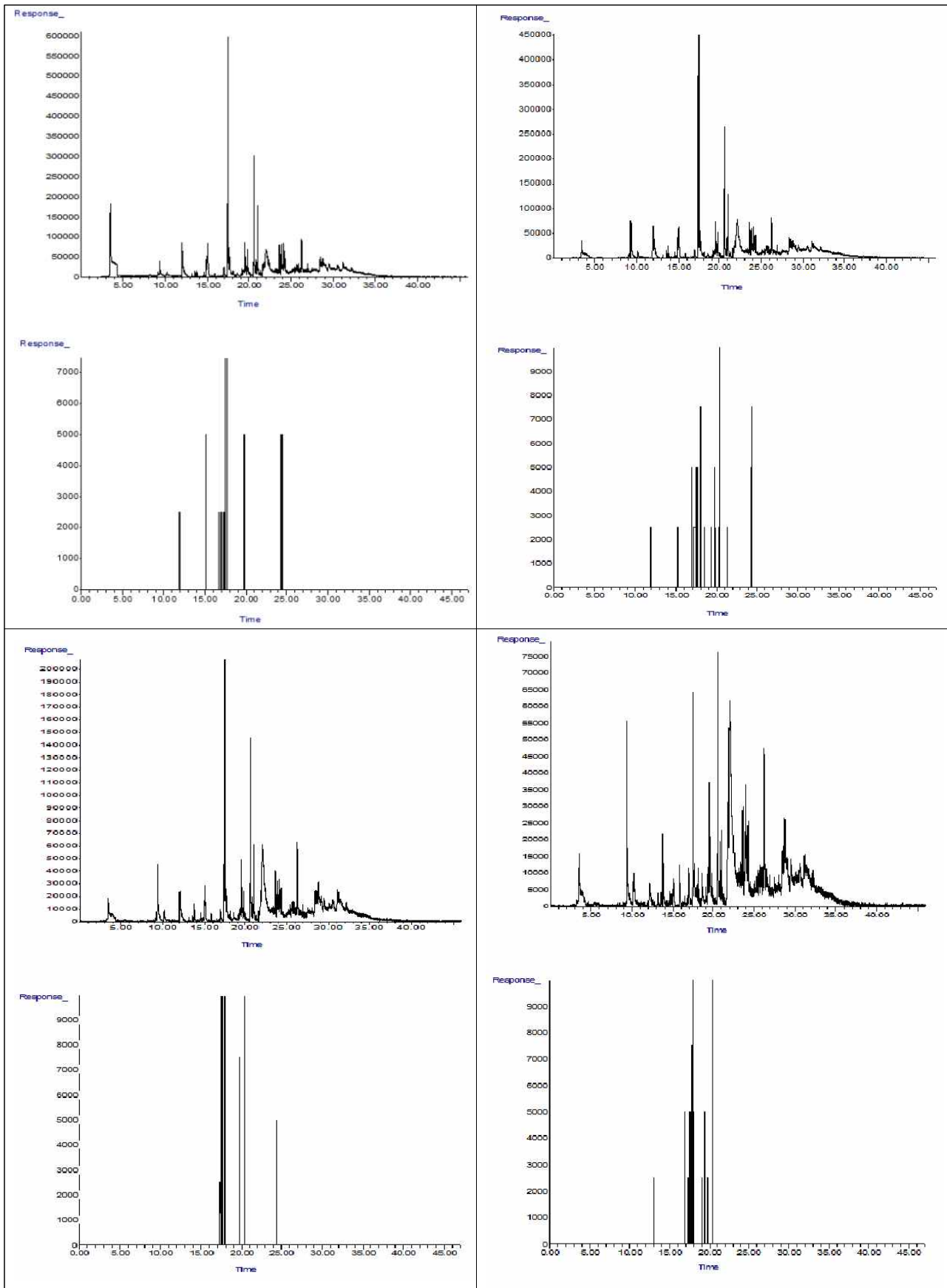


Figure 26. Total ion chromatogram and aroma-gram of *Platycodon autumnale* Decne. at 2 min, 3 min, 4 min and 5 min.



Table 36. Volatile compounds and sniffing tests of *Platycodon autumnole* Decne. at 0 min

NO.	Compounds	Retention Time(min)	RI	compound (ug/100g)	%	ODP intensity
1	Hexanal	8.201	817	0.25	0.16	
2	Benzaldehyde	13.649	979	0.63	0.40	1
3	Sabinene	15.835	1047	0.64	0.41	
4	1, 8-Cineole	15.926	1050	0.36	0.23	
5	Benzyl alcohol	16.098	1055	1.63	1.04	1
6	2, 3, 4, ,5 Tertramethyl pyrazine	17.683	1104	0.33	0.21	
7	Undecane	17.957	1114	0.14	0.09	
8	1, 6-Octadien-3-ol	18.043	1117	0.42	0.27	3
9	Nonanal	18.140	1120	0.50	0.32	4
10	(+)-2-Bornanone	19.462	1166	0.34	0.22	3
11	endo-Borneol	20.115	1187	0.22	0.14	4
12	Menthol	20.269	1192	0.16	0.10	3
13	Dodecane	20.881	1214	3.85	2.46	4
14	Decanal	21.093	1222	0.46	0.30	2
15	2, 6-Dimethyl undecane	22.340	1268	0.21	0.14	
16	10-Methylnonadecane	22.649	1278	0.60	0.39	
17	2, 6, 10, 15, 19, 23-Hexamethyl tetracosane	22.890	1287	0.65	0.41	
18	Methylbenzoate	23.130	1295	4.34	2.78	
19	Anethole	23.405	1305	1.09	0.70	
20	Safrole	23.508	1310	1.20	0.77	
21	Tridecane	23.651	1315	20.96	13.41	
22	Heneicosane	24.108	1333	0.39	0.25	1
23	$\alpha$ -Cubebene	25.104	1372	1.40	0.90	
24	Butyldodecyletetetredecanesulfuro usacid	25.482	1386	1.29	0.83	
25	$\alpha$ -Ylangene	25.711	1394	1.50	0.96	
26	Copaene	25.831	1399	6.09	3.90	
27	$\beta$ -Bourbonene	26.083	1409	1.00	0.64	
28	Tetradecane	26.277	1417	23.74	15.19	
29	Cedrene	26.844	1441	0.87	0.56	
30	Caryophyllene	26.992	1447	8.40	5.38	
31	$\beta$ -Copaene	27.210	1456	0.77	0.49	
32	1-Octadecanesulphonyl chloride	27.576	1470	0.18	0.12	
33	$\beta$ -Famesene	27.710	1476	2.59	1.66	
34	trans- $\alpha$ -Bisabolene	27.839	1481	3.09	1.98	
35	$\alpha$ -Curcumene	28.474	1506	29.28	18.73	
36	Zingiberene	28.789	1520	14.32	9.16	
37	$\beta$ -Bisabolene	29.104	1534	10.85	6.94	
38	$\beta$ -Sesquiphellandrene	29.521	1551	11.47	7.34	
39	1, 54-Dibromo-tetrapentacontane	29.756	1561	0.10	0.06	

Table 37. Volatile compounds and sniffing tests of *Platycodon autumnole* Decne. at 2 min

NO.	Compounds	Retention Time(min)	RI	compound (ug/100g)	%	ODP intensity
1	Methyl-pyrazine	9.111	846	0.20	0.54	
2	2-Furancarboxaldehyde	9.346	853	0.57	1.53	
3	2, 5-Dimethyl-furan	9.454	856	0.02	0.06	
4	2-Furanmethanol	10.187	877	0.13	0.36	
5	2, 5-Dimethyl-pyrazine	11.961	929	0.53	1.42	
6	2, 6-Dimethyl-pyrazine	12.001	930	1.39	3.74	1
7	5-Methyl-2-furancarboxaldehyde	13.763	982	0.21	0.57	
8	2-Pentyl-furan	14.610	1006	0.10	0.28	
9	2-ethyl-6-methyl-pyrazine	14.885	1015	0.65	1.75	
10	Trimethyl-pyrazine	15.000	1019	1.37	3.69	3
11	2-Ethyl-3-methyl-pyrazine	15.056	1021	1.06	2.86	
12	3-Ethyl-2, 5-dimethyl-pyrazine	17.414	1095	8.22	22.10	1
13	2-Ethyl-3, 5-dimethyl-pyrazine	17.591	1100	1.83	4.93	4
14	2-Methyl-6-(1-propenyl)-pyrazine	18.043	1117	0.10	0.28	
15	2-Isobutyl-3-methylpyrazine	19.113	1154	0.34	0.90	
16	2, 3-Diethyl-5-methyl-pyrazine	19.708	1174	0.32	0.87	
17	3, 5-Diethyl-2-methyl-pyrazine	19.777	1176	0.54	1.45	
18	3, 5(3, 6)-Dimethyl-2-n-propylpyrazine	19.868	1179	0.88	2.37	3
19	1-D3-Methyl-2-pyridithione	20.807	1211	0.06	0.16	
20	Dodecane	20.887	1214	0.60	1.62	
21	2, 5-Dimethyl-3-(2-methyl propyl)-pyrazine	21.047	1220	2.32	6.23	
22	3-Methyl-2-furoic acid	21.865	1250	0.37	1.00	
23	5-(Hydroxymethyl)-2-furancarboxaldehyde	21.968	1254	4.15	11.16	
24	Tridecane	23.633	1315	1.17	3.15	
25	2-Butyl-3, 5-dimethyl-pyrazine	23.868	1324	2.71	7.30	
26	5-Aceroxymethyl-2-furaldehyde	23.988	1329	0.69	1.85	
27	Dodecamethyl-cyclohexasiloxane	24.291	1341	0.65	1.75	3
28	Ylangene	25.705	1394	0.33	0.90	
29	$\alpha$ -Copaene	25.831	1399	0.40	1.07	
30	(cis)-2-Nonadecene	26.048	1408	0.40	1.08	
31	Tetradecane	26.254	1416	2.08	5.58	
32	Caryophyllene	26.981	1446	0.49	1.33	
33	1-(1, 5-Dimethyl-4-hecenyl)-4-methyl-benzene	28.457	1506	0.96	2.58	
34	Zingiberene	28.778	1520	0.96	2.59	
35	(+)-Aromadendrene	29.487	1550	0.35	0.95	

Table 38. Volatile compounds and sniffing tests of *Platycodon autumnole* Decne. at 3 min

NO.	Compounds	Retention Time(min)	RI	compound (ug/100g)	%	ODP intensity
1	Methyl-pyrazine	9.092	845	0.12	0.45	
2	2-Furancarboxaldehyde	9.284	851	1.41	5.35	
3	2-Furanmethanol	10.149	876	0.21	0.80	
4	2, 5-Dimethyl-pyrazine	11.942	928	0.39	1.48	
5	2,6-Dimethyl-pyrazine	11.982	929	1.04	3.94	1
6	5-Methyl-2-furancarboxaldehyde	13.737	981	0.37	1.40	
7	2-Pentyl-furan	14.585	1005	0.18	0.66	
8	2-Ethyl-6-methyl-pyrazine	14.871	1015	0.53	2.01	
9	2-Ethyl-5-methyl-pyrazine	14.952	1018	0.25	0.93	
10	Trimethyl-pyrazine	14.995	1019	0.79	2.99	
11	2-Methyl-1, 4-benzenediamine	15.036	1021	0.86	3.25	1
12	3-Ethyl-2, 5-dimethyl-pyrazine	17.401	1095	7.05	26.67	2
13	2-Ethyl-3, 5-dimethyl-pyrazine	17.655	1103	0.60	2.27	2
14	Nonanal	18.124	1120	0.14	0.52	3
15	N-Methyl-N-nitroso-2-propanamine	19.271	1159	0.14	0.51	1
16	2, 3-Diethyl-5-methyl-pyrazine	19.689	1173	0.23	0.88	2
17	2, 5, 6-Trimethyl-4-ethylpyrimidine	19.767	1176	0.37	1.40	1
18	Dodecane	20.866	1213	0.44	1.66	4
19	2, 5-Dimethyl-3-(2-methylpropyl)-pyrazine	21.032	1220	1.78	6.73	
20	2, 5-Dimethyl-3-(1-propenyl)-pyrazine	21.660	1243	0.18	0.68	1
21	5-Formyl-2-furfurylmethanoate	21.783	1247	0.32	1.21	
22	5-(Hydroxymethyl)-2-furancarboxaldehyde	21.963	1254	2.18	8.24	
23	Tridecane	23.618	1314	0.91	3.44	
24	2, 3-Dimethyl-5-(2-methyl propyl)-pyrazine	23.861	1324	0.82	3.10	
25	5-Acetoxymethyl-2-furaldehyde	23.985	1329	0.46	1.75	
26	2, 5-Dimethyl-3-(3-methyl butyl)-pyrazine	24.152	1335	0.88	3.32	3
27	(+)-Aromadendrene	25.631	1391	0.21	0.79	
28	$\alpha$ -Ylangene	25.695	1394	0.27	1.02	
29	Tetradecyl ester pentafluoropropionic acid	26.055	1408	0.27	1.01	
30	Tetradecane	26.237	1416	1.75	6.60	
31	trans-Caryophyllene	26.977	1446	0.30	1.12	
32	1-(1, 5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl benzene	28.442	1505	0.64	2.41	
33	Cedrene	29.500	1551	0.38	1.42	

Table 39. Volatile compounds and sniffing tests of *Platycodon autumnole* Decne. at 4 min

NO.	Compounds	Retention Time(min)	RI	compound (ug/100g)	%	ODP intensity
1	2-Furancarboxaldehyde	9.321	852	0.77	6.38	
2	2-Furanmethanol	10.175	876	0.01	0.09	
3	2, 5-Dimethyl-pyrazine	11.991	930	0.11	0.92	
4	2,6-Dimethyl-pyrazine	12.034	931	0.32	2.66	
6	5-Methyl-2-furancarboxaldehyde	13.756	982	0.23	1.95	
7	2-Ethyl-6-methyl-pyrazine	14.902	1016	0.19	1.61	
8	2-Ethyl-5-methyl-pyrazine	14.980	1019	0.09	0.77	
9	Trimethyl-pyrazine	15.021	1020	0.31	2.54	
10	2-Methyl-1, 3-benzenediamine	15.065	1022	0.39	3.22	
11	3-Ethyl-2,5-dimethyl-pyrazine	17.415	1095	2.86	23.79	2
12	2-Ethyl-3, 5-dimethyl-pyrazine	17.600	1101	0.39	3.21	3
13	2,6-Diethyl-pyrazine	18.132	1120	0.11	0.88	4
14	N-Methyl-N-nitroso-2-propanamine	19.261	1159	0.18	1.53	1
15	2,3-Diethyl-5-methyl-pyrazine,	19.704	1174	0.11	0.92	
16	3, 5-Diethyl-2-methyl-pyrazine	19.782	1176	0.16	1.37	
17	Dodecane	20.883	1214	0.35	2.93	4
18	2,3-Dimethyl-5-(2-methylpropyl)-pyrazine	21.044	1220	0.88	7.32	
19	1, 3-Dimethyl-3, 4-dihydro-pyrrolo(1, 2-a)pyrazine	21.673	1243	0.05	0.43	
20	5-Hydroxymethylfurfural	22.041	1257	1.18	9.83	
23	5-(Hydroxymethyl)-2-furancarboxaldehyde	22.152	1261	0.12	0.99	
25	Tridecane	23.628	1314	0.54	4.45	
26	2-Butyl-3,5-dimethyl-pyrazine	23.866	1324	0.41	3.44	
27	5-Acetoxyethyl-2-furaldehyde	23.988	1329	0.38	3.14	
28	$\alpha$ -Ylangene	25.712	1394	0.17	1.44	
29	2, 4-Quinolinediol	25.829	1399	0.21	1.74	
30	(E)-2-Tetradecene	26.042	1407	0.13	1.04	
31	Tetradecane	26.248	1416	1.04	8.62	
32	Zingiberene	28.780	1520	0.33	2.78	

Table 40. Volatile compounds and sniffing tests of *Platycodon autumnole* Decne. at 5 min

NO.	Compounds	Retention Time(min)	RI	compound (ug/100g)	%	ODP intensity
1	Furfural	9.335	853	0.99	9.38	
2	2-Furanmethanol	10.189	877	0.21	2.03	
3	5-Methyl-2-furancarboxaldehyde	13.756	982	0.37	3.48	
4	dl-Limonene	15.815	1035	0.09	0.83	
6	2, 5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone	16.935	1081	0.16	1.51	2
7	3-Ethyl-2, 5-dimethyl-pyrazine	17.431	1096	0.92	8.70	
8	4-Hydroxy-3-methylbenzaldehyde	17.614	1101	0.08	0.76	1
9	Nonanal	18.140	1120	0.11	1.02	4
10	Maltol	18.533	1134	0.17	1.59	
11	N-Ethyl-N-nitroso-ethanamine	19.268	1159	0.16	1.49	
12	2, 3-Dihydro-3, 5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one	19.435	1165	0.62	5.84	
13	N-(4'-Chlorophenyl)-8-fluoro-3-methyl-isoalloxazine	19.544	1168	0.08	0.76	2
14	Dodecane	20.878	1214	0.16	1.52	4
15	2, 5-Dimethyl-3-(2-methyl propyl)-pyrazine	21.050	1220	0.31	2.92	
16	5-Formyl-2-furfurylmethanoate	21.793	1248	0.44	4.15	
17	5-(Hydroxymethyl)-2-furancarboxaldehyde	22.030	1256	3.54	33.56	
20	Tridecane	23.635	1315	0.34	3.21	
23	5-Acetoxymethyl-2-furaldehyde	23.978	1328	0.67	6.32	
25	7-Tetradecene	26.043	1408	0.12	1.18	
26	Tetradecane	26.244	1416	0.76	7.18	
27	1-(1, 5-Dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-benzene	28.465	1506	0.24	2.28	
28	8- $\alpha$ -13-Dihydroxy-4,15,16-trinor-labdane	29.485	1550	0.03	0.29	

(7) 맛 성분 변화탐색 : 도라지의 볶음처리별 맛 성분 결과는 Table 41 및 Figure 30에 나타내었다. 맛 성분 센서를 통해서 확인된 도라지의 결과를 보면 가열 이전에서는 saltiness와 sweetness가 7.3과 5.8로 가장 높게 확인되었다. 2분간의 가열을 통해서 sourness와 Umami가 7.3과 7.9로 대폭 증가하였다. 가열시간 3분과 4분을 통해서도 sourness와 Umami는 7.5와 7.3 그리고 4분에서도 7.1과 6.6으로 다른 맛 성분에 비해 높은 수치를 유지하였다. 이러한 경향은 5분의 열처리 과정에서는 큰차이를 보이는데, 5분간의 열처리 과정에서는 최초 열처리 이전의 패턴과 유사한 saltiness와 sweetness가 6.2와 6.9로 가장 높게 확인되었다. 열처리과정을 볼 때 3분과 4분 정도에서 높은 Umami 값을 얻을 수 있으며, Umami의 경우 주로 감칠맛 성분이라는 점을 볼 때 적절한 열처리 과정을 통해 원하는 맛성분의 패턴을 찾을 수 있으리라 판단된다.

Table 41. Taste screening of *Platycodon autumnole* Decne. by roasting times

Taste	Roasting time(min)				
	0	2	3	4	5
Sourness	2.2	7.3	7.5	7.1	5.9
Saltiness	7.3	6.0	5.1	5.4	6.2
Umami	2.4	7.9	7.3	6.6	5.8
Sweetness	5.8	5.9	5.3	6.1	6.9
Bitterness	4.9	6.7	6.3	6.2	6.0

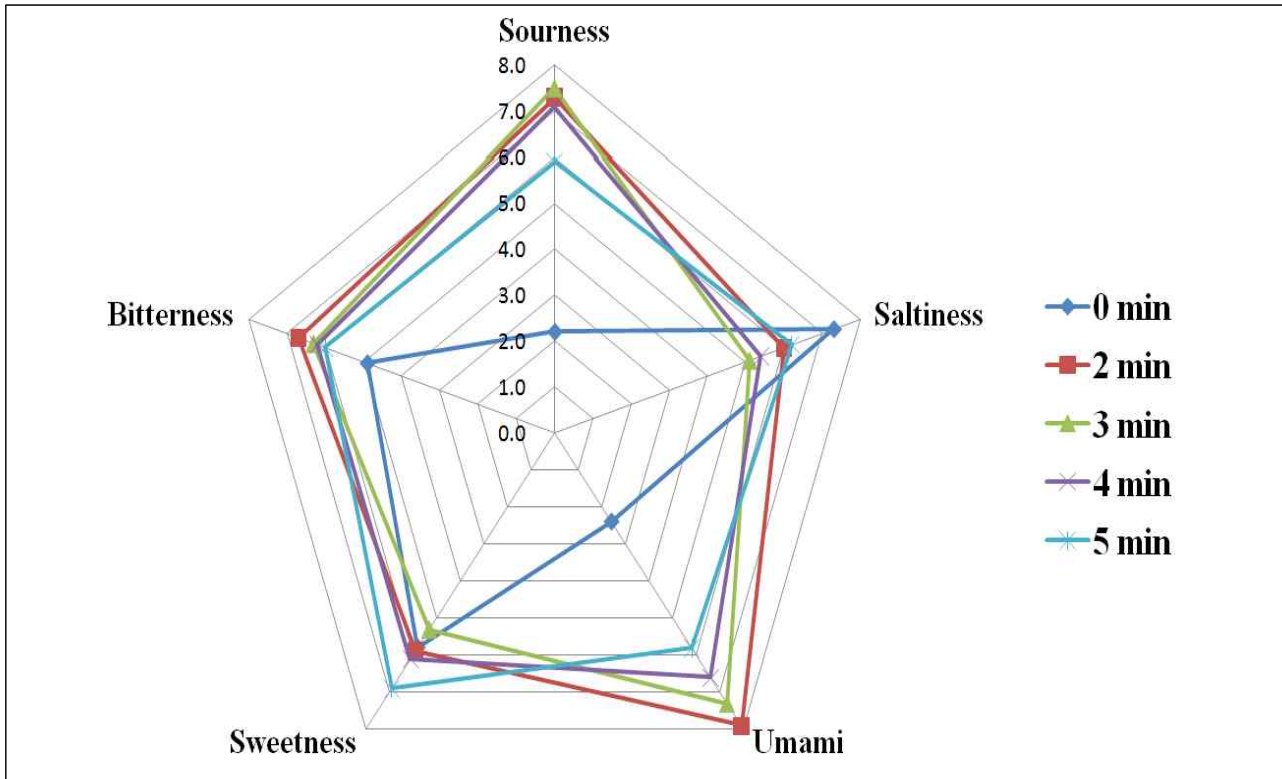


Figure 30. Taste screening in *Platycodon autumnole* Decne. by roasting times

(8) 냄새센서를 통한 향기성분 탐색 : 도라지의 볶음처리별 냄새성분 결과는 Table 42 및 Figure 31에 나타내었다. 냄새 센서의 경우는 개별 향기성분에 대한 profile이 아닌 전반적인 향기성분의 패턴을 확인하는 연구로써 fragrance, strength, NH<sub>3</sub>, 그리고 H<sub>2</sub>S에 대한 지표를 보여주며, fragrance는 주로 낮은 분자량을 가진 물질을 검출하며, 긍정적인 향기에 대한 지표로 알려져 있으며, strength의 경우에는 높은 분자량을 가진 향기성분을 검출하며, 이러한 경우는 주로 냄새라는 표현을 쓰는 부정적 향기성분에 대한 값으로 알려져 있어, 높은 fragrance값과 낮은 strength값이 향기성분에 대해서는 우수한 평가를 하는 것이 특징이다. 도라지의 경우 fragrance값이 최초 54±1에서 가열처리에 따라서 56±1에서 58±0까지 증가하는 경향을 확인하였고, 이러한 증가 패턴은 향기성분에서 긍정적인 부분으로 간주한다. 또한 strength값은 최초 4,172±427에서 5분간의 열처리를 통해서 3,505±255까지 감소함을 확인할 수 있었다. 향기성분의 경우는 열처리과정이 오히려 긍정적인 경향을 보이는 것으로 확인되었다. 암모니아의 수치 역시 열처리 이전에 566±89에서 5분간의 열처리를 통해서 118±19까지 감소함을 확인할 수 있었다. 황화수소(H<sub>2</sub>S)에서도 열처리 이전에 2,392±422에서 5분간의 열처리를 통해서 1,521±102까지 감소함을 확인할 수 있었다. 적절한 열처리 조건은 기존의 도라지가 가지는 향기성분을 개선할 수 있는 중요한 가공 지표가 될 것으로 판단된다.

Table 42. Odor screening of *Platycodon autumnole* Decne. by roasting times

Odor	Roasting time(min)				
	0	2	3	4	5
Fragrance	54±1	57±1	58±0	57±1	56±1
Strength	4,172±427	4052±131	3,686±95	3,979±301	3,505±255
NH <sub>3</sub>	566±89	347±152	165±10	204±22	118±19
H <sub>2</sub> S	2,392±422	2,006±167	1,537±60	1,827±168	1,521±102

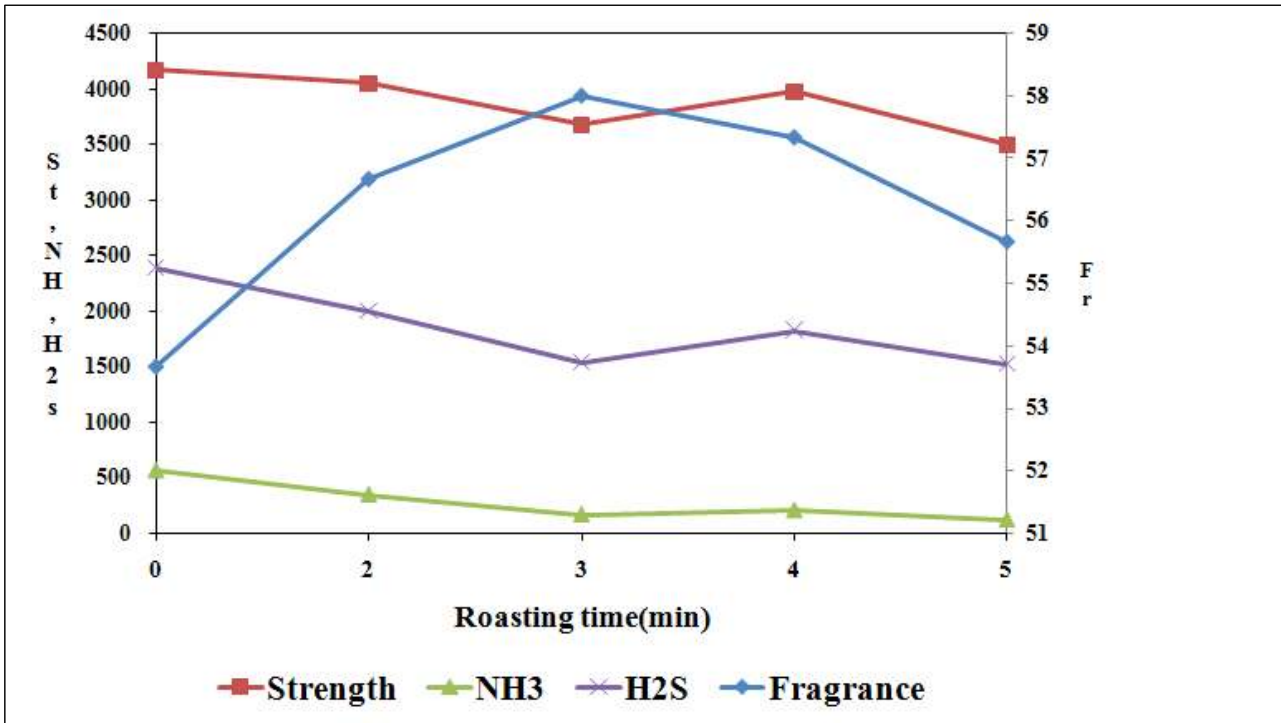


Figure 31. Odor screening in *Platycodon autumnole* Decne. by roasting times

# 제5절 지리산 권역 자생 토종 약용작물의 판별 마커 및 보존 기술 개발

## [제4세부, 경남과학기술대학교 산학협력단]

### 1-1. 1차년도 연구수행 방법

#### 가. 유전자원 확보 및 보존 체계 구축

(1) 유전자원수집 : 국내의 대표적인 약용작물 연구기관 즉 농촌진흥청 국립원예특작과학원, 인삼특작부, 전국의 농업기술원등에 분양을 의뢰하여 각 계통별로 보증된 시료의 식물체 또는 종자를 확보하도록 노력하였다.

(2) 수집된 유전자원의 보존 및 관리 : 수집된 종자는 보관하기가 용이한 종이봉투에 넣고 4°C 에 보관하였으며, 식물체는 포트에 옮겨 온실에서 재배하고 잎조직을 소독 후 기내 배양조건을 확립중에 있음.

#### 나. 주요약용작물의 분자생물학적 판별 마커 개발

(1) 게놈 DNA 분리 : 수집된 식물체별로 일정량의 종자 또는 잎을 액체질소에 급속 냉동 시킨 후 곱게 갈아서 얻은 분말을 이용하여 GeneAll사의 Exgene™ Plant SV 키트를 이용하여 회사에서 제공한 실험방법에 따라 게놈 DNA를 분리하였다. 정제된 DNA의 순도를 조사하기 위하여 일정량의 분획을 1% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 확인한 후 UV-spectrophotometer를 이용하여 234 nm, 260 nm, 280 nm에서 각각 흡광도를 측정하여 A260/A280 값이 1.8-2.2 범위 그리고 A234/A260 값이 0.5-0.8 범위 내 포함 여부를 조사하여 RNA 및 단백질 등의 오염정도를 확인하여 순수한 DNA를 확인하였다.

(2) 엽록체 유전자의 증폭 및 염기서열 분석 : 엽록체 유전자 내의 단일염기다형성을 확인하고자 *TrnL -TrnF* 유전자 단편과 *matK* 유전자 단편의 증폭을 위하여 GenBank에서 확인하여 PCR증폭용 primer를 제작하였다. 유전자의 증폭은 SolGent 회사(Seoul, South Korea)에서 제공하는 PCR 반응용 완충용액 및 Solg™ Pfu DNA polymerase를 사용하여 중합반응과정에서 야기될 수 있는 돌연변이를 최소화 하였다. 제조사에서 제공하는 실험방법에 따라 순수 분리한 DNA 50 ng과 프라이머를 각각 10 pmole을 혼합 한 후 94°C에서 5분간 DNA를 변성 시킨 후 94°C에서 30초, 60°C에서 10초, 72°C에서 30초를 1 cycle로 하여 35 cycle 반복 후 72°C에서 5분간 연장반응을 시킨 후 4°C에서 반응을 종료하고 증폭된 DNA밴드는 1.5% agarose gel을 이용하여 전기 영동하여 그 결과를 확인하였다. 증폭되어진 각 유전자 단편을 T-Blunt™ PCR Cloning Kit(Solgent)를 이용하여 클로닝하여 염기서열분석은 SolGent 회사(Seoul, South Korea)에 의뢰하여 수행하였다. 한편 클로닝과정에서 돌연변이가 일어날 수도 있으므로 클로닝을 하지 않고 증폭된 밴드를 아가로즈 겔에서 용출하여 순수정제한 후 직접 염기서열 분석도 동시에 수행하였다. 또한 최종적으로 확인된 단일염기다형성(SNP)는 최소 5반복이상 수행하여 검정하였다.

#### (3) 일반 PCR용 마커 개발

전술한바와 같이 하수오는 백수오 및 이엽우피소와 속이 다르다. 그리고 백수오와 이엽우피소는 속은 같으나 종이 다르기 때문에 이들의 염기서열을 비교한 결과 예상한바와 같이 하수오



는 백수오와 이엽우피소와 비교하여 크게 차이가 나타났으며 백수오와 이엽우피소를 비교하였을 경우에도 일부 염기서열의 치환(substitution), 삭제(deletion)등 염기서열로는 확연하게 구분이 가능하였다. 이러한 염기서열다형성을 이용하여 이들을 구분하기 위한 판별 키트를 개발하고자 먼저 각종에 특이하게 결합 할 수 있는 프라이머(마커)를 디자인하였다.

(4) ARMS-PCR : 염기서열에 차이가나는 SNP를 3'-말단으로 한 정방향 프라이머는 SNP와 바로 이웃하는 염기(T)를 다른 3개의 염기로 변경한 후 프라이머를 제작하였으며 PCR 조건은 일반 PCR과 동일한 조건으로 수행하였다.

(5) HRM curve 분석 : High Resolution Melting (HRM) curve 분석 기술의 조건은 다음과 같다. 단일염기다형성(SNP)이 중앙에 위치하는 *TrnL* 유전자단편을 증폭하기 위하여 제작한 프라이머(AUR trnL-F forward, AUR trnL-F reverse)를 제작하였고, 순수 분리 정제한 DNA(10 ng)와 각각의 프라이머를 각각 5 pmol씩 넣고 10 ul의 SsoFast™ EvaGreen® Supermixes BIO-RAD, 172-5200 premixture를 넣고 전체 반응액을 20 ul로 맞춘 후 Mx3005P QPCR Systems(Agilent Technologies)을 사용하여 HRM curve 분석을 수행하였다. 조건은 먼저 98 °C에서 2분간 효소를 활성화 시킨 후 98 °C에서 5초간 DNA를 변성을 시킨 후 57 °C에서 20초간 유지하면서 annealing과 함께 상보가닥의 연장이 진행되도록 하여 이를 30회 반복 수행하고 종료된 후에는 40°C까지 온도를 내린 후 95 °C까지 증가시키면서 melting curve를 확보하도록 입력한 프로그램을 실시하여 결과를 얻었다.

## 1-2. 1차년도 연구결과

### 가. 유전자원 확보 및 보존 체계 구축

#### (1) 유전자원 확보 현황

(가) 혼·오용이 심한 적하수오, 백하수오, 이엽우피소계통 확보현황 : 현재까지 수집된 자원은 경남생약협동조합에서 백하수오 1점, 충북농업기술원, 국립원예특작과학원, 경남농업기술원, 경북농업기술원에서 적하수오, 백하수오, 이엽우피소 각각 1점씩을 수집하였다. 수집된 자원은 식물체 또는 종자로서 이들을 각각 보관하면서 실험에 사용하였다 (표 1-1).

표 1-1. 적하수오, 백수오, 이엽우피소 유전자원 수집현황

일련번호	입고날짜	생약명	학명	입고형태	확보경로
2014-01	2014-08-01	백하수오	<i>Cynanchum wilfordii</i>	한약재	경남생약농업협동조합
2014-03	2014-09-04	적하수오	<i>Polygonum multiflorum</i>	식물체·종자	충북농업기술원(오창)
2014-04	2014-09-04	백하수오	<i>Cynanchum wilfordii</i>	식물체·종자	충북농업기술원(오창)
2014-05	2014-09-04	이엽우피소	<i>Cynanchum auriculatum</i>	식물체·종자	충북농업기술원(오창)
2014-10	2014-10-16	적하수오	<i>Polygonum multiflorum</i>	식물체	국립원예특작과학원인삼특작부(충북음성)
2014-11	2014-10-16	백하수오	<i>Cynanchum wilfordii</i>	식물체·종자	국립원예특작과학원인삼특작부(충북음성)
2014-12	2014-10-16	이엽우피소	<i>Cynanchum auriculatum</i>	식물체	국립원예특작과학원인삼특작부(충북음성)
2014-21	2015-01-08	적하수오	<i>Polygonum multiflorum</i>	식물체·종자	경남농업기술원(안의)
2014-22	2015-01-08	백하수오	<i>Cynanchum wilfordii</i>	식물체	경남농업기술원(안의)
2014-23	2015-01-08	이엽우피소	<i>Cynanchum auriculatum</i>	식물체·종자	경남농업기술원(안의)
2014-24	2015-03-18	적하수오	<i>Polygonum multiflorum</i>	종자	경북농업기술원(봉화)
2014-25	2015-03-18	백하수오	<i>Cynanchum wilfordii</i>	종자	경북농업기술원(봉화)
2014-26	2015-03-18	이엽우피소	<i>Cynanchum auriculatum</i>	종자	경북농업기술원(봉화)

(나) 산형화과 약용작물 유전자원 확보 : 산형화과에 속하는 당귀와 천궁속에 속하는 약용 자원은 경남생약협동조합에서 한약재로 판매하는 참당귀 1점, 충북농업기술원에서 일당귀, 궁 궁이, 토천궁 각 1점씩, 국립원특작과학원에서 참당귀 1점, 경남농업기술원에서 참당귀, 일당 귀, 세발당귀, 일천궁 각 1점씩, 경북농업기술원에서 참당귀 1점을 포함하여 총 10점의 식물체 또는 종자를 수집하였다(표 1-2).

**Table 1-2. 산형화과 약용작물 유전자원 수집현황**

일련번호	입고날짜	생약명	학명	입고형태	확보경로
2014-02	2014-08-01	참당귀	Angelica gigas Nakai	한약재	경남생약협동조합
2014-07	2014-09-04	일당귀	Angelica acutiloba Kitag.	종자	충북농업기술원(오창)
2014-08	2014-09-04	궁궁이	Angelica polymorpha Maxim	식물체	충북농업기술원(오창)
2014-09	2014-09-04	토천궁	Ligusticum chuanxiong Hort.	식물체	충북농업기술원(오창)
2014-13	2014-10-16	참당귀	Angelica gigas Nakai	식물체 · 종자	국립원예특작과학원인삼특작부 (충북음성)
2014-17	2015-01-08	참당귀	Angelica gigas Nakai	식물체 · 종자	경남농업기술원(안의)
2014-18	2015-01-08	일당귀	Angelica acutiloba Kitag.	식물체 · 종자	경남농업기술원(안의)
2014-19	2015-01-08	세발당귀		식물체	경남농업기술원(안의)
2014-20	2015-01-08	일천궁	Angelica genuflexa Nutt.	식물체 · 종자	경남농업기술원(안의)
2014-27	2015-03-18	참당귀	Angelica gigas Nakai	종자	경북농업기술원(봉화)

(2) 영양체 기내보존 체계 확립

(가) 종자는 종자보관용 종이봉투에 담아 4℃ 보관, 활력 검정, 기내보존과 연계하여 진행 중에 있음.

(나) 영양체보존을 위하여 하수오, 당귀, 천궁 등의 계통별로 기내에서 파종 후 잎 또는 엽 병을 채취하여 조직 배양 조건을 확립 중에 있으며 조직배양이 쉽게 되지 않고 수집한 계통에 따라 발아력에 문제가 있어 어려움이 있으며, 일반 상토에서 발아시켜 얻은 성숙된 식물체로부터 치상용 절편을 채취하고, 배지 내 호르몬 조성 등의 최적 조건 확립 중에 있음.

**나. 혼·오용 약용작물의 종·속간 구분용 분자생물학적 마커 개발**

(1) 적하수오, 백수오, 이엽우피소계통 판별 마커 개발

(가) 엽록체 유전자의 증폭 및 염기서열 분석 결과 : 적하수오, 백수오, 이엽우피소 3계통별 로 엽록체 게놈에 존재하는 *matK* 유전자와 *trnL-F* 유전자단편의 염기서열을 분석하여 alignment한 결과 적하수오는 다른 두 계통과 많은 차이를 보였으며 속은 같으나 종이 다른 백 하수오와 이엽우피소는 상당히 유사하여 일부 SNP를 확인할 수 있어 이들 SNP를 이용한 특이 판별 프라이머를 제작할 수 있었다(표 1-3, 1-4).

**표 1-3. 백수오와 이엽우피소의 matK 유전자 단편내 SNP**

생약명	출처	matK
백수오	특작(2)	TGTTTTCATTTTTTAACAAAAAGAAATC-----AACGAT
	충북(3)	TGTTTTCATTTTTTAACAAAAAGAAATC-----AACGAT
	안의(34)	TGTTTTCATTTTTTAACAAAAAGAAATC-----AACGAT
	NCBI	
이엽우피소	특작(5)	TGTTTTCATTTTTTAACAAAAAGAAATCTAAAAAGAAATCAACGAT
	충북(4)	TGTTTTCATTTTTTAACAAAAAGAAATCNAAAAAAGAAATCANCNGT
	NCBI	TGTTTTCATTTTTTAACAAAAAGAAATCTAAAAAGAAATCAACGAT

표 1-4. 백수오와 이엽우피소의 trnL-trnF 유전자단편내 SNP

생약명	출처	trnL-F
백수오	특작(14)	GAAATTCCAGTACCTAGATCAAACCTTTT <b>GAA</b> TCTCTTTTCGCCCTTTTAATTGACATA
	충북(15)	GAAATTCCAGTACCTAGATCAAACCTTTT <b>GAA</b> TCTCTTTTCGCCCTTTTAATTGACATA
	안의(37)	GAAATTCCAGTACCTAGATCAAACCTTTT <b>GAA</b> TCTCTTTTCGCCCTTTTAATTGACATA
	NCBI	GAAATTCCAGTACCTAGATCAAACCTTTT <b>GAA</b> TCTCTTTTCGCCCTTTTAATTGACATA
이엽우피소	특작(16)	GAAATTCCAGTACCTAGATCAAACCTTTT <b>TAA</b> CCTCTTTTCGCCCTTTTAATTGACATA
	충북(17)	GAAATTCCAGTACCTAGATCAAACCTTTT <b>TAA</b> CCTCTTTTCGCCCTTTTAATTGACATA
	NCBI	GAAATTCCAGTACCTAGATCAAACCTTTT <b>TAA</b> CCTCTTTTCGCCCTTTTAATTGACATA

(2) 적하수오, 백수오, 이엽우피소의 판별용 프라이머 제작

3 종의 약용작물에 대한 엽록체 유전자, matK, trnL-trnF 유전자의 염기서열 비교분석을 통하여 확인한 SNP를 이용한 프라이머 디자인 결과 (표 1-5)

표 1-5. PCR 수행시 사용되어진 Primer

	Primer	sequence (5'→3')	Tm (°C)	size (bp)
적하수오	FAL trnL-F F	AAACTCCAAAAAGGATGAAGAATAAATCTAG	58.3795	829
	FAL trnL-F R	GGCCGAGATTTTCAGTCCTCTG	58.6865	
백수오	WIL trnL-F F	CGTACGGACTTAATTGGATTGAGCCTTAGTAA	63.9929	828
	WIL trnL-F R	GAATCTTCTTTTCGCCCTTTTAATTGA	59.0481	
이엽우피소	AUR matK F	CATTTTTTAACAAAAAGAAATCTAAAAAGAAATC	58.4371	746
	AUR matK R	AAAGTTCTAGCACAAGAAAGTCGAAGTATATAC	58.0225	

(3) PCR에 의한 적하수오, 백수오, 이엽우피소 계통의 판별 결과

표 1-5에서 기술한 TrnL 유전자의 증폭용 프라이머를 사용한 경우에는 밀양, 으뜸, 아산, 제주 등의 백도라지 계통에서 추출한 DNA로부터 장백계통과 동일한 위치에서 예상한 598 bp의 밴드를 확인할 수 있었다(그림1-1).

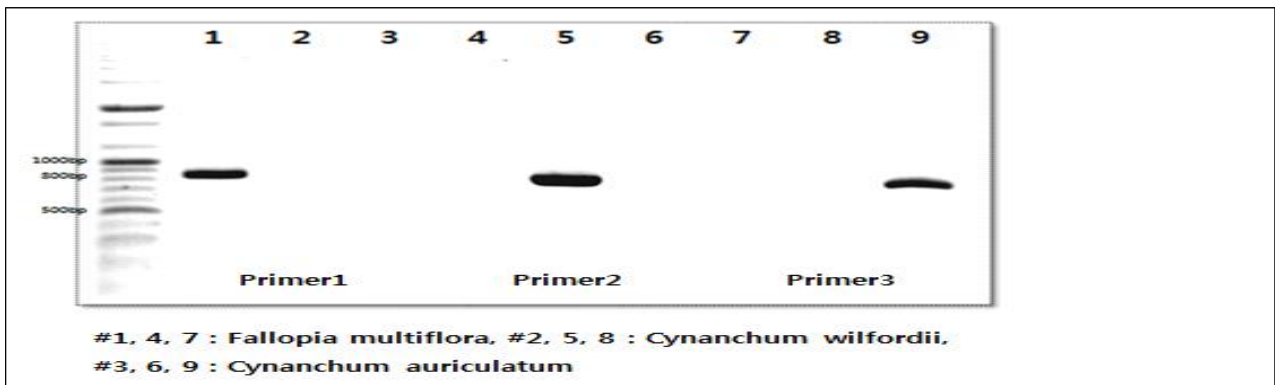


그림 1-1. 적하수오, 백수오, 이엽우피소계통을 판별하기 위한 피시알 결과 (1.4.7은 적하수오, 2, 5, 8은 백수오, 3, 6, 9는 이엽우피소 계통이며 프라이머1은 적하수오, 프라이머2는 백수오, 프라이머 3은 이엽우피소 특이 판별용 프라이머이다.

(4) HRM curve 분석 기술을 이용한 적하수오, 백수오, 이엽우피소계통을 판별 : 또한, 이상의 염기서열을 이용하여 적하수오, 백수오 및 이엽우피소의 상동성이 가장 높은 부위를 중심으로 제작한 프라이머(표 1-6)를 이용하여 3가지 계통에 대한 HRM curve 분석을 통하여 각 계통들을 판별할 수 있는 결과를 얻었다. 적하수오는 백수오와 이엽우피소와 비교하여 보면 속이 다르므로 확연하게 판별이 가능하였다. 뿐만 아니라 속은 같으나 종이 다른 백수오와 이엽우피소도 아주 유사하지만 판별이 가능하도록 차이가 나는 HRM curve를 나타내어 향후 이 기술로도 이들 계통을 판별 할 수 있는 것으로 검토되었다(그림 1-2).

표 1-6. HRM curve 분석에 의한 적하수오, 백수오, 이엽우피소의 판별용 프라이머

Primer	sequence (5'-3')	Tm (°C)	Size (bp)
AUR trnL-F SNP F	TTTGAGCAAGAAATCCCCATTTG	58.86	236bp
AUR trnL-F SNP R	GGCCGAGATTTTCAGTCCTCTG	58.68	

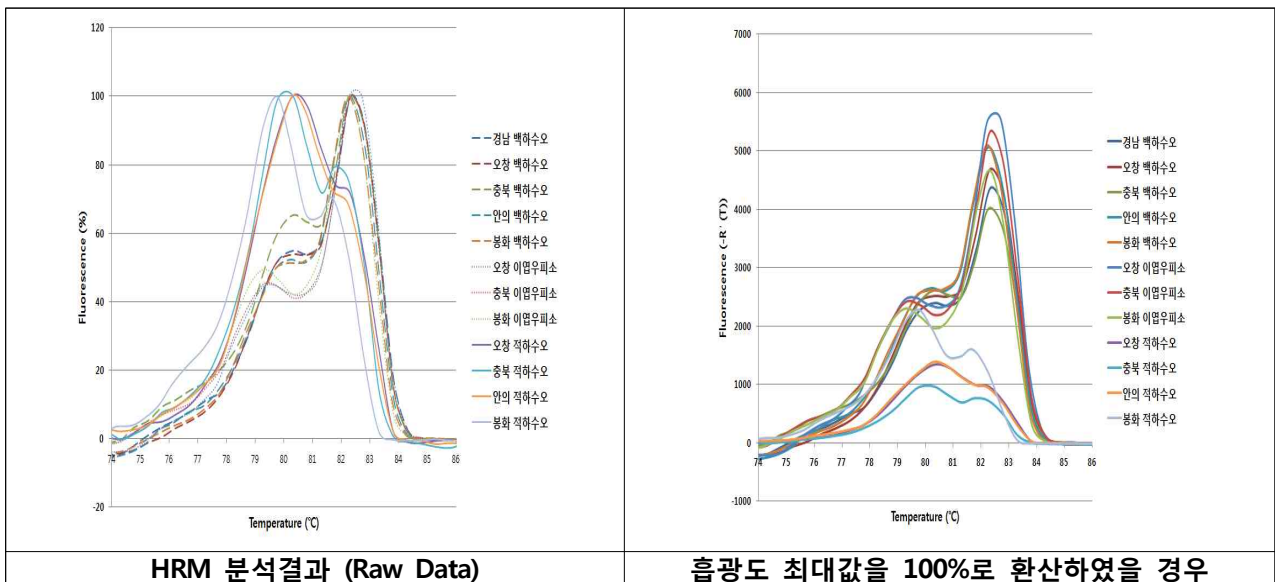


그림 1-2. 적하수오, 백수오, 이엽우피소 계통의 trnL-F 유전자단편을 이용한 HRM curve 분석 결과

#### 다. SNP 마커를 이용한 토종 백도라지(장백)의 판별 기술 개발

##### (1) 엽록체 유전자의 염기서열비교분석 및 판별 마커 개발

엽록체 유전자인 *TrnL* 유전자의 염기서열을 비교분석한 결과 그림1-3에서 보는 바와 같이 지금까지 수집한 40여 다른 도라지 계통과는 다른 하나의 SNP가 장백도라지에서 발견되었으며 이를 이용한 프라이머를 디자인한 다음 ARMS-PCR용 프라이머를 디자인 하였으며(표 1-7), 이를 이용하여 장백도라지를 판별한 결과를 그림 1-3에 나타난 바와 같았다.

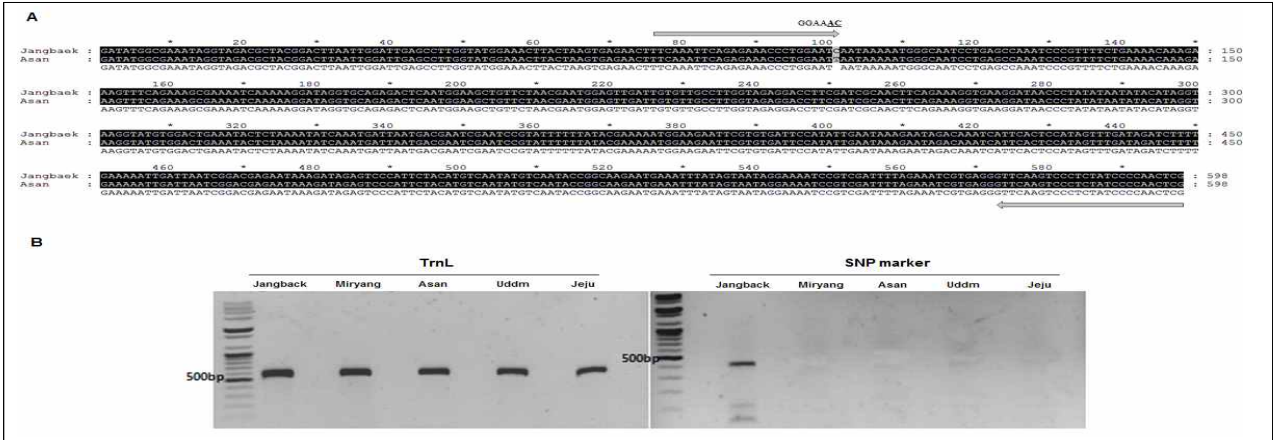


그림1-3. 장백도라지의 SNP (A)와 이를 이용하여 디자인한 프라이머를 이용한 ARMS-PCR 결과(B)

표 1-7. 장백도라지 판별용 ARMS-PCR용 프라이머

No.	Primer	Nucleotide sequence (5'-3')	Tm (°C)	size (bp)
1	JB trnL SNPF-1	CAGAGAAACCCTGGAAAC	58.5	522
2	JBtrnL SNPF-2	CAGAGAAACCCTGGATTC	58.5	
3	JB trnL-R	CGAGTTGGGGATAGAGGGACTTGAAC	62.9	

(2) HRM curve 분석 기술을 이용한 장백도라지계통의 판별

장백도라지계통을 판별하기 위하여 단일염기다형성(SNP)이 중앙에 위치하는 *TrnL* 유전자 단편(201 bp)을 증폭하기 위하여 제작한 프라이머(JBTrnLSNP-F, JBTrnLSNP-R)를 사용하여 HRM 패턴 분석 실험을 수행한 결과 장백도라지는 다른 계통과 구분이 가능한 패턴을 보였다 (그림 1-4 참조)

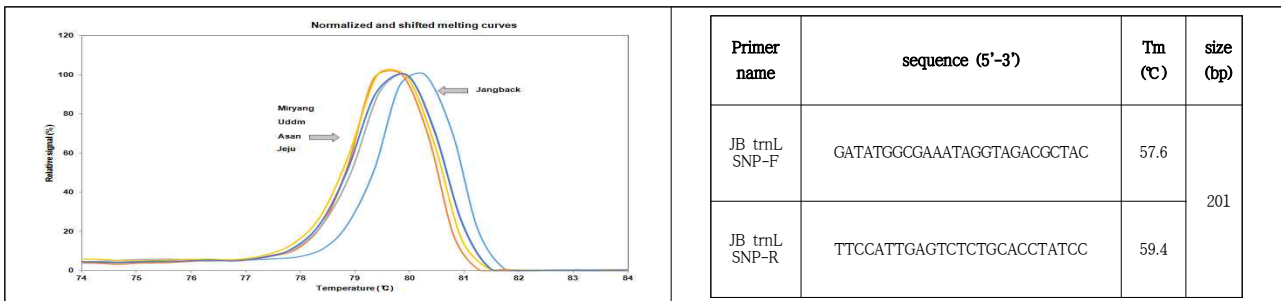


그림 1-4. 장백도라지계통(파란색 선)의 판별을 위한 HRM curve 분석 결과 및 프라이머 정보

2-1. 2차년도 연구수행 방법

가. 유전자원수집

1년차에 이어 2년차에도 일부 유전자원을 지속적으로 수집하고 각 계통별로 보관하여 시료의 식물체 또는 종자를 확보하도록 노력하였다.

나. 수집된 유전자원의 보존 및 관리

수집된 종자는 보관하기가 용이한 종이봉투에 넣고 4°C 에 보관하였으며, 식물체는 폼트에 옮겨 온실에서 재배하고 잎 조직을 소독 후 기내 배양조건을 확립하도록 노력함

**다. 게놈 DNA 분리, ARMS-PCR, HRM패턴 분석**

1년차와 동일하며 해당 프라이머의 종류에 따른 PCR 온도 및 조건만 다르게 함

**라. 약용작원의 기내 증식을 위한 배지 및 호르몬 조성**

아래의 조건으로 MS 배지에 조직을 치상하거나 종자를 발아시켜 발근 및 활착의 조건을 조사하고자 하였다(표 2-1).

조건별 호르몬 처리 농도 (mg/L)		
	IBA	NAA
1	0	0
2	0.5	0
3	1.0	0.1
4	1.5	0.5
5	2.0	1.0

**마. 항균활성 및 항산화효과 측정**

(1) 하수오 추출물 조제 : MS배지에서 키운 하수오 부정근을 건조하여 얻은 시료를 이용하여, 80% 에탄올 용매로 사용하여 2회 열수 추출하였다. 추출액은 여과지(Whatman No.)로 여과한 뒤 회전감압농축기를 이용하여 농축한 후 동결건조하였다. 동결 건조한 분말은 냉동보관한 후 항균실험에 사용하였다.

(2) 하수오 항균력 실험 : *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* 에 대한 항균활성은 paper disc diffusion 방법을 사용하였다. TBS배지에 균을 도말한 다음 멸균된 paper disc를 올리고 DMSO에 100ug/ul의 농도로 용해된 시료를 paper disc에 50ul 흡착시킨 후, 37°C incubator에서 24시간 배양한 다음 디스크 주위의 생육 저해환 (Clear zone) 생성 유무를 확인하였다.

**2-2. 2차년도 연구결과**

**가. 유전자원 확보 현황**

(1) 백수오, 이엽우피소의 추가 수집현황 : 2년차에도 경남농업기술원 안의약초시험장의 도움을 받아 9계통의 백수오를 강원도의 평창군, 정선군, 경남의 거창군, 함양군, 제주시 조천읍 등에서 잎 또는 뿌리를 수집하여 냉동보관 또는 식물체의 껍트재배 중에 있으며, 이들 계통을 대상으로 1년차에 개발한 판별 기술을 이용하여 진위여부를 조사하도록 하였다(표 2-2).

**표 2-2. 2년차 백수오 자원 수집 현황**

일련번호	생약명/식물명	학명	분양, 수집지역 및 기원	입고형태
2016-01	백수오	<i>Cynanchum wilfordii</i> Hemsley	강원도 평창군	뿌리
2016-02	백수오	<i>Cynanchum wilfordii</i> Hemsley	경남 거창군	뿌리
2016-03	백수오	<i>Cynanchum wilfordii</i> Hemsley	경남 함양군	뿌리
2016-04	백수오	<i>Cynanchum wilfordii</i> Hemsley	제주시 조천읍	뿌리
2016-06	백수오	<i>Cynanchum wilfordii</i> Hemsley	강원도 정선군 임계면	뿌리
2016-07	백수오	<i>Cynanchum wilfordii</i> Hemsley	강원도 정선군 임계면	뿌리
2016-08	백수오	<i>Cynanchum wilfordii</i> Hemsley	강원도 정선군 임계면	뿌리
2016-09	백수오	<i>Cynanchum wilfordii</i> Hemsley	강원도 정선군 임계면	뿌리

(2) **꾸지뽕 자원 수집 현황** : 최근 꾸지뽕의 수요가 증가하고 중국산과 국산 토종의 약효성분의 차이 등이 보고됨에 따라 중국산과 국산계통을 판별할 수 있는 마커를 개발하여 경남 산청 등의 꾸지뽕 재배 단지에 국산 토종을 보급 유지 시킬 수 있도록 하고자 경남지역을 중심으로 중국산 계통과 한국산 계통을 먼저 확보하고, 전남 해남군, 경남 진주시, 의령군, 밀양 등에서 잎 또는 줄기를 확보하여 냉동보관 중에 있다(표 2-3).

**표 2-3. 수집 및 보관중인 꾸지뽕 계통 현황**

일련번호	생약명/식물명	학명	분양, 수집지역 및 기원	입고형태
2014-41	꾸지뽕	<i>Maclura tricuspidata</i>	경남 산청군 생비랑면 (중국산)	잎
2014-42	꾸지뽕	<i>Maclura tricuspidata</i>	경남 산청군 생비랑면 (한국산)	잎
2014-30	꾸지뽕	<i>Maclura tricuspidata</i>	전남 해남군 송지면 송호리 산 45	잎
2014-31	꾸지뽕	<i>Maclura tricuspidata</i>	전남 해남군 송지면 송호리 산 45	잎
2014-36	꾸지뽕	<i>Maclura tricuspidata</i>	경남 진주시 대곡면 단목리	잎/줄기
2014-37	꾸지뽕	<i>Maclura tricuspidata</i>	경남 의령군 대의면	줄기
2014-38	꾸지뽕	<i>Maclura tricuspidata</i>	경남 산청군 생비랑면	줄기
2014-39	꾸지뽕	<i>Maclura tricuspidata</i>	경남 진주시 미천면 대압	줄기
2016-10	꾸지뽕	<i>Maclura tricuspidata</i>	경남 밀양(중국산)	잎/줄기

(3) **당귀 유전자원 수집현황** : 2 년차에는 중국산 당귀(*Angelica sinensis*)를 한약재 시장에서 말린 뿌리를 직접 구할 수 있었다( 표 2-4).

**표 2-4. 2년차에 수집된 당귀 유전자원 현황**

일련번호	입고날짜	생약명/식물명	확보경로	입고형태	비고	학명
2016-28	2016-05-02	중국당귀	현진제약 수입	한약재	중국산	<i>Angelica sinensis</i>

(4) **도라지 유전자원 수집현황** : 미국의 Swallowtail garden Seeds (Santa Rosa, CA, USA)에서 MariesII, Hakone double white, Hakon double blue, Fugi white, Fugi pink, Fugi blue, Astra white, Astra pink, Astra blue, Astra semi-double blue 등 10 계통의 도라지 종자를 분양 보관 중에 있다.

#### 나. 영양체 기내보존

- (1) 종자는 종자보관용 종이봉투에 담아 4℃ 보관, 활력 검정, 기내보존과 연계하여 진행 중에 있음.
- (2) 영양체보존을 위하여 하수오, 백수오를 기내에서 파종 후 증식을 시켜 보관 중에 있으며, 무균 상태의 뿌리를 별도로 채취하여 뿌리의 배양을 진행 중에 있다.
- (3) 장백 등 백도라지의 경우에는 영양체 보존이 아주 잘 되었으며,
- (4) 당귀는 수집한 일반 상토에서 발아시켜 얻은 성숙된 식물체로부터 치상용 절편을 채취하고, 배지 내 호르몬 조성 등의 최적 조건 확립 중에 있음.

#### 다. 백수오와 이엽우피소의 혼합비율 판별 기술 개발

##### (1) 프라이머 정보

qPCR에 의한 백수오 및 이엽우피소의 혼합비율을 조사하기 위한 종 특이 프라이머의 염기서열 정보는 표 2-5에 요약하였다.

표 2-5. 백수오와 이엽우피소의 혼합비율 판별용 프라이머 정보

Target species	Name	Accession No.	Sequence (5' - 3')	Tm (°C)	Size (bp)
Actin	Actin F	67	GGCTGGATTTGCTGGTGATG	57	257
	Actin R	68	CCGCCTGAATAGCAACATAC	52	
trnL-trnF (control)	trnLF-F-2	399	TTTGAGCAAGAAATCCCCATTTG	59	236
	trnLF-R	401	GGCCGAGATTTTCAGTCCTCTG	59	
백수오 ( <i>Cynanchum wilfordii</i> Max. Hemsley)	trnLF-F-2	399	TTTGAGCAAGAAATCCCCATTTG	59	142
	WILtrnLF-R	392	TCAATTAAGGGCGAAAGAAGATTC	59	
이엽우피소 ( <i>Cynanchum auriculatum</i> Royle ex Wight)	trnLF-F-2	399	TTTGAGCAAGAAATCCCCATTTG	59	142
	AURtrnLF-R	424	TCAATTAAGGGCGAAAGAAGGTTA	59	

(2) 백수오와 이엽우피소의 혼합비율 판별 결과 (그림 2-1)

PCR반응의 종료 후 얻어진 증폭 값을 대조구로 사용한 내재유전자(actin)과 *trnL-trnF* 유전자 단편의 증폭된 값으로 보정 한 후 상대적인 DNA의 함량을 비교한 결과 의도적으로 혼합시킨 각각의 혼합비율과 거의 일치하는 경향을 얻어 향후 실제적으로 두 가지 한약재가 혼재되어 있을 경우의 상대적인 혼합비율을 추정할 수 가 있을 것으로 확인되었다. 이 결과는 단지 혼재의 여부만을 판별하는 정성분석도 필요하지만 실제 유통시장에서 문제가 발생하였을 경우에 정확한 혼입양도 판별할 수 있는 정량적 판별기술도 개발한 것으로 그 의미가 크다고 하겠다.

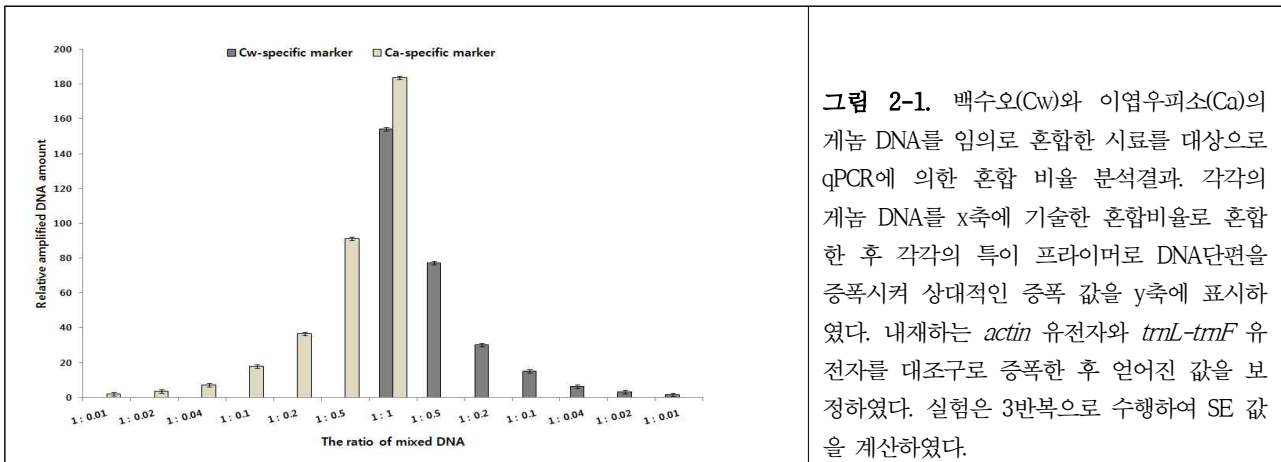


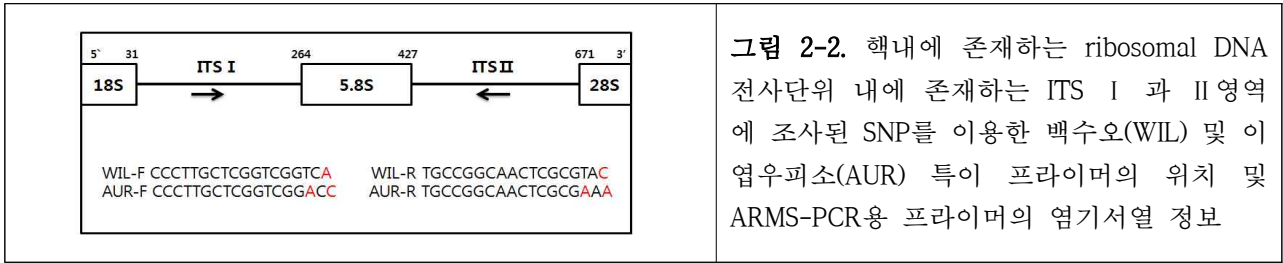
그림 2-1. 백수오(Cw)와 이엽우피소(Ca)의 게놈 DNA를 임의로 혼합한 시료를 대상으로 qPCR에 의한 혼합 비율 분석결과. 각각의 게놈 DNA를 x축에 기술한 혼합비율로 혼합한 후 각각의 특이 프라이머로 DNA단편을 증폭시켜 상대적인 증폭 값을 y축에 표시하였다. 내재하는 *actin* 유전자와 *trnL-trnF* 유전자를 대조구로 증폭한 후 얻어진 값을 보정하였다. 실험은 3반복으로 수행하여 SE 값을 계산하였다.

라. 백수오와 이엽우피소의 교잡종 판별을 위한 ITS 유전자 마커 개발

(1) ITS 유전자 단편내 SNP를 이용한 ARMS-PCR용 프라이머 정보

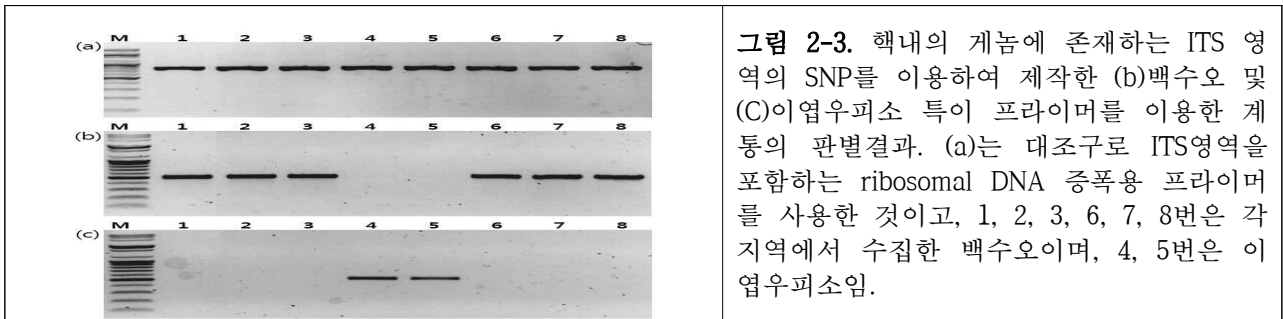
핵내에 존재하는 ITS 유전자단편의 염기서열을 확보하고자 먼저 ribosomal DNA의 전사단위 내에 존재하는 18S rRNA와 28S rRNA를 암호하는 유전자의 염기서열을 GenBank에서 검색하여 백수오(*Cynanchum wilfordii* isolate cy1, accession No. AY548207.1) 및 이엽우피소 (*Cynanchum auriculatum*, accession No. AB109974.1)을 이용하여 18S rDNA, ITS I, 5.8S rDNA, ITS II, 28S rDNA를 포함하는 단편을 증폭할 수 있는 프라이머를 제작하였다. 이엽우피소 및 백수오의 염기서열을 비교분석하여 SNP를 확인한 후 amplification refractory mutation system(ARMS)-PCR용 프라이머를 제작하였다 (그림 2-2).





(2) ITS 마커를 이용한 이엽우피소와 백수오의 판별 실험 결과 (그림 2-3)

이엽우피소와 백수오는 속은 다르지만 종이 같고 근연종이기 때문에 종간 교잡종이 일어날 가능성이 없지 않다. 이러한 교잡종은 엽록체 내에 존재하는 판별 마커로는 구분이 불가능하기 때문에 핵내 존재하는 ITS 유전자를 이용한 판별 마커를 개발하고자 상기한 프라이머를 이용하여 지역별로 수집된 계통에 대한 판별 실험을 수행한 결과 현재까지 수집된 모든 자원은 엽록체의 판별과 결과와 일치하여 교잡종은 없는 것으로 확인 되었다.



마. ARMS-PCR 기술을 이용한 백수와 이엽우피소의 판별 기술 개발

(1) 프라이머 디자인 결과

ARMS-PCR용 프라이머는 표 2-6과 표2-7에서 요약하였다. *trnL-trnF* 유전자의 ARMS-PCR용 Primer로 3' -말단에 위치하는 SNP에서 3번째 염기를 A, G, C로 돌연변이를 유기시킨 3가지 reverse primer를 제작하였으며, 핵내에 존재하는 ITS 유전자의 경우에는 정방향과 역방향 모두 T와 A로 돌연변이를 유기시킨 프라이머를 제작하여 사용하였으며 PCR은 아래의 조건으로 수행하였다.

표 2-6. Various ARMS-PCR primers designed based on SNPs on *C. auriculatum* and *C. wilfordii* (*trnL-trnF*)

	Primer name	Sequence	Tm(°C)	Size(bp)
<i>C. wilfordii</i>	392F	CGTACGGACTTAATTGGATTGAGCCTTAGTAA	64	828
	WIL trnLF-1R	TCAATTA AAAAGGGCGAAAAGAAGATC	61.6	
	WIL trnLF-2R	TCAATTA AAAAGGGCGAAAAGAAGAGTC	63.2	
	WIL trnLF-3R	TCAATTA AAAAGGGCGAAAAGAAGACTC	63.2	
<i>C. auriculatum</i>	392F	CGTACGGACTTAATTGGATTGAGCCTTAGTAA	64	828
	AUR trnLF-1R	TCAATTA AAAAGGGCGAAAAGAAGGATA	61.6	
	AUR trnLF-2R	TCAATTA AAAAGGGCGAAAAGAAGGGTA	63.2	
	AUR trnLF-3R	TCAATTA AAAAGGGCGAAAAGAAGGCTA	63.2	

표 2-7. Various ARMS-PCR primers designed based on SNPs on *C. auriculatum* and *C. wilfordii* (Nuclear ITS region of ribosomal DNA)

	Primer name	Sequence	Tm(°C)	Size(bp)
<i>C. wilfordii</i>	WIL ITS SNP marker-F	CCCTTGCTCGGTCGGTCA	59	504bp
	WIL ITS SNP marker-R	TGCCGGCAACTCGCGTAC	60.2	
<i>C. auriculatum</i>	AUR ITS SNP marker-F	CCCTTGCTCGGTCGGACC	59.8	504bp
	AUR ITS SNP marker-R	TGCCGGCAACTCGCGAAA	63	

(2) *trnL-trnF* 유전자를 이용한 ARMS-PCR

*trnL-trnF* 유전자의 경우에는 이엽우피소와 백수오의 염기서열을 분석한 후 2개의 SNP를 연속적으로 보이는 부위를 찾아서 역방향프라이머를 제작하였으며 정방향 프라이머는 SNP를 나타내지 않은 부위에서 제작하였다. 따라서 실험조건에 따라 결과가 혼동되었기 때문에 역방향프라이머에 인위적으로 돌연변이를 유기시킨 3종의 프라이머를 제작하여 그 특이성을 비교 조사하였다. 그 결과 3종의 역방향 프라이머 모두 이엽우피소와 백수오를 판별하기에 충분하였으며, 재현성을 보인 것으로 확인되었다(그림 2-4, 그림 2-5).

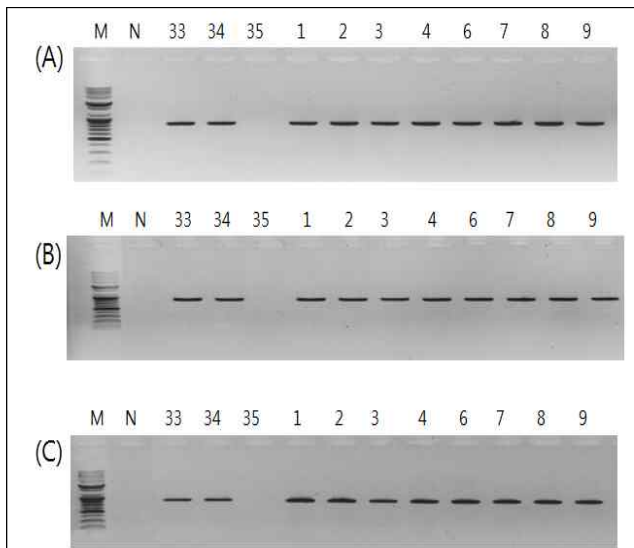


그림 2-4. The result of ARMS-PCR with specific primer for *C. wilfordii*, WIL *trnL-trnF* 1R(A), 2R(B) and 3R(C) of *trnL-trnF* gene as indicated Table 1. M, size marker; N, Negative control, no template, lane 35, *C. auriculatum* all the other lanes, *C. wilfordii* as indicated in Table 1.

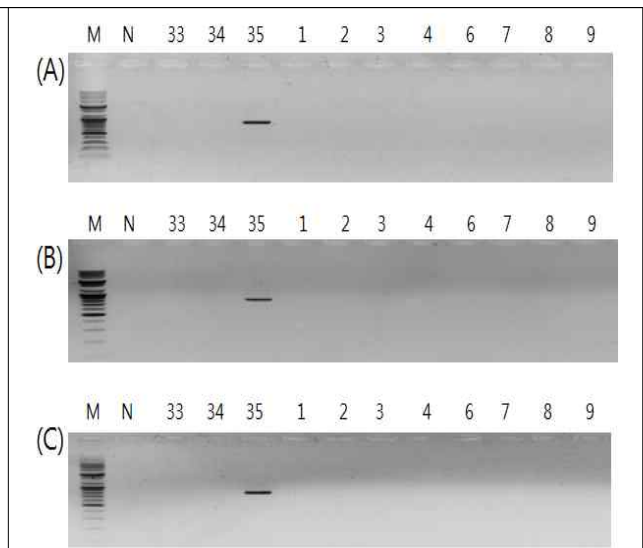
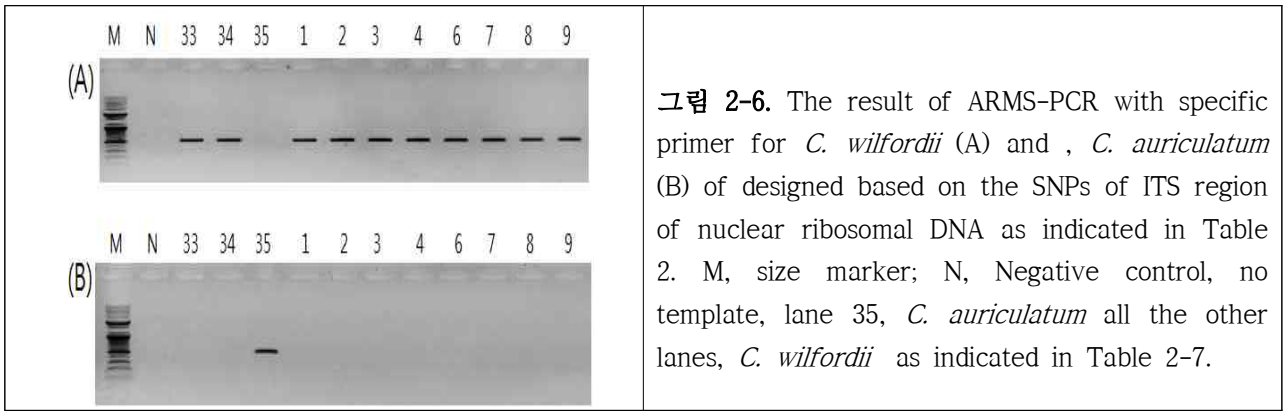


그림 2-5. The result of ARMS-PCR with specific primer for *C. auriculatum*, AUR *trnL-trnF* 1R(A), 2R(B) and 3R(C) of *trnL-trnF* gene as indicated Table 1. M, size marker; N, Negative control, no template, lane 35, *C. auriculatum* all the other lanes, *C. wilfordii* as indicated in Table 1.

(3) ITS 유전자를 이용한 ARMS-PCR

이엽우피소와 백수오의 ITS 영역의 염기서열을 분석한 후 정방향 및 역방향 모두 하나의 SNP를 나타내는 위치를 3' -말단으로 하여 상단으로 3번째의 염기를 각각 A로 변경하였다(표 2-7). 이렇게 하여 제작한 프라이머로 ARMS-PCR을 수행한 결과 역시 보다 특이성이 띄어지고 재현성이 높은 결과를 얻었다(그림 2-6). 결론적으로 경남농업기술원 약초시험장과 공동으로 강원도, 제주도 등에서 수집한 8 종의 백수오 계통은 모두 백수오가 확실한 것으로 판명되어 안심하고 농민들이 재배하도록 하였음



**바. 참당귀, 일당귀, 세발당귀의 분자생물학적 판별 기술 개발**

**(1) ITS 유전자 단편의 염기서열을 이용한 판별 프라이머 제작 (표 2-8 참조)**

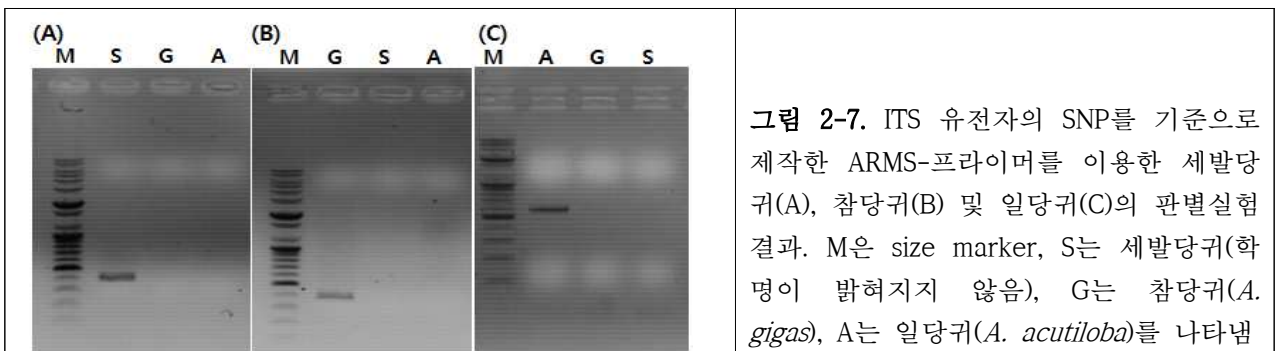
2년차에 수집된 중국당귀를 이용하여 1년차에 수집한 참당귀, 일당귀, 세발당귀에 대한 핵 내 ITS유전자의 염기서열 정보를 비교분석한 결과 2년차에 중국현지 약재시장에서 수입한 중국당귀시료는 참당귀로 판명되었다. 지속적으로 중국당귀시료를 확인하는 한편 2년차에는 우선 참당귀, 일당귀, 세발당귀에 대한 판별마커를 개발하기로 하였으며 이들 염기서열의 비교분석 결과로 확인된 SNP를 근거로 판별프라이머를 제작하였다(표 2-8 참조).

**표 2-8. ITS 유전자의 SNP를 기준으로 제작한 참당귀, 일당귀, 세발당귀의 판별용 프라이머**

	Primer name	Sequence	Tm(°C)	Size(bp)
참당귀	Cham_ITS_F	CCTGGTAGGTGGCCACGCT	64.7	387 bp
	Cham_ITS_R	TTTTTCCGCCAACCGCGCG	65	
일당귀	ill_ITS_F	AATGACCCGCTAACACGTC	56.6	561 bp
	ill_ITS_R	TGCTGCCTAAGGGTCATG	56.2	
세발당귀	SB_ITS_F	GCCTCGGTCTCCTGTCTGCGAATACT	56.5	410 bp
	SB_ITS_R	TTTTCCGCCAACCGCGCA	56.5	

**(2) ARMS-PCR에 의한 참당귀, 일당귀 및 세발당귀의 판별실험 결과**

상기한 프라이머와 참당귀, 일당귀 및 세발당귀로부터 분리한 게놈 DNA를 주형으로 하여 ARMS-PCR을 수행한 결과 ITS 유전자에서 보인 SNP를 기준으로 제작한 프라이머들이 각각의 계통을 정확하게 판별할 수 있는 것으로 확인되었다(그림 2-7). 따라서 향후 중국당귀와 함께 지역별로 또는 시장에서 수집한 다양한 종류의 당귀 계통들을 대상으로 보다 폭넓은 실험을 수행하여 실용화가 되도록 하여야 할 것으로 사료되었다. 또한 이 결과를 바탕으로 앞으로 시료의 상태 즉, 일차가공, 천일건조 또는 열풍건조 등에 의한 뿌리 시료, 약탕으로 제조한 당재 등에 포함된 당귀시료들을 확인 할 수 있는 다양한 연구를 수행할 수 있는 기반을 마련하였다.



## 사. 국산토종과 중국산 꾸지뽕 계통의 분자생물학적 판별 기술 개발

### (1) 엽록체 유전자단편(*trnL-trnF* 와 *matK*)내에 존재하는 단일염기다형성의 확인 및 특이판별용 프라이머 제작(표 2-9)

국내 토종으로 알려진 한국산과 중국에서 도입된 종으로 알려진 꾸지뽕 계통들을 대상으로 *trnL-trnF*와 *matK* 유전자단편을 증폭하여 염기서열 분석을 수행하여 *trnL-trnF* 유전자 단편의 경우에는 2개, *matK* 유전자의 경우에 10개의 위치에서 단일 염기단일염기다형성 패턴을 확인할 수 있었다. 특히하게도 한국산의 경우에는 *trnL-trnF* 유전자 단편의 약 707bp 부위에서 12 bp(CTTTTTAATTGA)가 반복되어 있는 것을 확인할 수 있었으며 이들을 바탕으로 프라이머를 제작하였다(표 2-9).

표 2-9. *trnL-trnF* 유전자단편을 이용한 ARMS-PCR용 프라이머 정보

Origin	Gene	Name	Accession No.	Sequence (5' - 3')	Tm (°C)	Size (bp)
Korea	<i>trnL-trnF</i>	trnLF-F	460	GGGTTTCAGAAGGCAATAATAAATCAT	55.8	375
		trnLF-R	459	CCTCTTACTATAAAATTTTCATTGTTGTCG	55.1	
China	<i>trnL-trnF</i>	trnLF-F	451	GGGTTTCAGAAGGCAATAATAAATAG	53.7	372
		trnLF-R	452	CTTACTATAAAATTTTCATTGTTGGCA	51.7	

### (2) 엽록체 유전자단편(*trnL-trnF*)에 대한 ARMS-PCR용 primer를 이용한 한국 및 중국 꾸지뽕 계통의 판별용 마커 개발

그림 2-8은 *trnL-trnF* 유전자의 SNP를 기준으로 5' -말단 쪽으로 2번째의 염기를 각각 다른 염기로 치환하여 ARMS-PCR용 primer를 제작한 결과를 도식화한 것이다.

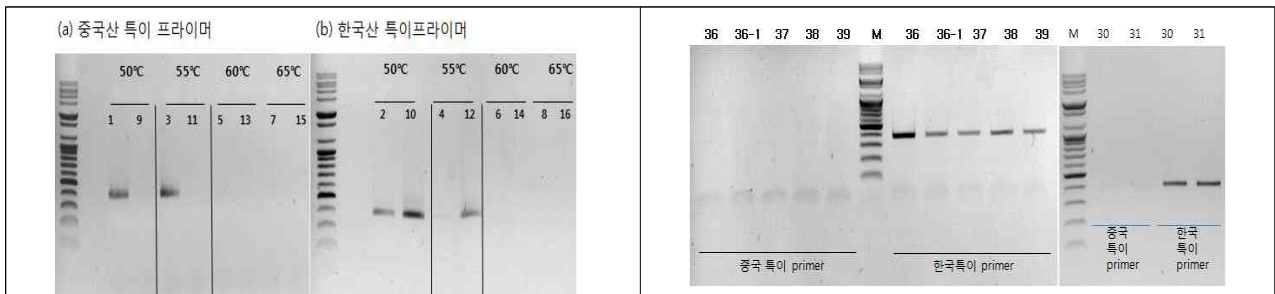


그림 2-8. *trnL-trnF* 유전자단편의 단일염기다형성을 이용하여 제작한 프라이머를 이용한 ARMS-PCR 결과. 중국계통(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8); 한국계통(9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16).

경남 산청군 생비량면의 김광연씨 농가에서 수집한 중국 혹은 한국 계통의 기원이 확실하게 알려진 계통을 대조구(수집번호, 41, 42)로 하여 ARMS primer의 작동 여부를 확인 한 후, 경남 진주시 대곡면(자원 수집번호, 36, 36-1), 경남 의령군 대의면(37), 경남 산청군 생비량면(38), 경남 진주시 미천면 대암(39), 그리고 전남 해남군 송지면 송호리 산 45(30, 31)에서 수집된 대상으로 분석한 결과 모두 한국산으로 판명되었다(그림 2-8).

### (3) 한국과 중국 꾸지뽕 계통의 교잡종 판별에 이용될 수 있는 핵내 DNA판별마커 개발

한국과 중국 꾸지뽕 계통은 종이 같은 것으로 상호 교잡이 가능할 것으로 판단되며 특히 최근에 중국에서 도입된 중국종이 대량으로 재배되면서 국내 전역에서 한국산 계통과 사료 교잡이 되어 유통되고 있을 것으로 사료된다. 이러한 교잡종은 상기한 엽록체 내에 존재하는 판별 마커로는 구분이 불가능 할 수 도 있다. 따라서 엽록체에 존재하는 유전자는 모계유전을 하

고 핵에 존재하는 유전자는 교배에 의하여 유전을 하기 때문에 핵내에 존재하는 ribosomal DNA를 암호 하는 유전자의 전사단위 내에 존재하는 intergenic transcribed spacer (ITS) 지역의 유전자단편에 나타나는 단일염기다형성을 확인한 다음 그것을 근거로 하여 각각을 구분할 수 있는 판별마커를 개발하여 교잡종도 판별 할 수 있도록 하였다.

ITS 유전자단편의 염기서열을 확보하고자 먼저 꾸지뽕의 ribosomal DNA의 전사단위 내에 존재하는 18S rRNA와 28S rRNA를 암호 하는 유전자를 GenBank에서 검색하여 기존에 알려진 염기서열 정보로부터 프라이머(표 2-10)를 제작하여 중국과 한국 꾸지뽕 계통(시료번호 41, 42) 으로부터 분리한 게놈 DNA를 이용하여 PCR로 증폭하여 얻은 단편을 직접 염기서열 분석하여 상호 비교한 결과 역시 예상한 바와 같이 아주 유사하여 단지 8개 정도의 염기만이 치환이 일어난 것으로 조사되었다. 주어진 염기서열을 기준으로 두 개의 단일염기다형성을 포함하는 양방향 프라이머 셋트를 제작하여 이들 두 계통을 판별하고자 하였다 (표 2-10).

표 2-10. 한국과 중국 꾸지뽕 계통간 교잡종을 판별하기 위한 핵내 ITS DNA의 SNP를 포함하는 primer의 정보

Target species	Name	Accession No.	Sequence (5' - 3')	Tm (°C)	Size (bp)
꾸지뽕의 rDNA 단편	ITS-F	421	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	58	762
	ITS-R	422	GCCGTTACTAGGGGAATCCTTG	57.6	
한국 꾸지뽕	Korea- ITS-F	439	GCCAAGTGCGTGCCGCTCAGC	68.7	458
	Korea- ITS-R	441	CGACAACCACCTTTTGCCACA	60.2	
중국 꾸지뽕	China- ITS-F	440	GCCAAGTGCGTGCCGCTCTGT	66.2	458
	China- ITS-R	442	CGACAACCACCTTTTGTCACG	57.5	

상기한 primer를 이용하여 *trnL-trnF* 유전자 마커로 모두 한국산으로 확인된 지역별로 수집된 꾸지뽕 자원에 대하여 PCR을 수행한 결과 역시 모든 자원에서 한국산으로 밝혀졌다(그림 2-9). 이 결과는 모계 유전을 하는 엽록체에 존재하는 *trnL-trnF* 유전자의 염기서열로부터 제작한 중국 및 한국 특이 프라이머를 사용하여 확실하게 구분이 가능하였던 계통에 대하여 핵내에 존재하는 ITS 유전자단편의 단일염기다형성을 기초로 제작한 프라이머로도 동일한 결과를 얻었으므로 이들 유전자원은 모두 그 기원이 한국인 것이 확실하다고 할 수 있다.

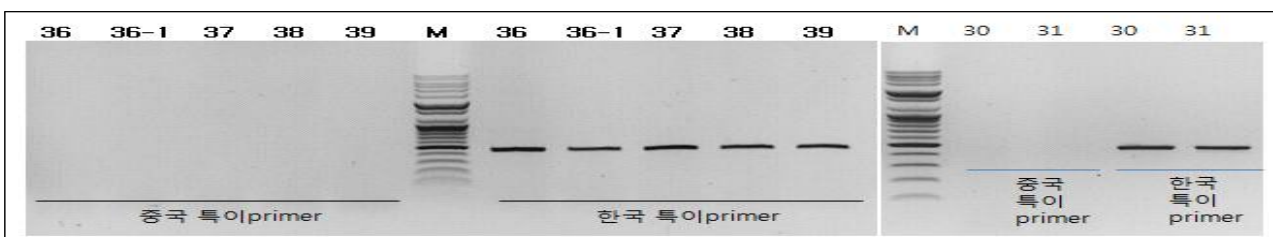


그림 2-9. 핵내에 내재하는 ITS 유전자단편의 단일염기다형성을 이용하여 제작한 프라이머로 국내에서 수집된 꾸지뽕 유전자원의 기원 판별 결과. 시료번호는 표 1에 기술한 수집된 지역을 각각 표시한 것이다.

본 연구의 또 다른 목표로서 한국과 중국 꾸지뽕은 동일한 학명을 사용하고 있으므로 같은 종이나 국가별로 그 계통이 서로 다른 것으로 이들 두 계통은 상호 교잡이 가능할 것이다. 따라서 상호교잡이 일어난 경우에는 엽록체 유전자 마커로는 구분이 불가능하기 때문에 핵내에 존재하는 ITS유전자를 이용할 수 있도록 별도로 판별 프라이머를 작하였다. ITS 판별 프라이머를 사용하여 경남 밀양의 재배 농가로부터 수집한 한 계통(수집 번호 2016-10, 표 2참조)에 대하여 분석을 한 결과, *trnL-trnF* 유전자 마커로는 모두 한국산으로 판명되었으나 ITS 마커로는 한국 뿐만 아니라 중국특이 프라이머를 사용한 경우에도 동일한 크기의 PCR 산물이

생성된 것으로 조사되었다(그림 2-10). 이러한 결과는 아마도 한국계통을 모본으로 하여 중국계통의 꽃가루가 수분되어 수정이 일어나 그 결과로 나타난 교잡종으로 추정된다. 향후 2016-10번 교잡종과는 반대로 중국계통이 모본이 되고 한국계통의 꽃가루가 수분이 된 교배조합을 찾아서 보다 많은 분자생물학적 마커를 사용한 추가연구가 필수적으로 수행되어야 할 것으로 사료되며 형태학적인 차이와 아울러 지표성분과 약리효과 등에 관한 연구가 병행될 경우 학문적으로 유용할 뿐만 아니라 이들의 유통과정에서 쉽게 판별이 가능할 것으로 보인다.

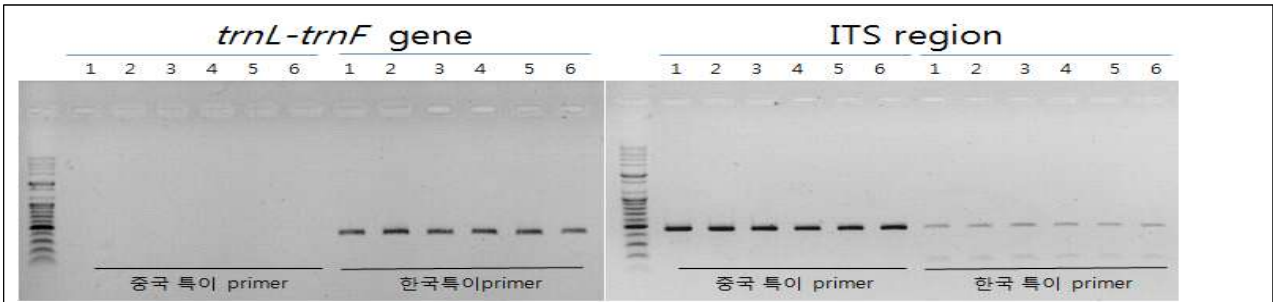


그림 2-10. 한국과 중국 계통간의 교잡종으로 추정되는 계통(수집번호 2016-10, 표 1참조)에 대한 엽록체판별 마커(*trnL-trnF*)와 핵내에 내재하는 ITS 판별 마커를 이용한 PCR 결과. Lane 1, 2, 3은 랫, Lane 4, 5, 6은 줄기에서 분리한 DNA를 사용한 것으로 2016-10번 시료에 대하여 3반복 실험을 수행한 결과임.

#### (4) High resolution melting (HRM) curve 패턴의 분석을 통한 한국과 중국 꾸지뽕 계통의 기원 판별 기술 개발

엽록체의 계놈에 존재하는 *trnL-trnF* 및 *matK* 유전자와 핵내에 존재하는 ITS 유전자단편의 염기서열을 비교한 결과 밝혀진 단일염기다형성패턴을 근거로 하여 HRM curve 분석용 프라이머를 디자인하였다. 이들 염기서열의 단일염기다형성을 하나 혹은 그 이상을 포함하도록 하여 중앙에 위치하도록 하여 크기가 약 200bp 정도 되는 PCR 산물을 생성하도록 프라이머를 디자인하였으며 그 염기서열 정보를 표 2-11에 요약 하였다.

표 2-11. HRM curve 패턴을 이용한 중국 및 한국 계통의 기원 판별용 프라이머의 염기서열 정보

Name	Accession No.	Sequence(5' -3')	Tm (°C)	Size (bp)
MAC-trnLF-F	487	GAAGATCTTTGAGAAAGGAATCCC	56.3	296
MAC-trnLF-R	406	TGCCAGGAACCAGATTTGAACT	57.2	
MAC-matK-F	485	GTGTGGTCTCAACCAGGAAG	57.2	197
MAC-matK-R	486	GCCAACGATCCAATCAGAGG	57.7	
MAC-ITS-F	488	TCCCGTGAACCATCGAGTC	58.2	205
MAC-ITS-R	489	GCACGTGACAAGGGACTTG	58.1	

각각의 유전자에 대한 HRM curve 패턴을 분석한 결과 그림 2-11에 제시한 바와 같이 *matK*와 *trnL-trnF* 그리고 ITS 유전자단편에 대하여 중국 및 한국 꾸지뽕계통의 서로 다른 HRM curve 패턴을 보여 계통들의 판별이 가능한 것으로 조사되었다. 특히 12bp의 반복서열을 포함하는 *trnL-trnF* 유전자의 경우 두 계통에 대하여 보다 확실하게 차이가 나는 패턴을 보여 향후 유통시장 등에서의 실용화에 적용될 수 있을 것으로 사료되었다.

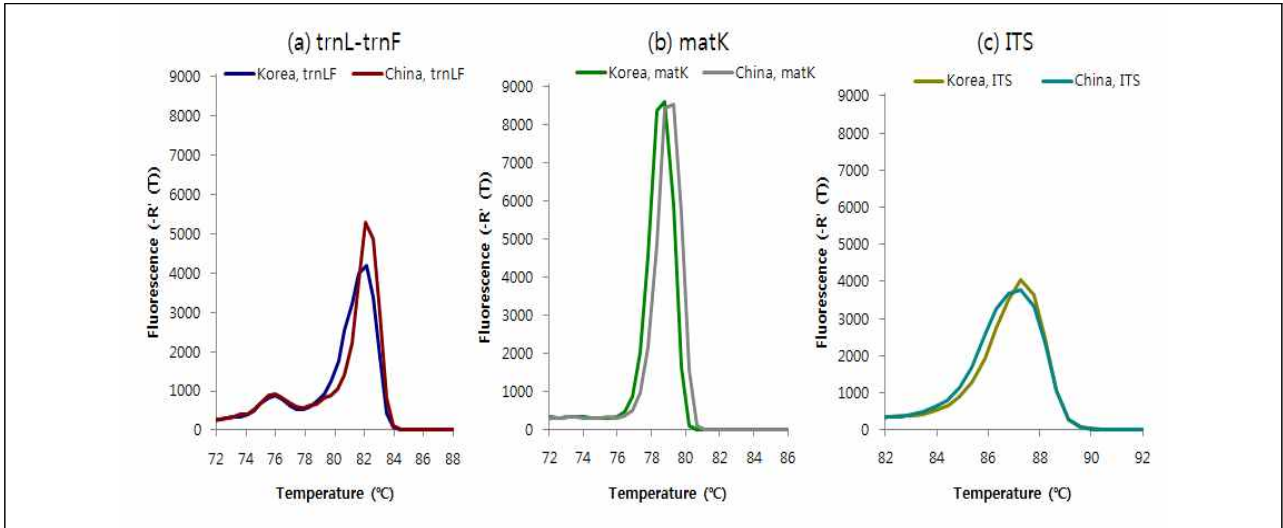


그림 2-11. 엽록체유전자, *trnL-trnF*(A), *matK*(B)와 핵내 유전자 *ITS*(C) 단편을 이용한 HRM curve 패턴에 따른 중국 및 한국 꾸지뽕 계통의 판별 결과.

### 3-1. 3차년도 연구수행 방법

#### 가. 유전자원 확보 및 보존 체계 구축

##### (1) 유전자원수집

1년차와 2년차에 수집된 유전자원을 기내 및 저온 냉장고에 보존하고 추가로 일부 유전자원을 수집함

##### (2) 수집된 유전자원의 보존 및 관리

수집된 종자는 보관하기가 용이한 종이봉투에 넣고 4°C 에 보관하였으며, 식물체는 포트에 옮겨 온실에서 재배하고 잎 조직을 소독 후 기내 배양조건을 확립하도록 하고, 뿌리의 배양조건 확립 등에 사용하였다.

#### 나. ARMS-PCR, HRM 패턴분석

1년차와 2년차에 기술한 재료 및 방법에 준하여 실험을 수행하였으며 해당되는 프라이머와 반응 조건만 달리하였다.

#### 다. 부정근 배양

백도라지, 적하수오, 백수오의 부정근을 배양하기 위하여 종자를 발아시켜 얻은 뿌리를 잘라 MS 액체배지 (MS powder with vit. 4.4g/L, Sucrose 30g/L)에 IBA 호르몬을 0.00, 0.5, 1.0, 1.5mg/L별로 처리하여 조사하였다.

#### 라. 항균활성 및 항산화효과 측정

##### (1) 백수오 추출물 조제

MS배지에서 키운 백수오 부정근을 건조하여 얻은 시료를 이용하여, 80% 에탄올 용매로 사용하여 2회 열수 추출하였다. 추출액은 여과지(Whatman No.)로 여과한 뒤 회전감압농축기를 이용하여 농축한 후 동결건조하였다. 동결 건조한 분말은 냉동보관 한 후 항균실험에 사용하였다.

**(2) 백수오 항균력 실험**

*Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* 에 대한 항균활성은 paper disc diffusion 방법을 사용하였다. TBS배지에 균을 도말한 다음 멸균된 paper disc를 올리고 DMSO에 100ug/ul의 농도로 용해된 시료를 paper disc에 50ul 흡착시킨 후, 37°C incubator에서 24시간 배양한 다음 디스크 주위의 생육 저해환 (Clear zone) 생성 유무를 확인하였다.

**3-2. 3차년도 연구결과**

**가. 우수약용작물의 육묘보급시스템 구축**

**(1) 지속적인 유전자원 수집**

(가) 당귀 유전자원 수집 : 국내 토종 당귀는 참당귀(*Angelica gigas* Nakai)이고, 국내의 지리산 고산지대에서 자생하는 것으로 알려진 세발당귀(*Angelica gigas* Jiri), 일본에서 자생하는 것으로 알려진 일당귀 (*Angelica acutiloba* Kigag)는 이미 1년차에 수집하였으나 3년차에는 동일한 속에 속하는 중국당귀(*Angelica sinensis* Oliv. Diels)와 그리고 속은 다르지만 구당귀로 알려진 *Levisticum officinale*을 중국과 미국에서 직접 분양 받아 확보하였다(표 3-1).

**표 3-1. 3년차에 수집된 당귀유전자원 현황**

일련번호	생약명/식물명	학명	분양, 수집지역 및 기원	입고형태
2016-28	중국당귀	<i>Angelica sinensis</i>	중국	한약재
2016-48	구당귀	<i>Levisticum officinale</i>	미국, Horizon Herbs (Williams, OR, USA)	종자(DNA) (충북대)

(나) 꾸지뽕 유전자원 수집 : 2년차에 확립된 핵내 ITS 및 엽록체(trnL-trnF) 마커로 확실하게 구분이 되지 않고 마치 한국계통과 중국계통이 교잡종인 것처럼 나타난 2016-10-6 및 2016-10-9번 계통에 대한 추가연구를 수행하기 위하여 3년차에 추가로 유전자원을 수집하여 조사하였다(표 3-2).

**표 3-2. 3년차까지 수집 및 보관중인 꾸지뽕 계통 현황**

일련번호	생약명/식물명	학명	분양, 수집지역 및 기원	입고형태
2014-41	꾸지뽕	<i>Maclura tricuspidata</i>	경남 산청군 생비랑면 (중국산)	잎
2014-42	꾸지뽕	<i>Maclura tricuspidata</i>	경남 산청군 생비랑면 (한국산)	잎
2016-33	꾸지뽕	<i>Maclura tricuspidata</i>	경남 산청군	잎
2016-34	꾸지뽕	<i>Maclura tricuspidata</i>	경남 사천시	잎
2016-36	꾸지뽕	<i>Maclura tricuspidata</i>	경남 진주시 경남과학기술대학교 약용식물원	잎
2016-10-6	꾸지뽕	<i>Maclura tricuspidata</i>	경남 밀양시(중국종)	잎
2016-10-9	꾸지뽕	<i>Maclura tricuspidata</i>	경남 밀양시(중국종)	줄기
2016-47	꾸지뽕	<i>Maclura tricuspidata</i>	중국 수입산(자연애제약)	건줄기



(다) 엉겅퀴계통 유전자원 수집 : 3년차 연차실적계획에 수정변경사항으로 이미 등록된 바와 같이 본 사업단의 참여기업인 ‘자연애제약’에서 최근 수요량이 급증하고 있는 유럽산 엉겅퀴에 대비하여 국내산 엉겅퀴를 판별 할 수 있는 마커의 개발을 요구하여 국내외 엉겅퀴계통들을 수집한 결과를 표 3-3에 요약하였다. (1년차에 수집한 국산 대계와 유럽산 엉겅퀴를 대조로 하여 추가로 캐나다, 국산 섬엉겅퀴 등 6점을 수집하였다

**표 3-3. 수집 및 보관중인 엉겅퀴 계통 현황**

일련번호	생약명/식물명	학명	분양, 수집지역 및 기원	입고형태
2014-28	엉겅퀴	<i>Cirsium japonicum</i>	국산(대계)	전초/뿌리
2014-29	엉겅퀴	<i>Silybum marianum</i>	유럽(milk thistle)	잎
2016-37	엉겅퀴	<i>Cirsium arvense</i>	캐나다	DNA
2016-38	엉겅퀴	<i>Cirsium arvense</i>	캐나다	DNA
2016-43	엉겅퀴	<i>Cirsium japonicum</i>	국산(대계)	잎
2016-44	엉겅퀴	<i>Cirsium nipponicum</i>	국산(섬엉겅퀴)	잎
2016-45	엉겅퀴	<i>Cirsium japonicum</i>	국산(대계)	잎
2016-46	엉겅퀴	<i>Silybum marianum</i>	유럽(milk thistle)	잎

**(2) 우수약용작물의 농가보급시스템 구축을 위한 경남과학기술대학교의 역할 정립**

(가) 기내 보존 시스템 구축 (경남과학기술대학교)

(나) 혼·오용 약용작물의 분자생물학적 판별 시스템 구축

(다) 주요 약용자원의 부정근 배양 등 조직배양 체계 구축 : 생근과 비교하여 기내에서 배양한 부정근, 조직 또는 배양세포와의 약효성분 비교 등 기초연구 시스템 구축

(라) 약용자원의 유전·육종 시스템 구축을 통한 우수약용자원 보급

**(3) 경남지역의 산학연 공동협력체계 구축을 통한 우수약용작물의 농가보급 시스템 구축**

(가) 경남농업기술원 약용자원연구소의 육묘보급시설 이용극대화

(나) 경남생약조합의 약초 재배 포장의 활용 극대화

(다) 경남한방약초연구소의 물질분석, 향산화효과 검정 등의 시설 활용 극대화

(라) 경남 약초 재배농가들의 이윤 극대화

**다. 분자생물학적 판별 마커로 확인된 약용자원의 농가보급 시스템 구축**

**(1) 장백도라지의 농가보급시스템 구축**

경남농업기술원, 약용자원연구소 약용작물육묘보급시설을 이용하여 기내 또는 플러그묘 형태로 증식시킨 장백도라지를 농가에 보급하는 시스템 구축으로 거창, 산청, 합천 등에 연간 300만주 이상을 보급하여 농가소득 증대에 기여함

**(2) 지역별 재배농가에서 수집된 백수오의 분자생물학적 판별 및 현장 적용**

※ SCI 논문, Plant Biotechnology Report, P(2017) 11:127-133에 발표됨)

(가) 국내의 지역별 농가에서 수집한 백수오계통의 수집 현황 : 1년차 수행과정에서 충북 음성과 경북 봉화에서 수집한 백수오 (*Cynanchum wilfordii*)와 이엽우피소(*Cynanchu auriculatum*)를 대상으로 2년차에 개발한 백수오와 이엽우피소의 판별 마커를 사용하여 국내 지역별로 재

배되고 있는 백수오 계통을 농가에서 직접 채취하여 이엽우피소의 혼재여부를 조사하였다. 경남 거창에서 1점, 함양 1, 제주도조천 1, 강원도 평창 1, 정선 4점 등 총 8점을 수집하였으며 이들에 대한 진위 여부를 판정하였다.

(나) Amplification refractory mutation system (ARMS)-PCR용 Primer 조합의 개발 : 2년차에 개발한 엽록체와 핵내 유전자를 이용하여 백수오와 이엽우피소의 혼재여부 및 혼합비율 까지 측정이 가능한 마커를 이용하여 보다 정교한 판별마커 조합을 개발하고자 primer의 3´-말단에서 3번째 염기를 임의로 변이를 유발하도록 하여 이엽우피소와 백수오에 해당하는 특이 allele의 핵산증폭을 보다 신뢰성이 있고 확실하게 할 수 있는 ARMS-PCR 기술을 개발하고자 하였다. 따라서 기존에 2년차에 개발된 엽록체 trnL-trnF 유전자와 핵내 ITS 유전자의 특이 프라이머 조합을 이용하여 3´-말단에서 3번째 염기를 임의로 변경시킨 프라이머 조합을 제작하였다(표 3-4).

Table 3-4. Primer sequences used in this study.

Target species	Primers	Sequences (5'-3')	Tm (°C)	Size (bp)
<i>C. wilfordii</i>	TrnL-F forward	CGTACGGACTTAATTGGATTGAGCCTTAGTAA	64.0	828
	TrnL-F reverse	TCAATTTAAAAGGGCGAAAGAAGATTTC	59.0	
	TrnL-F specific reverse-1	TCAATTTAAAAGGGCGAAAGAAGAATC	61.6	
	TrnL-F specific reverse-2	TCAATTTAAAAGGGCGAAAGAAGAGTC	63.2	
	TrnL-F specific reverse-3	TCAATTTAAAAGGGCGAAAGAAGACTC	63.2	
<i>C. auriculatum</i>	TrnL-F forward	CGTACGGACTTAATTGGATTGAGCCTTAGTAA	64.0	828
	TrnL-F specific reverse	TCAATTTAAAAGGGCGAAAGAAGGTTA	59.0	
	TrnL-F specific reverse-1	TCAATTTAAAAGGGCGAAAGAAGGATA	61.6	
	TrnL-F specific reverse-2	TCAATTTAAAAGGGCGAAAGAAGGGTA	63.2	
	TrnL-F specific reverse-3	TCAATTTAAAAGGGCGAAAGAAGGCTA	63.2	
<i>C. wilfordii</i>	ITS forward	CCCTTGCTCGGTCGGTCA	59.0	504
	ITS reverse	TGCCGGCAACTCGCGTAC	60.2	
	ITS specific forward-1	CCCTTGCTCGGTCGGACA	60.7	
	ITS specific reverse-1	TGCCGGCAACTCGCGAAC	60.7	
	ITS specific forward-2	CCCTTGCTCGGTCGGGCA	63.0	
	ITS specific reverse-2	TGCCGGCAACTCGCGGAC	63.0	
	ITS specific forward-3	CCCTTGCTCGGTCGGCCA	63.0	
ITS specific reverse-3	TGCCGGCAACTCGCGCAC	63.0		
<i>C. auriculatum</i>	ITS forward	CCCTTGCTCGGTCGGACC	59.8	504
	ITS reverse	TGCCGGCAACTCGCGAAA	63.0	
	ITS specific forward-1	CCCTTGCTCGGTCGGTCC	63.0	
	ITS specific reverse-1	TGCCGGCAACTCGCGTAA	58.4	
	ITS specific forward-2	CCCTTGCTCGGTCGGGCC	65.3	
	ITS specific reverse-2	TGCCGGCAACTCGCGGAA	60.7	
	ITS specific forward-3	CCCTTGCTCGGTCGGCCC	65.3	
ITS specific reverse-3	TGCCGGCAACTCGCGCAA	60.7		

(다) ARMS-PCR기술을 이용한 농가에서 수집한 계통의 백수오 진위여부 조사 :

① 엽록체 유전자인 trnL-trnF 단편 마커를 이용한 백수오의 진위 여부 조사 상기한 프라이머 조합을 이용하여 농가에서 수집된 백수오 계통의 진위 여부를 확인하고자 ARMS-PCR을 수행한 결과 2016년도에 수집한 경남 거창, 함양, 제주도, 강원도 평창 및 정선에서 수집한 8계통들은 모두 백수오(Cw)로 확인되었다. 1년차에 대조구로 이엽우피소로 판명된 계통과 비교하여 확실하게 구분이 가능하였으며, 프라이머 조합의 3´-말단에서 3번째 염기를 임의로 변경하여 제작한 3가지 다른 프라이머 조합을 사용하였을 경우에 모든 조합에서 동일한 결과를 얻을 수 있었다(그림 3-1).

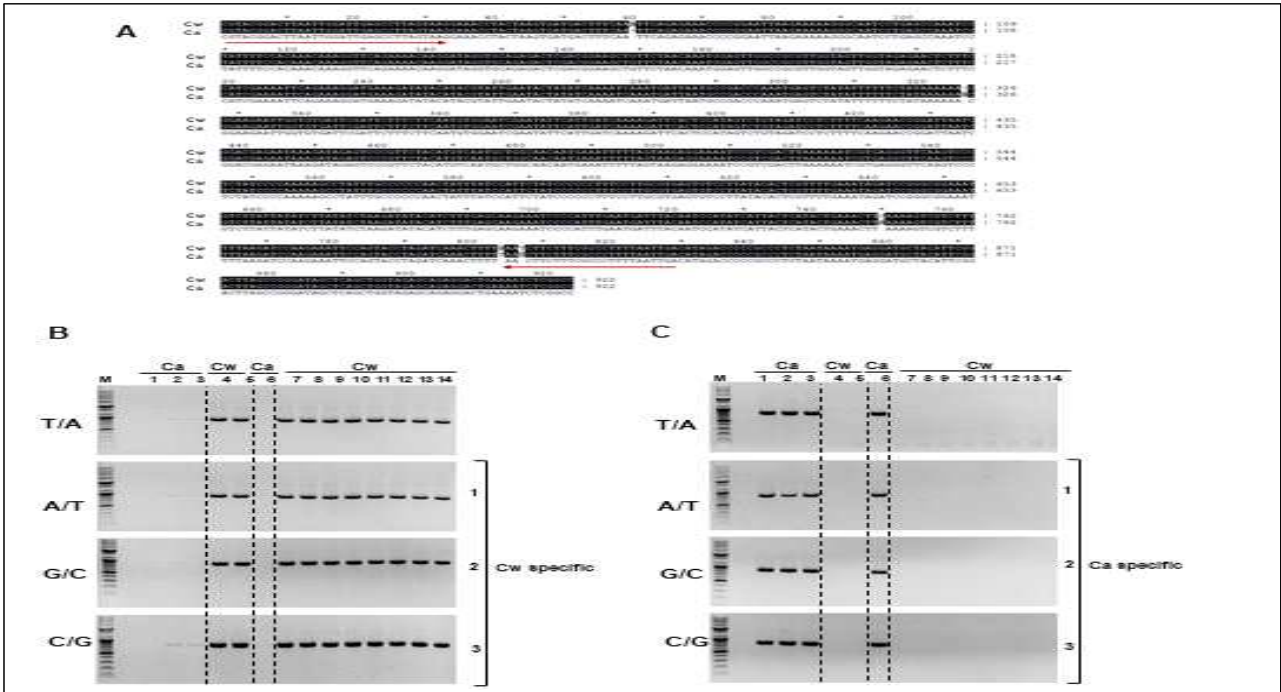


그림 3-1. Primer sets and products of ARMS-PCR with mismatched primer sets using the *TrnL-F* (GenBank JX028242.1) chloroplast intergenic region in the two similar medicinal plant species, *C. wilfordii* (Cw), and *C. auriculatum* (Ca). (A) Primer positions for Cw or Ca specific ARMS-PCR analysis. Box indicate the mismatched primer sequence regions; (B) PCR results using Cw-specific mismatched primers; (C) PCR results using Ca-specific mismatched primers. Sample numbers 1, 2, 3 and 6 were from Ca specimens; sample numbers 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 and 14 were from Cw specimens. M indicate marker.

② 핵내 ITS 유전자 마커를 이용한 백수오의 진위 여부 조사 : 핵의 게놈에 존재하는 ribosomal DNA 단편의 internal transcribed spacer region에서 제작한 판별마커는 이미 2년차에 개발하였으며 3년차에는 엽록체의 *trnL-trnF* 유전자마커와 유사하게 ARMS-PCR 기술을 적용하고자 3' -말단에서 3번째 염기를 임의로 변경하여 제작한 3가지 다른 프라이머 조합을 사용하여 핵산증폭실험을 수행한 결과 *trnL-trnF* 마커와 동일하게 3년차 (2016년도)에 전국의 지역별 농가재배포장에서 수집한 8계통은 모두 백수오인 것으로 판명되었다. ITS barcode의 경우에는 1번 조합 즉 A/T 또는 T/A변이조합에서 가장 우수한 결과를 보였으며 다른 2 및 3번 조합 즉 G/C 또는 C/G 변이의 경우에는 단일밴드만 나타나지 않아 마커로 사용하기에 부적절한 것으로 조사되었다(그림 3-2). 따라서 3년차에 걸쳐 개발한 두 종류의 유전자단편으로부터 개발한 판별 마커조합은 실제로 현지 포장이나 시중에 유통되고 있는 백수오의 진품 판별에 활용될 수 있을 것으로 판단되며 본 연구결과는 SCI 논문뿐만 아니라 특허도 출원하여 현재 심사 중에 있다.

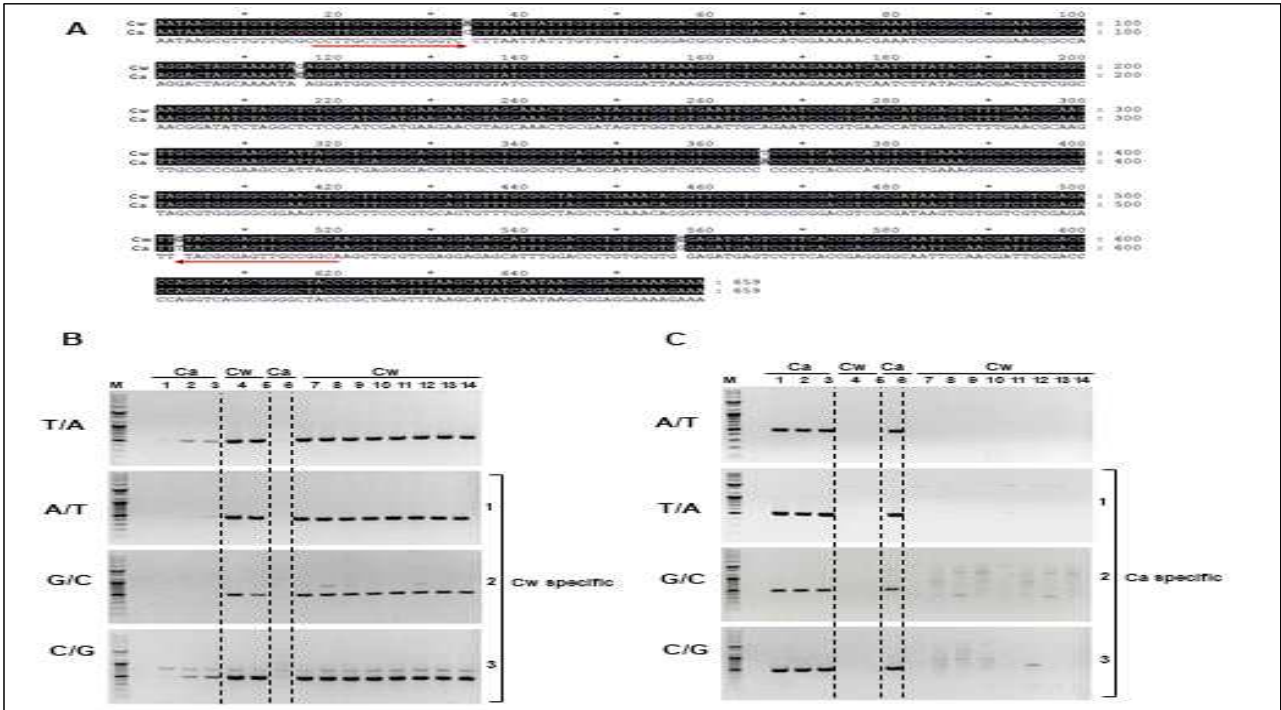


그림 3-2. Primer sets and products of ARMS-PCR with mismatched primer sets using the *ITS* nuclear ribosomal DNA intergenic region (accession numbers AY548207.1 and AB109974.1) in the two similar medicinal plant species, *C. wilfordii* (Cw) and *C. auriculatum* (Ca). (A) Primer positions for Cw or Ca specific ARMS-PCR analysis; (B) PCR results using Cw-specific mismatched primers; (C) PCR results using Ca-specific mismatched primers. Sample numbers 1, 2, 3 and 6 were from Ca specimens; sample numbers 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 and 14 were from Cw specimens. M indicate marker.

## (2) 국가별, 지역별 당귀계통의 분자생물학적 판별 마커 개발 및 현장적용

### (가) ITS barcode를 이용한 세발당귀의 판별 마커 개발

① 염기서열 비교분석을 통한 SNP 확인 : 1년차에 수집한 참당귀, 세발당귀, 일당귀 그리고 3년차에 수집한 중국당귀와 구당귀를 대상으로 핵내 ITS 유전자단편을 증폭하여 염기서열을 비교분석하여 다양한 SNP를 확인하였다 (그림 3-3). 수집된 당귀 계통별 시료의 잎 또는 건 뿌리 등으로부터 게놈 DNA를 분리한 후 ITS 유전자단편을 증폭하여 염기서열을 비교분석하여 그림 3-3에 도식화 하였다. 약 800 bp에 해당하는 염기서열을 비교 분석한 결과 세발당귀(SB)는 참당귀(gigas)와 단 2개의 염기(143, 512번)만 염기가 다른 것으로 확인되었으며, 종이 다른 중국당귀, 일당귀와는 보다 많은 차이를 보였고, 특히 속이 다른 구당귀와는 크게 차이가 나는 것으로 조사되었다. 세발당귀는 국내의 지리산 고산지대에서 자생하는 참당귀로 알려져 있으며 형태학적으로는 뿌리가 가늘다고 하여 세발당귀라고 명명(그림 3-4)한 것 외에는 거의 육안으로 구분이 되지 않으므로 염기서열은 동일할 것으로 예측하였으나 두 개의 SNP를 확인할 수 있어 이들의 유연관계에 관한 추가연구가 필요한 것으로 조사되었다.

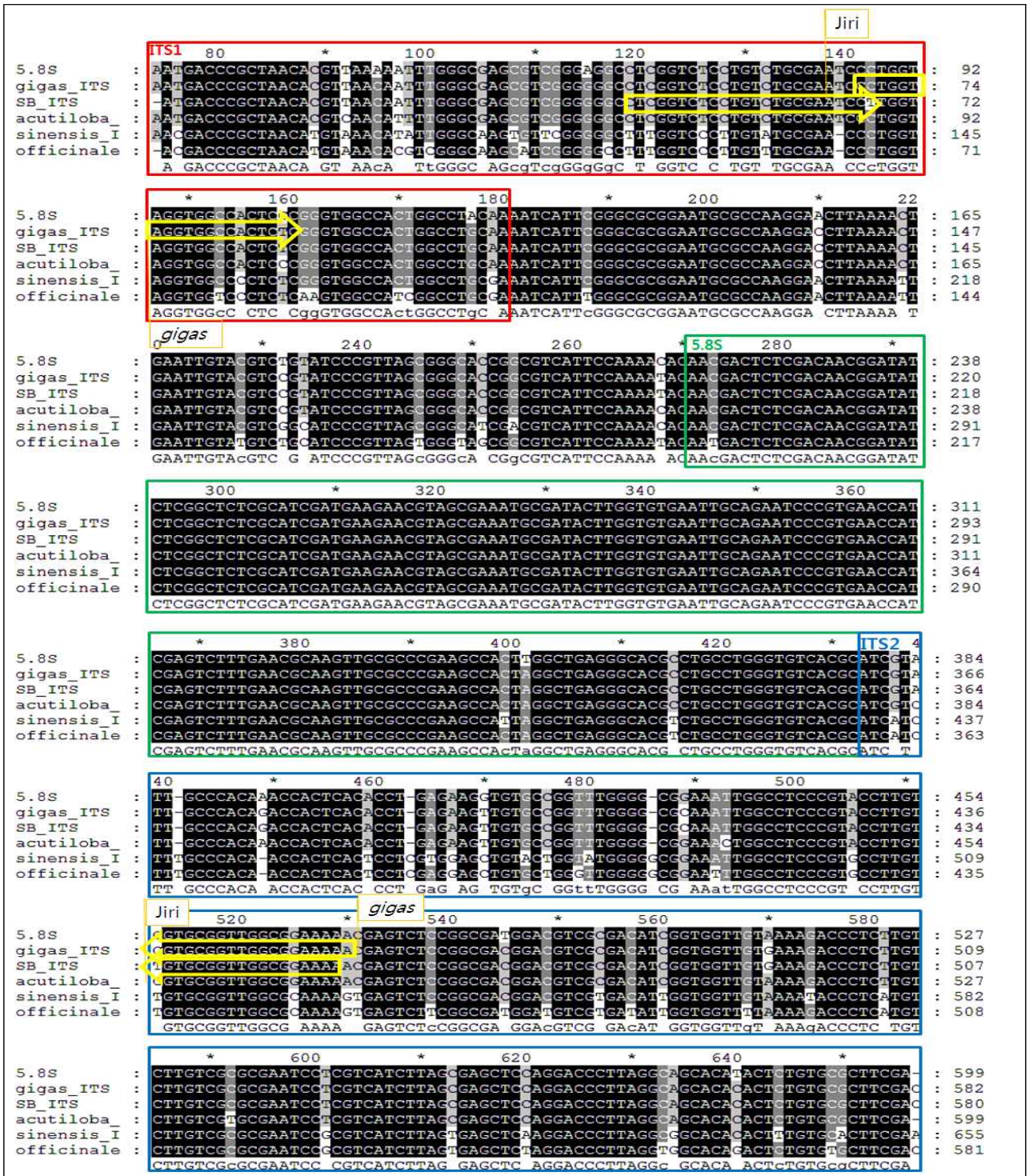


그림 3-3. 5종의 당귀 종에 대한 핵 내 ribosomal rDNA 단편의 염기서열 비교 분석 결과. 참당귀 (*gigas*), 세발당귀(SB\_ITS)에 대한 특이 판별용 정방향 및 역방향프라이머의 위치를 각각 표시하였으며, ITS I, 5.8S rDNA, ITS II 지역을 각각 다른 색 상자로 표시하였다



그림 3-4. 세발당귀(*Angelica gigas* Jiri)(좌), 참당귀(*Angelica gigas* Nakai)(우)의 형태학적 비교

② 국내 자생하는 당귀(세발당귀 및 참당귀)의 판별 마커 개발 : 세발당귀와 참당귀의 염기서열을 비교하면 2개의 SNP(143, 512번)가 확인되어 이들을 이용하면 가능할 것으로 사료되었으나 두 번째 SNP는 참당귀와 일당귀는 동일한 염기 “C” 이나, 세발당귀, 중국당귀와 구당귀는 동일한 “T” 로 나타나 5종의 당귀계통을 동시에 효과적으로 구분할 수 있는 판별마커를 제작하기가 어려웠다. 따라서 우선 국내자생 당귀인 세발당귀와 참당귀를 그룹으로 다른 3종으로부터 구분할 수 있는 판별마커를 먼저 개발하여 국내자생 당귀그룹을 구분 한 후 이들 그룹으로부터 세발당귀와 참당귀를 각각 구분할 수 있는 판별 마커를 개발하도록 하였다. 국내 자생그룹을 구분할 수 있는 판별마커는 그림 3-3의 염기서열 비교분석결과를 통하여 세발당귀 및 참당귀는 동일하고 다른 중국당귀, 일당귀, 구당귀와는 차이를 보이는 SNP를 기준으로 제작하였다 (표 3-5).

표 3-5. 국내자생 당귀 그룹(세발당귀, 참당귀)의 판별용 프라이머 정보

	Name	Sequence (5' - 3' )	Tm(°C)	Access. No	Size (bases)
국내자생당귀 (세발당귀 및 참당귀)	Kor_ITS_SNP_F	ATGACCCGCTAACACGTT	53.9	627	514
	Kor_ITS_SNP_R	CAAGACAAGAGGGTCTTTC	55.2	628	

상기한 프라이머를 사용하여 핵산증폭실험을 수행하였다(그림 3-5).

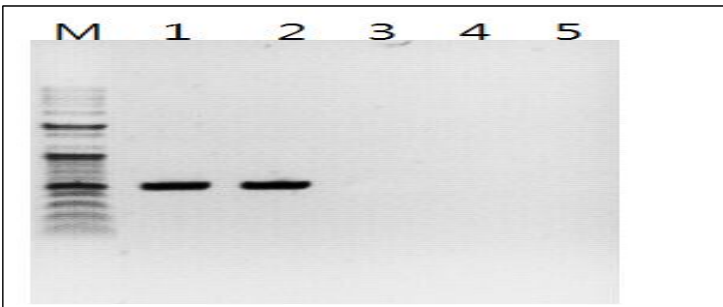


그림 3-5. 국내 자생종인 세발당귀와 참당귀를 구분하기 위한 프라이머(표 2 참조)를 이용한 PCR 실험 결과. M, 분자 크기; 1, 세발당귀; 2, 참당귀; 3, 일당귀; 4, 중국당귀; 5, 구당귀.

③ 세발당귀 및 참당귀의 구분을 위한 판별 마커의 제작 : 세발당귀와 참당귀사이도 구분이 가능하고 아울러 중국당귀, 일당귀, 그리고 구당귀와도 구분이 가능한 판별마커를 제작하기 위하여 먼저 세발당귀에만 특이하게 적용되는 정방향프라이머는 다른 4 종 즉 참당귀, 중국당귀, 일당귀, 구당귀의 염기와는 유일하게 다른 하나인 143번 염기 “T” 를 3' -말단으로 하고 역방향은 512번 염기 “T” 를 3' -말단에 위치하게 하였는데 이는 참당귀와 일당귀의 염기와는 다르나 중국당귀와 구당귀와는 동일하였다. 이렇게 디자인하여 제작한 정방향과 역방향 프라이머를 각각 SB\_ITS\_SNP\_F와 SB\_ITS\_SNP\_R로 명명하였다 (표 3-6).

표 3-6. 세발당귀의 판별용 ITS 머커의 염기서열 정보

	Name	Sequence (5' - 3' )	Tm(°C)	Access. No	Size (bases)
세발	SB_ITS_SNP_F	CGGTCTCCTGTCTGCGAATCCT	63.1	605	406
	SB_ITS_SNP_R	TTTTCCGCCAACCGCACA	60.2	538	
당귀	SB_ITS_ARMS_F_A	CGGTCTCCTGTCTGCGAATACT	60.3	606	
	SB_ITS_ARMS_F_T	CGGTCTCCTGTCTGCGAATTCT	60.9	607	
	SB_ITS_ARMS_F_G	CGGTCTCCTGTCTGCGAATGCT	63.7	608	
	SB_ITS_ARMS_R_T	TTTTCCGCCAACCGCTCA	59.8	536	
	SB_ITS_ARMS_R_G	TTTTCCGCCAACCGCGCA	63.7	478	
	SB_ITS_ARMS_R_C	TTTTCCGCCAACCGCCCA	63.2	537	

반면에 참당귀의 정방향 프라이머는 160번의 염기 “T” 를 3’ -말단에 위치하게 하였는데 이는 일당귀와는 다르나 세발당귀, 중국당귀, 구당귀와는 동일하였다. 그러나 역방향 프라이머는 세발당귀의 판별용 역방향 프라이머와 동일한 위치인 512번 염기 “C” 를 3’ -말단에 위치하게 하여 반대로 일당귀와는 동일하나 세발당귀와 중국당귀 그리고 구당귀와는 다른 염기이므로 정방향과 역방향 프라이머를 사용하면 참당귀만 구분이 가능한 판별 마커를 개발하도록 디자인 하여 각각을 gigas\_ITS\_SNP\_F와 gigas\_ITS\_SNP\_R로 명명하였으며 그에 따른 ARMS-PCR용 프라이머도 동시에 제작하였다(표 3-7).

표 3-7. 참당귀의 판별용 ITS 머커의 염기서열 정보

	Name	Sequence(5' - 3' )	Tm(°C)	Access.No	Size(bp)
참당귀	gigas_ITS_SNP_F	CCTGGTAGGTGGCCACTCT	64.7	539	387bp
	gigas_ITS_SNP_R	TTTTTCCGCCAACCGCACG	65	544	
	gigas_ITS_ARMS_F_A	CCTGGTAGGTGGCCACACT	61.2	540	
	gigas_ITS_ARMS_F_G	CCTGGTAGGTGGCCACGCT	64.7	479	
	gigas_ITS_ARMS_F_C	CCTGGTAGGTGGCCACCCT	64.2	541	
	gigas_ITS_ARMS_R_T	TTTTTCCGCCAACCGCTCG	61.3	542	
	gigas_ITS_ARMS_R_G	TTTTTCCGCCAACCGCGCG	65	480	
	gigas_ITS_ARMS_R_C	TTTTTCCGCCAACCGCCCG	64.5	543	

③ 세발당귀 및 참당귀의 판별용 핵 내 ITS 우수 판별마커 검증 : 상기한 프라이머 조합을 사용하여 각 계통별 유전자의 증폭은 전술한 바와 같이 수행하였으며, 다만 각각의 프라이머 셋트별로 주어진 Tm값을 annealing 온도로 하였다. 그 결과 세발당귀 판별용 특이 프라이머 중 내재하는 단일염기다형성을 이용하여 제작한 프라이머(SB\_ITS\_SNP\_F와 SB\_ITS\_SNP\_R, accesseion 번호 605와 538)를 사용한 경우에는 참당귀, 세발당귀, 일당귀, 중국당귀 그리고 구당귀 등 거의 모든 시료를 구분하지 않고 밴드를 형성하였다. 그러나 3’ -말단에 인접한 세 번째 염기를 “T” 또는 “G” 로 변경한 607+536, 608+478번 프라이머 조합을 사용한 경우에 세발당귀 시료에만 선명하게 밴드가 나타나고 다른 시료에는 모든 밴드가 사라져 확실하게 판별이 가능하다는 결론을 얻을 수 있었다. 반면에 “A” 또는 “C” 로 변경한 프라이머 조합에는 ARMS-PCR의 효과가 없는 것으로 조사되었다. 한편, 참당귀의 판별용 프라이머의 경우에도 “G” 로 변경한 479+480번 프라이머 조합에서만 참당귀 시료에서 밴드를 형성하여 단 한 조합만 판별마커로 사용이 가능한 것으로 확인되었다. 하지만 전반적으로 강도가 약한 밴드를 생산하였다 (그림 3-6).

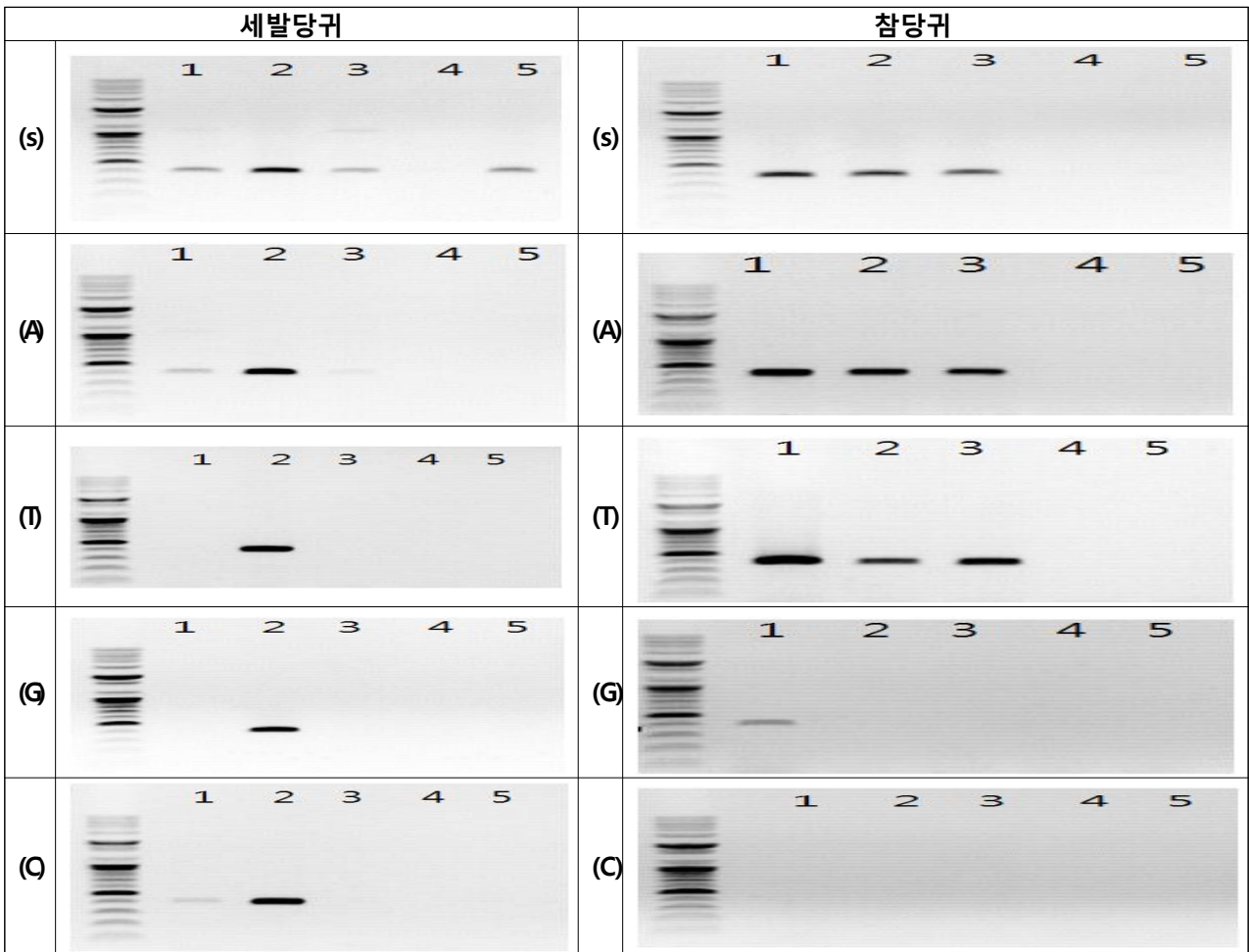


그림 3-6. 세발당귀 및 참당귀의 구분을 위한 판별 마커(표 3, 4 참조)를 이용한 ARMS-PCR 실험 결과. (S)는 당귀 계통별로 내재하는 단일염기다형성만 포함하는 프라이머, 그리고 (A), (T), (G), (C)는 3' -말단에 인접한 세 번째 염기서열을 해당하는 염기로 변경하여 만든 ARMS-PCR용 프라이머 조합임. 1, 세발당귀; 2, 참당귀; 3, 일당귀; 4, 중국당귀; 5, 구당귀.

(다) 중국당귀, 일당귀, 구당귀의 판별 마커 개발

① 중국당귀, 일당귀 및 구당귀 등 5계통에 대한 ITS의 염기서열 비교분석을 통한 SNP 확인 : 공시한 당귀 계통별 시료의 잎 또는 건 뿌리 등으로부터 게놈 DNA를 분리한 후 핵 내에 존재하는 ITS의 염기서열을 비교분석하기 위하여 기존에 알려진 primer 셋트 (Forward, 5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' ; Reverse, 5' - GCCGTTACTAGGGGAATCCTTG-3' )를 이용하여 ITS 단편을 증폭한 후 염기서열분석을 하여 상호 비교분석한 결과를 도 2에 제시하였다. 약 800 bp에 해당하는 염기서열을 비교분석한 결과 중국당귀, 일당귀는 같은 속이지만 종이 다르므로 국내토종으로 알려진 참당귀 및 세발당귀와는 ITS I 및 ITS II 영역에서 많은 염기의 치환과 결실 등에 의한 단일염기다형성을 보였다. 특히 속이 다른 구당귀와는 보다 많은 차이를 나타내었다(그림 3-7).



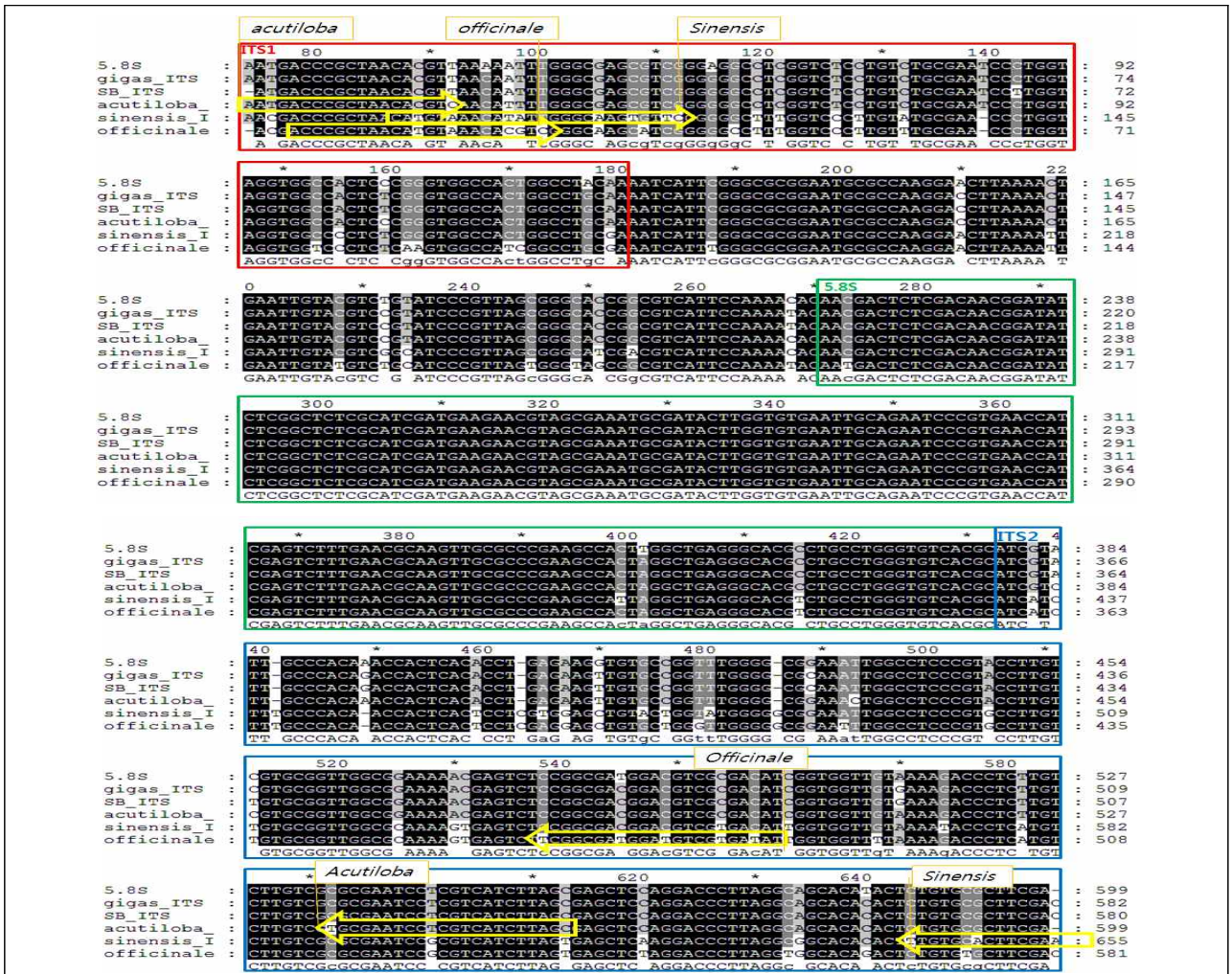


그림 3-7. 당귀계통별 ITS 유전자단편의 염기서열 비교분석결과. 정방향 및 역방향 프라이머의 위치를 각각 표시하였다. ITS I, 5.8S rDNA, ITS II 영역을 각각 다른 색 상자로 표시하였다.

② 중국당귀의 핵 내 ITS유전자를 이용한 판별마커 개발 : 중국에서 건재 한약재 또는 건장식품 등으로 수입되는 중국당귀의 판별마커를 개발하기 위하여 도 1의 염기서열 비교분석결과 다른 4종의 당귀 종들과 단일염기다형성을 보이는 위치에서 정방향 및 역방향 프라이머를 제작하도록 하였다. 즉 112번째 염기가 중국당귀만 유일하게 “C” 로 다른 4종의 “G” 와는 차이를 나타내어 정방향프라이머의 3’ -말단에 위치하도록 디자인하였으며, 마찬가지로 644번째의 염기가 다른 4종은 “C” 인 반면에 중국당귀만 “T” 를 나타내어 이를 역방향의 3’ -말단에 위치하도록 하여 프라이머를 제작하여 각각 inensis\_ITS\_SNP\_F와 sinensis\_ITS\_SNP\_R로 명명하였다(표 3-8).

표 3-8. 중국당귀의 판별용 ITS 마커 염기서열 정보

	Name	Sequence	Tm(°C)	Accession	
				No.	Size (bp)
중국 당귀	sinensis_ITS_SNP_F	CATGTAAACATATTGGGCAAGTG TTC	55.8	599	577bp
	sinensis_ITS_SNP_R	GGTCCACATT CGAAGTGCACAA	59.6	600	

상기한 프라이머를 사용하여 국내외서 수집한 당귀종으로부터 분리한 DNA를 사용하여 다음과 같이 핵산증폭실험을 수행하여 그 결과를 그림 3-8에 도식화하였다. 대조구로 사용한 다른

당귀종 즉 국내토종으로 알려진 참당귀, 세발당귀, 일당귀 그리고 속이 다른 구당귀에는 DNA가 증폭되지 않았으나 중국당귀에만 예상한 크기(577 bp)의 DNA가 증폭됨을 확인하여 표 3-8에서 제시한 프라이머는 중국당귀의 판별용 마커로 사용할 수 있다는 결론을 얻었다.

중국당귀					구당귀				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5

그림 3-8 중국당귀와 구당귀의 판별용 프라이머를 사용한 PCR 실험결과. M, 분자 크기; 1, 세발당귀; 2, 참당귀; 3, 일당귀; 4, 중국당귀; 5, 구당귀.

③ 구당귀의 핵 내 ITS 유전자를 이용한 판별마커 개발 : 구당귀의 판별마커용 프라이머는 속이 다르기 때문에 *Angelica* 속에 속하는 참당귀, 중국당귀, 일당귀와는 많은 단일염기다형성을 보여 비교적 쉽게 프라이머를 디자인할 수 있었다. 즉 정방향은 100번째 염기인 “C” 그리고 역방향은 538번째 염기인 “T” 를 3’ -말단에 위치하도록 하여 각각의 프라이머를 제작하여 각각 officinale\_ITS\_SNP\_F와 officinale\_ITS\_SNP\_R로 명명하였다 (표 3-9).

표 3-9. 구당귀(*Levisticum officinale*)의 판별용 ITS 머커 염기서열 정보

	Name	Sequence(5' -> 3' )	Tm(°C)	Accession No	Size (bp)
구당귀	officinale_ITS_SNP_F	ACCCGCTAACATGTAAACACGTC	58.9	601	480bp
	officinale_ITS_SNP_R	ATATCACGACATCCATCGCCGA	59.8	602	

상기한 프라이머를 사용하여 주어진 Tm값을 annealing 온도로 하여 PCR을 수행한 결과 그림 3-8에서 보는 바와 같이 구당귀의 게놈 DNA를 사용한 경우에만 정확하게 예상한 크기(480 bp)의 단일 밴드를 생산하여 다른 4종의 당귀와 구분하기 위한 판별마커로 사용하기에 충분하다는 결론을 얻었다

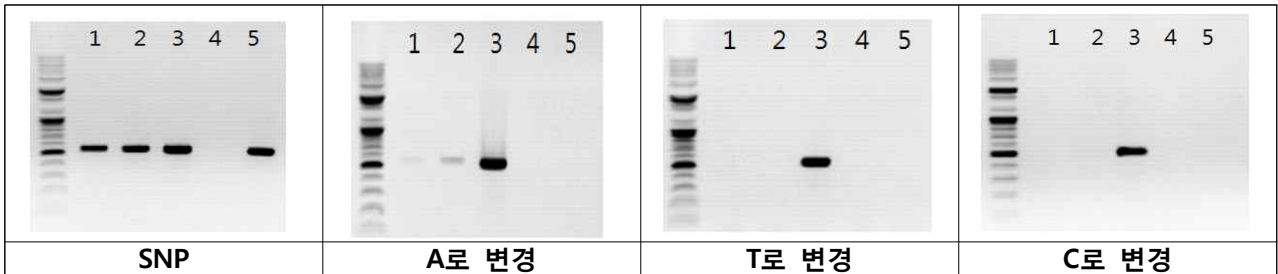
④ 일당귀의 핵 내 ITS 유전자를 이용한 판별 마커개발 : 일당귀의 경우에도 도2의 염기서열 비교 분석 결과로부터 일당귀에만 나타는 단일염기다형성을 확인하여 정방향은 92번 염기(T), 그리고 역방향은 592번째 염기(C)를 각각의 3’ -말단에 위치하도록 하여 프라이머를 제작하여 각각 acutiloba\_ITS\_SNP\_F와 acutiloba\_ITS\_SNP\_R로 명명하였다(표 3-10).

표 3-10. 일당귀의 판별용 ITS 유전자의 SNP 및 ARMS-마커 염기서열 정보

	Name	Sequence(5' -> 3' )	Tm (°C)	Accession No	Size (bp)
일당귀	acutiloba_ITS_SNP_F	AATGACCCGCTAACACGTC	56.6	603	537bp
	acutiloba_ITS_SNP_R	GCTAAGATGACGAGGATTCGCA	58.9	604	
	acutiloba_ARMS_F_A	AATGACCCGCTAACACATC	53.7	609	
	acutiloba_ARMS_F_T	AATGACCCGCTAACACTTC	53.7	610	
	acutiloba_ARMS_F_C	AATGACCCGCTAACACCTC	56.2	611	
	acutiloba_ARMS_R_A	GCTAAGATGACGAGGATTCACA	55.8	612	
	acutiloba_ARMS_R_T	GCTAAGATGACGAGGATTCTCA	55.5	613	
	acutiloba_ARMS_R_C	GCTAAGATGACGAGGATTCCCA	58.3	614	

상기한 프라이머 즉 정방향과 역방향프라이머의 3’ -말단에 단일염기다형성을 포함하는 프라이머 acutiloba\_ITS\_SNA\_F (Accession No. 603)과 acutiloba\_ITS\_SNA\_R (604)을 사용하여 PCR

반응을 수행한 결과 도 3에서 보는 바와 같이 일당귀 뿐만 아니라 국내토종인 참당귀와 세발당귀 그리고 구당귀에서도 동일한 크기의 강한 DNA 밴드가 확인되는 결과를 얻었다. 일당귀의 경우에는 정방향과 역방향 프라이머의 3' -말단에 공히 각각의 단일염기다형성을 포함하고 있음에도 불구하고 종의 특이성이 낮아 판별마커로 사용할 수 없는 결과를 얻었으며 이러한 현상은 기존의 다른 연구결과에서 이미 지적한 바와 같이 단일염기다형성의 실용화에 걸림돌이 되고 있다 (그림 3-9).



**그림 3-9.** 일당귀의 SNP 또는 ARMS-PCR 판별 마커(표 4 참조)를 이용한 핵산증폭실험 결과. SNP는 일당귀에 내재하는 단일염기다형성을 각각 정방향과 역방향의 3' -말단에 위치하도록 하여 제작한 프라이머, 그리고 (A), (T), (C)는 3' -말단에 인접한 세 번째 염기서열을 해당하는 염기로 변경하여 만든 ARMS-PCR용 프라이머 조합을 사용한 결과임. 1, 세발당귀; 2, 참당귀; 3, 일당귀; 4, 중국당귀; 5, 구당귀.

따라서 각각의 3' -말단에서 5' -말단 쪽으로 세 번째 염기를 다른 3종류의 염기로 변경시킨 ARMS-프라이머를 제작하여 가장 우수한 마커를 개발하고자 하였다. 표 4에서 각각의 세 번째 염기를 “A” 로 변경한 609번과 612번 조합, “T” 로 변경한 610번과 613번 조합, 그리고 “C” 로 변경한 611번과 614번 조합을 사용하여 각각 PCR반응을 수행한 결과 “T” 또는 “C” 로 변경한 조합에서 일당귀에만 선명하게 밴드를 확인할 수 있어 이들을 판별 마커로 사용할 수 있다는 결론을 얻었다. “A” 로 변경한 경우에도 그 효과는 인정 할 수 있었으나 세발당귀 및 참당귀에서 약한 밴드가 확인되어 실용화하기에는 부적합한 것으로 판단되었다.

(라) 엽록체 barcode를 이용한 당귀 계통별 판별마커 개발

1년차와 2년차에 수집한 참당귀, 세발당귀, 일당귀를 대상으로 개발한 엽록체 trnL-trnF 유전자 barcode를 대상으로 개발한 분자마커를 대상으로 3년차에 추가로 수집된 중국당귀와 구당귀를 포함한 추가적용실험을 수행하였으며, matK 유전자 barcode도 포함하여 ARMS-PCR기술을 이용하여 5계통을 별도로 각각 판별이 가능한 마커를 개발하고자 하였다.

① trnL-trnF 유전자단편의 염기서열 비교분석 및 SNP확인 : 3년차까지 수집된 5 종의 당귀 계통에 대하여 추가적으로 분자생물학적 판별 마커를 개발하고자 엽록체에 존재하는 trnL-trnF유전자단편의 염기서열들을 비교분석하여 SNP를 확인하여 본 결과 약 400 bp 내에 5계통이 서로 차이를 보이는 SNP는 단지 5개 뿐이었다. 구체적으로 보면 참당귀와 세발당귀는 완전히 일치하여 SNP를 찾을 수가 없었으며, 중국당귀와 구당귀에서 각각 다른 계통들과 차이를 보이는 SNP가 하나씩 확인이 되어 중국당귀와 구당귀는 별도로 확인이 가능한 판별 마커를 제작할 수 있었으나 일당귀, 참당귀, 세발당귀는 불가능하였다(그림 3-10).

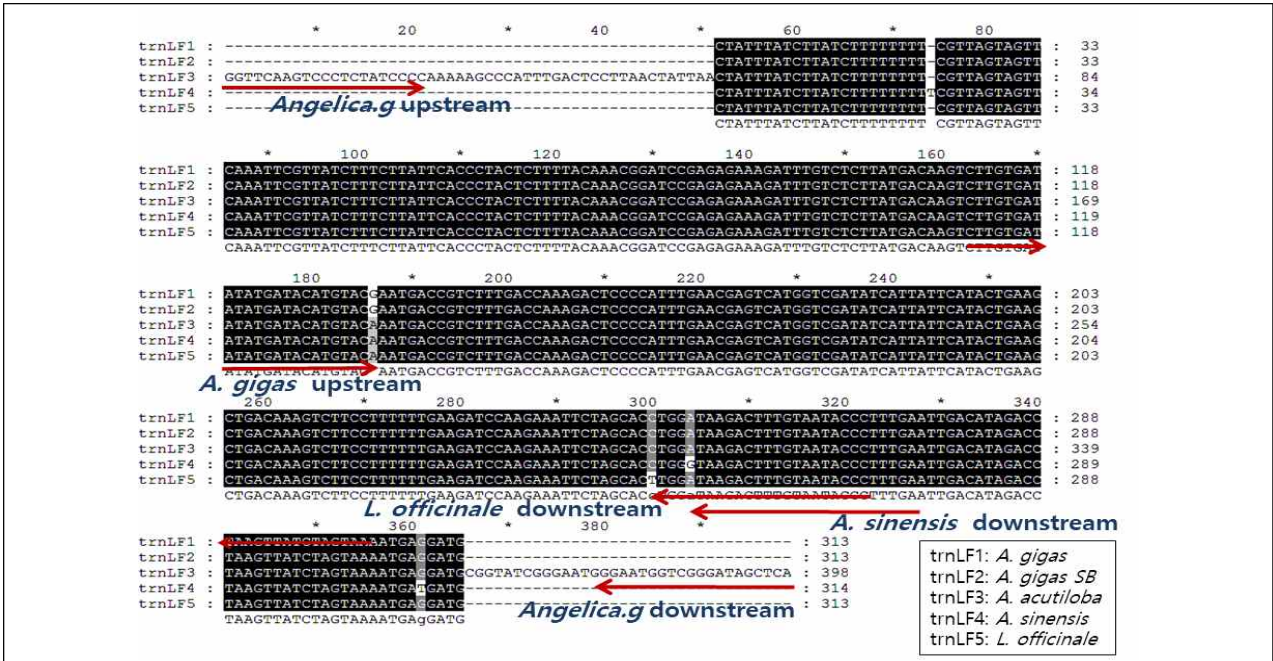
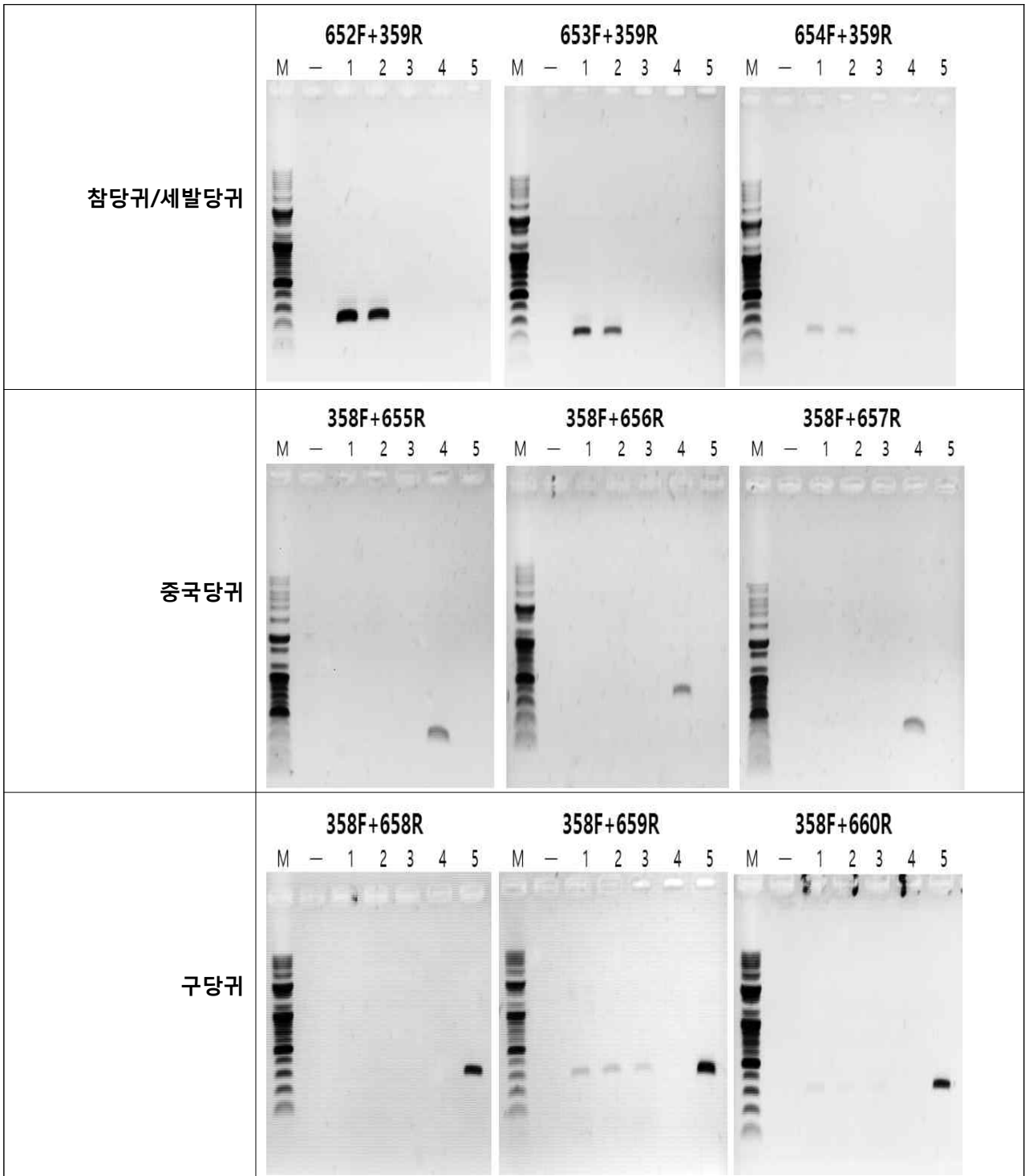


그림 3-10. 참당귀, 세발당귀, 일당귀, 중국당귀, 구당귀에 대한 trnL-trnF 유전자 단편의 염기서열 비교분석을 통한 SNP 확인. 참당귀, 구당귀, 중국당귀에 대한 판별 프라이머의 위치를 각각 표시함. 세발당귀와 일당귀는 적당한 SNP를 확보하지 못하여 판별 프라이머를 제작하지 못함

② trnL-trnF 유전자의 SNP를 이용한 당귀계통의 판별마커 제작 및 검증 ; 상기한 염기서열 비교분석 결과 확인된 SNP를 근거로 하여 참당귀/세발당귀, 중국당귀, 구당귀를 판별할 수 있는 각각의 SNP 프라이머와 3'-말단에 인접한 3번째의 염기를 임의로 변경한 ARMS-PCR용 primer 들을 제작하였다(표 3-11). 이들 프라이머 조합 중 먼저 SNP만을 포함한 primer를 사용하여 핵산증폭실험을 수행하여 본 결과 모든 계통의 시료에서 DNA 단편이 증폭되어 판별이 어려웠다. 따라서 3' 말단에서 세 번째 염기를 임의로 변경한 프라이머 조합을 사용하여 재 실험을 수행하여 그 결과를 그림 3-11에 도식화 하였다. 참당귀와 세발당귀를 동시에 검출이 되도록 디자인한 프라이머에서는 3종류의 ARMS - PCR용 프라이머에서 모두 예상한 크기의 밴드를 생산하였으며 그중 A→C로 변경한 경우에 가장 우수한 결과를 얻었다. 한편 중국당귀의 경우에는 T→G, 구당귀의 경우에는 C→A로 변경한 경우에 가장 우수한 결과를 얻었으며, 다른 프라이머의 경우에는 예상한 크기의 밴드를 생산하지 못하거나 다른 위치에 다수의 밴드를 생산하였다 (그림 3-11).

표 3-11. trnL-trnF 유전자를 이용한 당귀계통 판별용 ARMS-PCR 프라이머 목록. 초록색은 SNP를 보이는 염기인 3'-말단에서 3번째 염기를 해당염기로 변경하였음.

	Name	Sequence	Tm (°C)	No	Size(bp)
참당귀/ 세발당귀	A.gigas_trnLF_F	CTTGTGATATATGATACATGTACG	58.4	635	250
	A.gigas_trnLF_1F	CTTGTGATATATGATACATGTGCG	60.1	652	250
	A.gigas_trnLF_2F	CTTGTGATATATGATACATGTCCG	60.1	653	250
	A.gigas_trnLF_3F	CTTGTGATATATGATACATGTTCCG	58.4	654	250
중국 당귀	A.sinensis_trnLF_R	TTCAAAGGGTATTACAAAGTCTTAC	59.2	636	315
	A.sinensis_trnLF_1R	TTCAAAGGGTATTACAAAGTCTAAC	59.2	655	315
	A.sinensis_trnLF_2R	TTCAAAGGGTATTACAAAGTCTGAC	60.9	656	315
	A.sinensis_trnLF_3R	TTCAAAGGGTATTACAAAGTCTCAC	60.9	657	315
구당귀	L.officinale_trnLF_R	AGGGTATTACAAAGTCTTATCCAA	58.4	637	310
	L.officinale_trnLF_1R	AGGGTATTACAAAGTCTTATCAA	56.7	658	310
	L.officinale_trnLF_2R	AGGGTATTACAAAGTCTTATCGAA	58.4	659	310
	L.officinale_trnLF_3R	AGGGTATTACAAAGTCTTATCTAA	56.7	660	310



**그림 3-11.** trnL-trnF 유전자마커를 이용한 당귀계통의 판별 실험 결과. 1, 참당귀, 2, 세발당귀, 3, 일당귀, 4, 중국당귀, 5, 구당귀. 프라이번호는 표 참조.

③ 당귀 계통별 엽록체 matK유전자의 염기서열비교분석 SNP확인 : 엽록체 matK유전자를 대상으로 염기서열을 비교하여 SNP를 확인하여 본 결과 역시 참당귀와 세발당귀는 특이한 SNP가 없어 상호구분을 위한 마커를 제작하기는 어려웠으나 일당귀는 다른 계통과 비교하여 단하나의 SNP를 이용하여 allele 판별마커를 제작할 수 있었다 (그림 3-12)



그림 3-12. 당귀 계통별 matK 유전자단편의 염기서열 비교분석 및 SNP 확인. 각 계통에 대한 SNP에 근거한 판별 프라이머의 위치를 화살표로 표시함. 참당귀와 세발당귀는 SNP를 확인하지 못하여 구분 가능한 프라이머를 제작하지 못함. matK1, 참당귀; matK2, 세발당귀; matK3, 일당귀; matK4, 중국당귀; matK5, 구당귀

④ matk 유전자의 SNP를 이용한 당귀계통별 판별마커를 이용한 검증 (ARMS-PCR 결과) : 계통별 염기서열비교결과 확인한 SNP를 3'-말단으로 하고 3번째의 염기를 다른 3가지 염기로 변경한 ARMS-PCR용 프라이머를 계통별로 제작하였다(표 3-12)

표 3-12. mat k 유전자를 이용한 당귀 계통 판별용 프라이머 (ARMS-PCR) 목록. 초록색은 빨간색의 SNP를 나타내는 3'-말단에서 3번째 염기를 해당염기로 변경하였음.

	Name	Sequence	Tm (°C)	No	Size (bp)
참당귀/세발당귀	A.gigas_matK_R	CTATAATAATGAGAAATATTTCTGCA <b>A</b>	57.7	631	764
일당귀	A.acutiloba_matK_R	CGTTACAAAATCTCGCTTAG <b>A</b>	58.4	632	658
	A.acutiloba_matK_1R	CGTTACAAAATCTCGCTT <b>CGA</b>	57.4	643	658
	A.acutiloba_matK_2R	CGTTACAAAATCTCGCTT <b>GGA</b>	57.4	644	658
	A.acutiloba_matK_3R	CGTTACAAAATCTCGCTT <b>TGA</b>	55.5	645	658
중국당귀	A.sinensis_matK_R	TACGCCCAAATCGGACAAT <b>T</b>	55.2	633	733
	A.sinensis_matK_1R	TACGCCCAAATCGGAC <b>CCAT</b>	57.3	646	733
	A.sinensis_matK_2R	TACGCCCAAATCGGAC <b>GAT</b>	57.3	647	733
	A.sinensis_matK_3R	TACGCCCAAATCGGAC <b>TAT</b>	55.2	648	733
구당귀	L.officinale_matK_R	GGGGCGTCCCTTTT <b>GAT</b>	54.8	634	385
	L.officinale_matK_1R	GGGGCGTCCCTTTT <b>AAT</b>	52.4	649	385
	L.officinale_matK_2R	GGGGCGTCCCTTTT <b>CAT</b>	54.8	650	385
	L.officinale_matK_3R	GGGGCGTCCCTTTT <b>TAT</b>	52.4	651	385

상기한 프라이머를 사용하여 핵산증폭실험을 수행한 결과를 그림 3-13에 도식화 하였다. 참당귀/세발당귀는 SNP만을 이용한 프라이머를 사용하여 선명하게 구분이 가능하였으므로 굳이 ARMS-PCR용 primer 조합을 사용할 필요가 없었다. 그러나 일당귀는 A를 C 또는 G로 변경하였을 경우에 보다 우수한 결과를 나타내었으며, 중국당귀의 경우에는 A염기를 T로 변경한 경우 그리고 구 당귀는 G를 A 또는 T 로 변경한 경우에 우수한 결과를 나타내었다.

결론적으로 핵산증폭기술을 이용하여 5종의 당귀 계통을 판별하기 위한 분자생물학적 마커를 현장에 적용하기 위하여 핵내의 ITS 유전자와 엽록체의 trnL-trnF, 그리고 matK 유전자 등 3 종류의 마커를 종합하면 실용화까지 가능할 것으로 판단되었다.

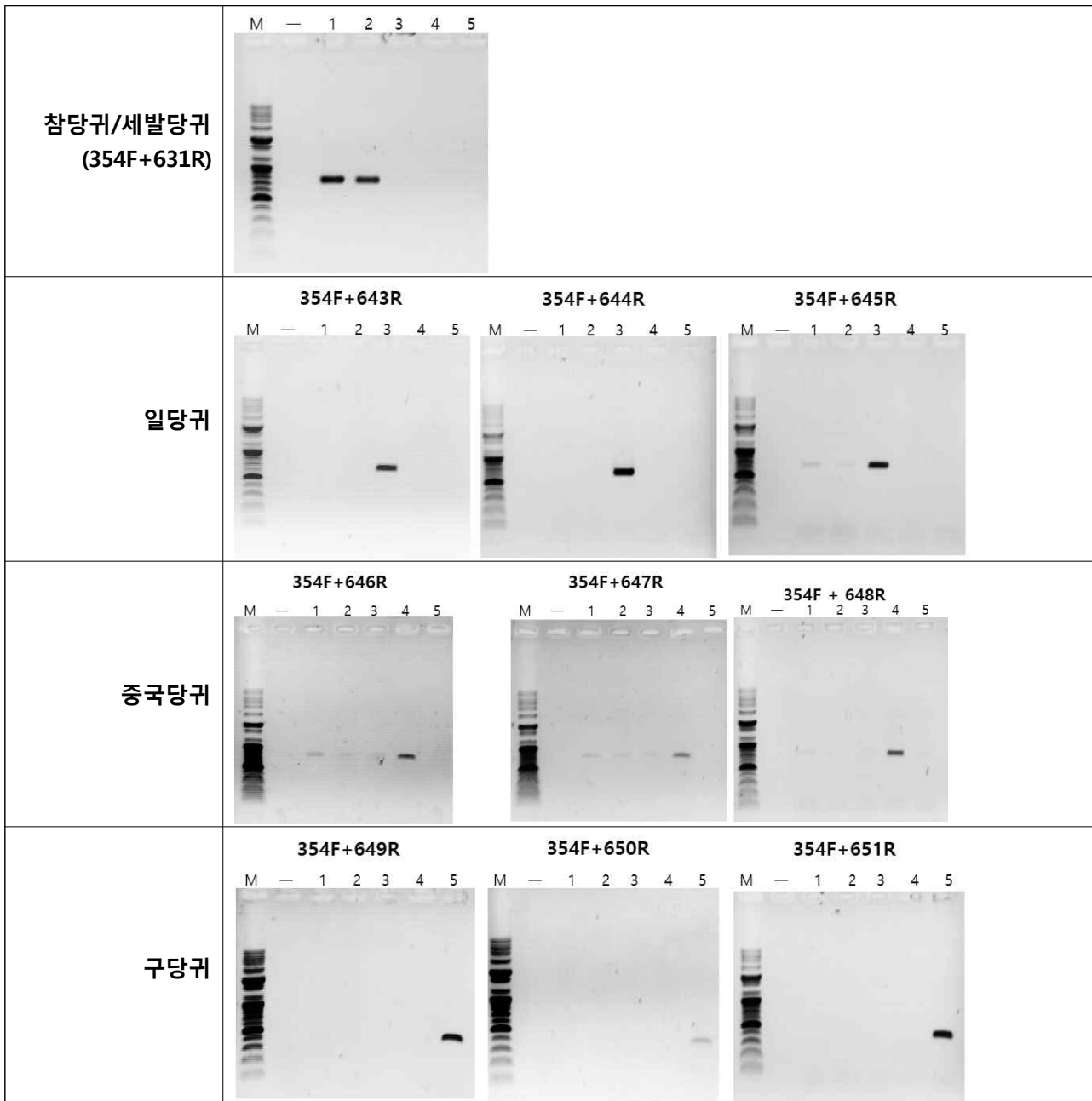


그림 3-13. mat k 유전자마커를 이용한 당귀계통의 판별 실험 결과. 1, 참당귀, 2, 세발당귀, 3, 일당귀, 4, 중국당귀, 5, 구당귀. 프라이머번호는 표3-12 참조.

(마) High Resolution Melting (HRM)패턴 분석기술을 이용한 당귀 계통 판별

① 핵내 ITS 유전자단편에 대한 HRM분석 기술을 이용한 당귀계통 판별 및 혼합비율 확인

- 핵내 ITS 유전자를 이용한 HRM 패턴 분석용 프라이머는 염기서열을 비교하여 가장 많은 SNP를 포함하는 단편으로 약 200bp 이내의 단편을 증폭할 수 있도록 5종의 당귀계통의 ITS 단편을 증폭할 수 있는 범용 프라이머를 제작하여 표 3-13에 요약하였다.

표 3-13. 당귀의 ITS 유전자를 이용한 HRM 패턴 분석용 프라이머 정보

Name	Sequence	Tm(°C)	No	Size(bp)
SB_HRM_F	CGAGTCTTTGAACGCAAGTT	54.6	625	244bp
SB_HRM_R	CTAAGATGACGAGGATTCGC	54.4	626	

- ITS 유전자 단편의 HRM 패턴비교분석에 의한 당귀 계통의 판별 기술 확립 : ITS 유전자 단편을 이용한 HRM 패턴을 비교 분석한 결과 5종의 당귀 계통의 구분이 가능하였으며 특히 참당귀와 세발당귀는 단 하나의 SNP를 포함하지만 쉽게 구분이 가능하여 HRM 패턴 비교 기술의 정확성을 확인 할 수 있었다 (그림 3-14).

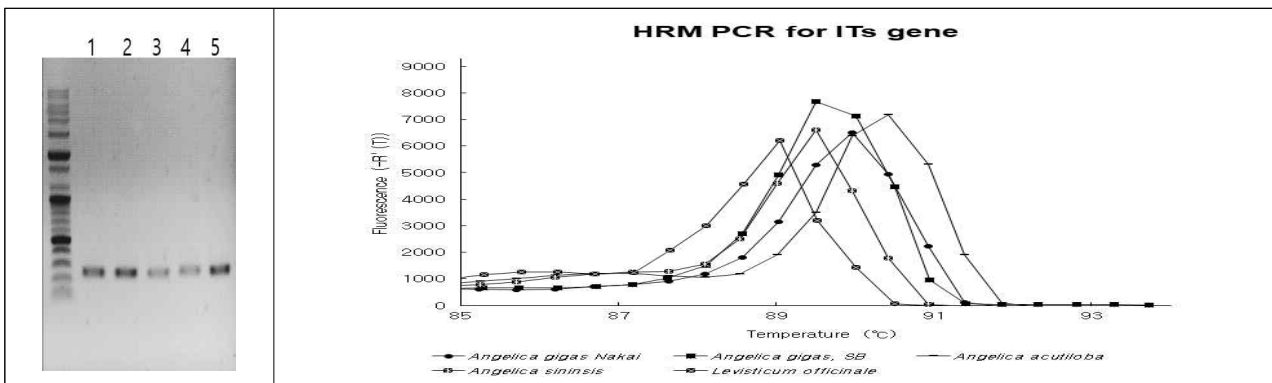


그림 3-14. ITS 유전자단편의 HRM 패턴 비교분석에 의한 당귀 계통 판별 실험 결과. 왼쪽은 HRM 패턴 비교용 ITS 유전자 단편의 핵산증폭을 위한 프라이머로 1, 참당귀, 2, 세발당귀, 3, 일당귀, 4, 중국당귀, 5, 구당귀를 핵산증폭실험을 수행한 결과. 오른쪽은 이를 바탕으로 HRM패턴 비교분석을 수행한 결과

- ITS 유전자단편을 이용한 HRM 패턴 비교분석에 의한 참당귀의 농도 및 다른 당귀 계통의 혼합비율 검증(그림 3-15)

- 참당귀의 농도에 따른 HRM 패턴 변화 : 참당귀의 농도를 점차적으로 희석하여 50, 25, 6, 3, 1%를 포함하도록 만든 일정용액을 대상으로 HRM 패턴 비교분석을 수행한 결과 점차적으로 농도에 비례하여 melting curve의 peak가 상대적으로 낮아지는 것으로 보아 이 결과를 이용하여 표준 농도곡선으로 한다면 정확하지는 어느 정도의 농도를 추산할 수 있을 것이다.

- 참당귀를 기준으로 다른 당귀계통을 동일 비율로 혼합한 시료에 대한 HRM 패턴을 비교한 결과 많은 종류의 시료가 혼합될수록 melting curve의 peak가 비례하여 낮아지는 결과를 얻어 참당귀의 농도가 낮아지는 경우와 유사한 패턴을 나타내었다.

- 참당귀를 기준으로 하여 중국당귀의 농도별( 50, 25, 6, 3, 1%)의 비율로 혼합한 경우 혼합한 중국당귀의 농도가 낮아짐에 따라 peak 낮아지는 경향을 보였다

- 이러한 결과는 중국당귀를 기준으로 참당귀를 동일한 비율로 혼합한 경우에도 유사한 패턴을 보였다. 즉 순수한 중국당귀의 경우 고유한 낮은 peak를 보이든 것이 50%의 비율로 참당귀를 혼합한 경우 참당귀의 패턴과 유사하게 peak가 증가한 후 농도가 낮아짐에 따라 점차 peak가 비례하여 낮아지는 경향을 보였다.

결론적으로 종합하면, 순수한 하나의 계통만을 대상으로 한 경우에는 농도가 높아짐에 따라 비례하여 peak가 증가한다. 그러나 다른 당귀 계통을 혼합한 경우 간섭에 의하여 peak가 달라



지며 혼합 계통의 농도가 증가함에 따라 peak도 높아진다. 그러나 3종류이상의 다양한 당귀계통을 혼합 할 경우는 예측하기가 어려웠다.

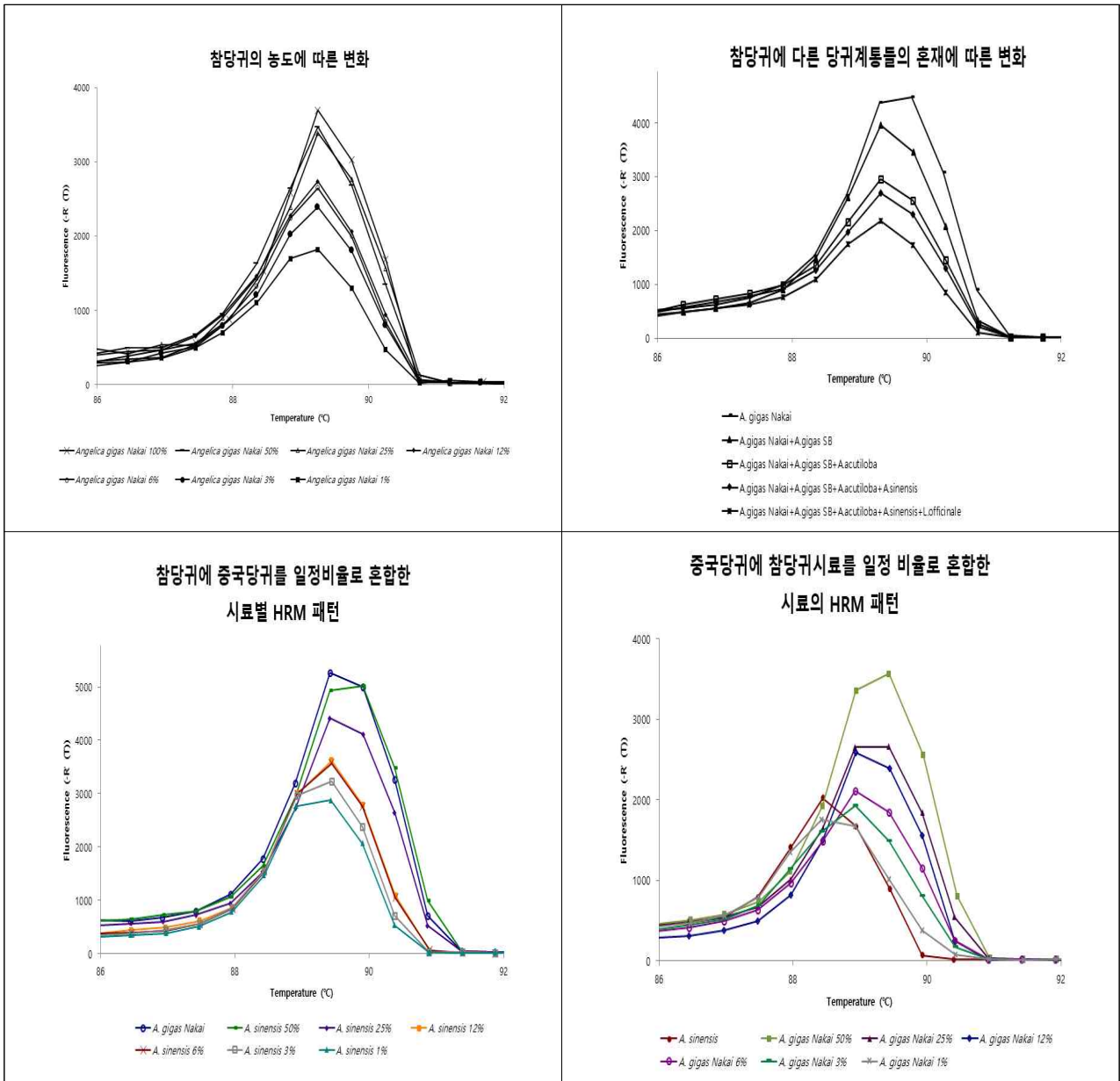


그림 3-15. 참당귀의 농도별, 당귀 계통들의 혼재에 따른 HRM패턴 비교분석

② 엽록체 유전자 trnL-trnF 및 matK 유전자단편에 대한 HRM 분석기술을 이용한 당귀계통의 판별 : 엽록체 유전자 단편을 이용한 HRM 패턴 비교분석으로 당귀 계통을 판별하기 위하여 이들 trnL-trnF 유전자와 matK 유전자단편의 염기서열을 비교하여 각각의 SNP를 포함하는 범위에서 증폭하여 HMR패턴을 비교하고자 각 유전자단편의 증폭을 위한 프라이머를 제작하였다(표 3-14).

표 3-14. HRM 패턴 분석을 위한 trnL-trnF 와 mat k 유전자 단편의 증폭을 위한 프라이머 목록

	Name	Sequence	Tm (°C)	No	Size (bp)
trnL-trnF	A.gigas_trnLF_HRM_F	GATTTGTCTCTTATGACAAGTC	56.6	670	197 bp
	A.gigas_trnLF_HRM_R	GGTCTATGTCAATTCAAAGGG	57.4	671	
mat K	A.gigas_matK_HRM_F	GTTCGATACTCTTGTTCCAA	54.3	669	170 bp
	Angelica.g_matK_R	TCTAGCACAAAGACAGTCGAAGT	50.7	355	

이들 프라이머를 이용하여 해당 유전자단편을 증폭시킨 후 HRM 패턴을 조사하여 비교한 결과를 그림 3-16에 도식화 하였다. 디자인한 프라이머조합이 해당하는 크기의 유전자단편을 제대로 생산하는지의 여부를 확인한 후 각 계통별로 분리한 DNA를 대상으로 HRM 패턴을 분석한 결과 각 계통의 판별이 가능하였다(그림 3-16). 그러나 matk의 경우 구당귀, trnL-trnF 유전자의 경우에는 일당귀에 대한 SNP를 각각 포함하는 구간을 정하기가 어려워 이들은 분석에 포함시킬 수 없었다. 특이하게도 단하나의 SNP를 나타내는 참당귀와 세발당귀의 경우에도 matk 유전자와 trnL-trnF 유전자 단편 모두의 HRM패턴의 차이를 보여 판별이 가능하였다.

결론적으로 종합하여 보면 당귀의 경우 핵내 유전자인 ITS 단편을 이용한 마커로 ARMS-PCR을 수행하면 개별적으로 판별이 충분히 가능하다. 이를 보다 확실하게 검증하고자 엽록체 유전자인 trnL-trnF 와 matK 유전자 단편으로부터 만든 마커를 사용한 ARMS-PCR과 HRM 패턴 비교분석기술을 적용하면 보다 정확하고 신속하게 판별이 가능할 것으로 사료된다.

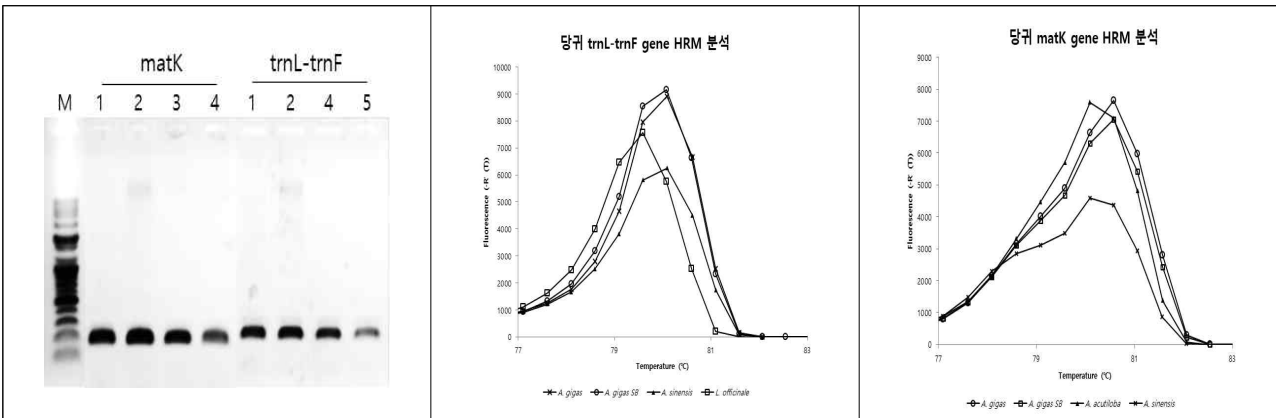


그림 3-16. trnL-trnF 및 matk 유전자단편을 이용한 당귀의 계통별 HRM 패턴 비교분석 결과. 왼쪽은 디자인한 프라이머로 증폭한 각 유전자단편, 중앙은 matK, 오른쪽은 trnL-trnF 유전자에 대한 HRM 패턴 비교 분석결과

### 라. 국산 및 중국산 꾸지뽕 계통의 분자생물학적 판별 마커 개발

#### (1) 핵 내 ITS 유전자단편을 이용한 중국산과 한국토종의 판별 기술 개발

2년차의 연구보고서에서 기술한 바와 같이 경남 밀양의 재배 농가로부터 수집한 한 계통 (수집 번호 2016-10, 표 참조)은 trnL-trnF 유전자 마커로는 모두 한국산으로 판명되었으나 ITS 마커로는 한국뿐만 아니라 중국특이 프라이머를 사용한 경우에도 동일한 크기의 PCR산물이 생성된 것으로 조사되어 아마도 중국계통과 국산 꾸지뽕계통의 교잡종일 가능성이 있을 것이라고 추정하였다. 3년차에는 이에 대한 추가보완 연구를 수행하기 위하여 경남지역의 재배단지인 산청, 사천, 밀양 그리고 중국에서 직접 구입한 건줄기 등을 추가적으로 수집하였으며 이들을 대상으로 ITS 유전자의 염기서열을 비교분석한 결과 시료번호 2016-33, 34, 36번은 한국계통과 동일한 것으로 그리고 2016-10과 47은 중국계통으로 확인되었다(그림 3-17).



그림 3-17. 꾸지뽕 계통별 ITS 유전자의 염기서열비교 결과 및 판별 프라이머의 위치

상기한 결과에서 8개의 SNP를 확인하였으며 이중 2개의 SNP가 인접하여 있는 부위에서 각 계통을 판별하기 위한 정방향 및 역방향 프라이머를 제작하였으며 중국계통 판별용 프라이머는 SNP를 보이는 프라이머를 그대로 사용하였으나 한국계통 판별용 프라이머는 인접한 염기를 임의로 변경한 ARMS-PCR용 프라이머를 제작하였다. 즉 정방향 프라이머의 3' -말단에 바로 이웃한 염기 G를 T로 그리고 역방향 프라이머의 3' -말단에서 3번째 염기 A를 T로 변경하였다(표 3-15).

표 3-15. 한국과 중국 꾸지뽕 계통간 교잡종을 판별하기 위한 핵내 ITS DNA의 SNP를 포함하는 primer 와 ARMS-PCR용 primer의 정보. 붉은 색은 SNP, 초록색은 임의로 변경시킨 염기서열임.

Target species	Name	Accession No.	Sequence (5' - 3')	Tm (°C)	Size (bp)
한국 꾸지뽕	Korea- ITS-F ARMS	503	GCCAAGTGCCTGCCGCTC <b>ATC</b>	66.3	458
	Korea- ITS-R ARMS	462	CGACAACCACCTTTTG <b>CCTCA</b>	59.4	
중국 꾸지뽕	China- ITS-F	440	GCCAAGTGCCTGCCGCTC <b>TGT</b>	66.2	458
	China- ITS-R	442	CGACAACCACCTTTTG <b>TACG</b>	57.5	

상기 프라이머를 사용하여 핵산 증폭실험을 수행한 결과 2016년도에 수집한 33, 34, 36은 한국계통 즉 2014-42(K)로 판명되었으며 2016-10-6, 10-9, 47은 중국계통 즉 2014-41(C)와 동일한 밴드를 각각 확인하여 손쉽게 판별이 가능하였다(그림 3-16).

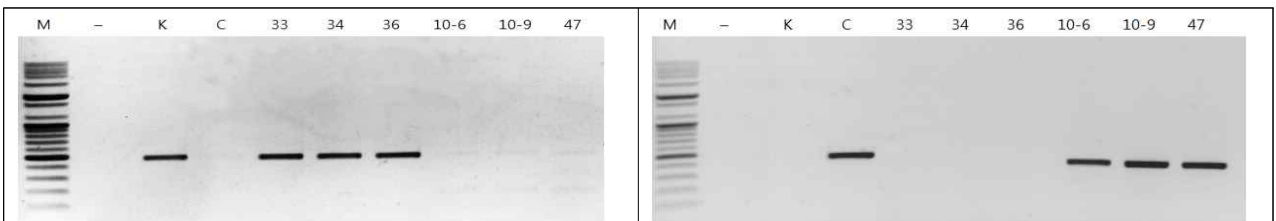


그림 3-16. ITS 유전자 마커를 이용한 한국과 중국계통의 판별 결과. 한국계통 특이 판별 프라이머 (503F+462R)와 중국계통 특이판별 프라이머 (440F+442R)를 이용한 PCR 수행 결과이며, 각 프라이머 번호의 염기서열정보는 표 2에 정리되어 있음. K는 한국계통(2014-2), C는 중국계통 1(2014-1)로 확인된 대표 시료이며, 나머지는 각각 수집된 계통들의 일련번호이다. 왼쪽은 한국 계통 특이 프라이머 (503F+462R), 오른쪽은 중국계통 특이 프라이머 (440F+442R)

(2) 엽록체 유전자 단편을 이용한 국산 및 중국산 꾸지뽕 판별 마커 개발

(가) 엽록체 유전자단편(*trnL-trnF* 와 *matK*)내에 존재하는 단일염기다형성의 확인 : *trnL-trnF* 와 *matK* 유전자단편을 증폭하여 염기서열 비교 분석을 수행한 결과 기존에 알려진 한국계통 및 중국계통 1과는 또 다른 중국계통을 확인하였다. 즉 시료번호 2016-33, 34, 36은 한국계통과 동일한 것으로 판명되었으나, 2016-10과 47은 한국계통도 중국계통 1도 아닌 새로운 계통인 것으로 판명되었다(그림 3-17). 즉 단일염기다형성을 염기서열번호에 따라 정리하여 본 결과 표 3-16에 요약한 바와 같이 총 4개의 단일염기다형성을 확인하였으며, 중국계통 1은 한국계통과 비교하여 465번 염기가 T 에서 C로 변한 단 하나의 SNP가 확인 되었으며, 877번 부근에서 12 bp (ATTGACTTTTTA)가 삭제된 것으로 확인 되었다. 그러나 2016-10과 47은 465번 염기는 중국계통 1과 동일하나 247, 248, 813번 염기가 한국 또는 중국계통도 아닌 또 다른 염기를 나타내어 새로운 중국계통으로 확인 되었으며, 따라서 중국계통 1과 중국계통 2로 명명하고 이들과 한국종을 구분하기 위한 판별마커를 개발하고자 하였다.

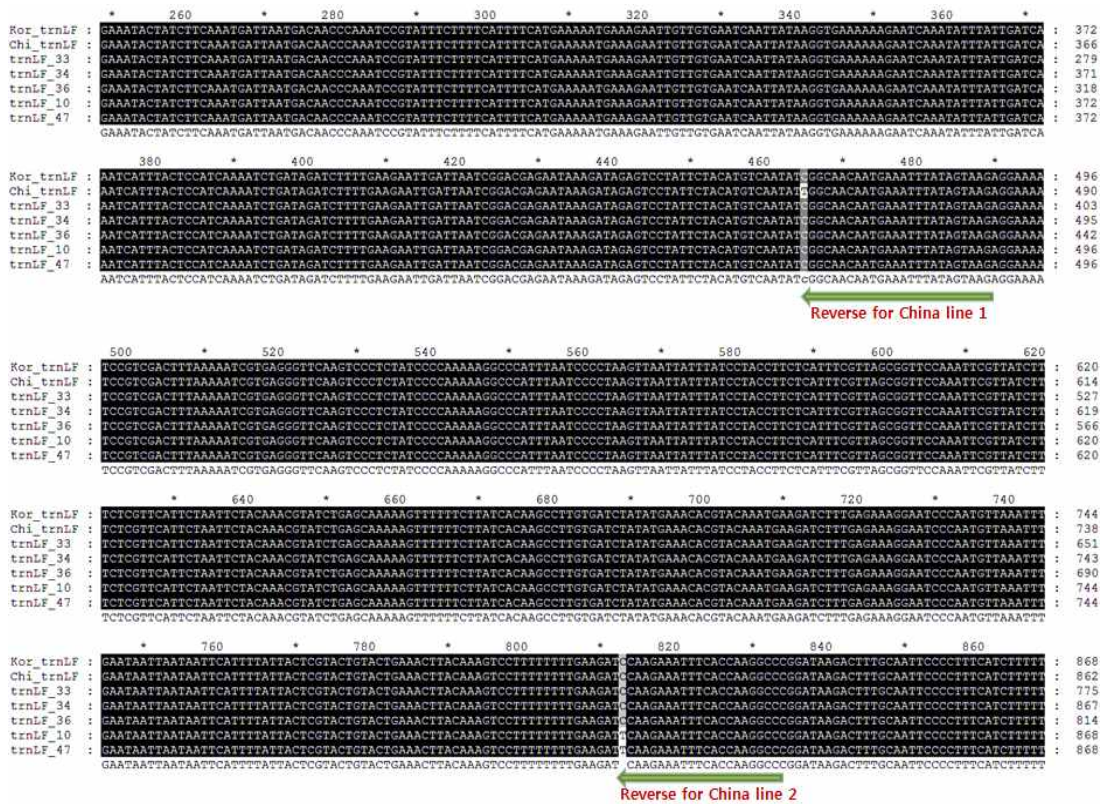


그림 3-17. 수집된 꾸지뽕 계통별 *TrnL-TrnF* 유전자의 염기서열 비교 분석 결과 및 중국계통 1과 중국계통 2의 판별용 프라이머 위치

표 3-16. 수집된 꾸지뽕 계통간 *trnL-trnF* 유전자단편의 단일염기다형성 패턴

염기서열번호	247	248	465	813	877-888
2014-42 (한국계통)	C	G	C	C	ATTGACTTTTTA
2014-41 (중국계통 1)	C	G	T	C	DELETE
2016-10	T	A	C	T	ATTGACTTTTTA
2016-47	T	A	C	T	ATTGACTTTTTA

또한 *matK* 유전자단의 염기서열을 비교한 결과에서도 그림 3-18에서 제시한 바와 같이 2016-10과 47은 한국계통과 중국계통1과는 다른 계통으로 판명되었다. 차이가 나는 SNP는 표

3-16에서 제시하였다.

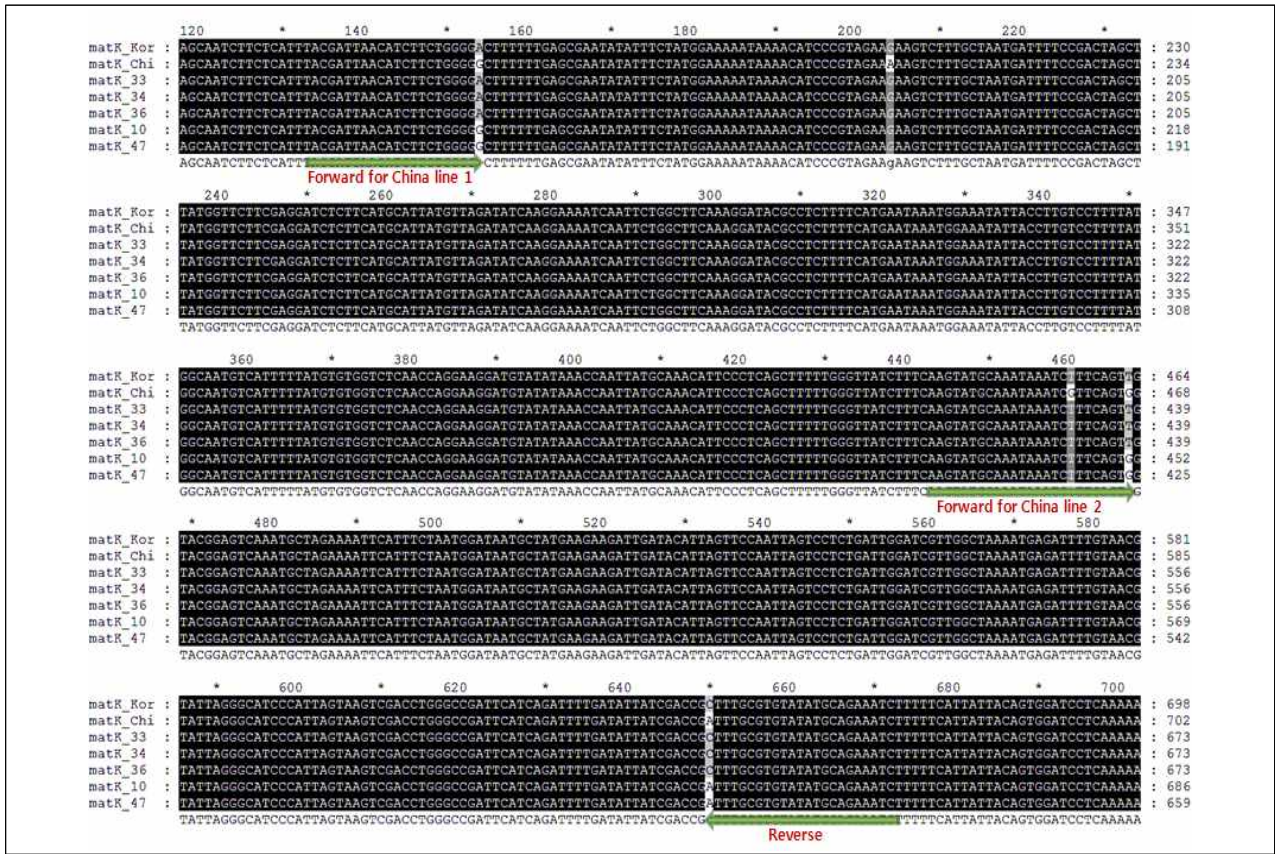


그림 3-18. 수집된 꾸지뽕 계통별 *Mat K* 유전자의 염기서열 비교 분석 결과 및 판별용 프라이머 위치

표 3-16. 수집된 꾸지뽕 계통간 *matK* 유전자단편의 단일염기다형성 패턴. 적색으로 표시한 염기는 한국 계통과 동일하며 나머지는 중국계통 1과 동일함.

염기서열번호	154	204	460	467	650	743
2014-42 (한국계통)	A	G	T	T	C	G
2014-41 (중국계통 1)	G	A	G	G	A	T
2016-10	G	G	T	G	A	G
2016-47	G	G	T	G	A	G

(나) 엽록체 유전자단편(*trnL-trnF*)에 대한 ARMS-PCR용 primer를 이용한 한국 및 중국 꾸지뽕 계통들의 판별용 마커 개발 : 이들 3계통들의 염기서열을 비교분석한 결과 SNP가 많지 않고, 특히 동일한 위치에서 3계통을 동시에 판별이 가능한 프라이머의 제작은 어려웠다. 따라서 정방향 프라이머는 *trnL-trnF* 유전자단편 전체를 증폭시킬 때 사용한 primer 즉 5'-GATATGGCGAAATCGGTAGACG- 3'를 그대로 사용하였으며, 중국계통 1의 판별을 위한 역방향 primer는 465번 위치의 단일염기다형성을 나타내는 염기 (그림 3-17 참조)를 3'-말단에 위치하도록 하였으며, 5'-말단 쪽으로 3번째 염기를 각각 T와 G로 변경하였다(표 3-17). 중국계통 2를 판별하기 위한 특이 프라이머는 813번의 단일염기다형성(그림 3-17참조)을 보이는 염기를 3'-말단에 위치하게 하여 그 자체만으로 한국계통과 중국계통1과는 다른 역방향 프라이머를 제작하였으며(표 3-18), 5'-말단 쪽으로 세 번째 염기를 인위적으로 변형시켜 만든 3 종류의 ARMS-PCR용 프라이머를 제작하였다(표 3-19).

표 3-17. 중국계통 1과 한국계통 구지뿔의 판별을 위한 *trnL-trnF* 유전자 마커용 (ARMS-PCR)프라이머정보

Origin	Gene	Name	Accession No.	Sequence (5' - 3')	Tm (°C)	Size (bp)
Korea	<i>trnL-trnF</i>	trnLF-F	405	GATATGGCGAAATCGGTAGACG	57.2	525
		trnLF-R	459	CCTCTTACTATAAAATTTTCATTGTTG <b>TCG</b>	55.1	
China 1	<i>trnL-trnF</i>	trnLF-F	405	GATATGGCGAAATCGGTAGACG	57.2	525
		trnLF-R	452	CTTACTATAAAATTTTCATTGTTG <b>GCA</b>	51.7	

표 3-18. 중국계통 2 구지뿔의 판별을 위한 *trnL-trnF* 유전자 마커용 SNP프라이머정보

Origin	Gene	Name	Accession No.	Sequence (5' - 3')	Tm (°C)	Size (bp)
Korea/china 1	<i>trnL-trnF</i>	trnLF-F	405	GATATGGCGAAATCGGTAGACG	57.2	860
		trnLF-R	562	GGCCTTGGTGAAATTTCTT <b>G</b>	59.4	
China 2	<i>trnL-trnF</i>	trnLF-F	405	GATATGGCGAAATCGGTAGACG	57.2	860
		trnLF-R	561	GGCCTTGGTGAAATTTCTT <b>A</b>	57.4	

표 3-19. 중국계통 2 구지뿔의 판별을 위한 *trnL-trnF* 유전자 마커용 ARMS-PCR 프라이머정보

Origin	Gene	Name	Accession No.	Sequence (5' - 3')	Tm (°C)	Size (bp)
Korea/china 1	<i>trnL-trnF</i>	trnLF-F	405	GATATGGCGAAATCGGTAGACG	57.2	860
		trnLF-R	578	GGCCTTGGTGAAATTTCT <b>AGG</b>	59.4	
		trnLF-R	579	GGCCTTGGTGAAATTTCT <b>GGG</b>	61.3	
		trnLF-R	580	GGCCTTGGTGAAATTTCT <b>CGG</b>	61.3	
China 2	<i>trnL-trnF</i>	trnLF-F	405	GATATGGCGAAATCGGTAGACG	57.2	860
		trnLF-R	575	GGCCTTGGTGAAATTTCT <b>AGA</b>	57.4	
		trnLF-R	576	GGCCTTGGTGAAATTTCT <b>GGA</b>	59.4	
		trnLF-R	577	GGCCTTGGTGAAATTTCT <b>CGA</b>	59.4	

상기한 프라이머셋트를 이용하여 PCR 반응을 수행한 결과는 다음과 같다. 먼저 표 6에서 제시한 중국계통 1을 판별하기 위한 프라이머 셋트(405F와 459R 또는 452R)를 사용하여 PCR 을 수행한 결과, 그림 3-19에서 제시한 바와 같이 2016년도에 수집하여 분석한 모든 구지뿔 개체들은 기존에 한국종으로 확인된 계통 즉2014-42(K)와 동일한 위치에 밴드를 나타내었다. 그러나 중국계통 1 특이 프라이머(405F와 452R)은 2014-41(C), 즉 기존에 중국계통으로 확인한 계통에서만 단일밴드를 확인하여 예상한바 대로 이 프라이머는 중국계통 1을 판별하기 위한 마커로 사용할 수 있다는 결론을 얻었다.

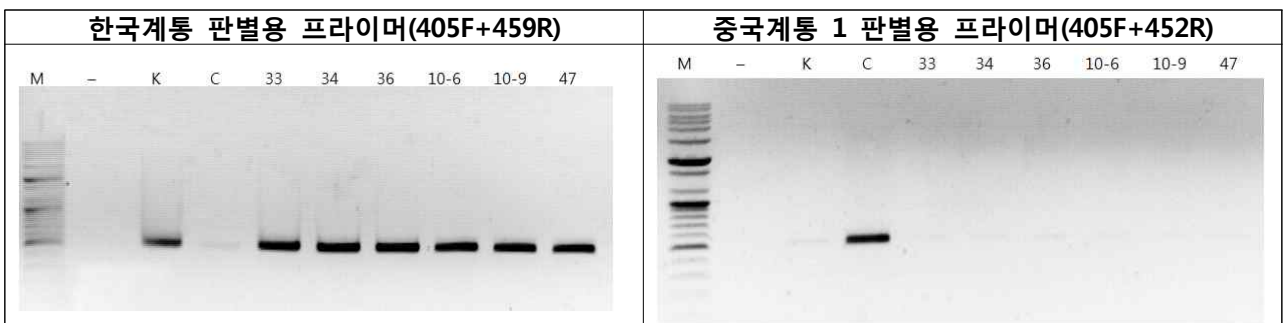
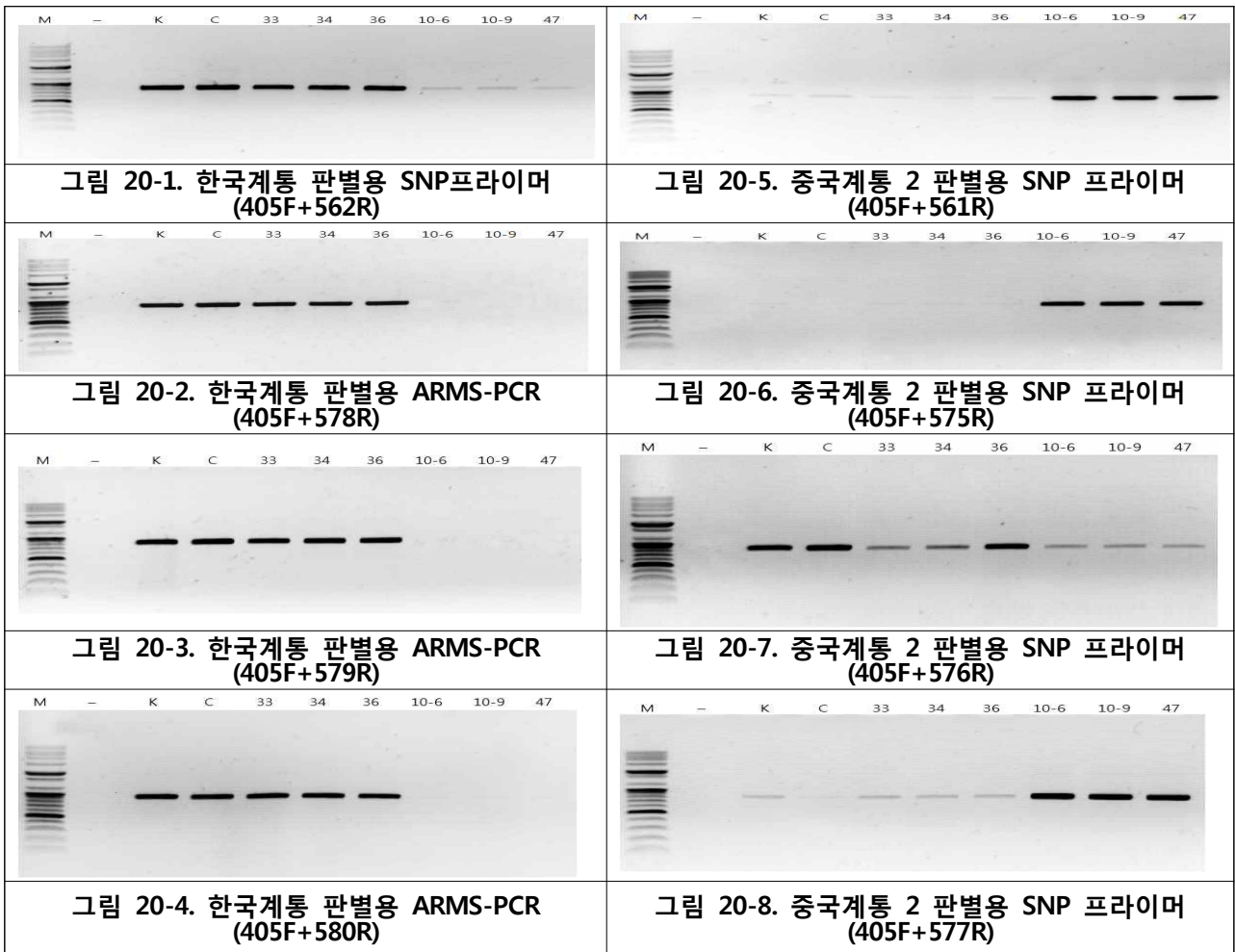


그림 3-19. 중국계통 1의 판별용 *TrnL-TrnF* 유전자 마커를 이용한 ARMS-PCR 결과.각 프라이머 번호의 염기서열정보는 표 6에 정리되어 있음. K는 한국계통(2014-2), C는 중국계통 1(2014-1)로 확인된 대표 시료이며, 나머지는 각각 수집된 계통들의 일련번호이다.

중국계통 2를 판별하기 위한 실험으로 표 3-18과 표 3-19에서 제시한 ARMS-PCR용 프라이머셋트를 사용하여 핵산증폭실험을 수행한 결과에서도 예상한바와 같이 중국계통2만 판별할 수 있도록 디자인한 561R, 575R과 정방향 프라이머 405F를 사용한 경우에는 2016-10의 10-6, 10-9, 10-9, 그리고 2016-47에만 단일밴드를 나타내었으며(그림 3-20-5, 3-20-6 참조), 동일위치에서 제작한 다른 프라이머 즉 562R, 578R, 579R 580R과 정방향 프라이머인 405F로는 기존에 중국종으로 확인된 중국계통 1(C)와 한국종으로 확인된 한국계통(K) 그리고 33, 34, 36번 시료에도 동일하게 단일밴드를 나타내었다(그림 3-20-1, 3-20-2, 3-20-3, 3-204 참조).



**그림 3-20.** 중국계통 2의 판별용 *TrnL-TrnF* 유전자 마커를 이용한 ARMS-PCR 결과. 각 프라이머 번호의 염기서열정보는 표 3-18 및 표 3-19에 정리되어 있음. K는 한국계통(2014-2), C는 중국계통 1(2014-1)로 확인된 대표 시료이며, 나머지는 각각 수집된 계통들의 일련번호이다.

단 하나의 단일염기다형성만을 포함하는 프라이머를 사용하여 제작한 중국계통 2의 판별용 프라이머 (561R과 405F)에 대한 핵산증폭실험결과(도6-5)를 자세히 검토하여 보면 다른 계통에서도 희미하게 약한 밴드가 출현한 것을 확인하여 이를 보다 선명하게 차이가 나도록 하기 위하여 제작한 ARMS-PCR용 프라이머를 사용한 결과, 도 6-6에서 보는 바와 같이 세 번째 염기의 T를 A로 변경한 프라이머 즉 575R이 가장 좋은 결과를 보였으며, 나머지 즉 G 또는 C로 변경한 경우에는 오히려 더 복잡한 결과를 얻었다(그림 3-20-7, 3-20-8 참조).

반면에 동일위치에서 제작한 다른 계통 즉 한국계통 및 중국계통 1에 대한 프라이머의 경우에는 염기를 변경하지 않은 562R을 사용한 경우에는 중국계통2에 해당하는 10-6, 10-9 및 47번 개체에도 희미하게 약한 밴드를 나타내었으나 ARMS-PCR용 프라이머 즉, 578R, 579R,

5580R를 사용한 경우에는 이들 희미한 밴드들이 모두 사라지고 선명하게 차이를 보이는 만족할만한 결과를 얻어 이들 프라이머들은 한국계통 및 중국계통1에 대하여 중국계통 2를 판별할 수 있는 마커로 사용할 수 있는 것으로 판명되었다.

(다) 엽록체 유전자단편(*matK*)에 대한 ARMS-PCR용 primer를 이용한 한국 및 중국 꾸지뽕 계통들의 판별용 마커 개발 : *matK* 유전자의 염기서열을 비교한 확인한 SNP를 기준으로 중국계통 1과 2를 판별 할 수 있는 프라이머를 제작하였다(표 3-20, 표 3-21, 표 3-22).

표 3-20. 중국계통 1의 꾸지뽕의 판별을 위한 *matK* 유전자 마커(SNP) 및 (ARMS-PCR)용 프라이정보. 적색으로 표시한 염기는 SNP, 초록색은 임의로 변경한 염기임.

Origin	Gene	Name	Accession No.	Sequence (5' - 3')	Tm (°C)	Size (bp)
Korea	<i>matK</i>	matK-F	425	CAAGTATGCAAATAAATC <b>TTTCAGTT</b>	52.4	509
		matK-R	408	ATGATTGACCAGATCGTTGATGC	57.4	
China 1	<i>matK</i>	matK-F	426	CAAGTATGCAAATAAATC <b>GTTTCAGTG</b>	56	509
		matK-R	408	ATGATTGACCAGATCGTTGATGC	57.4	
Korea	<i>matK</i>	matK-F	497	CAAGTATGCAAATAAATC <b>TTTCA</b> <b>TTT</b>	53	509
		matK-R	408	ATGATTGACCAGATCGTTGATGC	57.4	
China 1	<i>matK</i>	matK-F	499	CAAGTATGCAAATAAATC <b>GTTCA</b> <b>ATG</b>	55.6	509
		matK-R	408	ATGATTGACCAGATCGTTGATGC	57.4	

표 3-21. 중국계통 2, 꾸지뽕의 판별을 위한 *matK* 유전자 마커(SNP)용 프라이정보. 적색으로 표시한 염기는 SNP임.

Origin	Gene	Name	Accession No.	Sequence (5' - 3')	Tm (°C)	Size (bp)
Korea	<i>matK</i>	matK-F	559	ACGATTAACATCTTCTGGGG <b>A</b>	57.4	537
		matK-R	560	GATTTCTGCATATACACGCAA <b>A</b> <b>G</b>	59.3	
China 2	<i>matK</i>	matK-F	557	ACGATTAACATCTTCTGGGG <b>G</b>	59.4	537
		matK-R	558	GATTTCTGCATATACACGCAA <b>A</b> <b>T</b>	57.5	



표 3-22. 중국계통 2, 꾸지뽕의 판별을 위한 matK 유전자 마커(ARMS-PCR)용 프라이머정보. 적색으로 표시한 염기는 SNP, 초록색은 임의로 변경한 염기임.

Origin	Gene	Name	Accession No.	Sequence (5' - 3')	Tm (°C)	Size (bp)
Korea	matK	matK-F	569	ACGATTAACATCTTCTGG <b>AGA</b>	55.5	537
		matK-F	570	ACGATTAACATCTTCTGG <b>TGA</b>	55.5	
		matK-F	571	ACGATTAACATCTTCTGG <b>CGA</b>	57.4	
		matK-R	572	GATTTCTGCATATACACGC <b>AGAG</b>	61.1	
		matK-R	573	GATTTCTGCATATACACGC <b>ATAG</b>	59.3	
		matK-R	574	GATTTCTGCATATACACGC <b>ACAG</b>	61.1	
China 2	matK	matK-F	563	ACGATTAACATCTTCTGG <b>AGG</b>	57.4	537
		matK-F	564	ACGATTAACATCTTCTGG <b>TGG</b>	57.4	
		matK-F	565	ACGATTAACATCTTCTGG <b>CGG</b>	59.4	
		matK-R	566	GATTTCTGCATATACACGC <b>AGAT</b>	59.3	
		matK-R	567	GATTTCTGCATATACACGC <b>ATAT</b>	57.5	
		matK-R	568	GATTTCTGCATATACACGC <b>ACAT</b>	59.3	

상기한 중국계통 1에 대한 판별 마커를 사용하여 핵산증폭실험을 수행한 결과 그림 3-21에 제시한 바와 같이 한국계통 판별용 프라이머(425F+408R)와 ARMS-PCR용으로 염기를 변경시킨 497F+408R은 ITS 마커로 한국계통으로 판명된 33, 34, 36 개체들에는 선명하게 밴드를 나타내었으나 중국계통 1번으로 판명된 2014-41(C)와 10, 47번 개체들은 밴드를 생산하지 않았다. 반면에 중국계통 1번 판별용 프라이머, 426F+408R을 사용한 경우에 중국계통1번은 선명하고 10, 47번 개체들에도 약하지만 밴드를 생산하였으나 인접한 염기를 다른 염기로 변경시킨 ARMS-PCR용 프라이머, 499F+408R을 사용한 경우에 10번과 47번 개체에 나타난 약한 밴드들이 사라지고 중국계통 1 개체만 선명하게 밴드를 보여 판별이 가능한 것으로 조사되었다.

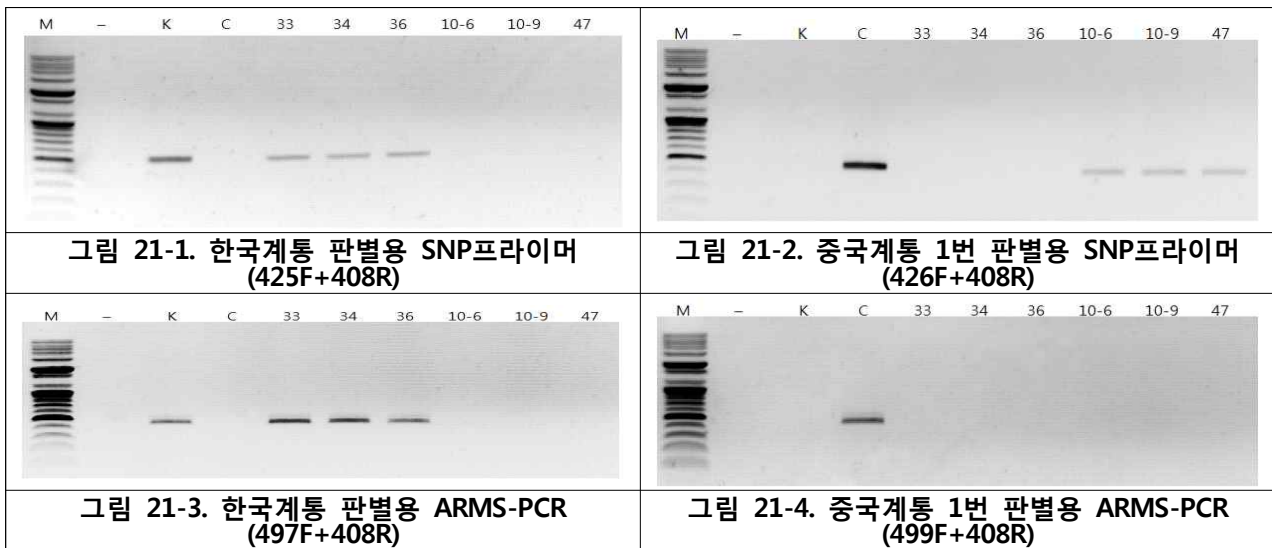


그림 3-21. 중국계통 1 꾸지뽕의 판별용 MatK 유전자 마커의 분석 결과. K는 한국계통(2014-2), C는 중국계통1(2014-1)로 확인된 대표 시료이며, 나머지는 각각 수집된 계통들의 일련번호이다.

다음으로 중국계통 2는 전술한 바와 같이 중국계통1과 2에 공히 밴드를 생산하도록 제작한 판별 마커들을 사용하여 핵산증폭실험을 수행한 결과, 그림 3-22에 제시한 바와 같이 한국계통에 대한 판별 마커 즉 SNP(559F+560R)과 인접한 염기를 변경한 ARMS-PCR용 프라이머(560F+572R, 570F+573R, 571F+574R)들을 사용한 경우 ITS 마커로 한국계통으로 판명된 2014-42(C)와 33, 34, 36 개체들은 밴드들을 생성하였으나, 핵내 ITS 마커로 중국계통 1로 확인된

2014-41(C)와 엽록체 유전자인 *trnL-trnF* 마커로 중국계통 2로 확인된 10, 47번 개체들은 밴드를 생산하지 않아 예상한 결과를 얻었다. 또한 중국계통1과 2에 공히 밴드를 생성하도록 제작한 프라이머로 SNP(557F+558R) 그리고 ARMS-PCR용 프라이머(563F+558R, 564F+567R, 565F+568R)를 사용한 경우에도 예상한 바와 같이 2014-41(중국계통 1)과 10, 47번 개체들은 모두 밴드를 생성하였다. 그러나 SNP 그 자체만을 이용한 프라이머와 인접한 3번째 염기를 T로 변경한 프라이머를 사용한 경우에는 약하지만 한국계통에도 밴드를 생성하였다(그림 22-5, 22-7 참조).

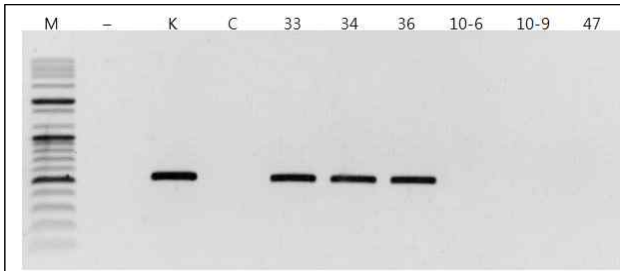


그림 22-1. 한국계통 판별용 SNP 마커 (559F+560R)

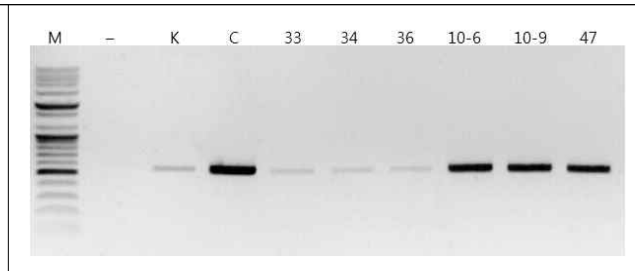


그림 22-5. 중국계통 판별용 SNP마커(557F+558R)

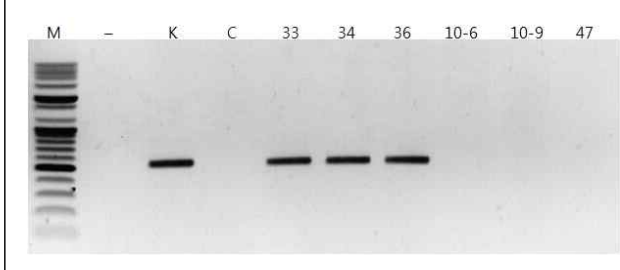


그림 22-2. 한국계통 판별용 ARMS-PCR (569F+572R)

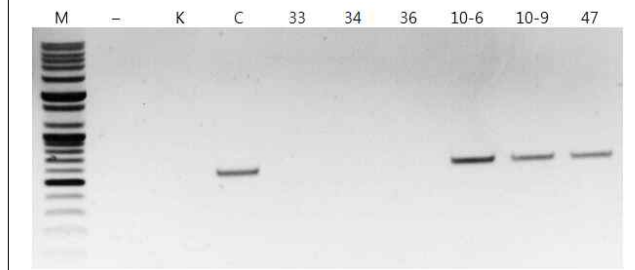


그림 22-6. 중국계통 판별용 ARMS-PCR (563F+558R)

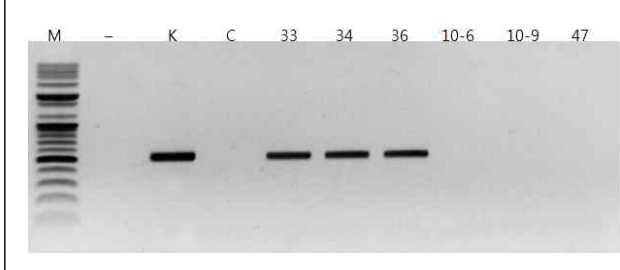


그림 22-3. 한국계통 판별용 ARMS-PCR (570F+573R)

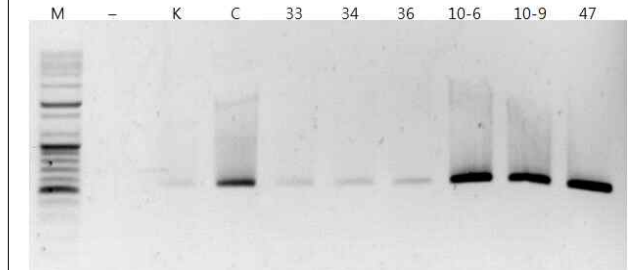


그림 22-7. 중국계통 판별용 ARMS-PCR (564F+567R)

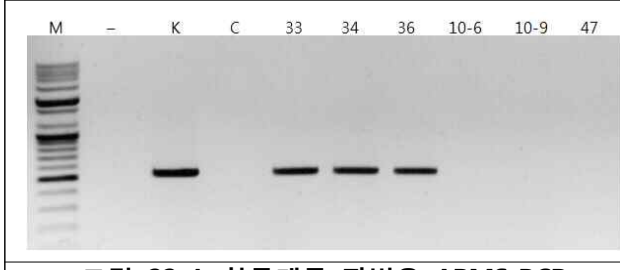


그림 22-4. 한국계통 판별용 ARMS-PCR (571F+574R)

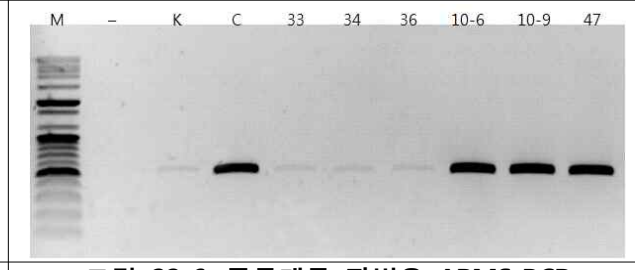


그림 22-6. 중국계통 판별용 ARMS-PCR (565F+568R)

그림 3-22. 중국계통 2의 *MatK* 유전자 마커를 이용한 ARMS-PCR 결과. K는 한국계통(2014-2), C는 중국계통1(2014-1)로 확인된 대표 시료이며, 나머지는 각각 수집된 계통들의 일련번호이다.

마. 국산 영정귀계통의 분자생물학적 판별 마커 개발

(1) 영정귀 수집계통별 핵 내 ribosomal DNA (rDNA) 유전자 단편의 염기서열 비교분석결과 (그림 3-23)

국내에서 자생하는 것으로 알려진 4종의 영정귀 즉 대계, 큰영정귀, 고려영정귀, 섬영정귀와 유럽영정귀 그리고 캐나다영정귀 등 총 6종의 핵 내 DNA인 rDNA 유전자 단편의 염기서열을 비교 분석 한 결과 총640 bp의 염기서열 중 31개의 단일염기다형성을 보여 상호간에 높은 상동성을 나타내었다.

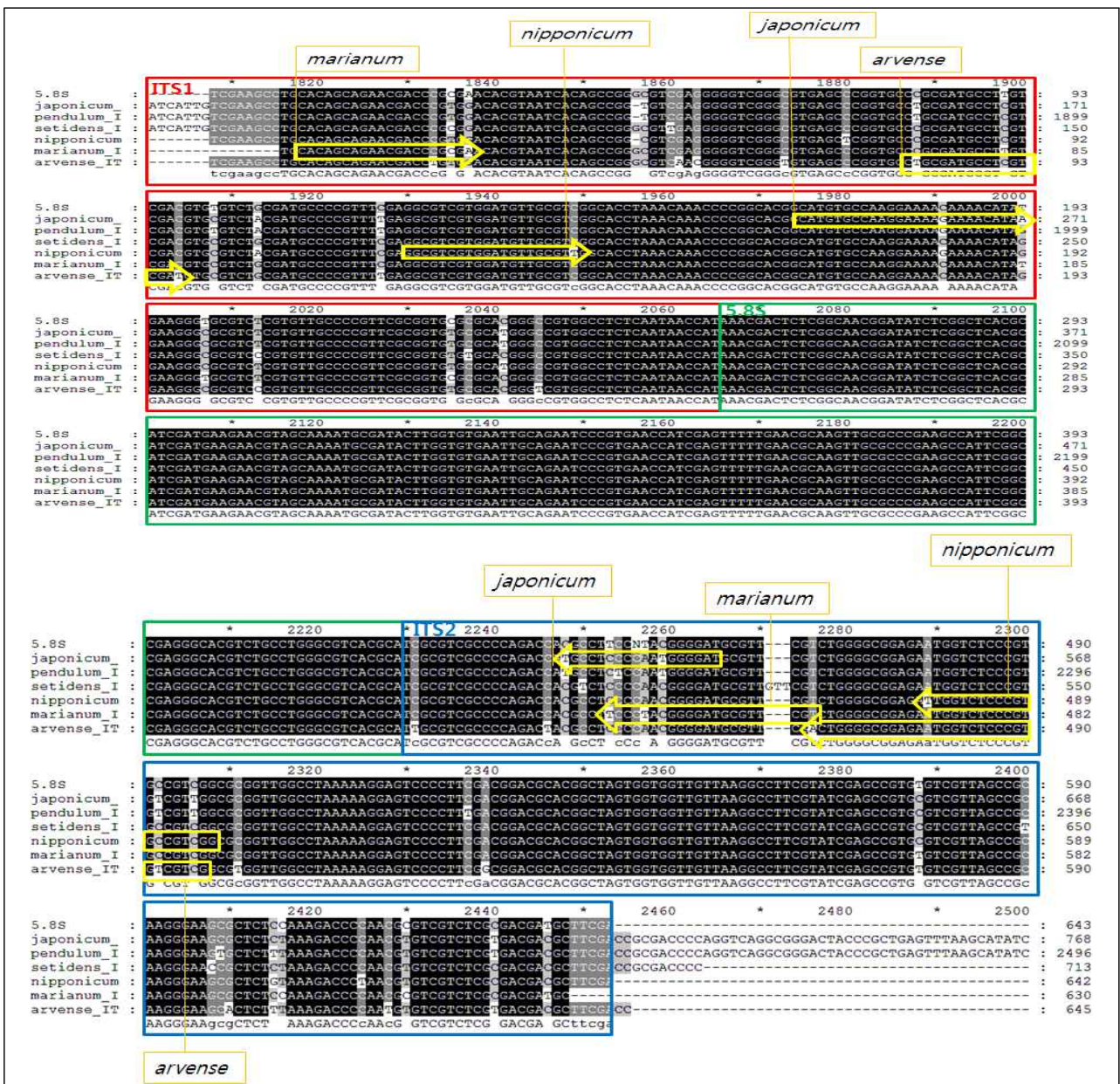


그림 3-23. 국내 자생하는 영정귀(*C. japonicum*), 큰영정귀(*C. pendulum*),고려영정귀(*C. setidens*), 섬영정귀(*C. nipponicum*), 유럽영정귀(*Silybum marianum*) 및 캐나다영정귀(*Cirsium arvense*)의 핵 내 ITS 영역의 염기서열 비교분석 결과. 각각의 판별용 프라이머를 표시하였으며, ITS I, 5.8S RNA, ITS II 영역을 각각 다른 색깔의 상자로 표시하였음.

(2) 국내 자생하는 영정귀(대계)(*C. japonicum*)의 판별 마커 개발

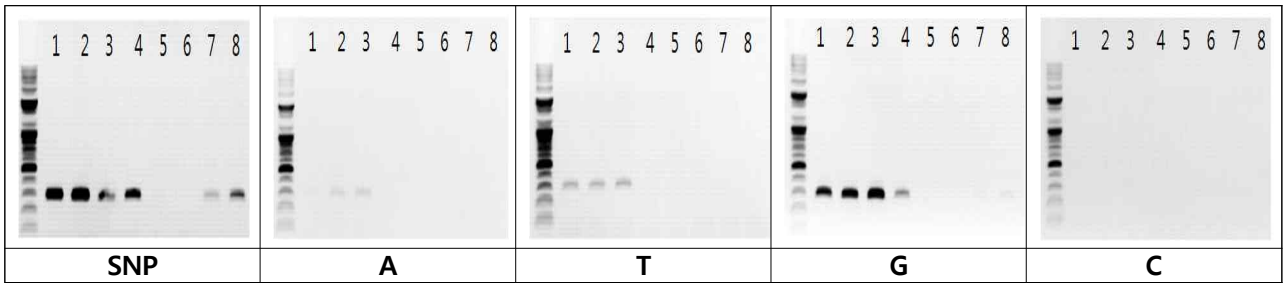
국내에서 자생하는 영정귀 중 대표적인 것으로 알려진 대계(*C. japonicum*)를 판별하기 위한 프라이머를 제작하기 위하여 그림 3-23에서의 염기서열 비교분석 결과에서 확인된 단일염

기다형성 중 정방향은 2000번째, 역방향은 2248번째 염기를 3' -말단에 위치하도록 각각 디자인하였다. 따라서 대계영경귀 판별용 정방향 프라이머는 본 연구에서 확인된 다른 5종의 영경귀종과 차이가 나는 염기 “T” 가 3' -말단에 위치하도록 하였으나, 역방향 프라이머는 고려영경귀(*C. setidens*), 유럽(*Silybum marianum*), 캐나다영경귀(*Cirsium arvense*)와는 차이를 보이거나 큰 영경귀(*C. pendulum*)와는 동일한 “T” 염기가 3' -말단에 위치하도록 하였다(표 3-23).

표 3-23. 국산영경귀(*C. japonicum*)의 판별용 ITS 유전자 SNP 및 ARMS-프라이머의 염기서열 정보

	Name	Sequence (5' -> 3' )	Tm (°C)	Accession No	Size (bp)
대계	japonicum_ITS_SNP_F	CATGTGCCAAGGAAAAGAAAACATAA	55.4	615	291 bp
	japonicum_ITS_SNP_R	ATCCCCATTGGGGAGGCA	61.2	616	
	japonicum_ITS_ARMS_F_A	CATGTGCCAAGGAAAAGAAAACAAAA	56.2	618	
	japonicum_ITS_ARMS_F_G	CATGTGCCAAGGAAAAGAAAACAGAA	57.6	617	
	japonicum_ITS_ARMS_F_C	CATGTGCCAAGGAAAAGAAAACACAA	57.9	619	
	japonicum_ITS_ARMS_A	ATCCCCATTGGGGAGACA	57.3	620	
	japonicum_ITS_ARMS_T	ATCCCCATTGGGGAGTCA	57.3	621	
	japonicum_ITS_ARMS_C	ATCCCCATTGGGGAGCCA	61.2	622	

상기한 프라이머(615번과 616번)를 사용하여 수집된 영경귀종으로 부터 분리한 게놈 DNA를 주형으로 하고, 표 3-23에서 기술한 프라이머 조합을 사용하여 PCR 실험을 수행하여 조사한 결과, 3' -말단에 각각 단일염기다형성을 포함하는 SNP 프라이머 (615와 616번)를 사용하여 PCR을 수행한 결과 유럽산 영경귀를 제외한 다른 3종 즉 대계, 섬(물)영경귀 그리고 캐나다산 영경귀에서 모두 동일한 크기의 DNA 밴드를 생산한 것으로 조사되어 대계영경귀에 내재하는 단일염기다형성만으로 만든 SNP 프라이머는 다른 영경귀종으로 부터 구분할 수 있는 판별마커로 사용하기에 부적합한 것으로 조사되어 ARMS-PCR 기술의 도입이 필요하였다(그림 3-24). 따라서 SNP 프라이머의 3' -말단에서 5' -말단 쪽으로 세 번째 염기를 각각 다른 3종류의 염기로 변경한 프라이머를 제작하여 정방향 및 역방향프라이머 모두 동일한 염기로 치환된 프라이머 조합을 사용하여 PCR반응을 수행하여 본 결과 3' -말단과 인접한 세 번째 염기를 각각 “T” 로 변경시킨 615번과 621번 프라이머 조합에서 가장 선명한 밴드를 생산하여 ARMS기술의 도입으로 판별효과를 높일 수 있는 것으로 조사되었다. 그러나 “G” 로 치환한 경우 (617+616 조합)에는 섬영경귀에도 약한 밴드를 생산하였으며 “A” (618+620조합) 또는 “C” (619+622조합)로 치환한 경우에는 모든 시료에서 밴드가 사라지거나 아주 희미하게 되는 결과를 얻어 판별 마커로는 부적합한 것으로 조사되었다(그림 3-24).



**그림 3-24.** 국내 자생하는 엉겅퀴(*C. japonicum*)의 SNP 또는 ARMS-PCR 판별 마커(표 2 참조)를 이용한 핵산증폭실험 결과. SNP는 국산엉겅퀴에 내재하는 단일염기다형성을 각각 정방향과 역방향의 3' -말단에 위치하도록 하여 제작한 프라이머, 그리고 (A), (T), (G), (C)는 3' -말단에 인접한 세 번째 염기서열을 각각 해당하는 염기로 변경하여 만든 ARMS-PCR용 프라이머 조합을 사용한 결과임. 1, 2, 3은 국산엉겅퀴(*C. japonicum*)로 수집지역 및 시기가 다른 시료이고, 4는 섬엉겅퀴(*C. nipponicum*), 5와 6은 유럽엉겅퀴(*Silybum marianum*), 7과 8은 캐나다에서 수집된 엉겅퀴(*Cirsium arvense*)임. SNP는 3' -말단에 인접한 염기를 변경하지 않은 내재하는 염기 그 자체만으로 제작한 프라이머, A, T, G, C는 각각의 염기로 변경하여 제작한 ARMS-PCR을 수행한 결과임

(3) 섬엉겅퀴(*C. nipponicum*)의 구분을 위한 판별용 마커 개발

섬 또는 물엉겅퀴로 불리우는 *C. nipponicum*을 판별하기 위한 프라이머 역시 그림 3-23을 참조하여 유일하게 다른 5종의 엉겅퀴와 차이가 나는 단일염기다형성을 보이는 염기를 근거로 하여 제작하도록 하였다. 즉 정방향 프라이머는 1949번 염기 그리고 역방향 프라이머는 2289번 염기를 각각 3' -말단에 위치하도록 하여 프라이머를 제작하여 각각 nipponicum\_ITS\_SNP\_F, nipponicum\_ITS\_SNP\_R로 명명하였다 (표 3-24). 공시한 엉겅퀴 시료로부터 분리한 게놈 DNA와 상기한 섬 엉겅퀴 판별용 정방향 과 역방향 프라이머를 이용하여 주어진 Tm값을 annealing 온도로 하고 전술한 조건으로 PCR 반응을 수행한 결과 목표로 한 섬 엉겅퀴보다 유럽 또는 캐나다 엉겅퀴에서도 강한 밴드를 생산하여 역시 ARMS 기술의 도입이 필요한 것으로 조사되었다(그림 3-25). 따라서 정방향과 역방향 프라이머의 3' -말단에 이웃한 세 번째 염기를 각각 다른 3가지의 염기로 변경하여 제작 한 다음(표 3-24), 같은 염기 조합의 프라이머를 사용하여 PCR 실험을 수행하여 본 결과 세 번째 염기를 “T” 로 변경한 정방향 및 역방향 프라이머 조합 (592+595)에서 섬엉겅퀴에만 예상한 크기(376 bp)의 단일 밴드를 확인하여 가장 우수한 결과를 얻었으며, “A”, “G” 또는 “C” 로 변경한 조합에서는 다른 종의 시료에도 밴드를 생성 하거나, 크기가 다른 DNA 밴드가 보여 판별마커로는 부적합 한 것으로 조사되었다. 따라서 국내에서 자생하는 것으로 알려진 엉겅퀴 중 본 발명에서 수집하여 확인한 대계와 섬엉겅퀴의 판별마커는 향후 실용화가 가능할 것이다.

**표 3-24.** 섬엉겅퀴(*C. nipponicum*)의 판별용 SNP 및 ARMS-프라이머의 염기서열 정보

	Name	Sequence (5' → 3' )	Tm(°C)	Accession No	Size (bp)
섬(물)엉겅퀴	nipponicum_ITS_SNP_F	GGCGTCGTGGATGTTGCGTT	63.2	589	376
	nipponicum_ITS_SNP_R	CCGACGGCACGGGAGACCAA	67.5	590	
	nipponicum_ITS_ARMS_F_A	GGCGTCGTGGATGTTGCATT	60.5	591	
	nipponicum_ITS_ARMS_F_T	GGCGTCGTGGATGTTGCTTT	60.6	592	
	nipponicum_ITS_ARMS_F_C	GGCGTCGTGGATGTTGCCTT	63	593	
	nipponicum_ITS_ARMS_R_A	CCGACGGCACGGGAGACAAA	65	594	
	nipponicum_ITS_ARMS_R_T	CCGACGGCACGGGAGACTAA	59.1	595	
	nipponicum_ITS_ARMS_R_G	CCGACGGCACGGGAGACGAA	67.3	596	

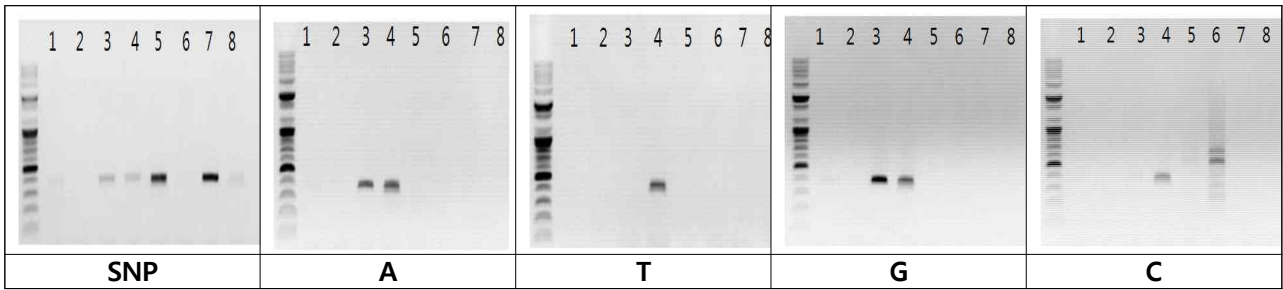


그림 3-25. 국내 자생하는 섬엉겅퀴(*C. nipponicum*)의 SNP 또는 ARMS-PCR 판별 마커(표 3 참조)를 이용한 핵산증폭실험 결과. SNP는 섬엉겅퀴에 내재하는 단일염기다형성을 각각 정방향과 역방향의 3' -말단에 위치하도록 하여 제작한 프라이머, 그리고 (A), (T), (G), (C)는 3' -말단에 인접한 세 번째 염기서열을 각각 해당하는 염기로 변경하여 만든 ARMS-PCR용 프라이머 조합을 사용한 결과임. 1, 2, 3은 국산엉겅퀴(*C. japonicum*)로 수집지역 및 시기가 다른 시료이고, 4는 섬엉겅퀴(*C. nipponicum*), 5와 6은 유럽엉겅퀴(*Silybum marianum*), 7과 8은 캐나다에서 수집된 엉겅퀴(*Cirsium arvense*)임. SNP는 3' -말단에 인접한 염기를 변경하지 않은 내재하는 염기 그 자체만으로 제작한 프라이머, A, T, G, C는 각각의 염기로 변경하여 제작한 ARMS-PCR을 수행한 결과임

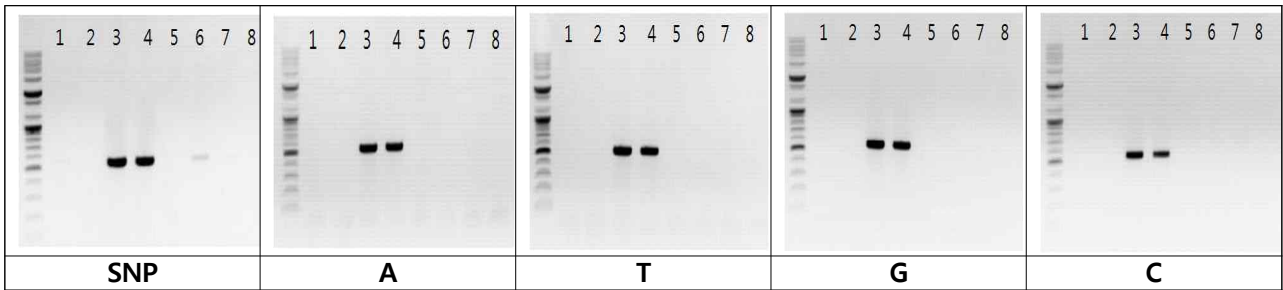
#### (4) 캐나다 엉겅퀴(*Cirsium arvense*)의 구분을 위한 판별 마커 개발

캐나다의 온타리오 주 도로변에서 채취한 엉겅퀴의 핵 내 rDNA 단편의 염기서열을 분석한 결과 이는 국내에서 자생하는 엉겅퀴들과 동일한 *Cirsium*속에 속하는 *Cirsium arvense*로 확인되었으며 문헌에 의하면 이는 유럽에서 북미로 이동된 외래종으로 북미 온대지역에서 가장 심각한 잡초 중의 하나로 알려져 있다. 따라서 국내에 자생하는 엉겅퀴와 동일한 속에 속하나 종이 다른 캐나다엉겅퀴와 속이 다르나 역시 엉겅퀴(milk thistle)로 호칭되고 있는 유럽엉겅퀴(*Silybum marianum*)를 본 발명에 포함하여 각각의 판별 마커를 개발하기로 하였다. 먼저 캐나다엉겅퀴의 판별 마커는 그림 3-23의 염기서열 비교분석 자료에서 캐나다엉겅퀴에만 유일하게 단일염기다형성을 보이는 염기들 즉 1837번과 2253번 염기를 3' -말단으로 하는 정방향과 역방향 프라이머를 각각 제작하여 각각 *arvense\_ITS\_SNP\_F*와 *arvense\_ITS\_SNP\_R*로 명명하였다(표 3-25).

표 3-23. 캐나다엉겅퀴(*Cirsium arvense*)의 판별용 SNP 및 ARMS-프라이머의 염기서열 정보

	Name	Sequence (5' -> 3' )	Tm(°C)	Accession No	Size (bp)
캐나다	<i>arvense_ITS_SNP_F</i>	CTGCGATGCCTCGTCGAT	59.6	581	545bp
	<i>arvense_ITS_SNP_R</i>	CGACACATTGGGGTCTTTAAAGAGT	58.4	582	
	<i>arvense_ITS_ARMS_F_A</i>	CTGCGATGCCTCGTCAAT	57	583	
	<i>arvense_ITS_ARMS_F_T</i>	CTGCGATGCCTCGTCTAT	55.9	584	
	<i>arvense_ITS_ARMS_F_C</i>	CTGCGATGCCTCGTCCAT	59.6	585	
	<i>arvense_ITS_ARMS_R_T</i>	CGACACATTGGGGTCTTT AAAGTGT	58.7	586	
	<i>arvense_ITS_ARMS_R_G</i>	CGACACATTGGGGTCTTTAAAGGGT	60.9	587	
	<i>arvense_ITS_ARMS_R_C</i>	CGACACATTGGGGTCTTTAAAGCGT	61.3	588	

이들 프라이머를 사용하여 공시한 엉겅퀴 시료들로부터 분리한 게놈 DNA를 대상으로 PCR 반응을 수행한 결과, 예상한 바와 같이 캐나다엉겅퀴는 예상한 크기(545 bp)의 강한 DNA밴드를 확인하였으나 다른 엉겅퀴종 특히 유럽종에서 약한 밴드를 확인하였다. 따라서 ARMS기술을 도입하여 판별효과를 보다 높일 수 있는지의 여부를 확인하기 위하여 3' -말단에 인접한 세 번째 염기를 각각 다른 3가지의 염기로 변경한 프라이머를 제작하였다. 이들 프라이머를 대상으로 정방향과 역방향프라이머의 세 번째 염기를 동일한 염기 즉 “A”, “T”, “G”, “C” 로 조합하여 PCR을 다시 수행하여 본 결과 모든 조합에서 캐나다엉겅퀴에만 밴드를 생산하는 것을 확인하여 이들을 캐나다엉겅퀴의 판별용 프라이머로 사용할 수 있음을 확인하였다(그림 3-26).



**그림 3-26.** 캐나다 엉겅퀴(*C. arvense*)의 SNP 또는 ARMS-PCR 판별 마커(표 3-23)를 이용한 핵산증폭 실험 결과. SNP는 캐나다엉겅퀴에 내재하는 단일염기다형성을 각각 정방향과 역방향의 3' -말단에 위치하도록 하여 제작한 프라이머, 그리고 (A), (T), (G), (C)는 3' -말단에 인접한 세 번째 염기서열을 각각 해당하는 염기로 변경하여 만든 ARMS-PCR용 프라이머 조합을 사용한 결과임. 1, 2, 및 5는 국산엉겅퀴(*C. japonicum*)로 수집지역 및 시기가 다른 시료이고, 3과 4는 각각 캐나다에서 수집한 엉겅퀴이며, 6은 섬엉겅퀴(*C. nipponicum*), 7과 8은 유럽엉겅퀴(*Silybum marianum*)임. SNP는 3' -말단에 인접한 염기를 변경하지 않은 내재하는 염기 그 자체만으로 제작한 프라이머, A, T, G, C는 각각의 염기로 변경하여 제작한 ARMS-PCR을 수행한 결과임

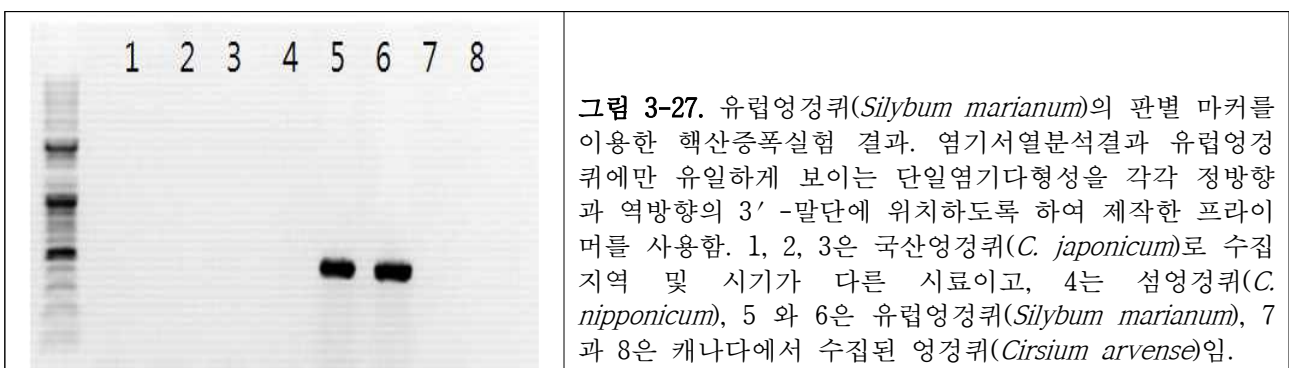
(5) 유럽엉겅퀴(*Silybum marianum*)의 구분을 위한 판별 마커 개발

최근 국내 소비자들의 건강기능식품에 대한 선호도의 증가추세에 따라 유럽산 엉겅퀴의 수입량 또한 증대되고 있는 실정이다. 따라서 국산 엉겅퀴와의 구분 유통질서의 확립을 위한 판별마커의 개발 필요성이 시급한 실정이다. 유럽에서 수입되는 엉겅퀴는 학명이 국내의 엉겅퀴종과는 다른 *Silybum marianum* 으로 그림 3-231에서 제시한 바와 같이 국내 자생하는 엉겅퀴 즉 대계(*C. japonicum*), 섬엉겅퀴(*C. nipponicum*), 또는 고려엉겅퀴(*C. setidens*), 큰엉겅퀴(*C. pendulum*), 그리고 캐나다엉겅퀴(*Cirsium arvense*)와는 많은 단일염기다형성을 보였다. 그 중 유럽산엉겅퀴에만 유일하게 다른 1837번과 2253번의 단일염기다형성을 보이는 염기를 정방향 또는 역방향 프라이머의 3' -말단에 위치하도록 하여 프라이머를 제작하여 각각 *marianum\_ITS\_SNP\_F*와 *marianum\_ITS\_SNP\_R*로 명명하였다(표 3-24).

**표 3-24.** 유럽산엉겅퀴(*Silybum marianum*)의 판별용 프라이머의 염기서열 정보

	Name	Sequence (5' -> 3' )	Tm(°C)	Accession No	Size (bp)
유럽	<i>marianum_ITS_SNP_F</i>	CACAGCAGAACGACCCGCGA	65	597	456bp
	<i>marianum_ITS_SNP_R</i>	ACGAACGCATCCCCGTAGGGA	65	598	

이들 프라이머를 사용하여 공시한 4종의 엉겅퀴 시료로부터 분리한 게놈 DNA를 대상으로 PCR 실험을 수행한 결과, 유럽산 엉겅퀴 시료에서만 예상한 크기(456 bp)의 DNA 밴드를 형성하여 상기한 SNP 프라이머를 그대로 유럽엉겅퀴(*S. marianum*)의 판별마커로 사용하기에 적합하다는 결론을 얻었다(그림 3-27).



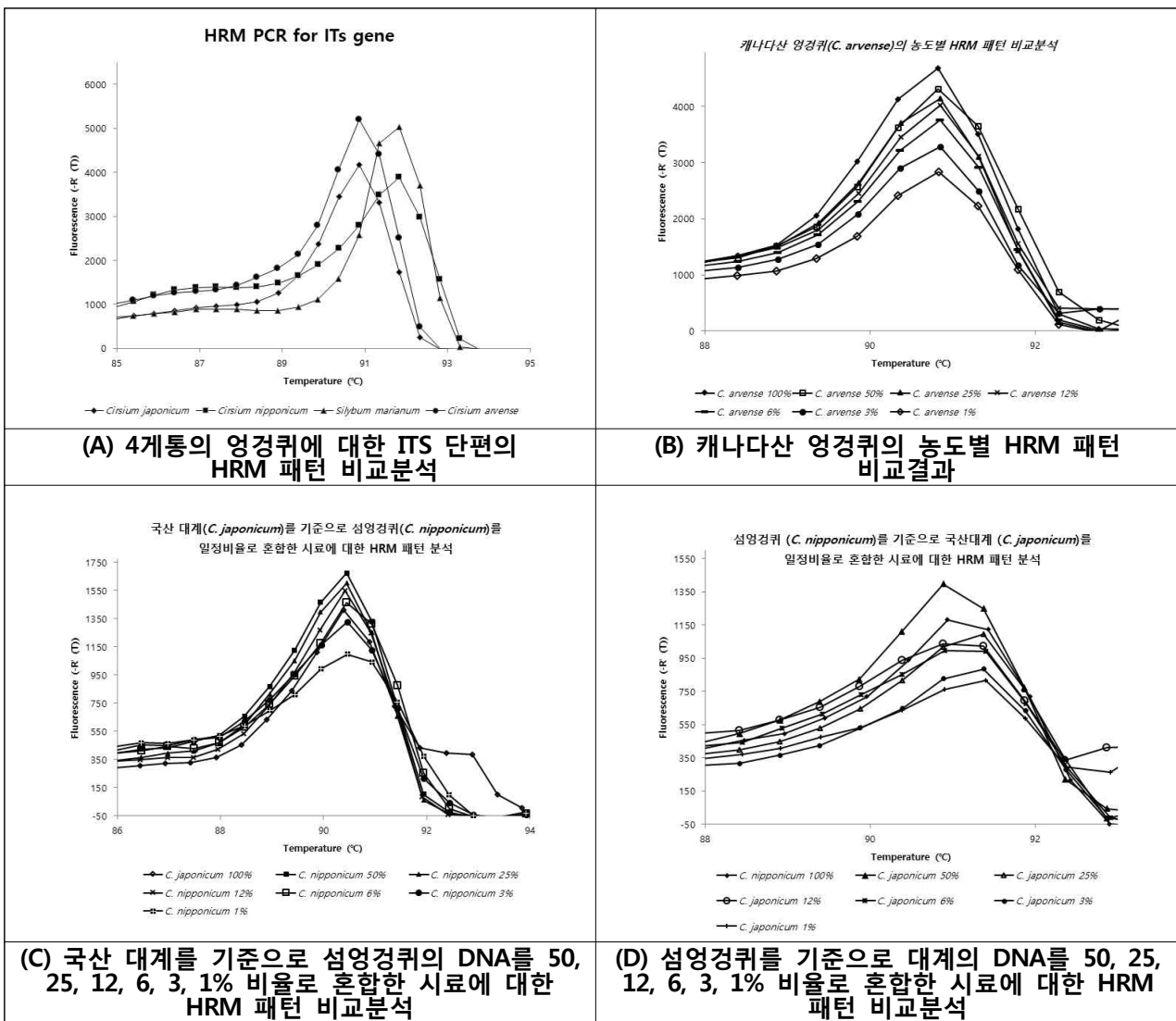
**그림 3-27.** 유럽엉겅퀴(*Silybum marianum*)의 판별 마커를 이용한 핵산증폭실험 결과. 염기서열분석결과 유럽엉겅퀴에만 유일하게 보이는 단일염기다형성을 각각 정방향과 역방향의 3' -말단에 위치하도록 하여 제작한 프라이머를 사용함. 1, 2, 3은 국산엉겅퀴(*C. japonicum*)로 수집지역 및 시기가 다른 시료이고, 4는 섬엉겅퀴(*C. nipponicum*), 5 와 6은 유럽엉겅퀴(*Silybum marianum*), 7 과 8은 캐나다에서 수집된 엉겅퀴(*Cirsium arvense*)임.

**(6) HRM패턴 비교분석에 의한 엉겅퀴 계통의 판별 기술 개발**

(가) ITS 유전자단편의 HRM패턴 비교 분석에 의한 엉겅퀴 계통의 판별 기술 개발 : 엉겅퀴의 핵내 ITS 유전자를 대상으로 HRM 분석용 단편의 증폭을 위하여 표 3-25에 요약한 바와 같이 프라이머를 디자인하였다,

**표 3-25. HRM 패턴 분석용 엉겅퀴의 ITS 유전자 증폭용 프라이머**

Name	Sequence	Tm (°C)	No	Size (bp)
japonicum_HRM_F	GCAGAATCCCGTGAACCATCGA	61	623	238 bp
japonicum_HRM_R	GCTCGATACGAAGGCCTTAACAAC	60	624	



**그림 3-28. ITS유전자단편에 대한 엉겅퀴의 계통별 HRM 패턴 비교분석 결과**

대계로 호칭되는 국산엉겅퀴(*C. japonicum*) 2점, 역시 국내에 서식하는 것으로 섬엉겅퀴(*C. nipponicum*) 1점, 유럽엉겅퀴(*Silybum marianum*) 2점, 그리고 캐나다에서 수집한 엉겅퀴(*C. arvense*) 2점에 대하여 각각의 DNA를 분리한 다음 상호간 SNP가 가장 많이 분포하도록 디자인한 프라이머(표 3-25)를 사용하여 HRM패턴을 비교분석한 결과 (그림 3-28), 본 실험에 사용한 4종의 엉겅퀴는 분명하게 구분이 가능하였다(그림 3-28(A)). 그림 3-28(B)는 캐나다산 엉겅퀴의 DNA농도를 50, 25, 12, 6, 3, 1%로 각각 희석한 시료에 대한 HRM 패턴을 비교한 결과 첨가한



DNA의 농도에 비례하여 상대적으로 peak가 낮아짐을 확인하여 상대적인 농도의 측정이 가능하였다. 한편 시중에 영경귀 계통들이 혼재하여 유통되는 경우 식별이 불가능하기 때문에 이들에 대한 혼재여부를 분자생물학적으로 확인하는 기술을 개발하고자 대계인 국산영경귀를 기준으로 섬영경귀를 50, 25, 12, 6, 3, 1%로 DNA를 혼합하거나(그림 3-28 C), 반대로 섬영경귀를 기준으로 대계를 50, 25, 12, 6, 3, 1% 비율로 혼합하여(그림 3-28 D) 각각의 HRM 패턴을 비교한 결과, 혼재한 DNA의 비율이 낮아짐에 따라 상대적으로 peak가 비례하여 낮아짐을 확인하여 향후 유통시장에서의 실용화에 적용될 수 있도록 추가연구가 필요한 것으로 조사되었다.

(나) 엽록체 유전자단편의 HRM패턴 비교분석에 의한 영경귀 계통의 판별 기술 개발 : 다음으로 영경귀의 엽록체 유전자인 trnL-trnF 및 matK 유전자의 HRM 패턴 비교분석에 의한 판별 기술을 개발하고자 각 유전자에 대한 프라이머를 표 3-26과 같이 디자인한 하여 제작하였다.

표 3-26. 엽록체 유전자 (trnL-trnF 및 matK)를 이용한 HRM 패턴 분석용 primer 목록

	Name	Sequence	Tm (°C)	No	Size (bp)
trnL-trnF 유전자	C. nipponicum_trnLF_F	GGGCAATCCTGAGCCAAATCA	61.3	629	253 bp
	C. japo_trnLF_HRM_R	TATGGAGTGAATTGTTTGATC	53.5	668	
matK 유전자	C.japo_matK_HRM_F	GTTCGATACTCTTGTTCCAA	57.4	666	205 bp
	C.japo_matK_HRM_R	TCTAGCACAAGACAGTCGAAGT	57.5	667	

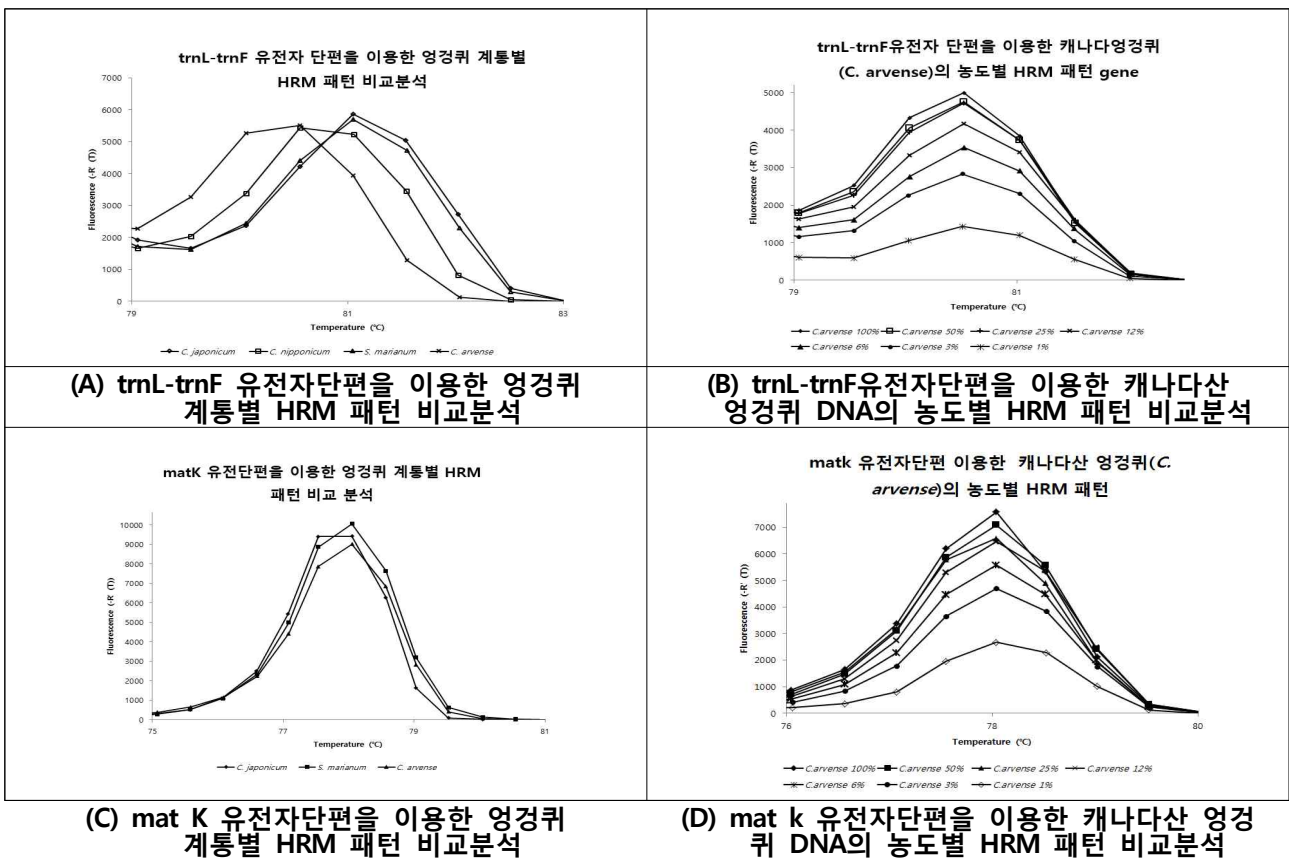


그림 3-29. 엽록체 유전자 trnL-trnF 및 matK 유전자를 이용한 영경귀 계통별 HRM 패턴 분석 결과

바. 주요 약용작물의 기내 배양체를 이용한 항균성 및 항산화성 조사

(1) 부정근 배양 조건 및 수율 조사

주요약용작물의 기내 배양조건을 확립하여 일반 노지에서 재배한 약용작물의 조직과 비교

하여 관련된 약효 성분이나 기타 항산화성 및 항균력에 대한 비교실험을 수행하고자 먼저 백수오, 장백도라지, 적하수오에 대한 부정균의 배양조건을 확립하는 실험을 수행하였다. 예비실험으로 1, 2년차에 수행한 결과를 종합하여 3년차에는 효과가 높은 IBA의 호르몬 농도별 부정균의 생체중 증가속도를 측정하여 결과를 비교하여 본 결과, 표 3-27에서 요약한 바와 같이 백수오, 장백도라지, 적하수오 모두 1.0 mg/L의 IBA 호르몬 농도에서 가장 우수한 생체중의 증가율을 보였다. 3년차에는 상기한 조건에서 배양한 부정균 시료들을 동결건조한 후 협동연구기관인 경남한방약초연구소에 분양하여 일반 노지에서 재배한 약용작물과의 상대적인 성분분석 실험을 수행하도록 하였다.

표 3-27. IBA 호르몬의 농도별 부정균 체적 증가율 (단위 g)

IBA농도 (mg/L)	백수오(g)		장백		적하수오	
	생체중	평균±SD	생체중	평균±SD	생체중	평균±SD
0.0	0.03	0.045±0.012	0.058	0.056±0.004	0.028	0.04±0.012
	0.059		0.059		0.037	
	0.047		0.051		0.056	
0.5	0.125	0.121±0.019	0.127	0.109±0.013	0.093	0.09±0.004
	0.143		0.096		0.089	
	0.096		0.104		0.098	
1.0	0.176	0.171±0.021	0.182	0.137±0.01	0.224	0.23±0.021
	0.194		0.123		0.206	
	0.143		0.207		0.256	
1.5	0.057	0.057±0.001	0.064	0.069±0.01	0.099	0.1±0.001
	0.058		0.082		0.097	
	0.055		0.06		0.096	

(2) 기내 배양균을 이용한 항균성 및 항산화성 조사

기내에서 배양한 백수오의 부정균 시료와 시중에서 구입한 건조한 백수오와 적하수오 시료를 동결건조한 후 처리한 시료추출액에 대하여 살모넬라균 (*Salmonella typhimurium*), 피부표피포동상구균 (*Staphylococcus epidermidis*), 대장균(*Escherichia coli*), 충치균(*Streptococcus mutans*), 포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 등을 배양한 배지위에서 생육저해환 확인 실험을 수행한 결과, 백수오의 부정균은 살모넬라와 충치세균, 포도상구균에 대하여 약 10 - 12 mm의 생육저해환을 나타내었다. 반면에 시중에서 구입한 노지에서 재배한 백수오의 건조한 뿌리 추출물은 대장균에서도 약가늌이 항균력을 보였으며, 시중에서 구입한 적하수오의 경우에는 공시한 5종의 모든 균에 대하여 항균력을 나타낸 것으로 조사되었다.

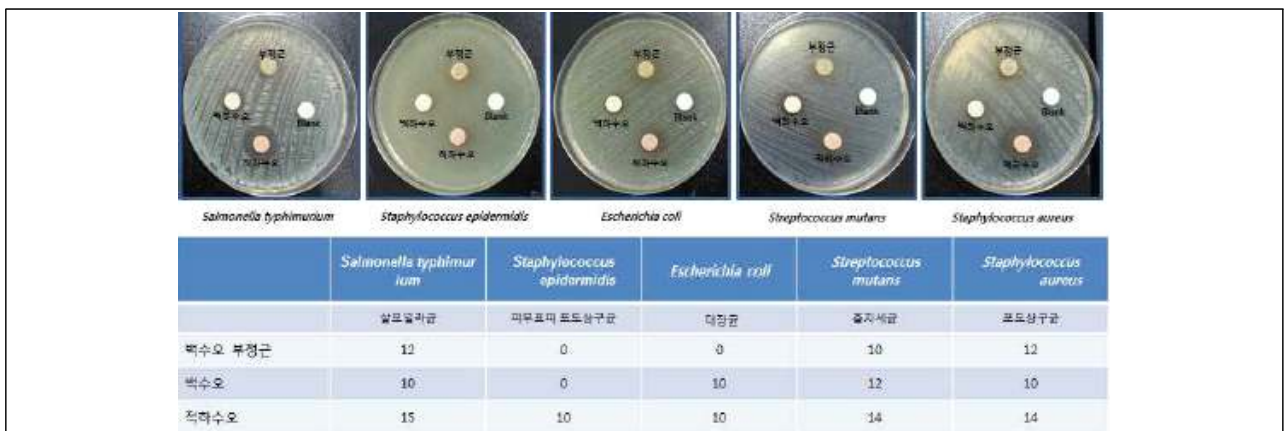


그림 3-30. 부정균 배양액의 추출액을 이용한 항균력 조사 (단위 mm)

## 제6절 지리산 권역 약용작물 활용 6차 산업 및 수익창출 모델 개발 [제5세부, 경남과학기술대학교 산학협력단]

### 1-1. 1차년도 연구수행 방법

#### 가. 한방약초 산업 분석

##### (1) 확장된 가치사슬 모형 이론

(가) 가치사슬(value chain)모형이란 기업이 가치(Value) 창출을 위해 수행하는 활동들의 중요성과 연계성을 고려하여 핵심 역량을 파악하기 위한 분석도구이다. 가치사슬 모형에서는 기업을 디자인, 생산, 판매, 운송, 지원 등을 포함한 제반활동을 수행하는 집합체로 가정하고, 이런 활동의 연관관계를 나타낸다(Poter, 1985).

(나) ‘확장된 가치사슬(extended value-added chain)’ 모형은 가치사슬의 개념을 더욱 넓은 범위로 확장시켜 산업의 특성을 파악 가능한 프레임워크로서 <그림 5-1-1>과 같은 형태를 보인다. 확장된 가치사슬의 모습은 산업마다 매우 상이한 형태를 보일 수 있으며, 경계는 원자재에서 유통에 이르는 전체 가치사슬의 모습을 나타내며, 그 내부에 포함된 작은 화살표들은 각 단계에 해당하는 기업을 나타낸다(조남재·박상혁,2001).

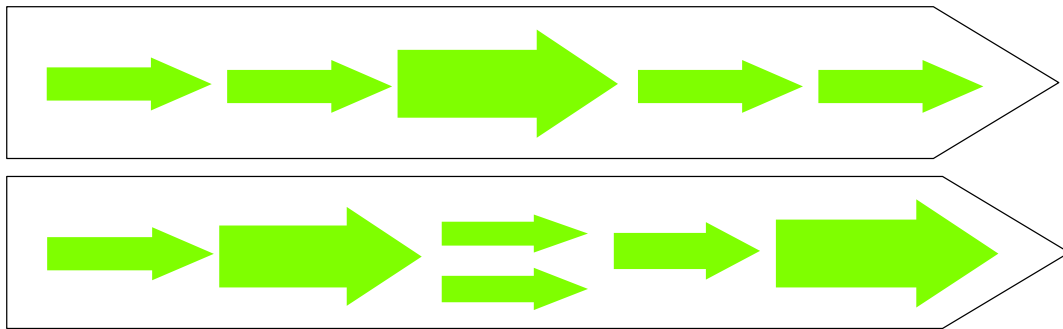


그림 5-1-1. 확장된 가치사슬 모형들

##### (2) 한방약초 산업의 산업구조 분석

(가) 우리나라의 한방약초 산업은 과거 한의원을 통한 한약재 공급이 주를 이루었다. 한의원과의 거래는 한의사의 처방을 통해 이루어지는 한약제조를 위한 다품종 소량거래로 지속되어 왔다. 이는 궁극적 소비자의 취향이나 니즈 파악이 불필요하고 ‘동의보감’ 등 수 천년전부터 전해 내려오는 탕약 제조 요소를 생산 및 공급해 오는 방식으로 진행되어 왔다. 국내의 한방약초 생산 농업분야는 다품종 소량거래 등의 이유로 인해 꾸준히 생산규모가 축소되어 왔고, 그로 인해 국내 소비의 상당한 부분이 수입 약초로 채워져 왔다. 지리산권역의 약초 생산 역시 자연상태의 약초를 채취하는 경우를 제외하고는 체계적 계획에 의한 생산이 이루어지지 못하고 있는 상황이다.

(나) 최근 한방약초 산업이 한의원과의 거래를 벗어나 새로운 시장으로 확장하는 모습을 보이고 있다. 가공 기술의 발달과 웰빙, 힐링 문화의 영향으로 국내 식품 시장이 꾸준히 성장해 왔기 때문이다. 또한 한류의 열풍으로 아시아권을 중심으로 한국의 화장품, 한국의 건강식품 수출이 꾸준히 증가하고 있다. 이에 국내 기업들은 한국의 한방약초를 토대로 한방화장품,

한방음료 개발을 위한 연구를 더욱 활발히 진행 중에 있으며 이는 한방약초 산업 종사자들에게 더 큰 시장을 제공한다. 이에 정부를 중심으로 한방약초 산업에서는 생산이력제, GMP인증 등 다양한 인증 절차를 만들어 생산에서부터 가공 판매에 이르기까지 체계적 관리를 위해 노력하고 있다. 또한 국내 한방약초의 우수한 약용 유전자원 확보 및 종자 대량생산 기반을 구축하고 산·학·연 협력 산업화 기반을 구축하였으며, 지역별로 특성에 맞는 약용작물 육성계획을 수립하고 있다.

## 나. 농촌의 조직 변화 교육

### (1) 동태적 조직변화 연구

조직변화란 외부환경 변화에 적응하며 살아남기 위해서 변화가 필수적인 동태성에 적응하기 위하여 적응적(unplanned) 혹은 비적응적(planned)으로 조직의 구조와 기술 및 사람 등이 변화하는 것을 의미한다(임창희, 2010). 경영학에서 조직변화에 관한 연구들의 강조점은 크게 ‘계획적 변화활동(activity)’ 과 ‘역동적인 변화과정(process)’ 을 설명하는 두 가지로 대별된다(Porras and Robertson, 1987). 오늘날과 같이 복잡하고 불확실성이 높은 급진적 환경변화에 적응하기 위해서는 계획적 변화활동 측면보다는 역동적 측면의 동태적인 환경변화에 따른 조직변화 방식에 대한 연구 필요성이 크게 강조되고, 기업생존의 필수요건으로 제시되고 있다. 조직의 안정상태의 관점보다 동태적인 변화의 관점을 전제로 하는 것이 현대 조직을 이해하는데 더욱 도움이 되기 때문이다(박상혁·한만선·전형광, 2013). 오늘날의 복잡한 환경 속에서 성공적인 6차산업을 위해서는 농촌 구성원들의 참여적 변화를 토대로 한 농촌 조직의 동태적 조직변화가 반드시 이루어져야 한다. 이를 위해서는 조직 구성원들이 환경변화를 민첩하게 감지하고(sense-making) 조직 전략에 대한 동태적 의사결정 능력을 갖추는 것이 강조된다.

### (2) 전략적 의사결정 연구

(가) 전략에 대한 의사결정에 대한 연구는 크게 전략의 내용(contents)과 수립 및 실행과정(process)으로 구분하는 성향을 보이고 있다(Jang, 1998). 전략의 내용을 강조하는 연구는 인간의 합리성을 기초로, 기업이 주어진 경영환경 하에 최선의 선택을 하는 것을 전제로 한 전략의 구체적인 내용을 주로 연구하였다. 반면에 실행과정에 대한 연구는 행동과학에 입각하여 기업의 의사결정이 어떤 과정에 의해 이루어지는가에 초점을 맞추고 있다. 이러한 대립적 이론을 농업의 6차산업화를 예로 설명하면, 새로운 6차산업화 모델을 만드는데 초점을 맞추는 것이 전자에 해당하고 6차산업화 모델이 어떤 과정을 거쳐 수립되는가에 초점을 맞추는 것이 후자에 해당한다고 볼 수 있다.

(나) 해석주의의 영향으로 의사결정 과정에 대한 연구는 다른 양상을 보이게 되는데, 기업의 전략은 제품, 소비자, 기술 등을 어떻게 구성하느냐에 따라 수립되는 것이 아니라 이를 기업 내의 경영자가 어떻게 해석하느냐에 따라 달라진다는 것이다(Barr, 1998; Anand and Peterson, 2000). 즉 특정사건에 대한 경영자의 해석이 기업 행동으로 연결된다는 것이다. 이러한 기업 행동을 결정하는 조직의 의사결정 권한은 조직구조의 형태에 따라 다르게 나타나는데, 중앙 집중적인 조직의 경우는 최고경영자의 기업 환경에 대한 해석이 조직 전략 방향에 매우 큰 영향을 나타내고 있다. 반면 분권화 되어 있는 조직인 경우에는 의사결정 처리과정에서 최고경영자의 해석보다 조직구성원들이 환경에 대해 어떤 해석을 내리고, 어떤 과정을 통해 조직내 여론이 형성되며, 형성된 여론이 의사결정으로 귀결되는가가 더 중요하게 나타난다. 따라서 분권화된 의사결정 구조를 가진 기업인 경우에는 조직구성원들의 환경에 대한 이

해, 즉 센스메이킹(sense-making)에 기반한 상호작용이 매우 중요하며 그에 따라 조직의 전략이 결정된다(Corner, Kinicki and Keats, 1994).

(다) 성공적인 6차산업화는 1차, 2차, 3차 산업에서 각각 개별경영주체로 활동하던 구성원들을 조합하여 지역단위 동태적 조직경영체를 구성하는 것으로 시작된다. 이는 의사결정에 있어 분권화되어 있는 조직의 형태를 보이며, 조직구성원들의 센스메이킹에 기반한 상호작용이 전략적 의사결정 처리과정에 있어서 중요하게 된다.

## 다. 6차산업화를 위한 체계적 공급사슬(SCM) 관리 연구

### (1) 빅데이터 분석을 통한 한방약초 기반 소비자 니즈 분석

(가) 빅 데이터(big data)란 기존 데이터베이스 관리도구로 데이터를 수집, 저장, 관리, 분석할 수 있는 역량을 넘어서는 대량의 정형 또는 비정형 데이터 집합 및 이러한 데이터로부터 가치를 추출하고 결과를 분석하는 기술을 의미한다(Gantz, J. & Reinsel, D., 2011).

(나) Fortune 1,000 대기업을 대상으로 실시한 빅데이터 활용 현황 조사에서 생산 업무에 빅데이터 이니셔티브를 활용하고 있다는 응답은 67%로 해마다 꾸준히 증가하고 있다. 빅데이터의 활용을 산업별로 구분해보면 미디어/커뮤니케이션, 금융, 서비스 산업에서 가장 활발하게 활용되고 있다. 많은 기업들은 정보수집과 전략수립보다는 파일럿/시험과 실제 활용을 목적으로 투자를 진행하고, 고객경험을 강화하고 업무효율을 개선하기 위해 빅데이터의 실질적인 가치를 창출하고 확보하는 방안을 마련하는데 주력하고 있다.

(다) 빅데이터의 활용을 위한 요소 기술을 분류하면 빅데이터 수집 기술, 빅데이터 공유 기술, 빅데이터 저장 기술, 빅데이터 처리 기술, 빅데이터 분석 기술, 빅데이터 시각화 기술로 분류 가능하다.

#### < 빅데이터 활용을 위한 요소기술 분류 >

요소기술	설 명	해당 기술
빅데이터 수집	조직내부와 외부의 분산된 여러 데이터 소스로부터 필요로 하는 데이터를 검색하여 수동 또는 자동으로 수집하는 과정과 관련된 기술로 단순 데이터 확보가 아닌 검색/수집/변환을 통해 정제된 데이터를 확보하는 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>•ETL</li> <li>•크롤링 엔진</li> <li>•로그 수집기</li> <li>•센싱</li> <li>•RSS, Open API 등</li> </ul>
빅데이터 공유	서로 다른 시스템간의 데이터 공유	<ul style="list-style-type: none"> <li>•멀티 테넌트 데이터 공유</li> <li>•협업 필터링 등</li> </ul>
빅데이터 저장	작은 데이터라도 모두 저장하여 실시간으로 저렴하게 데이터를 처리하고, 처리된 데이터를 더 빠르고 쉽게 분석하도록 하여, 이를 비즈니스 의사 결정에 바로 이용하는 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>•병렬 DBMS</li> <li>•하둡(Hadoop)</li> <li>•NoSQL 등</li> </ul>
빅데이터 처리	엄청난 양의 데이터 저장·수집·관리·유통·분석을 처리하는 일련의 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>•실시간 처리</li> <li>•분산 병렬 처리</li> <li>•인-메모리 처리</li> <li>•인-데이터베이스 처리</li> </ul>
빅데이터 분석	데이터를 효율적으로 정확하게 분석하여 비즈니스 등의 영역에 적용하기 위한 기술로 이미 여러 영역에서 활용해 온 기술임	<ul style="list-style-type: none"> <li>•통계분석</li> <li>•데이터 &amp; 텍스트 마이닝</li> <li>•예측 분석 &amp; 평판 분석</li> <li>•최적화</li> <li>•소셜 네트워크 분석 등</li> </ul>
빅데이터 시각화	자료를 시각적으로 묘사하는 학문으로 빅데이터는 기존의 단순 선형적 구조의 방식으로 표현하기 힘들기 때문에 빅데이터 시각화 기술이 필수적임	<ul style="list-style-type: none"> <li>•편집 기술</li> <li>•정보 시각화 기술</li> <li>•시각화 도구</li> </ul>

(라) 정부의 측면에서는 미국, EU, 일본 등 주요국가들이 공공데이터를 개방하여 거버넌스의 혁신을 이루고 시민의 공공정보 접근권을 보장하고자 노력하고 있다. 우리나라도 공공 데이터를 개방하고 개인 맞춤형 서비스를 제공하는 전자정부 시스템 ‘정부3.0’을 추진하고 있다.

(마) 빅데이터의 분석 및 활용은 관광산업분야에서도 활발한데, 비즈니스 트렌드 파악, 지능형 관광안내시스템 보급, 실시간 고객의 목소리 이해, 수익성 높은 고객의 유치 확보 등의 목적으로 활용되고 있다. 호주, 노르웨이, 스위스, 프랑스 등 주요 해외사례국가들은 현지인 의견 수렴, 관광객 이동 패턴 파악을 통한 빅데이터 구축 등 콘텐츠 수집 및 개발을 다양하게 추진하고 있으며, 외래관광객을 위해 다양한 언어 지원, 현지인들의 의견 정보 제공 등의 서비스를 웹 또는 모바일 앱을 통해 제공하고 있다. 한국관광공사도 국내 통신업체, 신용카드업체, 빅데이터 전문업체들과 함께 국내 관광객들의 행동패턴을 분석하고 이를 기반으로 2013년도 전국 문화관광축제 16개의 성과를 분석하는 연구를 진행하였다. 또한 외래 관광객의 니즈 분석을 위해 각종 해외 유명 포털 사이트, SNS 이용 내역 등을 분석하는 등 보다 효율적인 한국 관광상품 개발을 위해 빅데이터 기반 기술들을 활발하게 이용하고 있다(한국관광공사, 2014).

(바) 우리나라는 제주도 등의 지방자치단체를 중심으로 관광객 패턴 빅데이터 분석등의 관광 및 홍보마케팅 활용을 위한 연구가 진행중이다. 하지만 1차, 2차, 3차 산업의 융합으로 진행되는 특성이 있는 농촌의 6차산업을 위해서는 빅데이터를 기반으로 생산 단계에서 부터 체계적으로 관리하는 모델이 필요하다. 또한 6차산업을 농촌 관광 및 체험으로 마무리되는 구조이므로 빅데이터를 기반한 각 관광객별 실시간 맞춤형 정보 제공 기능을 제공할수 있는 시스템을 적극 활용할 필요가 있다.

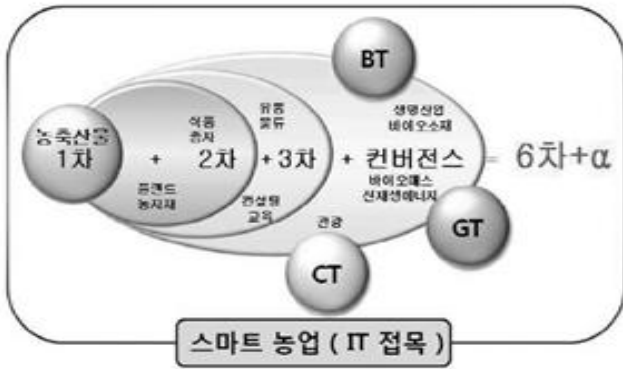
## (2) 공급사슬(Supply Chain)

(가) 6차 산업화는 1차 산업, 2차 산업, 3차 산업으로 이어지는 농촌 문화 및 농산물의 ‘공급사슬’을 농촌을 중심으로 관리하여 농업의 부가가치를 상승시키는 일이다. 하지만 동태적이고 불확실한 시장을 농업 1인의 개별 경영주체가 대응하기는 역부족인 상황이며 지역단위의 조직경영체를 구성하는 것이 바람직하다. 아래 그림은 6차산업화의 공급사슬을 표현한 것이다.

(나) 위의 그림에서 보는 것과 같이 6차산업화의 공급사슬은 정보 및 농산물의 흐름만이 고려된 한 방향의 진행이 주류를 이루고 있다. 하지만 오늘날과 같은 동태적 환경에서는 생존을 위한 체계적 전략이 필요하고 가장 핵심적인 전략은 고객의 니즈 분석이다. 고객의 니즈 분석을 위해서는 여러가지 방법이 있지만 현재의 고객 데이터를 실시간 분석가능하다는 점에서 빅데이터 분석 기법을 활용하는 방법이 최근 가장 각광을 받고 있다. 한방약초 산업의 성공적인 6차산업화를 위해서는 고객의 니즈분석을 토대로 1차, 2차, 3차 산업의 한방약초 공급사슬을 체계적으로 관리하는 통합적 관리체제가 필요한 것이다.

## (3) 빅데이터 기반 6차산업화 공급사슬 관리

(가) 최근의 농업은 6차산업화 정책과 더불어 다양한 변화를 시도하고 있다. IT강국으로서 위상을 가진 우리나라는 농업과 ICT(Information Communication Technology)의 접목으로 스마트 농업을 지향하는 미래목표를 가지고 있다. 생산, 가공, 유통, 소비의 등 농업의 전 가치사슬에 걸쳐 ICT와의 융합을 가속화시키는 중에 있다. 아래 그림은 한국농촌경제연구원에서 진행한 ‘스마트농업의 현황과 발전 방향’ 과 농림수산식품부의 ‘스마트 농업 가치사슬 및 ICT 역할’을 보이고 있다(SPRI, 2014).



〈 스마트농업의 현황과 발전방향 / 스마트 농업 가치사슬 및 ICT 역할 〉

(나) 모바일 시대로 접어들면서 포털 사이트, SNS 등에서 흐르는 고객의 실시간 정보들은 기업에게 현재의 고객 니즈를 분석하는데 가장 중요한 요소로 각광받고 있다. 이러한 정보들은 SNS 대화 내용, 고객의 위치정보, 신용카드 이용내역 정보 등의 빅데이터 형태로 존재한다. 성공적인 6차산업화를 위해서는 이러한 빅데이터를 기반으로 고객의 니즈를 분석하고, 농업의 생산, 가공, 유통으로 이어지는 가치사슬의 전 단계에서 체계적으로 관리되어야만 한다.

1-2. 1차년도 연구결과

가. 한방약초 산업 분석

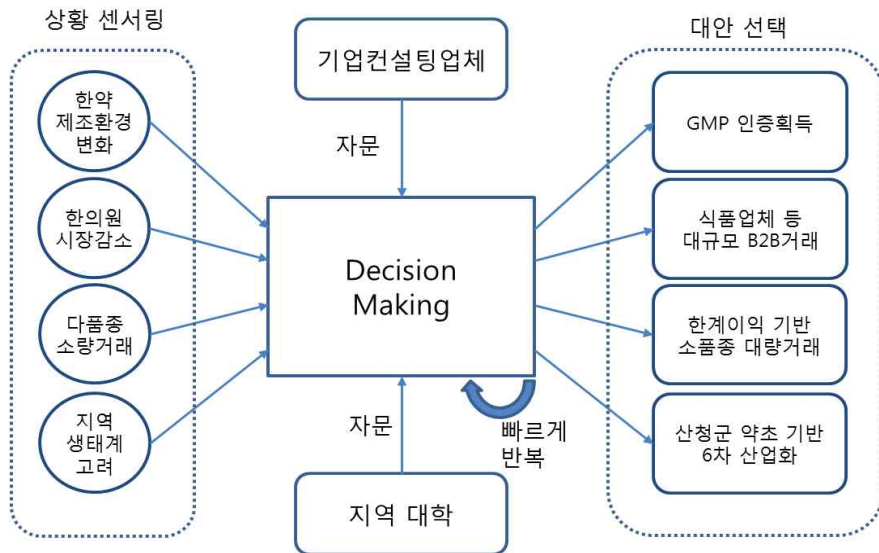
(1) 확장된 가치사슬 모델로 표현한 한방약초 산업분석 모형

한방약초 산업분석(As-Is)	한방약초 산업분석(To-Be)
<p>국내 한방약초 소규모 생산자 (경북,충북,강원 등)    국내 한방약초 산업의 확장된 가치사슬</p> <p>한의원</p> <p>한방약초 수입업체</p> <p>해외 한방약초 생산자 (중국,베트남,인도네시아 등)    수입 한방약초 산업의 확장된 가치사슬</p>	<p>국내 한방약초 대규모 생산자 (경남 산청, 경북,충북,강원 등)    국내 한방약초 산업의 확장된 가치사슬</p> <p>한의원</p> <p>한방약초 수입업체</p> <p>해외 한방약초 생산자 (중국,베트남,인도네시아 등)    수입 한방약초 산업의 확장된 가치사슬</p> <p>건강식품 및 음료 제조업체</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 국내 소비량이 국내 생산량을 초과하여 수입에 의존</li> <li>• 국내 한약재에 대한 소비자의 신뢰도가 높음</li> <li>• 한의원과 의 소액 거래 중심</li> <li>• 다품종 소량거래로 생산 및 재고관리가 어려움</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 생산이력제 등으로 국내 한약재 보호 및 체계적 생산 유도</li> <li>• 국내 식품산업의 성장으로 건강식품 및 음료 개발 업체와의 소품종 다량거래로 수익증대 효과 기대</li> <li>• 체계적 산업관리로 소비자 니즈를 기반한 계약 재배로 생산의 안정화 기대</li> <li>• 한류문화를 기반으로 국내 한약재 및 건강식품 수출 증대를 기대</li> </ul>

## 나. 참여기업의 전략적 의사결정 모형 개발

### (1) 지리산권역 한방약초 산업내 조직의 전략적 의사결정 모형 연구

(가) 지리산권역 한방약초 산업의 조직변화는 4회의 컨설팅과 워크숍을 진행하는 동안 이루어졌다. 컨설팅 과정에서 J조직은 전략적 의사결정을 위한 조직구조를 K대표 중심의 중앙집중형 의사결정 구조에서 분권형 의사결정 구조로의 변모를 시도하였다. J조직은 조직구성원의 센스메이킹(Sense-making)으로 중요한 의사결정 사항을 수립하고, 직원간 상호작용을 빠르게 재반복 실행하는 전략적 의사결정 모형을 확립하였다. 이 모형을 기반으로 J조직은 급진적 변화를 보이는 시장 상황에 동태적으로 대응할 수 있는 조직으로 거듭날 수 있었다.



(나) J조직은 센스메이킹 기반 전략적 의사결정 모형을 토대로 K대표와 직원들의 토론 및 협의 과정을 빠르게 반복하여 다음과 같은 5가지 중요한 의사결정을 진행하였다.

J기업의 전략적 의사결정
○ 동태적 환경 적응을 위한 내·외부적 조직변화
○ 업계내 경쟁력 확보를 위한 GMP 인증
○ 한계이익을 고려한 체계적 상품(재고) 정리
○ 건강식품 제조업체(천호식품 등)와의 새로운 거래 개설
○ 지역 동반성장을 고려한 한방약초 기반 6차 산업화 적극 추진

① 동태적 환경에 유기적으로 대응할 수 있는 조직으로의 변화를 위해 내·외부적 조직변화를 이루었다.

② 한방약초 산업분석을 통해 얻은 수요변화 정보에 따라 빠른 기간 내에 GMP인증을 획득하여 업계내 경쟁력을 확보하였다.

③ 한계이익을 고려하여 취급 품목을 선별하고 소품종 다량거래로 재고관리가 쉬워지도록 상품 라인업을 변경하였다.

④ 한의원을 대상으로 유지해온 다품종 소량거래에서 벗어나 건강식품 및 음료 제조업체를 새로운 목표 고객으로 설정하였다.

⑤ 한방약초 지역생태계 성장을 더불어 J조직의 동반성장을 이루는 산청군 6차산업화를 적극 추진한다.



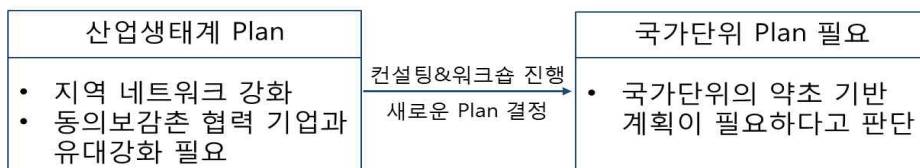
(다) 위의 전략적 의사결정을 통해 J조직은 동종업계 타 회사들이 어려움에 처한 상황에서 식품회사와의 대량거래를 트고 새로운 매출을 발생시키는 성과를 이루었다.

(라) 본 연구가 진행되는 동안 J사는 전략적 의사결정 모형을 기반으로 아래와 같이 내·외부적 조직구조 변화를 진행하여 동태적 조직으로의 변화를 진행하였다.

구분	컨설팅 진행 전	컨설팅 진행 후
내부적 조직 변화	- 대표가 모든 의사결정	- 중간 관리자 고용 - 팀 기반 의사결정
상품 라인업 변화	- 다품종 소량 취급	- 소품종 다량 취급
거래처 변화	- 약 800여 한의원	- 핵심 거래 한의원 - 건강식품/음료 제조업체
지역 내 협력 조직 변화	- 산청군 - 동의보감 지역 네트워크	- 경남과학기술대학교(산학협력관계) - 경남한방약초연구소 - 산청군 - 약초 계약재배 생산자

(마) 본 연구 과정 중에 J조직은 내·외부적 조직변화를 통해 국내 및 해외의 대형 식품회사 등을 대상으로 새로운 고객을 확보하는데 총력을 기울일 수 있었다. 한의원을 대상으로 하던 기존 거래에 비해 대형 식품회사와의 거래는 수십 배 이상의 물량이 요구되었고 이는 지역생태계의 한방약초 1차 산업에 활력을 가져왔다. 또한 J조직은 외부적으로 산청군 및 지역 내 대학과의 협력관계를 굳건히 하여 한방약초 기반 2차(가공 및 생산), 3차(판매 및 홍보) 산업을 이끌어갈 수 있는 네트워크를 구축하였다. 대학과의 협력을 통해 대학의 인적, 물적 자원을 활용함으로써 연구 개발 비용을 절감하고, 대학생 SNS서포터즈 및 인턴십 프로그램의 활용 등으로 홍보비용 역시 절감할 수 있었다. 이를 통해 내부적으로 성장을 대비한 조직변화로서 중간관리자를 고용할 수 있었다.

(바) J조직의 전략적 의사결정의 특이사항은 기존 협력관계에 있던 단체와의 네트워크 강화는 더 이상 시너지 효과가 없다고 판단하여 가능한 배제하기로 결정한 것이다. 이는 J조직이 기존의 네트워크를 탈피하여 새로운 도전을 시도하겠다는 결정으로 최고경영자와 조직원들의 상호작용을 통해 조직원들이 환경변화에 대해 긍정적인 반응을 일으킬 수 있는 방향으로 빠르게 결정한 것이다.



## 다. 코디네이터 기관을 통한 6차산업 가치사슬 관리 모형 개발

### (1) 코디네이터 기관의 필요성 및 업무 정의

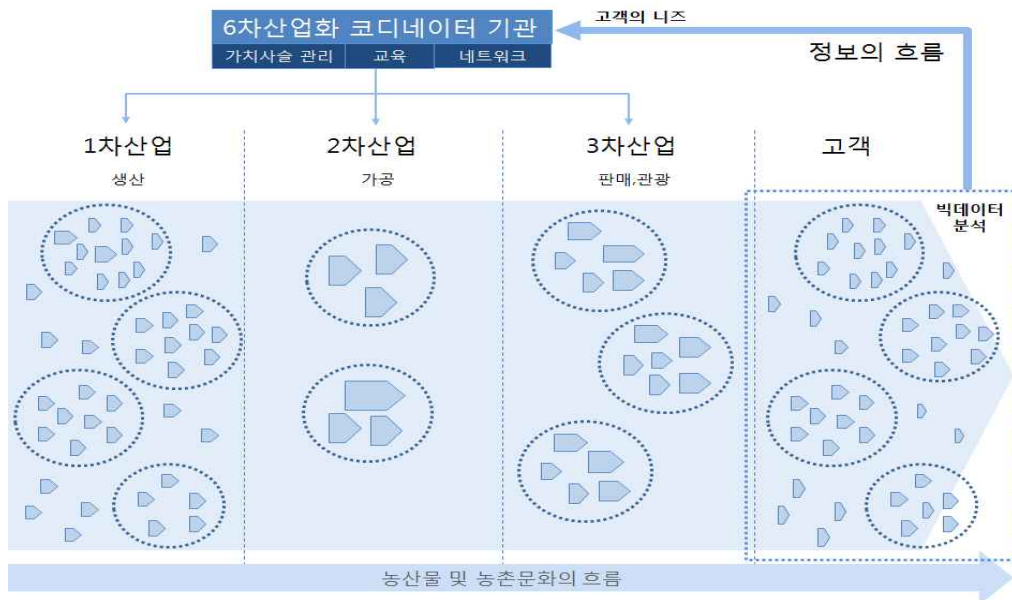
(가) 생산량이 많지 않고 분산된 특성을 보이는 우리나라의 농업 가치사슬을 체계적으로 유지·관리하기 위해서는, 빅데이터 분석 결과를 가치사슬 전 분야에 조달하는 정보 코디네이터 기관이 필요하다.

(나) 코디네이터 기관은 다음과 같은 기능들을 수행하여야 한다.

- ① 빅데이터 기반 소비자 니즈 분석 및 관리

- ② 지역 연구소와 연계된 한방약초 효능 분석 및 검증
- ③ 1차 산업 : 빅데이터에 근거한 생산 약초 결정
- ④ 2차 산업 : 가공의 정밀화, 효율화를 위한 빅데이터 기반 정보 제공
- ⑤ 3차 산업 : 유통의 지능화와 더불어 소비자의 니즈 분석을 통한 홍보 및 체험, 실시간 맞춤형정보제공

(다) 본 연구에서는 성공적인 6차산업화를 위해 ‘6차산업화 코디네이터 기관’을 포함한 체계적 가치사슬 관리를 위한 다음과 같은 모형을 제안하였다.



< 빅데이터 기반 6차산업화 가치사슬 모형 >

### 라. 지리산권역 한방약초 6차산업화를 위한 참여기업 컨설팅 및 워크숍 진행

(1) 지역 한방약초 네트워크 활성화 워크숍 및 참여기업 컨설팅

(가) 산청군내 약초산업 관계자들의 네트워킹을 도모하기 위해 1회의 워크숍을 진행하였다.

구분	일정	핵심내용
워크숍	2015년 2월 24일	- 지리산 권역 6차 산업 비전 및 전략 - 기업가정신과 지역생태계 - 지역생태계 구축을 위한 실제 방향 논의

(나) 지리산권역 6차산업화의 성공을 위해 외부 기업컨설팅 전문가를 초청하여 참여기업 J사를 대상으로 4회의 컨설팅을 진행하였으며 요약 내용은 아래 표와 같다.

구분	일정	핵심내용
1차 컨설팅	2014년 9월 12일	- 재무제표 분석 - 내·외부 조직 분석
2차 컨설팅	2014년 10월 17일	- 업무 및 조직 개선 방안 - 주변 생태계 협력 구도 형성 유도
3차 컨설팅	2014년 12월 16일	- 좋은 협력업체 확보의 중요성 - 지역주민 협력 구도 형성 유도
4차 컨설팅	2015년 3월 17일	- 환경변화에 대응하는 소프트웨어 강화 정책 - 협력 조직간의 네트워크 강화 필요성 강조

< 참여기업 컨설팅 진행 모습 >



## 2-1. 2차년도 연구수행 방법

### 가. 6차산업 기업가정신 연구

#### (1) 기업가정신의 정의

(가) 기업가정신은 전문가에 따라 다양하게 정의되고 있다. Schumpeter(1934)는 기업가정신이란 “기업의 발전을 위해 혁신을 선도하는 것이며, 혁신은 지속적인 창조적 파괴” 라고 주장하였다. Morris & Paul(1987)은 “기업의 대표가 위험을 감수하고, 혁신적이며 진취적으로 활동하는 기업가의 성향” 이라고 주장하였고, Stevenson & Jarillio(1990)는 “새로운 가치창출을 위해 혁신하고, 위험을 감수하며, 진취적으로 자원을 새롭게 구성하는 활동” 이라고 하였다. Lumpkin and Dess(1996)는 “기존 제품과 차별되는 혁신적인 제품이나 서비스로서 이를 개발하기 위한 행동양식이나 의사결정” 이라고 주장하였다. Timmons(1994)는 “무(無)에서 유(有)를 창조하는 것, 위험은 있지만, 보상을 기대하여 새로운 가치를 창조하는 과정” 이라고 정의하였다. Stevenson, Roberts & Grousbeck(1989)는 “현재 보유하고 있는 자원과 관계없이 일어나는 기회의 추구” 라고 주장하였으며, Rocha(2004)는 “혁신을 기반으로 새로운 경제활동 창조, 이로 인한 새로운 조직을 창조하는 것” 이라고 주장하였다. 이와 같이, 기업가정신은 관점에 따라 다양하게 정의되어, 하나의 관점으로 기업가정신을 정의하고 이해하는 것은 불완전하며 단편적이다.

(나) 기업가정신은 앵트러프러니어십(entrepreneurship)을 번역한 것으로, 한문으로는 企業家精神, 起業家精神으로 쓸 수가 있다. 기회를 추구하고, 혁신을 통해 새로운 것을 만들어 내 고자 하는 태도와 실행 정신이다. 그런 의미에서 업을 일으키는 起業家精神이 적합하다(배종

태·차민석, 2009).

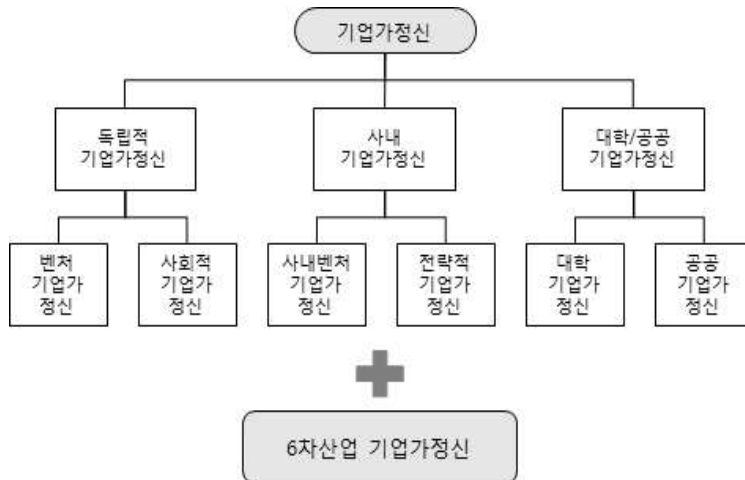
(다) 6차산업에서의 기업가정신이란, “농촌에서 지역주민들과의 진정성 있는 의사소통으로 지역 어메니티(amenity)를 활용하여 자원을 발굴하며, 이를 가치있는 제품이나 서비스로 사업화하여 추진하려는 태도와 정신” 이라고 정의할 수 있다.

**(2) 기업가정신의 유형**

(가) 기업가정신의 유형에는 크게 독립적 기업가정신, 사내 기업가정신, 대학/공공 기업가정신이 있다. 독립적 기업가정신에는 벤처기업가정신, 사회적 기업가정신으로 나뉜다. 사내 기업가정신에는 신사업을 창출하는 개념으로 사내벤처, 기업 내에 있는 문화를 혁신하고, 사업영역을 새롭게 구상하는 전략적 기업가정신이 있다.

(나) 피터 드러커는 ‘기업가적 사회’ 를 예고했다. 기업가정신이 기업뿐만 아니라 전 분야로 확산된다는 의미이다. 실제로 기업가정신은 순수 상업적 영역을 벗어나 사회적 기업가정신, 대학/공공 기업가정신에까지 확대되고 있다. 나아가 최근에는 군사 분야에서의 군대 기업가정신, 농업분야의 농업 기업가정신, 도시 개발 분야의 도시 기업가정신으로 퍼져나가고 있다(이춘우 외, 2014). 본 연구에서는 기존의 기업가정신을 6차산업 분야로 확대하며, 6차산업 기업가정신을 측정하기 위한 지표를 개발하였다.

(다) 기존 연구문헌 조사를 통해 기업가정신 유형을 구분하면 아래 그림과 같다.



출처: (Lee, et al., 2014)

**(3) 전통적인 기업가정신의 구성요소**

(가) 전통적인 기업가정신에 대한 다양한 견해를 정리하면, “기업가정신이란 급변하는 기업의 경쟁 환경 속에서 현재 통제할 수 있는 자원에 구애받지 않고 혁신성, 진취성, 위험감수성 등을 통하여 새로운 가치와 기회를 창조하기 위해 끊임없이 도전하는 정신으로, 기업의 성장과 발전에 실질적으로 기여할 수 있는 전체적인 태도와 역량’ 으로 정의할 수 있다. 정의 중에서 가장 일반적으로 나타나는 핵심구성요소는 혁신성, 위험감수성, 진취성이다(윤백중, 2012). 장성희·김희대·최문중(2011)은 혁신성을 “기존에 없었던 새로운 것을 개발하는 것” 이라고 주장했다. 기존의 것을 개선하거나 응용한 ‘창조적 모방’ 으로 새로운 시장에, 새로운 기술로 나타내는 것이다. Garcia and Calantone(2002)은 혁신을 “고객에게 기존에 없던 새로운 것을 제공하며, 시장·기술의 새로움과 노하우” 라고 정의했다.

(나) 태량량(2011)은 위험감수성을 “기업가의 행동방향을 결정하는 중요한 요소로서, 불확실한 기업환경 속에서도 위험을 무릅쓰는 의사결정을 하고, 급변하는 상황을 선호하며, 도전

하고 모험하는 성향”으로 ‘High risk, High return’이라는 말처럼 위험을 감수하는 기업가일 수록 기업성과가 더 높게 달성된다고 하였다.

(다) 박상용·김연정(2004)은 진취성을 “경쟁시장에서 더 우월한 위치를 차지하기 위한 경쟁사의 행동에 능동적으로 도전하는 자세”라고 하였다. 또한, 고광만(2012)은 “시장 환경변화에 발 빠르게 대응하기 위하여 새로운 제품을 개발 또는 새로운 시장에 진출하려는 주도적인 경영활동이나 이에 대한 적극적 대응활동”으로 정의하였다.

〈 전통적인 기업가정신에 대한 정의와 구성요소 〉

연구자	개념 정의	구성요소
Schumpeter (1934)	생산성 향상, 경제 성장, 그리고 궁극적으로는 사회발전에 기여하는 혁신과 창조적 파괴활동과 그러한 혁신 실행의 성향	혁신성
Miller (1983)	새로운 가치창출을 위한 혁신성, 위험감수성, 진취성으로 자원을 재분배하거나 재결합하는 활동	혁신성 진취성 위험감수성
McClelland (1965)	온건한 위험감수성	위험감수성
Gartner (1985)	새로운 조직의 창출	진취성
Hisrich & Brush(1984)	위험부담과 그에 상응하는 보상을 전제로 하여 가치 있는 그 무엇을 새로이 창조하는 과정	위험감수성 혁신성
Zahra (1991)	제품과 공정의 혁신, 시장 개발을 통한 신사업의 창출을 위한 제 활동	혁신성
Kao (1995)	사업기회의 인지, 위험부담의 적절한 관리, 적절한 자원동원의 기준을 바탕으로 가치를 창출하려는 시도	위험감수성 진취성
Dollinger (1999)	위험과 불확실성의 조건하에서 수익과 성장을 목적으로 하는 혁신적 경제조직의 창출	위험감수성 혁신성
Hisrich & Peters(1992)	기업가의 심리적인 상태를 말하는 것이 아니고 기업가가 필요하다고 생각하는 판단력 자체	진취성
Lumpkin & Dess(1996)	조직의 신규 진입	진취성
Timmons (1994)	사실상 무로부터의 가치 창출을 위한 창조적 능력 및 위험감수 의지	위험감수성
Kuratko & Hodgetts (1992)	기업의 지속적인 성장, 원동력으로서 기업의 성패를 좌우할 수 있는 매우 중요한 요인	진취성
장수덕(2001)	기업가들이 발휘하는 진보적인 사고체계와 행위 양식	진취성
김종년(2004)	아무것도 아닌 것으로부터 가치 있는 어떤 것들을 이루어내는 인간적이고 창조적인 활동	혁신성
이정호(2005)	조직이 위험 추구적, 진취적, 그리고 혁신적으로 행동하는 것	혁신성 진취성 위험감수성
배종태·차민석 (2009)	현재 보유하고 있는 자원이나 능력에 구애받지 않고 기회를 포착하고 추구하는 사고방식 및 행동양식	진취성

출처: (Yoon, 2012)

(4) 6차산업 기업가정신 구성요소에 대한 기존 연구

(가) 농촌지역에서 새로운 업을 창출해내는 것이 6차산업이다. 대부분 지역 마을단위에서 이루어지는데, 지역 자원에 대한 가치를 계발하고 서로 아무 관련이 없어 보이는 것도 연결하고, 엮어나가며 새로운 사업분야를 개척해야한다. 생산적 복지와 지역 비즈니스를 상생시켜나 가야 한다. 따라서 6차산업에서 가장 중요한 것은 기업가정신이며 기업가정신에 6차산업의 승패가 달려 있다 해도 과언이 아니다.

(나) 서윤정(2013)에 따르면 6차산업 기업가정신은 가치계발, 진정성, 협력성, 진취성이라는 구성요소를 가진다.

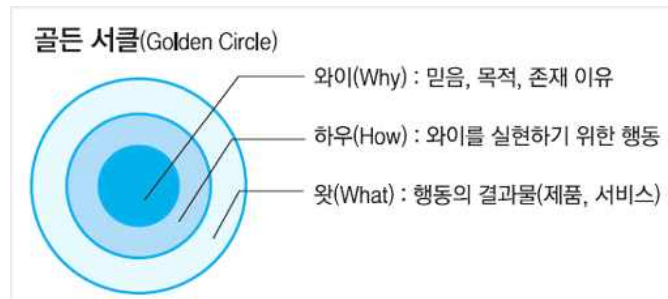
< 6차산업 기업가정신에 대한 개념과 구성요소 >

연구자	개념	구성요소
서윤정	존재가 가지고 있는 고유한 가치를 발굴하여 쓸모 있는 가치로 만드는 것	가치계발
	고객, 지역, 사회에 경제적 이익과 함께 제품의 가치를 향상 시키고 책임과 소양을 다하는 태도와 자세	진정성
	주변에 여러 사람들과 잘 어우러지고, 서로 돕는 지혜, 상생의 힘이 필요한 것	협력성
	잠재된 수요를 발견하고, 찾아내는 것	진취성

나. 스토리텔링 적용 연구

(1) 지역 스토리 발굴을 통한 6차산업 활성화 방안

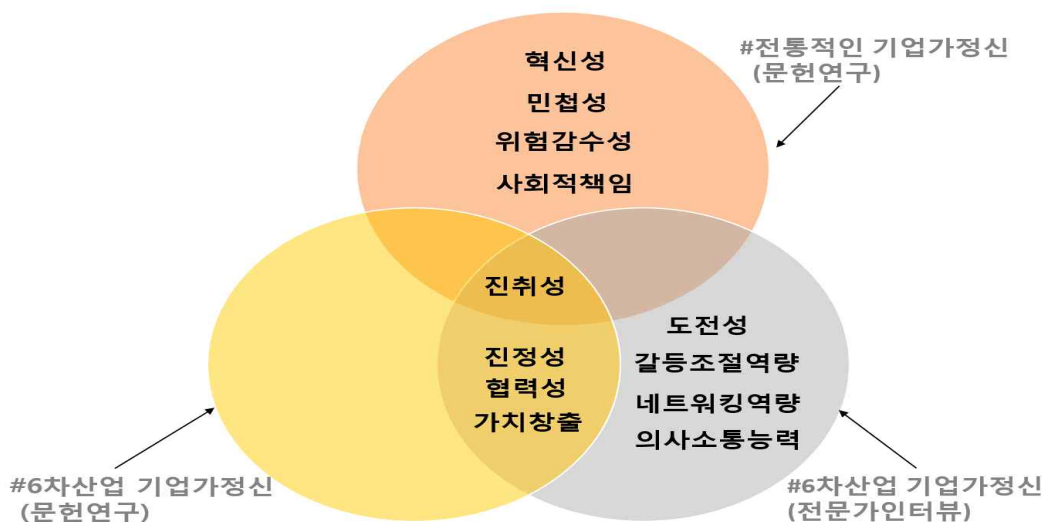
(가) 성공적인 6차산업을 위해서는 1차, 2차, 3차 산업을 연결하는 지역의 이야기로 Why, How, What으로 연계되는 마음을 움직이는 스토리 개발이 필요함



2-2. 2차년도 연구결과

가. 6차산업 기업가정신 지표 최종 도출

(1) 6차산업 기업가정신 지표 1차 도출



< 6차산업 기업가정신의 지표 도출 1차 과정 >

**(2) 6차산업 기업가정신 지표 도출을 위한 전문가 인터뷰 진행**

(가) 지속적인 수익창출이 이루어지는 6차산업 비즈니스를 위해서는 6차산업에 적합한 기업가정신을 연구하고 진단할 수 있는 지표를 개발할 필요하였고, 기존 문헌연구에 이어 6차산업 전문가인터뷰를 진행하였다.

〈 전문가 인터뷰를 통한 6차산업 기업가정신 요소 〉

구분	성명	6차산업에서 요구되는 기업가정신 요소에 대한 인터뷰
6차산업 현장 전문가 (3인)	류O하	진정성, 협력성, 진취성
	오O호	공감소통성, 동기부여, 상생협력성
	전O광	비전(꿈), 연구(차별화), 협력성
6차산업 비즈니스전문가 (3인)	임O엽	갈등조절역량, 협력성, 도전성
	신O욱	의사소통능력, 가치창출, 네트워킹 역량
	조O만	네트워크역량, 추진력, 정보력

**(3) 6차산업 기업가정신 지표 도출을 위한 해당 산업 종사자 통계조사 진행**

(가) 6차산업에 적합한 기업가정신지표 개발을 위해 6차산업 종사자들 104명을 대상으로 기업가정신 구성요소를 설문 조사하였다. 설문대상의 통계학적 특성은 다음 표와 같다.

〈 설문대상의 통계학적 특성별 분포 (n=104) 〉

특성	구분	n	%	특성	구분	n	%	
성별	남자	65	62.5	연령	20대	3	2.9	
	여자	39	37.5		30대	8	7.7	
재배 작물 유형	식량작물	19	18.3		40대	36	34.6	
	시설채소	16	15.4		50대	47	45.2	
	과수	17	16.3		60대	10	9.6	
	축산	4	3.8		중졸이하	4	3.8	
	화훼	6	5.8		고졸	16	15.4	
	기타(약초)	42	40.4		전문대졸	17	16.3	
거주 지역	거제시	3	2.9		학력	대졸	52	50.0
	김해시	1	1.0			대학원	15	14.4
	밀양시	1	1.0	6차 산업 인증		있다	53	51.0
	사천시	12	11.5			없다	51	49.0
	진주시	42	40.4	특허 (출원/ 등록)	있다	34	32.7	
	통영시	1	1.0		없다	70	67.3	
	창원시	3	2.9	상표 등록	있다	43	41.3	
	거창군	5	4.8		없다	61	58.7	
	고성군	6	5.8	산업 유형	3차	14	13.5	
	산청군	5	4.8		2차+3차	14	13.5	
	의령군	2	1.9		1차+3차	37	35.6	
	창녕군	1	1.0		1차+2차+3차	39	37.5	
	하동군	8	7.7		법인 형태	농업회사법인	17	16.3
	함안군	1	1.0	영농조합법인		22	21.2	
	함양군	8	7.7	개인사업자		38	36.5	
	합천군	3	2.9	예비창업자		16	15.4	
	울주군	2	1.9	기타		11	10.6	

(나) 6차산업 기업가정신 지표개발을 위해 6차산업 종사자들 104명을 대상으로 설문조사를 진행하였으며 그 기초 결과는 다음과 같다.

**< 6차산업 기업가정신 지표의 인식수준 >**

변인	설문내용	M	SD
혁신성	1. 성장과 발전이 필요하다.	4.27	0.61
	2. 신제품 개발이나 끊임없는 변화가 필요하다.	4.35	0.54
	3. 최신 경영기법 도입이 필요하다.	4.21	0.63
	4. 창의적 마케팅방법을 활용해야한다.	4.32	0.6
	5. 창조적이고 독창적인 아이디어가 필요하다.	4.45	0.57
	전 체	4.32	0.46
위험감수성	1. 위험을 무릅쓰고 환경변화에 적극 대응해야한다.	3.86	0.90
	2. 위험이 높더라도 수익이 큰 사업에 도전해야한다.	3.21	0.99
	3. 약간은 무모하더라도 도전해야한다.	3.13	1.05
	4. 새로운 사업 분야에 적극 진출하려고 노력해야한다.	3.89	0.81
	5. 아이টে에 대한 확신이 들면 과감하게 투자해야한다.	3.69	1.02
	전 체	3.56	0.75
사회적책임	1. 사회에 공헌해야 한다	4.04	0.70
	2. 사회적 책임감을 갖고 공익사업을 해야 한다.	3.99	0.79
	3. 기부 협찬활동을 꾸준히 실천해야한다.	3.97	0.81
	4. 고용창출을 통해서 사회의 경제적 성장에 기여해야한다.	4.13	0.68
	5. 지역공동체의 필요를 잘 파악해야한다.	4.12	0.69
	6. 지역행사에 참여하고 지원해야한다.	4.01	0.73
전 체	4.04	0.62	
진취성	1. 시장흐름을 지속적으로 파악해야한다.	4.36	0.61
	2. 고객이 무엇을 원하는지 파악해야한다.	4.47	0.59
	3. 경쟁사의 움직임을 신속히 파악해야한다.	4.30	0.68
	4. 신제품 개발이나 새로운 서비스를 도입해야한다.	4.37	0.67
	5. 끊임없이 틈새시장을 찾고 신속하게 공략해야한다.	4.39	0.67
	전 체	4.38	0.53
진정성	1. 진심에서 우러나오는 서비스를 해야한다.	4.35	0.65
	2. 정성을 다해 서비스를 해야한다.	4.32	0.64
	3. 정직하게 서비스를 해야한다.	4.33	0.67
	4. 자신의 내면에서 우러나오는 서비스를 해야한다.	4.35	0.68
	5. 인간적인 느낌이 나는 서비스를 해야한다.	4.33	0.70
	전 체	4.33	0.60
협력성	1. 공동목표에 참여하고 따라야한다.	4.09	0.67
	2. 동료들을 배려해야한다.	4.19	0.64
	3. 우리 조직에서 주어진 책임과 역할을 다해야한다.	4.30	0.61
	4. 조직이 어려운 상황일 때 희생해야한다.	4.02	0.74
	5. 동료의 필요를 보면 도와줘야한다.	4.16	0.62
	전 체	4.15	0.56
도전성	1. 안정적인 일보다 개척하고 변화하는 일을 해야한다	3.82	0.8
	2. 경험이 없는 새로운 업무에 도전해야한다	3.62	0.93
	3. 매사에 매우 정열적으로 일해야한다	4.20	0.70
	4. 주어진 일의 어려움이 크더라도 최선을 다해야한다	4.29	0.66
	5. 여러 가지 힘든 어려움을 극복할 자신이 있어야한다	4.32	0.61
	전 체	4.05	0.55
네트워킹역량	1. 업무와 관련된 세미나나 워크숍에 자주 참석해야한다.	4.17	0.67
	2. 업무와 관련된 협회나 조직 활동에 자주 참석해야한다.	4.10	0.66
	3. 다양한 사람들에게 업무와 관련된 정보를 구해야한다.	4.15	0.65
	4. 업무상 만난 사람들에게 자주 연락해야한다.	4.02	0.71
	5. 다양한 친교 모임에 자주 참석해야한다.	3.89	0.76
	전 체	4.07	0.59
의사소통능력	1. 상대방의 입장에서 문제를 이해하려고 노력해야한다.	4.18	0.63
	2. 상대방의 의견에 경청하고, 반응해야한다.	4.19	0.58
	3. 자유롭게 나의 의견을 제시해야한다.	4.17	0.63
	4. 여러 가지 방법으로 서로 반대되는 의견을 조정해야 한다.	4.13	0.64
	5. 상대방의 주장과 행동에 관심을 기울여야한다.	4.22	0.59
	전 체	4.18	0.49
전 체	4.12	0.42	

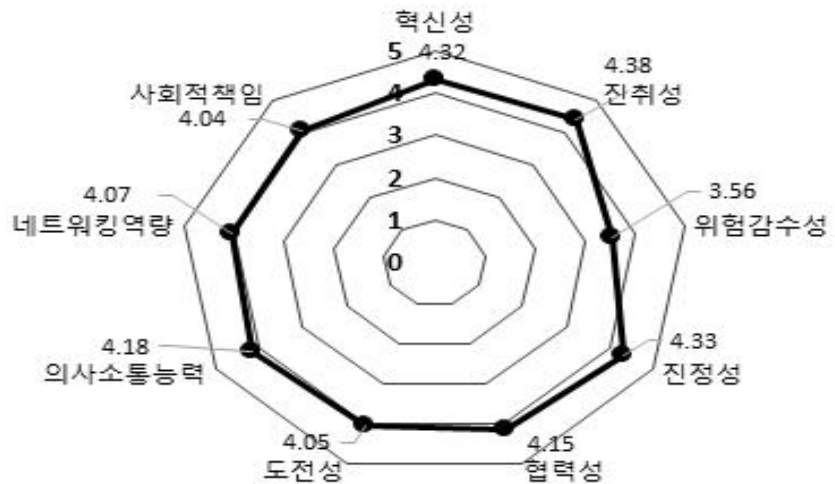


**(4) 6차산업 기업가정신 지표 최종 도출**

(가) 문헌연구를 통해 전통적 기업가정신 지표 구성요소로는 혁신성, 민첩성, 위험감수성, 사회적책임, 진취성이라는 구성요소를 도출하였고, 문헌연구 및 전문가인터뷰를 통해서 6차산업 기업가정신에는 진정성, 협력성, 가치창출, 도전성, 갈등조절역량, 네트워킹역량, 의사소통 능력이라는 구성요소가 도출되었음. 이는 6차산업 창업이 전통적 창업보다 더 다양한 역량을 갖추어야 한다고 해석할 수 있음.

(나) 사전조사 내용을 기반으로 설문용 구성요소를 구성하고 6차산업종사자 104명을 대상으로 진행한 설문조사를 통해 6차산업 기업가정신 진단을 위한 구성요소는 혁신성, 위험감수성, 사회적책임, 진취성, 진정성, 협력성, 도전성, 네트워킹역량, 의사소통역량으로 도출되었음.

혁신성은 “창조적이고 독창적인 아이디어가 필요하다.” (평균 4.45), 위험 감수성은 “새로운 사업 분야에 적극 진출하려고 노력해야한다.” (평균3.89), 사회적 책임은 “고용창출을 통해서 사회의 경제적 성장에 기여해야한다.” (평균 4.13), 진취성은 “고객이 무엇을 원하는지 파악해야 한다.” (평균 4.47), 진정성은 “진심에서 우리나라오는 서비스를 해야한다.” (평균 4.35), “자신의 내면에서 우리나라오는 서비스를 해야한다.” (평균 4.35), 협력성은 “우리 조직에서 주어진 책임과 역할을 다해야한다.” (평균 4.30), 도전성은 “여러 가지 힘든 어려움을 극복할 자신이 있어야한다” (평균 4.32), 네트워킹역량은 “업무와 관련된 세미나나 워크숍에 자주 참석해야한다.” (평균 4.17), 의사소통능력은 “상대방의 주장과 행동에 관심을 기울여야한다.” (평균 4.22)가 가장 높은 필요성을 나타내는 내용이었다.



〈 6차산업 기업가에게 요구되는 기업가 정신 수준 〉

**나. 지역 스토리 발굴을 통한 6차산업 활성화 스토리텔링 모델**

**(1) 골든서클 이론을 활용한 6차산업 스토리텔링 전개 방식 개발**

<p>(가) Why ?</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>① 우리는 왜 농사를 짓는가?</li> <li>② 우리는 어떤 농부인가?</li> <li>③ 우리의 농산물은 어떤 의미가 있는가?</li> </ul> <p>(나) How?</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>① 우리는 어떻게 농사를 짓는가?</li> <li>② 우리의 농산물은 어떤 특징이 있는가?</li> <li>③ 우리의 농산물은 어떤 효능이 있는가?</li> </ul> <p>(다) What?</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>① 우리는 무슨 행위를 하는가?</li> <li>② 우리의 생활에는 어떤 재미가 있는가?</li> </ul>	<p>스토리텔링으로 6차산업 차별화</p>
---	-------------------------

(2) 스토리텔링 5W1H + 1E 기법 개발 : Why, Who, When, Where, What, How + Effect

스토리텔링 클리닉 & 창업문제 해결

아이디어 정리



(가) 본 연구에서는 경남과학기술대학교 창업지원단과의 연계를 통해 지리산권역 약용작물 생산자를 포함한 지역 농업인을 대상으로 6차산업 스토리텔링 교육을 진행하였다.

< 스토리텔링 교육모습 >



(나) 기존 농가, 귀농 농가 등을 대상으로 스토리텔링 교육을 통해 개인 농가별 비전, 브랜드, 온·오프라인 홍보 콘텐츠 등의 결과를 확보하였다.

< 예술시장과 함께하는 우리 약초시장 >

※ 사진출처 : 산청한방약초축제 홍보 사이트



다. 기업가정신 교육

(1) 국내외 리더십과정 운영을 기반으로 지속적인 기업가정신 교육 진행

(가) 본 연구에서는 창업대학원, KR컨설팅과의 연계를 통해 지역내의 자발적 문제해결능력 향상을 원하는 기업가를 대상으로 크리액션 아카데미 창조적 리더십과정을 진행하였음

(나) 창조적 리더십과정에서는 KR컨설팅 이강락 대표님의 기업가정신 교육과정과 더불어 창업대학원의 주도로 액션러닝, 디자인씹킹 방법론을 적용한 문제해결 기법을 익히고, 현실 속에 존재하는 다양한 문제를 도출하고 그 해결방안을 찾아가는 과정으로 진행함

< 크리액션 아카데미 창조적 리더십과정 중국연수 >



### 라. 농업인 SNS 활용 교육 진행

(1) 본 연구에서는 경남과학기술대학교 창업지원단과의 연계를 통해 지리산권역 약용작물 생산자를 포함한 지역 농업인을 대상으로 SNS 활용 홍보 교육을 진행하였다.

< 농업인 SNS교육 진행 >



### 마. ‘청년창업을 6차산업으로 심포지엄’ 진행

(1) “농업 기반 산업에서 필요로 하는 청년 인재의 역량”의 주제를 기반으로 심포지엄 사전 토론을 진행함

< 농업인 SNS교육 진행 >



### 3-1. 3차년도 연구수행 방법

#### 가. 농산업비즈니스

##### (1) 농산업비즈니스의 이해

###### (가) 산업으로서의 농업

① 산업으로서의 농업은 초기에 생산을 담당하는 산업으로 분류되었으며, 인간에게 필요한 식량을 재배하는 곡물 생산에 한정되었다가 과채류 및 원예류, 임업 및 잠업까지 생산 범위가 확대되었다. 최근에는 농산물의 가공(2차산업), 농산물 유통·판매 및 농촌 관광 서비스(3차산업) 영역까지 그 범위가 확대되었다(김성수 외, 2012; 김윤희, 2001; 김종안 외, 2015; 김태곤·허주녕, 2011; 서윤정, 2013).

② 농업은 자급자족경제로부터 상업경제로서의 상업농형태로 발전하여 왔다. 기술이 지속적으로 진보되어 자체 생산량이 증가되었고, 값싼 외국 농산물의 수입으로 농업 종사자간의 경쟁은 지속적으로 심화되고 있는 것이 현재의 상황이다(신인식, 1995; 김윤희, 2001). 농업 현장의 여러 가지 어려움에도 불구하고 농산업의 긍정적인 여건들도 형성되고 있다. 올바른 먹거리를 추구하는 식품소비 패턴 변화, 귀농자 증가, 환경·생태·치유 등에 대한 소비자의 관심 고조 등과 같은 현상이 두드러지게 나타나고 있다(김태곤 외, 2013).

③ 소비의 변화로부터 시작된 트렌드 변화는 우리의 농산업에 현장에 그대로 반영되고 있다. 과거 1차산업의 생산부문에 집중되어있던 우리 농업은 가공, 판매, 체험관광 등 지역사회에 필요한 각종 서비스를 제공하는 영역으로 확산을 꾀하는 비즈니스 모델로 변화하고 있다. 농림축산식품부는 6차산업을 주도하여 농산물의 부가가치 증대, 농촌 자원의 서비스 산업화를 적극적으로 지원하였다. 6차산업이란 농촌에 존재하는 모든 유무형의 자원을 바탕으로 1차 생산 × 2차 식품 제조가공 × 3차 판매 및 문화·체험·관광산업의 연계로 새로운 부가가치를 창출하는 활동을 의미한다(6차산업.com, 2016; 김종안 외, 2015; 김태곤·허주녕, 2011; 서윤정, 2013).

###### (나) 농업현장의 사회혁신 : 협동조합과 임팩트비즈니스

① 최근 우리나라의 농업현장에서는 6차산업이 활발히 진행되고 있다. 6차산업 주체는 크게 개별농업인과 농업인 중심의 공동경영체로 구분되는데, 투자자본의 확보, 정책사업 참여 등을 목적으로 점차 공동체 경영을 지향하고 있다(김태곤·허주녕, 2011; 황영모, 2011). 공동체 경영을 지향하고 있는 현재의 농산업 트렌드를 깊이 이해하기 위해서는 협동조합과 임팩트비즈니스에 대한 이해가 필요하다.

② 협동조합의 개념은 관점에 따라 다양하게 정의된다. 국제협동조합연맹(ICA, 1995)에서는 ‘공동으로 소유하고 민주적으로 운영되는 사업체를 통해 공동의 경제적·사회적·문화적 필요와 욕구를 충족시키기 위해서 자발적으로 모인 사람들의 자율적 단체’로 정의하였고, 2012년 1에 제정·공포된 우리나라 협동조합기본법에서는 ‘재화 또는 용역의 구매·생산·판매·제공 등을 협동으로 영위함으로써 조합원의 권익을 향상하고 지역사회에 공헌하고자 하는 사업조직’으로 정의한다(오은주·김선기, 2012; 임준형 외, 2013). 농업에서 협동조합 조직은 1920년대에 처음 등장하였고 ‘협동조합’이라는 용어 자체는 농촌 주민들에게 상당한 인지도를 갖게 되었다. 그런데 막상 농촌 현실에서는 농협과 신협을 제외하면 협동조합이라고 부를 만한 조직들을 만나기가 어려웠다(김정섭외, 2012; 오은주·김선기, 2012). 하지만 소규모 경영체가 많은 농촌에서 협동조합은 지역사회의 경제적 지속가능성에 크게 기여할 수 있다. 생산협동조합 뿐

만 아니라 사회적 배제(social exclusion)현상으로 인한 농촌지역의 부족 자원을 소비(또는 구매) 협동조합을 통해 해결할 수 있기 때문이다. 협동조합법 제정 이후 농촌에서는, 공동경영을 위한 조직경영체 유형으로서 협동조합에 대한 기대가 높은 것으로 나타났다(김종선 외, 2013, 최양부, 2012).

③ 임팩트 비즈니스(impact business)는 비즈니스분야에서의 인간중심 사회혁신으로 ‘사회적 문제를 비즈니스 해법을 통해 푸는 과정에서 소셜 임팩트(social impact)를 창출하는 것을 주요 목적으로 하는 비즈니스’를 의미한다(니콜라 아자르, 2013; 도현명, 2011; 조용호, 2015; Porter, M. E.& Kramer, M. R., 2011). 국내에서는 임팩트 비즈니스를 ‘사회적 기업’과 동일한 맥락으로 표현하고 있다. 사회적 기업이란 ‘영리기업과 비영리기업의 중간 형태로, 사회적 목적을 우선적으로 추구하면서 재화·서비스의 생산·판매 등 영업활동을 수행하는 기업(조직)’을 의미한다(임준형 외, 2013; 한국사회적기업진흥원, 2016). 사회적 기업(social enterprise) 및 사회적 경제의 중요성은 협동조합들이 활발하게 활동하는 유럽 국가들에서 중요성이 강조되고 있으며, 우리나라의 몇몇 농촌지역에서는 협동조합을 포함한 여러 경제활동 조직들이 사회적 경제를 지향하는 네트워크를 형성하려 노력하고 있다(김정섭외, 2012; 임준형 외, 2013). 농촌 정책은 그동안 내생적 발전(endogenous development) 모델에 근거하여 농촌 지역사회 주민들의 집합적 행동(collective action)을 강조해 왔다. 주민의 집합적이고 자발적인 행동을 강조해 온 농촌 정책에 사회적 경제를 지향하는 협동조합 활동이 접합될 가능성이 크다(김정섭외, 2012; 오내원 외, 2010, 홍서연 외, 2015).

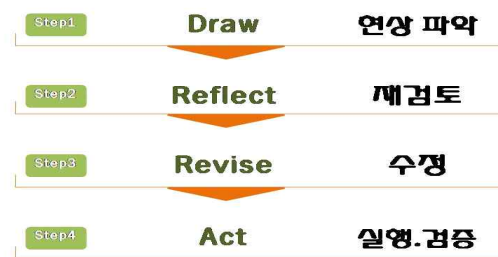
## 나. 비즈니스모델(Business Model)

### (1) 비즈니스모델이란

#### (가) 정의

① 예스 피그누어(Yves Pigneur) 교수와 알렉스 오스왈더비즈니스 에 따르면 비즈니스 모델이란 ‘자신의 가치를 어떻게 창출하고 고객에게 전달하는가’라고 정의내릴 수 있다. 세계화가 진행되고 경쟁이 심화되는 시장 안에서는 계획대로 비즈니스를 진행하기가 매우 어렵다. 또한 비즈니스의 속도가 중요해진 지금은 비즈니스를 추진하는데 있어서 계획을 세우기(planning)보다 모델을 디자인하면서 진행하는 ‘모델링 접근’ 전략이 효율적이다.

#### 캔버스 작성 4단계



신규 비즈니스를 구상하고 진행해나가는 데 있어 실제로 나타나는 문제점이나 과제를 수정하고, 비즈니스의 방향성을 재검토하면서 최상의 방향으로 개선시켜나가며 현 상황에 가장 최적화된 비즈니스 모델을 선별해 실천하는 편이 실용적이라고 할 수 있다. 캔버스를 사용해서 예상할 수 있는 가능성을 기술하고 검증해나가는 접근 방식이 주목받는 이유이다.

② 서비스 지배 논리(service-dominant logic)라는 말도 있듯이, 요즘은 사업이나 제품을 전부 ‘서비스’로 파악하는 사고가 주류를 이루고 있다. 상품 자체의 기능이나 성능이 아니라 그 상품에서 고객이 원하는 가치가 무엇인가? 그것을 고민하는 기업만이 글로벌 비즈니스 경쟁에서 살아남을 수 있다. 그래서 비즈니스 모델을 디자인, 테스트하는 과정에서 상황에 따

라 디지전 메이킹(decision making)을 연습하는 것도 아주 중요하다. 또한 모든 요소를 결정하기 전에 프로토타입(prototype)으로 현장에서 빠르게 점검해보는 것도 중요하다.

**(2) 비즈니스모델 켄**

**(가) 정의**

① 비즈니스모델 켄(Business Model Zen)은 자유문화 라이선스로 개방되고 고객중심, 전략 사고, 실천학습의 사상을 가진 한국에서 만들어진 토종 비즈니스모델 방법론이다(조용호, 2013).

② 비즈니스모델 켄의 기본 철학은 단순성(simplicity), 조화로움(balance), 통일감(integrity)을 광범위에게 반영하고 있으며, ‘고객 중심으로 비즈니스를 바라봄’, ‘고객-문제-해법-시장 관점에서 발상’이라는 기본개념을 추구하고 있다(조용호, 2013).

**(나) 비즈니스모델 켄 캔버스**

① 비즈니스모델 켄은 비즈니스 컨셉, 계획, 실행에 따라 3단계로 구성하여 진행하며, 각 단계는 서로 유기적으로 연결되어 있는 구조로 이루어져있다. 비즈니스모델 켄은 비즈니스 유형에 따라 아래 그림과 같이 차별화된 캔버스를 제공하고 있다.



② 시장과 혁신의 교차모델을 중심으로 구성된 비즈니스모델 켄 캔버스는 고객 문제의 공감 단계로 부터 시작되어 비즈니스의 실행요소까지를 담은 비즈니스모델 도식화 방법이다.

③ 비즈니스모델 켄 캔버스는 Zen Idea 단계, Zen Design 단계, Zen Action 단계의 3단계 접근법으로 비즈니스를 분석한다.

㉔ Zen Idea 단계는 기회탐색 → 고객 → 문제 → 아이디어 발상의 흐름으로 진행되며 (1) 시장 기회 탐색에서 시작해서 (2)고객을 이해함으로써 문제에 접근하고 (3)본질적인 문제에 대해 정의를 내린 후, (4)새로운 아이디어 발상을 통해 문제 해결의 단서를 찾아가는 과정을 의미한다.

㉕ Zen Design 단계는 (5)아이디어 발상을 통해 찾은 단서를 기반으로 창의적인 해법을 구체화하고, (6) 구체화된 해법을 실현하기 위한 협력자를 파악하며, (7) 수익모델을 정의하는 설계 과정을 의미한다.

㉖ Zen Action 단계는 (8)고객의 마음을 얻기 위한 방법을 찾고, (9)본격적인 실행을 위해

실행요소를 정의 및 실행 결과에 대한 고객의 반응을 측정하여 발생하는 문제의 원인을 진단할 방법 고안하고, (10) 마지막으로 실행을 통해 얻게 된 데이터의 의미를 분석하는 실행과정을 의미한다.

#### 다. 소셜 미디어(Social Media)를 활용한 마케팅 모델 연구

##### (1) 하이컨셉 마케팅

###### (가) 하이컨셉 시대

① 다니엘 핑크는 저서 ‘새로운 미래가 온다’에서 인류의 역사는 농경사회, 산업화사회, 지식정보화사회에서 한걸음 더 나아가 하이컨셉(High Concept) 시대로 변화되고 있다고 예고하였다. 하이컨셉 시대에는 지식정보화 사회의 좌뇌적 사고만으로는 경쟁에서 이길 수 없다. 감성과 감동을 포용하는 우뇌적 사고가 함께 이루어져야하기 때문이다.

② ‘하이컨셉(High Concept)’이란 트렌드와 기회를 감지하는 능력, 무관해 보이는 아이디어의 결합을 통해 남들이 전혀 생각하지 못하는 새로운 아이디어를 창조하는 역량, 예술적이고 감성적인 아름다움을 창조하는 능력 등을 종합적으로 지칭하는 개념이다. 이어서 다니엘 핑크는 기능적인 가치 뒤에 숨어있는 감성가치 또는 문화, 예술적 가치들을 창조해 내는 것이라 덧붙여 설명하였다(이향은·이순중, 2009).

③ 하이컨셉 시대에는 더 이상 기술이나 품질과 같은 이성적, 논리적인 방법만으로는 브랜드를 차별화하기가 어렵다. 그래서 요즈음 문화 마케팅, 아티스들의 예술과 상업적 상품의 통합 마케팅, 작은 일상생활을 통해 감성적으로 의사소통을 하는 마케팅, 이성적 가치를 뛰어넘는 창의적이고 독창적인 정체성을 만들어가는 활동 등이 눈에 띄게 늘어가고 있다.

④ 하이컨셉 시대의 마케팅은 누구나 다 알수 있는 ‘사실’들을 어떻게 엮어냈느냐가 관건이 되었다. 디자인이나 브랜드를 언어로 읽어내고 언어로 표현하는 능력이 더욱 절실히 필요하게 되었다. 미묘한 인간의 감성을 자극하기 위해서는 상상력만으로는 역부족이며 추진력을 가속화시킬 수 없다. 따라서 오늘날은 사실을 엮어내는 ‘스토리텔링’이 마케팅의 중요한 요소로 자리매김하게 되었다. 이를 위해서는 인문학적인 태도를 중시하고 보다 많은 경험과 다양한 문화를 섭렵해야 한다.

###### (나) 브랜딩 마케팅

① Branding의 사전적 정의는 ‘이름을 붙이다’이고 학술자료에 근거하여 요약하면 ‘소비자로 하여금 브랜드의 가치를 인지하도록 하여 해당 브랜드에 대한 충성도를 높이는 행동’이다. 그러나 시장에서 사용하는 브랜딩의 의미는 블랜딩(blending)에 가깝다. 블랜딩은 상품과 그 외 요소와의 혼합, 융합을 의미한다. 문화의 혼합, 관계의 혼합으로 해석할 수 있는 블랜딩형 브랜딩은 ‘강력한 관계 구축’이다(유니타스브랜드 매거북, 2010).

② 최근 많은 브랜딩 전문가들은 “오늘날의 브랜딩은 친구 관계이다”라고 말한다. 연결(connect)가 핵심 키워드로 주목을 받고 있는 요즘의 상황을 보았을 때, 관계 구축의 관점으로 해석하면 브랜드와 충성 고객 간의 관계는 친한 친구들 간의 관계와 유사하다는 의미이다.

③ 모든 브랜드는 공동체의 연결된 힘으로 구축된다. 공동체란 기업 안에 속한 직원뿐만 아니라, 외부파트너, 거래처, 투자자, 고객, 비고객, 더 나아가 경쟁자들까지 모두 포함된다. 이러한 공동체는 서로 주기도 하고 받기도 하는 완벽한 생태계이다. 따라서 시장은 브랜드 생태계(brand ecosystem)로 해석할 수 있다.





**The Modern Digital Ecosystem: Web, Social, Mobile, Search**

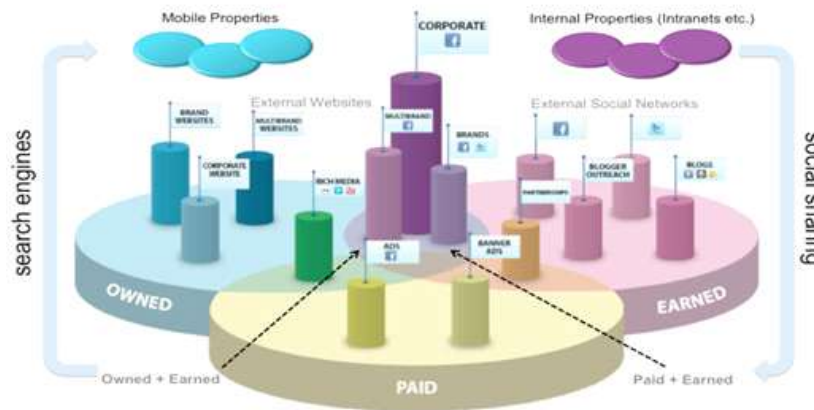


그림 출처 : <https://cuene.com/2012/10/16/brand-ecosystems/>

**(2) 전략적연동모형과 소셜미디어 마케팅**

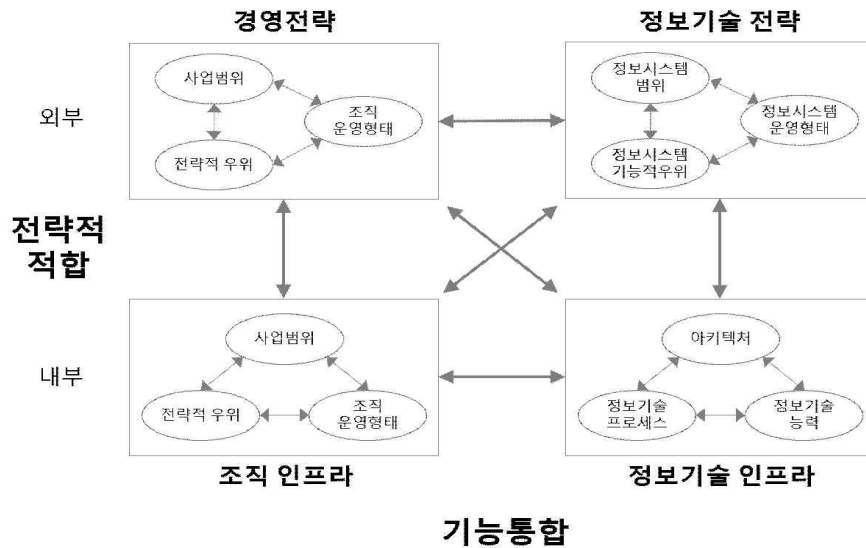
**(가) 전략적연동모형**

① 기업이 사업 전략을 수립하고 이를 지원할 조직 인프라를 구축하는 전략적 연계와 연구는 정보시스템에 주안을 두고 있는 중요한 업무이다(King, 1978; Reich and Benbasat, 1996). 조직전략과 정보시스템 전략간의 통합은 조직의 성공에 필요한 응용시스템의 개발이 가능하다는 점과 효율적인 정보시스템 프로젝트관리가 가능하게 한다는 점 그리고 경영전략을 반영치 않은 정보시스템은 기업자원의 낭비를 초래한다는 점에 있어서 조직의 성공에 결정적인 기여를 한다(Lerderer and Sethi, 1992).

② 전략적 연계는 기업전략과 정보기술 전략간에 존재하고 있는 적합도(fit)로 정의할 수 있으며 (Chan and Huff, 1993), 이와 관련된 많은 연구가 수행되고 있다. 하지만 기업 전략에 적합한 정보시스템을 도입 또는 개발하는 것은 여전히 어려운 숙제로 남아 있다(Henderson and Venkatraman, 1992; Pyburn, 1983).

③ 전략적 연동모형(strategic alignment model)은 정보기술이라는 범위에 경영전략을 수립하는 데 초점이 되는 내·외적 요소들을 고려대상으로 추가한 개념이다. 마치 기업이 시장에서 활동할 위치, 제품의 위치를 정하는 방법을 고려하듯이 정보기술전략과 인프라(infrastructure)의 위치를 시장에서 정하는 것이라 할 수 있다.

④ 전략적 연동모형은 아래 그림과 같이 사업전략, 조직 인프라, 정보기술전략, 정보기술 인프라라는 네 개의 요소를 갖는다(Henderson and Venkatraman, 1992).



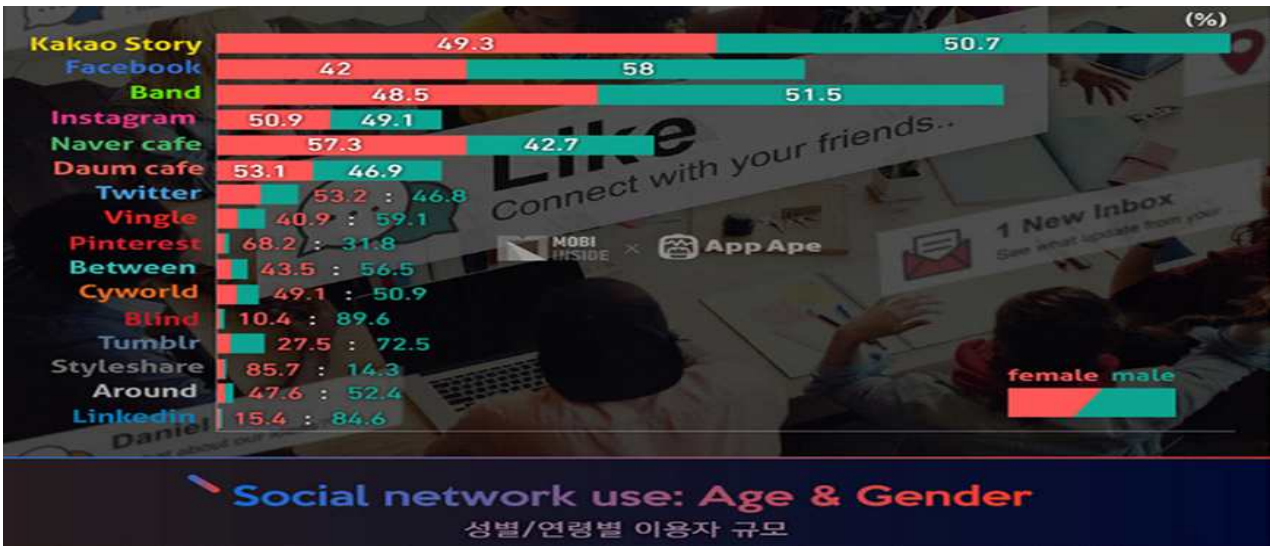
(나) 소셜미디어 마케팅

① 인터넷의 대중적 보급에 핵심적 역할을 담당한 웹은 데이터를 소유한다거나 독점하지 않고 누구나 손쉽게 데이터를 생산하고 공유할 수 있도록 한 사용자 참여중심의 인터넷 환경인 웹 2.0으로 발전하였다. 웹 2.0은 기술을 뜻하는 용어가 아니라 웹이 곧 플랫폼(platform)이라는 의미로서, 포털 중심의 독점적 소통 생태계에서 탈피하고 개방, 공유, 자율의 패러다임을 강조하는 개인미디어의 급속한 확산을 가져왔다.

② 웹2.0을 기반으로 한 SNS(Social Network Service)의 등장은 소셜미디어의 확산 및 소셜커뮤니케이션의 폭발적인 증가를 가져오고 '시멘틱 웹(semantic web)', '빅 데이터(big data)' 등과 같은 새로운 키워드를 탄생시켰다. 한국방송통신전파진흥원(2012)에 따르면 소셜미디어는 서비스기능에 따라 아래 표와 같이 8가지 유형으로 구분할 수 있다.

SNS분류	기능	서비스
프로필 기반	특정 사용자나 분야의 제한없이 누구나 참여 가능한 서비스	페이스북, 카카오톡, 마이스페이스
비즈니스 기반	업무나 사업관계를 목적으로 하는 전문적인 비즈니스 중심의 서비스	링크나우, 링크드인, 비즈스페이스
블로그 기반	개인 미디어인 블로그를 중심으로 소셜 네트워크 기능이 결합된 서비스	네이버 블로그, 네이버 밴드, 원도우라이브스페이스
버티컬	사진, 비즈니스, 게임, 음악, 레스토랑 등 특정 관심분야만 공유하는 서비스	유튜브, 핀터레스트, 인스타그램, 페이스북
협업 기반	공동 창작, 협업 기반의 서비스	위키피디아
커뮤니케이션 중심	채팅, 메일, 동영상, 컨퍼런싱 등 사용자 간 연결 커뮤니케이션 중심의 서비스	세이클럽, 네이버온, 이버디, 미보, 네이버밴드
관심주제 기반	분야별로 관심 주제에 따라 특화된 네트워크 서비스	도그스터, 와인로그, 트렌드밀
마이크로블로깅	짧은 단문형 서비스로 대형 소셜네트워킹 서비스 시장의 틈새를 공략하는 서비스	트위터, 텀블러, 미투데이

③ 스마트폰 앱 사용 기록을 기반으로 데이터를 조사 분석하는 App Ape(앱 에이프)가 2016년 4월에 분석한 우리나라의 SNS 이용현황을 보면 카카오톡, 네이버 밴드, 페이스북의 MAU(Monthly Active Users)가 가장 높은 것으로 나타났다. (\*MAU(Monthly Active Users): 한 달에 한 번 이상 해당 서비스를 이용한 순수 이용자 수)



SNS구분	이용규모 (MAU 순위)	1일 평균 실행횟수	주요 사용 연령대	성별 이용 비율	
				여	남
카카오토티	1	7.2	30~50대	49.3%	50.7%
밴드	2	9.1	30~50대	48.5%	51.5%
페이스북	3	15.4	10~20대	42%	58%
네이버 카페	4	14	30~40대	57.3%	42.7%
인스타그램	5	6.2	20대	50.9%	49.1%
다음카페	6	7.5	30~50대	53.1%	46.9%
트위터	7	12	20대	53.2%	46.8%
텀블러	8	3.2	20대	27.5%	72.5%

※자료출처 : mobiinside.com, appa.pe(앱에이프)채구성

④ 소셜미디어 마케팅으로 대변되는 인터넷마케팅은 기업에게 고객과의 접점에 있어 시간과 공간의 제약을 극복할 수 있고 마케팅과 판매경비절약이 가능하며 기업이미지 창출과 고객관리를 효과적으로 할 수 있다(장효순, 2013) 이러한 인터넷마케팅의 특징을 기반으로 최근의 소셜미디어 마케팅은 고객과의 접점에서 거래 당사자인 고객과의 유대를 더욱 강화시켜 나간다.

⑤ 네이버 지식백과(2017)의 정의에 따르면 소셜 미디어는 트위터(Twitter), 페이스북(Facebook)과 같은 소셜 네트워킹 서비스(social networking service, SNS)에 가입한 이용자들이 서로 정보와 의견을 공유하면서 대인관계망을 넓힐 수 있는 플랫폼을 의미한다. 이러한 정의적 관점으로 보면 소셜미디어의 이용행위는 대인관계와 정보공유로 구분될 수 있으며, 소셜미디어를 활용한 마케팅 수행에 있어서 중요한 요인은 고객과의 지속적인 교류를 위한 온라인 대인관계 형성과 고객들과의 상호작용이 가능한 마케팅 콘텐츠 생산활동으로 볼 수 있다.

⑥ 소셜미디어마케팅 활동은 제품의 품질에 관심을 둔 기존 마케팅에 비해 거래 대상인 고객과의 지속적 유대관계를 강화하여 상호이익을 극대화 한다는 측면에서 관계마케팅의 성격이 강하다.

⑦ 소셜미디어마케팅은 마케팅 담당자 입장에서 다양한 활동이 수반된다. 소셜미디어마케팅 수행에 있어서 고객과의 커뮤니케이션은 대부분 공개적으로, 실시간적으로 이뤄지는 만큼 기업의 입장에서는 실시간적인 대응이 중요하다. 또한 다수의 소셜미디어 사용자들이 지켜보는 만큼 정보제공에 있어서 벌어질 수 있는 각종 위기대응 역량도 필요하다. 고객들이 지속적

으로 관심을 가지고 소비할 수 있는 소셜미디어 콘텐츠 생산과 편집, 공유활동 또한 중요한 업무이다.

⑧ 이러한 다양한 활동에는 그에 따르는 다양한 역량과 전문성, 경험, 역할분담 등을 필요로 하는데 소수의 마케팅 담당자가 모든 활동을 전담하기에는 소셜미디어마케팅의 본연의 목적을 효과적으로 달성하는데 어려움이 있다. 소셜미디어 마케팅을 효과적으로 수행하기 위해선 우선 마케팅 업무를 체계화하고 실행 구성원을 조직하는 것이 중요하다. 그러나 일반농업기업 또는 농민단체 등에서 자체적으로 마케팅역량을 전문화하고 마케팅 조직을 구성하는데에는 전문성과 인적, 자본적인 한계가 있다

### 3-2. 3차년도 연구결과

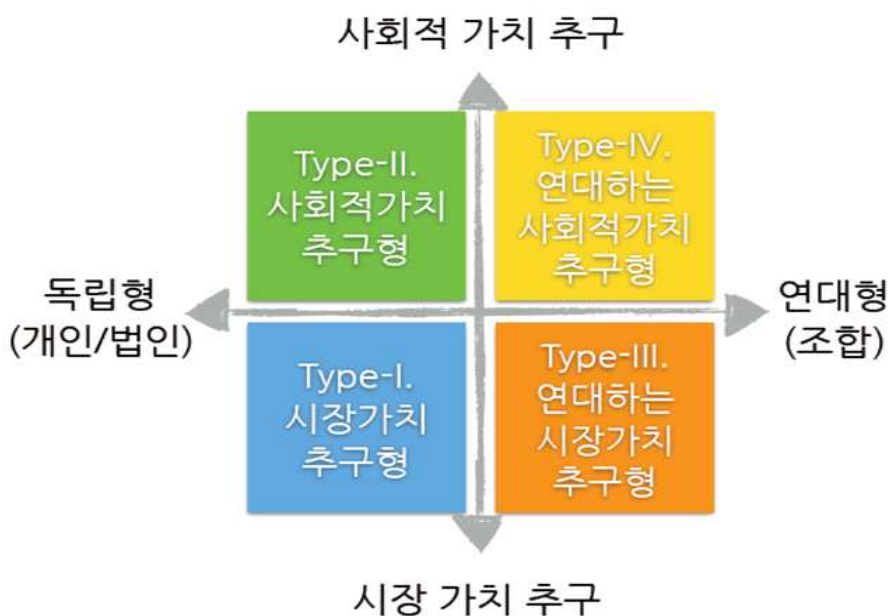
#### 가. 농산업 비즈니스 트렌드 분석

##### (1) 농산업 비즈니스 트렌드 분석결과

(가) 농산업 또는 농업비즈니스의 트렌드 변화와 특성을 분석하면 다양한 구성요인들이 존재한다(권중섭·장우환, 2011).

(나) 본 연구에서는 현장조사에 근거한 전문가토론을 통해 농업비즈니스 구분을 위해 2가지 중요 요소를 선택하였다. 첫번째 요소는 사업주체에 대한 구분으로 독립형과 연대형으로 나누어 구분하였다. 독립형은 개별농업인과 농업법인으로 대표되며, 연대형은 협동조합형으로 구분된다. 두번째 요소는 사업주체가 추구하는 가치에 대한 구분으로 ‘시장가치추구’와 ‘사회가치추구’로 구분하였다. ‘시장가치추구’ 유형은 개별 주체의 영업이익을 목표로 사업을 진행하는 유형을 의미하고, ‘사회적가치추구’ 유형은 임팩트비즈니스와 같이 우리 사회에 존재하는 문제를 해결하고 긍정적 영향을 주고자 하는 의지를 내포하고 있음을 의미한다.

(다) 아래 그림은 농업비즈니스를 참여 주체와 추구 가치로 구분한 4가지 사업유형을 보인다.



< 농업비즈니스 사업유형 구분 >

④ 농업비즈니스 4가지 사업유형은 다음과 같이 각각 다른 비즈니스 목적을 기반으로 정의하였다.

영역구분	유형구분	비즈니스 목적
Type-I.	시장가치 추구형	시장적 가치인 매출/수익 극대화를 목표로 함
Type-II.	사회적가치 추구형	지역 사회/환경적 가치 창출을 목표로 함
Type-III.	연대하는 시장가치 추구형	협동조합, 커뮤니티 비즈니스 등 연대의 가치를 통해 함께 성장하는 것을 목표로 함
Type-IV.	연대하는 사회적가치 추구형	사회/환경적 가치와 연대의 가치를 동시에 추구하는 것을 목표로 함

**(2) 트렌드 분석결과에 따른 유형별 농업비즈니스 우수사례 분석**

(가) 본 연구에서는 농업비즈니스 혁신을 위한 사례 농기업들의 비즈니스모델을 비즈니스 모델 켄 캔버스를 기반으로 분석, 정리하고자 한다. 비즈니스모델 켄 캔버스는 최근 농산업 트렌드에서 두드러지게 나타나는 사회혁신형 비즈니스모델별 캔버스를 제공해주고 있기 때문이다.

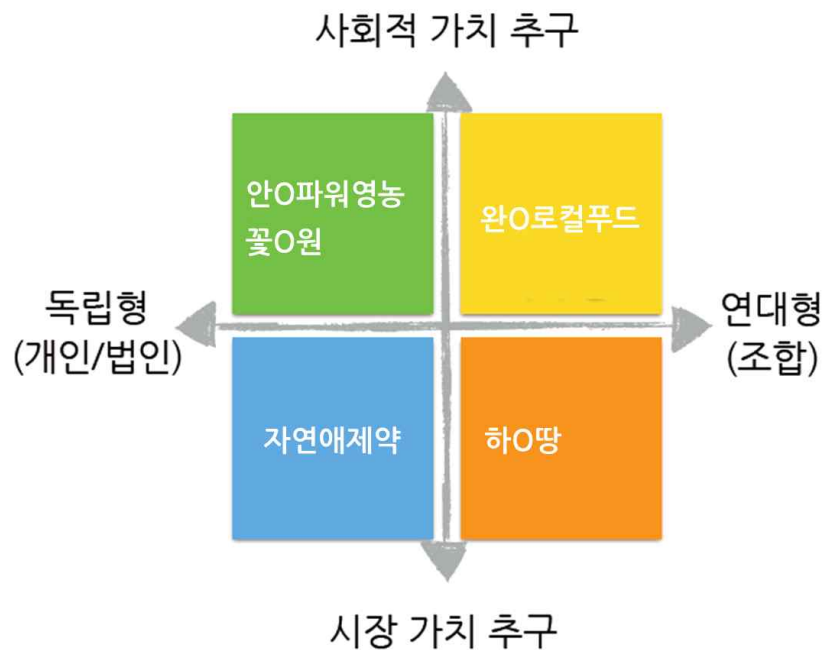


**< 비즈니스모델 켄 캔버스 : 협동조합형과 임팩트비즈니스형 >**

(나) 본 연구의 진행을 위해 서울, 경남 진주, 충남 논산 지역에서 각각 활동 중인 전문가들이 모였다. 전문가는 총 5명으로, 농업전문가 2명, 창업전문가 2명, 비즈니스모델 전문가 1명으로 구성하였으며, 미팅은 2016년 5월에 시작하여 2016년 11월까지 총 6회에 걸쳐 진행하였다.

회차	회의일자	참여인원	회의내용
1차	2016.05.09.	전문가 5명, 진행 1명	-프로젝트 연구 진행을 위한 사전 미팅 진행
2차	2016.05.30.	전문가 5명, 진행 2명	-농산업 트렌드 분석 및 농산업 유형 구분 요소 선정을 위한 미팅 진행 -비즈니스모델 쟁 캔버스 활용 방법 학습
3차	2016.08.11.	전문가 5명, 진행 2명	-7월 12일 미팅취소에 따른 회의 재진행 -농산업의 사업유형 구분 요소 결정(4분면 구성) -각 사업유형별 비즈니스 목적 정의를 위한 미팅 진행
4차	2016.09.26.	전문가 5명, 진행 2명	-각 사업유형별 구체적 농기업 사례조사 후 공유(4개 기업)
5차	2016.10.21	전문가 4명, 진행 2명	-9월 26일 미팅취소에 따른 회의 재진행 -각 사업유형별 구체적 농기업 사례조사 후 공유(4개 기업) -농산업에서의 비즈니스 선택시 주의사항 논의 -비즈니스모델 쟁 캔버스 구성 요소를 고려한 사례내용 정리
6차	2016.11.28.	전문가 4명, 진행 2명	-비즈니스모델 쟁 캔버스를 이용하여 사례 내용 정리 마무리 (8개 기업)

(다) 본 연구에서 정의한 농업비즈니스 유형별 비즈니스모델 사례를 선정하여 비즈니스모델 쟁 캔버스를 기반으로 분석하였다. ‘Type I : 시장가치 추구형’은 본 프로젝트 참여기업인 ‘자연애제약’을 대상으로 분석하였고, ‘Type II : 사회적가치 추구형’의 사례는 ‘꽃0원’과 ‘안0파워영농’, ‘Type III: 연대하는 시장가치 추구형’ 사례는 ‘하0땅’, ‘Type IV: 연대하는 사회적가치 추구형’의 사례는 ‘완0로컬푸드’를 대상으로 분석하였다.



① Type-I 시장가치 추구형 비즈니스모델 사례 : 자연애제약

비즈니스모델 Zen 캔버스 (자연애제약)

<b>아이디어 발상</b> - 지리산 권역의 청정한약재 공급을 통한 고객 신뢰확보. - 전국 한의원 DB, 한약재 생산자 DB와 유통업체 DB 구축을 통해 정보 전문성을 확보하고 장기적으로 원외당전 사업으로 확장가능.		<b>혁신 협력자</b> -경남과학기술대학교 -경상대학교 의대 -경남한방약초연구소 -한의사협회 -영업사원 -삼성그룹(중국) -KR 컨설팅 -산청군 -NC다이너 야구팀 시장 협력자		<b>실행 및 테스트</b>
<b>고객</b> - 전국 한의원 1000여 곳 - 건강식품 및 음료 제조업체	<b>문제</b> - (한의원)다품종 소량의 국내산 한방 약초를 한의원 고객이 원하는 타이밍에, 적절한 가격으로 공급되면 좋겠다 - (제조업체)소비자 트렌드에 맞는 국내, 국외 한방약초를 대량으로 확보하여 제매에 공급 필요 - 품질인증 받은 한약재료와 스토리 있는 약재 공급이 필요	<b>해법</b> - 한의원별 재고현황 DB를 만들고 Before Service 개념 도입 - 전국 약초생산자 및 유통업체와의 네트워크 구축으로 대용량 한약재 확보 및 보급 대응 - 전국 약초생산자 현황 정보DB를 만들고 주기적으로 업데이트 하여 품질인증 약재 생산정보 확보	<b>공간</b> - 소비자 트렌드를 반영한 전문적이고 믿을 수 있는 한약재료 공급 - 즉각적인 대응으로 고객업체의 시장 대응력 향상	
- 한방관련 산업의 집적 및 활성화를 도모한다 <span style="float: right;">사명</span>	- 한방 제조업(3조6261억원,2012) - 한방 도매업(2748억원,2012) - 한약재 생산규모(2012년): 제조사 247개, 품목 488개 <span style="float: right;">시장</span>	- 350가지 한약재 제조허가 보유 - 현대화된 당전시스템 - GMP 인증 등 체계적생산관리 <span style="float: right;">비교우위</span>	- 한방, 향노화 - 고객의 니즈와 전문가(한의사)의 의견이 결합된 한방재료 공급 - 신뢰 <span style="float: right;">하이컨셉</span>	
<b>기획 탐색</b> - 인구 초고령화 시대로 진입하면서 건강식품에 대한 관심이 증가하고 수요가 증가하고 있음 - 건강식품 제조회사들이 적당한 물량의 원료공급을 즉시에 받고자 하고 있음 - 전세계적으로 식물성 허브를 기반으로 제약 개발시장이 크게 형성되고 있음 - 원외 당전실 및 공동이용이 허용되었다.(2008년 의료법 개정)	<b>매출</b> - 원외당전(당전, 제환, 약침 등) - GMP 한약재 공급 - 경육고, 숙지방 공급 - 한약재 구입비 - 생산비용(타전, 제환, 약침 등) - 인건비(생산, 개발, 영업, 유통) - 마케팅 / 홍보비 / 영업비 <span style="float: right;">비용</span>		<b>학습 및 피봇</b>	

② Type-II 사회적가치 추구형 비즈니스모델 사례 : 꽃0원, 안0파워영농

비즈니스모델 Zen 캔버스 (꽃0원)

<b>아이디어 발상</b>		<b>혁신 협력자</b> 슬로푸드협회 마르셰 장터 논산귀농장터 <span style="float: right;">시장 협력자</span>		<b>실행 및 테스트</b>
<b>고객</b> a. 건강한 생각의 소비자 b. 재료의 질을 생각하는 요리사	<b>문제</b> a. 건강한 먹거리 생산 b. 다른 방식의 유통 c. 다른 방식의 홍보	<b>해법</b> 다품종 소량생산 농사과정의 공개 대면홍보 → 푸러미개발 SNS 마르셰장터 소셜다이닝	<b>공간</b> a. 친환경 생산방식 b. SNS로 신뢰구축 c. 사회적 관계 구축	
건강한 먹거리를 사회적으로 소비 <span style="float: right;">사명</span>	로컬푸드에 대한 인식 높아 시장 진입 용이 <span style="float: right;">시장</span>	젊은 귀농인이 가진 스토리 활용 <span style="float: right;">비교우위</span>	하이컨셉	
<b>기획 탐색</b> 지자체(논산시)의 로컬푸드 지원 농업, 농촌에 대한 문화적 가치 인식 증대 사회적 가치에 대한 소비자 인식 제고	<b>매출</b> 푸러미, 마르셰, 지역귀농인 장터, 소셜 다이닝 농자재, 모종, 인건비 포장비, 택배비 장터 교통비 식당 임대료, 운영비 <span style="float: right;">비용</span>		<b>학습 및 피봇</b>	

http://businessmodelzen.co.kr

비즈니스모델 쉐 캔버스 (안0과워영농)

아이디어 발상		혁신 협력자 완주CB센터	실행 및 테스트	
		마을농가 여행사업단 등 지역방송사 시장 협력자		
고객 일반 소비자	문제 마을의 홍보 계 방문을 제고 마을 소득 연계	해법 마을공동체로 홍보 점점방 차별화 → 농산물 가공품 체험/관광 마을내 생산물 구매	공간 마을공동체사업 농촌의 넉넉함 품질 유지	
지역의 특산물의 판로 확보와 장애인 고용 증대 사명	냉동딸기 시장은 확대, 논산의 지역마케팅에 편승 시장	논산 지역특산물, 품질 비교우위	힐링 하이컨셉	
완주군의 마을기업 정책 건강, 힐링 개념 대부 고령화에 대한 마을의 대책 마련		매출 농산물, 가공품 점점, 숙박, 식사		
기획 탐색		원재료비 인건비, 공과금 시설 운영비 비용	학습 및 피봇	

<http://businessmodelzen.co.kr>

③ Type III 연대하는 시장가치 추구형 비즈니스모델 사례 : 하0땅

비즈니스모델 쉐 캔버스 (하0땅)

아이디어 발상		혁신 협력자 논산시 공동체경제추진단	실행 및 테스트	
		딸기농가 밴더 시장 협력자		
고객 주스, 빵 프랜차이즈 대기업	문제 원재료 확보와 원가유지 대량 판매처 확보와 공급단가 장애인 노동의 질	해법 품질 신뢰 농가 확보 출하 조절을 위해 저장 장애인에 맞는 환경 조성 → 냉동 딸기	공간 품질 장애인 고용	
지역의 특산물의 판로 확보와 장애인 고용 증대 사명	냉동딸기 시장은 확대, 논산의 지역마케팅에 편승 시장	논산 지역특산물, 품질 비교우위	하이컨셉	
지자체(논산시)의 딸기 분야의 지원 딸기 비수기에 대한 대안 마련 장애인 일자리 창출에 대한 관심		매출 냉동딸기가 주소득원 딸기고추장 등 신제품 개발 비수기 다른 농산물 유통		
기획 탐색		원재료비 인건비, 공과금 시설 감가상각비 비용	학습 및 피봇	

<http://businessmodelzen.co.kr>



④ Type IV 연대하는 사회적가치 추구형 : 완0로컬푸드

비즈니스모델 캔버스 (완0로컬푸드)

아이디어 발상		혁신 협력자 완주군청	실행 및 테스트	
		생산농가 관내 학교	시장 협력자	
고객 로컬 소비자 먼 거리의 꾸러미, 쇼핑물 소비자	문제 소농에 대한 대책 다품종 소량 생산품 판매 품질에 대한 신뢰 홍보	해법 기획생산 입점형태 판매방식 안전검사 → 일본 직매장 방식 적용	공감 소농의 생산에 대한 믿음 신선도, 안정성 검증시스템 적은 거리 이동에 대한 신뢰	
지역의 소농의 판로 확보 농민의 소득증대 사명	로컬푸드의 중요성 대두 시장은 점점 확대 시장	비교우위	하이컨셉	
완주군의 로컬푸드 지원정책 신선, 안전 농산물에 대한 소비자 인식 제고 고령화된 농촌의 대안 마련		매출 직매장 운영수익		
기획 탐색		인건비, 시설 운영비 비용	학습 및 피봇	

<http://businessmodelizen.co.kr>

나. 브랜드 마케팅 및 소셜미디어 마케팅 실행 모델 제시

(1) 동의보감 하이컨셉에 기반한 한방약초 브랜드 마케팅

(가) 국보319호로 분류되는 동의보감은 2009년에 세계기록유산으로 등재되었다. 등재사유는 ‘예방의학’ 측면과 공공의료서비스측면에 대한 선구적인 면에 대한 고평가이다. 동의보감은 병에 대한 치료방법 뿐만 아니라 발생원인까지 상세하게 밝히고 있기 때문이다.

(나) 동의보감은 ‘사람 중심의 의학’을 정립하였다. 서문에 ‘병이 같더라도 사람에 따라 치법이 다르다’고 언급하고 있다. 동의보감 ‘탕액편’에는 갖가지 재료를 이용해 치료약을 만드는 법을 설명하였는데, 비싼 약을 구하기 힘든 일반 백성이 구할 수 있는 손쉬운 약재들을 중심으로 처방하였다.

(다) 동의보감의 여러 근거에 따라 산청군 동의보감촌의 하이컨셉은 우리나라의 쓰임새에 가장 적절한 ‘백성(사람) 중심의 예방의학’으로 표현할 수 있다. 이는 지리산의 정기(精氣)를 맞고 자라는 산청군 인근의 약초에 역사적인 스토리를 제공하며 브랜딩 요소로 손색이 없다. 따라서 본 연구에서는 ‘백성을 위한 예방의학, 지리산 약초’라는 브랜드 마케팅을 제안하였다.

(2) 전략적연동모형을 기반으로 하는 소셜미디어 마케팅 실행 모델

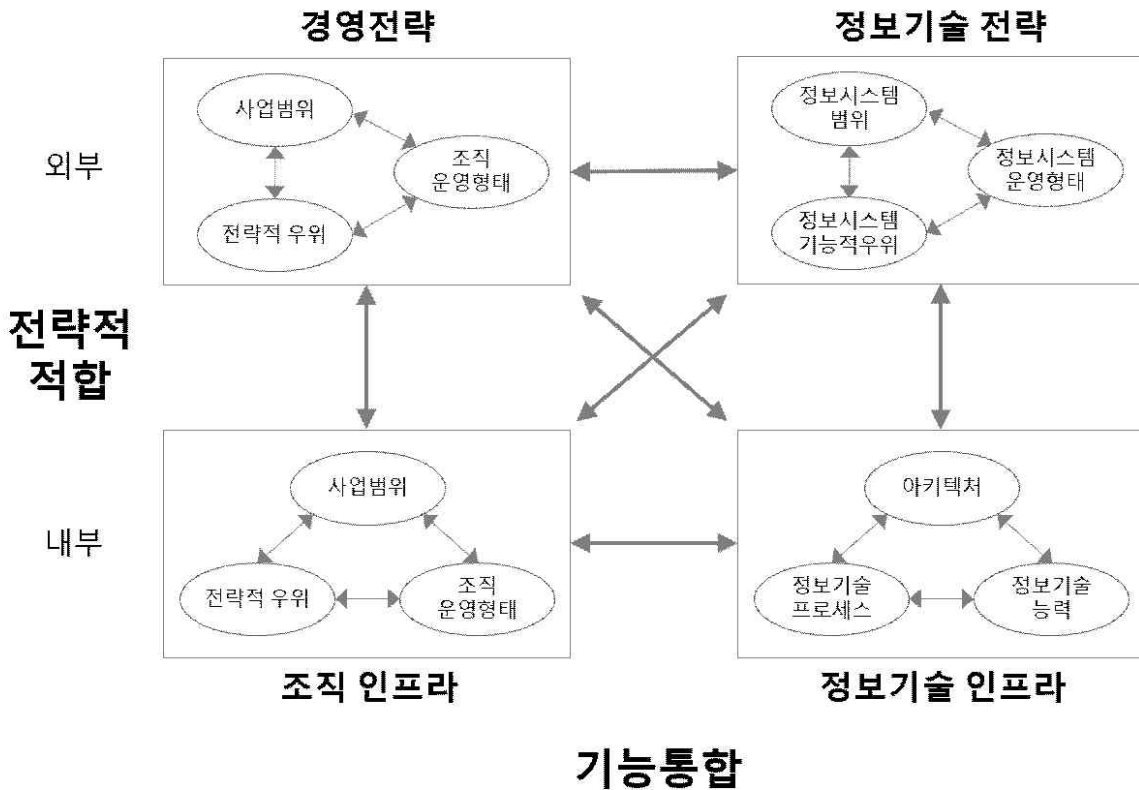
(가) 지역 자원을 활용한 6차산업은 생산자, 공급자, 파트너 등 각종 이해관계자들이 존재한다. 이들은 6차산업 활성화를 통한 지역경제 활성화라는 공통의 목표를 공유한다. 이러한 측면에서 이들은 서로가 이익을 공유하는 대상이며 연대의 대상이 된다.

(나) 소셜미디어마케팅 조직을 구성함에 있어 기존의 한계를 극복하는데에는 이해관계자들을 연계한 공동의 소셜미디어마케팅 실행공동체 구성이 대안이 될 수 있다. 다양한 이해관계자들의 소셜미디어마케팅 활동 참여는 6차산업과 관련한 다양한 마케팅 콘텐츠의 양적인 확

보가 가능하고, 콘텐츠 가공, 편집 교육을 통해 콘텐츠 품질을 향상시킬 수 있다. 또한 소셜미디어 이용 고객들에게는 6차산업 관련 분야에 종사하고 있는 전문가들과 직접 소통할 수 있는 기회를 제공하여 고객과의 친밀성을 높여 소셜미디어를 이용한 관계마케팅의 목표를 달성할 수 있다. 이러한 소셜미디어 마케팅 실행공동체를 조직함에 있어서 핵심은 이해관계자들 간 공동의 마케팅 전략을 수립하고 이를 실행할 소셜미디어 정보기술과 프로세스를 공유하는 것이다.

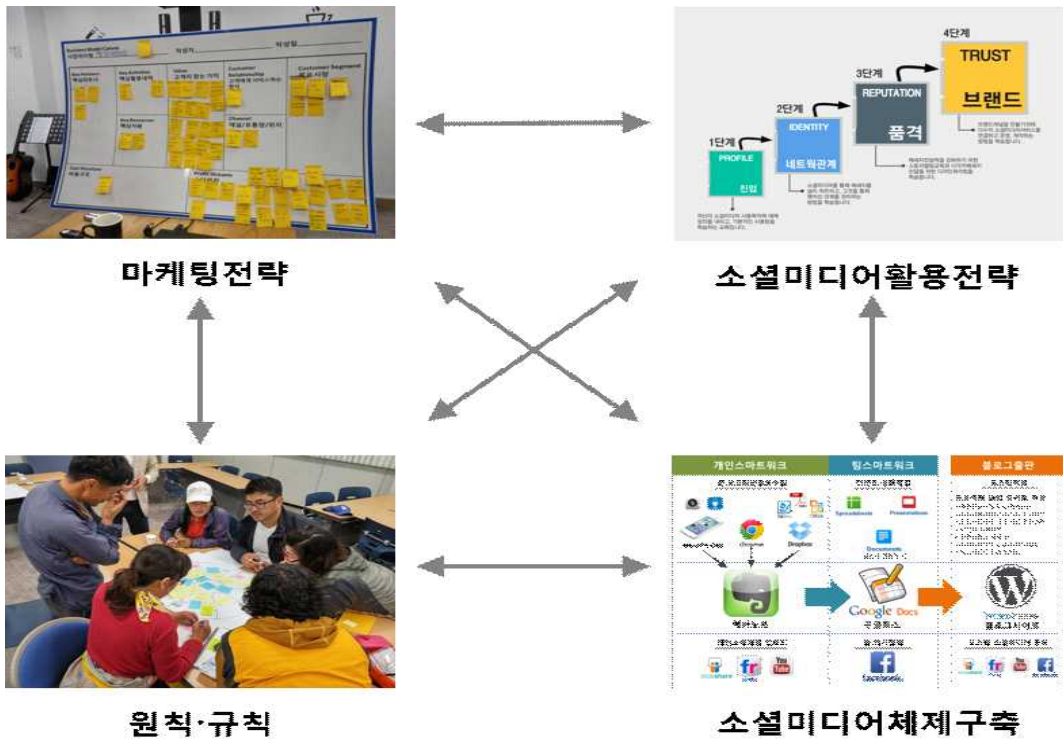
(다) 본 연구에서는 소셜미디어 마케팅 실행공동체의 공동의 전략을 수립하고 체계적인 프로세스를 공유하기 위해 전략적연동모형(strategic alignment model)을 기반으로 하는 실행모델을 제시한다.

(라) 전략적연동모형은 그림과 같이 조직의 경영전략과 조직구성 인프라, 정보시스템 기술 인프라와 정보기술 전략의 4가지 요소를 제시하며 경영전략과 정보기술 전략의 연계를 통해 조직의 성공에 기여하는 것이 목표이다(Henderson, J. C. and Venkatraman, N., 1992)



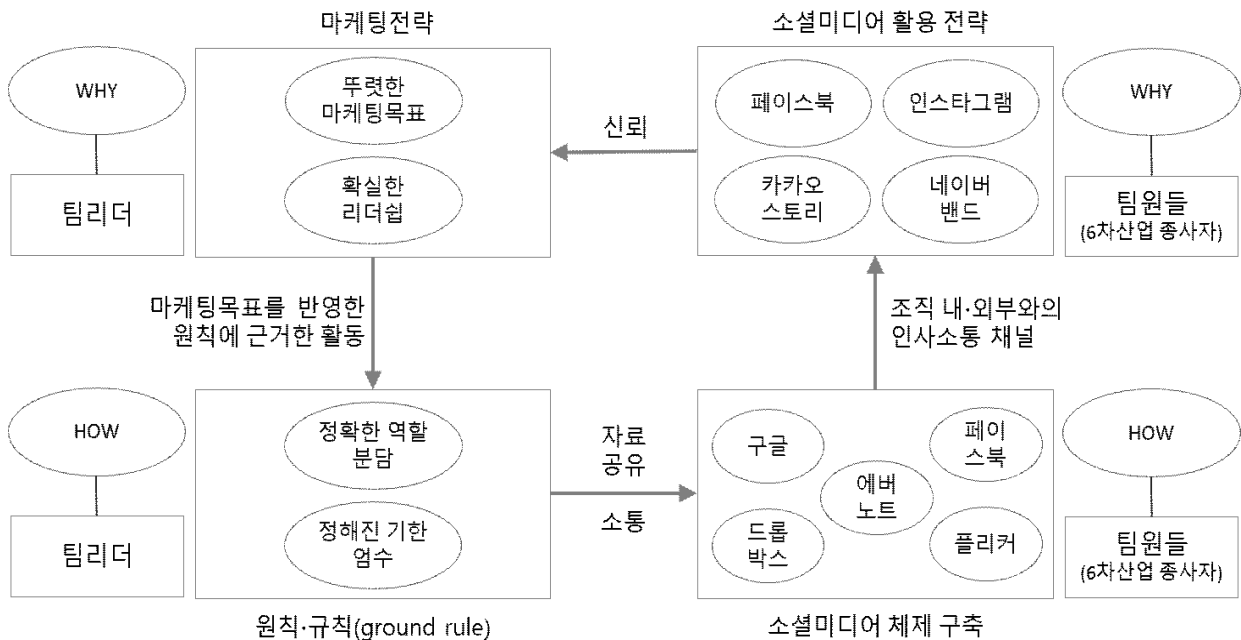
< 전략적 연동모형 >

(마) 본 연구에서는 전략적연동모형을 기반으로 소셜미디어마케팅 공동체의 실행모델을 마케팅전략과 소셜미디어정보기술 간의 전략적 연계라는 관점으로 다음 그림과 같이 마케팅전략, 원칙과 규칙, 소셜미디어 활용전략, 소셜미디어 체제 구축의 4가지 요소를 연계하는 모델을 제시한다.



< 전략적 연동모형 기반의 소셜미디어마케팅의 4가지 실행요소 >

(바) 전략적 연동모형 기반 소셜미디어마케팅의 4가지 실행요소는 전략적 연계가 가능하다. 전략적 연계는 마케팅전략과 소셜미디어 활용전략, 원칙과 규칙, 소셜미디어 체제 구축 간에 적합도(fit)를 높이는 것이 중요하며 4가지 요소를 연결하고 있는 부분들이 전략적 조화를 가능하게 한다. 약한 연결고리(weak tie)인 이해관계자들로 구성된 실행공동체가 지속가능하기 위해선 구체적인 마케팅전략의 수립과 이를 실행함에 있어서 적합한 원칙·규칙과 소셜미디어 체제를 구축하고 소셜미디어 마케팅 전략을 펼칠 수 있는 전략적 연동모형 기반의 소셜미디어 마케팅 실행 모델을 갖추는 것이 중요하다.



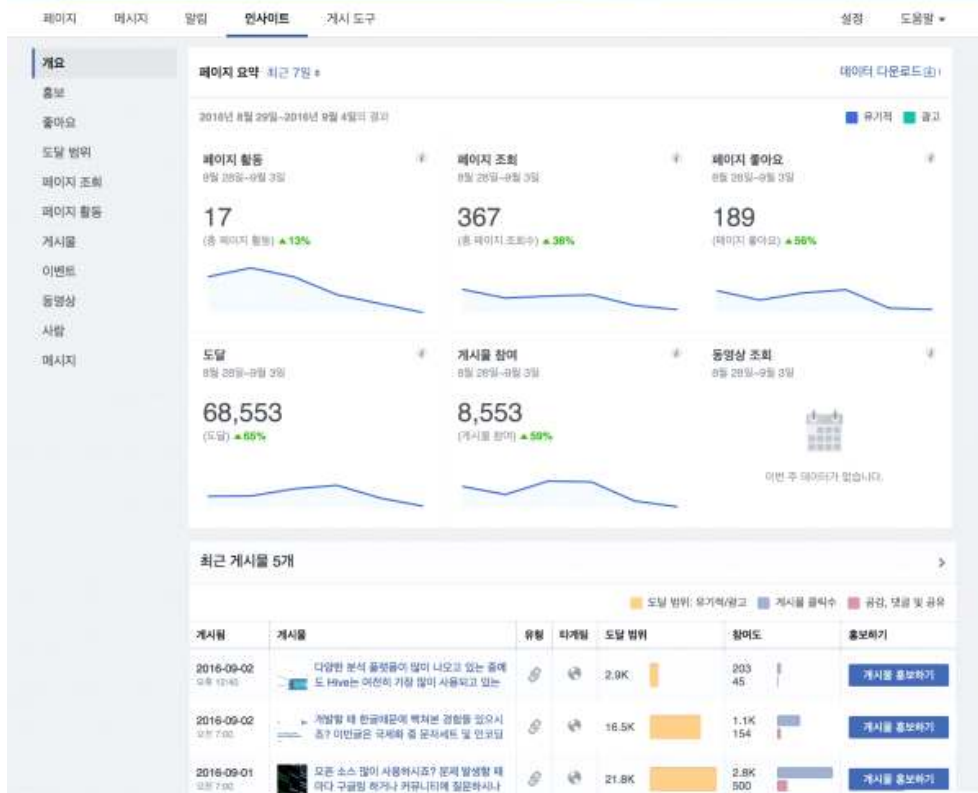
< 전략적 연동모형 기반의 소셜미디어마케팅 실행모델 >

## 다. UX를 고려한 한방약초 신제품 제작을 위한 마케팅 프로세스 제시

### (1) 소셜미디어를 활용한 신제품개발 마케팅

(가) 마케팅은 생산자가 상품 또는 서비스를 소비자에게 유통시키는 데 관련된 모든 체계적 경영활동으로서 매매 자체만을 가리키는 판매보다 훨씬 넓은 의미를 지니고 있다. 기능내용은 제품관계, 시장거래관계, 판매관계, 판매촉진관계, 종합조정관계로 대별된다. 제품관계에는 신제품의 개발, 기존제품의 개량, 새 용도의 개발, 포장·디자인의 결정, 낡은 상품의 폐지 등이 있다(두산백과) 신제품개발을 위한 마케팅을 수행함에 있어서 소셜미디어는 고객의 의견과 욕구, 불만, 라이프스타일 등에 대한 다양한 정보들과 통찰을 제공받을 수 있는 장소이다. 신제품의 기획단계에서부터 개발아이디어, 프로토타입제작 등 일련의 과정에 대해 고객으로부터 의견을 제공받을 수 있다면 신제품의 시장성과 기능적 보완 및 완성도를 제고할 수 있다.

(나) 전세계 10억명 이상의 이용자가 가입한 대표적인 소셜미디어인 페이스북은 개인명이 아닌 브랜드, 비즈니스, 단체 명의의 계정을 추가로 개설해 타겟고객과 소통할 수 있는 페이지라는 기능을 제공하고 있다. 페이스북 페이지는 콘텐츠를 제공하는 관리자의 활동에 따라 수반되는 이용자들의 반응을 아래 그림과 같이 통계적으로 처리하여 보여준다.

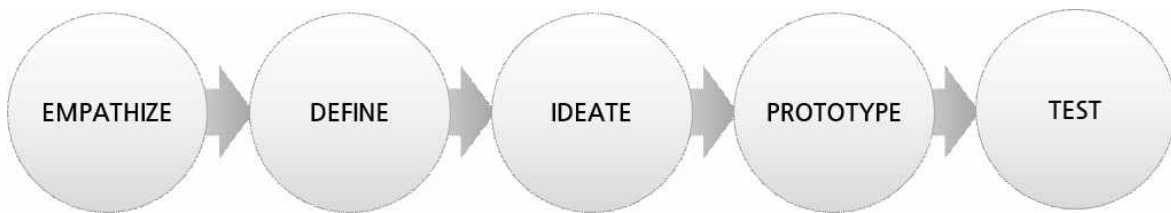


### < 페이스북 페이지 인사이트 >

(다) 페이스북 페이지 인사이트는 관리자활동 및 이용자들의 참여 및 다양한 반응, 유사 경쟁 페이지의 정보를 통계처리하여 보여줌으로써 페이스북 이용자들의 행태에 대한 분석적인 마케팅을 가능케한다. 신제품 개발을 위한 소셜미디어 마케팅 활동에 페이스북 페이지를 활용한다면 고객이 어떤 정보에 어떠한 방식으로 반응하는지 실시간적으로, 통계적으로 분석이 가능하다. 제품의 기능적인 부분, 고객의 요구사항, 판매경로의 설정, 가격정책 등 신제품개발과 관련한 다양한 내용의 리서치활동으로 얻어진 고객데이터를 통해 신제품과 관련한 이슈들을 보완해 나갈 수 있는 것이 신제품마케팅 활동의 합리적인 대안이 될 수 있다.

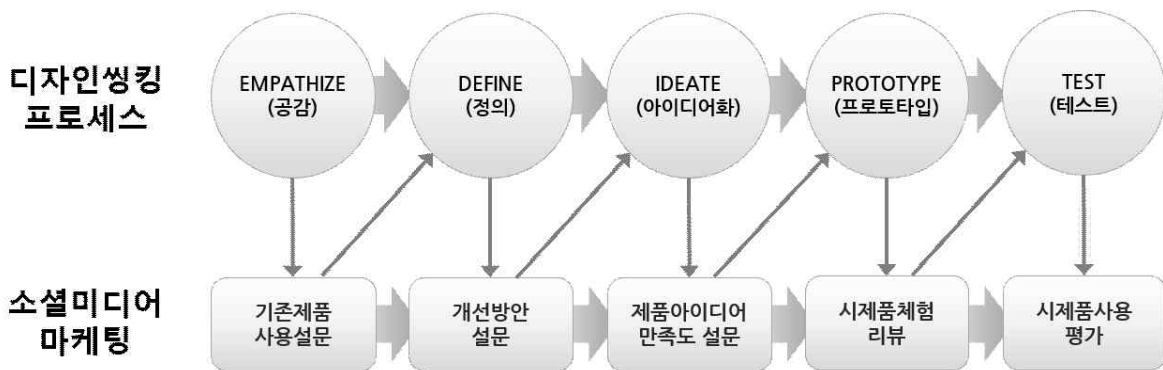
## (2) 디자인씽킹을 활용한 신제품개발 마케팅

(가) 디자인 씽킹은 독일 소프트웨어 기업인 SAP의 하소 플레트너 회장이 만들고, 미국 스탠퍼드 디스쿨(Hasso Plattner Institute of Design at Stanford; Stanford D.School)이 확산시킨 교육 프로그램이다. 인간의 필요에 공감하고 대중이 모르는 잠재적 욕구를 발굴해서 프로토타입까지 만들어보는 과정을 말한다. 사람들이 겪는 불편함을 인간 중심관점으로 찾아내 해결하기 때문에 창의적 문제해결 방법론으로 불린다(CNET Korea.(2013). What is Design Thinking? Why do you need?, <http://www.cnet.co.kr/view/11335>) 디자인씽킹은 제품이나 서비스 혁신을 위한 디자이너 감수성과 작업방식을 이용한 사고방식으로서 단지 외적인 디자인이 아니라 제품에 대한 개발 및 기획, 마케팅 등 전반적인 과정에 적용이 가능하다(Brown, T.(2008). Design thinking. Harvard business review, 86(6), 84.) 대중적으로 많이 활용되는 스탠포드 디스쿨의 디자인씽킹 프로세스는 <그림 5>와 같이 공감(Empathize), 정의(Define), 아이디어화(Ideate), 프로토타입(Prototype), 테스트(Test)의 5단계를 거친다.



< 스탠포드 디스쿨 디자인씽킹 프로세스 >

(나) 소셜미디어는 디자인씽킹의 사람들이 겪는 불편함을 인간 중심관점으로 찾아내는데에 좋은 장소이며 도구로서 활용이 가능하다. 소셜미디어를 통해 관계맺은 이용자들을 대상으로 시제품 개발과 관련한 이슈들에 대한 리서치활동을 통해 다양한 의견과 불만, 소망, 아이디어 등을 제공받을 수 있으며, 확보한 이용자 반응들은 소셜미디어에서 제공하는 통계분석을 통해 과학적인 근거를 토대로 시제품 개발에 반영할 수 있다. 아래 그림은 디자인씽킹 프로세스와 소셜미디어마케팅을 연계한 시제품개발 마케팅 프로세스이다.



< 디자인씽킹과 소셜미디어를 연계한 시제품개발 마케팅 모델 >

(다) 디자인씽킹 프로세스의 각 단계에서 나온 결과물들은 반드시 소셜미디어 이용자의 반응을 거쳐 통계적으로 분석되어 다음단계로 넘어갈 수 있도록 설계되어 있다. 디자인씽킹 프로세스에 근거한 신제품개발 과정 마다 즉각적으로 소셜미디어를 통해 고객반응을 살피고, 이에 대한 분석내용이 제품개발 피드백으로 반영될 수 있도록 하는 것이다. 고객이 불편해하는 문제에 대해 인간중심적 관점으로 신제품이 개발될 수 있도록 하는 것이 본 연구는 디자인 씽킹과 소셜미디어를 연계한 신제품개발 마케팅 프로세스 개발을 목적으로 진행하였다.

## 라. 지리산권역 한방약초 6차산업화를 위한 참여기업 컨설팅 및 포럼 진행

### (1) 세계적 트렌드 변화에 대응한 사업전환과 6차산업 기반 일자리창출 포럼

주제	일정	참여구성원	토론내용
6차산업과 일자리창출	2017.06.15.	발제자 : 3인 전문가 토론자 : 3인 전문가 그 외: 참여기업 대표, 경남과기대 관계자	- 6차산업 현장과 연결된 전문인력 양성 방안 - 6차산업으로 청년창업, 일자리창출 방안 - 6차산업 현장에서 바라보는 그린 일자리 창출 방안

#### (가) 토론내용 1 : 6차산업 현장과 연결된 전문인력 양성 방안

① 6차산업은 어떻게 농산물의 가치를 올릴 것인가가 가장 핵심가치이다. 많은 정책들이 진행되고 있지만 거의 기업농, 부자농이 혜택을 다 가져가고 있는 것이 현실이다. 소농들은 생산에 집중하느라 그 외의 상황을 파악할 여력이 없다. 소농들의 고충을 알기 위해서는 반드시 현장방문, 현장과 바로 연결된 전문인력이 절실히 필요하다.

② 현재 전국적으로 농업인을 위한 다양한 교육과정이 진행 중인데 주관 기관마다 다르고 지역마다 다르게 이루어지고 있다. 일본의 경우는 전국 어디를 가도 귀농을 위한 교육이 동일하게 이루어지고 있다. 우리나라도 현장과 연결된 전문인력 양성을 위해서는 먼저 체계적인 교육프로그램의 설계가 필요하다. 농촌 현장의 소리를 귀에 담고 현장에 투입되는 새로운 인력에게도 미래가 보장될 수 있는 교육프로그램을 설계하고 체계적인 교육으로 농촌과 일 자리를 필요로 하는 인력 모두가 함께 성장할 수 있는 정책을 펼쳐야 할 시기로 판단된다.

③ 농촌에서 현재 이루어지고 있는 6차산업은 농민을 위한 사업이 아니라 새로운 판매망 중심의 6차사업이라는 생각이 든다. 실제 기존 농업인들은 귀농정책이나 도시농업에 대해 부정적인 감정을 가지고 있다. 그렇다면 사람의 성장과 산업 성장을 모두 포함하는 정책들이 필요한 것 같다.

#### (나) 토론내용 2 : 6차산업으로 청년창업, 일자리창출 방안

① 농업에서의 창업은 농지 확보가 가장 중요하다. 일자리창출방안으로 창업을 고려한다면 농촌으로 청년 인구의 유입을 유도하는 것이 절실한 상황이다. 하지만 청년들은 창업 초기 단계부터 농지를 확보하기가 아주 어렵다. 농촌도 땅값이 상당히 높기 때문에 1차적으로 청년들이 구입이 어렵고, 농지를 임대로 시작하는 경우 임대기간 종료 후 땅주인에게 사업기회가 넘어가는 일이 허다한 상황이다. 따라서 청년들의 농창업을 적극 권장하기 위해서는 가장 먼저 농지확보를 위한 전략이 우선되어야 할 것이다.

② 1차 생산에 집중하고 있는 소농들이 원하는 일자리는 새로운 것이 아니라 마음놓고 농사를 짓게 해주는 것이 가장 좋은 방법이라 판단된다. 수확된 농산물에 대해 최소유통마진을 지켜주고 구매해준다면 많은 농업인들이 가공, 판매를 위해 더욱 수고할 필요가 줄어들 것이다. 필요에 따라 소비자와의 직거래를 원한다면 적절한 교육이 필요하겠지만, 마음놓고 생산에 집중할 수 있는 환경을 조성해주는 것도 그들에게 선택권이 주어지는 것이므로 의미가 있다고 볼 수 있다.

③ 농촌 현장에서 6차산업에 임하는 기업은 소비자관점의 6차산업을 진행할 필요가 있다. 지속성을 위해서는 가끔 손해를 볼때도 있지만 소비자가 선택하는 이유가 가장 중요하다고 판단된다. 브랜드를 확실히 하고, 탄탄한 스토리를 제공한다면 소비자들은 우리 기업을 인지하게 될 것이다. 농업은 1.5배 또는 2배 그 이상의 고부가가치는 구현이 불가능한 사업이다. 왜냐하면 소비자들이 원물가격을 거의 알고 있기 때문이다. 따라서 지속성을 생각하며 사업을

유지하는 것이 장기적으로 이득이라는 점을 공유하고 싶다.

(다) 토론내용 3 : 6차산업 현장에서 바라보는 그린 일자리 창출 방안

① 농업·농촌, 농식품은 인간의 생존을 좌지우지하는 먹거리로부터 시작되어 지구적인 환경문제와 직접 연결되는 산업이다. 기후변화에 따른 생산현장의 전략변화에서부터 가공현장에서의 환경적 제재, 판매현장에서의 소비자 관심변화까지 모든 산업이 환경문제와 연결되어 나타나고 있다. ‘녹색성장’이라는 키워드는 반짝하고 지나가는 유행성 단어가 아니다. 지속적으로 관심이 증대될 필요성이 있는 단어이다.

② 환경문제와 함께하는 시대에 기업으로 생명을 유지하고 지속적으로 성장하기 위해서는 기업 내부의 문제뿐 아니라 외부적, 사회적 상황에 최대한 관심을 가지고 대응하여야 한다. 본 프로젝트의 참여기업인은 한방약초산업의 핵심기업으로 성장을 목표로 하기 위해 더욱 ‘그린 일자리 창출’에 관심을 가져야만 한다. 한방약초는 산업자체가 자연, 건강, 힐링 등의 뜻을 포함하고 있기 때문이다. 한방약초 기반 그린 일자리는 어떤 것이 가능한지 깊이 생각해볼 필요가 있다. 예를들어 한방약초 폐기물은 활용성이 다양하다. 발효 후 퇴비로 활용이 가능하며, 바이오 매스 에너지 생산의 가능성도 충분하다. 기업의 시작부터 끝까지 모두가 환경적으로 문제가 없는 기업만이 앞으로 생존하게 될 것이다. 지금시점부터 철저히 미래를 대비할 필요가 있다.

< 6차산업과 일자리창출 간담회 진행 모습 >



## (2) 참여기업 컨설팅

(가) 지리산권역 6차산업화의 성공을 위해 외부 기업컨설팅 전문가를 초청하여 참여기업 J사를 대상으로 2회의 추가 컨설팅을 진행하였으며 요약 내용은 아래 표와 같다.

구분	일정	핵심내용
5차 컨설팅	2016년 9월 9일	- 기술 이전과 관련한 이전비용 설정 - 새로운 농업법인 설립 절차
6차 컨설팅	2016년 11월 28일	- 사업다각화를 위한 준비사항 - 주식회사를 농업회사법인으로 변경하는 절차

### <참여기업 컨설팅 진행 모습>



## 마. 산청군 도라지 이용 6차산업 사업화 비즈니스 모델 개발 [(주)자연애제약 중심]

### (1) BM 수립 배경

(가) 경상남도 핵심 전략산업 : 향노화·바이오산업

○ 향노화·바이오를 ‘경남 5+1 핵심 전략산업’에 포함 : 기반구축, 기술개발역량, 기업지원, 연계협력사업의 4대사업 분야 30개 세부사업에 국비 1,896억원 등 총 5,175억원의 예산을 투입하는 3단계 로드맵 수립

○ 한방, 양방, 해양 등 세 방향으로 향노화를 산업화하고 서·북부권과 남해안 지역 발전 촉진을 목표로 추진

○ 연구개발과 사업화 기반구축을 위해 1단계(2014~2016)부터 생산기반을 확충하고 관광단지 조성하는 2단계(2017~2019), 대규모 복합단지를 조성하고 안정적 제품 공급이 가능한 3단계(2020~2022)로 추진

○ 특히, 2013년 2월 향노화 관련 사업추진 및 지원을 위해 경제통상본부 미래산업과 향노화·바이오 전담조직을 구성하여, 2014년 1월 낙후된 서부경남의 발전을 위해 서부권개발본부 한방향노화산업과로 조직 확대 운영

○ 경남 한방향노화산업과 관광산업 접목 ‘한방특화 웰니스산업’ 비즈니스 모델 발표하였고(2016년 3월 9일, 그림 7-2), 산청군 산청한방향노화산업 로드맵인 ‘SANC(산청) 플랫폼’을 발표(2016년 5월 3일, 산청한방향노화포럼)



# 한방특화 웰니스 관광벨트 조성

(경남 한방향노화산업과, 2016.03.09)



## 한방 향노화 휴양단지 조성현황



【한방특화 웰니스 관광산업 벨트 조성】 (출처: 경남 한방향노화산업과)

(나) 현 정부의 창조경제 방향 : 농업·농촌 6차산업

○ 농업 6차 산업이란 제1차 산업(농산물 생산)부터 제2차 산업(가공), 제3차 산업(유통, 물류, 관광)을 융합하고 아울러 농업을 제6차 산업이라는 새로운 틀로 바꾸자는 것이 정부의 주장 있음.

○ 특히, 산청군은 한방향노화산업 연계 ‘한방향노화 MAFH 6차산업 플랫폼 구축’을 산청군 한방향노화산업 육성 로드맵에 반영 (그림 7-3)



【산청 한방향노화 MAFH 6차산업 플랫폼】 (출처: 산청한방향노화포럼)

⇒ 이에 따라 본 연구의 사업화 BM 모델은 산청 한방향노화산업 연계 도라지 6차 산업으로 수립

**(2) BM 목표 및 핵심경쟁요인**

(가) BM 목표 (그림)

- 비전 : 한방항노화산업의 새로운 ‘Blue Ocean’ 창출
- 3대 목표 : 원료수급 체계화 → 제품 고도화 → 기능성 소재 산업화
- 추진전략 : 도라지의 생산-가공-유통-마케팅-체험-관광 고도화 시스템 구축



【그림 7-4. 도라지 항노화 연계-6차산업 BM 개발 전략】

(나) 핵심경쟁요인

- 현재 도라지 가공제품은 진주 소재 (주)장생도라지를 필두로 도라지환, 도라지사탕, 도라지 침출주, 도라지청, 도라지 절편, 도라지차, 도라지음료 등이 생산·판매되고 있음
- 도라지 추출물의 경우 ‘간 기능’ 개별인정원료 등록은 2013년 완료되었으나, 제품 아직 미출시 상태임
- 한편 간 기능 기능성음료의 경우 국내·외적으로 지속적인 성장세이며, 국내의 경우 대기업 위주 제품들이 치열한 구도 양상을 나타내고 있음

**(3) 목표 시장 구조**

(가) 경쟁기업 현황

○ 경쟁기업 현황

- 도라지 관련 제품의 경우 기업화 형태 경남 진주 소재 (주)장생도라지가 유일하며, 일부 경남생약협동조합과 영농조합법인에서 1차 단순가공품을 생산·판매되고 있음
- 간 기능 기능성음료의 대기업 혹은 중견기업(건강기능식품 전문제조기업) 위주의 쿠팰스 프리미엄’ (한국야구르트), ‘힘찬하루 헛개차’ (광동제약), 모닝케어 강황’ (동아제약) 등이 시장에 우위를 점하고 있음

○ 경쟁구조

- 현재 도라지 관련 제품은 1차 단순가공품이 주를 이루고 있어 본 연구가 성공적으로 수행된다면 활성도라지는 홍삼 시장과 유사한 새로운 시장이 형성될 것으로 판단되어 경쟁구조에서 우위를 점할 것으로 판단
- 기능성 음료 시장 규모는 2012년 기준 약 1조8000억원에 이르며, 연간 기준 성장률

41.5%로 음료 시장 중에서도 가장 큰 폭으로 성장하고 있는 추세로 대기업 위주의 경쟁구조이나, 국내산 토종 약용자원인 도라지를 이용한 활성도라지를 제조하고 이를 기초로 간 기능(비만-당뇨 포함) 효능이 증빙된다면 건강기능식품 시장에 새로운 간 기능 소재로서 공급이 가능하며, 가공원료(추출물 혹은 발효물)를 대기업 혹은 건강기능식품 전문제조기업에 B2B 방식으로 원료를 공급하여 경쟁구조에서 1차적인 원료 소재 시장을 확보할 것으로 판단

(나) 시장진입 장벽

○ 도라지 가공전문업체 (주)장생도라지 이외에 전문한 사항이라, 일반 가공식품(십전대보환, 발효도라지차)의 시장진입에 대한 장벽은 크게 없을 것으로 판단

○ 상기에 기술한 것처럼 기능성 음료 시장은 대기업 위주의 시장이 형성되어 있어 초기 시장진입의 장벽을 클 것으로 판단됨으로 초기에는 가공원료(추출물 혹은 발효물)를 대기업 혹은 건강기능식품 전문제조기업에 B2B 방식으로 원료를 공급 전략으로 시장진입 장벽을 해소하고, 향후 간 기능 기능성음료의 경우 숙취음료와 연계되어 있어 숙취 효능 등의 추가적인 평가를 통해 편의점(\*숙취음료의 경우 51% 정도가 편의점에서 판매)으로 시장을 진입

(4) 수익 확보 전략

(가) 주요 고객군

○ 도라지는 경남이 전국 생산량 2위로서 원료 확보에는 문제가 없을 것으로 판단되며, (주)자연애제약은 현재 전국 1,500여개의 한의원에 한약재와 공진단 제품을 납품하고 있고 경남 프로 야구단 ‘NC 다이노스’에 프로모션 하고 있어 제품의 홍보, 판매에 강점을 가지고 있음. 또한, 경상남도와 산청 한방 향노화산업의 대표 상품으로 육성하여 이와 연계된 홍보, 마케팅 및 판매 전략을 수립하여 새로운 고객군을 확보할 예정

○ 특히 십전대보환(가칭) 등의 미국 수출의 경우에는 뉴트리션컴퍼니(미국 대형유통업체)와 연계하여 미국의 인허가 획득 및 유통망을 확보할 예정

○ 활성도라지 추출물 혹은 발효물의 1차 가공원료는 콜마비엔에이치(주) 등의 건강기능식품 전문기업 혹은 대기업에 지속적인 원료 공급을 위한 기술사업화 방안을 모색할 예정



## 제7절 지리산 권역 약용작물 복합추출물의 생활습관성 질환 개선 효과 검증 [제1협동, 경상대학교 산학협력단]

### 1-1. 1차년도 연구수행 방법

#### 가. 약용작물 버섯추출물 및 복합추출물의 안전성을 세포주를 이용하여 검증

##### (1) 시약 및 기기

(가) 시약: MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromide, Solon), DMSO (dimethyl sulfoxide, Sigma), DMED medium (DMEM/High glucose, Hyclone)

(나) 기기: RTCA 기기는 xCelligence (Roche)를 사용하였고, spectrophotometer 기기는 Infinite M200 Pro (TECAN)을 사용하였다.

##### (2) 실험방법

(가) MTT assay : 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 이틀간 키운 세포를 96well plate 에 그룹 당 4well 씩 각각 5000개의 세포를 처리하여 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 48시간 동안 키웠다. 48시간 후 MTT assay 용액을 각 well마다 200ul (2mg/ml)를 처리하여 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 4시간 처리하였다. 4시간 후 각 well에 DMSO를 200ul를 처리하여 OD값을 측정하였다.

(나) RTCA : RTCA 전용 plate에 DMEM medium을 각 well 마다 50ul 씩 넣고 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 한 시간 처리한 후 그룹 당 4 well 씩 각 well당 5000개의 세포를 포함하고 있는 100 ul의 DMEM 배지를 처리하여 실온에서 30분 놓아두었다. 30분 후 plate를 xCelligence에 연결하였다. plate가 연결된 기계를 37°C CO<sub>2</sub> incubator에 넣고 48시간동안 세포의 성장의 실시간으로 측정하였고, 48시간 후 각 추출을 정해진 농도로 DMEM과 섞어 150 ul를 처리하여 72시간 동안 실시간으로 측정하였다.

#### 나. 약용작물 버섯추출물 및 복합추출물의 효능을 세포주를 이용하여 검증

##### (1) 시약 및 기기

(가) 시약 : 본 실험에 사용한 항체들은 p-ACC (Cell signaling Technology), ACC (Cell signaling Technology), p-AMPK (Cell signaling Technology), AMPK (Cell signaling Technology), GLUT 4 (Abcam) 이다. western blot 밴드는 ECL western blotting detection reagent (Amersham)을 사용하였다.

(나) 기기 : power supply (Power Pac, BioRAD), transfer 기기는 (trans-blot, BioRAD)를 사용하였고 western blot 밴드는 luminescent image analyzer (LAS 4000, FUJIFILM)을 이용하여 확인 하였다.

##### (2) 실험방법

(가) 단백질 추출 : 각 세포를 24시간 동안 37°C CO<sub>2</sub> incubator 키운 후 추출물들이 일정한 농도로 포함되어 있는 DMEM을 처리한 후 48시간 동안 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 증식시켰다. 48시간 후 세포를 깨뜨려 단백질 추출하였다.

(나) 단백질 정량 : 추출한 단백질을 1/30로 희석 시킨 뒤 96well plate에 각 그룹 당 2well 씩 각 well에 25 ul씩 넣은 후 단백질 정량 reagent 를 처리 하여 1시간 동안 37°C incubator

처리한 뒤 OD값을 측정 하였다.

(다) western blot : gel을 확인 할 sample의 크기에 따라 다르게 만들었다. p-ACC, ACC는 6% gel을 이용하였으며, p-AMPK, AMPK, GLUT 4는 10% gel을 사용 하였다. 각 sample은 3ug /ug의 농도로 만들었으며, folding 되어 있는 단백질을 linear하게 만들기 위해 5분간 끓였다. 각 단백질은 30 ug씩 loading 하였으며, sample이 유리판을 완전히 빠져나올 때 까지 running 시켰다. running 이 끝난 gel을 분리하여 15V에서 40분동안 membrane에 transfer 시켰고, transfer 끝난 membrane을 풍슈를 처리하여 transfer된 band를 확인 한 후 15분씩 2번 TBS-t로 washing 하였다. washing이 완료된 membrane을 5% skim milk를 처리하여 실온에서 2시간 처리하였고, 2시간 후 5% BSA용액에 1차 항체를 1:1000 의 비율로 섞은 용액을 처리한 뒤 4℃ 냉장고에서 overnight 시켰다. overnight시킨 membrane을 15분씩 3번 TBS-t로 washing 하였다. washing이 끝난 membrane을 2차 항체를 1:5000의 비율로 섞은 용액을 넣고 실온에서 1시간 처리한 후 15분씩 4번 TBS-t로 washing 하였다. washing이 끝난 membrane을 ECL western blotting detection reagent에서 1분간 처리후 LAS 4000이용하여 band를 확인 하였다.

## 1-2. 1차년도 연구결과

### 가. 약용작물 버섯추출물 및 복합추출물의 안전성을 세포주를 이용하여 검증

#### (1) 약용작물 버섯추출물의 안전성 검증

(가) 영지버섯 추출물 독성시험 : 영지버섯 에탄올 추출물을 농도별로 3T3 cell과 HepG2 cell에 처리하여 MTT assay를 실시하여 세포독성을 나타내는 농도를 확인하였다(Fig. 1). MTT assay 결과 두 세포 주 모두 영지버섯 추출물을 0.1 mg/ml 이상의 농도로 처리한 그룹들에서 대조군에 비해 유의미한 값의 차이로 세포사멸이 나타남을 확인하였다. 영지버섯 추출물의 MTT assay 결과를 바탕으로 실시간 세포의 성장을 파악할 수 있는 Real Time Cell Analyzer (RTCA)를 사용하여 추출물의 세포독성 여부를 재확인 하였다(Fig. 2). RTCA 전용 plate에 각 well 당 5000개의 세포를 증식 시키면서 버섯 추출물을 각각 0.01, 0.05, 0.5 mg/ml 의 농도로 처리하여 지속적으로 세포 성장 여부를 모니터링 한 결과 0.01 과 0.05 mg/ml 농도에서 대조군과 비교하였을 때, 세포 성장에 영향을 미치지 않음을 확인 했으며, MTT assay 에서 30% 남짓 세포가 사멸된 것으로 나타난 0.5 mg/ml의 농도에서는 세포가 추출물 처리 후에 더 이상 성장하지 못하고 죽는 것으로 확인 되었다. 이는 일반적인 MTT assay에서 나타나는 세포독성 보다 더욱 민감하게 추출물의 세포독성을 RTCA를 통해서 확인 할 수 있음을 보여주는 자료이며, 이를 바탕으로 이후의 세포 실험과 동물 실험의 추출물 투여량을 결정할 수 있을 것으로 판단 하였다.

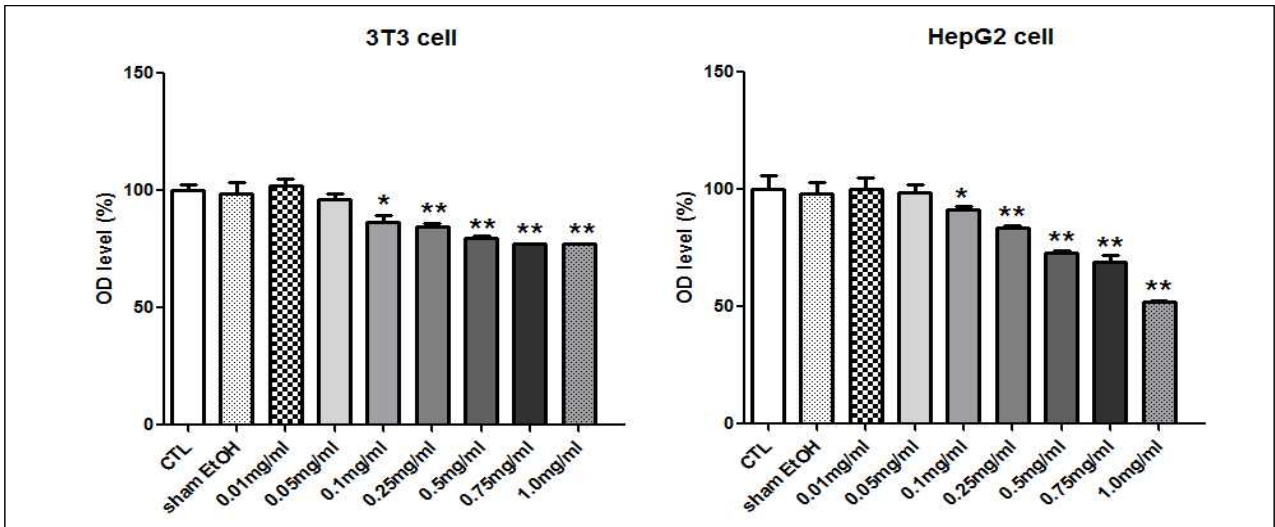


Fig. 1. MTT assay of 3T3 cell and HepG2 cell

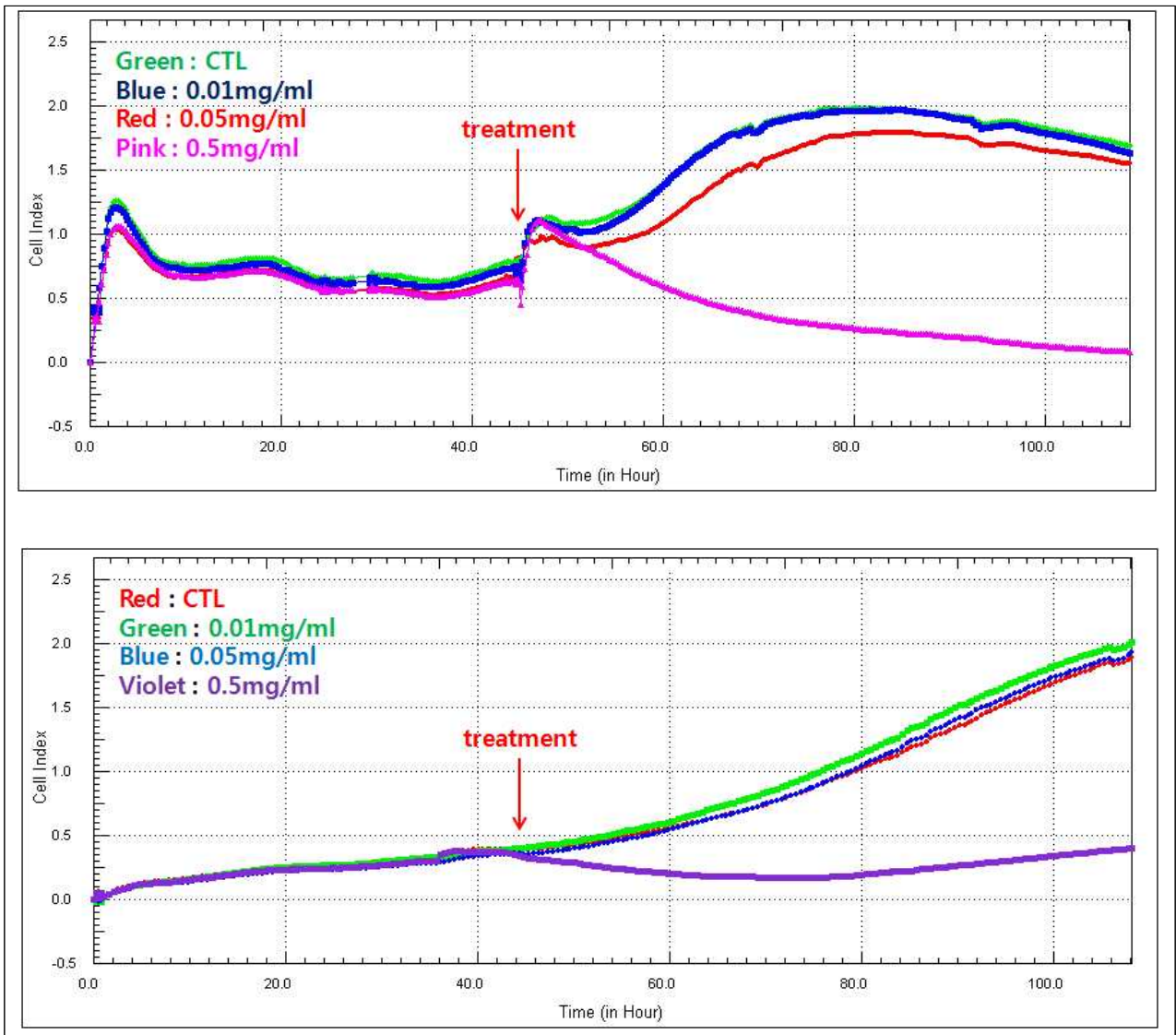


Fig. 2. RTCA of 3T3 cell and HepG2 cell

**(2) 약용작물 복합추출물 (자소엽, 당귀, 도라지 및 백수오) 복합추출물의 안정성 검정**

(가) 복합추출물 독성시험 : 복합추출물을 농도별로 3T3 cell 과 HepG2 cell에 처리하여 MTT assay를 실시하여 세포 독성을 나타내는 농도를 확인하였다(Fig. 3). MTT assay 결과 두 세포주 모두 복합추출물 0.25mg/ml 이상의 농도로 처리한 그룹들에서 대조군에 비해 유의미한 값의 차이로 세포 사멸이 나타남을 확인 하였다. 복합추출물의 MTT assay 결과를 바탕으로 실시간 세포의 성장을 파악할 수 있는 Real Time Cell Analyzer (RTCA)를 사용하여 추출물의 세포독성 여부를 재확인 하였다(Fig. 4). RTCA 전용 plate에 각 well 당 5000개의 세포를 증식 시키면서 복합 추출물을 각각 0.1, 0.25, 0.5 mg/ml의 농도로 처리하여 지속적으로 세포 성장 여부를 모니터링 한 결과 0.5mg/ml의 농도에서만 세포 독성이 나타남을 확인 하였다. 따라서 복합추출물의 세포 실험과 동물실험을 위한 용량을 0.1과 0.25 mg/ml로 정하였다.

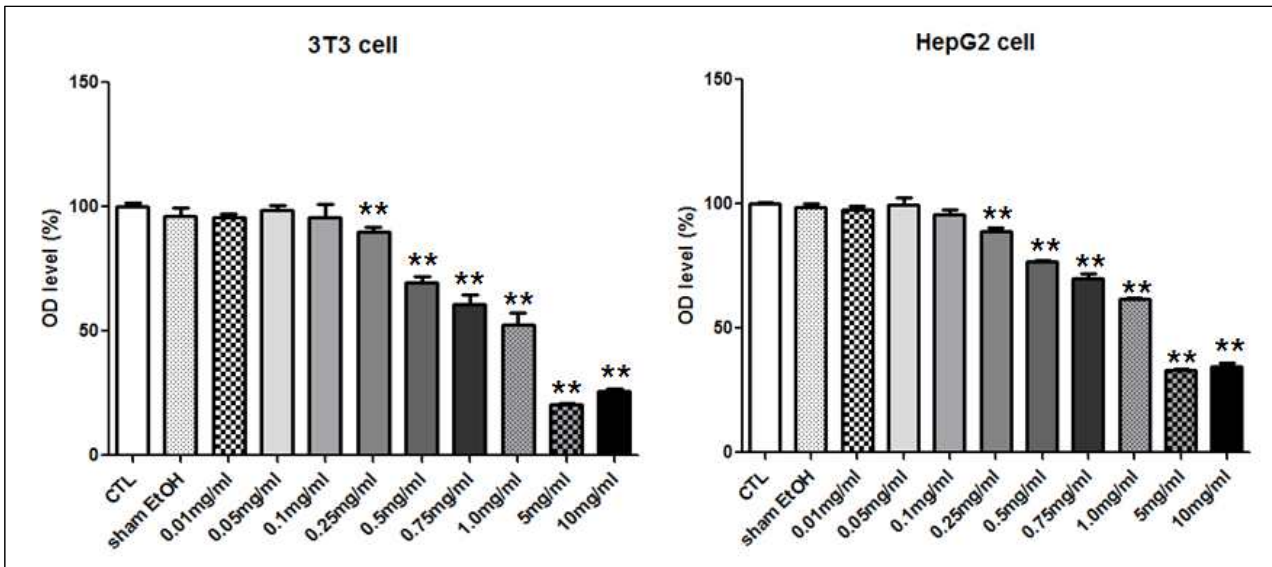


Fig. 3. MTT assay of 3T3 cell and HepG2 cell

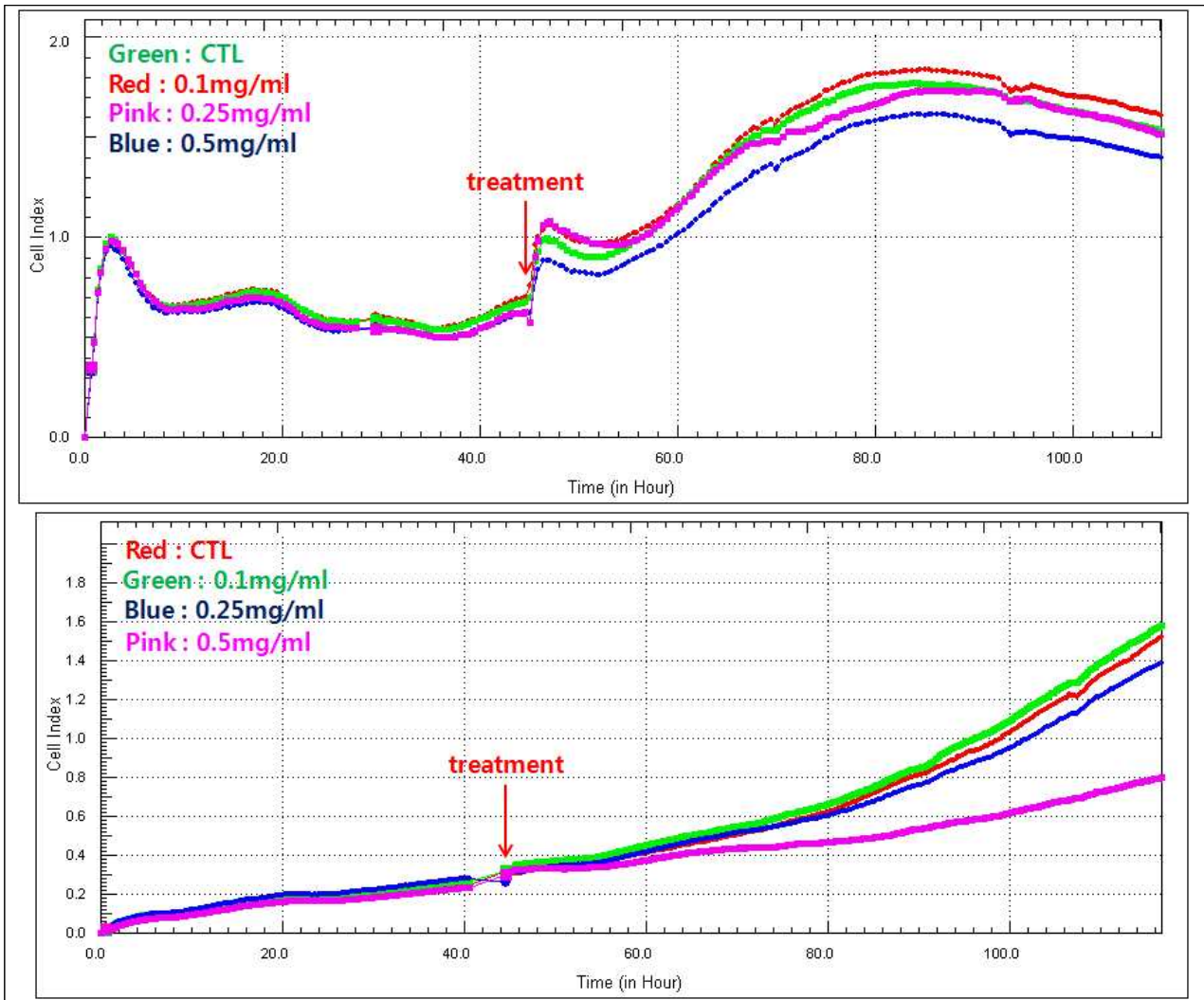


Fig. 4. RTCA of 3T3 cell and HepG2 cell

#### 나. 약용작물 버섯추출물 및 복합추출물의 효능을 세포주를 이용하여 검정

##### (1) 약용작물 버섯추출물의 효능 검정

(가) 3T3 cell : MTT assay와 RTCA의 결과를 바탕으로 세포독성을 나타내지 않았던 농도인 0.01mg/ml, 0.05mg/ml 을 3T3 cell 에 처리하고 48시간 후, p-AMPK (phospho-AMP-activated protein kinase), GLUT 4 (Glucose transporter type 4)와 p-ACC (phospho-Acetyl-CoA carboxylase)의 변화를 western blot으로 확인하였다(Fig. 5). 그 결과 0.05 mg/ml의 농도에서 p-AMPK, p-ACC, GLUT4 의 활성이 증가한 것을 확인 할 수 있었다. 이는 영지버섯 추출물이 에너지를 증가시켰다는 것을 보여주는 결과이다. 영지버섯 추출물이 에너지를 증가시켜 지방합성을 억제시키는 효과가 있음을 보여주는 결과이다.



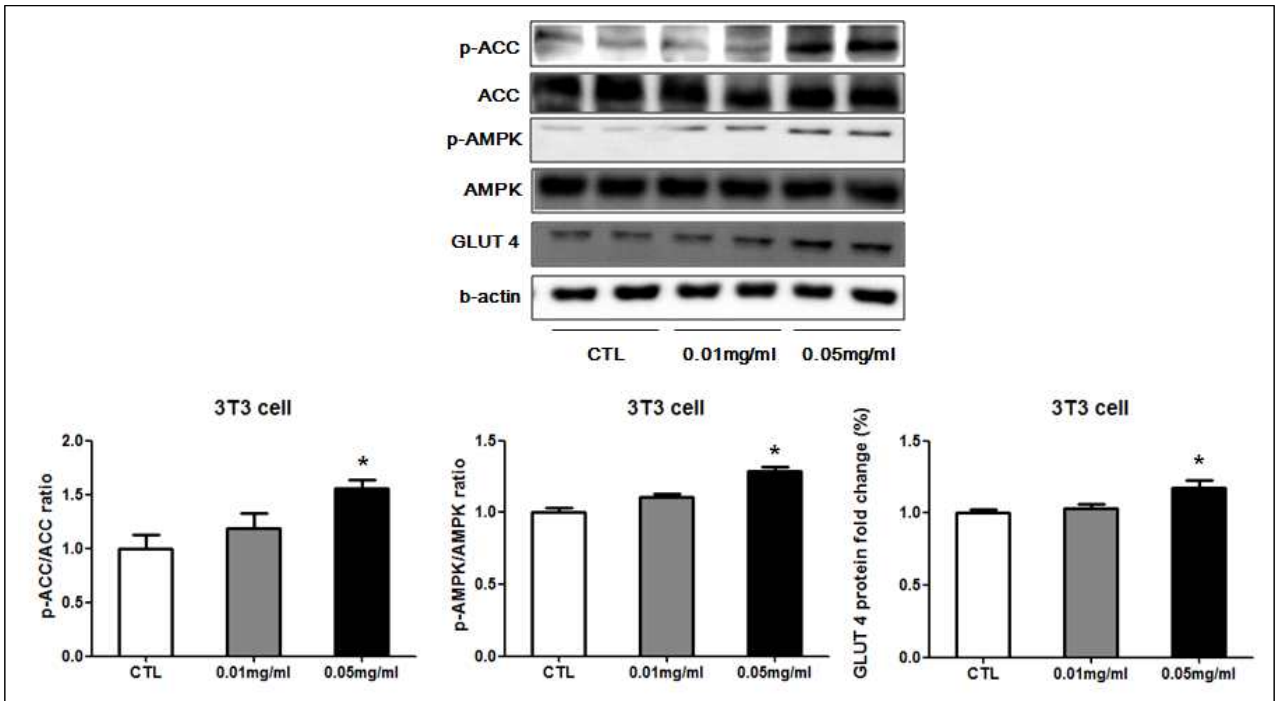


Fig. 5. western blot of 3T3 cell

(나) HepG2 cell : MTT assay와 RTCA의 결과를 바탕으로 세포독성을 나타내지 않았던 농도인 0.01mg/ml, 0.05mg/ml 을 3T3 cell 에 처리하고 48시간 후, p-AMPK (phospho-AMP-activated protein kinase), GLUT 4 (Glucose transporter type 4)와 p-ACC (phospho-Acetyl-CoA carboxylase)의 변화를 western blot으로 확인하였다(Fig. 6). 그 결과 0.05 mg/ml의 농도에서 p-AMPK, p-ACC, GLUT4 의 활성이 증가한 것을 확인 할 수 있었다. 이는 영지버섯 추출물이 에너지 대사를 증가시켰다는 것을 보여주는 결과이다. 영지버섯 추출물이 에너지 대사를 증가시켜 지방 합성을 억제시키는 효과가 있음을 보여주는 결과이다.

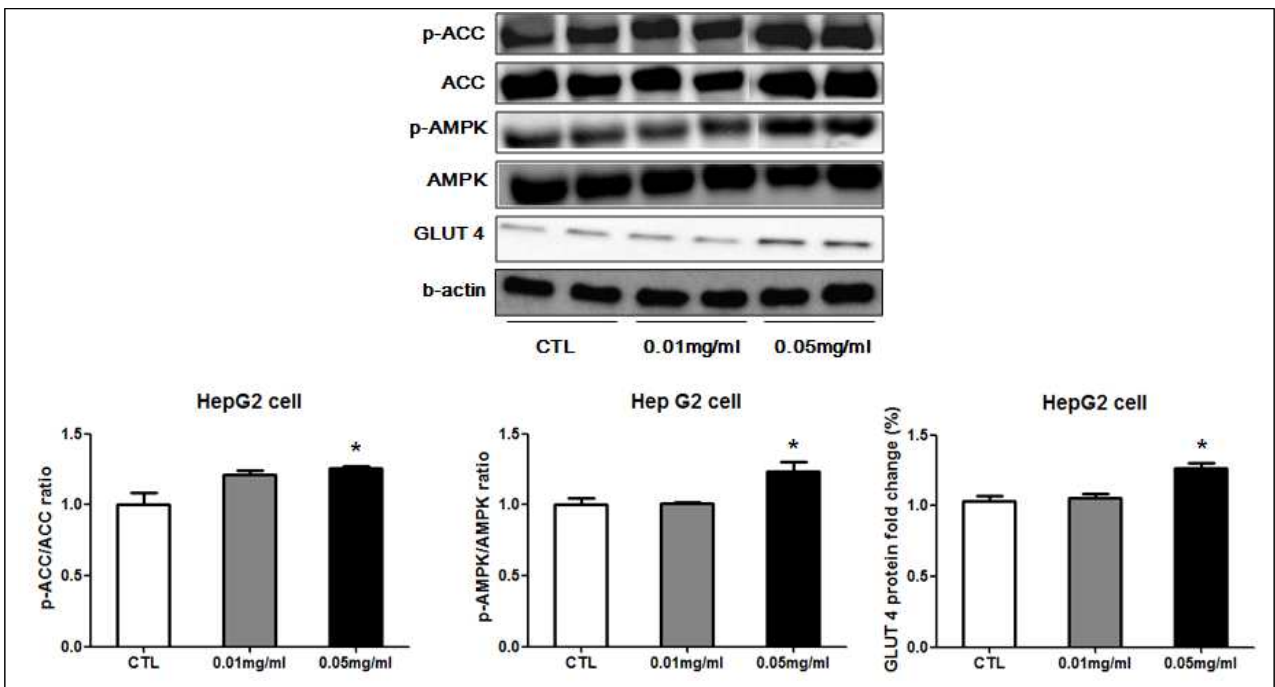


Fig. 6. western blot of HepG2 cell

(1) 약용작물 복합추출물 (자소엽, 당귀, 도라지 및 백수오)의 효능 검증

(가) 3T3 cell : MTT assay와 RTCA의 결과를 바탕으로 세포독성을 나타내지 않았던 농도인 0.1mg/ml, 0.25mg/ml 을 3T3 cell 에 처리하고 48시간 후, p-AMPK (phospho-AMP-activated protein kinase), GLUT 4 (Glucose transporter type 4)와 p-ACC (phospho-Acetyl-CoA carboxylase) 의 변화를 western blot으로 확인하였다(Fig. 7). 그 결과 0.1 mg/ml, 0.25 mg/ml의 두 농도 모두에서 p-ACC 의 활성이 증가한 것을 확인 할 수 있었으며, p-AMPK, GLUT 4의 활성은 0.25 mg/ml 농도에서 증가한 것을 확인 할 수 있었다. 이는 복합추출물 또한 에너지 대사를 증가시켜 지방합성을 억제시키는 효과가 있음을 보여주는 결과이다.

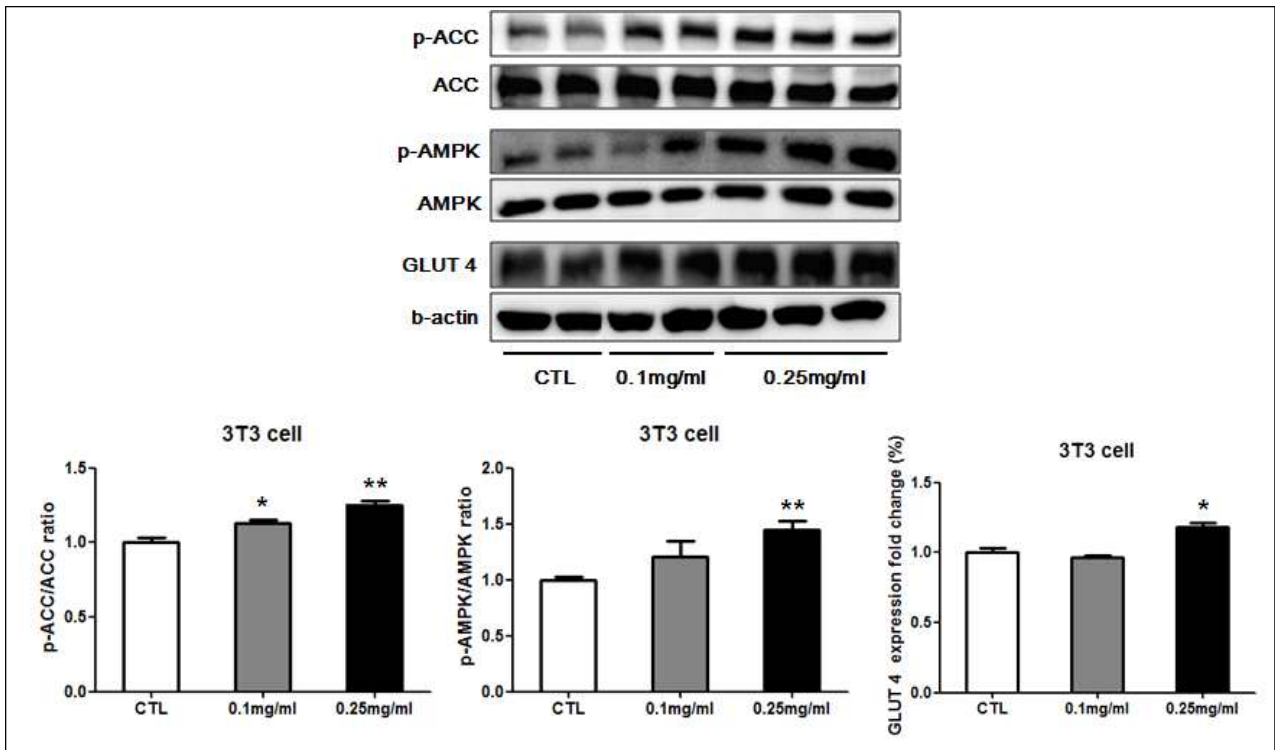


Fig. 7. western blot of 3T3 cell

(나) HepG2 cell : MTT assay와 RTCA의 결과를 바탕으로 세포독성을 나타내지 않았던 농도인 0.1mg/ml, 0.25mg/ml 을 HepG2 cell 에 처리하고 48시간 후, p-AMPK (phospho-AMP-activated protein kinase), GLUT 4 (Glucose transporter type 4)와 p-ACC (phospho-Acetyl-CoA carboxylase)의 변화를 western blot으로 확인하였다(Fig. 8). 그 결과 0.25 mg/ml의 농도에서 p-ACC, p-AMPK, GLUT4 의 활성이 증가한 것을 확인 할 수 있었다. 이는 복합추출물 또한 에너지 대사를 증가시켜 지방합성을 억제시키는 효과가 있음을 보여주는 결과이다.

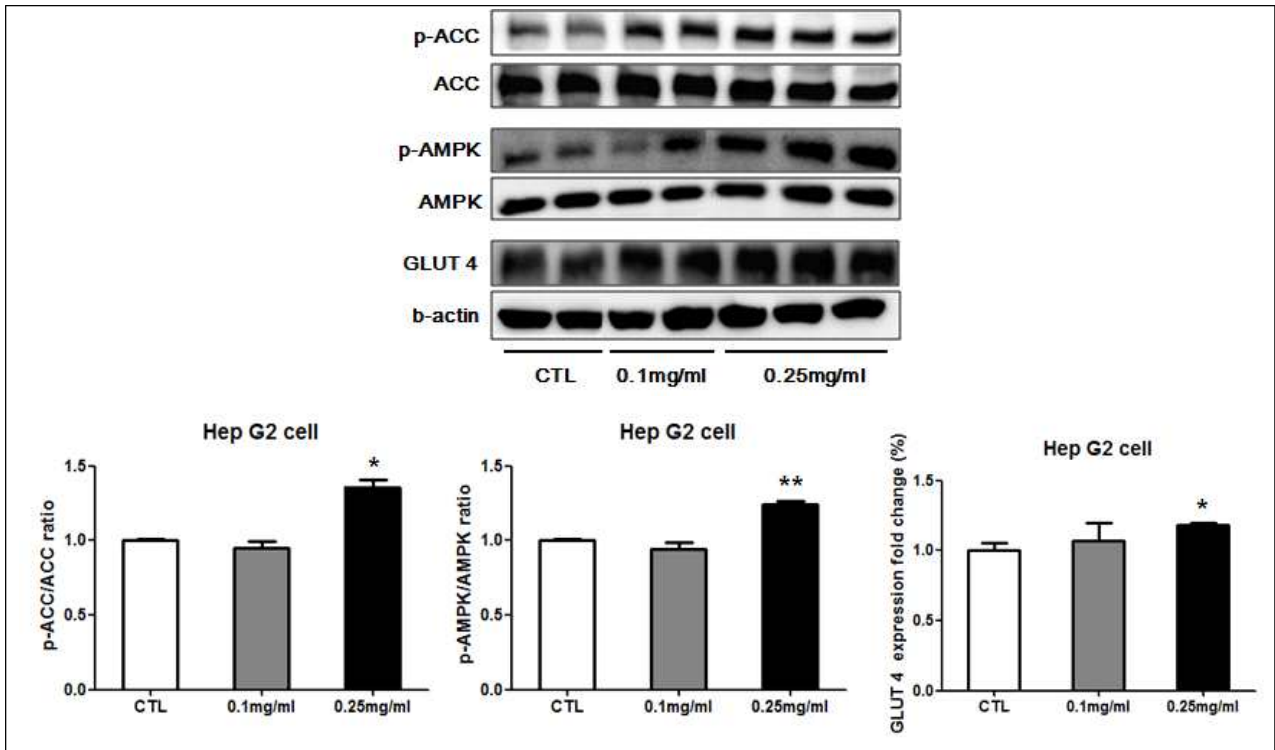


Fig. 8. western blot of HepG2 cell

## 2-1. 2차년도 연구수행 방법

가. 지방간 동물모델에서 약용버섯 추출물의 지방간 개선효과 평가 및 기전 연구  
(동물윤리위원회 승인번호 : GNU-141119-M0055)

(1) 약용버섯 추출물 투여가 지방간 개선에 미치는 영향을 조직학적으로 분석

(가) 동물 사육 : 생쥐는 C57BL/6 3주령을 사용하였으며, 먹이는 45% 고지방식 먹이를 사용하였다.

(나) 식이법 : C57BL/6 3주령 생쥐를 1주일의 적응 기간을 가진 후 실험을 진행하였다. 1주일의 적응 기간이 끝나기 하루 전 오후에 모든 그룹의 먹이공급을 중단하고 다음 날부터 먹이를 공급하였다. 버섯추출물(extract of *Ganoderma lucidum*, GL)은 0.05mg/g의 용량으로 1주일에 5일간 투여 하면서 체중 변화와 먹이 섭취량의 변화를 측정하였다. 정상식이(Normal diet, ND)와 고지방식이(High Fat diet, HFD)를 공급하였으며, 각 그룹의 마리 수는 ND(n=10), ND+GL(n=11), HFD(n=10), HFD+GL(n=11)이다.

(다) 조직 : IPGTT와 IPITT 측정이 끝난 후 15주차에 모든 그룹을 희생시켜 각 그룹의 간 조직과 Perirenal, Epididymal 지방을 적출하여 무게를 측정하였고, 간 조직은 단백질 분석과 조직학적 분석을 위해 -80℃에 보관하였다.

(라) 대사/지질지표 분석 : IPGTT와 IPITT 측정이 끝난 후 15주차에 모든 그룹을 희생시켜 심장으로부터 혈액을 추출하고 혈청을 분리하여 녹십자에 의뢰하여 대사지표(AST, ALT, ALP), 지질지표(HDL, LDL, TG, TC)를 측정하였다.

(마) 조직학적 분석 : 각 그룹의 간 조직을 적출하여 paraffin block과 frozen section을 만들

어 각각 H&E염색과 Oil Red O 염색을 하였다. 먼저 생쥐들을 4% NBP를 이용하여 perfusion하였다. 간 전체를 척출하여 4% NBP에 1시간동안 고정하고, 1시간 후 새로운 4% NBP에 5시간동안 후 고정 하였다. 후 고정 후 paraffin block을 만들기 위해 간 조직 일부를 떼어내어 흐르는 물에 24시간동안 놓아두었다. 후 고정 후 일부를 떼어내고 남은 간 조직의 frozen block을 제조하기 위해 1X PBS로 10분씩 6번 washing 한 후 20% sucrose에 넣어 4°C에서 조직이 가라앉을 때 까지 놓아두었다. 조직이 완전히 가라앉은 후 꺼내어 간 조직 일부를 떼어내어 O.C.T compound(Sakura Finetek, CA, USA)에 심어 동결시킨 뒤 10um 씩 frozen section하였다. section한 조직은 슬라이드에 붙여 -80°C에 보관 하였다. 간조직을 흐르는 물에 24시간동안 놓아 둔 후 꺼내어 표본가공기(Shandon Histocentre 3, Leica Biosystems Nussloch GMBH, Germany)로 표본을 제작한 후 paraffin block을 제조하였다. H&E염색은 paraffin block을 5um 씩 section하여 슬라이드에 붙여 말린 뒤 deparaffin 과정을 거친 후 흐르는 물에 10분 동안 놓아 둔 후 Hematoxylin(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)에 10분간 염색시킨 후 D.W에 잠깐 수세한다. 수세 후 0.3% acid alcohol로 3초간 분별한 뒤 흐르는 물에 5분 동안 놓아둔다. 5분 후 Eosin(Sigma-Aldrich)에 2분간 놓아둔 후 흐르는 물에 3분간 놓아둔다. 3분 후 탈수 과정을 거친 후 mounting 하여 현미경으로 관찰하였다. Oil Red O 염색은 -80°C에 보관된 조직절편을 꺼내어 실온에서 완전히 말린다. 완전히 마른 조직절편을 흐르는 물에 10분간 washing 한 후 완전히 마를 때 까지 실온에 놓아둔다. 절편이 완전히 마르면 100% propylene glycol(Sigma-Aldrich)를 점적하여 완전 탈수 시킨다. 조직절편 슬라이드를 55°C에 pre-warm 시킨 60% Oil Red O(Sigma-Aldrich) 염색약에 넣어 1시간 동안 55°C에서 염색시킨다. 염색이 끝난 조직절편 슬라이드를 85% propylene glycol을 점적하여 분별하고 D.W에 조직 절편 슬라이드를 넣어 propylene glycol을 세척하고 Hematoxylin에 5분간 염색한다. 5분 후 D.W 잠깐 수세한 후 0.3% acid alcohol로 3초간 분별한 뒤 흐르는 물에 5분간 washing한다. Washing 후 aqueous mounting 용액으로 mounting 하고 현미경으로 관찰한다.

## (2) 간 조직에서 지방 대사에 관련된 단백질들의 발현양상 분석

(가) 시약 : 본 실험에 사용한 항체들은 p-ACC, ACC, p-AMPK, AMPK(Cell signaling Technology, USA), GLUT4(Abcam, USA)이다. western blot 분석은 ECL western blotting detection reagent(Amersham, USA)을 사용하였다.

(나) 기기 : power supply(Power Pac, BioRAD), trans-blot(BioRAD, USA)를 사용하였고 western blot 밴드는 luminescent image analyzer(LAS4000, FUJIFILM)을 이용하여 확인하였다.

(다) 단백질 추출 : 각 그룹 당 3마리를 제외한 모든 생쥐의 간을 척출하여 일부를 떼어 1.5ml tube에 넣어 액체질소에 넣어 동결시킨 후 단백질 lysis reagent(Tissue protein extraction reagent, Thermo, USA)을 이용하여 단백질을 추출하였다.

(라) 단백질 정량 : 추출한 단백질을 1/30로 희석 시킨 뒤 96 well plate에 각 그룹 당 2 well씩 각 well에 25 ul씩 넣은 후 단백질 정량 reagent를 처리하여 1시간 동안 37°C incubator 처리한 뒤 OD값을 측정하였다.

(마) Western blot : gel을 확인 할 sample의 크기에 따라 다르게 만들었다. p-ACC, ACC는 6% gel을 이용하였으며, p-AMPK, AMPK, GLUT 4는 10% gel을 사용 하였다. 각 sample은 3ug/ug의 농도로 만들었으며, folding 되어 있는 단백질을 linear하게 만들기 위해 5분간 끓였다. 각 단백질은 30 ug씩 loading 하였으며, sample dye가 유리판을 완전히 빠져나올 때 까지 전기영동으로 단백질을 분리하였다. Gel을 분리하여 15V에서 40분 동안 PVDF membrane에

transfer시켰고, transfer 끝난 membrane을 풍슈를 처리하여 transfer된 band를 확인 한 후 15분씩 2번 TBS-T로 washing 하였다. washing이 완료된 membrane을 5% skim milk를 처리하여 실온에서 2시간 처리하였고, 2시간 후 5% BSA용액에 1차 항체를 1:1000의 비율로 섞은 용액을 처리한 뒤 4°C 냉장고에서 overnight 시켰다. overnight시킨 membrane을 15분씩 3번 TBS-T로 washing 하였다. washing이 끝난 membrane을 2차 항체를 1:5000의 비율로 섞은 용액을 넣고 실온에서 1시간 처리 한 후 15분씩 4번 TBS-t로 washing 하였다. washing이 끝난 membrane을 ECL western blotting detection reagent에서 1분간 처리 후 LAS 4000이용하여 band를 확인하였다.

### (3) 약용버섯 추출물 투여가 고혈당증 개선에 미치는 영향 평가

(가) 동물 사육 : C57BL/6 3주령 생쥐를 사용하였으며, 먹이는 45% 고지방식이를 사용하였다.

(나) 식이법 : C57BL/6 3주령 생쥐를 1주일의 적응 기간을 가진 후 실험을 진행하였다. 1주일의 적응 기간이 끝나기 하루 전 오후에 모든 그룹의 먹이공급을 중단하고 다음 날부터 먹이를 공급하였다. 각 그룹의 마리 수는 ND (n=10), ND+버섯추출물(n=11), HFD(n=10), HFD+버섯추출물(n=11)이다. 버섯추출물(extract of *Ganoderma lucidum*, GL)은 0.05mg/g의 용량으로 1주일에 5일간 투여 하면서 체중 변화와 먹이 섭취량의 변화를 측정하였다.

(다) 혈당측정: 식이 4주차부터 2주마다 각 그룹의 공복 혈당을 16시간 절식 상태에서 꼬리의 정맥혈에서 혈액을 추출하여 혈당변화를 측정하였다.

(라) 내당능/인슐린 민감도 측정 : 12주간의 식이가 끝난 후 13주차에 내당능검사(IPGTT)와 14주차에 인슐린 민감도(IPITT)를 측정하였다. 내당능 검사는 16시간 절식 시킨 후 20% D-glucose (2g/kg; Sigma-Aldrich)를 IP 후 30분, 60분, 90분, 120분 후 마다 꼬리의 정맥혈에서 혈액을 추출하여 혈당 변화를 측정하였고, 인슐린 민감도는 insulin (1Unit/kg; Humulin-R, Eli Lilly and company, IN)을 IP 후 30분, 60분, 90분, 120분 후 마다 꼬리의 정맥혈에서 혈액을 추출하여 혈당 변화를 측정하였다.

## 나. 지방간 동물모델에서 약용작물 복합추출물의 지방간 개선효과 평가 및 기전 연구

(동물윤리위원회 승인번호 : GNU-141119-M0055)

### (1) 약용작물 복합추출물 투여가 지방간 개선에 미치는 영향을 조직학적으로 분석

(가) 약용버섯 추출물과 동일한 방법으로 진행하였다.

### (2) 간 조직에서 지방 대사에 관련된 단백질들의 발현양상 분석

(가) 약용버섯 추출물과 동일한 방법으로 진행하였다.

### (3) 약용작물 복합추출물 투여가 고혈당증 개선에 미치는 영향 평가

(가) 약용버섯 추출물과 동일한 방법으로 진행하였다.

## 2-2. 2차년도 연구결과

### 가. 지방간 동물모델에서 약용버섯 추출물의 지방간 개선효과 평가 및 기전 연구

#### (1) 약용버섯 추출물 투여가 지방간 개선에 미치는 영향을 조직학적으로 분석

(가) 동물실험 : 약용버섯 추출물의 지방간 개선효과를 검증하기 위해, 정상 생쥐에 정상식이와 고지방식이를 공급한 그룹으로 나누어 식이하고, 세포실험에서 세포독성이 없고 지방대사

와 당대사를 증가시키는 농도를 생체적용용량으로 환산하였다. 각각 ND 그룹과 HFD 그룹에 0.05 mg/g의 용량으로 일주일에 5일간 투여하면서 체중 변화와 먹이 섭취량의 변화를 체크하였다. HFD의 특성으로 실험 직전에 쥐에 Fasting 기간을 두어도 실험 초기에는 먹이 섭취량이 적어 몸무게 차이가 나타나지 않지만, 시간에 따라 점차적으로 HFD에 의해 체중이 서서히 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 9).

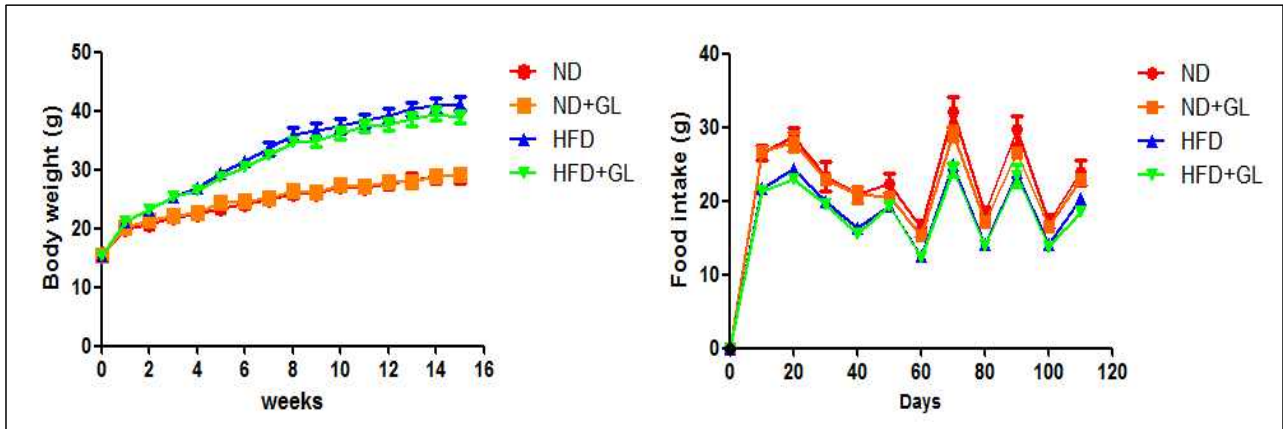


Fig. 9. The change of body weight and food intake.

(나) 대사/지질지표 분석 : IPGTT와 IPITT 측정이 끝난 후(IPGTT, IPITT에 대한 결과 및 고찰은 “(3)” 에 서술) 추출물 투여가 지방간 개선에 미치는 영향을 분석하기 위해 15주차에 모든 그룹을 희생시켜 심장에서부터 혈액을 추출하여 혈청을 분리 한 후 녹십자에 대사지표 (AST, ALT, ALP), 지질지표(HDL, LDL, TG, TC) 측정을 의뢰하였다. 먼저, 간은 단백질 합성, 포도당 및 기타 탄수화물 대사, 핵산 대사, 지질 대사, 약물 대사 등을 담당하는 중요한 장기이다. 하지만 다양한 질환들에 의해 손상 될 수 있고, 이러한 질환을 진단하기 위해 생화학적 검사를 진행하였다. 그 결과 AST(aspartate aminotransferase)수치는 모든 그룹에서 차이가 없는 것으로 나타났고, ALP(alkaline phosphatase)는 HFD만을 준 그룹에서만 유의미하게 감소한 것으로 나타났고, ALT(alanine aminotransferase)는 HFD만 준 그룹에서 유의미하게 증가한 것으로 나타났다. 하지만 HFD와 약용버섯 추출물을 동시에 준 그룹에서 유의미하게 감소하여 모든 ND그룹의 ALT수치와 차이가 없는 것을 확인 할 수 있었다. ALP의 수치 증가는 간과 담도계 이상으로 발생하는 경우와 그 외에도 뼈에서도 분비되므로 골질환을 가지고 있는 경우(주로 골 합성보다는 골분해시 분비된다)에도 상승할 수 있고, 근육대사가 많을 때도 상승할 수 있다. 이런 다양한 이유로 변화하기 때문에 해석에 유의해야 한다고 알려져 있다. 그러므로 ALP 수치의 변화만으로는 간 기능 저하와 밀접하다고 말할 수 없다. AST와 ALT는 간세포 내에 존재하는 효소들로 주로 간세포가 손상을 받는 경우에 혈중으로 방출되어 혈중 수치가 증가하게 된다. 급성 간세포 손상 초기에는 간세포 내 농도가 높은 AST가 ALT보다 더 많이 증가하지만 24~48시간 뒤에는 반감기가 더 긴 ALT가 더 높아진다고 알려져 있고, 알코올성 간질환에서는 AST가 더 증가한다고 알려져 있다. 만성 간세포 손상에서는 ALT가 더 높은 경우가 흔하다. 우리는 비알콜성 비만동물모델을 이용하여 실험을 진행하였으므로 모든 그룹에서 AST의 수치에 차이가 없었다. 하지만 ALT는 간세포 손상으로 수치가 증가하기 때문에 HFD를 준 그룹에서 유의미하게 ALT의 수치 증가는 HFD가 간세포 손상을 일으켰다는 것을 말해주는 결과이다. HFD와 약용버섯 추출물을 동시에 준 그룹에서 ALT의 수치가 유의미하게 낮게 나타나는 것을 보아 약용버섯 추출물이 간세포 손상을 예방했다는 것을 보여 주는 결과이다(Fig. 10).

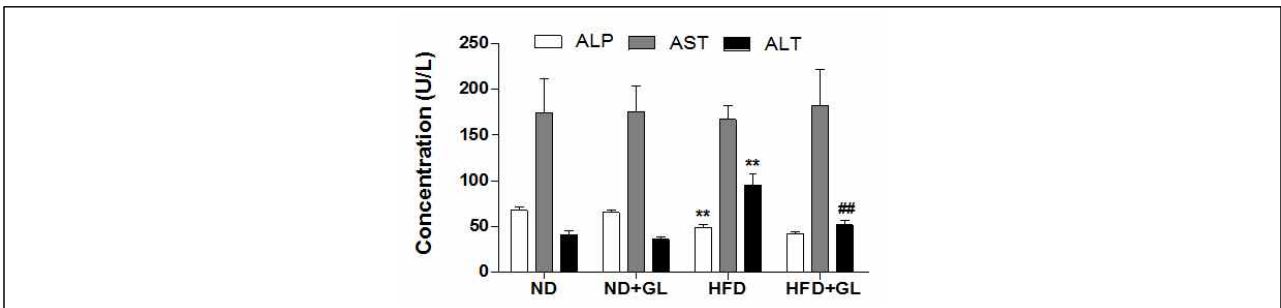


Fig. 10. GL effectively attenuated HFD induced liver injury.

(다) 혈액 내 지질지표 측정 : Total cholesterol(TC)양은 고지방식이(HFD)를 준 모든 그룹에서 정상식이(ND)를 준 모든 그룹과 비교하여 높게 나타나고 있었다(Fig. 11A). 하지만 HFD만 준 그룹과 HFD와 약용버섯 추출물을 동시에 준(HFD+GL)과 비교하였을 때, HFD+GL을 동시에 처리한 그룹에서 TC의 양이 유의미하게 감소한 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 11A). LDL은 동맥경화를 일으키는 주요 인자로서 혈관성 질환과 밀접하게 관련된다. HFD를 준 모든 그룹은 ND를 준 모든 그룹보다 LDL의 수치가 유의미하게 증가한 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 11B). 각 그룹의 LDL 수치를 비교한 결과 ND만 준 그룹과 HFD만 준 그룹보다 각 그룹에 약용버섯 추출물을 동시에 준 그룹에서 LDL이 유의미하게 감소한 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 11B). 중성지방인 triglyceride(TG)는 모든 그룹에서 차이가 없음을 확인 할 수 있었다.(Fig. 11C). HDL수치는 HFD를 준 모든 그룹에서 ND를 준 그룹과 비교하여 유의미한 증가가 나타났으며, ND만 준 그룹과 ND와 약용버섯 추출물을 동시에 준 그룹을 비교 하였을 때 HDL이 유의미하게 감소된 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 11D). LDL/HDL ratio에서 ND를 준 모든 그룹은 HFD를 준 모든 그룹보다 LDL/HDL ratio가 유의미하게 증가한 것을 확인할 수 있었으며, HFD만 준 그룹과 비교하여 HFD와 약용버섯 추출물을 동시에 준 그룹에서 LDL/HDL ratio가 유의미하게 감소된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 11E). 콜레스테롤의 높고 낮음은 모든 사람에게 똑같이 적용되는 것이 아니라 건강했던 사람에게 적용하는 기준과 이전에 질환이 있는 사람에게 적용하는 기준이 다르다. 그러므로 HFD를 준 모든 그룹은 비만이 이미 발생한 상태이고, 모든 ND그룹은 비만이 발생하지 않은 상태이다. 비만이 발생한 HFD를 준 모든 그룹에서 HFD와 약용버섯 추출물을 동시에 준 그룹에서 LDL이 유의미하게 감소한 것을 보아 약용버섯 추출물이 지방간 예방에 효과가 있음을 보여 주는 결과이다.

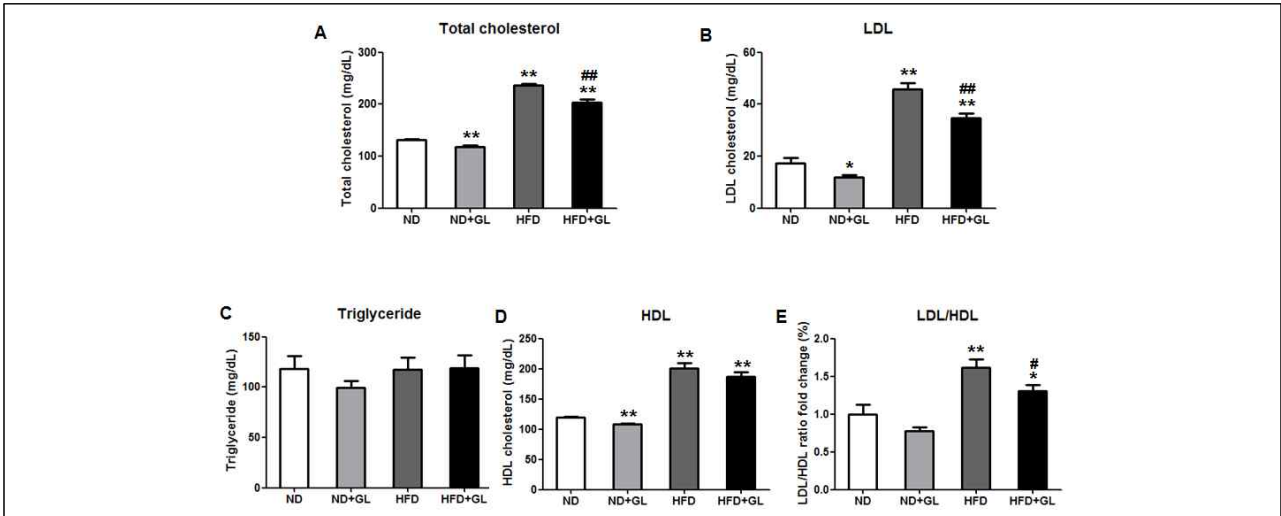


Fig. 11. Effect of GL on serum lipid profile.

(라) 조직학적 분석 : 각 그룹에서 3마리씩을 제외한 모든 생쥐의 간 조직과 Perirenal, Epididymal 지방을 척출하여 무게를 측정하였다. HFD를 준 모든 그룹에서 ND를 준 그룹보다 간 조직과 지방 무게가 유의미하게 높았으며, HFD만을 준 그룹과 HFD와 약용버섯 추출물을 동시에 준 그룹을 비교하였을 때 간조직과 각 지방조직의 지방함량이 유의미하게 감소한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 12A). 각 조직을 척출하여 크기를 비교하였을 때, 육안으로도 HFD만 준 그룹과 HFD와 약용버섯 추출물을 동시에 준 그룹을 비교하였을 때, 간 조직의 크기와 지방침착이 감소한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 12B). 몸무게 대비 간의 무게가 HFD만 준 그룹과 HFD와 약용버섯 추출물을 동시에 준 그룹에서 유의미하게 감소한 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 12C). H&E 염색은 지방이 침착되어 있는 곳은 염색을 하지 못하기 때문에 하얗게 구멍이 뚫린 것처럼 보인다. HFD만을 준 그룹과 HFD와 약용버섯 추출물 동시에 준 그룹을 비교하였을 때, HFD와 약용버섯 추출물 동시에 준 그룹에서 하얀 부분이 현저히 감소한 것을 확인할 수 있다(Fig. 12D). 그리고 Oil Red O 염색은 지방이 많이 침착되어 있을수록 더욱 붉게 나타난다. 역시 HFD만을 준 그룹과 HFD와 약용버섯 추출물 동시에 준 그룹을 비교하였을 때, HFD만을 준 그룹에서 붉은 점들이 더욱 많이 나타나는 것을 확인할 수 있다. 그러므로 약용버섯 추출물투여가 지방간을 유의미하게 감소시켰다는 것을 보여주는 결과이다.



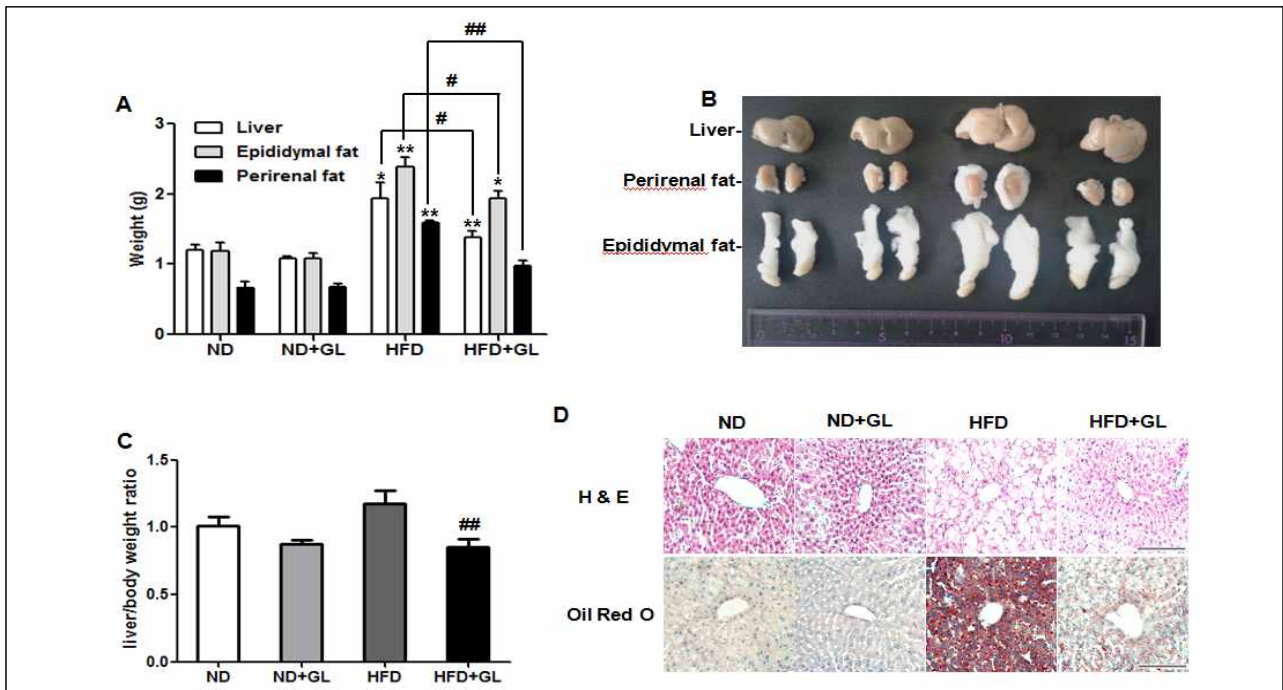


Fig. 12. GL effectively attenuated HFD induced hepatosteatosis.

(2) 간 조직에서 지방 대사에 관련된 단백질들의 발현양상 분석

(가) 에너지 대사와 관련된 단백질들인 p-AMPK(phospho-AMP-activated protein kinase), GLUT4(Glucose transporter type 4)와 p-ACC(phospho-Acetyl-CoA carboxylase) 항체를 처리하여 단백질 변화를 western blot으로 확인하였다. 그 결과 HFD만을 준 그룹에서 p-AMPK, p-ACC, GLUT4 의 단백질 발현양이 유의미 하게 감소한 것을 확인 할 수 있었다. 하지만 약용버섯 추출물을 동시에 처리한 HFD 그룹에서는 이런 감소가 나타나지 않는 것을 확인할 수 있었으며, 모든 ND그룹과 비교하여 단백질의 발현량에 차이가 없는 것을 확인 할 수 있었다. 이 결과는 약용버섯 추출물이 에너지 대사관련 단백질의 활성을 증가시켰다는 것을 보여준다. 그러므로 약용버섯 추출물이 에너지를 증가시켜 지방합성을 억제시키는 효과가 있음을 보여주는 결과이다(Fig. 13).

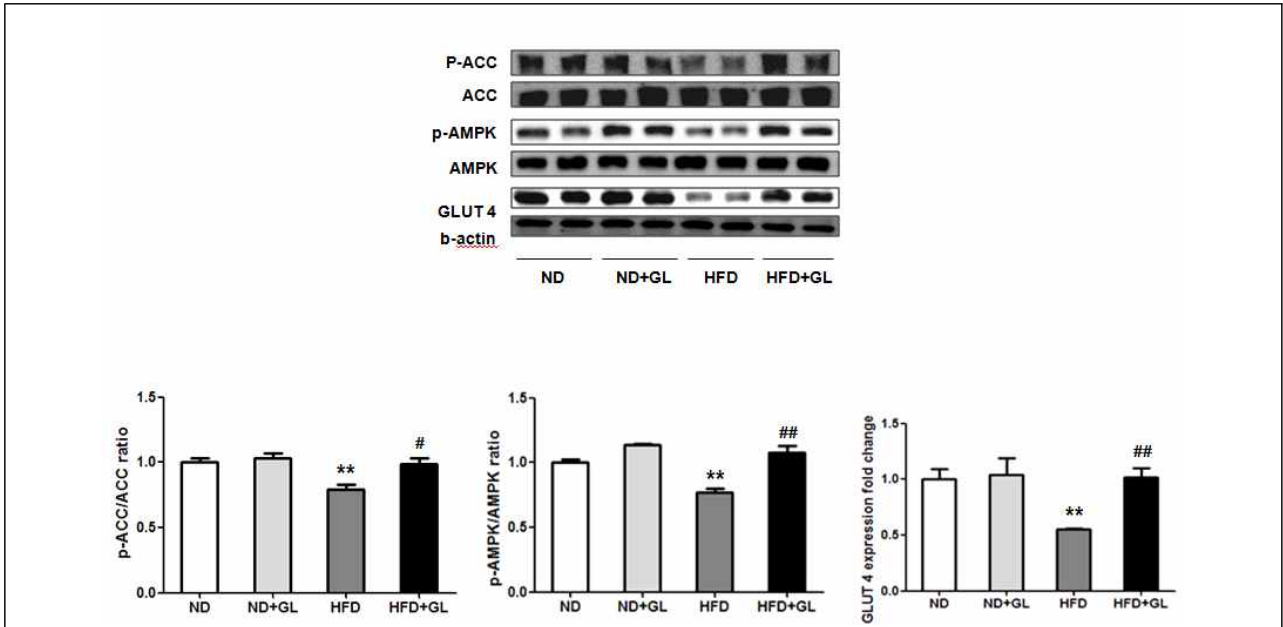


Fig. 13. Effect of GL on the phosphorylation of ACC, AMPK and expression of GLUT4 in HFD fed mice with oral administration.

### (3) 약용버섯 추출물 투여가 고혈당증 개선에 미치는 영향 평가

(가) 혈당측정 : 기존에는 4주차마다 혈당을 측정하려 하였으나 약용버섯 추출물의 고혈당증 억제 효과를 더욱 세밀히 확인하기 위해 식이 4주차부터 2주마다 혈당을 측정하는 것으로 방향을 전환하였다. 그래서 식이 4주차부터 혈당측정 부터는 2주마다 전날 오후 5시에 먹이를 모두 제거하고 16시간 동안 절식시키고 다음날 오전 9시에 꼬리의 정맥혈에서 혈액을 추출하여 혈당을 측정하였다. 그 결과 HFD만 준 그룹은 식이 8주차까지 급격하게 혈당이 증가하여 이후에 계속적으로 혈당이 높게 유지 되는 것을 알 수 있었다. 하지만 HFD와 약용버섯 추출물을 동시에 준 그룹의 혈당은 HFD만 준 그룹과 비교하여 혈당이 현저히 적게 나타나는 것을 확인 할 수 있었다. 이 수치는 정상식이를 준 그룹과 비슷한 수준이었다. 그러므로 약용버섯 추출물 투여가 고혈당증 개선효과가 있음을 보여준다(Fig. 14).

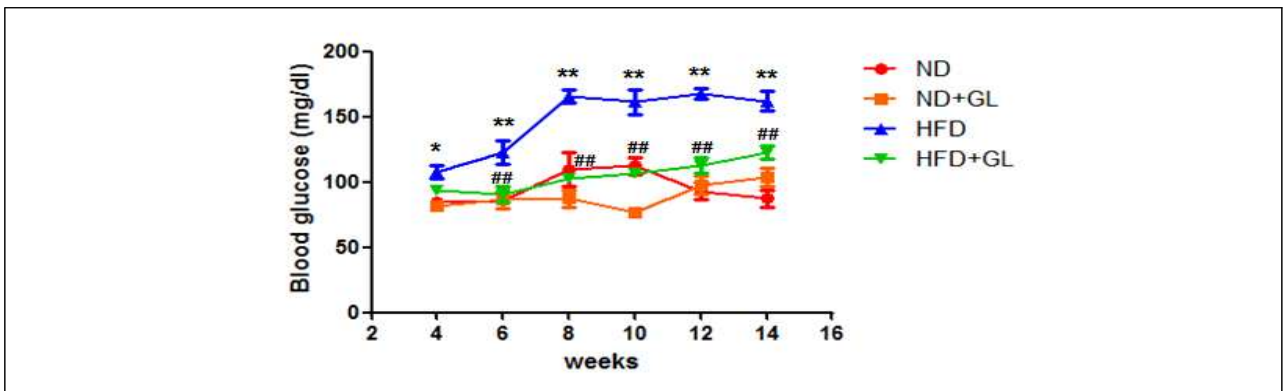


Fig. 14. Effect of GL on fasting blood glucose level.

(나) 내당능/인슐린 민감도 측정 : 12주간의 식이가 끝난 후 13주차에 내당능(IPGTT)과 14주차에 인슐린 민감도(IPITT)를 측정하였다. 먼저 IPGTT결과에서 20% D-glucose를 복강투여한 후 시간대 별로 혈당을 측정하였다. 20% D-glucose 복강투여 후 HFD만을 준 그룹에서 다른 모든 그룹보다 혈당이 급격히 증가하는 것을 확인할 수 있었고, HFD와 약용버섯 추출물을 동시에

준 그룹에서는 이런 증가 폭이 감소한 것을 확인 할 수 있었다. 혈당은 식사 후 증가하여 시간이 지남에 따라 감소하여 정상혈당으로 돌아가지만 HFD만을 준 그룹은 2시간 후에도 혈당이 정상수치보다 훨씬 높은 것을 확인 할 수 있었지만, 반면에, 약용버섯 추출물을 동시에 준 그룹에서는 모든 ND그룹과 비교하여 혈당이 유의미한 차이를 보여주지 않았다(Fig. 15A). IPITT에서도 HFD만 준 그룹은 인슐린 투여 후에도 고혈당이 유지되는 것을 확인 할 수 있었고, 반면에, 약용버섯 추출물을 동시에 준 그룹의 혈당은 모든 ND그룹의 혈당과 차이가 나타나지 않는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 15B). 그러므로 약용버섯 추출물이 고혈당증 개선에 효과가 있음을 보여주는 결과이다.

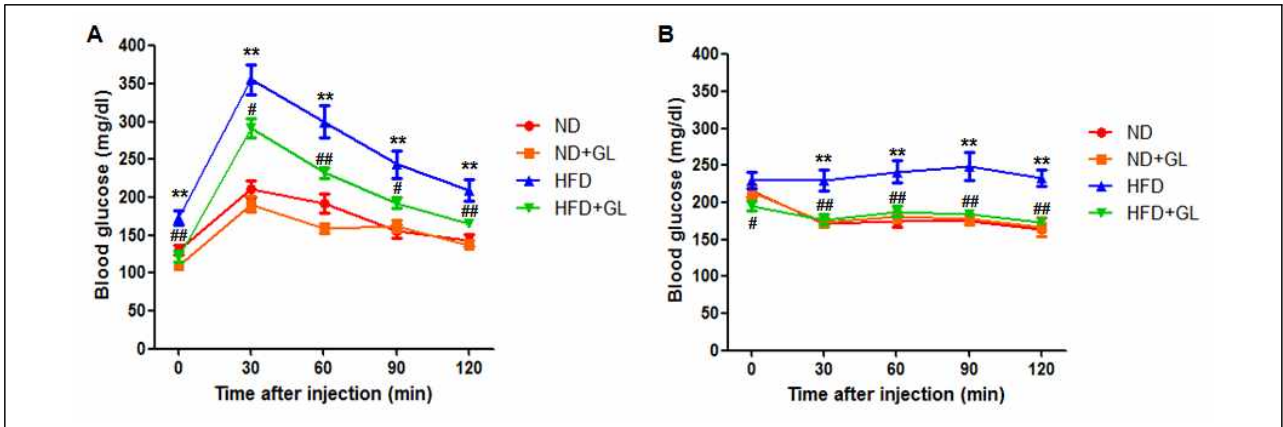


Fig. 15. Effect of GL on glucose tolerance and insulin tolerance in HFD fed mice.

### 나. 지방간 동물모델에서 약용작물 복합추출물의 지방간 개선효과 평가 및 기전 연구

#### (1) 약용작물 복합추출물 투여가 지방간 개선에 미치는 영향을 조직학적으로 분석

(가) 동물실험 : 약용버섯 추출물의 지방간 개선효과를 검증하기 위해, 정상 생쥐에 정상식이(Normal diet, ND)를 공급한 그룹과 고지방식이(High Fat diet, HFD)를 공급한 그룹으로 나누어 식이를 하면서, 세포실험에서 독성이 없으면서 지방대사와 당대사를 증가시키는 농도의 생체 적용 용량을 계산하여, 각각 ND 그룹과 HFD 그룹에 0.05 mg/g의 용량으로 일주일에 5일간 투여하면서 체중 변화와 먹이 섭취량의 변화를 체크하였다. HFD의 특성으로 실험 직전에 쥐에 Fasting 기간을 두어도 실험 초기에는 먹이 섭취량이 적어 몸무게 차이가 나타나지 않지만, 시간이 지남에 따라 점차적으로 HFD에 의한 체중 증가가 서서히 나타나고 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 복합추출물 투여군은 고지방식이 및 정상식이 투여군 모두에서 별다른 영향을 나타내지 않았다(Fig. 16).

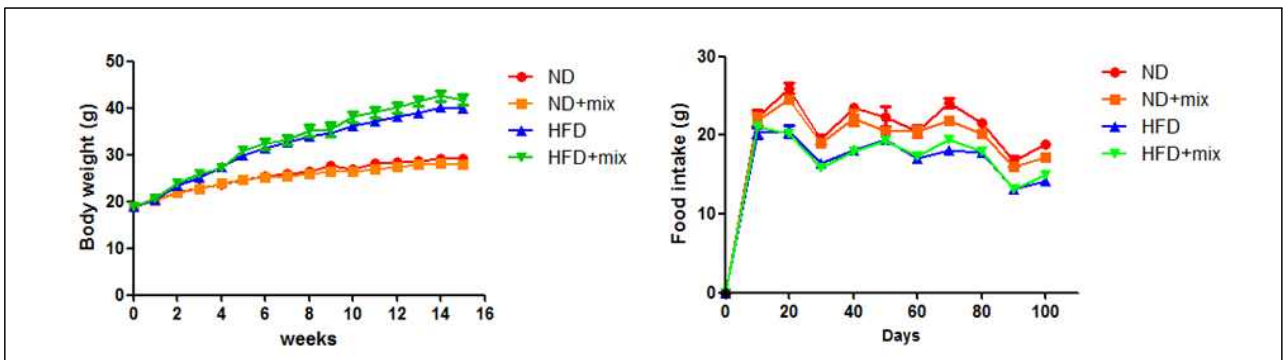


Fig. 16. The change of body weight and food intake.

(나) 대사/지질지표 분석 : IPGTT와 IPITT 측정이 끝난 후 약용작물 복합추출물 투여가 지방

간 개선에 미치는 영향을 분석하기 위해 15주차에 모든 그룹을 희생시켜 심장으로 부터 혈액을 추출하여 혈청을 분리 한 후 녹십자에 대사지표(AST, ALT, ALP), 지질지표(HDL, LDL, TG, TC) 측정을 의뢰하였다. 그 결과 AST수치는 모든 그룹에서 차이가 없는 것으로 나타났고, ALP는 HFD만을 준 그룹에서만 유의미 하게 감소한 것으로 나타났고, ALT(alanine aminotransferase)는 HFD만 준 그룹에서 유의미하게 증가한 것으로 나타났다. 하지만 HFD와 약용작물 복합추출물을 동시에 준 그룹에서 유의미하게 감소한 것을 확인 할 수 있었다. AST와 ALT는 간세포 내에 존재하는 효소들로 주로 간세포가 손상을 받는 경우에 혈중으로 방출되어 혈중 수치가 증가하게 된다. 급성 간세포 손상 초기에는 간세포 내 농도가 높은 AST가 ALT보다 더 많이 증가하지만 24-48시간 뒤에는 반감기가 더 긴 ALT가 더 높아진다고 알려져 있고, 알코올성 간 질환에서는 AST가 더 증가한다고 알려져 있다. 만성 간세포 손상에서는 ALT가 더 높은 경우가 흔하다. 우리는 비알콜성지방 동물모델을 이용하여 실험을 진행 하였으므로 모든 그룹에서 AST의 수치에 차이가 없는 것이다. 하지만 ALT는 간세포 손상으로 수치가 증가하기 때문에 HFD를 준 그룹에서 유의미하게 ALT의 수치 증가는 HFD가 간세포 손상을 일으켰다는 것을 말해주는 결과이다. HFD와 약용작물 복합추출물을 동시에 준 그룹에서 ALT의 수치가 유의미하게 낮게 나타나는 것을 보아 약용작물 복합추출물이 간세포 손상을 개선하는 효과가 일부 있음을 확인하였다(Fig. 17).

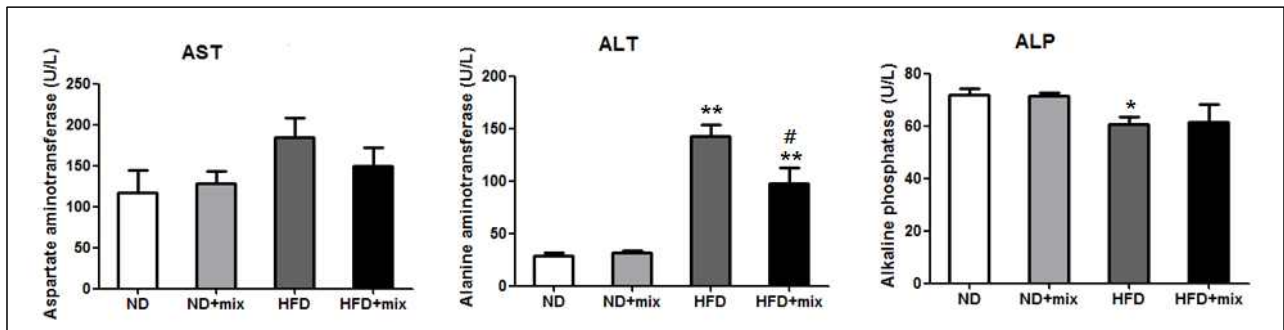


Fig. 17. Mixture effectively attenuated HFD induced liver injury.

(다) 혈액 내 대사지표 측정 : TC의 수치는 고지방 식이(HFD)를 준 모든 그룹에서 정상식이 (ND)를 준 모든 그룹과 비교하여 높게 나타나고 있었고, 이 수치는 약용작물 복합추출물을 동시에 투여하여도 TC를 감소시키지 못하였다(Fig. 18A). TG의 수치는 모든 그룹에서 차이가 없음을 확인 할 수 있었다(Fig. 18B). LDL 수치는 ND를 준 모든 그룹보다 HFD를 준 모든 그룹에서 LDL의 수치가 유의미 하게 증가한 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 18C). LDL 수치 또한 약용작물 복합추출물을 동시에 주어도 감소되지 않는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 18C). HDL수치는 HFD를 준 모든 그룹에서 ND를 준 그룹과 비교하여 유의미한 증가가 나타났다(Fig. 18D). 이 결과 약용작물 복합추출물은 지방간 개선에는 효과가 없는 것을 알 수 있었다.

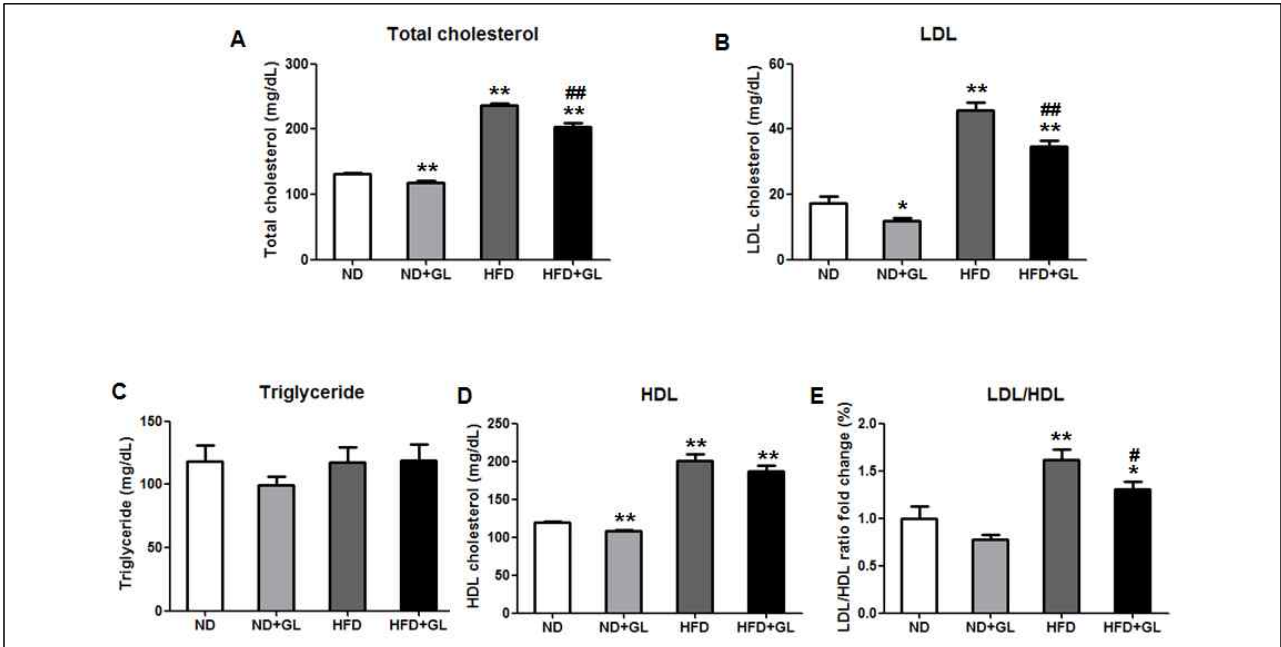


Fig. 18. Effect of GL on serum lipid profile.

(라) 조직학적 분석: 각 그룹에서 3마리씩을 제외한 모든 생쥐의 간조직과 Perirenal, Epididymal 지방을 척출하여 무게를 측정하였다. HFD를 준 모든 그룹에서 ND를 준 그룹보다 간 조직과 지방 무게가 유의하게 높게 나타났으며, HFD와 약용작물 복합추출물을 동시에 처리하여도 지방감소 효과가 나타나지 않았다. 이 결과들을 종합하면 약용작물 복합추출물은 간 손상 개선에는 효과를 나타내지만, 지방간 개선에는 효과가 없음을 나타낸다(Fig. 19).

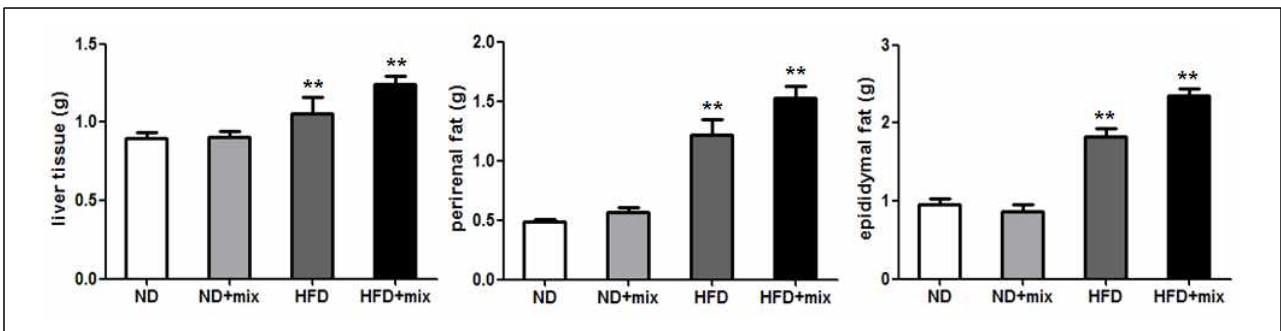


Fig. 19. The weight of liver, perirenal fat and epididymal fat in mice.

## (2) 간 조직에서 지방 대사에 관련된 단백질들의 발현양상 분석

(가) 생쥐의 간을 척출하여 일부를 떼어 1.5ml tube에 넣어 액체질소에 넣어 동결시킨 후 단백질 lysis reagent를 이용하여 단백질을 추출한 후 단백질 정량을 정량하고 각 단백질을 30 ug씩 loading한 후 running 시켰다. running 이 끝난 gel을 분리하여 membrane에 transfer시키고, membrane에 에너지 대사와 관련된 단백질들인 p-AMPK(phospho-AMP-activated protein kinase), GLUT4(Glucose transporter type 4) 항체를 처리하여 단백질 변화를 western blot으로 확인하였다. 그 결과 에너지 대사관련 단백질인 p-AMPK, GLUT4 모두 모든 그룹 간에 발현량의 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러므로 약용작물 복합추출물은 지방합성 억제효과가 없음을 알 수 있었다(Fig. 20).

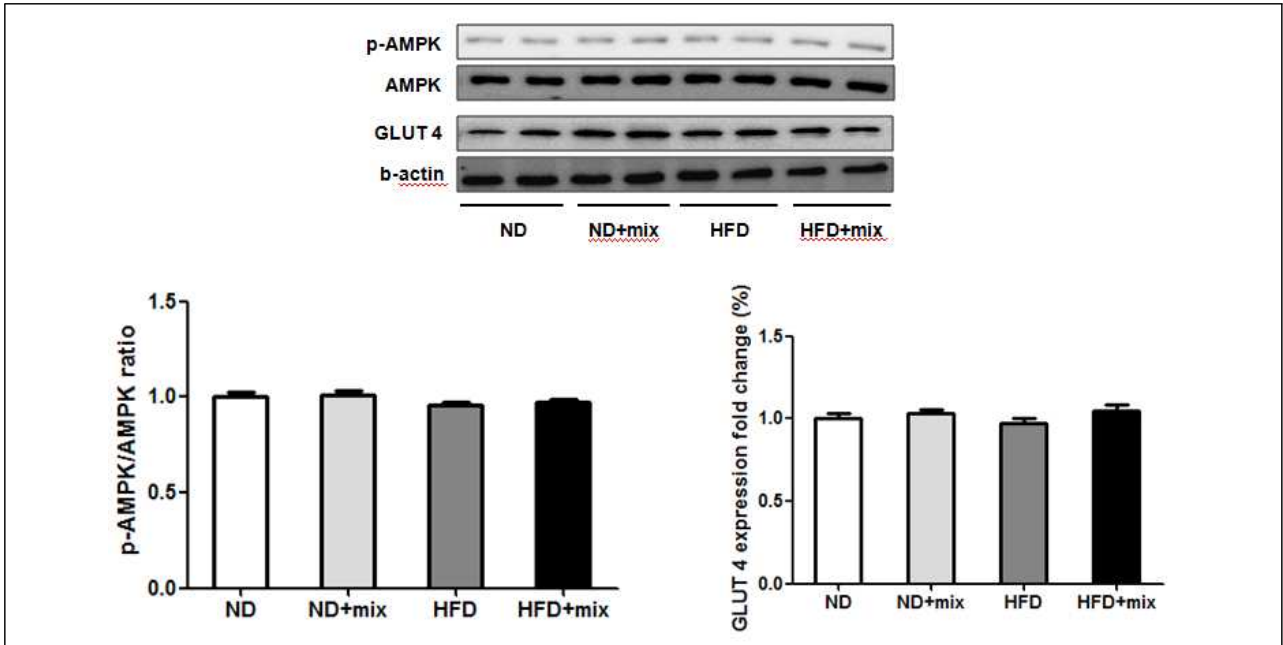


Fig. 20. Effect of mixture on the phosphorylation of AMPK and expression of GLUT4 in mice.

### (3) 약용버섯 추출물 투여가 고혈당증 개선에 미치는 영향 평가

(가) 혈당측정 : 혈당측정은 2주마다 전날 오후 5시에 먹이를 모두 제거하고 16시간 동안 절식시키고 다음날 오전 9시에 꼬리의 정맥혈에서 혈액을 추출하여 혈당을 측정하였다. 그 결과 HFD를 준 그룹과 HFD와 약용작물 복합추출물을 동시에 준 그룹 모두에서 고혈당증이 나타나는 것을 확인 하였다. 그러므로 약용작물 복합추출이 고혈당증 개선에 효과가 없다는 것을 보여주는 결과이다(Fig. 21).

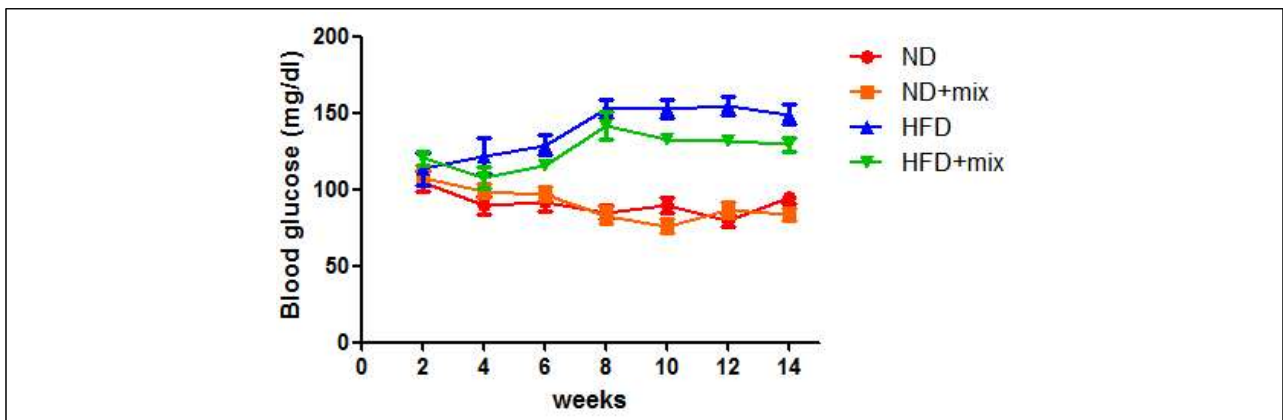


Fig. 21. Effect of mixture on fasting blood glucose level.

(나) 내당능/인슐린 민감도 측정 : 12주간의 식이가 끝난 후 13주차에 내당능(IPGTT)과 14주차에 인슐린 민감도(IPITT)를 측정하였다. 먼저 IPGTT결과에서 20% D-glucose 복강투여 후 시간대 별로 혈당을 측정하였다. 20% D-glucose 복강투여 후 HFD만을 준 그룹과 HFD와 약용작물 복합추출물을 동시에 준 그룹에서 혈당이 급격히 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 2시간 후에도 혈당이 정상수치보다 훨씬 높은 것을 확인할 수 있었다. IPITT에서는 HFD만 준 그룹과 HFD와 약용작물 복합추출물 동시에 준 그룹간의 혈당변화의 차이가 없는 것을 확인하였다 (Fig. 22).

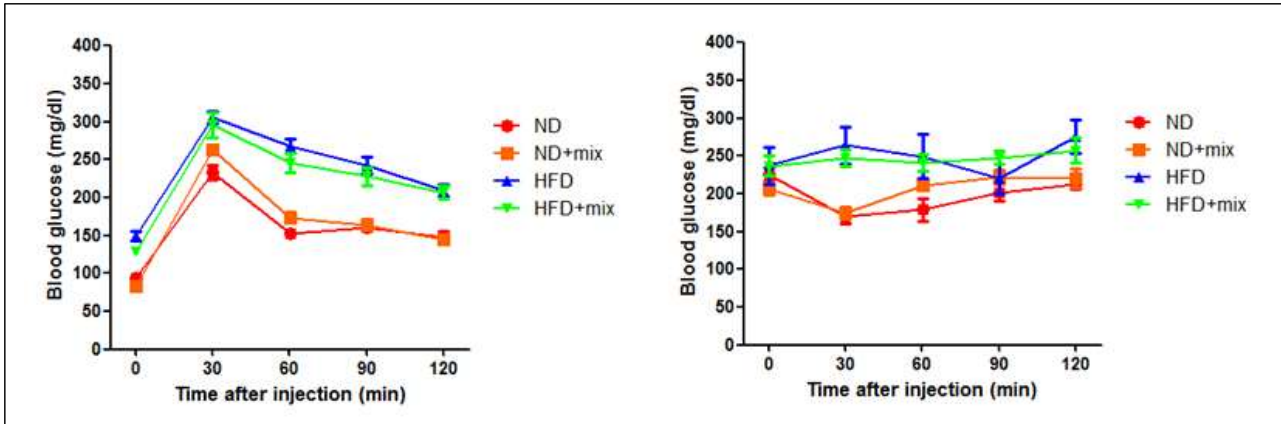


Fig. 22. Measurement of IPGTT and IPITT in mice.

### 3-1. 3차년도 연구수행 방법

#### 가. 적하수오 추출물의 안전성을 세포주를 이용하여 검정

(1) 1차년도 약용작물 버섯추출물 및 복합추출물의 안전성과 동일한 방법으로 진행하였다.

#### 나. 적하수오 추출물 효능을 세포주를 이용하여 검정

##### (1) 시약 및 기기

(가) 시약 : 본 실험에 사용한 항체들은 p-ACC (Cell signaling Technology), ACC (Cell signaling Technology), p-AMPK (Cell signaling Technology), AMPK (Cell signaling Technology), GLUT 4 (Abcam), SREBP-1(Santa Cruz) 이다. western blot 밴드는 ECL western blotting detection reagent (Amersham)을 사용하였다.

(나) 기기 : power supply (Power Pac, BioRAD), transfer 기기는 (trans-blot, BioRAD)를 사용하였고 western blot 밴드는 luminescent image analyzer (LAS 4000, FUJIFILM)을 이용하여 확인 하였다.

##### (2) 실험방법

(가) 단백질 추출 : 각 세포를 24시간 동안 37°C CO2 incubator 키운 후 추출물들이 일정한 농도로 포함되어 있는 DMEM을 처리한 후 48시간 동안 37°C CO2 incubator에서 증식시켰다. 48시간 후 세포를 깨뜨려 단백질 추출하였다.

(나) 단백질 정량 : 추출한 단백질을 1/30로 희석 시킨 뒤 96well plate에 각 그룹 당 2well씩 각 well에 25 ul씩 넣은 후 단백질 정량 reagent 를 처리 하여 1시간 동안 37°C incubator 처리한 뒤 OD값을 측정 하였다.

(다) western blot : gel을 확인 할 sample의 크기에 따라 다르게 만들었다. p-ACC, ACC는 6% gel을 이용하였으며, p-AMPK, AMPK, GLUT 4, SREBP-1는 10% gel을 사용 하였다. 각 sample은 3 ug/ul의 농도로 만들었으며, folding 되어 있는 단백질을 linear하게 만들기 위해 5분간 끓였다. 각 단백질은 30 ug씩 loading 하였으며, sample이 유리판을 완전히 빠져나올 때 까지 running 시켰다. running 이 끝난 gel을 분리하여 15V에서 40분동안 membrane에 transfer 시켰고, transfer 끝난 membrane을 풍슈를 처리하여 transfer된 band를 확인 한 후 15분씩 2번 TBS-t로 washing 하였다. washing이 완료된 membrane을 5% skim milk를 처리하여 실온에서 2시

간 처리하였고, 2시간 후 5% BSA용액에 1차 항체를 1:1000의 비율로 섞은 용액을 처리한 뒤 4°C 냉장고에서 overnight 시켰다. overnight시킨 membrane을 15분씩 3번 TBS-t로 washing 하였다. washing이 끝난 membrane을 2차 항체를 1:5000의 비율로 섞은 용액을 넣고 실온에서 1시간 처리 한 후 15분씩 4번 TBS-t로 washing 하였다. washing이 끝난 membrane을 ECL western blotting detection reagent에서 1분간 처리후 LAS 4000이용하여 band를 확인 하였다.

(라) Oil red O 염색 : 세포를 24 well plate에 50000개씩 1ml seeding한 후 48시간 동안 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 키우고, DMEM 배지를 제거하고 24시간 동안 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 starvation 하였다. 24시간 후 DMEM 배지를 제거하고 CTL (1% BSA), CTL+PM (0.05mg/ml), CTL+PM (0.1mg/ml), 0.5mM FFA (free fatty acid), 0.5mM FFA+PM (0.05mg/ml), 0.5mM FFA+PM (0.1mg/ml)를 각각 처리 한 후 24시간 동안 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 incubation 시켰다. 24시간 후 DMEM 배지를 제거하고 1X PBS 1ml를 넣어 2번 washing 한 후, 30분 동안 실온에서 10% NBP로 세포를 고정 하였다. 30분 후 formalin을 버리고 DW 1ml 넣어 2번 washing 하였고, 60% isopropanol을 1ml 넣어 5분간 실온에서 incubation하였다. 5분 후 60% isopropanol을 제거하고 60% ORO solution 500ul 넣고 1시간 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 incubation 하였다. 1시간 후 1ml DW로 3번 washing 하고, 1ml DW를 넣고 세포의 사진을 찍었다. 사진을 찍은 후 DW를 제거 한 후 60% isopropanol을 500ul를 넣은 후 5분간 실온에서 incubation 하였다. 5분 후 60% isopropanol을 제거하고, 100% isopropanol을 250ul 넣어 30분간 실온에서 incubation 한 후, 새로운 24 well plate에 incubation한 용액 200ul을 넣고 492nm로 측정하였다.

(마) 중성지방(triglyceride; TG) 측정 : 세포를 24 well plate에 50000개씩 1ml seeding한 후 48시간 동안 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 키우고, DMEM 배지를 제거하고 24시간 동안 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 starvation 하였다. 24시간 후 DMEM 배지를 제거하고 CTL (1% BSA), CTL+PM (0.05mg/ml), CTL+PM (0.1mg/ml), 0.5mM FFA (free fatty acid), 0.5mM FFA+PM (0.05mg/ml), 0.5mM FFA+PM (0.1mg/ml)를 각각 처리 한 후 24시간 동안 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 incubation 시켰다. 24시간 후 DMEM 배지를 제거하고 1X PBS 1ml를 넣어 2번 washing 한 후, cold standard diluent assay buffer를 80ul를 넣고 cell을 긁었다. cell을 sonicate로 10초, 10000g에서 10분 동안 원심분리 하였다. 상층액을 새로운 tube로 옮기고, TG assay kit plate에 10ul씩 넣고 TG enzyme solution 150ul 넣고, 실온에서 15분 반응 시킨 후 540nm에서 측정하였다.

## 다. 지방간 동물모델에서 적하수오 추출물의 지방간 개선효과 평가 및 기전 연구

(동물윤리위원회 승인번호 : GNU-141119-M0055)

### (1) 적하수오 추출물 투여가 지방간 개선에 미치는 영향을 조직학적으로 분석

(가) 동물실험은 2차년도 약용버섯 추출물과 동일한 방법으로 진행하였다.

### (2) 간 조직에서 지방 대사에 관련된 단백질들의 발현양상 분석

(가) 2차년도 약용버섯 추출물과 동일한 방법으로 진행하였다.

(나) 중성지방(triglyceride; TG) 측정 : 각 그룹 당 3마리를 제외한 모든 생쥐의 간을 척출하여 일부를 떼어 1.5ml tube에 넣어 액체질소에 넣어 동결시킨 후 단백질 lysis reagent (Tissue protein extraction reagent, Thermo, Meridian Rd., Rockford, IL 61101 USA)을 이용하여 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질을 TG assay kit plate에 10ul씩 넣고 TG enzyme solution 150ul 넣고, 실온에서 15분 반응 시킨 후 540nm에서 측정하였다.

### (3) 적하수오 추출물 투여가 고혈당증 개선에 미치는 영향 평가



(가) 2차년도 약용버섯 추출물과 동일한 방법으로 진행하였다.

### 3-2. 3차년도 연구결과

#### 가. 적하수오 추출물의 안전성을 세포주를 이용하여 검정

##### (1) 적하수오 추출물 독성시험

(가) 적하수오 추출물(*Polygonum multiflorum* Thunb. PM)을 농도별로 HepG2 cell에 처리하여 MTT assay를 실시하여 세포독성을 나타내는 농도를 확인하였다(Fig. 23). MTT assay 결과 적하수오 추출물을 0.25 mg/ml 이상의 농도로 처리한 그룹에서 대조군에 비해 세포사멸이 유의미하게 나타남을 확인하였다. 적하수오 추출물의 MTT assay 결과를 바탕으로 실시간 세포의 성장을 파악할 수 있는 Real Time Cell Analyzer (RTCA)를 사용하여 추출물의 세포독성 여부를 재확인 하였다(Fig. 24). RTCA 전용 plate에 각 well 당 5000개의 세포를 증식 시키면서 적하수오 추출물을 각각 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml 의 농도로 처리하여 지속적으로 세포 성장 여부를 모니터링 한 결과 0.05 와 0.1 mg/ml 농도에서 대조군과 비교하였을 때, 세포가 천천히 증식하는 것으로 나타났지만, 지속적인 세포성장 증가가 나타나는 것을 확인했다. 0.2 mg/ml의 농도에서는 세포가 추출물 처리 후에 더 이상 성장하지 못하는 것으로 확인 되었다. 이 실험은 MTT assay에서 나타나는 세포독성 보다 더욱 민감하게 추출물의 세포독성을 확인 할 수 있는 실험 방법이다. 이 결과를 바탕으로 이후 세포 실험에 사용 할 적하수오 추출물의 농도 (0.05, 0.1mg/ml)를 결정하였다.

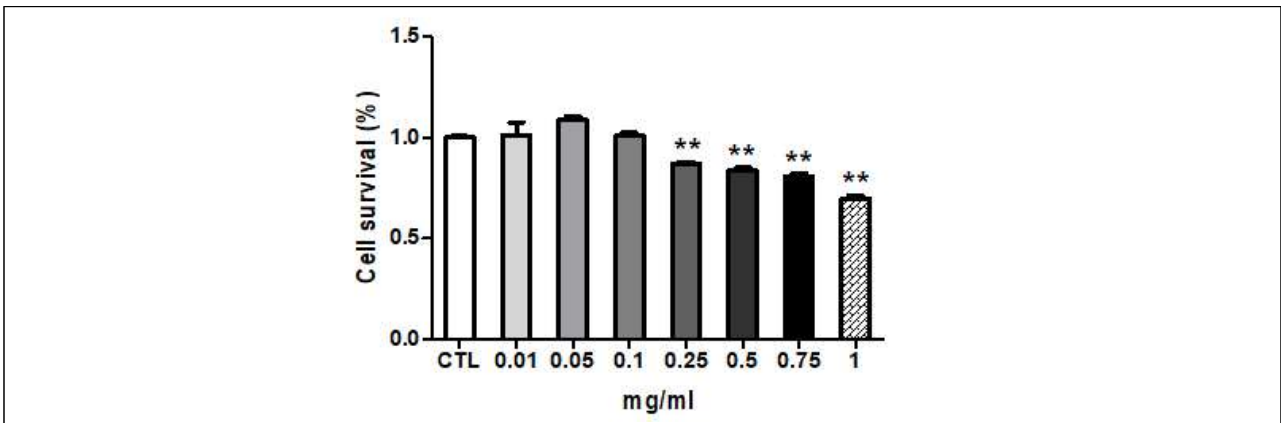


Fig. 23. MTT assay of HepG2 cell

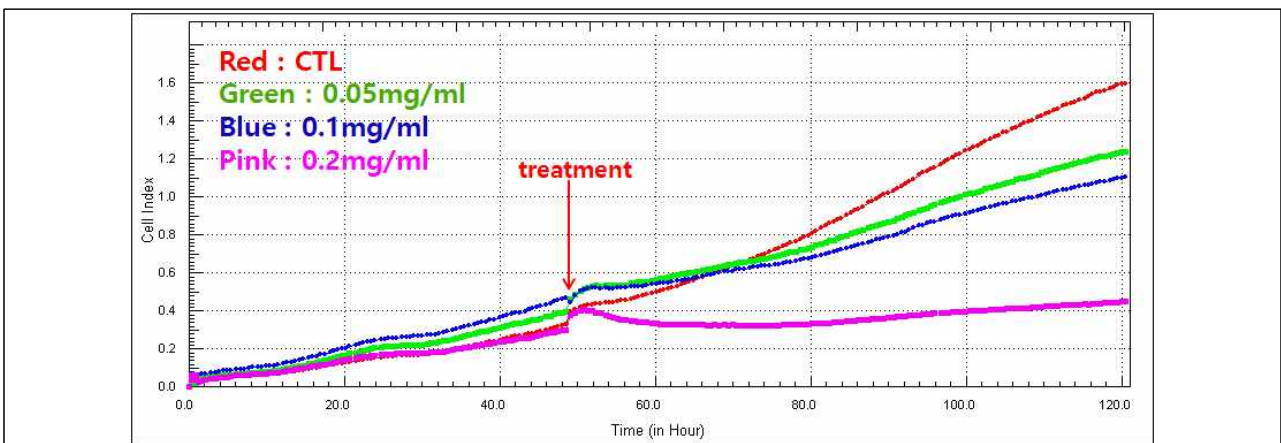


Fig. 24. RTCA of HepG2 cell

## 나. 적하수오 추출물 효능을 세포주를 이용하여 검증

### (1) 간세포에서 적하수오 추출물의 효능 검증

(가) 단백질 발현 분석: MTT assay와 RTCA의 결과를 바탕으로 세포독성을 나타내지 않았던 농도인 0.05mg/ml, 0.1mg/ml 을 HepG2 cell 에 처리하고 48시간 후, 지질대사 및 지질합성에 관여하는 단백질들의 발현과 활성화를 확인한 결과는 다음과 같다. 적하수오 추출물은 AMPK 및 ACC 등 지질대사 효소의 활성화를 일으키고 GLUT4의 발현을 증가시켰으며, 간세포에서 지질축적을 유발하는 FFA에 의해 이러한 단백질이 감소하는 조건에서도 이를 유의적으로 증가시켰다. 또한 FFA에 의한 지질합성효소의 발현을 조절하는 전사인자인 SREBP-1의 활성 증가는 적하수오 추출물 처리에 의해 유의적으로 억제되었다(Fig. 25).

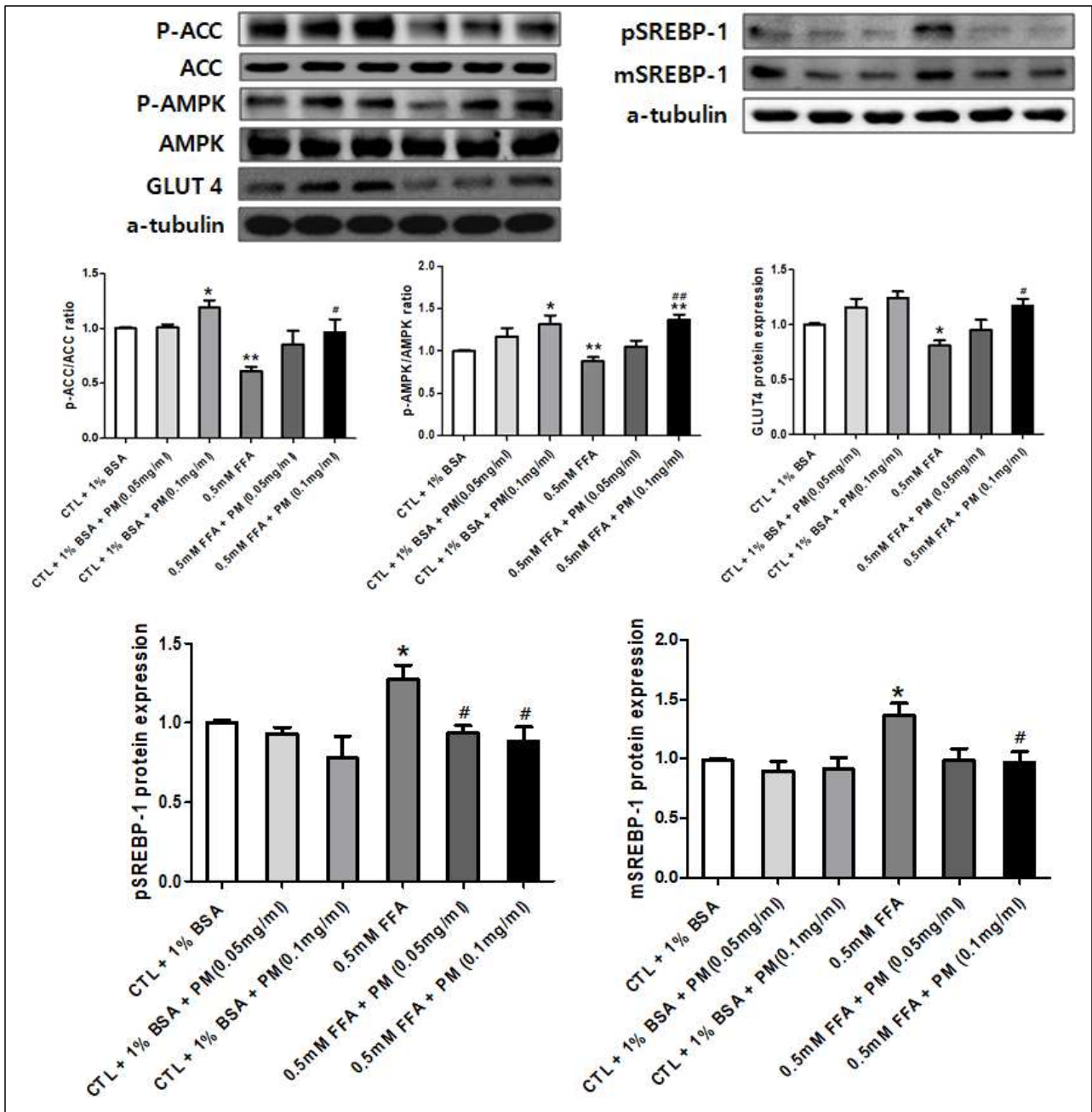


Fig. 25. effect of PM on lipogenic and lipolytic enzymes in FFA-treated HepG2 cells

(나) 지질축적 분석: HepG2 cell에서 FFA 처치에 의한 지질축적 정도를 확인하기 위해 Oil red O 염색을 진행하였다. 축적된 지질은 Oil Red O 염색에 의해 붉은색으로 보여지며, 아래 그림에서와 같이 FFA 처치는 현저하게 Oil Red O 염색이 증가하는 결과를 보여준다. 적하수오 추출물은 FFA에 의한 간세포 내 지질축적을 농도의존적으로 억제하였다. 지질축적 정도를 정량화한 결과 통계적으로 유의한 억제효과를 보여주었다(Fig. 26).

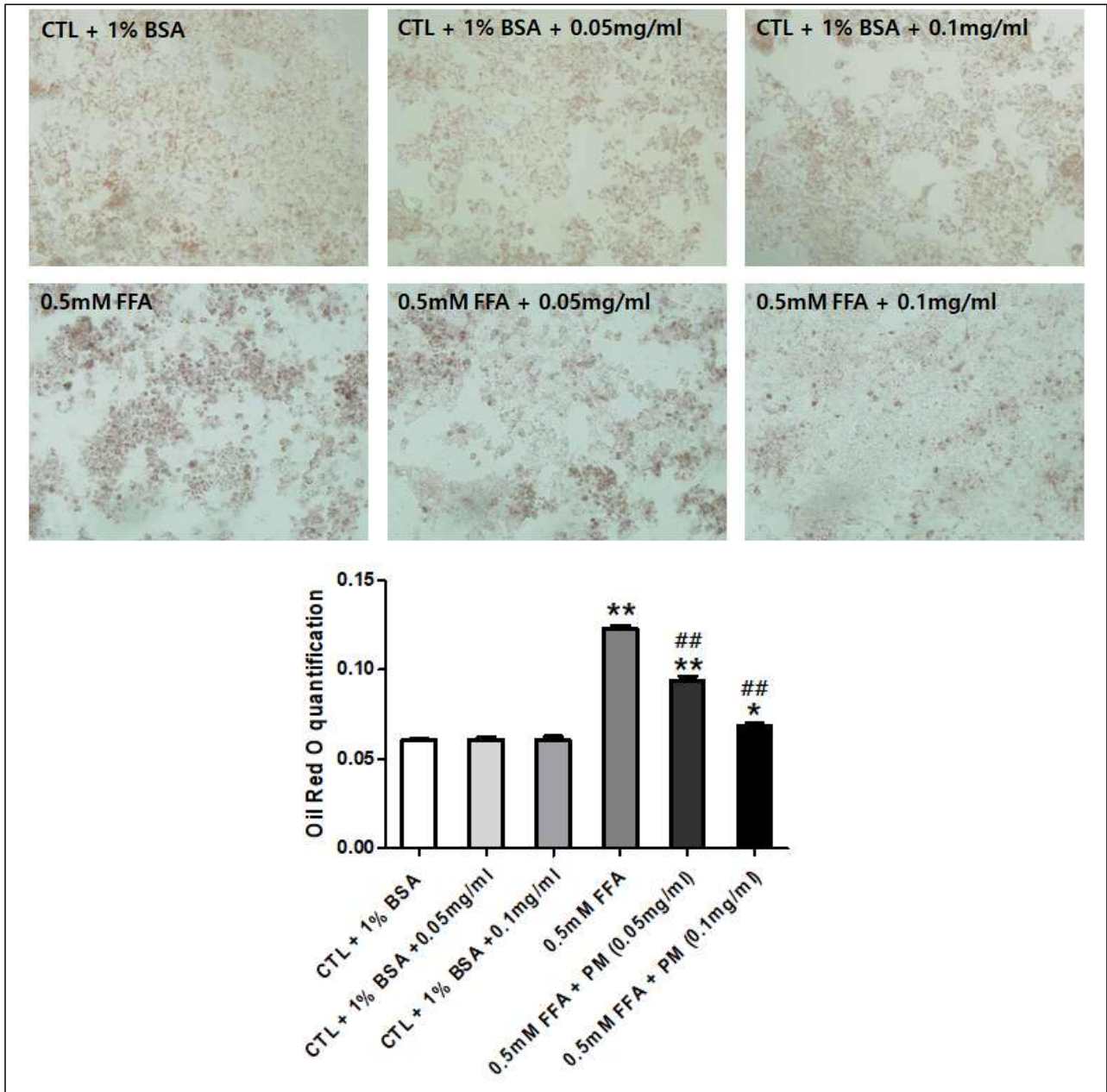


Fig. 26. effect of PM on lipid accumulation in FFA-treated HepG2 cells

(다) 중성지방 축적 분석: 지방간은 중성지방 형태로 간세포 내 지질의 과도한 축적을 의미하므로 HepG2 세포에서 FFA 처치를 통해 간세포 내 중성지방 축적을 유발하였다. 0.5 mM FFA의 처치는 간세포 내 중성지방 함량을 대조군에 비해 증가시켰으며, 이러한 증가는 적하수오 추출물에 의해 농도의존적으로 억제되었다(Fig. 27).

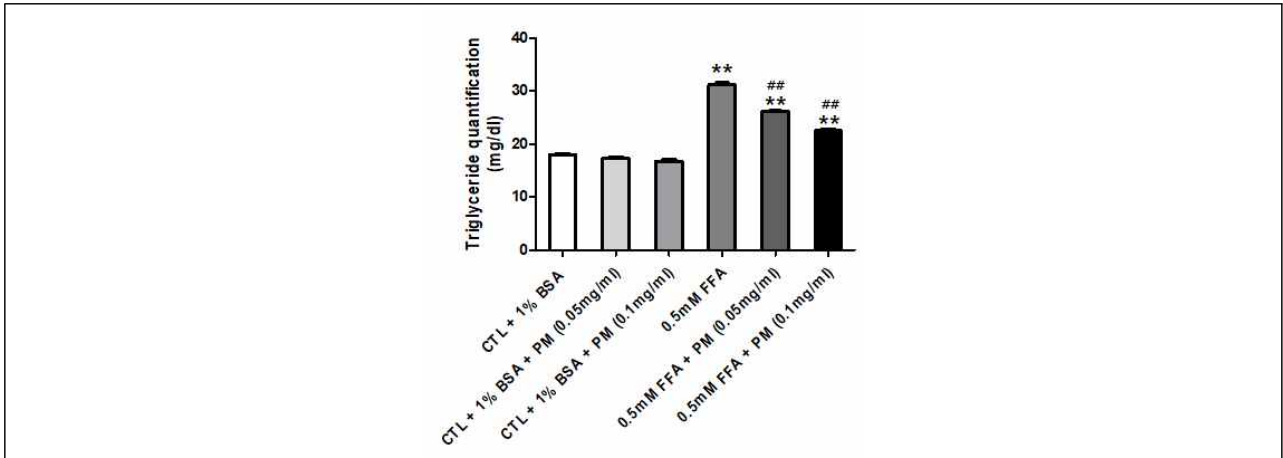


Fig. 27. effect of PM on triglyceride accumulation in FFA-treated HepG2 cells

## 다. 지방간 동물모델에서 적하수오 추출물의 지방간 개선효과 평가 및 기전 연구

### (1) 약용작물 복합추출물 투여가 지방간 개선에 미치는 영향을 조직학적으로 분석

(가) 동물실험 : 적하수오 추출물의 지방간 개선효과를 검증하기 위해, 정상 생쥐에 정상식이(Normal diet, ND)를 공급한 그룹과 고지방식이(High Fat diet, HFD)를 공급한 그룹으로 나누어 식이를 하면서, 세포실험에서 독성이 없으면서 지방대사와 당대사를 증가시키는 농도의 생체 적용 용량을 계산하여, 각각 ND 그룹과 HFD 그룹에 0.1 mg/g의 용량으로 일주일에 5일간 투여하면서 체중 변화와 먹이 섭취량의 변화를 체크하였다. 시간이 지남에 따라 점차적으로 HFD에 의한 체중 증가가 서서히 나타나고 있음을 확인할 수 있었다. 적하수오 추출물은 체중 변화에 별다른 영향을 나타내지 않았다.

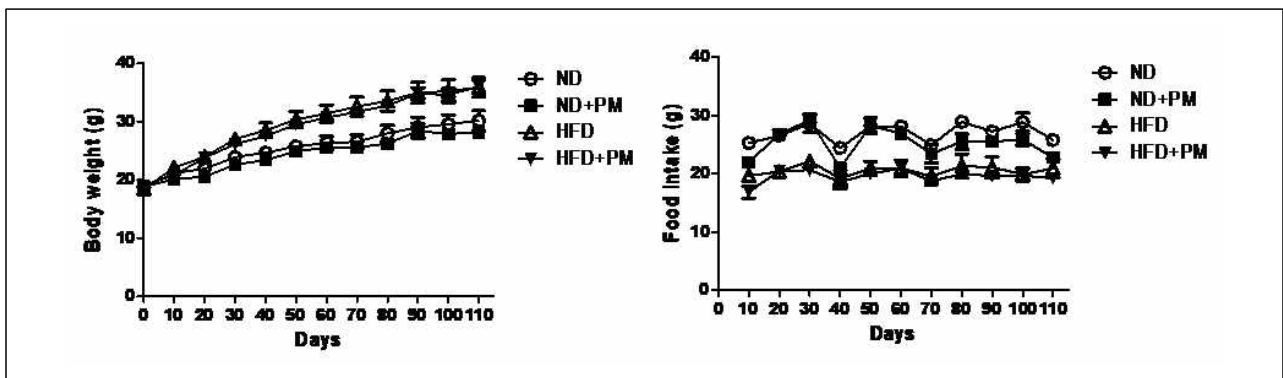


Fig. 28. The change of body weight and food intake.

(나) 조직학적 분석: 각 그룹에서 3마리씩을 제외한 모든 생쥐의 간조직과 Perirenal, Epididymal 지방을 척출하여 무게를 측정하였다. ND를 준 모든 그룹과 HFD를 준 모든 그룹 사이의 간 조직의 무게는 차이가 없었다(Fig. 29A) HFD를 준 모든 그룹에서는 ND를 준 그룹과 비교해서 지방조직 무게가 유의적으로 높았으며, 이는 HFD와 적하수오 추출물을 동시에 준 그룹에서 감소하였다(Fig. 29B 및 29C). 각 조직을 척출하여 크기를 비교하였을 때, 육안으로도 HFD만 준 그룹과 HFD와 적하수오 추출물을 동시에 준 그룹과 비교하였을 때, 지방조직이 감소한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 29D). 간 조직에서 H&E 염색을 통해 조직학적 분석을 한 결과 HFD 그룹은 ND 그룹에 비해 지방축적이 현저하게 증가하였으며, HFD와 적하수오 추출물을 투여한 그룹에서 이러한 지질축적은 억제되었다. Oil Red O 염색을 통해 지방축적 정도를 분석한 결과 H&E에 의한 조직학적 분석 결과와 유사한 결과를 나타내었다(Fig. 29E).

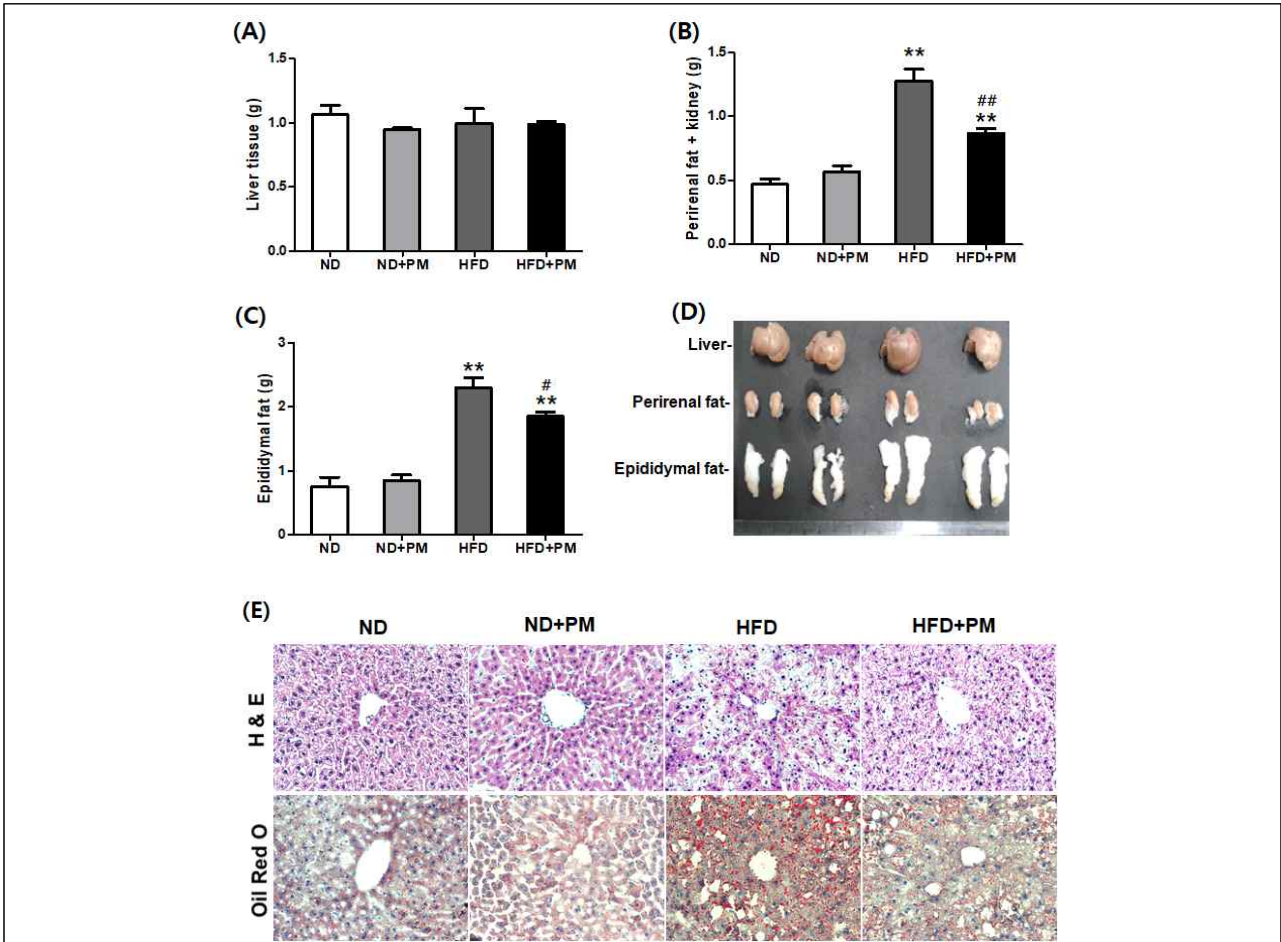


Fig. 29. PM attenuated hepatic steatosis induced by HFD in mice

(다) 중성지방(triglyceride; TG) : 중성지방은 체내에서 합성되는 지방의 한 형태이고, 우리 몸에서 칼로리 섭취가 부족한 경우 체내에서 에너지원으로 분해해 사용되기도 한다. 그런데 중성지방의 양이 많아질 경우 체내에서 다양한 문제를 유발할 수 있다. 특히 혈액 내의 중성지방 수치가 높아지면 심혈관계 건강이 위협받을 수 있다. 열량섭취가 많아지거나 당질 섭취가 늘어나면 중성지방합성이 증가되고 체내에 축적되면 고중성지방혈증 같은 이상지질혈증이 발생할 수 있다. 본 연구결과에서는 HFD 그룹은 ND 그룹에 비해 간 조직 내 중성지방 함량이 유의적으로 증가하였으며, 이러한 증가는 HFD 그룹에서 적하수오 추출물 투여에 의해 억제되었다 (Fig. 30).

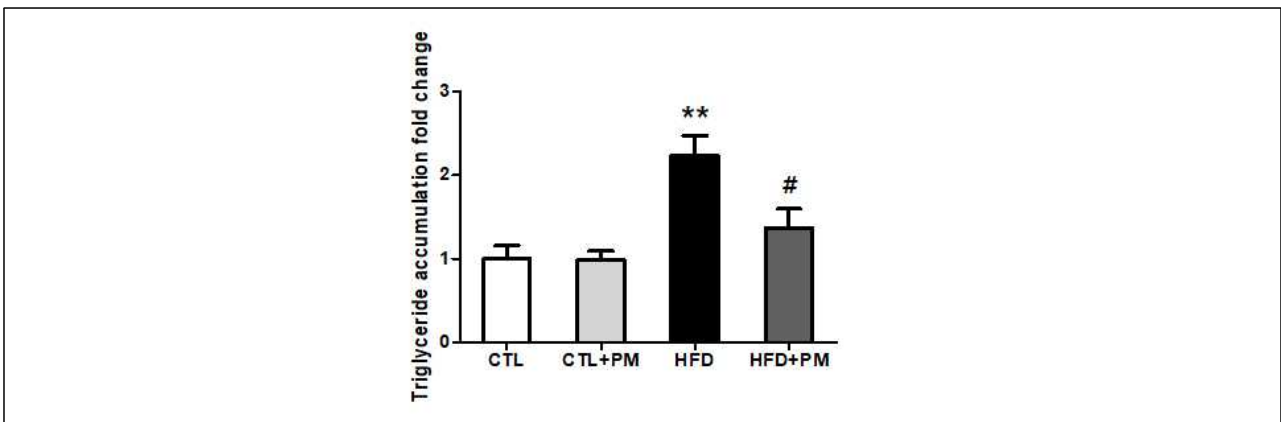


Fig. 30. Effect of PM on triglyceride accumulation in liver from mice

(2) 간 조직에서 지방 대사에 관련된 단백질들의 발현양상 분석

(가) 생쥐의 간을 척출하여 에너지 대사와 관련된 단백질인 p-AMPK(phospho-AMP-activated protein kinase), GLUT 4(Glucose transporter type 4)와 p-ACC(phospho-Acetyl-CoA carboxylase), SREBP-1(sterol regulatory element-binding protein-1)의 전구체(pSREBP-1) 단백질과 성숙된 (mSREBP-1) 단백질의 변화를 western blot으로 확인하였다. 그 결과 HFD만을 준 그룹에서 p-AMPK, p-ACC, GLUT4 등 에너지 대사 관련 단백질 발현이 감소하였으며, 지질합성 효소의 발현을 조절하는 전사인자인 SREBP-1의 단백질 발현과 mature형이 증가하는 것을 확인하였다. 이러한 단백질 발현변동은 적하수오 추출물 투여에 의해 유의적으로 억제되었다. 따라서, 적하수오 추출물은 지방간 발병에 관계되는 지질대사 및 지질합성 관련 인자의 발현변동을 개선하는 효과가 있는 것을 알 수 있다(Fig. 31).

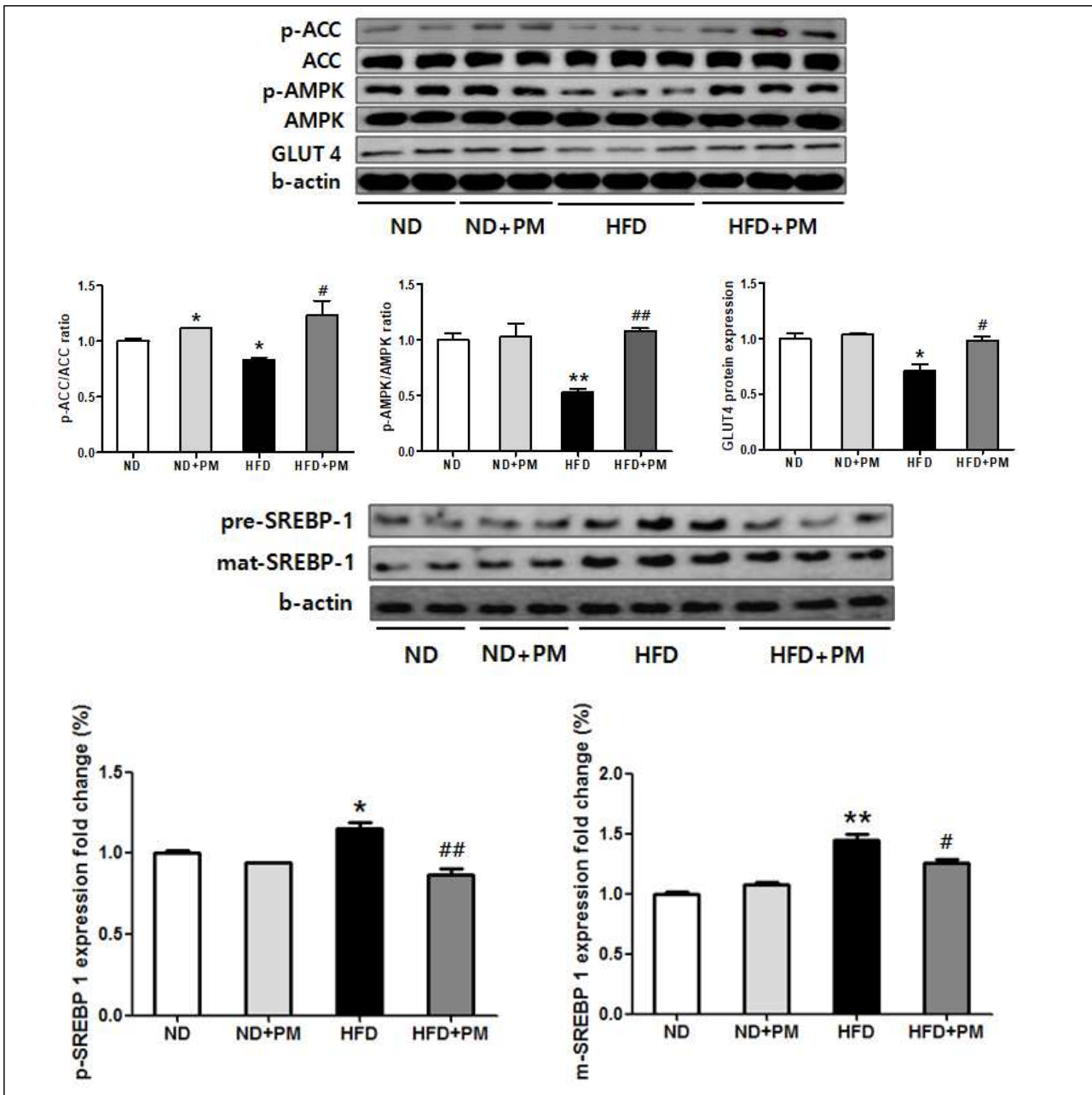


Fig. 31. Effect of PM on the phosphorylation or protein levels of ACC, AMPK, GLUT4 and SREBP-1 in liver tissues from the mice fed with HFD

### (3) 적하수오 추출물 투여가 고혈당증 개선에 미치는 영향 평가

(가) 혈당측정 : 식이 2주차부터 2주마다 혈당을 측정하였다. 2주마다 전날 오후 5시에 먹이를 모두 제거하고 16시간 동안 절식시키고 다음날 오전 9시에 꼬리의 정맥혈에서 혈액을 추출하여 혈당을 측정하였다. 그 결과 HFD만 준 그룹은 식이 2주차부터 혈당이 증가하여 이후에 계속적으로 혈당이 높게 유지 되는 것을 알 수 있었다. 하지만 HFD와 적하수오 추출물을 동시에 준 그룹의 혈당은 HFD만 준 그룹과 비교하여 혈당이 유의미 하게 적게 나타나는 것을 확인 할 수 있었다. 이 수치는 정상식을 준 그룹과 비슷한 수준이었다. 그러므로 적하수오 추출물 투여가 고혈당증 개선효과가 있음을 보여준다.

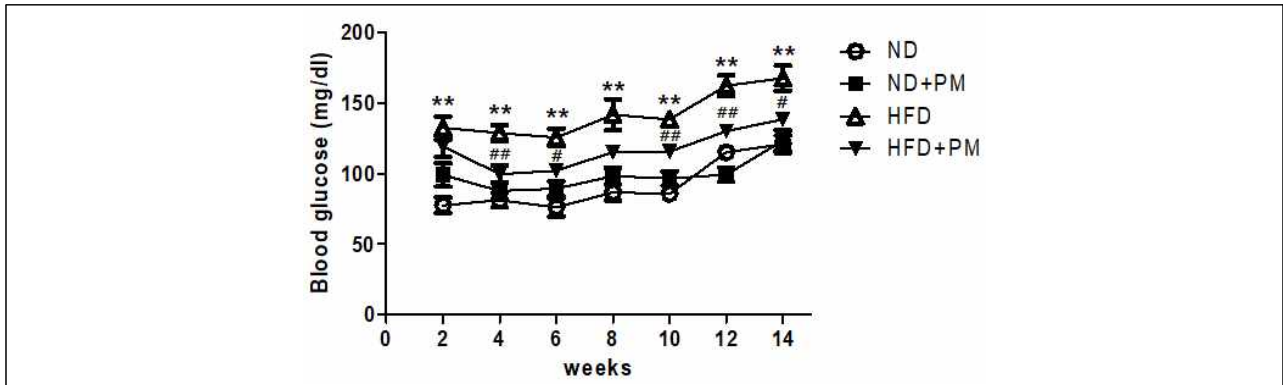


Fig. 32. Effect of PM on fasting blood glucose level.

(나) 내당능/인슐린 민감도 측정 : 12주간의 식이가 끝난 후 13주차에 내당능(IPGTT)과 14주차에 인슐린 민감도(IPITT)를 측정하였다. 먼저 IPGTT결과에서 20% D-glucose를 IP후 시간대 별로 혈당을 측정하였다. 20% D-glucose를 IP후 30분 후 모든 그룹에서 혈당이 급격히 증가하는 것을 확인할 수 있었고, IP 60분 후 부터는 HFD만을 준 그룹보다 다른 모든 그룹에서 혈당 감소가 유의미 하게 빠르게 나타나는 것을 확인 할 수 있었다. HFD만 준 그룹과 HFD와 적하수오 추출물을 동시에 준 그룹 간에 비교하였을 때, HFD와 적하수오 추출물을 동시에 준 그룹이 더 빠른 혈당감소가 나타나는 것을 확인 할 수 있었다. 혈당은 식사 후 증가하여 시간이 지남에 따라 감소하여 정상혈당으로 돌아가지만 HFD만을 준 그룹은 2시간 후 에도 혈당이 정상 수치보다 훨씬 높은 것을 확인 할 수 있었지만, 반면에, 적하수오 추출물을 동시에 준 그룹에서는 모든 ND그룹과 비교하여 혈당이 유의미한 차이를 보여주지 않았다(Fig. 33A). IPITT에서도 HFD만 준 그룹은 인슐린 투여 후 에도 고혈당이 유지되는 것을 확인 할 수 있었고, 반면, 적하수오 추출물을 동시에 준 그룹의 혈당은 모든 ND그룹의 혈당과 차이가 나타나지 않는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 33B). 그러므로, 적하수오 추출물이 고혈당증 개선에 효과가 있음을 보여주는 결과이다.

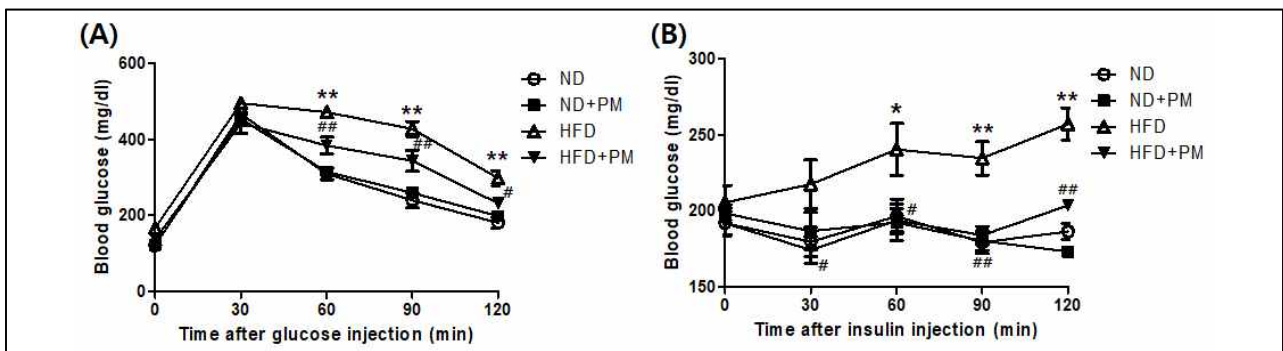


Fig. 33. Measurement of IPGTT and IPITT in mice.

## 제8절 지리산 권역 약용작물의 대량생산 및 표준화 [제2협동, (재)경남한방약초연구소]

### 1-1. 1차년도 연구수행 방법

#### 가. 지리산권역 약용작물(도라지, 하수오, 자소엽, 당귀)의 화합물 구조·분석

##### (1) 재료 및 방법

###### (가) 실험 재료, 시약 및 기기분석

① 본 실험에 사용한 당귀, 도라지, 하수오, 자소엽은 경상남도 산청군 경남생약농업협동조합으로부터 제공받아 -20℃에서 냉동보관하면서 사용하였다. 본 연구에서 사용된 시약으로 재료 추출 및 물질분리 시약은 1급 시약(SK Chemicals, Korea)을 사용하였으며, 분석용 시약은 Acetonitrile(Gradient grade, Merck 및 HPLC grade, Burdick&jackson, USA), Water(HPLC grade, Burdick&jackson, USA)을 사용하였다.

㉠ 기기 : 성분분석을 위한 HPLC- PDA(High performance liquid chromatography- Photodiode Array Detector)는 Waters e2695(Waters, Milford, MA, USA), Waters 2998 Photodiode Array Detector, Waters temperature control module column oven을 사용하였으며, 컬럼은 Waters 120 ODS-BP(4.6 mm × 250 mm 5 μm)를 사용하였다.

MS(Mass spectrometry)는 Acquity UPLC - Xevo G2-S Q-TOF(Waters, Milford, MA, USA)를 사용하였으며, 컬럼은 UPLC BEH(2.1×50 mm, C18, 1.7 μm, Acquity)를 사용하였다. NMR(Nuclear Magnetic Resonance) spectrum은 300MHz, 500MHz-NMR (Bruker, USA)를 사용하였다.

###### (나) 유기용매를 이용한 분획물 조제

① 분획물 조제 : 당귀, 도라지, 백수오, 자소엽은 음건한 다음 마쇄하여 사용하였다. 각각의 시료 4 kg에 40 L의 100% methanol을 첨가하고 3일 동안 상온 교반하여 2회 반복 추출하였다. 시료 100% methanol 추출물을 Large scale rotary evaporator(R-220SE, Büchi, Flawil, Switzerland)에 1차 농축시킨 후, Rotary vacuum evaporator(N-1200B, EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 methanol을 완전히 제거하였다. 농축이 완료된 추출물은 -70℃의 Deep freezer(CLN-70 UW, NIHON, Tokyo, Japan)에 보관하면서 사용하였다. 농축 건조된 methanol 조추출물을 증류수에 현탁시킨 후 용매의 극성에 따라 n-hexane, chloroform, ethyl acetate(EtOAc), n-butanol (BuOH)로 3회씩 반복하여 각 층으로 분획하였다. 각 분획층을 Rotary vacuum evaporator(N-1200B, EYELA, Tokyo, Japan)를 사용하여 완전히 농축하여 -70℃의 Deep freezer에 보관하면서 물질 구조 동정을 위한 시료로 사용하였다.

###### (다) Chloroform 분획층의 물질 분리

① 분획물 분리 : Chloroform 분획층은 MPLC(medium pressure liquid chromatography system, comiflash Rf200, Teledyne Isco, Lincoln, NE, USA)를 사용하여 1차 분리하였다. Pre-packed silica gel column (Teledyne Isco, 30×220 mm)에 Chloroform 분획층을 약 500 mg/mL의 농도로 조제하여 5 mL 주입하고 MPLC를 사용하여 분리하였다. MPLC상에서 순차적으로 분리된 분획을 TLC로 확인하여 비슷한 성분 패턴끼리 모아 농축하여 분획물을 선별하고 분획물 각각을 Pre-packed silica gel column (Teledyne Isco, 20×140 mm)에서 2차 분리 하였다. 2차 분리된 분



획을 TLC로 다시 확인하여 비슷한 성분 패턴끼리 모아 다시 분획물을 얻었다. 각각의 분획물을 Prep LC(preparative HPLC, PLC2020, Gilson, Middleton, WI, USA)를 사용하여 분리, 정제 하였다.

#### (라) EtOAc 분획층의 물질 분리

① 분획층 분리 : EtOAc 분획층은 MPLC(medium pressure liquid chromatograph system, comiflash Rf200, Teledyne Isco, Lincoln, NE, USA)를 사용하여 1차 분리하였다. Pre-packed silica gel column (Teledyne Isco, 30×220 mm)에 EtOAc 분획층을 약 500 mg/mL의 농도로 조제하여 5 mL 주입하고 분리하였다. MPLC상에서 순차적으로 분리된 분획을 TLC로 확인하여 비슷한 성분 패턴끼리 모아 농축하여 분획물을 선별하고 분획물 각각을 Pre-packed silica gel column (Teledyne Isco, 20×140 mm)에서 2차 분리 하였다. 2차 분리된 분획을 TLC로 다시 확인하여 비슷한 성분 패턴끼리 모아 분획물을 얻었다. 각각의 분획물을 Prep LC(preparative HPLC, PLC2020, Gilson, Middleton, WI, USA)를 사용하여 분리, 정제하였다.

LC 분석 크로마토그램에서 비슷한 retention time을 가지는 화합물들은 정확한 분리를 위하여 Recycling LC(recycling preparative HPLC, LC-9130NEXT, JAI, Tokyo, Japan)를 활용하여 다시 한번 분리, 정제하였다.

### 나. 한방천연물 library 및 profiling 구축

#### (1) 재료 및 방법

##### (가) 시료 조제

① 유기용매를 이용한 분석 시료 조제 : 제 4세부에서 확보한 시료 19종(이엽우피소 잎(오창), 이엽우피소 잎(인삼특작부), 이엽우피소 잎(조직배양), 이엽우피소 뿌리(안의), 백수오 잎(오창), 백수오 잎(조직배양), 백수오 뿌리(안의), 적하수오 잎(인삼특작부), 적하수오 잎(오창), 적하수오 잎(조직배양), 적하수오 뿌리(안의), 만추, 큰조롱, 토천궁, 궁궁이, 박주가리, 참당귀, 일당귀, 일천궁)에 methanol을 무게 대비 10배수를 넣고 실온에서 3일간 추출하였다. 추출액은 Rotary vacuum evaporator(N-1200B, EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 methanol을 완전히 제거하였다. 농축이 완료된 추출물은 -70°C의 Deep freezer (CLN-70UW, NIHON, Tokyo, Japan)에 보관하면서 분석 시료로 사용하였다.

##### (나) 분석조건

- 분석기기: Waters Acquity UPLC H-class system
- 분석파장: 254, 280, 330 nm
- 컬럼: Acquity UPLC BEH C18(2.1 mm × 100 mm 1.7 μm)
- 컬럼 온도: 35° C
- 주입량: 1 μL
- 유속: 0.4 mL/min
- 이동상(A) 0.1% Acetic acid in H<sub>2</sub>O
- 이동상(B) Acetonitrile
- 이동상 gradient 조건

분석시간 (min)	이동상 (A) (%)	이동상 (B) (%)	비고
0	97	3	
1	85	10	
5	85	50	
6	75	90	
10	75	25	
11	50	25	
12	55	45	
15	43	43	
18	100	0	
20	97	3	

#### 다. 지리산권역 약용작물(도라지, 하수오, 자소엽, 당귀)의 지표물질 정성·정량 분석

##### (1) 재료 및 방법

(가) 실험 재료, 시약 및 기기

① 기기 : 지표물질 정성·정량 분석을 위한 기기는 UPLC- PDA(Ultra performance liquid chromatography- Photodiode Array Detector)는 Acquity UPLC H-class system(Waters, Milford, MA, USA), Waters 2998 Photodiode Array Detector, Waters temperature control module column oven 을 사용하였으며, 컬럼은 Acquity UPLC BEH C18(2.1 mm×100 mm 1.7 μm)를 사용하였다.

② 분석조건 : 상동

#### 라. 지리산권역 약용작물(도라지, 하수오, 자소엽, 당귀)의 기능성 대사체 선별

##### (1) 재료 및 방법

(가) 실험 재료, 시약 및 기기

① 기기 : MS(Mass spectrometry)는 Acquity UPLC - Xevo G2-S Q-TOF(Waters, Milford, MA, USA), 컬럼은 Acquity UPLC BEH C18(2.1 mm×100 mm 5 μm)를 사용하였다. MS parameter는 capillary 3 kV, sampling cone 30 kV, Extraction cone 7 kV, source temperature 120°C, desolvation temperature 350°C, desolvation gas 600 L/hr 조건 하에 이온화를 시켰으며, 이때 사용한 Leucine enkephalin (556.2771 m/z)은 정확한 MS를 측정하기 위해 lock mass 용으로 사용하였으며 calibration은 NaF (sodium formate)를 사용하여 calibration을 시켜 주었다.

② 시료조제 : 당귀, 도라지, 백수오, 자소엽을 95% EtOH 용매에 무게 대비 용매의 함량을 1:10 비율로 넣고 실온에서 3일간 추출하였다. 추출액은 Rotary vacuum evaporator(N-1200B, EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 용매를 완전히 제거 하였다.

③ 분석조건

- 분석기기: Waters Acquity UPLC - Xevo G2-S Q-TOF
- 분석파장: 254, 280, 330 nm
- 컬럼: Acquity UPLC BEH C18(2.1 mm × 100 mm 1.7 μm)
- 컬럼 온도: 35° C
- 주입량: 1 μL
- 유속: 0.35 mL/min
- 이동상(A) 0.1% formic acid : H<sub>2</sub>O
- 이동상(B) Acetonitrile

- 이동상 gradient 조건

분석시간 (min)	이동상 (A) (%)	이동상 (B) (%)	비고
0	99.5	0.5	
20	30	70	
22	0	100	
23	99.5	0.5	

마. 지리산권역 약용작물(도라지, 하수오, 자소엽, 당귀)의 시험재배

(1) 재료 및 방법

(가) 실험 재료, 시약 및 기기

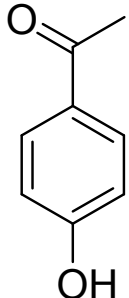
① 실험 재료 : 경남농업협동조합에서 보유한 2014년도 이엽우피소, 적하수오, 백수오, 도라지, 자소엽, 당귀 종자 및 종근을 시험재배 시료로 사용하였다

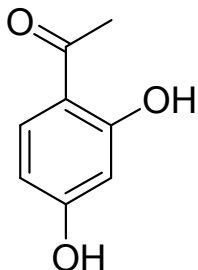
② 시험재배 : 종자는 300립을 흐르는 수돗물에 3일간 침종처리 하였다. 이후 6시간 반건조 시킨 후, 125공 플러그 트레이에 원예용 상토를 충전한 후, 완전히 포수 시키고 1칸에 2립씩 파종하였고 종근은 200개를 72공 플러그 트레이에 1칸에 1개씩 파종하였다. PE필름으로 배지를 덮어 포습상태를 유지한 후 22℃ 암상태의 생장상에 정치시켜 발아시켰다, 7일 후 필름을 걷어내고 발아된 묘는 19~23℃ 온도에서 생육되었으며, 3일에 한번 씩 저면관수 하였다. 본엽 4매 나올 때 큰 포트에 이식하여 9주간 재배하였다.

1-2. 1차년도 연구결과

가. 지리산권역 약용작물(도라지, 하수오 자소엽, 당귀)의 화합물 구조 · 분석

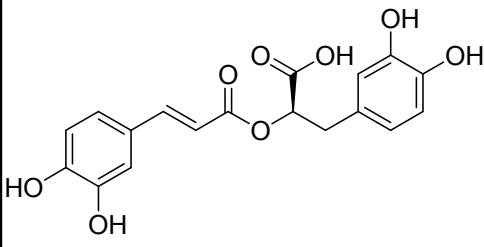
(1) 백수오 : 4-Hydroxyacetophenon, 2,4-Dihydroxyacetophenon

	화합물명	4-Hydroxyacetophenon (백수오)
	성 상	white powder
	분자식	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>
	분자량	136.15
	MS	TOF-MS( <i>m/z</i> ): [M+H] <sup>+</sup> 137.0653
<sup>1</sup> H NMR (MeOD, 300 MHz)	δ 7.90(d, J=9.0Hz, 2H, H-2,6), 6.85(d, J=9.0Hz, 2H, H-3,5), 2.53(s, 3H, 4-OMe)	
<sup>13</sup> C NMR (MeOD, 75 MHz)	δ 128.7(C-1), 130.7(C-2), 114.7(C-3), 162.5(C-4), 114.7(C-5), 130.7(C-6), 198.0(C-7), 24.88(4-OMe)	

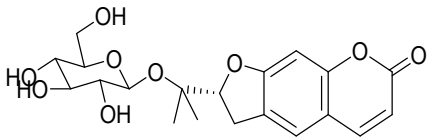
	화합물명	2,4-DiHydroxyacetophenon (백수오)
	성상	brown powder
	분자식	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>
	분자량	152.15
	MS	TOF-MS( <i>m/z</i> ): [M+H] <sup>+</sup> 153.0613
<sup>1</sup> H NMR (MeOD, 300 MHz)	δ 7.76(d, J=9.0Hz, 1H, H-6), 6.38(dd, J=9.0Hz, J=2.1Hz, 1H, H-3), 6.24(d, J=2.1Hz, 1H, H-5), 3.38(s, 3H, 4-OMe)	
<sup>13</sup> C NMR (MeOD, 75 MHz)	δ 112.8(C-1), 164.8(C-2), 102.2(C-3), 164.1(C-4), 108.0(C-5), 133.7(C-6), 202.7(C-7), 26.3(4-OMe)	

(2) 자소엽 : scopoletin, rosmarinic acid

	화합물명	Scopoletin (자소엽)
	성상	white powder
	분자식	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
	분자량	192.1
	MS	TOF-MS( <i>m/z</i> ): [M+H] <sup>+</sup> 193.05001
<sup>1</sup> H NMR (DMSO, 500 MHz)	δ 7.91(d, J=9.5Hz, 1H, H-4), 7.22(s, 1H, H-5), 6.78(s, 1H, H-8), 6.22(d, J=9.5Hz, 1H, H-3), 3.82(s, 3H, 6-OMe)	
<sup>13</sup> C NMR (DMSO, 125 MHz)	δ 161.1(C-2), 151.6(C-7), 150.0(C-9), 145.7(C-6), 144.9(C-4), 112.1(C-3), 111.0(C-10), 110.1(C-5), 103.2(C-8), 56.5(6-OMe)	

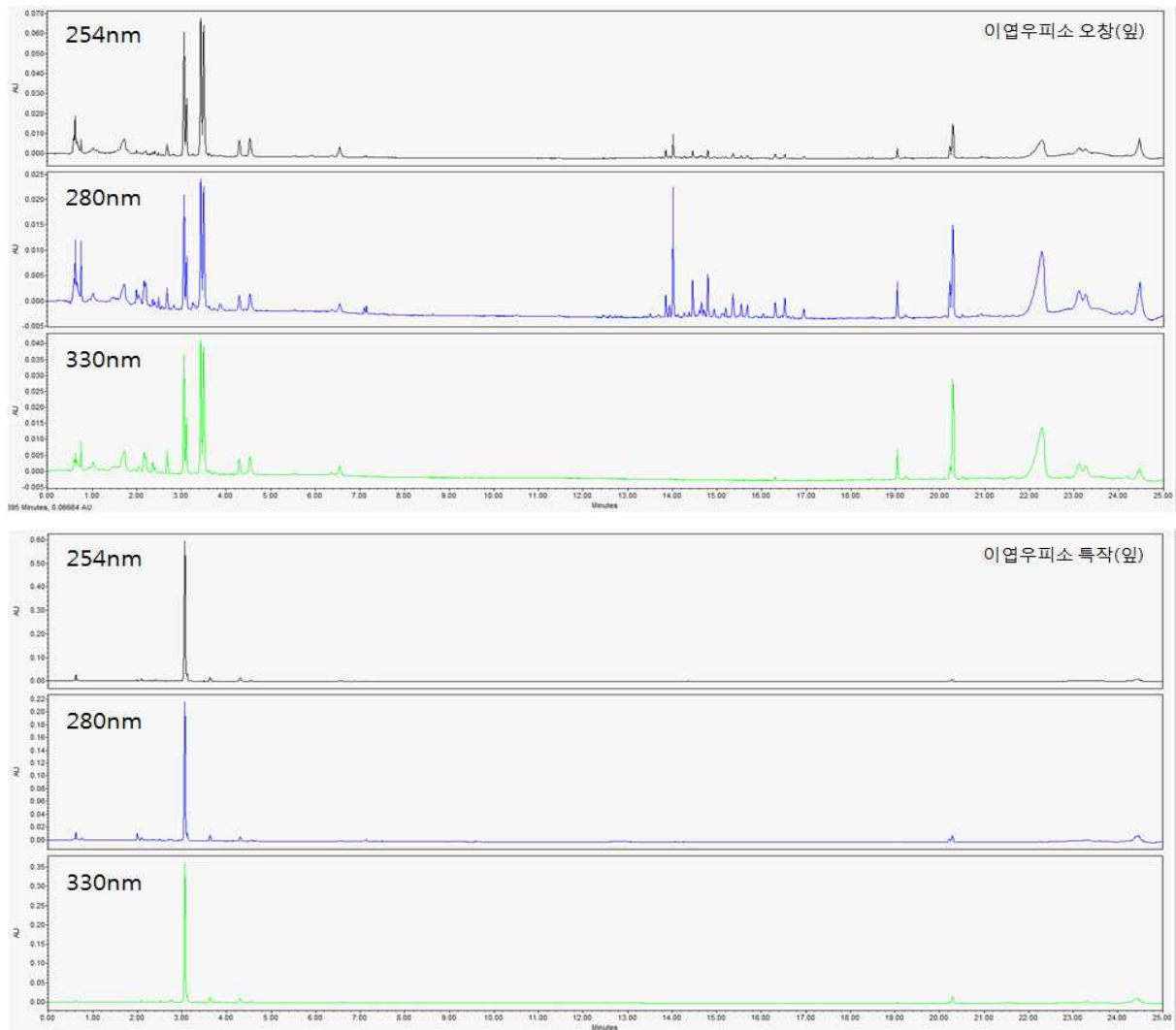
	화합물명	Rosmarinic acid (자소엽)
	성상	brown powder
	분자식	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>
	분자량	360.31
	MS	TOF-MS( <i>m/z</i> ): [M+H] <sup>+</sup> 361.0898
<sup>1</sup> H NMR (MeOD, 300 MHz)	δ 7.57(d, J=15.9, 1H, H-7), 7.06(d, J=2.1, 1H, H-2), 6.97(dd, J=10.2, J=2.1, 1H, H-6), 6.73(m, 2H, H-5, H-2'), 6.71(d, J=8.1, 1H, H-5'), 6.63(dd, J=8.1, J=2.1, 1H, H-6'), 6.29(d, J=15.9, 1H, H-8), 5.20(dd, J=18.6, J=4.2, 1H, H-6'), 3.12(dd, J=18.6, J=4.2, 1H, H-8'), 3.02(dd, J=18.6, J=4.2, 1H, H-7')	
<sup>13</sup> C NMR (MeOD, 75 MHz)	δ 172.0(C-9'), 167.0(C-9), 146.3(C-7), 146.3(C-4'), 145.4(C-3'), 144.7(C-4), 143.8(C-3), 127.8(C-1'), 126.2(C-1), 121.7(C-6'), 120.3(C-6), 116.1(C-2'), 115.0(C-5), 114.8(C-5'), 113.7(C-2), 112.9(C-8), 99.8(C-8'), 73.1(C-7')	

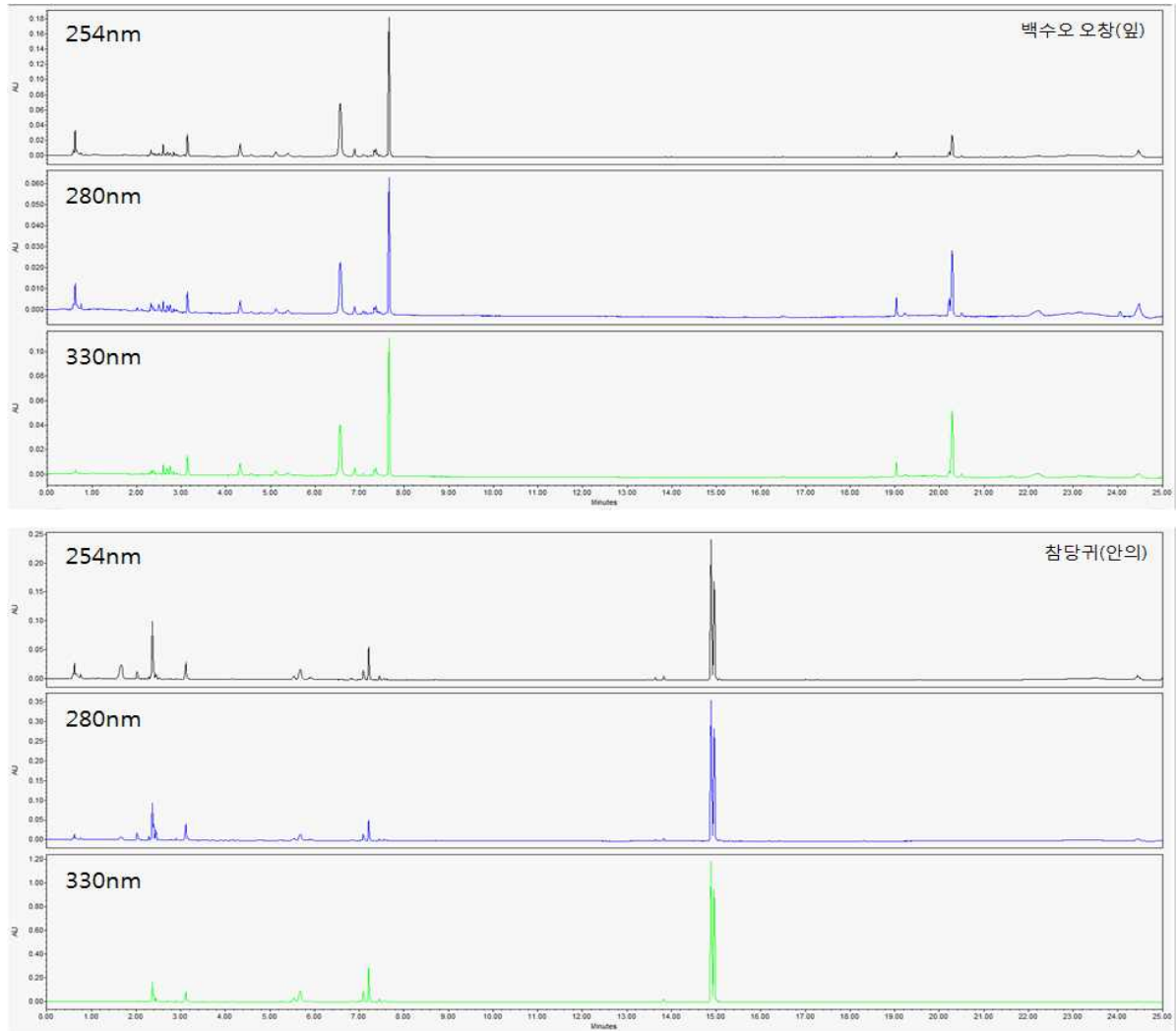
(3) 당귀 : nodakenin

	화합물명	Nodakenin (당귀)
	성상	white powder
	분자식	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>
	분자량	408.40
	MS	TOF-MS( <i>m/z</i> ): [M+H] <sup>+</sup> 409.1503
<sup>1</sup> H NMR (Acetone-D <sub>6</sub> , 300 MHz)	$\delta$ 7.86(d, J=9.3, 1H, H-4), 7.40(s, 1H, H-5), 6.71(s, 1H, H-8), 6.20(d, J=9.3, 1H, H-3), 4.94(m, 1H, H-3'), 4.58(d, J=7.8, 1H, H-1''), 3.28-3.10(m, 4-H, sugar proton), 1.42(s, 3H, gem-CH <sub>3</sub> ), 1.27(s, 3H, gem-CH <sub>3</sub> )	

나. 한방천연물 library 및 profiling 구축

(1) 한방천연물 추출물 구축 : 시료 19종에 대하여 254nm, 280nm, 330nm별로 스펙트럼을 나타내었다.





다. 지리산권역 약용작물(도라지, 하수오, 자소엽, 당귀)의 지표물질 정성·정량 분석

(1) 약용작물 추출 : 지리산권 약용작물 지표물질 정성 12건, 추출조건별 정성 및 정량 분석 15건 완료

Table. Qualitative analysis of compounds from the Medicinal herb

Sample	Compounds	t <sub>R</sub> (min)	Remarks
당귀	decursin	14.877	
	nodakenin	5.665	
자소엽	apigenin	10.190	
	puerarin	2.676	
	luteolin	9.190	
	scopoletin	4.050	
	caffeic acid	2.972	
	rosmarinic acid	7.575	
백수오	gagaminine	13.627	
	4'-Hydroxyacetophenone	3.773	
	2',4'-Dihydroxyacetophenone	5.849	
도라지	platycodin D	14.444	

Table. Proportion and regression equation of compounds from the Medicinal herb

Sample	Compound	t <sub>R</sub> (min)	Regression equation(R <sup>2</sup> )
당귀	Nodakenin	6.630	Y = 7580x - 7620 (0.999)
	Decursin	15.122	Y = 19500x + 11200 (0.999)
하수오	4-Hydroxyacetophenon	3.773	Y = 28600x + 1180 (0.999)
	2,4-DiHydroxyacetophenon	5.849	Y = 22300x - 13000 (0.999)
자소엽	Rosmarinic acid	7.586	Y = 12300x - 14800 (0.998)

Table. Compound content of solvent Extract(1000ug/ml) from Medicinal herb

Sample	Compound	ug/mL				
		50% EtOH	95% EtOH	Water	MeOH	EtOAc
당귀	Nodakenin	30.278	83.767	9.103	73.761	17.544
	Decursin	4.628	214.948	NT	84.656	165.889
백수오	4-Hydroxyacetophenon	1.144	7.563	0.908	1.767	5.759
	2,4-DiHydroxyacetophenon	1.164	11.501	0.800	1.426	7.308
자소엽	Rosmarinic acid	9.148	4.725	5.171	176.177	4.148

## 라. 지리산권역 약용작물(도라지, 하수오, 자소엽, 당귀)의 기능성 대사체 선발

### (1) 당귀 기능성 대사체 선발

(가) UPLC Q-TOF 이용 결과 : 분석 결과, Nodakenin, marmesin, Decursinol, 7-hydroxy-6-(2R-hydroxy-3-methylbut-3-enyl) coumarin, Demethylsuberosin 및 Decursinol angelate이 확인되었었다. Nodakenin, Demethylsuberosin, Decursinol angelate는 주 화합물로 확인되었고, 그 다음으로 Decursinol이 7-hydroxy-6-(2R-hydroxy-3-methylbut-3-enyl)coumarin, marmesin 순으로 확인되었었다. 추후 연구 진행으로 2차년도에 시기별, 부위별에 따라 기능성 대사체의 변화를 분석 할 예정.

### (2) 도라지 기능성 대사체 선발

(가) UPLC Q-TOF 이용 결과 : 분석 결과, Deapioplatycoside E, Platycoside A, Platycodin D2, Platycodin D3, Polygalacin D2 및 Platycodin D가 확인되었었다. 추후 연구 진행으로 2차년도에 시기별, 부위별에 따라 기능성 대사체의 변화를 분석 할 예정이다.

### (3) 자소엽 기능성 대사체 선발

(가) UPLC Q-TOF 이용 결과 : 분석 결과, Caffeic acid 및 Luteolin이 확인되었었다. 추후 연구 진행으로 2차년도에 시기별, 부위별에 따라 기능성 대사체의 변화를 분석 할 예정이다.

### (4) 백수오 기능성 대사체 선발

(가) UPLC Q-TOF 이용 결과 : 분석 결과, 12β-o-(4-hydroxybenzoyl)-8β,14β,17β-tihydroxypregn-2,5-diene-20-one, 3-o-methyl-caudatin, 12-o-vanilloyl-deacymetaplexigenin 및 20-o-salicyl-kidjoranin이 확인되었었다. 위 4개 지표물질은 백수오에서 minor compound로 확인되었었다.

추후 연구 진행으로 주 화합물의 해석과 시기별, 부위별에 따라 기능성 대사체의 변화를 분석할 예정이다.

#### 마. 지리산권역 약용작물(도라지, 하수오, 자소엽, 당귀)의 시험재배

##### (1) 시험재배

(가) 모장 시험재배 : 경남생약농업협동조합에서 보유한 육묘장에서 백수오, 이엽우피소, 적하수오, 도라지, 자소엽, 당귀 종자 및 종근을 재배한 결과를 아래에 나타내었다. 2차년도 계획과 관련하여 약용작물의 원료보급을 위한 재배단지 조성 및 시기별, 부위별 기능성 대사체 분석을 위해 6월 초 재배단지로 이식 예정이다.



Fig. Photograph of *Cynanchum auriculatum* Roylex Wight seedling.



Fig. Photograph of *Angelica gigas* seedling.

### 2-1. 2차년도 연구수행 방법

가. 지리산권역 약용작물(도라지, 백수오, 이엽우피소, 하수오, 자소엽, 당귀)의 시기별, 부위별 기능성 대사체 분석

##### (1) 재료 및 방법

(가) 실험 재료, 시약 및 기기

① 실험 재료 및 시약 : 본 실험에 사용한 당귀, 도라지, 백수오, 이엽우피소, 하수오, 자소엽은 경상남도 산청군 경남생약농업협동조합으로부터 모종, 생육 3개월, 생육 6개월 시료를 제공받아 -20℃에서 냉동보관하면서 사용하였다. 본 연구에서 사용된 시약으로 재료 추출 및 분



석용 시약은 Acetonitrile, Methanol(Gradient grade, Merck 및 HPLC grade, Burdick&jackson, USA), Water(HPLC grade, Burdick&jackson, USA) 을 사용하였다.

② 기기 : 기능성 대사체 분석을 위한 MS(Mass spectrometry)는 Acquity UPLC - Xevo G2-S Q-TOF(Waters, Milford, MA, USA)를 사용하였으며, 컬럼은 UPLC BEH(2.1×50 mm, C18, 1.7 μm, Acquity)를 사용하였다. Chemicals 분석은 Waters UNIFI 1.8 version의 내장된 library와의 비교 및 각각의 peak의 MS fragmentation pattern을 chemspider database와 비교하여 동정하였다.

(나) 유기용매를 이용한 분석시료 조제

① 분석시료 조제 : 당귀, 도라지, 하수오, 이엽우피소, 백수오, 자소엽은 음건한 다음 마쇄하여 사용하였다. 각각의 시료를 무게 및 부피를 고려하여 20~30배 정도의 희석비율로 100% methanol(Gradient grade, Merck 및 HPLC grade, Burdick&jackson, USA)을 첨가하고 7일 동안 상온 교반하여 2회 반복 추출하였다. 시료 100% methanol 추출물은 0.25μm syringe filter로 filtering 한 후 -70°C 의 Deep freezer(CLN-70UW, NIHON, Tokyo, Japan)에 보관하면서 사용하였다.

(다) 분석조건

① MS(Mass spectrometry)는 Acquity UPLC - Xevo G2-S Q-TOF(Waters, Milford, MA, USA), 컬럼은 Acquity UPLC BEH C18(2.1 mm×100 mm 5 μm)를 사용하였다. MS parameter는 capillary 3 kV, sampling cone 30 kV, Extraction cone 7 kV, source temperature 120°C, desolvation temperature 350°C, desolvation gas 800 L/hr 조건 하에 이온화를 시켰으며, 이때 사용한 Leucine enkephalin (556.27 71 m/z)은 정확한 MS를 측정하기 위해 lock mass 용으로 사용하였으며 calibration은 NaF (sodium formate)를 사용하여 calibration을 시켜 주었다.

② 분석조건

- 분석기기: Waters Acquity UPLC - Xevo G2-S Q-TOF
- 분석파장: 254, 280, 330 nm
- 컬럼: Acquity UPLC BEH C18(2.1 mm × 100 mm 1.7 μm)
- 컬럼 온도: 35° C
- 주입량: 1 μL
- 유속: 0.3 mL/min
- 이동상(A) 0.1% formic acid : H<sub>2</sub>O
- 이동상(B) Acetonitrile
- 이동상 gradient 조건

분석시간 (min)	이동상 (A) (%)	이동상 (B) (%)	비고
0	95	5	
0.5	95	5	
3	85	15	
8	50	50	
19	5	95	
25	5	95	
25.5	95	5	
35	95	5	

## 나. 지리산권역 약용작물(도라지, 영정귀, 자소엽, 당귀)의 시험재배

### (1) 시험재배

(가) 시험 재료 : 경남농업협동조합에서 보유한 2015년도 영정귀, 도라지, 자소엽, 당귀 종자 및 종근을 시험재배 시료로 사용하였다.

(나) 시험재배 : 종자는 300립을 흐르는 수돗물에 3일간 침종처리 하였다. 이후 6시간 반건조 시킨 후, 125공 플러그 트레이에 원예용 상토를 충전한 후, 완전히 포수 시키고 1칸에 2립씩 파종하였고 종근은 200개를 72공 플러그 트레이에 1칸에 1개씩 파종하였다. PE필름으로 배지를 덮어 포습상태를 유지한 후 22℃ 암상태의 생장상에 정치시켜 발아시켰다, 7일 후 필름을 걷어내고 발아된 묘는 19~23℃ 온도에서 생육되었으며, 3일에 한번씩 저면관수 하였다. 본엽 4매 나올 때 큰 포트에 이식하여 9주간 재배하였다.

## 2-2. 2차년도 연구결과

### 가. 지리산권역 약용작물(도라지, 백수오, 이엽우피소, 하수오, 자소엽, 당귀)의 시기별, 부위별 기능성 대사체 분석

#### (1) 기능성 대사체 분석

(가) 백수오 시기별, 부위별 대사체 분석

① 백수오 모종의 기능성 대사체 분석 결과는 negative mode 에서는 Quercetin, Kaempferol, 1-O-Feruloylglycerol 등 총 38개의 화합물이 확인되었으며, positive mode에서는 총 2개의 화합물이 검출되었다.

② 백수오 생육 3개월 앞의 기능성 대사체 분석 결과는 negative mode 에서는 Rhamnetin, Quercetin, Kaempferol, 등 총 58개의 화합물이 확인되었으며, positive mode에서는 총 4개의 화합물이 검출되었다.

③ 백수오 생육 3개월 줄기의 기능성 대사체 분석 결과는 negative mode 에서는 7,10,14-Trinethyl-pentadecanone-2, Kaempferol 3-O-β-D-glucopyranoside, Rhamnocitrin-3-O-β-D-glucoside 등 총 49개의 화합물이 확인되었으며, positive mode에서는 총 3개의 화합물이 검출되었다.

④ 백수오 생육 3개월 뿌리의 기능성 대사체 분석 결과는 negative mode 에서는 2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2-O-(6''-O-α-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside, 1-O-Feruloylglycerol, Ginsenoside Rg2 등 총 52개의 화합물이 확인되었으며, positive mode에서는 총 3개의 화합물이 검출되었다.

⑤ 백수오 생육 6개월 앞의 기능성 대사체 분석 결과는 negative mode 에서는 생육 3개월과 비슷한 화합물인 Rhamnetin, Quercetin, Kaempferol, 등 총 68개의 화합물이 확인되었으며, positive mode에서는 총 2개의 화합물이 검출되었다.

⑥ 백수오 생육 6개월 줄기의 기능성 대사체 분석 결과는 negative mode 에서는 생육 3개월과 비슷한 화합물인 7,10,14-Trinethyl-pentadecanone-2, Kaempferol 3-O-β-D-glucopyranoside, Rhamnocitrin-3-O-β-D-glucoside 등 총 58개의 화합물이 확인되었으며, positive mode에서는 총 4개의 화합물이 검출되었다.

⑦ 백수오 생육 6개월 뿌리의 기능성 대사체 분석 결과는 negative mode 에서는 생육 3개월과 비슷한 화합물인 2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2-O-(6''-O-α-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside, 1-O-Feruloylglycerol, Ginsenoside Rg2 등 총 62개의 화합물이 확인되었으며, positive mode에서는 총 7

개의 화합물이 검출되었다.

(나) 하수오 시기별, 부위별 대사체 분석

① 하수오 모종의 UPLC Q-TOF를 이용하여 기능성 대사체 분석 결과는 negative mode 에서는 Gallocatechin hexaacetate, Kaempferol, Quercetin-3-O-xyloside 등 총 103개의 화합물이 확인되었으며, positive mode에서는 총 4개의 화합물이 검출되었다.

② 하수오 생육 3개월 앞의 기능성 대사체 분석 결과는 negative mode 에서는 Epicatechin, 13-Hydroxy-9,11-hexadecadienoic acid, Kaempferol 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside 등 총 86개의 화합물이 확인되었으며, positive mode에서는 총 4개의 화합물이 검출되었다.

③ 하수오 생육 3개월 줄기의 기능성 대사체 분석 결과는 negative mode 에서는 Quercetin-3-O-arabioside, Acacetin-7-O- $\beta$ -D-glucoside, Kaempferol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside 등 총 59개의 화합물이 확인되었으며, positive mode에서는 총 18개의 화합물이 검출되었다.

④ 하수오 생육 3개월 뿌리의 기능성 대사체 분석 결과는 negative mode 에서는 2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2,3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, Ginsenoside Rh2, Isorhamnetin-3-gentiobioside-7-glucoside 등 총 63개의 화합물이 확인되었으며, positive mode에서는 총 18개의 화합물이 검출되었다.

⑤ 하수오 생육 6개월 앞의 기능성 대사체 분석 결과는 negative mode 에서는 생육 3개월과 비슷한 화합물인 Epicatechin, 13-Hydroxy-9,11-hexadecadienoic acid, Kaempferol 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside 등 총 84개의 화합물이 확인되었으며, positive mode에서는 총 21개의 화합물이 검출되었다.

⑥ 하수오 생육 6개월 줄기의 기능성 대사체 분석 결과는 negative mode 에서는 생육 3개월과 비슷한 화합물인 Quercetin-3-O-arabioside, Acacetin-7-O- $\beta$ -D-glucoside, Kaempferol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside 등 총 70개의 화합물이 확인되었으며, positive mode에서는 총 20개의 화합물이 검출되었다.

⑦ 하수오 생육 6개월 뿌리의 기능성 대사체 분석 결과는 negative mode 에서는 생육 3개월과 비슷한 화합물인 2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2,3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, Ginsenoside Rh2, Isorhamnetin-3-gentiobioside-7-glucoside 등 총 71개의 화합물이 확인되었으며, positive mode에서는 총 23개의 화합물이 검출되었다.

(다) 이엽우피소 시기별, 부위별 대사체 분석

① 이엽우피소 모종의 UPLC Q-TOF를 이용하여 기능성 대사체 분석 결과는 negative mode 에서는 Kaempferol 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, Terrestriamide, Zanthosimuline 등 총 49개의 화합물이 확인되었으며, positive mode에서는 총 21개의 화합물이 검출되었다.

② 이엽우피소 생육 3개월 앞의 기능성 대사체 분석 결과는 negative mode 에서는 Isorhamnetin, Ganoderenic acid D, 6-Hydroxykaempferol-3-O-glucoside 등 총 44개의 화합물이 확인되었으며, positive mode에서는 총 21개의 화합물이 검출되었다.

③ 이엽우피소 생육 3개월 줄기의 기능성 대사체 분석 결과는 negative mode 에서는 Nonanedioic acid, 10,13-Methyl octadecadienoate, Luteolin 등 총 45개의 화합물이 확인되었으며, positive mode에서는 총 9개의 화합물이 검출되었다.

④ 이엽우피소 생육 3개월 뿌리의 기능성 대사체 분석 결과는 negative mode 에서는 Ginsenoside Rh4, Isodahurinol, Dihydropalmitine, Nonanedioic acid 등 총 56개의 화합물이 확인되었으며, positive mode에서는 총 24개의 화합물이 검출되었다.

⑤ 이엽우피소 생육 6개월 앞의 기능성 대사체 분석 결과는 negative mode 에서는 생육 3개월과 비슷한 화합물인 6-Hydroxykaempferol-3-O-glucoside, Kaempferol-3-gentiobioside, Ganoderenic acid D

등 총 65개의 화합물이 확인되었으며, positive mode에서는 총 17개의 화합물이 검출되었다.

⑥ 이엽우피소 생육 6개월 줄기의 기능성 대사체 분석 결과는 negative mode에서는 생육 3개월과 비슷한 화합물인 Nonanedioic acid, 10,13-Methyl octadecadienoate, Luteolin 등 총 52개의 화합물이 확인되었으며, positive mode에서는 총 11개의 화합물이 검출되었다.

⑦ 이엽우피소 생육 6개월 뿌리의 기능성 대사체 분석 결과는 negative mode에서는 생육 3개월과 비슷한 화합물인 2Ginsenoside Rh4, Isodahurinol, Dihydropalmatine, Nonanedioic acid 등 총 63개의 화합물이 확인되었으며, positive mode에서는 총 29개의 화합물이 검출되었다.

(라) 도라지 시기별, 부위별 대사체 분석

① 도라지 모종의 UPLC Q-TOF를 이용하여 기능성 대사체 분석 결과는 negative mode에서는 Ginsenoside Rh4, Sophorabioside, Galloyloxypaeoniflorin 등 총 38개의 화합물이 확인되었으며, positive mode에서는 총 14개의 화합물이 검출되었다.

② 도라지 생육 3개월의 기능성 대사체 분석 결과는 negative mode에서는 1,3-O-Dicaffeoylquinic acid, Quercetin-3-O- $\alpha$ -L-rhamnoside, Picrasinoside G 등 총 64개의 화합물이 확인되었으며, positive mode에서는 총 26개의 화합물이 검출되었다.

③ 도라지 생육 6개월 잎과 줄기의 기능성 대사체 분석 결과는 negative mode에서는 Apigenin-7-O- $\beta$ -D-glucuronopyranoside, Flavone,5,7-dihydroxy-4'-O- $\alpha$ -D-glucoside, Ginsenoside Rh2 등 총 49개의 화합물이 확인되었으며, positive mode에서는 총 18개의 화합물이 검출되었다.

④ 도라지 생육 6개월 뿌리의 기능성 대사체 분석 결과는 negative mode에서는 Ginsenoside Rh4, Eclalbasaponin, Trachelosperoside 등 총 26개의 화합물이 확인되었으며, positive mode에서는 총 8개의 화합물이 검출되었다.

(마) 당귀 시기별, 부위별 대사체 분석

① 당귀 모종의 UPLC Q-TOF를 이용하여 기능성 대사체 분석 결과는 negative mode에서는 Vernolic acid, Caffeoyquinic acid, Decursidate, Hesperidin 등 총 60개의 화합물이 확인되었으며, positive mode에서는 총 25개의 화합물이 검출되었다.

② 당귀 생육 3개월의 기능성 대사체 분석 결과는 negative mode에서는 Nodakenin, Decursinol, Decursidate 등 총 80개의 화합물이 확인되었으며, positive mode에서는 총 48개의 화합물이 검출되었다.

③ 당귀 생육 6개월 잎과 줄기의 기능성 대사체 분석 결과는 negative mode에서는 Feruloylquinic acid, 7-O-[4'-O-(3'',4''-Dihydroxycinnamyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-6-methoxycoumarin, Leucocyanidin 등 총 54개의 화합물이 확인되었으며, positive mode에서는 총 32개의 화합물이 검출되었다.

④ 당귀 생육 6개월 뿌리의 기능성 대사체 분석 결과는 negative mode에서는 Decursidate, Pinoresinol-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, Nodakenin 등 총 36개의 화합물이 확인되었으며, positive mode에서는 총 21개의 화합물이 검출되었다.

(바) 자소엽 시기별, 부위별 대사체 분석

① 자소엽 모종의 UPLC Q-TOF를 이용하여 기능성 대사체 분석 결과는 negative mode에서는 Rosmarinic acid, Kaempferol 3-O- $\beta$ -D-glucuronopyranoside, Rhein 8-glucoside 등 총 38개의 화합물이 확인되었으며, positive mode에서는 총 8개의 화합물이 검출되었다.

② 자소엽 생육 3개월 잎의 기능성 대사체 분석 결과는 negative mode에서는 Rosmarinic acid, 5,7,2'-Trihydroxy-flavanone-4'-O- $\beta$ -D-glucoside, Luteolin-7-O-glucuronide 등 총 70개의 화합물이 확인되었으며, positive mode에서는 총 27개의 화합물이 검출되었다.

③ 자소엽 생육 3개월 줄기의 기능성 대사체 분석 결과는 negative mode에서는 Rosmarinic

acid, Hyptatic acid, Phytolaccagenic acid 등 총 34개의 화합물이 확인되었으며, positive mode에서는 총 9개의 화합물이 검출되었다.

④ 자소엽 생육 3개월 뿌리의 기능성 대사체 분석 결과는 negative mode 에서는 Rosmarinic acid, Caffeic acid, Hydroxy tetracosanic acid 등 총 40개의 화합물이 확인되었으며, positive mode에서는 총 10개의 화합물이 검출되었다.

### 나. 지리산권역 약용작물(도라지, 백수오, 이엽우피소, 하수오, 자소엽, 당귀)의 시기별, 부위별 Marker 분석

#### (1) Marker 분석

(가) 백수오 시기별, 부위별 Marker 분석 결과는 모종, 생육 3개월, 생육 6개월, 잎, 줄기, 뿌리별로 모두 다른 그룹으로 통계 결과가 나타났으며, S-plot 결과에서는 공통 화합물외에 이들을 구분할 수 있는 marker 후보군들을 알 수 있었다. 이러한 marker들은 추후 생육시기에 따른 물질변화 및 원료 검증에 기초 자료로 사용될 것으로 예상된다.

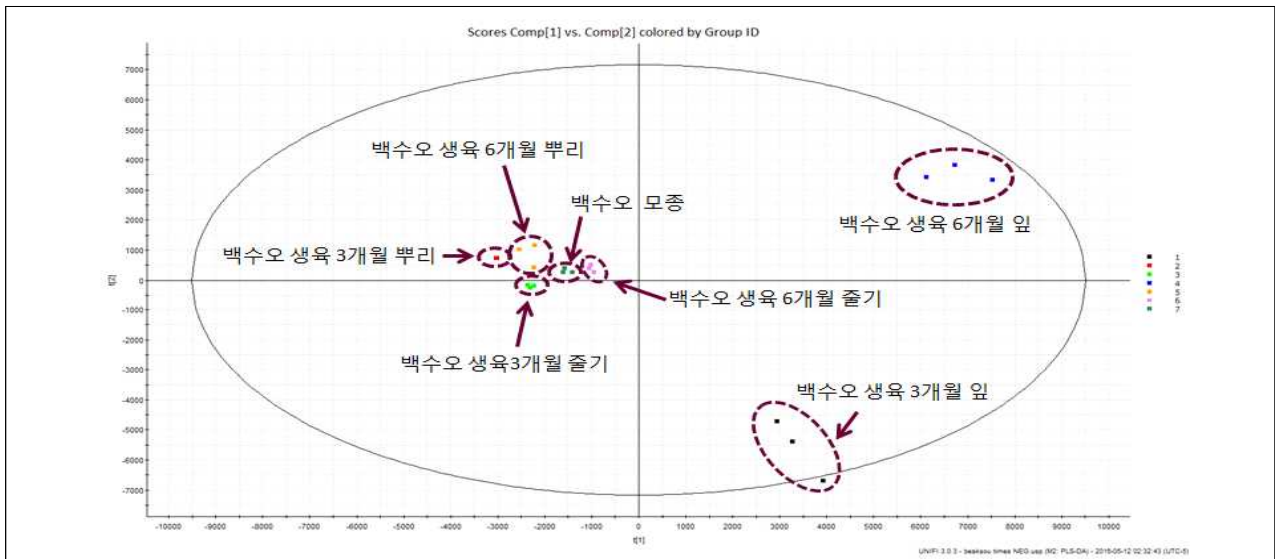


Figure. Identification of compounds from *Cynanchum wilfordii*

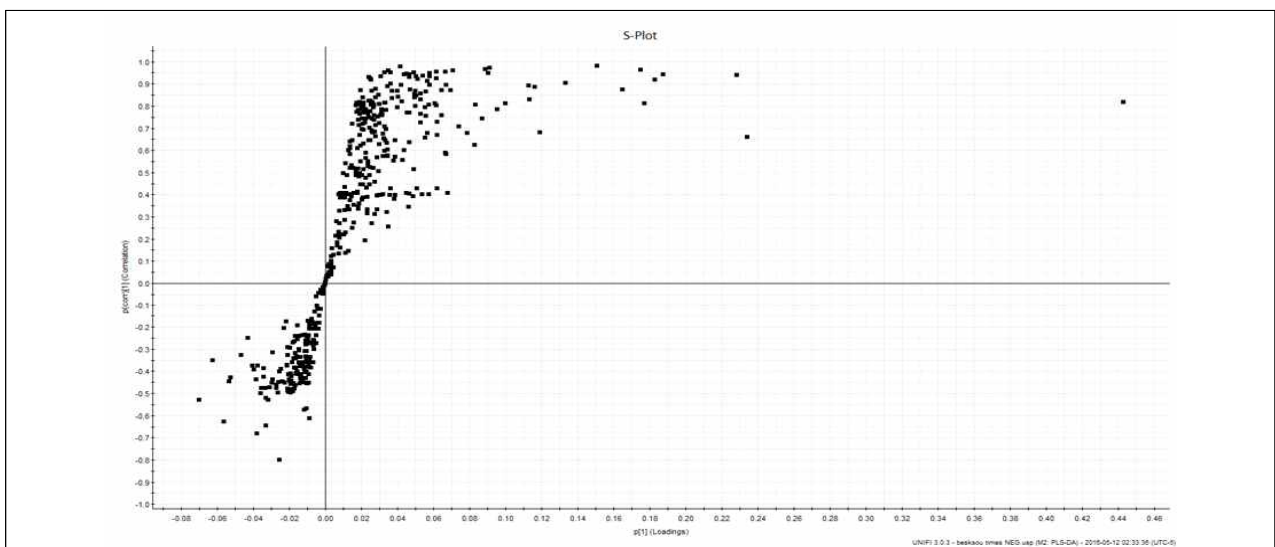


Figure. PCA score scatter and loading plot for the most representative metabolites (UPLC-QTOF-MS) of the methanol extract of *Cynanchum wilfordii*

(나) 하수오 시기별, 부위별 Marker 분석 결과는 모종, 생육 3개월, 생육 6개월, 잎, 줄기, 뿌리별로 모두 다른 그룹으로 통계 결과가 나타났으며, S-plot 결과에서는 공통 화합물외에 이들을 구분할 수 있는 marker 후보군들을 알 수 있었다. 이러한 marker들은 추후 생육시기에 따른 물질변화 및 원료 검증에 기초 자료로 사용될 것으로 예상된다.

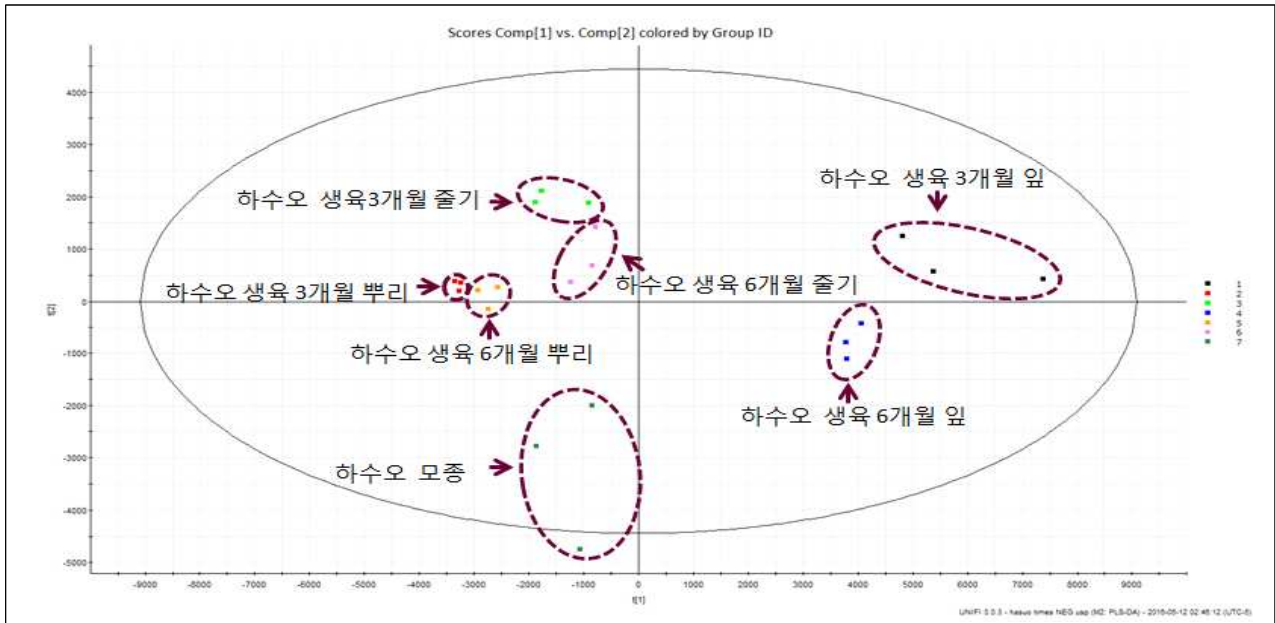


Figure. Identification of compounds from *Polygonum multiflorum*

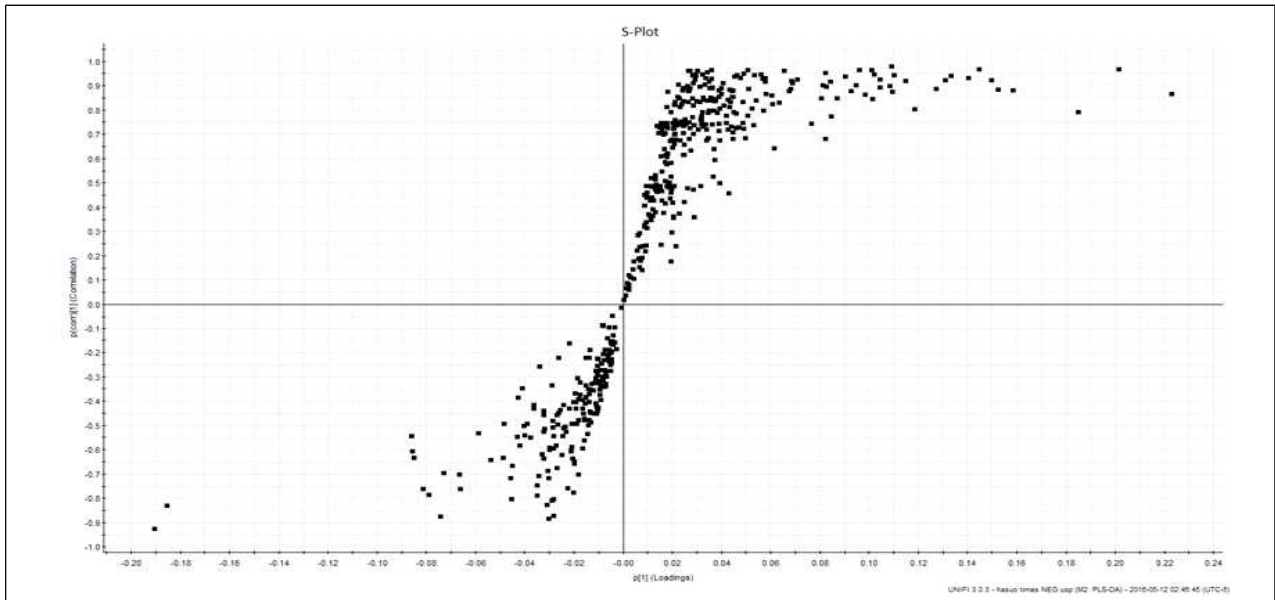


Figure. PCA score scatter and loading plot for the most representative metabolites (UPLC-QTOF-MS) of the methanol extract of *Polygonum multiflorum*

(다) 이엽우피소 시기별, 부위별 Marker 분석 결과는 모종, 생육 3개월, 생육 6개월, 잎, 줄기, 뿌리별로 모두 다른 그룹으로 통계 결과가 나타났으며, S-plot 결과에서는 공통 화합물외에 이들을 구분할 수 있는 marker 후보군들을 알 수 있었다. 이러한 marker들은 추후 생육시기에 따른 물질변화 및 원료 검증에 기초 자료로 사용될 것으로 예상된다.

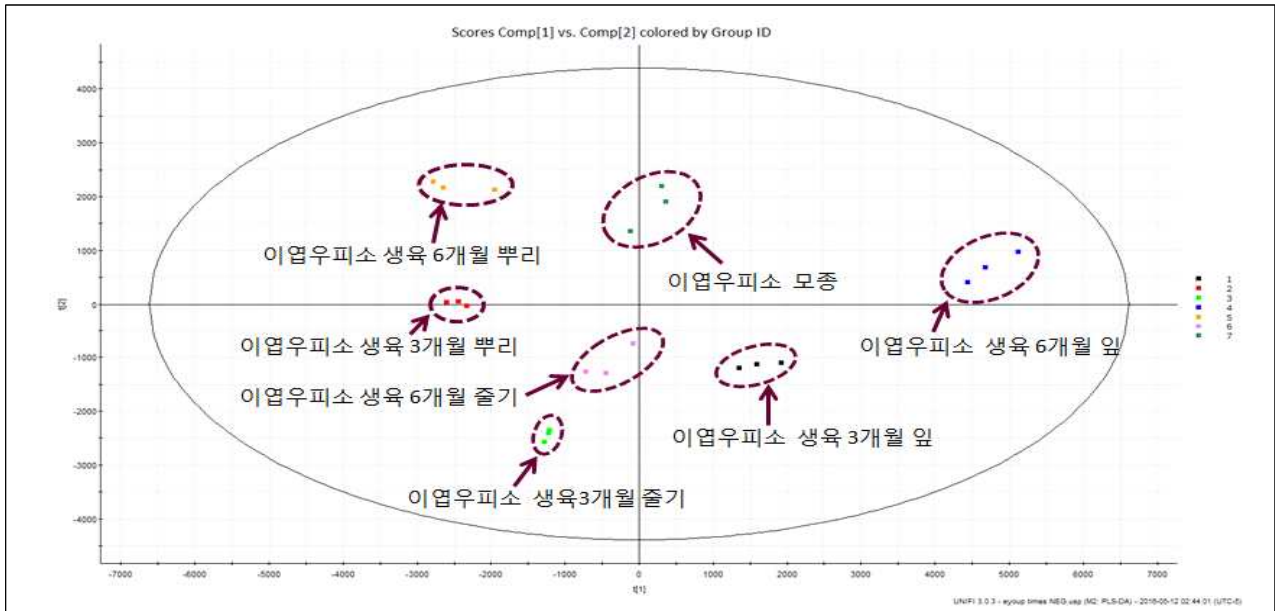


Figure. Identification of compounds from *Cynanchum auriculatum*

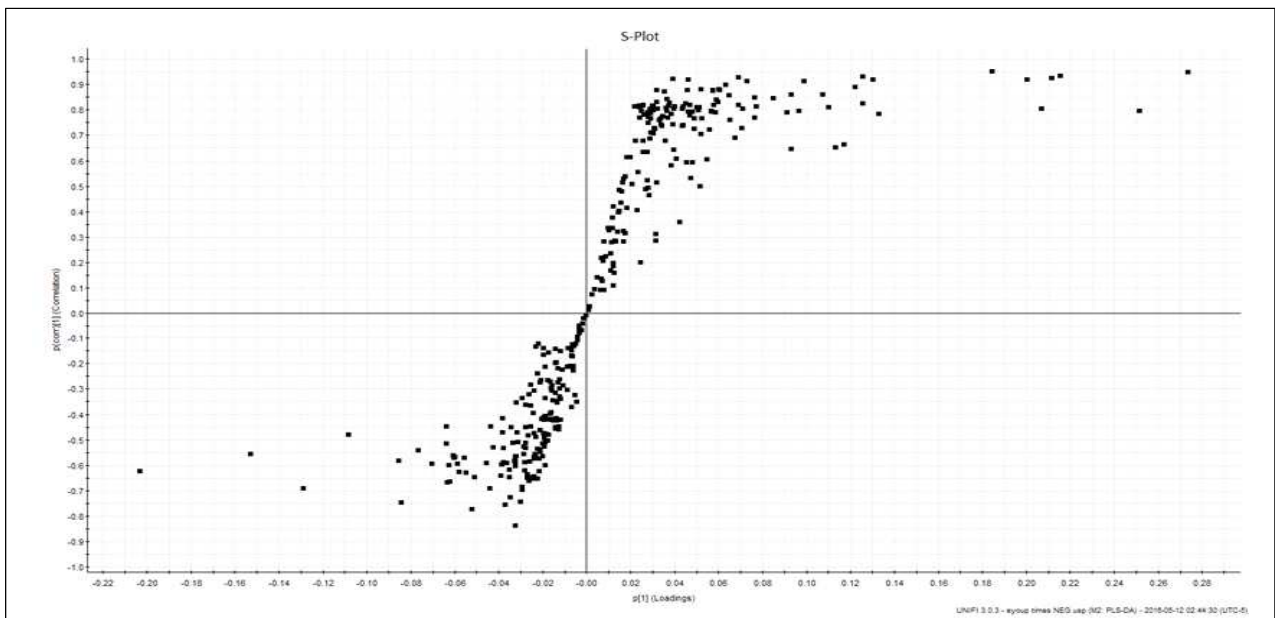


Figure. PCA score scatter and loading plot for the most representative metabolites (UPLC-QTOF-MS) of the methanol extract of *Cynanchum auriculatum*

(라) 도라지 시기별, 부위별 Marker 분석 결과는 모종, 생육 3개월, 생육 6개월, 잎, 줄기, 뿌

리별로 모두 다른 그룹으로 통계 결과가 나타났으며, S-plot 결과에서는 공통 화합물외에 이들을 구분할 수 있는 marker 후보군들을 알 수 있었다. 이러한 marker들은 추후 생육시기에 따른 물질변화 및 원료 검증에 기초 자료로 사용될 것으로 예상된다.

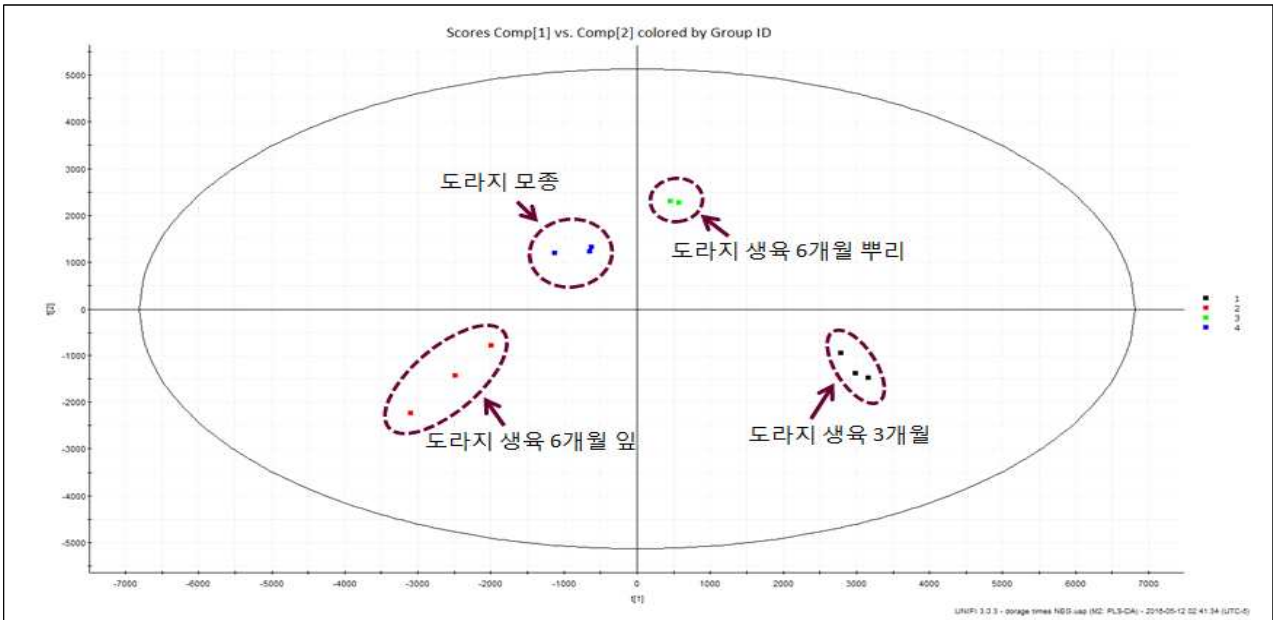


Figure. Identification of compounds from *Platycodon grandiflorum*

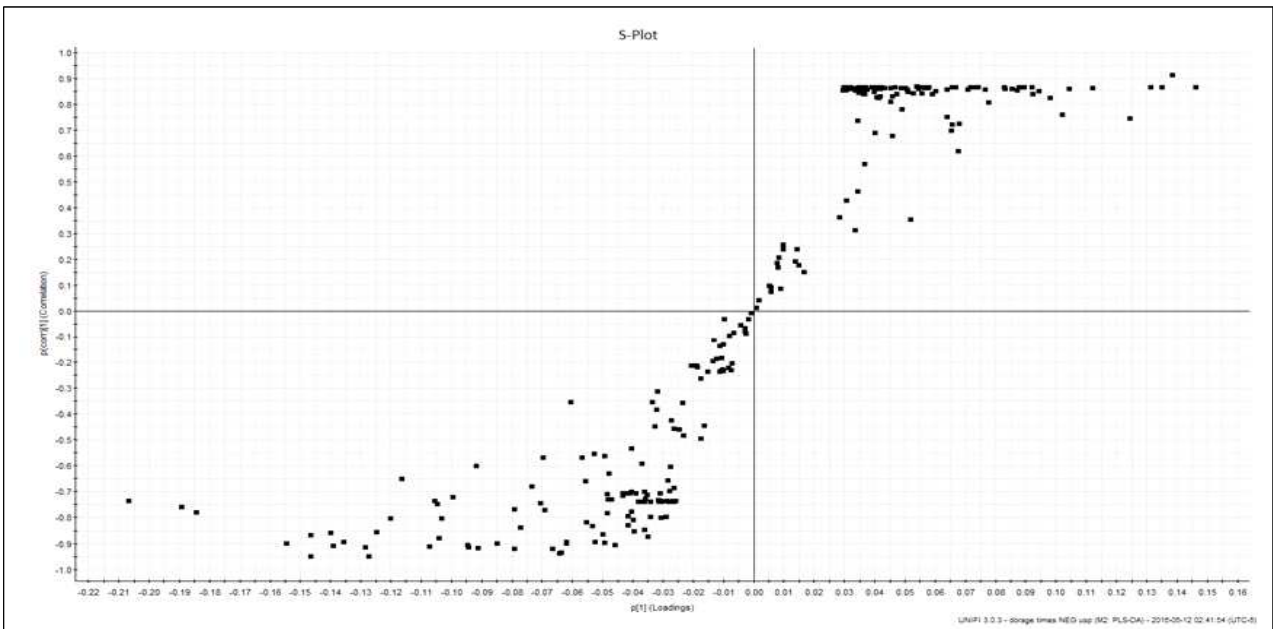


Figure. PCA score scatter and loading plot for the most representative metabolites (UPLC-QTOF-MS) of the methanol extract of *Platycodon grandiflorum*



(마) 당귀 시기별, 부위별 Marker 분석 결과는 모종, 생육 3개월, 생육 6개월, 잎, 줄기, 뿌리별로 모두 다른 그룹으로 통계 결과가 나타났으며, S-plot 결과에서는 공통 화합물외에 이들을 구분할 수 있는 marker 후보군들을 알 수 있었다. 이러한 marker들은 추후 생육시기에 따른 물질변화 및 원료 검증에 기초 자료로 사용될 것으로 예상된다.

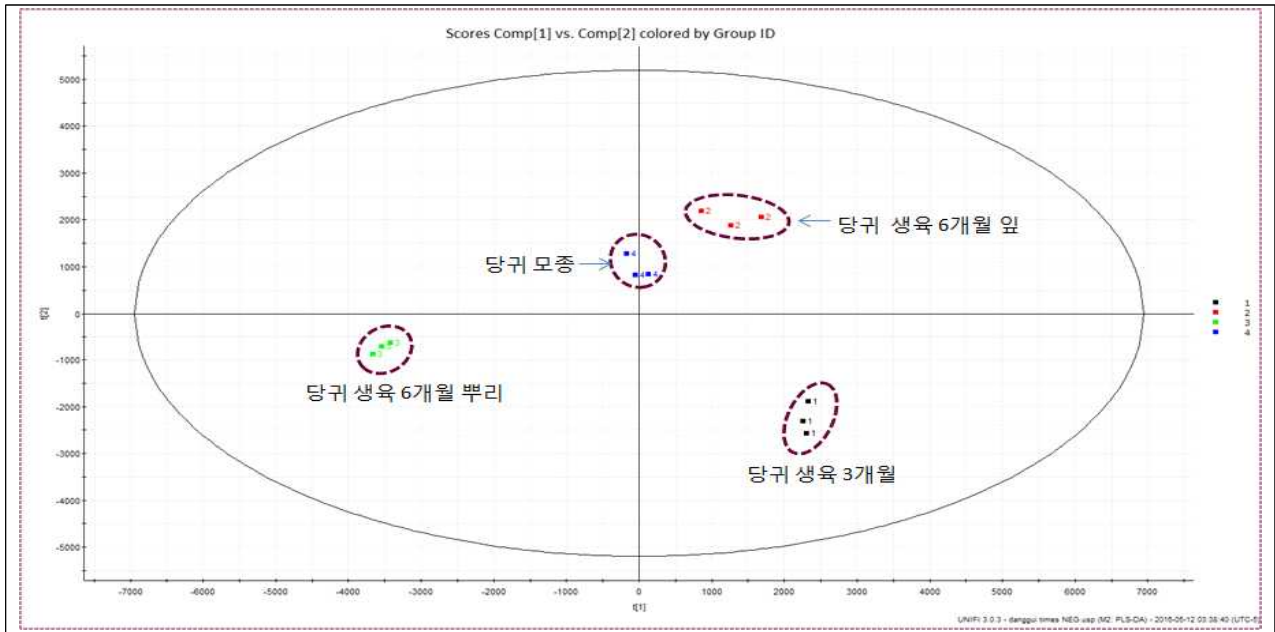


Figure. Identification of compounds from *Angelica gigas*

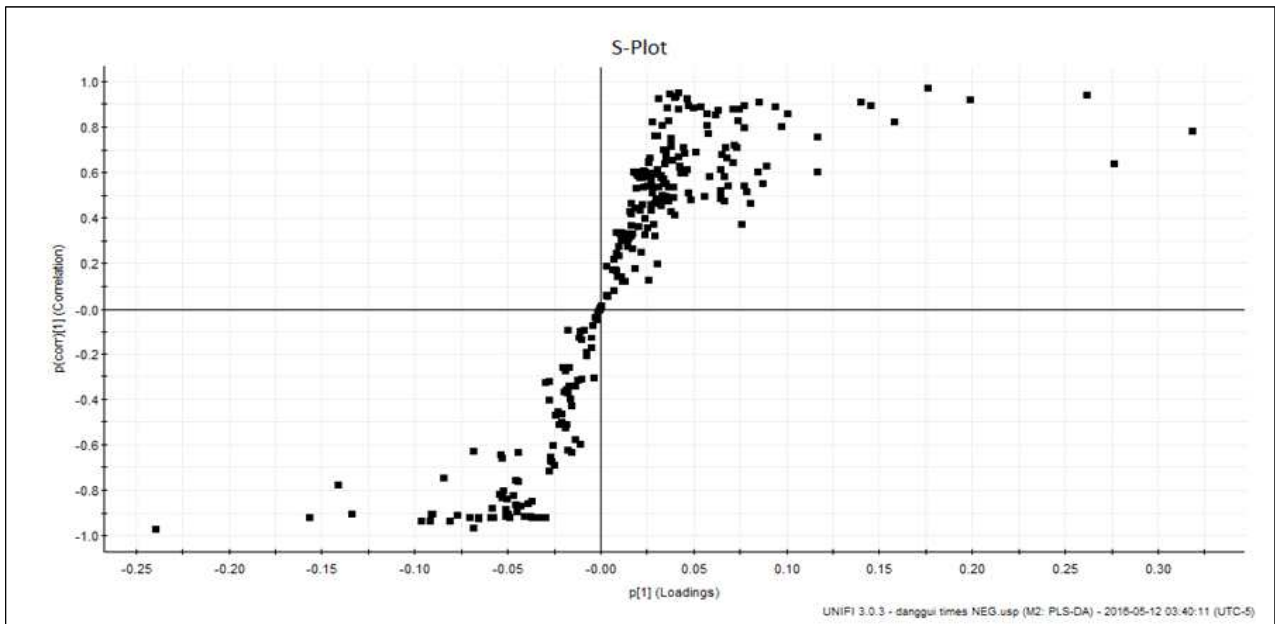


Figure. PCA score scatter and loading plot for the most representative metabolites (UPLC-QTOF-MS) of the methanol extract of *Angelica gigas*

(바) 자소엽 시기별, 부위별 Marker 분석 결과는 모종, 생육 3개월, 생육 6개월, 잎, 줄기, 뿌리별로 모두 다른 그룹으로 통계 결과가 나타났으며, S-plot 결과에서는 공통 화합물외에 이들을 구분할 수 있는 marker 후보군들을 알 수 있었다. 이러한 marker들은 추후 생육시기에 따른 물질변화 및 원료 검증에 기초 자료로 사용될 것으로 예상된다.

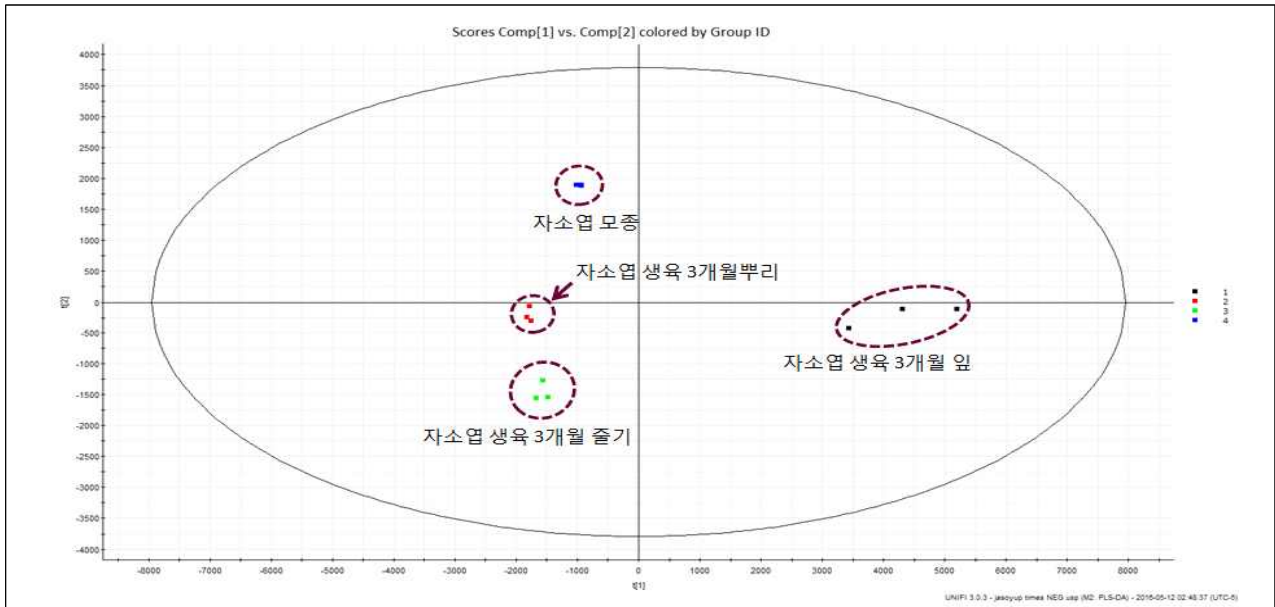


Figure. Identification of compounds from *Perilla frutescens* var. *acuta*

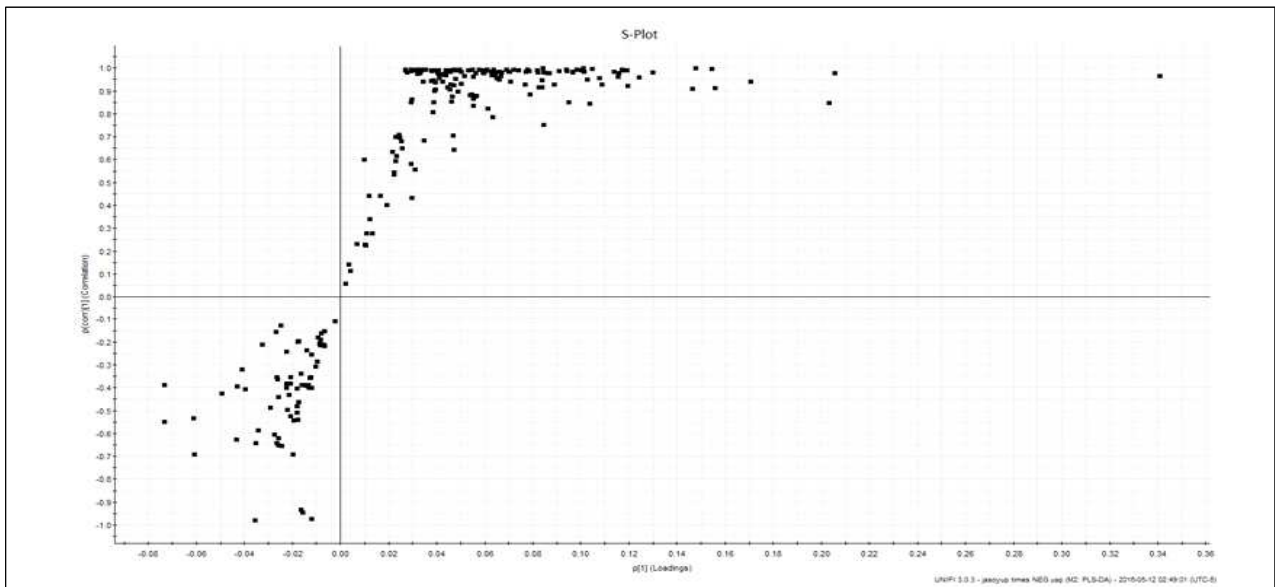


Figure. PCA score scatter and loading plot for the most representative metabolites (UPLC-QTOF-MS) of the methanol extract of *Perilla frutescens* var. *acuta*

#### 다. 지리산권역 약용작물(도라지, 영경귀, 자소엽, 당귀)의 시험재배

##### (1) 시험재배

(가) 경남생약농업협동조합에서 보유한 육묘장에서 1차년도에 백수오, 이엽우피소, 적하수오, 도라지, 자소엽, 당귀 종자 및 종근을 재배하여 시험재료 및 제품개발과 관련하여 사용하였고, 3차년도 계획과 관련하여 약용작물의 원료보급을 위한 재배단지 조성 및 대량생산체제확립을 위하여 재배단지를 조성하였다.



Figure. Photograph of *Cynanchum wilfordii* Hemsley(A), *Platycodon grandiflorum* and *Angelica gigas*(B), *Perillafrutescen*(C), *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight(D), *Polygonum multiflori radix*(E) for three month.



Figure. Photograph of *Platycodon grandiflorum*(A), *Polygonum multiflori radix*(B), *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight(C), *Cynanchum wilfordii* Hemsley(D), *Perillafrutescen*(E), *Angelica gigas*(F) for six month



Figure. Photograph of *Cirsium japonicum* seedling.

### 3-1. 3차년도 연구수행 방법

#### 가. 구축된 profiring 기반 대량추출체계 확립 및 표준화

##### (1) 추출조건에 따른 수율 측정

수율 측정을 위한 추출방법은 개똥썩 잎을 분쇄한 뒤 10 g을 round bottom flask (500 mL)에 넣고 deionized water 와 fermented ethanol 비율을 10:0, 8:2, 6:4, 4:6 2:8, 0:10로 하여 각 flask에 용매 비율별로 용매 250 mL을 가한 뒤 환류 냉각 장치를 장착한 water bath에서 80 및 100°C로 가열하면서 6시간 동안 추출하였다. 추출액은 filter paper로 여과하여 모은 여과액은 감압회전농축기로 용매를 제거한 뒤 전자저울로 칭량하여 추출 수율을 측정하였다.

##### (2) 생리활성 검증

###### (가) 총 페놀 함량

① 총 페놀 함량은 Folin-Denis법을 일부 변형하여 측정하였다. 즉, 시료 추출물 10  $\mu$ L에 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  용액 200 $\mu$ L 첨가하여 3분간 정치시켰다. 그 후 1 N Folin-Ciocalteu reagent 10  $\mu$ L 첨가 및 혼합한 후 37°C incubator에서 27분간 발색시켰다. 발색시킨 시료는 Multimicroplate reader(SpectraMax M5, Molecular Devices, USA)를 사용하여 750 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. 총 페놀 함량은 gallic acid를 이용하여 작성한 표준 검량곡선에 의해 값을 산출하였으며 GAE mg/100g으로 나타내었다.

###### (나) 총 플라보노이드 함량

② 총 플라보노이드 함량은 Jia 등의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 시료 추출물 10  $\mu$ L에 DW 117  $\mu$ L와 5%  $\text{NaNO}_2$  7.5  $\mu$ L를 첨가하여 5분간 정치시켰다. 10%  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  15  $\mu$ L를 첨가한 뒤 6분 후 1 M NaOH 50  $\mu$ L를 가하여 암실에서 11분간 반응시켰다. 그 후 Multimicroplate reader(SpectraMax M5, Molecular Devices, USA)를 사용하여 510 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. 총 페놀 함량은 (+)-catechin을 이용하여 작성한 표준 검량곡선에 의해 값을 산출하였으며 GE mg/100g으로 나타내었다.

###### (다) DPPH free radical scavenging activity

③ DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거 활성은 Blois 등의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 시료를 농도별(0.250, 0.125, 0.0625, 0.03125 mg/mL)로 희석한 후 96-well plate에 10  $\mu$ L와 0.15 mM DPPH용액 200  $\mu$ L을 가한 다음, 실온에서 30분간 반응시켜 Multimicroplate reader(SpectraMax M5, Molecular Devices, USA)를 사용하여 520 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. 양성대조군으로는 L-ascorbic acid를 사용하였으며 전자공여능은  $[1 - (\text{시료첨가구의 흡광도} / \text{음성대조구의 흡광도})] \times 100$ 으로 계산하여  $\text{IC}_{50}$ 로 나타내었다.

###### (라) ABTS cation radical scavenging activity

④ ABTS [2,2-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)] radical 소거 활성은 Re 등의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 7 mM ABTS 용액에 2.45 mM의 potassium persulfate를 1:1로 혼합한 후 암실에서 24시간 방치시켜 ABTS radical ( $\text{ABTS}^+ \cdot$ )을 형성시킨 후 732 nm에서 대조구의 흡광도 값이  $0.7 \pm 0.02$ 가 되도록 PBS(phosphate buffer saline, pH 7.4) buffer로 희석하여 사용하였다. 96-well plate에 희석된 ABTS radical 용액 190  $\mu$ L와 시료 추출물 10  $\mu$ L를 첨가하여 5분간 정치시킨 후 Multimicroplate reader (SpectraMax M5, Molecular Devices, USA)를 사용하여 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로는 L-ascorbic acid를 사용하였으며 ABTS radical 소거능은  $[1 - (\text{시료첨가구의 흡광도} / \text{음성대조구의 흡광도})] \times 100$ 으로 계

산하여 IC<sub>50</sub>로 나타내었다.

(마) 지표물질 분석

① osmaric acid, nodakenin 및 decursin 각각 100% MeOH을 가하여 1 mg/mL의 농도로 녹여 표준액으로 사용하였다. 분석용 표준물질과 시료액은 0.22 µm membrane filter로 여과한 후 사용하였다. 지표물질 분석은 Waters Acquity UPLC을, analytical column은 Acquity UPLC BEH C18(2.1 mm X 100 mm 1.7 µm)을 사용하였다. column 및 sample 온도는 각각 35°C, 10°C, flow rate는 0.4 mL/min, injection은 2 µL, mobile phase는 (A) 0.1% formic acid in H<sub>2</sub>O, (B) Acetonitrile를 사용하여 Table 1과 같은 gradient 조건으로 분석하였다. 각각의 지표물질은 검량선을 작성하여 시료 추출물의 함량을 측정하였다.

Table. Analytical conditions of UPLC for marker compounds

Rosmaric acid			Nodakenin, Decursin		
UV 240 nm			UV 330 nm		
Time	A	B	Time	A	B
0	100	0	0	100	0
3	100	0	1	80	20
4	75	25	2	70	30
7	75	25	6	60	40
10	0	100	11	60	40
12	0	100	12	10	90
13	0	100	13	10	90
14	100	0	14	100	0
15	100	0	15	100	0

(3) 대량추출법 확립

(가) 시제품 생산

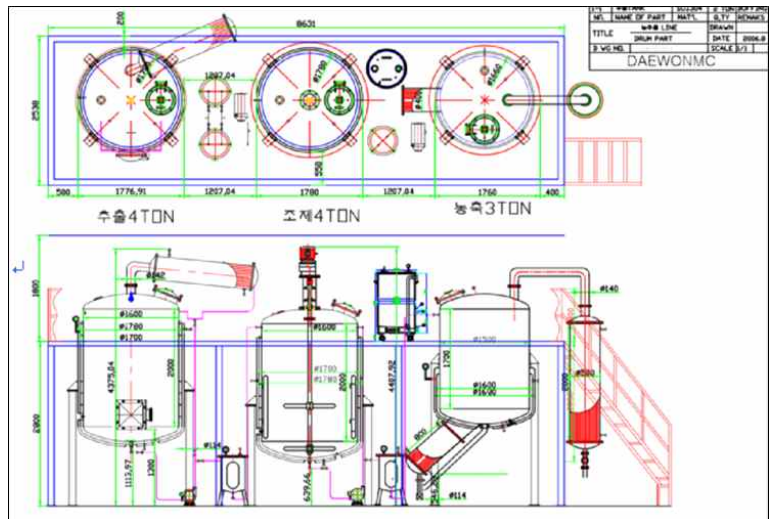
- ① 일반세균, 토양미생물 등의 오염 방지
- ② 타 재료와의 혼합 용이

(나) 대량 추출 체계 확립

- ① 소단위 추출법 연구결과를 근거로 하여 대량 추출 시도
- ② 생산성 향상 추진

※ 농추출설비 개요

- 설비명 : 경남생약농업협동조합 농추출라인
- 제조사 : 대원정밀
- 용량 : 추출기 4톤, 교반기 4톤, 농축기 3톤
- 재질 : SUS304
- 농축원리 : 초고속 진공 농축



나. 지리산권역 약용작물의 대량 재배기술 확립

(1) 시험재배

- (가) 지리산 권역 약용작물 육묘방법 개발

(나) 지리산 권역 약용작물 생육환경 연구

(다) 지리산 권역 약용작물 재배단지 조성 방안 모색

### 3-2. 3차년도 연구결과

#### 가. 구축된 profiring 기반 대량추출체계 확립 및 표준화

##### (1) 추출조건에 따른 수율 측정

(가) 추출용매별 엉겅퀴 지상부, 지하부, 당귀, 자소엽 및 도라지 추출물의 추출수율 결과는 Table 2과 같다. 추출수율은 엉겅퀴 지상부 8:2 추출물이 18.24%, 엉겅퀴 지하부 EtOH 추출물이 11.43%, 당귀 8:2 추출물이 13.45%, 자소엽 8:2추출물이 25.22%, 도라지 EtOH 추출물이 10.80%로 높게 나타났으며 대체적으로 ethanol의 용매 비율이 높을수록 높은 수율 경향을 보였다.

Table. Extraction yields of 5 kinds of medicinal plants extracted by different solvent combination rate

Temperature	Extraction solvent (water : FE)	Sample weight(g)	Extraction weight (g)	Yield (%)
<i>C. japonicum</i> Leaf	EtOH	10.08	1.51	14.98
	EtOH 8:2 DW	10.8	1.97	18.24
	EtOH 5:5 DW	10.05	1.65	16.42
	EtOH 2:8 DW	10.1	1.35	13.37
	DW	10.02	1.41	15.07
<i>C. japonicum</i> Root	EtOH	10.06	1.15	11.43
	EtOH 8:2 DW	10.05	1.13	11.24
	EtOH 5:5 DW	10.08	1.08	10.71
	EtOH 2:8 DW	10.07	1.06	10.53
	DW	10.01	0.99	9.89
<i>A. gigas</i>	EtOH	10.09	1.21	11.99
	EtOH 8:2 DW	10.04	1.35	13.45
	EtOH 5:5 DW	10.08	1.14	11.31
	EtOH 2:8 DW	10.06	1.07	10.64
	DW	10.03	1.04	10.37
<i>P. sikokiana</i>	EtOH	10.04	1.64	16.33
	EtOH 8:2 DW	10.07	2.54	25.22
	EtOH 5:5 DW	10.08	2.13	21.13
	EtOH 2:8 DW	10.11	2.07	20.47
	DW	10.01	1.52	15.18
<i>P. grandiflorus</i>	EtOH	10.09	1.09	10.80
	EtOH 8:2 DW	10.07	0.98	9.73
	EtOH 5:5 DW	10.08	0.91	9.03
	EtOH 2:8 DW	10.04	0.85	8.47
	DW	10.02	0.84	8.38

##### (2) 생리활성 검증

(가) 총 페놀 함량 : 추출용매별 엉겅퀴 지상부, 지하부, 당귀, 자소엽 및 도라지 추출물의 총 페놀 함량을 측정된 결과는 아래와 같다. 추출물별 총 페놀 함량은 각각 엉겅퀴 지상부의 8:2 추출물에서  $6857.472 \pm 25.76$  mg GAE/100g, 엉겅퀴 지하부의 EtOH 추출물에서  $4615.507 \pm 33.36$  mg GAE/100g, 당귀의 8:2 추출물에서  $3915.746 \pm 126.10$  mg GAE/100g, 자소엽의 8:2 추출물에서  $12698.366 \pm 255.52$  mg GAE/100g, 도라지의 EtOH 추출물에서  $2219.329 \pm 128.98$  mg GAE/100g로 높게 나타났으며 그 중 자소엽은  $9181.757 \pm 276.39 \sim 12698.366 \pm 255.52$  mg GAE/100g의 범위로

로 다른 추출물에 비해 가장 높은 함량을 나타냈다. 총 페놀은 항산화 활성과 상관관계가 있어 간접적인 지표로 활용되고 있으며 본 연구에서도 항산화 활성과 비슷한 함량을 나타내었다.

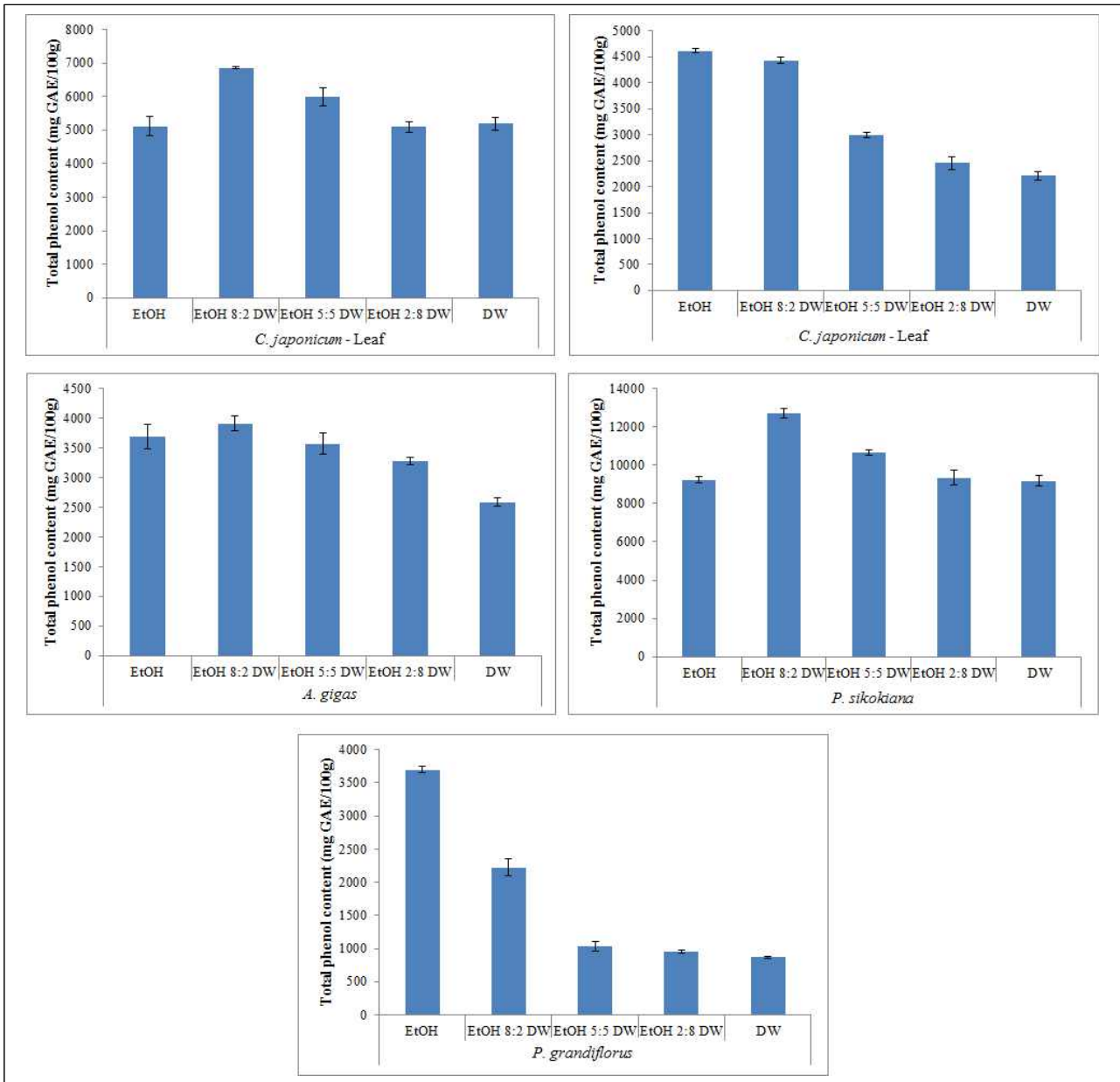


Fig. Total phenolic content of 5 kinds of medicinal plants extracted by different solvent combination rate. All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

(나) 총플라보노이드 함량 : 추출용매별 영경귀 지상부, 지하부, 당귀, 자소엽 및 도라지 추출물의 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과는 아래와 같다. 추출물별 총 플라보노이드 함량은 각각 영경귀 지상부의 8:2 추출물에서  $2337.173 \pm 31.15$  mg CE/100g, 영경귀 지하부의 EtOH 추출물에서  $607.568 \pm 25.47$  mg CE/100g, 당귀의 8:2 추출물에서  $574.318 \pm 17.51$  mg CE/100g, 자소엽의 8:2 추출물에서  $4037.341 \pm 19.94$  mg CE/100g, 도라지의 EtOH 추출물에서  $267.767 \pm 3.15$  mg CE/100g로 높은 함량을 보였다.

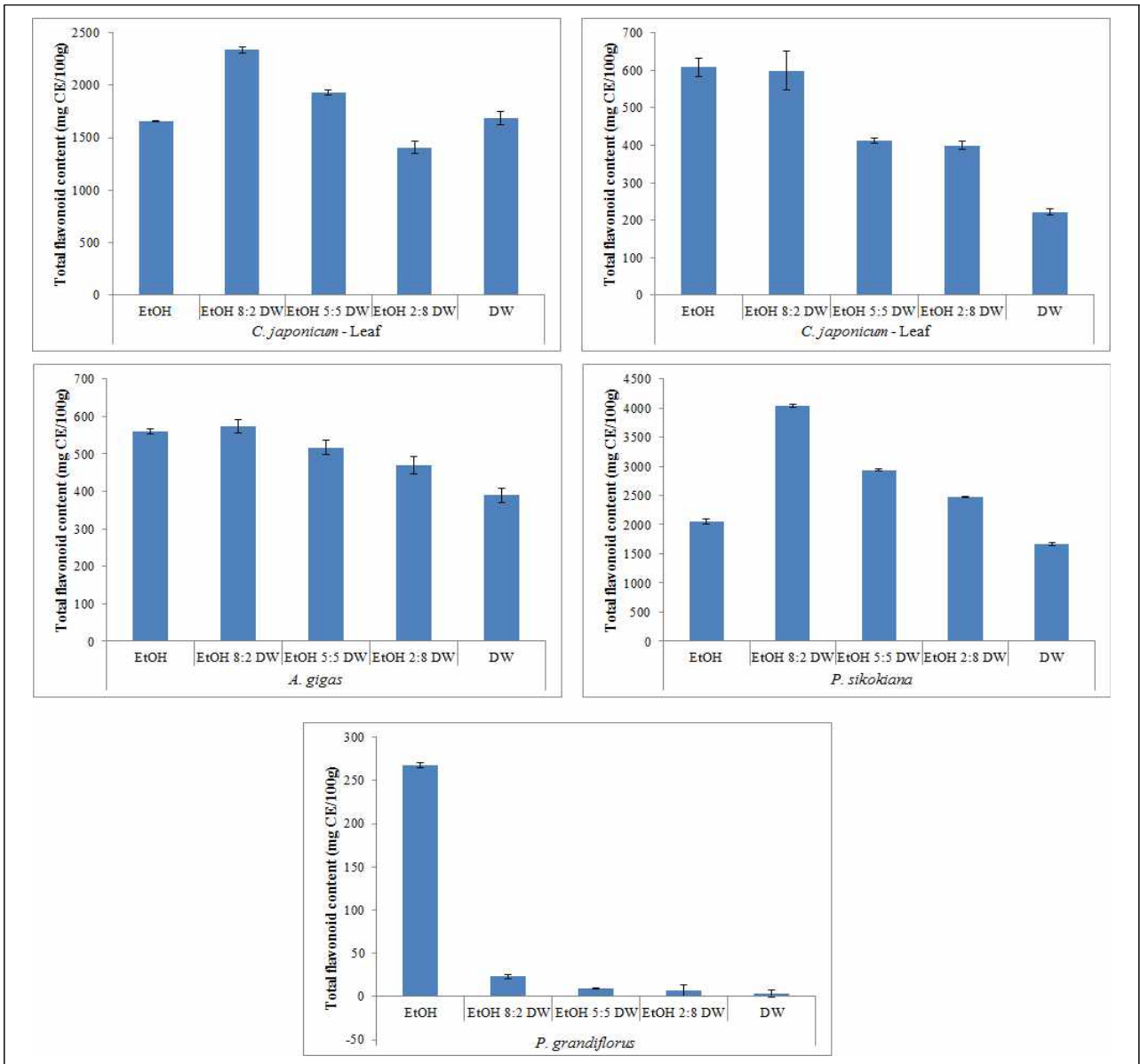


Fig. Total flavonoid content of 5 kinds of medicinal plants extracted by different solvent combination rate. All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

(다) DPPH free radical scavenging activity : 추출용매별 영경귀 지상부, 지하부, 당귀, 자소엽 및 도라지 추출물의 DPPH free radical 소거활성을 측정한 결과를 아래에 나타내었다. DPPH 라디칼 소거활성은 영경귀 지상부의 8:2 추출물에서  $19.78 \pm 0.83 \sim 62.4 \pm 10.27\%$ , 영경귀 지하부의 EtOH 추출물에서  $11.54 \pm 0.67 \sim 46.87 \pm 3.22\%$ , 당귀의 8:2 추출물에서  $7.66 \pm 0.39 \sim 49.33 \pm 3.05$ , 자소엽의 8:2 추출물에서  $47.08 \pm 2.09 \sim 88.14 \pm 0.45\%$ , 도라지의 EtOH 추출물에서  $4.98 \pm 0.55 \sim 41.86 \pm 5.37\%$ 로 추출용매 중 높은 활성을 나타내었다. 특히 0.250 mg/mL 자소엽 8:2 추출물은 0.03215 mg/mL ascorbic acid의  $87.03 \pm 5.48\%$ 와 비슷한 활성을 나타내었다.



Table. DPPH free scavenging activities of 5 kinds of medicinal plants extracted by different solvent combination rate.

DPPH radical scavenging activity		Inhibitory Effect(%)			
		31.25	62.5	125	250
<i>C. japonicum</i> Leaf	EtOH	8.89±0.93	22.13±0.19	29.35±1.12	45.30±4.17
	EtOH 8:2 DW	19.78±0.83	30.04±0.99	41.99±0.45	62.40±10.27
	EtOH 5:5 DW	18.59±0.60	27.09±0.57	40.54±0.28	55.66±2.16
	EtOH 2:8 DW	12.94±0.19	16.10±0.64	27.19±0.91	35.20±4.29
	DW	14.46±0.05	25.70±0.82	37.50±2.77	51.19±4.40
<i>C. japonicum</i> Root	EtOH	11.54±0.67	20.79±1.03	32.79±2.10	46.87±3.22
	EtOH 8:2 DW	11.01±0.15	20.51±1.21	28.79±0.28	45.28±3.58
	EtOH 5:5 DW	8.00±0.14	15.25±0.18	26.79±0.13	43.76±4.75
	EtOH 2:8 DW	7.84±0.11	15.37±0.81	24.73±0.55	38.31±0.32
	DW	4.63±0.15	9.80±0.12	18.91±0.11	28.30±3.02
<i>A. gigas</i>	EtOH	6.85±0.40	16.51±0.29	26.13±0.24	36.00±0.67
	EtOH 8:2 DW	7.66±0.39	17.43±0.53	31.35±1.56	49.33±3.05
	EtOH 5:5 DW	5.47±0.30	13.66±0.28	24.32±0.12	32.58±0.32
	EtOH 2:8 DW	4.28±0.06	11.45±0.17	20.54±1.18	31.10±3.05
	DW	0.76±0.06	3.94±0.05	10.33±0.29	22.88±0.70
<i>P. sikokiana</i>	EtOH	34.76±0.23	48.39±2.59	61.08±4.77	83.50±1.27
	EtOH 8:2 DW	47.08±2.09	70.24±5.23	85.27±4.61	88.14±0.45
	EtOH 5:5 DW	43.01±2.12	58.17±3.33	74.49±1.83	84.76±1.36
	EtOH 2:8 DW	42.77±0.40	55.56±3.75	73.39±2.97	84.13±3.12
	DW	32.1±1.81	41.57±1.46	58.78±3.39	75.73±2.83
<i>P. grandiflorus</i>	EtOH	4.98±0.55	8.11±0.33	14.57±0.47	41.86±5.37
	EtOH 8:2 DW	2.64±0.12	5.03±0.14	10.15±1.12	21.72±0.20
	EtOH 5:5 DW	0.75±0.12	1.71±0.23	9.04±0.26	16.22±0.28
	EtOH 2:8 DW	-0.15±0.58	0.37±0.48	1.77±0.14	7.78±0.68
	DW	-0.22±0.56	-0.06±0.03	0.57±0.98	7.20±0.13
		<b>3.90625</b>	<b>7.8125</b>	<b>15.625</b>	<b>31.25</b>
Ascorbic acid		39.54±1.18	54.89±2.23	65.42±2.77	87.03±5.48

All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

(라) ABTS cation radical scavenging activity : 추출용매별 엉겅퀴 지상부, 지하부, 당귀, 자소엽 및 도라지 추출물의 ABTS radical 소거활성을 측정한 결과는 아래와 같다. 엉겅퀴 지상부는 27.97±1.24~40.742±0.0 각각의 용매별 추출물의 경우, ethanol 추출용매의 비율이 높을수록 IC<sub>50</sub>이 낮은 값을 나타내었으며 엉겅퀴 지상부에서는 8:2 추출물이 27.970±1.24 ug/mL, 엉겅퀴 지하부에서는 EtOH 추출물이 24.042±0.55 ug/mL, 당귀에서는 8:2 추출물이 92.457±0.65 ug/mL, 자소엽에서는 8:2 추출물이 10.851±0.22 ug/mL, 도라지에서는 EtOH 추출물이 71.321±1.11 ug/mL로 낮았다. 그 중 자소엽 8:2 추출물은 대조군인 Ascorbic acid의 8.148±0.08 ug/mL와 비

슷한 값을 나타내었다.

Table. ABTS cation scavenging activity inhibition concentration (IC<sub>50</sub>) of 5 kinds of medicinal plants extracted by different solvent combination rate.

ABTS cation scavenging activity		IC <sub>50</sub> values (mg/mL)
Ascorbic acid		8.148 ± 0.08
<i>C. japonicum</i> Leaf	EtOH	38.989 ± 0.37
	EtOH 8:2 DW	27.970 ± 1.24
	EtOH 5:5 DW	35.437 ± 0.32
	EtOH 2:8 DW	40.742 ± 0.40
	DW	36.997 ± 0.14
<i>C. japonicum</i> Root	EtOH	24.042 ± 0.55
	EtOH 8:2 DW	43.178 ± 0.72
	EtOH 5:5 DW	44.836 ± 0.22
	EtOH 2:8 DW	82.086 ± 2.23
	DW	108.491 ± 1.30
<i>A. gigas</i>	EtOH	103.784 ± 0.78
	EtOH 8:2 DW	92.457 ± 0.65
	EtOH 5:5 DW	119.573 ± 0.14
	EtOH 2:8 DW	139.025 ± 1.71
	DW	140.747 ± 0.38
<i>P. sikokiana</i>	EtOH	17.29 ± 0.31
	EtOH 8:2 DW	10.851 ± 0.22
	EtOH 5:5 DW	13.988 ± 0.06
	EtOH 2:8 DW	14.912 ± 0.30
	DW	54.267 ± 0.90
<i>P. grandiflorus</i>	EtOH	71.321 ± 1.11
	EtOH 8:2 DW	161.383 ± 3.85
	EtOH 5:5 DW	411.197 ± 0.73
	EtOH 2:8 DW	436.461 ± 8.56
	DW	441.894 ± 13.75

All values are presented as the mean ± SD of triplicate determination.

(마) 지표물질 분석 : 본 연구에서는 자소엽에서는 rosmarinic acid를 지표물질로, 당귀에서는 nodakenin, decursin을 지표물질로 각각 설정하였다. 지표물질 UPLC 분석조건으로 각 지표물질의 검량선을 작성한 결과 R<sup>2</sup>이 0.999 이상으로 높은 직선성을 확인하였다. 또한 rosmarinic acid는 5.776 min에서, nodakenin은 2.558 min에서, decursin은 10.422 min에서 확인되었다(Table 5, Fig. 3). 자소엽의 추출용매별 rosmarinic acid 함량은 8:2 추출물에서 18.33 mg/g, 5:5 추출물에서 14.91 mg/g, 2:8 추출물에서 11.45 mg/g순이었다. 당귀의 지표성분인 nodakenin과 decursin의 함으로 계산하여 정량하였으며 당귀의 추출용매별 지표성분 함량은 EtOH 추출물에서 23.33 mg/

g, 8:2 추출물에서 15.31 mg/g, 5:5 추출물에서 15.05 mg/g순이었다.

Table. Equation and Corelation Coefficient(R<sup>2</sup>) Value of marker compounds.


Analyte	Equation	Corelation Coefficient(R <sup>2</sup> )
Rosmaric acid	7.62e+003X-1.49e+004	0.9999
Nodakenin	6.78e+003X-2.43e+004	0.9998
Decursin	1.39e+004X-5.64e+004	0.9998

Table. analytical results of *P. sikokiana* and *A. gigas*.

mg/g	<i>P. sikokiana</i>				
	EtOH	EtOH 8:2 DW	EtOH 5:5 DW	EtOH 2:8 DW	DW
Rosmaric acid	2.12	18.33	14.91	11.45	6.26
mg/g	<i>A. gigas</i>				
	EtOH	EtOH 8:2 DW	EtOH 5:5 DW	EtOH 2:8 DW	DW
Nodakenin	15.75	4.27	4.46	3.50	2.33
Decursin	7.58	11.04	10.56	3.04	0.15
Sum	23.33	15.31	15.02	6.54	2.48

(3) 대량추출법 확립

(가) 표준화를 위한 시제품 생산

공 정	<사용기기>
<p>① 주정 16ℓ, 물 4ℓ에 약용작물 1kg 투입</p> <p>② 100°C에서 6시간 추출</p> <p>③ 12시간 자연 침출</p>	 <p>초고속 진공 저온 농축 추출기 &lt;대한메디안 DM-3000&gt;</p>

(나) 약용작물 대량추출체계 확립

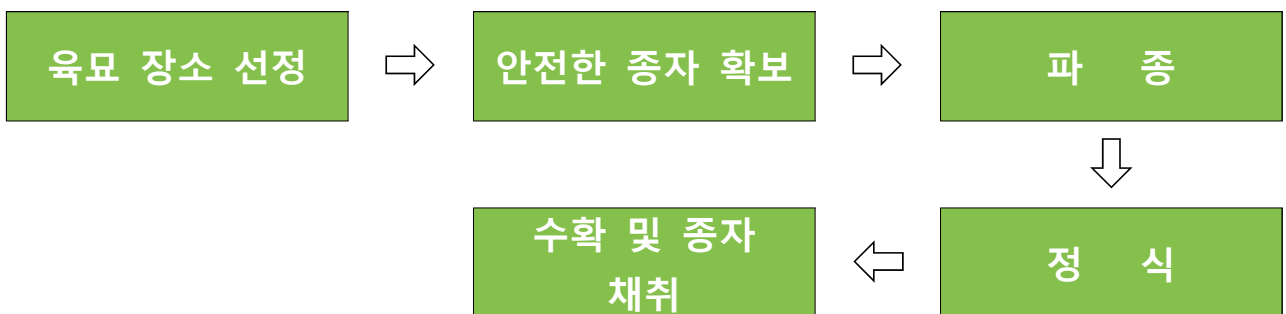
공 정	관 리 기 준
원료 검수 및 투입	성상, 변질, 부패, 이물 여부 확인 후 약용작물 100kg, 95% 발효주정 800ℓ, 물 200ℓ 투입
추 출	100°C에서 12시간 동안 추출
이 송	농축탱크로 이송
가 열	농축기의 온도가 60°C에 도달할 때 까지 가열한 뒤 6시간 추출
여 과	160mesh를 이용하여 여과
포 장	지표성분 함량 측정

나. 지리산권역 약용작물의 대량 재배기술 확립

(1) 시험재배

(가) 지리산 권역 약용작물 육묘방법 개발

① 육묘 방법 표준화 기준 설정



② 모종 생산 장소

- 경남생약농업협동조합 약초공정육묘장(경남 산청군 산청읍 병정리 소재)
- 면적 : 4,728㎡
- 시설 : 재배상(하이 베드) 32개

③ 안전한 종자 확보

- 경남약용작물종자보급센터 활용 (예시: 자소엽)
- 종자 모양 : 원주형



육묘장 외부 전경



실내 전경

- 종자 크기 : 0.05mm
- 종자 무게 : 측정불가(가벼움)
- 종자 색상 : 황갈색
- 종자 냄새 : 강한 허브향

④ 모종 생산 방법 (예시: 자소엽)



파종



육묘상자



105구 트레이



본밭 정식 직전

- 벼 육묘상자에 상토(pH6)를 가득 채운 후 그 위에 1:1 비율로 혼합한 종자와 모래를 흩어 뿌림

- 파종 후 배양상토에 물을 충분히 주어 수분을 80% 이상으로 유지하여 주고 육묘장의 온도도 20℃ 이상으로 유지
- 파종 15일 차에 수분 70%, 온도 25℃ 이상 유지
- 파종 20일 차부터는 수분 60%, 온도 25℃에서 30℃로 유지
- 파종 25일 차 분얼 2장 보이는 모종이 80% 이상 되면 105구 트레이로 이식
- 이식 시 핀셋 사용할 경우 부러지는 경우가 많으므로 반드시 아이스바 막대 이용
- 105구 트레이 이식 후 분얼이 4장될 때 까지 상토 습도 60%~70%, 온도 25℃에서 30℃로 유지
- 파종 40일 차에 분얼 4장에 도달한 모종이 90% 이상 되었을 때 노지로 정식

(나) 지리산 권역 약용작물 생육환경 연구

① 생육환경 조성 및 정식 (예시: 자소엽)



본밭 정식 작업 1

본밭 정식 작업 2

정식 30일 차

정식 60일 차

㉞ 밭 장만

- 가축분 퇴비 10a 당 100포(2,000kg) 투입 후 로타리 칩
- 이랑너비 120cm, 골높이 30cm로 경운 작업
- 잡초억제 및 습도유지를 위한 흑색 비닐 멀칭

㉟ 정식 및 관리

- 사방 30cm 간격으로 모종 식재

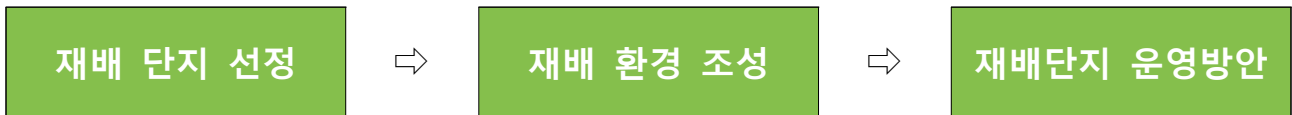
- 이식 후 관수 실시로 고사 방지
- 정식 30일 차 평균 키 30cm로 성장
- 지속적으로 잡초 제거 및 방충·방균 작업 실시
- 정식 65일 차 꽃봉우리 형성 시작, 평균 키 110cm
- 정식 80일 차 만개 후 씨앗 형성 시작
- 정식 120일 차 씨앗 결실 50% 확인

② 수확 및 종자 채취

- ㉠ 정식 125일 차 씨앗 결실을 80% 도달
- ㉡ 정식 130일 차 종자 채집을 위해 전초 수확
- ㉢ 각종 실험을 위해 결실 전에 대부분의 자소엽을 잘라 쓰고 1/4 정도만 채종을 위해 남겨 놓음
- ㉣ 지상부 전체를 10일 간 그늘에서 말림
- ㉤ 비닐 위에 지상부를 올려 놓고 도구를 이용해 타작하면서 종자 채집
- ㉥ 종자 10kg(10만평 재배 가능) 채종

(다) 지리산 권역 약용작물 재배단지 조성 방안 모색

① 대량 재배단지 조성



㉠ 재배 단지 선정

- 산청군에서 지정한 약초재배 단지를 활용하여 약용작물 재배 [경상남도 산청군 산청읍 옥산리 약초재배 단지]
- 토양이 비옥하며 위치적으로 일조량이 풍부함
- 약초재배 단지내 재배를 시작함으로써 생산농가에게 생육과정 및 재배기술을 교육하기에 이로우며, 약용작물에 대한 관심도와 홍보에도 이로운 점이 많음

㉡ 재배 환경 조성

- 토양 조성 : 10a당 가축부숙 2,000kg 살포
- 경운 작업 : 로터리 작업 이후 이랑 넓이 120cm 높이 30cm로 두둑 작업
- 비닐 멀칭 : 잡초 생육 억제 및 습도 유지를 위해 흑색 비닐 멀칭 작업
- 정식 : 300mm \* 300mm 간격으로 정식

㉢ 재배단지 운영방안

- 시험재배단지에서 채취한 종자를 확보
- 약초공정육묘장에서 표준화된 육묘방법을 기반으로 모종 육묘
- 경남생약농업협동조합 조합원(500여명)을 대상으로 재배 대상자 모집
- 선정된 재배 농가를 대상으로 모종을 보급하여 재배 면적과 농가를 늘려나감

## 제9절 연구개발 성과

### 1. 지식재산권

#### 가. 특허출원

순번	구분	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				
				출원인	대표 발명인	발명 자수	출원일	출원번호
1	특허	장백도라지 계통 판별용 마커 및 이를 이용한 장백도라지 계통 판별 방법	대한민국	경남과학기술대학교 산학협력단, (재)경남한방약초연구소	이신우	9	2015. 05.15	10-2015-0068094
2	특허	법제 하수오 추출물을 함유하는 인지기능 개선용 조성물	대한민국	경남과학기술대학교 산학협력단, (재)경남한방약초연구소	조계만	7	2015. 05.21	10-2015-0070973
3	특허	법제 하수오 추출물을 유효성분으로 포함하는 산화적 스트레스 개선용 조성물	대한민국	경남과학기술대학교 산학협력단	조계만	7	2015. 05.21	10-2015-0071021
4	특허	하수오, 백수오 및 이엽우피소의 판별 마커 및 이의 이용	대한민국	경남과학기술대학교 산학협력단	이신우	7	2015. 08.25.	10-2015-0119573
5	특허	단일염기다형성을 이용한 꾸지뽕 계통 판별용 마커 조성물, 및 이를 이용한 꾸지뽕 계통 및 교잡종 판별 방법	대한민국	경남과학기술대학교 산학협력단	이신우	5	2016. 05.13	10-2016-0059052
6	특허	초음파 처리를 이용하는 영지버섯 추출물의 제조방법 및 이의 용도	대한민국	경상대학교 산학협력단	김현준	5	2016. 05.04	10-2016-0055214
7	특허	영경귀와 도라지의 추출물을 이용한 기능성 음료조성물의 제조방법과 그 음료조성물	대한민국	경남과학기술대학교 산학협력단	남상해	6	2016. 07.18	10-2016-0086769
8	특허	증진된 기호성, 장기저장성 및 기능성을 갖는 도라지 함유 십전대보환 및 그 제조방법	대한민국	(주)자연애 제약	강민철	4	2016. 11.24	10-2016-0157126
9	특허	세발당귀 계통 판별용 조성물 및 이의 용도	대한민국	경남과학기술대학교 산학협력단	이신우	4	2017. 03.07	10-2017-0028976
10	특허	중국당귀, 구당귀 및 일당귀 계통 판별용 조성물 및 이의 용도	대한민국	경남과학기술대학교 산학협력단	이신우	4	2017. 03.07	10-2017-0029013
11	특허	꾸지뽕 계통 판별용 단일염기다형성 마커 및 이의 용도	대한민국	경남과학기술대학교 산학협력단	이신우	4	2017. 03.07	10-2017-0029029



12	특허	영정귀 계통 판별용 조성물 및 이의 용도	대한민국	경남과학기술대학교 산학협력단	이신우	4	2017.03.07	10-2017-0029042
13	특허	락토바실러스 플란타룸 균주와 락토바실러스 브레비스 균주로 혼합발효되고 우수한 기호성과 증진된 가바 함량 및 증진된 기능성을 갖는 여주-과채 발효음료	대한민국	경남과학기술대학교 산학협력단	조계만	5	2017.06.02	10-2017-0068747
14	특허	위액산 내성과 담즙산 내성이 탁월하고 높은 가바 생산성을 갖는 락토바실러스 WCP02, 이를 이용한 생균제제 및 발효식품	대한민국	경남과학기술대학교 산학협력단	조계만	3	2017.08.14	10-2017-0102863
15	특허	가바, 공액리놀레산 및 비배당체 이소플라본이 증진된 콩 발효조성물의 제조방법, 이에 이용되는 복합 생균제제 및 이 콩 발효조성물을 유효성분으로 포함하는 향당뇨 및 항비만 기능성식품	대한민국	경남과학기술대학교 산학협력단	조계만	4	2017.08.21	10-2017-0105248
16	특허	증진된 기호성과 항산화 활성을 갖는 식물성 브라운 소스 및 그 제조방법	대한민국	경남과학기술대학교 산학협력단	조계만	4	2017.08.31	10-2017-0111355
17	특허	글루탐산이 풍부하고 항산화 활성이 증진된 순 식물성 천연조미료 조성물 및 그 제조방법	대한민국	경남과학기술대학교 산학협력단	조계만	4	2017.08.31	10-2017-0111417
18	특허	프로토카테킨산, 에피카테킨 및 올레산이 강화되고 증진된 알파-글루코시다제 및 췌장 리파제 저해활성을 갖는 도라지 및 그 제조방법	대한민국	(주)자연애제약, 경남과학기술대학교 산학협력단, 강민철, 장민정	조계만	5	2017.09.15	10-2017-0118380

## 나. 특허등록

구분	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	등록					기 타
			출원인	대표 발명인	발명 자수	등록일	등록번호	
특허	법제 하수오 추출물을 유효성분으로 포함하는 산화적 스트레스 개선용 조성물	대한민국	경남과학기술대학교 산학협력단	조계만	7	2015.05.12	10-1737556	기술가치평가 완료
특허	우수한 영양성과 항산화 활성을 갖는 식물성 소스 및 그 제조방법	대한민국	경남과학기술대학교 산학협력단, 함양농업협동조합, 농촌진흥청	조계만	13	등록절차 진행 중		

## 2. 논문게재 및 학술회의 발표

### 가. 논문게재

번호	논문명	학술지명 (연도/권/페이지)	주저 자명	저자수	국명	발행 기관	SCI여부 (SCI/비SCI)
1	Type 1 diabetes alters astrocytic properties related with neurotransmitter supply, causing abnormal neuronal activities	Brain Research (2015/1602/32-43)	손현위, 김현준		네덜 란드	ELSEVIER SCIENCE BV	SCI (IF: 2.828)
2	약용작물의 기원 판별에 관한 분자생물학적 기술 개발 현황	J Plant Biotechnol (2015/42/6-12)	한은희, 이신우	3	한국	(사)한국 식물생명 공학회지	비SCI
3	백하수오의 식품학적 영양 성분 및 휘발성 향기 성분분석을 통한 관능적 특성 검토	J Korean Soc Food Nutr (2015/44/564-572)	임호정, 신의철	8	한국	(사)한국 식품영양 과학회지	비SCI
4	국내산 법제 하수오의 라디칼 소거능 및 산화적 스트레스 개선 효과	J Korean Soc Food Nutr (2015/44/809-815)	김현영, 조계만	12	한국	(사)한국 식품영양 과학회지	비SCI
5	성공적인 6차산업을 위한 가치사슬 모형과 빅데이터 활용 방안	디지털산업정보 학회 (2015/11/141-152)	박상혁	3	한국	디지털산 업정보학 회 논문지	비SCI
6	Comparison of Isoflavone Contents and Antioxidant Effect in Cheonggukjang with Black Soybean Cultivars by Bacillus subtilis CSY191	Korean J Environ Agric (2016/35/62-71)	아즈줄하 크만, 조계만	13	한국	The Korean Society of Environm ental Agricultur e	비SCI
7	백하수오와 자소엽 추출물의 생리활성 및 3T3-L1 전지방세포에 대한 분화억제효과	J Korean Soc Food Nutr (2016/45/642-650)	김선정, 남상해	4	한국	한국식품 영양과학 회지	비SCI
8	Development of molecular markers, based on chloroplast and ribosomal DNA regions, to discriminate three popular medicinal plant species, Cynanchum wilfordii, Cynanchum auriculatum, and Polygonum multiflorum	Molecular Biology Report (2016/43/323-332)	한은희, 이신우	7	네덜 란드	SPRINGE R	SCI (IF: 2.024)

9	사회 혁신을 위한 디자인 씽킹과 액션러닝의 통합모형	벤처창업연구 (2016/11/89-100)	박상혁	4	한국	벤처창업 연구학회 지	비SCI
10	Expressing the sweet potato orange gene in transgenic potato improves drought tolerance and marketable tuber production	Comptes Rendus Biologies (2016/339/ 207-213)	조광수, 김윤희, 이신우	9	French	Elsevier Masson SAS	SCI (1.100)
11	6차산업 기업가정신 지표개발	벤처창업연구 (2016/11/63-76)	김성규, 박상혁	5	한국	벤처창업 연구학회 지	비SCI
12	사회적 자본에 따른 6차산업 기업가정신이 경영성과에 미치는 영향	정보시스템연구 (2016/25/147-173)	김연중, 박상혁	3	한국	한국정보 시스템학 회지	비SCI
13	당귀(Angelica spp.)의 기원분석에 관한 분자생물학적 연구 현황 및 향후과제	Journal of Plant Biotechnology (2017/44/12-18)	이신우	6	한국	한국식물 생명공학 회지	비SCI
14	구지뽕 나무의 엽록체 TrnL-F 영역 염기서열 분석을 통한 특이적 SNP 분자마커의 확인	Journal of Plant Biotechnology (2017/44/135-141)	이수진, 이신우	4	한국	한국식물 생명공학 회지	비SCI
15	Molecular marker analysis of <i>Cynanchum wilfordii</i> and <i>C. auriculatum</i> using the simple ARMS-PCR method with mismatched primers	Plant Biotechnology Reports (2017/11/127-133)	한은희, 이신우	6	한국	SPRINGE R	SCI (IF: 1.422)
16	Antioxidant Activity and Protective Effects of <i>Cirsium japonicum</i> against Damaged Mouse Liver Cell (BNL CL.2)	Journal of Life Science (2017/27/442-449)	김선정, 남상해	4	한국	한국생명 과학회지	비SCI
17	국내산 땅콩의 일반 품종과 고올레산 품종에 대한 지용성 영양성분과 산화안정성 비교	Korean Journal of Food Science and Technology (2017/49/235-241)	임호정, 신의철	7	한국	한국식품 과학회지	비SCI
18	Time course effects of fermentation on fatty acid and volatile compound profiles of Cheonggukjang using new soybean cultivars	Journal of Food and Drug Analysis (2017/25/637-653)	조계만, 신의철	10	타이완	Elsevier Taiwan LLC	SCI (IF: 3.048)

나. 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의명칭	주발표자 (발표자 수)	발표일시	장소	국명(발표제목)
1	제8회 발효한약국제심포지엄 및 한국자원식물학회 추계학술대회 : 백두대간 치유 자원식물의 연구와 산업화	김준영 (13)	2014.09	제천 한방엑스포 공원	Antioxidant Effects of Methanol Extracts from Species of Compositae Plant and its metabolite profiling by LC/MS-QTOF
2	2014 International Symposium and Annual Meeting : Lifelong Health and Wellness from Nutrition and Food	정영심 (9)	2014.10	대전 김대중 컨벤션센터	Bacterial Diversity of <i>Bacillus subtilis</i> Group in <i>Doenjang</i> and <i>Kanjang</i> Based on16S rRNA Sequence and Their Antibacterial and Enzymatic Activities
3	2014 International Symposium and Annual Meeting : Lifelong Health and Wellness from Nutrition and Food	정영심 (5)	2014.10	대전 김대중 컨벤션센터	Isolation of <i>Bacillus</i> sp. from soy fermented foods and Their fermentative characteristics of <i>cheonggukjang</i>
4	2014 International Symposium and Annual Meeting : Lifelong Health and Wellness from Nutrition and Food	임호정 (6)	2014.10	대전 김대중 컨벤션 센터	Identification of Key Flavor Compounds of <i>Cynanchi Wilfordii</i> Radix with Simultaneous Distillation Extraction and Gas Chromatography
5	2014 International Symposium and Annual Meeting : Lifelong Health and Wellness from Nutrition and Food	임호정 (6)	2014.10	대전 김대중 컨벤션 센터	Investigation of Chemical Properties of New High-Oleic Peanut Cultivar
6	2014 International Symposium and Annual Meeting : Lifelong Health and Wellness from Nutrition and Food	임호정 (6)	2014.10	대전 김대중 컨벤션 센터	Fatty Acid Profile in Medicinal Plants: <i>Angelica gigas Nakai</i> , <i>Platycodon grandiflorum</i> , <i>Perillae folium</i> , and <i>Cynanchi wilfordii</i> Radix
7	한국식품저장유통학회 학술대회 : 지역 농특산물의 고부가가치화 전략	강수지 (6)	2014.11	목포 목포대학교 박물관 대강당	지리산 지역에서 생산된 생약재의 추출조건에 따른 항산화 및 항당뇨활성
8	(사)한국대사체학회 정기학술대회 및 제3차 정기총회	고건희 (7)	2015.04	부산 현대그랜드 호텔	Antioxidant Activity and Cytotoxic Effect of Extracts from <i>Solidago virga-aurea</i> <i>var.</i>
9	2015 한국벤처창업학회 춘계학술대회 : 세계화와 성과실현	박정선 (3)	2015.04	서울 서울대학교 SK경영관	성공적 6차 산업화를 위한 동태적 조직변화: 경남 산청군 약초 산업 사례를 중심으로
10	2015 한국벤처창업학회 춘계학술대회 : 세계화와 성과실현	박상혁 (3)	2015.04	서울 서울대학교 SK경영관	지속적인 콘퍼런스 행사를 통한 비영리기관의 협력네트워크 변화에 대한 연구

11	2015년 한국약용작물학회 심포지엄 및 춘계학술발표회 : 생물다양성협약 발효에 따른 약용식물자원의 효율적 이용 및 관리 전략	한은희 (6)	2015.05	서울 건국대학교 새천년관 국제회의장	하수오( <i>Polygonum multiflorum</i> ) 및 백하수오 ( <i>Cynanchum wilfordii</i> )의 대사공학 기술 적용을 위한 기내배양 기술 확립
12	제23회 기초의학 학술대회 : 기초의학을 중심으로 한 융합연구 활성화	정순웅 (6)	2015.05	경주 화백컨벤션 센터	<i>Ganoderma lucidum</i> Extract Changes Energy and Glucose Metabolism in HepG2 Cell and 3T3 Cell
13	한국식품영양과학회 국제학술대회	김선정 (3)	2015.08	평창알펜시아컨벤션센터	Physiological activities of extracts of <i>Cynanchi wilfordii</i> Radix and <i>Perilla sikokiana</i> .
14	한국식품영양과학회 국제학술대회	황정은 (8)	2015.08	평창알펜시아컨벤션센터	Free Radical Scavenging Effect and Oxidative Stress Protective Activity of Processed Polygoni Multiflori Radix
15	한국식품영양과학회 국제학술대회	주옥수 (5)	2015.08	평창알펜시아컨벤션센터	Physicochemical Properties of <i>Ganoderma lucidum</i> and Carbohydrate and Lipid Hydrolyzing Enzymes Inhibitory Activities of Ethanolic Extracts
16	한국식품영양과학회 국제학술대회	임호정 (11)	2015.08	평창알펜시아컨벤션센터	Identification of Key Flavor Compounds of <i>Angelica Gigas Nakai</i> with Simultaneous Distillation Extraction and Gas Chromatography with Mass Spectrometry
17	한국식품영양과학회 국제학술대회	임호정 (11)	2015.08	평창알펜시아컨벤션센터	Investigation of Volatile Compounds of <i>Perillae Folium</i> grown in the South Korea
18	International Confernece of the Korean Society for molecular and Cellular Biology	정순웅 (7)	2015.09	서울 코엑스	<i>Ganoderma lucidum</i> and mixture of four medicinal plant extracts change energy and glucose metabolism in vitro, and attenuate high fat diet-induced diab
19	한국약용작물학회 추계학술대회	한은희 (8)	2015.10	국립원예특작과학원	SNP 마커와 high resolution melting curve 분석용 마커를 이용한 장백도라지 계통 ( <i>Platycodon grandiflorum</i> , Jangback)의 판별기술 개발
20	한국식품저장유통학회 제36차 학술대회	강승미 (5)	2015.10	제주대학교 국제교류회관	아이스플랜트( <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> )의 생화학적 성분 및 항산화활성
21	한국식품저장유통학회 제36차 학술대회	김선정 (5)	2015.10	제주대학교 국제교류회관	서양영경귀( <i>Silybum marianum</i> )의 추출조건별 Flavolignan isomer 함량 및 생리활성

22	2016년 한국약용작물학회 춘계학술발표대회	한은희 (6)	2016.05	탄금호국제조 정경기장 그랜드스탠드	ARMS-PCR기술을 이용한 백수오와 이엽우피소의 분자유전학적 판별 마커 개발
23	2016년 한국응용생명화학학회 국제학술대회	황정은 (2)	2016.06	제주국제컨 벤션 센터	Changes of $\gamma$ -aminobutyric acid, isoflavone, and radical scavenging activity during germinated high-protein soy-powder milk of lactic acid fermentation
24	2016년 한국응용생명화학학회 국제학술대회	황정은 (2)	2016.06	제주국제컨 벤션 센터	Production of soy powder yogurt with enhanced levels of $\gamma$ -aminobutyric acid and isoflavone aglycone using sprouting high-protein soybean with <i>Lactobacillus brevis</i>
25	2016년 한국식물생명공학회 정기 학술발표회	구영민 (6)	2016.06	동아대학교 부민캠퍼스	Antioxidative and physiological activities of 70% ethanol extracts from different parts of <i>Veronicastrum sibiricum (L.) Pennell</i>
26	2016년 한국식물생명공학회 정기 학술발표회	한은희 (5)	2016.06	동아대학교 부민캠퍼스	Molecular characterization of transgenic potato expressing the sweetpotato orange gene (IbOr)
27	2016년 한국응용생명화학학회 국제학술대회	고건희 (8)	2016.06	제주국제컨 벤션 센터	Isolation and identification of $\alpha$ -glucosidase inhibitory compounds from <i>Artemisia annua L.</i> Leaves and steams
28	2016년도 한국생명과학회 제57회 정기총회 및 국제학술대회	김선정 (6)	2016.08	경주 더케이호텔	Biochemical components and physiological activities of <i>Cirsium japonicum</i> and <i>Silybum marianum</i>
29	2016년도 한국생명과학회 제57회 정기총회 및 국제학술대회	강승미 (6)	2016.08	경주 더케이호텔	Biochemical components and physiological activities of Ice plant ( <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> )
30	Plant Biotech 2016	이수진 (5)	2016.07	Queen' s University	Development of molecular markers, based on the SNPs of chloroplast gene and ITS of nuclear ribosomal DNA, to discriminate Korean and Chinese lines of <i>Cudrania tricuspidata</i> Bureau
31	제37차 한국식품저장유통학회 정기총회 및 학술대회	주옥수 (4)	2016.10	동아대학교 부민캠퍼스	약용복합추출물 첨가 청국장 브라운 소스의 이화학적 특성, phytochemicals 함량 및 항산화 활성

32	제37차 한국식품저장유통학회 정기총회 및 학술대회	황정은 (4)	2016.10	동아대학교 부민캠퍼스	Bacillus amyloliquefaciens 2TDJ15과 B. amyloliquefaciences MGD02 균주의 단독 및 혼합 종균에 의한 청국장 이화학적 특성, isoflavone 함량 및 항산화 활성
33	제37차 한국식품저장유통학회 정기총회 및 학술대회	황정은 (4)	2016.10	동아대학교 부민캠퍼스	Bacillus amyloliquefaciens 균주의 단독 및 혼합 종균에 의한 제조된 청국장 베이스 브라운 소스의 이화학적 특성, isoflavone 함량 및 항산화 활성
34	2016년 한국농약과학회 임시총회 및 추계학술발표회	고건희 (6)	2016.10	강원 설악 텔피노 골프 앤 리조트	Comparative assessment of three purification procedures after QuEChERS extraction for analysis of endosulfan and its metabolites in Astragalus root by GC/ECD and GC/MS
35	2016 KFN International Symposium and Annual Meeting	강승미 (7)	2016.11	제주국제컨벤션 센터	아이스플랜트(Mesembryanthemum crystallinum) 추출 분획물의 ACE 저해활성 및 3T3-L1 전지방세포에 의한 분화억제 효과
36	2016 KFN International Symposium and Annual Meeting	김선정 (7)	2016.11	제주국제컨벤션 센터	영경귀 추출물의 항당뇨, 항고혈압 및 3T3-L1 전지방세포의 분화억제 효과
37	2016 KFN International Symposium and Annual Meeting	김선정 (7)	2016.11	제주국제컨벤션 센터	영경귀의 Silymarin 화합물과 항산화 및 간보호 효과
38	2016 KFN International Symposium and Annual Meeting	김미소 (4)	2016.11	제주국제컨벤션 센터	산소 유도기간에 유래되는 일반 및 high-oleic 해바라기유의 산화 안정성 및 향미 특성 비교
39	2016 KFN International Symposium and Annual Meeting	김다솜 (4)	2016.11	제주국제컨벤션 센터	Time course effects of fermentation on fatty acid and volatile compound profiles of cheonggukjang, using new soybean cultivar
40	2016 KFN International Symposium and Annual Meeting	고건희 (8)	2016.11	제주국제컨벤션 센터	Metabolomics study of <i>Angelica gigas</i> based on Ultraperformance Liquid chromatography coupled with Q-TOF Mass Spectrometry (UPLC/Q-TOF MS)
41	2017 KoSFoST International Symposium and Annual Meeting	고건희 (8)	2017.06	제주국제컨벤션 센터	Metabolomics study of <i>Platycodon grandiflorum</i> based on Ultraperformance Liquid chromatography coupled with Q-TOF Mass Spectrometry (UPLC/Q-TOF MS)

42	2017년 한국약용작물학회 심포지엄 및 춘계학술발표회	이수진 (5)	2017.05	대구 호텔인터블 고	Molecular markers of the identification of Korean specific ecotype of <i>Cudrania tricuspidata</i> in the chloroplast TrnL-F region by ARMS-PCR and HRM pattern analyses
43	2017 International Symposium and Annual Meeting of the KSABC	황정은 (3)	2017.06	부산 해운대그랜 드호텔	Comparison of physicochemical properties and antioxidant activity of the gluten hydrolysis broth by various fungi
44	2017 International Symposium and Annual Meeting of the KSABC	황정은 (3)	2017.06	부산 해운대그랜 드호텔	Changes of phytochemical contents and antioxidant activities of new type of fermented soybean products using the <i>Aspergillus oryzae</i>
45	IFT17 Go with purpose	임호정 (4)	2017.06	Las Vegas	Effects of fermentation periods on fatty acid and volatile compound profiles of Cheonggukjang in an oil-rich soybean cultivar
46	IFT17 Go with purpose	김다솜 (4)	2017.06	Las Vegas	Changes in chemical, nutritional, and sensory Properties of dried balloon flower roots during the roasting process
47	2017년도 한국식물생명공학회 정기학술발표회	이수진 (4)	2017.06	대전 호텔인터시 티	ARMS-PCR technique with primers based on SNPs of chloroplast TrnL-F and nuclear ITS region for accurate and rapid discrimination of <i>Cynanchum wilfordii</i> and <i>C. auriculatum</i>
48	2017 Plants from Sea to Sky	이수진 (2)	2017.07	Vancouver British Columbia	SNP molecular markers for the differentiation of specific ecotypes of the medicinal plant, <i>Cudrania tricuspidata</i> Bureau using ARMS-PCR and HRM curve pattern analyses



### 3. 생명자원(생물자원)/화합물

No	생명자원(생물자원)/화합물명	등록/기탁번호	등록/기탁기관	발생년도
1	<i>Bacillus amyloliquefaciences</i> MGD02	KACC 92158P	국립농업과학원 한국농업유전자은행 (KACC)	2016-2017
2	<i>Lactobacillus brevis</i> BMK184	KACC 92156P	국립농업과학원 한국농업유전자은행 (KACC)	2016-2017
3	<i>Lactobacillus brevis</i> WCP02	KACC 92159P	국립농업과학원 한국농업유전자은행 (KACC)	2016-2017


### 4. 기술실시(이전) 및 기술료

번호	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)
1	직접실시	증진된 기호성, 장기저장성 및 기능성을 갖는 도라지 함유 십전대보환 및 그 제조방법	(주)자연애제약	2016.11.24	-
2	통상실시	가바, 공액리놀레산 및 비배당체 이소플라본이 증진된 콩 발효조성물의 제조방법, 이에 이용되는 복합 생균제제 및 이 콩 발효조성물을 유효성분으로 포함하는 향당료 및 향비만 기능성식품	(주)콜마비엔에이치	협의 진행 중 (기술료 등 협의 중)	
3	통상실시	프로토카테큐산, 에피카테킨 및 올레산이 강화되고 증진된 알파-글루코시다제 및 췌장 리파제 저해활성을 갖는 도라지 및 그 제조방법	(주)자연애제약	협의 진행 중 (기술료 등 협의 중)	

## 5. 사업화

No	사업화 방식	사업화 형태	지역	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생년도	기술 수명
							국내	국외		
1	자가 실시	신제품 개발	국내	한의원 납품용 대보환 3종	홍삼활력환, 도라지 함유 십전대보환, 녹용진환	(주)자연애 제약	203,806,500원	-	2015-2017	정체기
2	자가 실시	신제품 개발	국내	몽고 육수 불고기 쏘스	불고기 전골 소스의 배합비로 제조된 소스 제품화	몽고식품 (주)	-	-	8월 25일 신제품 출시	성숙기

## 6. 기술 및 제품 인증

구 분	인증분야	인증기관	인증내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증번호		
제품 제조 (자연애제약)	GMP시설	식품의약품안전처	한약재 제조 및 품질 관리기준		2015.4.14	대한민국

## 7. 교육 및 지도활용 내역

번호	교육명	교재명	주요내용	활용년도
1	자연애제약 1차 컨설팅	-	자연의 제약 회사 소개 및 제품소개	2014
2	자연애제약 2차 컨설팅	-	지역 경제 활성화와 6차 산업의 기반 조성을 위한 프로젝트로 지리산 지역의 생산·가공업체 ‘자연애제약’에 대한 기업분석 및 업무개선 2차 컨설팅	2014
3	자연애제약 3차 컨설팅	-	지역 경제 활성화와 6차 산업의 기반 조성을 위한 프로젝트로 지리산 지역의 생산·가공업체 ‘자연애제약’에 대한 기업분석 및 업무개선 3차 컨설팅	2014
4	자연애제약 4차 컨설팅	-	지역 경제 활성화와 6차 산업의 기반 조성을 위한 프로젝트로 지리산 지역의 생산·가공업체 ‘자연애제약’에 대한 기업분석 및 업무개선 4차 컨설팅	2014

5	도라지 재배 교육	-	도라지 재배 시 잡초방제를 위한 친환경 농약의 살포효과, 도라지의 생산 수확 후 가공 전략, 대량판매를 위한 유통 시장확보 등	2014
4	가공 상품 판매 전략	-	가공상품의 추가 개발 및 보완, 판매장의 분위기 개선 및 마케팅 전략, 방송, 홈쇼핑, 온라인 쇼핑등을 이용한 판매전략, 상품포장, 디자인, 원료공급 등	2014
5	1차 심포지엄	지리산권 농업의 새로운 가치창출을 위한 6차 산업화 전략 심포지엄	농업 6차산업화의 개념과 경남향노화 산업과 6차산업 및 지리산권 6차산업 진행팀의 사례 발표	2014
6	1차 워크숍	지리산권역 6차산업 육성을 위한 네트워크 구성 워크숍	지리산권역 6차산업 비전과 전략, 기업가정산과 지역생태계 등	2015
7	2차 워크숍	지리산권역 약용작물의 고부가가치 제품 및 6차 산업화 모델 개발	농업·농촌 6차산업화 개념과 경남6차산업화센터 소개, 지리산권 약용작물 이용 고부가가치 전략화, 지리산권 약용작물의 보존, 증식 및 판별 기술 등	2015
8	경상남도 인재개발원 공무원 역량 교육	향노화바이오산업의 기본이해 : 향노화산업과 6차산업	바이오 관련 경상남도 도청 및 시/군 지자체 담당 공무원을 대상으로 농식품 정책방향, 향노화산업과 6차산업의 기본 개념을 교육	2015
9	2015 경남과기대 시니어기술창업스쿨 : 농식품 가공기술 6차산업 창업과정	6차산업과 농산물 이용 발효식품 제조	경남과학기술대학교 시니어창업스쿨 수강생에게 농식품의 정책방향, 6차산업의 개념과 농산물 이용 발효식품 제조와 창업에 대해서 교육	2015
10	경상대학교 최고영농자과정 : 귀농대학 강의	농산물 이용 발효식품 제조 (식초와 식물추출발효음료 중심)	경상대학교 최고영농자과정 중 귀농·귀촌 대상으로 농식품의 정책방향, 6차산업의 개념과 농산물 이용 발효식품 제조와 창업에 대해서 교육	2015
11	2015년 함양여주 6차산업화 전략 세미나	2015년 함양여주 6차 산업화 전략 세미나 자료집	지리산권역인 함양군의 특화작물인 함양여주 6차산업화 육성을 전략으로 공무원, 기업인, 농업인 및 학생을 대상으로 6차산업 개념과 함양여주의 이용기술, 재배기술, 건강기능식품등록 진행사항 및 효능에 대해서 발표 및 토론	2015
12	산업체연구소 취업특강	산업체연구소 취업 특강 ppt	경남지역 창업을 한 청년 CEO들을 초청하여 6차산업과 창/취업 등에 대해서 재학생들에게 특강 실시	2015
13	식품과학부 산업체현장견학	함양영농조합법인 여주 6차산업현황과 HACCP공장 견학	식품영양과 마케팅 수업 일환으로 경남 함양군 소재의 함양영농조합법인에서 진행하고 있는 여주6차산업현황과 HACCP공장 견학	2015
14	향노화 연계 지리산권 6차산업 육성 및 사례	경남 향노화산업과 6차산업 활성화 방안 세미나 자료집	경남의 미래전략산업인 향노화산업가 연계한 지리산권역 6차산업 육성 방안 사례 발표 및 사업단 홍보	2015
15	생약자원연구회 발족 및 워크숍	경남 약용작물의 6차산업화 전략	민간조직인 생약자원연구회를 발족하고 약용작물의 발전을 위한 전략 등 발표와 토론	2015

16	지리산권역 약용작물 6차산업 육성을 위한 협력 및 발전 방안	경남한방약초연구소의 6차산업화 전략 및 비전 워크숍(2차년도) 자료집	지리산권 약용작물의 고부가가치를 위해서 산학연 연계 구축이 필요하며, 더 나아가 산청군 및 경남 향노화산업 연계를 통해 시너지 효과 낼 수 있는 방안 도출 및 경남일보 등 다수의 언론에 워크숍 홍보	2016
17	2016 경남과기대 시니어기술창업스 쿨 : 농식품 가공기술 6차산업 창업과정	6차산업과 농산물 이용 가공기술	경남과학기술대학교 시니어창업스쿨 수강생에게 농식품의 정책방향, 6차산업의 개념과 농산물 이용 가공기술과 창업에 대해서 교육	2016
18	지리산권역 6차산업화 심포지엄: 청년창업을 6차산업으로	지리산권역 6차산업화 심포지엄 자료집	업 베이스 창업을 위한 준비과정 및 창업방법, 펀딩 및 투자유치와 실제 청년 농업6차산업 창업 사례에 대해서 강연 및 농업을 베이스로 한 창업을 위한 기본 개념과 학생들에게 희망의 메시지를 전달	2016
19	지리산권역 고부가가치 제품 및 6차산업 비즈니스 모델 개발	순천과실 이용 농산업활성화 포럼 자료집	지리산권역 자원의 6차산업 사례를 발표하고 이를 통해 순천과실(매실)의 6차산업 육성 방안에 대해서 자문 및 자문위원으로 위촉 받음	2016
20	향노화 연계 지리산권 농업 6차산업 육성 전략	경남 향노화산업 발전 포럼 자료집 (서경방송 생방송)	경남의 미래전략산업인 향노화산업 중 한방향노화산업의 축인 산청-함양-거창-합천의 현재 추진하고 있는 6차산업 육성 사례와 한방특화 웰니스 관광 벨트 연계 6차산업 분야의 육성 전략에 대해서 홍보	2016
21	SCS 열린광장 산청 한방향노화산업 발전 군민토론회	산청 한방향노화산업 발전 군민토론회 패널 참석 (서경방송 방영)	약초의 선택과 집중, 허준선생을 모델로한 스토리텔링화, 선도기업 발굴, 산청군 로드맵의 체계화를 제시 및 대표약초 선정과 수매·보급, 건강기능식품·화장품 등 대표 브랜드 제품의 개발을 위해 산청군의 유·무형자원을 활용할 것을 제안	2016
22	경상남도 인재개발원 향노화바이오교육과정	2016 향노화바이오 교육과정	경남 미래 50년 핵심사업의 일환인 향노화 바이오 산업 벨트구축을 통한 새로운 경남도의 먹거리 구축 인식 확산을 기반으로 지리산권역 향노화 연계 6차산업 육성 전략과 각 지자체의 담당공무원 역할	2016
23	경남6차산업지원 센터 2016 6차산업 창업스쿨	경남6차산업지원센터 2016 6차산업 창업스쿨	경상남도 향노화산업의 사례 및 현황을 비롯하여 지리산권역 향노화 연계 6차산업 육성 전략과 각 지자체의 plan 교육, 창업자들에게 아이템 정보 제공	2016
24	자연애제약 1차 컨설팅	-	새로운 소재(이소플라본 고 함유 콩잎)에 대한 기술이전 타당성과 사업성 검토, 향후 진행방향 설정	2016
25	자연애제약 2차 컨설팅	-	확장 사업(도 주도하 원외탕전사업)에 대한 사업성과 자연애제약 기업명 변경에 대한 방향 등	2016

26	2015년 함양여주 6차산업화 전략 세미나	2015년 함양여주 향노화 축제 심포지엄집	지리산권역인 함양군의 특화작물인 함양여주 향노화 연계 6차산업화 육성을 전략으로 공무원, 기업인, 농업인 및 학생을 대상으로 6차산업 개념과 함양여주의 향노화 소재로서 가능성, 건강기능식품등록 진행사항 및 효능에 대해서 발표 및 토론	2016
27	2016년 시니어창업스쿨	농식품가공과정	농식품산업과 창업시장 현황을 경남 6차산업화 육성 사례를 중심으로 강의, 건강과 기능성 식품소재, 농식품내의 영양성분과 효능, 농식품 마케팅 전략 및 현장실습으로 진행	2016
28	2016년 시니어창업스쿨	향노화과정	경남 전략산업이니 향노화산업의 개념과 경남 한방향노화산업 전략약초 이용 상품개발 방향, 기능성 콩발효식품의 실험과 실습으로 진행	2016
29	거창군 향노화 포럼	거창군 향노화 포럼집	경남 한방향노화산업의 한 축인 거창군의 향노화산업 육성을 위한 포럼에서 거창군 향노화 제품 개발에 대해서 발제 및 토의	2016
30	경상대학교 농식품유통과정	농식품유통과정	경남 향노화산업 연계 지리산권 농식품 6차산업 육성과 농산물을 이용한 향노화 식품 개발과정에 대해서 강의	2017

## 8. 전문연구 인력양성

번호	분류	기준년도	인력양성 현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	인력양성	2014.07-2015.07	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
			1	4	2		4	3			7		
2	인력양성	2015.07-2016.07	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
			3	5		1*	5	3			8		1*
3	인력양성	2016.07-2015.05	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
			1	5	1						7		
합계	인력양성	2016.07-2017.08	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
			5	14	3	1					22		1

\*기타: 박사후연구원인 이지출 하크만은 본국(방글라데시)의 교수로 임용 (2016년 2월)

## 9. 정책활용 내역

번호	정책활용상태	주관부처	시책추진실적 및 계획	활용년도
1	항노화산업 육성 법제화 (검토 중)	국회 법제실 (후원: 농림축산식품부, 산업통상자원부, 보건복지부, 한국보건산업진흥원)	2015년 12월 항노화산업 육성 법제화를 위한 토론회 (국회회관 제3세미나실, 신성범 국회의원 주최)	2015-2017
2	산청 한방향노화 로드맵	산청군 / 산청한방향노화포럼	2015년부터 조직된 산청한방향노화포럼에서 산청 한방향노화 로드맵을 완성하여 산청군 한방향노화산업에 반영 (2017년. 2월)	2017년부터~

## 10. 보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록번호
2016	‘2016 미래건강, 경남항노화콘퍼런스’ 기획보고서 (기획보고서 상에 경남 전략약초 도라지의 6차산업화플랫폼 구축 방향 제시)	2016.10.	경상남도 / 경남테크노파크
2016	‘산청 한방향노화 로드맵’ 보고서	2017.02	산청군 항노화산업과
2017	기술가치평가 보고서 (특허명: 법제 하수오 추출물을 포함하는 산화적 스트레스 개선용 건강기능성 식품)	2017.08	아이피클루 국제특허법률사무소
2017	‘지리산권역 6차산업 비즈니스모델 연구 및 개발 ‘ 보고서	2017.08	경남과학기술 대학교
2017	‘자연애제약 함양군 이전 6차산업 사업계획’ 보고서 (참여기업 자연애제약의 함양군 이전 계획에 따른 6차산업 베이스 사업계획서)	2017.08	(주)자연애제약

## 11. 홍보/전시

### 가. 홍보실적

번호	홍보유형	매체명	홍보내용	홍보일자
1	잡지 인터뷰	주간인물	2014년 농림축산식품연구개발사업 선정 “경남을 대표하는 스타상품을 기대하다” 제목으로 사업팀 및 향후 비전 소개	2014.08
2	잡지 인터뷰	이슈메이커	“스타상품 만들어 농업·농촌 창조경제 실현에 앞장설 것” 제목으로 사업팀 및 향후 비전 소개	2014.12
3	인터넷 신문	아시아통신 등 다수	‘2014년 대한민국 창조경영대상’ 홍보 및 사업팀 및 향후 비전 소개	2014.12

4	잡지 인터뷰	파워코리아	약용작물의 6차산업화, 경남대표 ‘스타상품’ 개발에 힘쓸 터” 제목으로 사업팀 및 향후 비전 소개	2015.05
5	잡지 인터뷰	시사매거진2580	“스타상품 개발해 약초산업에 이바지 하고파” 제목으로 사업팀 및 향후 비전 소개	2015.08
6	인터넷 신문	함양신문 외 다수	함양군 “2015년 함양여주 6차산업화 전략 세미나” 개최 (주제발표)	2015.08
7	기타	kakao 후원 ChangeOn@GNTech	촌놈날다 시즌4 활동	2015.09
8	인터넷 신문	경남일보 외 다수	“경남6차산업지원센터, 진주국제농식품박람회 학술대회 개최”	2015.11
9	인터넷 신문	경남일보 외 다수	“한방약초연구소 약용작물 6차산업 워크숍 개최” 제목으로 홍보	2016.02
10	인터넷 신문	아시아뉴스통신 외 8건	“백수오·이엽우피소 구별 분자마커 개발, 기존 분자마커에 비해 신뢰성 높아, 국제학술지 논문 게재” 언론 보도	2016.03
11	서경방송 생방송	SCS 열린광장	“경남 향노화산업 발전 포럼: 향노화 연계 지리산권 농업 6차산업 육성 전략” 발표	2016.03
12	월간 잡지	경남생약협동조합 발간	경남도라지의 명품브랜드화 (도라지대감), 경남생약농협 창간호 기고	2016.03
13	서경방송 인터넷 신문	SCS 열린광장 포커스 뉴스 외 다수	산청 향노화산업 발전을 위한 군민 대토론회: “산청 한방향노화산업, 제품-서비스-관광 융합이 성공 해법” 등	2016.05
14	지역방송	경남 MBC	“지리산 도라지 상품 개발” 도라지를 이용한 도라지 함유 십전대보환 등의 상품 개발	2016.07
15	지역신문 및 인터넷 신문	경남일보 외 다수	“6차산업으로 약용작물 부가가치 키워야” 제목으로 심포지엄 관련 언론 보도	2016.10
16	중앙방송	YTN	“진짜와 가짜, 과학으로 밝히다” 백수오·이엽우피소 구별 분자마커 개발에 대한 내용 인터뷰	2016.11
17	인터넷 신문	경남연합일보 외 다수	“경남과기대, 비타민 분석능력 국제 수준 인증”의 제목으로 본 산업 소재의 성분분석을 통한 인증 획득	2017.04
18	인터넷 신문	창원일보 외 다수	“경남과기대, 6차산업학과 성과평가서 A등급” 제목으로 중소기업진흥공단에서 실시한 2016년 중소기업 계약학과 성과평가 결과 A 등급 획득관련 언론 홍보	2017.07

#### 나. 전시회 등 참여

번호	홍보유형	매체명	홍보내용	홍보일자
1	박람회 기획 및 전시	2014 진주 국제농식품박람회	현 정부의 농촌·농업 창조경제인 6차산업을 주제로 6차산업의 일반적인 개념과 서부경남의 명산인 지리산(산청), 덕유산(함양) 및 가야산(합천)의 약용작물 중심으로 6차산업 육성 주제관 기획, 산청군 (주)자연애제약, 함양군 함양영농조합법인 및 합천군 도라지사업단 관련 제품 전시	2014.11.05. - 2014.11.09 (5일간)

2	박람회 전시	2014 Feel 경남 특산물 박람회	2014 Feel 경남 특산물 박람회에 참가하여 생도라지 및 도라지 가공품 전시 및 홍보, 판매, 도라지차 시음회 진행	2014.11.13. - 2014.11.16 (4일간)
3	박람회	2015진주국제농식품박람회	박람회-6차산업 학술대회발표	2015.11.11.
4	컨퍼런스 참가	2015 미래건강 경남항노화 산업컨퍼런스	경남한방약초연구소 소개 및 개발 제품 소개	2015.10.15. - 2015.10.16 (2일간)
5	컨퍼런스 참가	2016 미래건강, 경남항노화산업 컨퍼런스	경남한방약초연구소의 6차 산업 홍보 및 상품전시	2016.10.11. - 2016.10.12 (2일간)
6	박람회 참가	2016 진주국제농식품박람회	경남한방약초연구소의 6차 산업 홍보 및 상품전시	2016.11.09. - 2016.11.13 (5일간)
7	박람회 참가	2016 항노화산업박람회 & 시니어 박람회	경남한방약초연구소의 6차 산업 홍보 및 상품전시	2016.11.24. - 2016.11.26 (3일간)

## 12. 기타

### 가. 타 연구개발사업에의 활용

번호	연구사업명	과제명	책임자	과제발주처 (부처)	활용년도
1	산학연 공동기술개발사업	식용버섯균사체를 이용한 비만 개선형 곡물발효식품 개발	조계만	산학연협회 (중소기업청)	2014-2015
2	농촌진흥청 6차산업 수익모델 사업	여주 로하스식품 농촌관광 활성화 사업	함양군 (조계만 추진위원)	농촌진흥청 (농촌진흥청)	2015-2016
3	항노화산업 육성 지원사업	활력새싹삼을 활용한 숙취해소음료 개발	박상원	경남TP (경상남도)	2016-2017
4	채용조건형 중소기업 계약학과 운영대학	농식품융복합 전문가 양성 석사과정 (6차산업학과)	박상혁	중소기업청	2016-2019
5	고부가가치식품 기술개발사업	경남 한방 항노화산업 전략약초 이용 스타상품 개발	강민철	농림축산식품부 (농기평)	2016-2018
6	풀뿌리기업육성 사업	함양 산양삼 기반 항노화 블록버스터급 상품 고도화 사업	조계만	산업통상 자원부	2017-2019
7	산림생명소재 개발사업	지리적 표시제 관련 산양삼을 활용한 유효성분 함량 극대화 및 기반기술 개발	조계만	한국임업진흥원 (산림청)	2017-2019
8	연구용역사업	함양 산양삼 이용 숙취해소 음료 개발	조계만	함양산양삼 6차산업사업단	2017



## 나. 포상 및 수상 실적

종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일자	포상기관
수상	대한민국 창조경영대상 (식품과학부문)	2014년 대한민국 혁신리더 식품과학부문 수상	조계만	2014.12.19	시사경제매거진 등
포상	학술상(연구부문)	2014년 국제저널지 발표 우수 교원	조계만	2014.12.30	경남과학기술대학교
포상	대상(산학협력부문)	2014년 연구비, 논문, 특허, 기술이전 등에서 가장 탁월한 교원	조계만	2015.04.29	경남과학기술대학교
수상	포스터 발표상 (제16-15호)	2016년 한국약용작물학회 춘계학술발표회 우수 포스터 발표상 수상	한은희 외 5명	2016.05.13	(사)한국약용작물 학회
수상	제26회 과학기술 우수논문상	제26회 과학기술우수논문상 (백수오와 이엽우피소 판별 마커 논문)	이신우	2016.03.18	한국과학기술단체 총연합회

## 다. 민간 조직

번호	조직명	활동 내용	활동 기간
1	산청한방향노화 포럼	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 2015년 7월: 포럼준비위원회 개최</li> <li>▶ 2015년 8월: 포럼 창립대회 개최</li> <li>▶ 2015년 12월: 향노화법제화를 대국민 토론회 개최 (국회의원 제3세미나실 : 신성범 국회의원 주제)</li> <li>▶ 2016년 5월: 산청향노화산업 로드맵 발표</li> <li>▶ 2016년 2월: 산청 한방향노화 로드맵 의견 수렴</li> <li>▶ 2017년 5월: 산청군 기업의 애로사항 해결을 위한 원탁토크</li> <li>▶ 2017년 7월: 제4차 산업혁명을 대비한 산청한방향노화산업 발전 방향 및 토론</li> </ul> <p>※ 본 총괄 연구책임자는 기획분과위원장 역임</p>	2015.08 ~ 2017.07
2	생약자원연구회 발족 및 워크숍	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 2015년 10월: 생약자원연구회 발족</li> <li>▶ 2016년 10월: 워크숍 개최 - 경남 약용작물의 6차산업화 전략</li> </ul>	2015.10 ~ 현재
3	경남향노화산업 발전연구회	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 2015년 4월: 경남향노화산업발전연구회 발족 - 총괄 연구책임자 조계만 : 서비스 분과 위원 위촉</li> <li>- 참여기업 책임자 강민철 : 산업 분과 위원 위촉</li> <li>- 세부 연구책임자 김윤근 : 소재 분과 위원 위촉</li> <li>▶ 2016년 4월: 2차 경남향노화산업발전연구회 - 경남 향노화산업 발전 전략 및 향노화주식회사 활성화 방안</li> </ul>	2015.04 ~ 현재

## 제10절 사업화성과 및 매출실적

### ▣ 몽고식품(주)

#### 1. 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0억원
			향후 3년간 매출	25억원
		관련제품	개발후 현재까지	0억원
			향후 3년간 매출	0억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0% 국외 : 0%
			향후 3년간 매출	국내 : 20% 국외 : 20%
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 0% 국외 : 0%
			향후 3년간 매출	국내 : 0% 국외 : 0%
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		1위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		3위

#### 2. 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		1년		
	소요예산(백만원)		26		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			0	15	25
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0	20	20
		국외	0	20	20
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		추후 한방소재 및 매콤함을 겸비한 다용도 유사소스 개발예정			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)		현재	3년후	5년후
	수입대체(내수)		0	15	25
	수 출		0	3	5

## ■ (주)자연애제약

### 1. 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	2억원	
			향후 3년간 매출	5억원	
		관련제품	개발후 현재까지	0억원	
			향후 3년간 매출	0억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0.1% 국외 : 0%	
			향후 3년간 매출	국내 : 0.5% 국외 : 0%	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 0% 국외 : 0%	
			향후 3년간 매출	국내 : 0% 국외 : 0%	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			10위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			20위

### 2. 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		-		
	소요예산(백만원)		-		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			2	5	8
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0	0.5	0.8
		국외	0	0	0
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		추후 산양삼 등을 활용한 한의용 및 건강기능식품으로 개발 예정			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)		현재	3년후	5년후
	수입대체(내수)		0	10	20
	수 출		0	5	10

# 제4장 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호

D-06

## 제1절 목표달성도

### 1. 정성적 목표달성도

가. 1차년도 : 2014년 7월 29일 ~ 2015년 7월 28일

세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
제1세부 : 지리산 권역 약용작물 복합추출물 활용 천연소스·조미 제품화 기술 및 6차 산업 네트워크 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>고초균 그룹 균주 선발·동정</li> <li>천연소스/조미 제조를 위한 약초복합 추출물의 최적화</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>영지버섯의 이화학적 특성 및 생리활성 (농식품부 협의사항)                             <ul style="list-style-type: none"> <li>-이화학적특성, 성분분석(<math>\beta</math>-glucan 등), 항산화활성 등 확인</li> </ul> </li> <li>하수오의 기능성물질 탐색 및 인지 개선능 확인                             <ul style="list-style-type: none"> <li>-기능성물질 : 4종 구조/동정</li> <li>-<i>In vitro</i>세포모델에서 산화적스트레스 개선효과 확인</li> <li>-세포/동물모델에서 인지능 개선효과 확인</li> </ul> </li> <li>소스 제조용 <i>B. subtilis</i> group 선발·동정 : 2종 확보                             <ul style="list-style-type: none"> <li>-특허균주 기탁 준비 중</li> </ul> </li> <li>한방약용작물의 최적 추출조건 및 혼합비율 선정                             <ul style="list-style-type: none"> <li>-4종의 혼합비율과 50% 주정/5시간/70°C 추출조건 확립</li> </ul> </li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>콩발효물 제조</li> <li>천연소스/조미 시제품화</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>콩발효물 및 이를 이용한 스톱 제조 : 단독 혹은 혼합균주 이용 스톱 제조 후 평가                             <ul style="list-style-type: none"> <li>-소스 제조용은 2TDJ15번 선정</li> <li>-조미제조용은 MGD02+2TDJ15 혼합균주 선정</li> </ul> </li> <li>약용작물 추출물 이용 천연 소스류 및 조미류 제품화 :                             <ul style="list-style-type: none"> <li>-약용복합추출물 10% 첨가 100% 식물성 소스 시제품화</li> <li>-약초당추출발효액 25% 첨가 자연조미료 시제품화</li> </ul> </li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>6차 산업 육성을 위한 네트워크 구축 및 홍보·마케팅 지원</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>심포지엄 및 워크숍 : 3회, 홍보, 전시회 등 : 5회</li> <li>정책협의회 : 1회 (과제활용 담당관)</li> <li>6차산업 등 교육 : 4회</li> <li>수상 : 대한민국창조경영대상</li> </ul>
제2세부 : 지리산 권역 약용작물 복합추출물 활용 기능성 음료·드링크 제품화 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>선정된 약용작물 (하수오, 자소엽)의 추출 및 혼합 최적화 연구</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>물과 발효주정을 이용하여 유효성분의 추출</li> <li><i>In vitro</i> test ; 항산화, 항당뇨, 항비만 효과 측정</li> <li>약용작물 추출물 최적의 혼합비율 조합 선정</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>약용작물 복합추출물의 음료 개발을 위한 최적화 연구</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>생약추출물 혼합물의 항산화 활성 측정</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>약용작물 복합추출물의 최적 발효조건 확립</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>발효기간별 최적 복합약용작물의 발효조건 확립</li> <li>기간별 약용작물 복합발효액의 항산화활성 측정</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>음료(1-2) 개발을 위한 최적의 혼합 레시피 개발</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>음료(1-2)개발을 위한 최적의 혼합 레시피 개발</li> <li>제조공정화 및 제품화</li> </ul>
제3세부 : 지리산 권역 약용작물 복합추출물 활용 제품의 표준화 및 관능평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>제조 조건별 및 제품의 영양성분(일반성분, 아미노산, 지방산, 비타민, 폴리페놀 물질) 검토</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>약용식물(백하수오)의 일반성분 및 영양 기능성 성분을 탐색 아미노산 조성 및 지방산 조성 및 수용성과 지용성 비타민 함량 제시</li> <li>항산화에 기여하는 총페놀 함량과 항산화 활성을 제시</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>제품의 휘발성 향기성분 분석</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>약용식물(백하수오)가 가지는 휘발성 향기성분 검토</li> <li>Sniffing test를 통한 개별 휘발성 성분에 대한 odor description 제시</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>가공 중 유해화학물질 분석</li> </ul>	95	<ul style="list-style-type: none"> <li>유해화학물질(벤조피렌) 분석을 통해 약용식물에는 유해화학물질이 미검출됨을 제시</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>패널을 이용한 제품의 소비자 선호도 조사를 통해 제품의 기호성 탐색</li> </ul>	90	<ul style="list-style-type: none"> <li>약용식물(백하수오)를 이용한 식용차를 통해 관능검사를 실시하고, 소비자들의 선호도를 조사하여 그 결과를 제시</li> </ul>

세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
제4세부 : 지리산 권역 자생 토종 약용작물의 판별 마커 및 보존 기술 개발	■ 유전자원 확보 및 보존 체계 구축	90	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 농촌진흥청과 각도의 농업기술원을 중심으로 하수오, 당귀, 천궁 등의 표준 시료 계통 수집</li> <li>■ 영양체 기내보존 체계 구축 중 (학술대회발표 1건)</li> </ul>
	■ 유사약용작물의 중·속간 구분용 분자생물학적 마커 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 혼·오용으로 문제가 되고 있는 이엽우피소와 백수오에 관한 기존의 마커와 다른 염색체 계층 SNP마커이용 판별 기술개발</li> <li>■ HRM curve 분석기술을 이용한 판별 기술 개발</li> <li>■ 국내 토종 장백도라지의 판별마커개발 (특허출원 완료 1건)</li> </ul>
제5세부 : 지리산 권역 약용작물 활용 6차 산업 및 수익창출 모델 개발	■ 산청군 한방약초 재배 및 가공에 대한 산업구조 분석	100	■ 확장된 가치사슬모형을 이용한 한방약초 산업구조를 현재(As-Is)와 미래(To-Be)를 기반으로 분석 완료
	■ 산청군 한방약초를 기반으로 하는 새로운 비즈니스 모델 제시	100	■ 전략적 의사결정 모형을 기반으로 한 동태적 조직변화를 이루고 이를 통해 새로운 시장 개척 및 새로운 수익을 발생시키는 비즈니스 모델 제시
	■ 산청군 한방약초 재배 농민 및 가공업체 재직자 역량강화 교육	100	■ 지리산권역 한방약초 가공 및 유통업체 컨설팅과 지역 네트워크 구축을 위한 워크숍 진행
제1협동 : 지리산 권역 약용작물 복합추출물의 생활습관성 질환 개선 효과 검증	■ 약용버섯 추출물과 약용작물 복합추출물의 세포주 안전성 검증	100	■ HepG2 및 3T3L1 세포주에서 MTT 및 RTCA 방법을 통해 세포독성 유발 용량 확인
	■ 약용버섯 추출물의 세포주 효능 검증	100	■ HepG2 및 3T3L1 세포주에서 AMPK와 ACC의 활성화 및 GLUT4 발현에 대한 효능 분석
	■ 약용작물 복합추출물의 세포주 효능 검증	100	■ HepG2 및 3T3L1 세포주에서 AMPK와 ACC의 활성화 및 GLUT4 발현에 대한 효능 분석
제2협동 : 지리산 권역 약용작물의 대량생산 및 표준화	■ 화합물 구조 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 4개 약용작물(도라지, 하수오, 자소엽, 당귀)의 시료확보</li> <li>■ 유기용매를 이용한 분획물 조제</li> <li>■ 기기분석에 의한 구조동정 실시</li> </ul>
	■ 한방천연물 library 및 profiling 구축	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 시료 조제 및 추출물 제조</li> <li>■ 기기분석(분석조건 확립, 분석)</li> </ul>
	■ 지표물질 정성·정량분석	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 4개 약용작물(도라지, 하수오, 자소엽, 당귀)의 시료조제</li> <li>■ 기기분석에 의한 정량분석</li> </ul>
	■ 기능성대사체 선별	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 4개(당귀, 도라지, 백수오, 자소엽) 약용작물 대상 추출</li> <li>■ 기기분석(분석조건 확립, UPLC Q-TOP 분석)</li> </ul>
	■ 약용작물 육묘장 및 시험재배	100	■ 약용작물 대상 종근 및 종자 확보 및 식재

나. 2차년도 : 2015년 7월 29일 ~ 2016년 7월 28일

세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
제1세부 : 지리산 권역 약용작물 복합추출물 활용 천연소스·조미 제품화 기술 및 6차 산업 네트워크 구축	■ 약용작물의 차 제조 조건 확립	100	■ 볶음처리에 따른 유효성분(polyphenol성 화합물) ■ 생리활성 변화 확인(항산화, 소화효소 저해활성 확인 및 DNA 보호효과 확인)
	■ 식·약용버섯균사체 선발 ■ 발효물 제조 ■ 천연소스·조미 제품화	100	■ <i>Asp. oryzae</i> , <i>Rhi. oryzae</i> , 송이버섯균사체 및 까치버섯 균사체 이용 활성글루텐 가수분해-발효물 제조 및 이화학적 특성, 생리활성 분석 ■ 발효물에 복합약초추출물을 첨가하여 자연조미료 제조 및 이화학적 특성, 생리활성 및 유효성분 분석 ■ 활성글루텐과 콩알 메주 가수분해-발효물 제조 및 이화학적 특성, 생리활성 및 유효성분 분석
	■ 6차 산업 육성을 위한 네트워크 구축 및 홍보·마케팅 지원	100	■ 심포지엄 및 워크숍 : 2회, 홍보, 전시회 등 : 11회 ■ 6차산업 연제 발표 및 교육 : 12회 ■ 민간 조직 구성 : 2건 -산청한방향노화포럼, 생약자원연구회
제2세부 : 지리산 권역 약용작물 복합추출물 활용 기능성 음료·드링크 제품화 기술	■ 선정된 약용작물(도라지 및 엉겅퀴)의 유효성분 추출 및 혼합 최적화 연구	100	■ 물과 발효주정을 이용하여 유효성분의 추출 ■ <i>In vitro</i> test ; 항고혈압, 간보호, 항산화, 항당뇨, 항비만 효과 측정 ■ 약용작물 추출물 최적의 혼합비율 조합 선정
	■ 약용작물 복합추출물의 음료개발을 위한 최적화 연구	100	■ 생약추출물 혼합물의 항산화 및 항당뇨활성 측정
	■ 약용작물 복합추출물의 최적 발효조건 확립	100	■ 발효기간별 최적 복합약용작물의 발효조건 확립 ■ 기간별 약용작물 복합발효액의 생리활성 측정
	■ 음료(3-4) 개발을 위한 최적의 혼합 레시피 개발	100	■ 음료(3-4)개발을 위한 최적의 혼합레시피 개발 ■ 제조공정화 및 제품화
제3세부 : 지리산 권역 약용작물 복합추출물 활용 제품의 표준화 및 관능평가	■ 제조 조건별 및 제품의 영양성분(일반성분, 아미노산, 지방산, 비타민, 폴리페놀 물질) 검토	100	■ 약용식물(당귀, 자소엽)의 일반성분인 수분, 지방, 단백질, 회분 및 탄수화물의 비율을 제시 ■ 유리 및 구성 아미노산 조성, 지방산 조성 및 수용성(vitamin C, 및 niacin)과 지용성 비타민 (tocopherols) 함량 제시 ■ 약용식물(당귀, 자소엽)의 총페놀 함량 제시를 통한 DPPH활성을 통한 항산화 활성을 제시
	■ 제품의 휘발성 향기성분 분석	100	■ GC/MS 분석을 통한 약용식물(당귀, 자소엽)이 가지는 총 51가지 및 43가지 휘발성 향기성분 분석결과 제시 ■ Sniffing test를 통한 개별 휘발성 성분에 대한 odor description 제시
	■ 가공 중 유해화학물질 분석	90	■ 유해화학물질(벤조피렌) 분석을 통해 약용식물(당귀, 자소엽)에는 미검출됨을 제시
	■ 패널을 이용한 제품의 소비자 선호도 조사를 통해 제품의 기호성 탐색	90	■ 약용식물(당귀, 자소엽)를 이용한 식용차를 통해 관능검사를 실시하고, 그 결과를 토대로 소비자들의 선호도를 조사하여 그 결과를 제시

세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
제4세부 : 지리산 권역 자생 토종 약용작물의 판별 마커 및 보존 기술 개발	■ 우수약용작물의 육묘보급 시스템 구축	90	■ 백수오, 꾸지뽕, 당귀, 천궁 등 주요 계통 자원 지속적 수집 ■ 기내 및 종자 보존
	■ 유사종 종/속 구별 RAPD 마커 개발	90	■ SNP분석용 계통별 염기서열 정보 분석 ■ trnL-trnF, matK, ITS 유전자별 판별 마커 개발 집중
	■ SNP 기술을 이용한 분자생물학적 바코드 개발	90	■ ARMS-PCR 기술, HRM분석 기술 등을 통한 상기 계통 판별 마커 개발 및 특허 출원 : 꾸지뽕(중국종, 한국종), 백수오와 이엽우피소, 당귀계통(세발당귀, 참당귀, 일당귀)
	■ 생리생태학적, 생화학적 판별 마커 개발	90	■ 중간 또는 계통간 교잡종의 조사(백수오와 이엽우피소간), 중국종과 한국 계통간의 꾸지뽕 ■ 이들의 혼합비율 추정 ■ 교잡종을 이용한 형태학적, 생태학적 비교분석 등
제5세부 : 지리산 권역 약용작물 활용 6차 산업 및 수익창출 모델 개발	■ 지리산권역 한방약초를 기반으로 하는 지속적 수익창출 비즈니스 모델 제시	100%	■ 지속적 수익 창출을 위한 6차산업을 위해서는 공동체적 사고와 기업가 정신이 절실히 필요함 ■ 농촌의 사회적 문제 해결의 관점으로 시작되는 6차산업은 공동체를 결속하고 지속적으로 네트워킹을 유지하여 영리를 창출하여야 함 ■ 따라서 이에 합당한 기업가정신이 절실히 요구되고 6차산업 기업가정신에 대한 지속적 교육이 필요함
	■ 지리산권역 한방약초를 기반으로 하는 스토리 발굴과 커뮤니티 지도 개발	100	■ Why, How, What으로 연결되는 지역스토리, 공동체 스토리, 농장 스토리 개발
	■ 지리산권역 한방약초 재배 농민 및 가공업체 재직자 역량강화 교육	100	■ 지역 사업을 리드할 경영자에 대한 6차산업 기업가정신 교육진행 ■ 액션러닝과 디자인씽킹 통합방법론을 기반으로 조직 및 개인의 자율적 문제해결능력 향상과정(고객의 문제관찰, 문제정의, 아이디어, 프로토타입 제작의 과정을 팀기반으로 진행)
제1협동 : 지리산 권역 약용작물 복합추출물의 생활습관성 질환 개선 효과 검증	■ 동물모델에서 약용버섯 추출물의 비만, 지방간 및 인슐린저항성 개선 효능평가 및 기전 연구	100	■ 고지방식이 동물모델에서 식이섭취량과 체중증가의 상관성 분석, 지방조직 및 간조직의 무게 분석, 간조직 내 지질축적 및 혈중 ALT, AST, ALP 분석 ■ 고지방식이 동물모델에서 AMPK와 ACC의 활성화 및 GLUT4 발현에 대한 효능 분석, 혈중 지질지표 분석 ■ 고지방식이 동물모델에서 공복혈당, ITT, GTT 분석
	■ 동물모델에서 약용작물 복합추출물의 비만, 지방간 및 인슐린저항성 개선 효능평가 및 기전 연구	100	■ 고지방식이 동물모델에서 식이섭취량과 체중증가의 상관성 분석, 지방조직 및 간조직의 무게 분석, 간조직 내 지질축적 및 혈중 ALT, AST, ALP 분석 ■ 고지방식이 동물모델에서 AMPK와 ACC의 활성화 및 GLUT4 발현에 대한 효능 분석, 혈중 지질지표 분석 ■ 고지방식이 동물모델에서 공복혈당, ITT, GTT 분석
제2협동 : 지리산 권역 약용작물의 대량생산 및 표준화	■ 약용작물 부위별/재배시기별 기능성대사체 분석	100	■ 6개(당귀, 도라지, 하수오, 이엽우피소, 백수오, 자소엽) 약용작물 대상 추출 ■ 기기분석(분석조건 확립, UPLC Q-TOF 분석) ■ 약용작물 부위별/재배시기별 화합물 Marker 분석
	■ 약용작물 육묘장 및 시험재배	100	■ 약용작물 대상 종근 및 종자확보 및 식재

다. 3차년도 : 2016년 7월 29일 ~ 2017년 7월 28일

세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
제1세부 : 지리산 권역 약용작물 복합추출물 활용 천연소스·조미 제품화 기술 및 6차 산업 네트워크 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ GABA 생성 젖산균 선발</li> <li>■ 발효물 제조</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 발효식품으로부터 분리한 젖산균 풀에서 GABA 생성 젖산균 선발 및 동정 : <i>Lac. brevis</i> 10종</li> <li>■ 선발 젖산균 이용 활성글루텐과 콩알 메주 가수분해-발효물 제조 및 이화학적 특성, 생리활성 및 유효성분 분석</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 생물공정기술 이용 활성 증진 도라지 제조 및 시제품화</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 증숙과 고온숙성과 젖산발효와 고온숙성을 병행하여 활성이 증진된 도라지 제조 기술 : 대환 제조</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 젖산발효 이용 발효 음료 및 천연조미료 시제품화</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 선발 <i>Lac. brevis</i>와 <i>Lac. plantarum</i> 혼합균주 이용 여주혼합야채젖산발효음료 제조</li> <li>■ 삼-물김치 젖산발효물과 식용버섯균사체 콩발효물 이용 천연조미료 제조 및 이화학적 특성, 생리활성 및 유효성분 분석, 시제품화</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 6차 산업 육성을 위한 네트워크 구축 및 홍보·마케팅 지원</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 심포지엄 : 1회, 홍보, 전시회 등 : 8회</li> <li>■ 6차산업 연계 발표 및 교육 : 5회</li> <li>■ 민간 조직 활동 : 산청한방향노화포럼</li> </ul>
제2세부 : 지리산 권역 약용작물 복합추출물 활용 기능성 음료·드링크 제품화 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 약용작물(1-5)의 음료류 개발을 위한 최적추출조건 확립</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 약용작물(도라지, 하수오, 자소엽, 당귀, 엉겅퀴)의 추출방법 및 조건의 최적화</li> <li>■ 추출물의 기능성 생리활성 검정</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 약용작물(1-5) 추출물의 최적 배합조건 확립</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 약용작물 추출물의 최적 배합조건 확립</li> <li>■ 약용작물 복합추출물의 기능성 검정</li> <li>■ 혼합음료의 생리활성 최적화 조건 확립</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 음료(5-7)개발을 위한 최적의 혼합 레시피 개발</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 음료(5-7)개발을 위한 최적의 혼합 레시피 개발</li> <li>■ 최적 음료 첨가물 선정</li> <li>■ 소비자 대상 관능평가 및 영양성분 분석</li> </ul>
제3세부 : 지리산 권역 약용작물 복합추출물 활용 제품의 표준화 및 관능평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 제조 조건별 및 제품의 영양성분(일반 성분, 아미노산, 지방산, 비타민, 폴리페놀 물질) 검토</li> </ul>	95	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 약용식물(도라지)의 영양 기능성 성분 탐색하여 그 결과를 제시</li> <li>■ 가공(열)처리에 따른 영양 및 기능성 성분의 변화를 탐색하여 그 결과를 제시</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 제품의 휘발성 향기성분 분석</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 가공(열)처리 과정 중 변화되는 약용식물(도라지)의 향기성분 변화 검토</li> <li>■ 휘발성 향기성분을 토대로 가공(열)처리 조건의 최적 조건 제시</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 가공 중 유해화학물질 분석</li> </ul>	90	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 가공(열)처리 과정 중 유해화학물질(벤조피렌)을 분석하여 미검출 됨을 제시</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 패널을 이용한 제품의 소비자 선호도 조사를 통해 제품의 기호성 탐색</li> </ul>	95	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 전자센서를 통한 도라지의 맛과 향기성분을 분석하고 소비자의 기호도에 긍정적인 영향을 미치는 최적 조건을 탐색하고 그 결과를 제시</li> </ul>



세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
제4세부 : 지리산 권역 자생 토종 약용작물의 판별 마커 및 보존 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 우수약용작물 육묘 보급을 통한 농가소득 증대</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 우수약용작물 육묘 보급시스템 구축 : 경남농업기술원 약용자원연구소, 경남한방약초연구소 등과의 협력체계 구축을 통한 농가소득 증대</li> <li>■ 기내 배양 시스템 구축 : 유용유전자원의 기내증식 및 부정근 배양 조건 확립</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 자생 토종약초의 기원판별을 위한 분자생물학적 마커 개발</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 핵내 ITS 및 엽록체(trnL-trnF, mat K)유전자의 SNP를 이용한 국내 자생 토종 약용작물의 판별 마커 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>-농가에서 수집한 백수오의 진위여부 판별(SCI 논문발표 1건)</li> <li>-참당귀, 세발당귀, 중국당귀, 일당귀, 구당귀의 판별 마커 개발 (특허 출원 2건)</li> <li>-국내 및 중국 자생 꾸지뽕의 판별 기술 개발(특허출원 1건)</li> <li>-국내자생, 캐나다, 유럽 등에서 수집한 엉겅퀴의 기원판별 기술 개발(특허출원 1건)</li> </ul> </li> <li>■ HRM 패턴 분석기술을 이용한 국내자생 토종 약용작물의 판별 및 혼입여부 분석 기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>-참당귀, 세발당귀, 중국당귀, 일당귀, 구당귀의 기원판별 및 혼입여부 판별 기술 확립</li> <li>-꾸지뽕(국내자생, 중국계통), 엉겅퀴(국내자생, 캐나다, 유럽)의 기원 판별 혼입여부 판별 기술 확립</li> </ul> </li> </ul>
제5세부 : 지리산 권역 약용작물 활용 6차 산업 및 수익창출 모델 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 산청군 한방약초에 대한 강화된 브랜드 마케팅 제시</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 동의보감의 근거를 기반으로 예방의학적 측면을 강화한 한방약초의 하이컨셉 도출</li> <li>■ 하이컨셉 요소를 이용한 브랜드 마케팅 제시 : ‘백성을 위한 예방의학, 지리산 약초’</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 산청군 한방약초 재배 농민 및 가공업체 재직자 역량강화 교육</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 현대 농산업의 트렌드 분석에 기반한 농업비즈니스 유형별 추구 방향 연구 및 교육</li> <li>■ 소셜미디어 마케팅 실행 모델 구축 및 교육</li> </ul>
제1협동 : 지리산 권역 약용작물 복합추출물의 생활습관성 질환 개선 효과 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 적하수오 추출물의 세포주 안전성 검증</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ HepG2 세포주에서 MTT 및 RTCA 방법을 통해 세포독성 유발 용량 확인</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 적하수오 추출물의 세포주 효능 검증</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ HepG2 세포주의 FFA 유발 지방축적모델에서 간세포 내 지질축적 및 중성지방 함량 변화 분석</li> <li>■ AMPK, ACC와 SREBP-1의 활성화 및 GLUT4 발현에 대한 효능 분석</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 동물모델에서 적하수오 추출물의 비만, 지방간 및 인슐린저항성 개선 효능평가 및 기전 연구</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 고지방식이 동물모델에서 식이섭취량과 체중증가의 상관성 분석, 지방조직 및 간조직의 무게 분석, 간조직 내 지질축적 및 중성지방 함량 변화 분석</li> <li>■ 고지방식이 동물모델에서 AMPK, ACC와 SREBP-1의 활성화 및 GLUT4 발현에 대한 효능 분석</li> <li>■ 고지방식이 동물모델에서 공복혈당 및 ITT, GTT 분석</li> </ul>
제2협동 : 지리산 권역 약용작물의 대량생산 및 표준화	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 대량추출체계 확립 및 표준화</li> </ul>	80	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 약용작물의 scale-up 추출 연구</li> <li>■ 경남생약농업협동조합 농추출라인 이용 대량 추출</li> <li>■ 대량추출공정 확립을 위한 추출물 표준화</li> <li>■ 소재의 안정성 확보(잔류농약, 지표성분 함량 등)</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 재배단지 조성</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 약용작물 대상 종근 및 종자확보 및 재배단지 조성</li> </ul>

## 2. 정량적 목표달성도

(단위 : 건수)

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액 (천원)	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비 SCI						
최종목표	8	8		4		4					2	10	18	21	9	10	3	20	
1차년도	목표	2											3	4	3	2	1	2	
	실적	3				1	8,706				1	1	4	12	10	7	0	6	5*
	달성율	150				-	-				-	-	133	300	333	350	0	300	-
2차년도	목표	3										2	4	5	3	3	1	6	
	실적	4				1	44,628					2	4	16	15	9	1	12	6**
	달성율	133				-	-					100	100	320	500	300	100	200	-
3차년도	목표	3	1		2		2					3	5	6	3	3	1	10	
	실적	11	1 (1)*	3**	1 (1)**	2	150,472					2	5	20	8	7	1	10	10**
	달성율	366	100	-	50	100	-					66	100	333	267	233	100	100	-
소계	목표	8	1		2		2					5	12	15	9	8	3	18	
	실적	18	1	3	1		4	203,806			1	5	13	48	33	23	2	28	21
	달성율	225	100	-	50		200	-			-	100	108	320	367	288	67	156	-
종료 1차년도		2		2		2					2	3	3		2		2		
종료 2차년도		3										2	2	2					
종료 3차년도		2										1	1	1					
소계		7		2		2					2	5	6	6		2		2	
합계		8	8		4		4				2	10	18	21	9	10	3	20	

\*기타 : 타과제 연구 활용 2건; 2014년 창조경영대상 수상 등 3건 (총괄 책임자)

\*\*기타 : 타과제 연구 활용 3건; 민간조직 2건; 수상 1건 (세부책임자)

\*\*\*기타 : 타과제 연구 활용 4건; 수상 1건; 보고서 5건 (기술가치평가 보고서 1건 포함)

\*특허등록 : 등록 1건 진행 중

\*\*품종등록 : 생물자원기탁 3건 (특허균주)

\*\*\*기술실시(이전) : 특허에 대해서 현재 (주)콜마비엔에이치와 (주)자연애제약에 이전 협의 중

## 제2절 관련분야 기여도

○ 제 1세부의 특허균주인 발효미생물은 식물성 소스 혹은 조미료 제조에 사용될 수 있을 뿐만 아니라 다양한 기능성 발효식품에 사용될 수 있고, 특히 생균제제 유산균은 유효성분이 증가된 콩발효식품 혹은 균주 자체로 다양한 제품개발이 가능한 결과 제시

○ 시판 중인 액상조미료들(생표식품의 연두, 청정원의 요리의 한수, CJ의 요리수, 신송식품의 이유)은 콩 또는 활성글루텐을 산분해하여 얻어진 액상원료 또는 인공감미료를 첨가하여 맛을 낸 액상조미료들로서 소비자가 생각하는 안전한 식품의 요구 또는 최근의 트렌드와는 차이가 있는 것이 현 실정임. 이에 본 연구는 단백질 분해효소를 함유한 것으로 알려진 천연물 소재 및 효소를 이용한 액상조미 소재의 제조공정 및 천연 액상조미료의 제조 기술 개발은 향후 제품 출시 경우 액상조미료의 시장 판도를 바꿀 수 있는 기술적 우위점을 제시

○ 활성증진 도라지 제조기술은 다양한 뿌리약용작물의 활성 증진을 통한 향후 기능성 소재 개발에 기여

○ 제 2세부의 다양한 약용작물 복합추출물 베이스 기능성 음료 제조 기술은 향후 항산화, 항고혈압, 간기능, 항당뇨 음료로 개발할 수 있는 자료를 제시

○ 제 3세부에서 제시하는 약용작물의 영양성분 및 기능성 성분의 표준화 결과는 실험에 사용되는 약용작물을 이용하여 제품개발 과정에서 기초자료로써 이용이 가능한 결과를 제시

○ 약용작물의 위해성 성분평가를 통해 최근 문제시되는 식품 및 식품소재의 안정성 문제 해결을 위한 자료로 이용이 가능

○ 약용작물이 가지는 향기성분을 이용하여 그동안 약용작물이 가지는 단점인 부정적인 향기성분을 줄일 수 있는 여러 가지 가공방법을 제시하고 부정적인 향기성분이 저감된 식품 및 식품소재로의 이용이 가능하다고 판단됨

○ 약용작물을 이용한 식용차에 대한 소비자 관능평가 결과를 통하여 소비자가 선호하는 맛성분을 파악하여, 고부가가치 식품 및 식품소재를 개발 할 수 있는 토대가 되는 결과를 제시

○ 제 4세부의 분자유전학적 기반 약용작물 판별기술은 약용작물 기반 건강기능식품 개발 시 소재의 원산지, 혼입 여부 등을 정확하게 판단할 수 있는 기준을 제시

○ 제 5세부의 컨버젠 기반 비즈니스 모델은 다양한 6차산업자 혹은 기업의 비즈니스 모델 개발에 크게 활용될 수 있음

○ 제 1협동과 제 2협동의 효능평가와 첨단 기기분석 기술을 이용한 기능성 대사체 분석 기술은 향후 건강기능식품 원료 개발 시 유용하게 사용될 수 있음

○ 한편 본 연구 중 조직된 산청 한방향노화포럼에서 제시한 한방향노화산업 로드맵은 산청군과 유사한 전국 각 군소도시의 특화작물을 이용한 신산업 육성의 로드맵 제시가 가능

## 제1절 연구개발 결과의 활용방안 및 기대효과

## 1. 연구개발 결과의 활용방안

- 본 연구결과의 국제저명학술지(생명/식품관련분야 SCD) 게재를 통한 한방약초의 기능적인 우수한 측면을 부각하고 약초산업의 경쟁력 강화를 위한 정책적 활용
- 본 연구결과에 의해 파생된 천연소스 혹은 조미료 및 기능성음료 기술은 경남 향노화산업 대표 스타상품으로 개발로 육성
- 중국산 약재 수입을 대체할 수 있는 토종 약용작물의 체계적인 종자보증 시스템 확립을 통한 지리산 특산 약용식물의 유전자원 보전, 증식 및 자원화에 활용
- 한방약초를 활용한 산청군 지역을 넘어 경남대표 향토 소재 개발의 기반을 구축함으로써 관광농원 등에 지역 농산물 소비가 촉진돼 지역경제 발전에 일익을 담당
- 한약약초 기능성대사체 분석 기술을 통한 다양한 기능성 가공제품 개발의 기초자료로 활용할 수 있을 뿐 만 아니라 이를 통한 다양한 기능성 가공제품의 신규 시장 진입이 가능
- 최근 급속도로 성장하고 있는 우리 발효식품의 대중화, 다양화 및 고급화를 동시에 이루기 위한 전 방위적 발전전략이 필요한 시점으로 발효산업의 활성화 및 세계화를 위한 새로운 기능성 천연조미료의 개발, 보급 및 미생물 분야의 실용화, 현장화 연구에 활용
- 소비자 기호에 맞는 한방약초 천연조미식품 개발을 통한 다양한 고객층 확보하고 100년 전통의 경남대표 향토기업인 몽고식품(주)의 생산라인을 이용하여 천연조미료를 생산하여 국내 수요 창출 뿐 만 아니라 수출 전략상품 개발에 활용
- 건강 지향적 트렌드에 따른 기능성음료 시장 성장으로 한방약초 활용 기능성음료 개발을 통한 다양한 고객층 확보하고 청정지역 지리산에 생산된 한방약초 기능성음료로 신규시장 진입에 활용
- 한방 약용작물을 이용 지닌 기능성 소재를 개발하고, 이를 이용하여 다양한 형태의 고객 맞춤형 건강기능성 소재의 상품화를 통한 내수촉진은 물론 수출 경쟁력 제고
- 한방약초 활용 제품은 향후 생활습관병(대사증후군) 질병 예방을 위한 건강기능식품 개발에 관한 연구는 초기 단계인 실정이므로 본 연구의 성공적 수행으로 독성과 부작용이 없는 식용 유래의 기능성 대사체 개발이 가능하여 향후 식·의약 소재화에 활용
- 유용자원(신규 건강기능성 소재) 확보 후 특허 출원 및 관련업체(식품, 생물공학, 의약/제약회사 등) 기술이전을 통한 산업화에 활용
- 한방 약용작물 추출과정 중 기능성을 위한 고효율 추출법에 따른 한방 약용작물 추출물 및 제품의 기능적인 우수성 홍보
- 한방약초에 BT 기술을 이용한 고부가가치 식품소재 제조기술에 대한 기업의 대량생산체계 확립을 통한 사업화와 재배농가의 소득 안정화 및 농촌체험, 한방약초축제 등과 연계하여 한방힐링관광 구축함으로써 산청 한방약초 6차 산업화에 활용
- 본 연구 중 파생된 산청한방향노화포럼으로부터 도출된 한방약초산업 육성 로드맵을 이용한 향노화 연계 한방약초 6차 산업화에 활용

○ 본 연구를 수행하는 동안 참여 대학원생·학부생은 이론적인 기초와 함께 실무를 동시 배움으로서 차 후 현장중심의 바이오 인력 고급 기술을 갖는 전문 인력과 6차 산업 전문 코디네이터 양성 기회로 활용

## 2. 기대성과 및 파급효과

### 가. 기술적 측면

○ 기능식품 제조 기술/추출기술 등의 우위선점 효과 : 한방약초를 이용한 다양한 제형의 건강기능식품, 기능성 발효식품 뿐만 아니라 건강기능성 소재 제조기술의 기술우위 선점 및 한국의 식·의약 산업과 연계된 산업(건강기능식품산업)의 기술적인 진보가 기대

○ 양조발효기술의 우위선점 효과 : 한방약초 재료 및 약초 추출물을 이용한 소비자 맞춤형 기능성이 향상된 천연조미 및 음료 생산을 통한 기술우위 선점 및 한국의 양조발효식품산업의 기술적인 진보가 기대

○ 국내토착 생물자원의 확보 효과 : 나고야의정서 발효 시 국내 식·의약품, 화장품산업에 미칠 파급효과를 최소화하기 위한 분쟁 소지가 있는 약용식물자원의 기원 판별 기술 확보. 한편 다양한 발효식품으로부터 우수 발효미생물의 지속적인 확보를 통한 국가 생물자원 확보에 기여 및 국내 토종 한방약초로부터 다양한 기능성대사체 확보에 기여

○ 식품관련 기술 진보 효과 : 식품과 관련된 전반적인 기반기술의 선점을 통해 기능성식품, 식품 분석학, 발효공학과 미생물 분야, 식품공정·포장학 및 기능성식품학 등의 생물 산업 분야에서의 핵심 기반 기술을 주도할 것으로 기대

○ 생명산업관련 기술진보 효과 : 식품뿐만 아니라 화장품, 제약/의약산업과 관련된 전반적인 기반기술의 선점을 통해 기능성 식품, 발효공학, 미생물 분야, 효소공학, 제약/의약분야 등의 생물산업 분야에서의 핵심 기반 기술을 주도할 것으로 기대

○ 새로운 신수요 창출 효과 : 한방약초 제품의 향 및 기능성 물질 탐색 기술은 다른 식품 혹은 요리 개발의 기초자료로서 활용할 수 있음 한편 본 연구의 성공적 수행으로 기능성 한방약초 종류의 개발로 종류 세계화는 물론이고 한식 세계화에 이바지할 것으로 기대

○ 생활습관병(대사증후군) 효능에 대한 과학적 근거 마련 : 과학적 연구결과를 토대로 한 향후 생활습관성 질환의 건강 예방법으로서 식이조절 및 제한에 대한 연구가 주를 이루고 있는 반면 식품섭취에 의한 혈당개선, 혈압개선, 간지질대사 개선에 대한 연구는 종합적으로 이루어지지 않고 있으므로, 본 연구의 성공적인 수행은 식품섭취에 의한 건강 증진 방법의 새로운 조명 및 제시가 가능하여 노령화에 따른 건강 문제를 근본적으로 해결하는데 기여하리라 생각되며, 치매예방 및 항노화, 혈액순환개선, 신장보호, 간 건강기능성 식품의 개발을 위한 연구의 폭을 더욱 더 넓힐 수 있고 이러한 기능성이 검증된 활성 소재의 개발에 공헌할 것으로 확신

### 나. 경제·산업적 측면

○ 1·2·3차 산업의 동반상승에 따른 6차 산업 육성 효과 : 한방약초의 이미지 제고에 따른 산청군 한방 약초의 소비촉진 및 농가 소득증대에 기여(1차 산업), 약초 생산업, 발효산업 및 약초 가공사업 등의 기능성 식품산업, 포장재 제조업 등의 2차 산업으로 파급, 한방 약초를 이용한 요식산업, 한방약초 축제 등 한방약초축제(3차 산업)과 연계된 부가가치 창출, 농가 및 가공업체의 간접적인 광고효과와 이익 창출 효과(3.5차 산업) 등 산업 전반에 걸친 동반 상승 및

과급 효과가 기대되며, 한방약초 재배부터 가공, 문화·관광산업 연계적인 육성을 통한 6차 산업 육성이 기대

○ 고용창출 및 주민 소득증대 효과 : 한방약초 부문의 고용창출은 물론이고, 기능성산업, 포장재산업, 요식산업, 관광축제산업 등 연관 산업 부문으로의 산업과급 효과 확대에 따른 고용이 창출로 지역경제 활성화에 기여할 것으로 기대되며, 산·학·연·민의 공동연구사업으로 경남지역의 신규 고용 효과도 기대

○ 우리 한방약초의 고부가가치 창출 효과 : 지역 한방약초를 주로 하는 가공품인 천연조미료 및 기능성음료 사업의 활성화는 전형적인 1차 산업에 기반으로 하는 지역산업기반의 고부가가치 창출 시스템을 제공함으로써 지속적 성장 동력을 제공하며, 나아가 수입 식품에 대한 대응 및 FTA 체제를 극복하는 하나의 수단으로 활용될 것으로 기대

#### 다. 사회·문화적 측면

○ 기업홍보 효과 : 브랜드 가치를 높여 고객가치를 창출할 뿐만 아니라 몽고식품(주), (주)자연애제약 및 경남생약농업협동조합에 대한 국민의 신뢰도를 높임으로써 경남 대표 향토기업 산업 메카로서 기업이미지 제고와 중소기업 및 중견기업 성장에 견인차 역할 기대

○ 사회적 자본 증진효과 : 약초생산업체 및 재배농가, 산청군청 등이 공동의 문제를 해결하는 데 적극적으로 참여하는 사회적 자본이 함께 축적되어 경남 지역사회 발전에 기여할 것으로 기대

○ 지역 혁신역량강화 효과 : 지역 산·학·연·민의 다양한 네트워크가 형성에 기반 한 지속가능한 지역혁신 체제 구축으로 산업경제뿐만 아니라 지역의 학문, 문화, 예술 등 다양한 부문의 동반상승이 기대

○ 지역특화 사업의 우수 모델 사업 : 류의태와 허준이 머물던 한의학의 본 고장이라는 지역적 특성과 문학, 풍류를 즐기던 양반 문화를 접목 할 수 있는 역사적 기반, 청정 관광지역이라는 자연적 기반, 친환경 농산업 육성에 집중하고 있는 정책적 기반, 한방약초 축제와 2013년 세계전통의약 엑스포 개최 등 다양한 지역의 문화적 기반 등 다양한 인프라를 모두 집결하여 활용할 수 있는 지역특화 사업의 우수 모델 사업으로 활용이 기대되며, 동의보감이 라는 파워 브랜드를 이용한 세계적인 이미지 메이커로 활용이 기대

#### 라. 6차산업적 측면

○ 한방약초 자원의 생산체계 확립 : 6차 산업화에 필요한 고품질 국산 토종 약용작물의 분자생물학적 판별 마커 개발로 유통시장의 질서 확립하고 청정지역 산청군에서 한방약초의 대량생산 체계를 확립함으로써 6차 산업의 근간이 되는 약초생산의 시스템화와 한방약초의 브랜드화

○ 지역의 단위산업을 총체적으로 발전시키는 시너지효과 : 지역의 약초관련 향토자원을 약초힐링으로 집중화, 타 산업의 향토자원을 융복합시켜 내는 새로운 모델 필요, 약재판매중심의 재래식 유통관에서 벗어나 생활용품 유통시스템 도입, 브랜드를 통한 이미지 마케팅으로 대중적 소비 확산 효과

○ 고품질 브랜드 개발은 사업의 고도성장 유도 효과 : 재배약초에서 산약초의 명품화 시도하여 도시를 타깃으로 한 전방위적인 제품 개발로 매출 확장, 기업형 사업추진으로 수익 극대화, 생산중심의 브랜드가 아닌 유통 중심의 브랜드 필요, 한방약초 생활용품 토탈 브랜드로 유도

○ 약초산업의 글로벌 리더로 성장 효과 : 대체의약 산업으로 불리는 세계 약초시장은 600달러(2001)시장에서 2,124억 달러(2007) 시장으로 비약적 발전, 한류로 인한 한방 화장품의 성공으로 한방에 대한 긍정적 이미지 형성, 신비한 고장이라는 지역의 스토리텔링 관광 상품 개발과 약초 한방상품에 대한 브랜드 선점, 국내 성공을 기반으로 해외로 진출하는 글로벌 브랜드 마케팅

○ 산청군 혹은 경남 한방향노화산업 육성 효과 : 현재 경남은 향노화산업을 미래먹거리 산업으로 육성하고 있으며, 특히 산청군 2016년 한방향노화산업 원년으로 선포하고 한방향노화산업 육성을 위해 행정력을 전적으로 투입하고 있음. 한방향노화산업의 기본 개념은 전략약초 대량생산 체계 구축을 통하여 고부가가치 기능성 스타상품(식품, 화장품 혹은 천연물의약품) 개발을 통해 향노화 웰니스 관광과 연계시키는 것이 기본 틀임

### 3. 사업화, 추가연구 및 기술이전

#### 가. 추가연구

○ 한방약초 유래 기능성대사체(천연물)의 항당뇨 및 항비만 효과이외에 또 다른 효능 검정을 통한 다양한 식·의약 소재로서의 기능성 탐색 실시. 특히, 적하수오의 경우 일부 면역기능과 혈관기능(본 보고서에서는 자료 제시하지 않음)에 대한 연구를 진행하여 이에 대한 추가적인 전임상시험과 임상시험 지원이 필요함

○ 본 연구에서 개발된 6차 산업 비즈니스 모델을 이용하여 산청 향노화 연계 한방약초 6차 산업화를 위한 행·재정적 지원이 더욱 필요함

#### 나. 타 연구의 응용

○ 본 연구의 일부에서 진행한 활성 증진 도라지(도라지만 자료 제시), 삼 혹은 더덕 등의 건강기능식품 개발을 위한 타 연구에 응용 혹은 기획 중

○ 또한 활성 증진 기술을 이용하여 지리산권역 지역인 함양의 특화작물 산양삼을 이용하여 현재 건강기능식품 개발 연구 진행 중

#### 다. 사업화 추진방안 및 기술이전

○ 한방약초를 활용하여 기능성이 강화되고 안전성이 보장되는 천연조미식품과 기능성음료 제조 기술을 개발함. 참여기업 기술이전 통한 대량 생산과 사업화를 시도함

##### ○ 기술이전 계획

● ‘가바, 공액리놀레산 및 비배당체 이소플라본이 증진된 콩 발효조성물의 제조방법, 이에 이용되는 복합 생균제제 및 이 콩 발효조성물을 유효성분으로 포함하는 항당뇨 및 항비만 기능성식품’ 특허출원에 대해서 건강기능식품 전문업체인 (주)콜마비엔에이치와 기술이전 협상중으로 기술이전 시 생균제제 유산균 제품으로 판매 예정임

● ‘활성도라지 증진 기술’ 과 ‘발효도라지차 제조법’ 은 현재 특허출원 예정으로 이에 대한 기술은 참여기업인 (주)자연애제약에 기술이전을 할 예정임

● ‘새싹삼과 콩발효물을 이용한 천연조미료 제조법’ 현재 특허출원 예정으로 이에 대한 기술은 농촌융복합사업자 농업회사법인 드림팜(유)에 기술이전을 할 예정임

### ○ 조미료 시장

- 조미료는 조리할 음식에 넣어 음식의 맛을 돋우거나 조절하는 물질로서 현대의 요리에서는 빠질 수 없는 불가결한 식품 중에 하나로 국내 판매되고 있는 조미료 제품은 분말 형태의 제품으로서 1세대 조미료인 미원, 2세대 조미료인 다시다, 감치미 등, 천연 조미료로 크게 분류되어지며 전체 조미료 시장은 약 4,200억원(2016년 기준) 추정되어지고 있음.

- 최근 건강에 대한 소비자의 관심 증가로 기존의 인공 조미료에서 천연 조미료로, 분말 형태에서 액상조미료로의 변화가 일어나고 있는 실정임. 특히 액상조미료의 경우 안전성 및 용해의 불편함을 개선한 제품이라는 의미에서 커다란 인기를 끌고 있음.

- 실제 액상조미료의 시초라고 할 수 있는 샘표식품의 연두를 필두로 청정원의 요리의 한수, CJ의 요리수, 신송식품의 이유 등이 개발되어 인기리에 시판 중이며 이들 액상조미료의 시장도 2014년 128억에서 2015년 164억, 2016년 200억으로 지속적인 증가 추세에 있음.

### ○ 기능성 음료 시장

- 2013년도 기준 기능성 음료는 세계 음료시장 중 10.7%를 차지하고 있으며, 연평균 성장률에 있어서는 7.7%로 가장 높은 성장률을 보이고 있음

- 특히 일본의 경우, 2003년부터 다른 기능성에 비해 간기능 개선(성장률 235%)에 대한 건강기능 식품이 크게 성장한 것으로 조사되었으며(출처: 건강기능식품 주요국가별 시장동향 분석, 삼일회계법인), 일본의 ‘우콘노 치카라(울금의 힘)’는 일본 숙취해소 시장 점유율이 70%에 이를 정도로 인기를 끌고 있는 상품으로 조사됨

### ○ 제4차산업 혁명

- 디지털 혁명을 기반으로 21세기 시작과 동시에 제4차 산업혁명이 출현

- 제4차 산업혁명은 로봇·빅데이터·사물인터넷(IoT)·인공지능(AI) 등 기술의 융합과 조화에 의해 촉발되는 혁신과 변화를 의미

- 지난 산업혁명은 인류의 삶을 변화시켰고 농업은 상대적으로 소외되었던 과거의 우를 범하지 않기 위한 미래 대응이 필요. 특히, 노동집약적 산업인 농업의 특성상 제4차산업혁명이 미치는 파급효과가 클 것으로 전망

- 미래 농업은 ‘시스템의 시스템’으로 연결되며, 여기에 인공지능과 빅데이터 등이 결합해 자율 운영되는 첨단산업으로 진화될 것으로 예상

• 여기서, 시스템의 시스템이란 기존 농기계, 종자, 농장 관리, 생산예측, 관수 등의 개별 시스템이 합쳐진 융합 시스템을 의미

• 이는 제4차 산업혁명의 핵심기술인 로봇·빅데이터·인공지능(AI) 등이 농업과 결합하면서 첨단화 및 새로운 가치를 창출

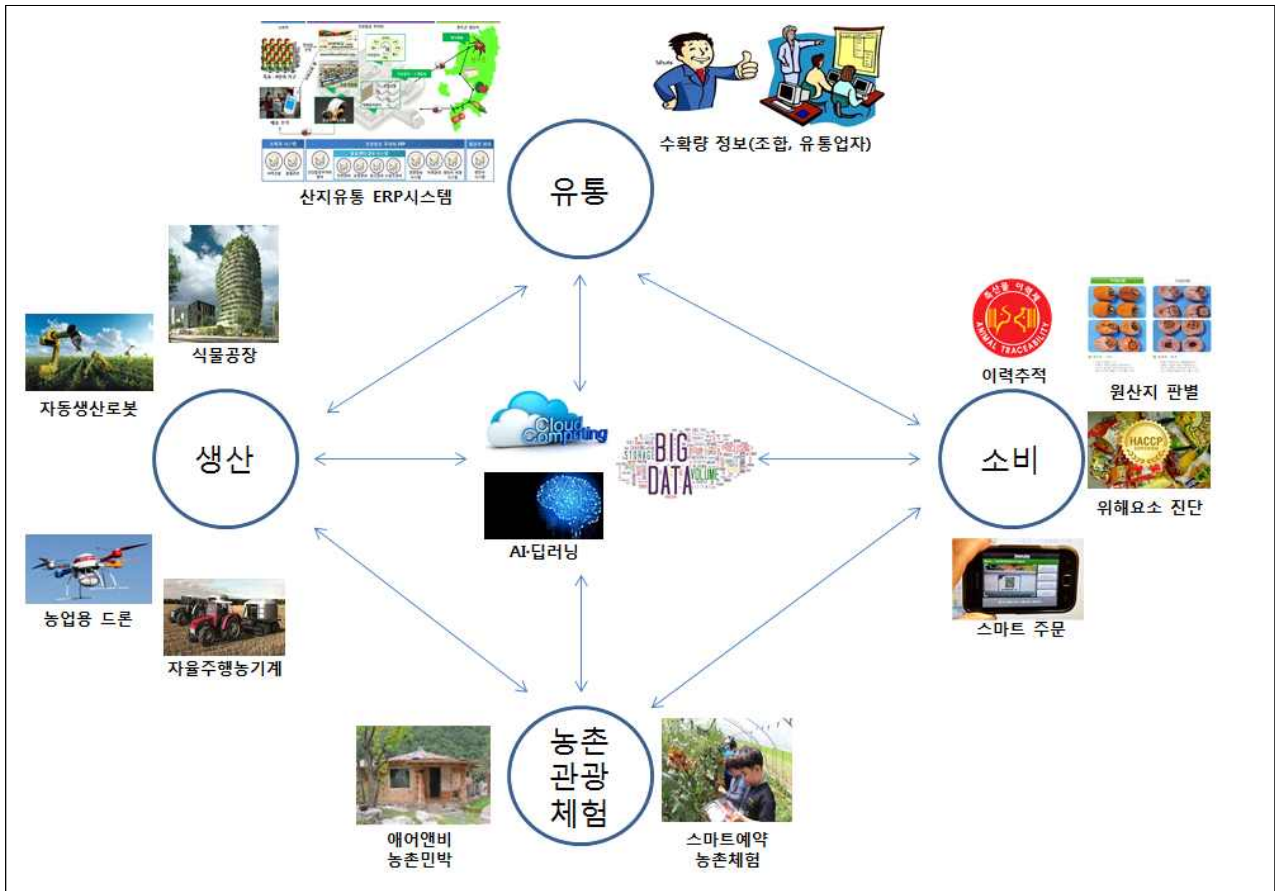
- 제4차 산업혁명에 따른 분야별 전망

• 농업생산 : 첨단 융합 기술을 기반으로 하는 ‘식물공장’, 온실·축사·노지 등을 포괄하는 ‘스마트 팜’, ‘정밀농업기계’ 등이 확대

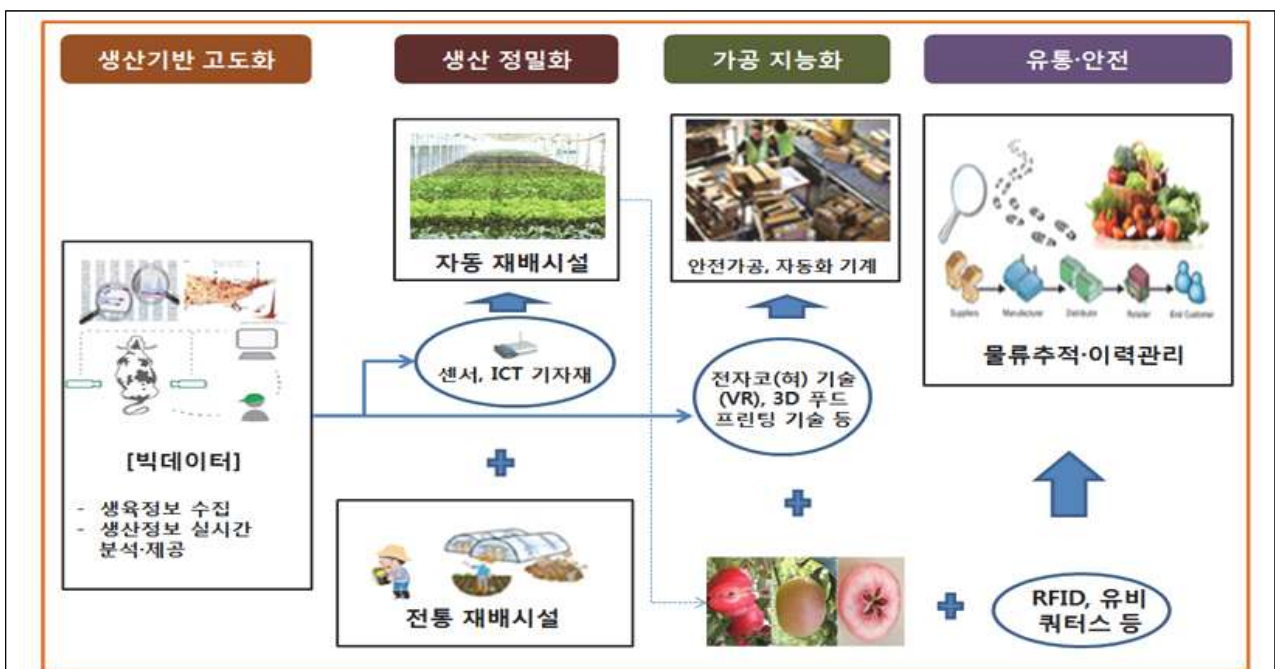
• 유통·소비 : 고령화, 1인 가구 확대, 초고속 드론 등 배송기술의 발전 등으로 스마트 생산·유통·소비 시스템이 활성화



- 농촌경제 : 소셜 네트워크(Social Network)를 기반으로 한 농촌 공유경제 시스템 확산 등 규모화·집단화된 경제 공동체 개념이 확산



【그림 6-1】 제4차 산업혁명이 적용되는 미래 농업의 모습 (출처 : 농림식품기술기획평가원, 2017)



【그림 6-2】 농림축산식품 분야 지능정보 기술 적용 개념도 (출처 : 미래창조과학부, 2016)

## 제7장 연구개발결과의 보안등급

코드번호

D-09

- 해당사항 없음

## 제8장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설 장비 현황

코드번호

D-10

- 해당사항 없음

## 제9장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호

D-11

### 제1절 경남과학기술대학교 산학협력단

#### 가. 연구실 안전조치 이행

##### (1) 기술적 위험요소 분석 :

○ 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 및 「산업안전보건법」에 따른 연구실 안전조치 이행계획(해당 연구실안전점검 및 정밀안전진단실시, 참여연구원의 교육훈련 및 건강검진실시, 보험가입 등) 및 기타 당해 연구개발사업 수행 시 필요한 연구실안전 확보 계획 등을 서술)

○ 경남과학기술대학교 공동실험실습관은 총장이 임명한 관장이 운영을 총괄하고 수행 업무의 특성에 따라 행정실, 분석실, 동물실험실, 안전관리실로 나뉘어져 있으며 전체 정원은 11명으로 교수, 일반직, 조교, 계약직, 용역직 등 다양한 직급으로 구성되어 있다.

○ 안전실은 연구활동중사의 건강보호와 불의의 안전사고를 예방하기 위한 안전교육, 안전점검, 폐기물관리 등 다양한 안전지원 활동을 수행하고 있다. 안전교육, 안전점검, 건강검진을 매년 수시로 실시하며 유전자변형생물체, 방사성 물질 및 발생장치 유지 관리도 철저히 시행하고 있다. 또한 안전보호구, 시약장, 가스누설검지기 설치, 응급사위기, 응급세안기 설치등을 중점사업으로 지속적으로 실시하여 학교 차원의 관리하에 안전조치를 준수

##### (2) 연구활동중사자 안전보험 가입

○ 목 적: 실험·실습·연구활동 중에 안전사고 발생 시에 신속한 치료와 적절한 보상을 받을 수 있는 보험에 가입하여 선진화된 안전경영을 구현

○ 대 상: 과학기술분야 대학생, 대학원생, 연구보조원 등

##### (3) 연구활동중사자 건강검진 실시

○ 목 적: 연구활동중사자의 건강상태 확인 및 보건증진을 위해 대상자를 선정하여 매년 시행

○ 검진종류: 특수건강검진

○ 대 상: 유해화학물질 다량 취급 연구실험실 종사자(대학생, 대학원생 등)

○ 선정기준: 유해물질 사용량, 실내환경측정결과, 실험폐액 배출량 등

## 나. 안전관리대책

### (1) 연구활동종사자 안전 교육 실시

○ 목 적: 과학기술분야 실험·실습·연구활동에 종사하는 구성원의 안전의식 고취 및 사고사례 등 다양한 안전정보 제공을 실시

○ 대 상: 과학기술분야 대학생, 대학원생, 연구보조원 등

### (2) 연구실 안전점검 실시

○ 목 적: 연구실험실의 주기적인 안전상태 확인을 통해 위험요소 발굴 및 개선하여 안전한 교육연구환경을 유지관리

○ 점검종류 : 정기점검, 정밀안전진단

○ 대 상: 과학기술분야 실험실습실, 연구실험실 등

○ 점검내용: 화학, 생물, 전기, 기계, 환기, 보건 분야 안전상태 확인

### (4) 실험폐기물 관리

○ 목 적: 교육·연구활동 과정에서 배출되는 각종 유해·위험한 실험폐기물의 안전하고 신속한 처리

○ 대 상: 화학폐기물, 생물폐기물, 방사성폐기물

### (5) 연구실 안전문화 활성화 캠페인 실시

○ 목 적: 대학내 연구실 안전문화 확산 및 구성원 안전의식 증진을 위한 캠페인 활동을 통해 인식 제고 및 자율적 참여를 유도 한다.

○ 내 용: 안전사고사례 전시 및 안전실천 약속 서명 등

## 다. 연구실 안전조치 이행 일정

### (1) 매월 4일 연구실 안전점검의 날 운영

추진일정	추진내용	비고
2014.08.01~ 2017.08.31.	- 일상점검일지 작성 등의 법률이행사항 확인	12회/년

### (2) 연구실 정밀안전진단 및 위험성평가 실시

추진일정	추진내용	비고
2014.08.01~ 2017.08.31.	- 연구실 정밀안전진단 실시계획 통보 - 정밀안전진단 대상 수요조사 - 연구실 정밀안전진단 실시 - 3등급 연구실 위험성평가 실시	- 전년도 개선실적 확인 - 3등급 유해실험실 개선효과검증

### (3) 연구실 안전교육 분기별 4회 실시

추진일정	추진내용	대상인원	비고
2014.08.01~ 2017.08.31.	- 연구실 안전교육 수요조사 실시 - 연구실안전교육 실시(4회/년)	350명 (교수포함)	영남권연구실 안전관리협의회 인력풀활용예정

### (4) 연구활동종사자 건강검진

추진일정	추진내용	실시기준	비고
2014.08.01~ 2017.08.31.	- VOCs 고농도 실험실 선별 - 1차 일반 및 특수건강검진실시 - 이상소견자 2차검진실시 - 직업성질환 예방대책마련	- VOCs 고농도실험실 - 유해인자별 MSDS확인	건강검진 관련예산 증액반영

(5) 연구활동종사자 상해보험 전체가입

추진일정	가입기관	추진내용	비고
2014.08.01~ 2017.08.31..	교육시설 재단공제회	- 연구활동종사자 현황자료 대조·확인 - 연구실 안전공제 가입자 현황제출 - 연구실 안전공제 재계약(1년간)	

## 제2절 경상대학교 산학협력단

### 가. 연구실 안전 관리

(1) 위험인자 분석

- 화학 분야: 사용 시약의 특성별 위험요소 확인 및 안전표지 부착
- 생물 분야: 병원균 미생물 및 바이러스 등 인체 유해물질 확인 및 안전표지 부착
- 기타 분야: 전기, 기계, 환기, 폐기물 등 연구실내 위험, 유해인자 확인 및 개선

(2) 안전 교육

- 자체교육: 월 1 회 이상 연구실 자체 안전교육 실시(위험물질 취급요령, 보호구 착용 등)
- 정기교육: 반기 1회, 학교주관 연구실안전교육 참석(연구과제 참여자 전원)

(3) 안전점검

- 일일점검: 매일 연구실책임자 및 연구실종사자가 실시 및 기록
- 정기점검: 연구실안전팀에서 년 2회 측정장비 등을 이용하여 연구실내 불안전사항 점검 실시
- 특별점검: 연구실 안전사고 발생시 점검을 실시하여 문제점 개선 및 재발방지 계획 수립

(4) 실험실 정밀안전진단 실시

- 대상: 유해화학물질을 취급하는 연구실, 유해인자를 취급하는 연구실, 독성가스를 취급하는 연구실
- 실시: 2년마다 1회 실시하여 교육과학기술부에 보고

### 나. 보험 가입 현황

보 험 명	보 상 내 용	대 상	주관부서
연구실 안전보험	사망/후유장해: 1억원/인	연구활동종사자 (학생, 수료생, 연구원등)	안전관리실
	상해 치료비: 1천만원/인 한도		〃
경영자배상책임보험	사망/후유장해: 2억원/인	재학생, (학부생, 대학원생)	학생과
	상해 치료비: 2백만원/인		
	대물배상책임: 2백만원/인		
산업재해보상보험	사망/후유장해: 관련 법률에 정한 기준	과제참여자 (재학생 제외)	산학협력단
	상해 치료비: 무한		
공무원연금보험	사망/후유장해: 관련 법률에 정한 기준	공무원 (교수, 직원)	교무과, 총무과
	상해 치료비: 무한		

## 다. 추가 이행

1) 실험종사자 건강검진 실시	유해물질 노출 여부 검사 특수 건강검진 실시
2) 실험실 공기질 관리, 환기	유해물질농도 측정관리, 환기대책수립
3) 실험실 환경개선공사	노후 실험실 개선공사 시행
4) 특수위험 실험실에 별도의 소화설비 설치	특수소화기 설치(금속하재 전용 소화기 등)
5) 유기용매 별도 보관	실험실외부 보관창고 보관, 필요시 운반 사용
6) 실험실 환경안전지침 게시	실험실 특성에 맞는 안전수칙 게시(장비사용 등)
7) 고압가스 안전관리	용기고정장치 설치, 경보기 설치, 노후가스 용기 폐기
8) 안전보호장비 시설 보완	응급샤워기, 응급세안기, 응급구급함 등

## 제3절 (재)경남한방약초연구소

### 가. 연구실 안전조치 이행계획

#### (1) 기술적 위험요소 분석

○ 일상점검 및 주기적인 안전점검을 실시하여 안전성 확보 : 일상점검 : 매일 실시, 정기점검 : 반기 1회

○ 정기적인 안전교육을 실시하여 참여연구원 안전의식 확보 : 안전보호구착용, 안전수칙 준수, 폐기물관리 철처 등, 자체교육 : 월 1회, 정기교육 참여 : 년 2 회

○ 안전사고 발생에 대비 안전보험가입 후 연구 참여 : 연구활동종사자 안전보험 가입 요청: 안전관리실

○ 구과제 수행 중 안전사고가 예상되는 부분은 즉시 개선, 보완 후 연구과제 수행

#### (2) 안전관리대책

##### ○ 인력전문성 제고

- 안전(관리감독자 교육): 대한산업안전협회(년 1회)
- 환경(환경실무자 교육): 환경보전협회(년 6회)
- 가스(법정교육): 가스안전공사(년 1회)
- 화학약품(법정교육): 소방안전협회(년1회)
- 방사선발생장치(작업종사자 교육): 원자력안전아카데미(년1회)

##### ○ 점검사항

구 분	점 검 분 야	중점 점검 사항	비 고
자 체	○담당자별 점검	○ 공조/ 유틸리티 장비 ○ 유틸리티배관, 폐수처리장	일일
	○안전관리팀 합동	○ 고압가스 사용 및 관리상태 ○ 화학약품 사용 및 관리상태	매 월, 안전점검의 날 관련
	○야간 및 휴일	○ 시설운영상태 ○ 24시간 가동장비 운영상태	일일
	○방사선발생장치	○ 실험장비 운영상태	일일
	○비상대응 훈련	○ 안전시설 시험동작 및 대피훈련	년 2회
외부전문 기관	○위험시설 안전진단	○ 실험실 안전관리 상태 ○ 가스 및 약품 안전관리상태	년 2회
	○안전검사	○ 호이스트, 압력용기 안전검사	2년1회
	○정기 및 자율검사	○ 고압가스저장시설 안전관리상태 ○ 위험물육내저장소 안전관리상태	년 5회
	○수시검사	○ 위험물육내저장소 안전관리상태	년 2회
	○검.교정	○ 방사선 서베이미터 검.교정	년 1회

○ 관련수칙

수 칙 명	주 요 내 용	비 고
○ 안전보건관리요령	- 안전관리 총괄, 고압가스, 전기, 화학약품 안전관리 세부사항	
○ 실험실 관리 수칙	- 관리자 편성 및 임무	
○ 전기관리 수칙	- 전기시설물 취급 및 구매설치	
○ 고압가스 취급 수칙	- 전기시설물 설치 등에 관한 규제	
○ 화학약품 관리 수칙	- 보관 및 운반, 사용 및 조작	
○ 환경 관리 수칙	- 누설 및 경보, 작업	
○ 방사선 관리 수칙	- 안전관리자 임무, 조치 및 의무	수질, 폐기물
	- 취급, 통제구역, 비상재해	
	- 오염물질 배출 및 방지 준수사항	
	- 장비도입 및 폐기시 준수사항	
	- 방사선발생장비 가동 준수사항	장비명:GC-ECD
	- 방사선발생장비 종사자 안전의무	

(3) 연구실 안전점검 정기적 실시 : 연구실의 기능 및 안전을 유지 관리하기 위하여 안전점검 지침에 따라 연구실에 관한 안전점검을 정기적으로 실시함.

(4) 참여 연구원의 안전관련 교육훈련 시행 : 산업안전보건법 제31조 (안전보건교육) 및 연구실 안전환경조성에 관한 법률 제 18조에 의거, 전 직원에 대한 안전보건교육을 매달 실시함. 교육 방법은 모든 직원에 대한 자체교육(2시간)을 실시하고, 안전보건교육 일지를 작성하여 관리함.

(5) 연구 내용 및 결과물 안전 확보 : 정기적으로 인원 및 시설 보안 항목, 문서보안 항목 그리고 정보보안 항목의 보안점검을 실시하여 연구 내용 및 결과물의 안전을 확보하고 있음. 참여 연구원들을 대상으로 연구 결과의 안전한 관리를 위한 안전교육 실시

(6) 연구실 안전 확보

○ 참여 연구원들이 안전관련 각종 법규, 규정 및 지침을 준수하도록 하며, 요구되는 안전교육 및 훈련 실시

○ 실험에 관련된 위험 정보를 숙지하고 적절한 개인 보호 장비 착용 실험실에 노출된 위험을 안전관리책임자에게 보고

○ 연구실의 잠재되어 있는 위험성 발견 및 위험물질과 각종 실험장비 등 사용에 따른 안전수칙이 잘 이행될 수 있도록 지도점검 및 교육

# 제10장 연구개발과제의 대표적 연구실적

코드번호

D-12

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록 국가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	Type 1 diabetes alters astrocytic properties related with neurotransmitter supply, causing abnormal neuronal activities	경상대학교	교신 저자	Brain Research	2.828	2015.03.01	중복	-
2	논문	Development of molecular markers, based on chloroplast and ribosomal DNA regions, to discriminate three popular medicinal plant species, Cynanchum wilfordii, Cynanchum auriculatum, and Polygonum multiflorum	경남과학 기술대학교	교신 저자	Molecular Biology Report	2.024	2016.03.01	단독	SCI/ 우수논문/ 언론홍보
3	논문	Time course effects of fermentation on fatty acid and volatile compound profiles of Cheonggukjang using new soybean cultivars	경남과학 기술대학교	제일/ 교신 저자	Journal of Food and Drug Analysis	3.048	2017.07.02	중복	SCI/ 상위10% 저널
4	특허	법제 하수오 추출물을 유효성분으로 포함하는 산화적 스트레스 개선용 조성물	경남과학 기술대학교	대표 발명자	대한민국	-	2017.05.12	단독	기술가치 평가실시 (약 3억원)
5	특허	가바, 공액리놀레산 및 비배당체 이소플라본이 증진된 콩 발효조성물의 제조방법, 이에 이용되는 복합 생균제 및 이 콩 발효조성물을 유효성분으로 포함하는 항당뇨 및 항비만 기능성식품	경남과학 기술대학교	대표 발명자	대한민국	-	2017.08.21	중복	기술이전 진행 중 (콜마비엔 에이치)

1. 우수 수상 및 홍보

가. 수상

(1) 제목 : 2014년 대한민국 창조경영대상

(2) 내용 : ‘2014년 국정감사 우수 국회의원 및 대한민국 창조경영 대상’ 에서 투철한 국가관과 참된 이념을 가지고 대한민국의 발전을 위해 탁월한 리더십과 전문성을 발휘, 세계 속의 대한민국 성장을 위해 헌신적으로 노력한 점을 인정받아 수상하였으며, 특히 현 정부의 농업·농촌 창조경제 일환으로 농림축산식품부로부터 ‘지리산권 약용작물의 고부가가치 제품 및 6차 산업화 연계 모델 개발’ 사업을 수행하고 있다.

(3) 홍보 : 아시아뉴스통신 등 다수



【그림 11-1】 2014년 대한민국 창조경영대상 수상내역 및 홍보

나. 홍보

(1) 제목 : ‘농업기술원, 백수오·이엽우피소 구별 분자마커 개발 성공 경남농업기술원 한은의 연구사와 경남과기대 이신우 교수팀’ 등 다수

(2) 내용 : 경상남도농업기술원(이하 경남농기원)은 지난 29일 “한은희 경남농기원 연구사와 이신우 경남과학기술대 농학·한약자원학부 교수가 공동으로 농림축산식품부, 농생명산업기술개발사업의 지원을 받아 하수오·백수오·이엽우피소 이 세 식물 중에 대한 판별 분자 마커를 개발하는데 성공했다” 며 “이 과정에서 많은 수의 샘플들을 대상으로 판별 실험을 수행한



결과를 국제학술지인 ‘Molecular Biology Reports(43호)’에 게재했다”고 밝혔다. 또한 YTN Science(중편)에 ‘진짜와 가짜, 과학의 밝히다’로 언론 홍보  
 (3) 일시 : 2016년 3월 30일, 2016년 11월 9일



【그림 11-2】 『백수오·이엽우피소 구별 분자마커 개발』 관련 SCI 논문 게재 내용 홍보 (2016년 3월 다수 및 11월 YTN Science)

## 2. 민간 조직 구성을 통한 네트워크 구축

### 가. 산청한방항노화포럼 조직

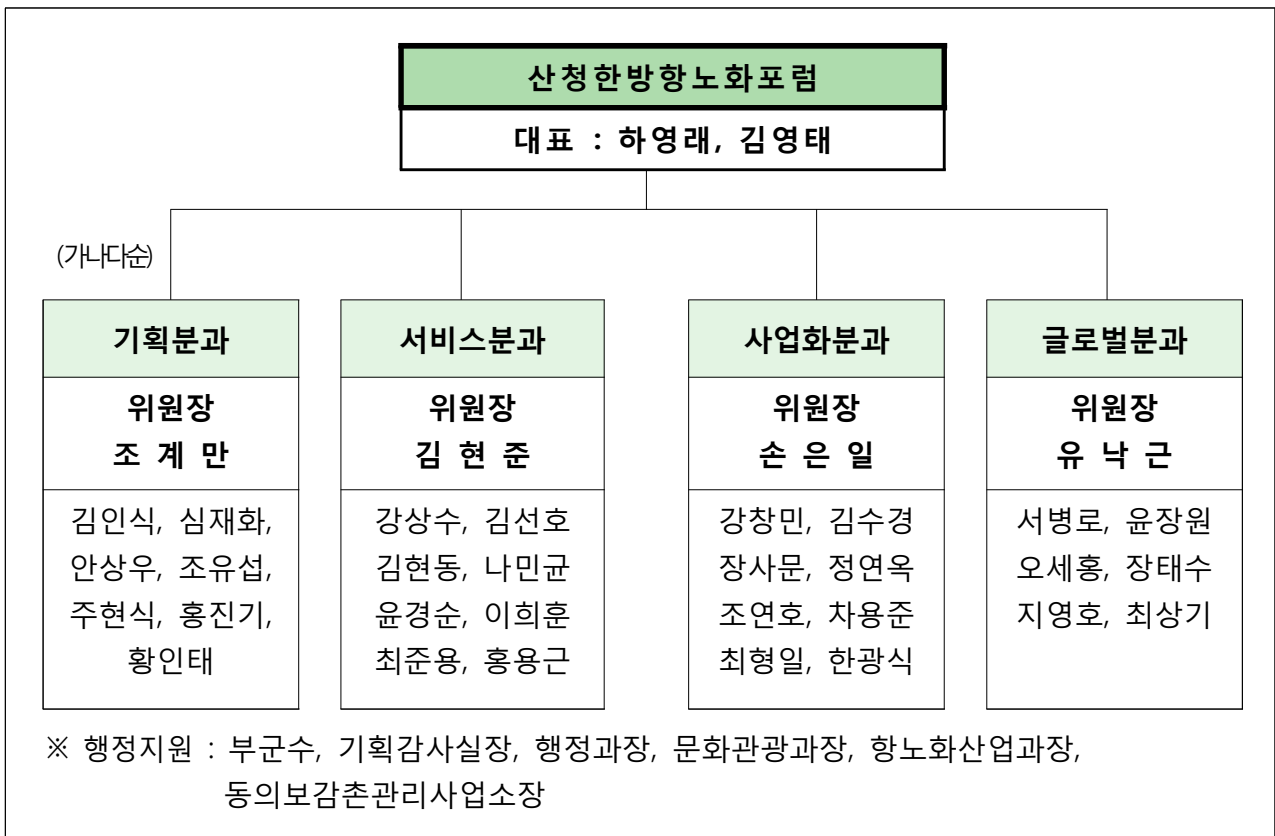
#### (1) 조직 구성

(가) 조직 : 대표 2 (상임, 공동), 분과위원장 4, 위원 28, 사무총장 1

(나) 역할 :

- ① 기획분과 : 지역발전 및 항노화산업 마스트플랜 기획·조정
- ② 서비스분과 : 몸관리·의료·식품등 서비스 프로그램개발 지원
- ③ 사업화분과 : 제품의 연구개발, 생산 및 마케팅 기업지원
- ④ 글로벌분과 : 디자인·의료·힐링 등 인프라구축 및 국내외 투자유치지원

(다) 조직도 :



【그림 11-3】 산청한방항노화포럼 조직도

#### (2) 활동 내용

(가) 포럼 준비 : 2015년 7월 31일 ‘산청한방항노화포럼’ 준비위원회 개최

(나) 창립 포럼 : 2015년 8월 26일 ‘산청한방항노화포럼’ 창립대회 개최

(다) 1차 포럼 : 2015년 12월 3일 ‘항노화산업 육성 법제화를 위한 토론회’ 개최

- ① 주최 : 신성범 국회의원 (국회의회회관 제3세미나실)
- ② 주관 : 산청한방항노화포럼, 경상남도, 산청군
- ③ 후원 : 농림축산식품부, 산업통상자원부, 보건복지부, 한국보건산업진흥원



(라) 2016년 1차 및 2차 포럼 : 2016년 05월 03일 및 2016년 12월 16일  
 ‘산청 한방향노화 로드맵(’ 발표와 정립(1차) 및 로드맵 수정 (2차)

- ① 산청(SANC) 플랫폼 구축 : 제품-서비스-관광 융합을 통한 고도화
- ② 6차산업 수익모델 제시 : 『한방 향노화 MAFH 6차산업 플랫폼 구축』

로드맵 비전 및 목표								
비전	<b>한방 향노화산업 메카 산청</b>							
목표	제품-서비스-관광의 융합을 통한 고도화된 한방 향노화산업 육성							
추진 전략	산청(SANC) 플랫폼							
	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 25%;">관광 (Sightseeing)</th> <th style="width: 25%;">고도화 (Advancement)</th> <th style="width: 25%;">네트워크 (Network)</th> <th style="width: 25%;">융합 (Convergence)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 관광일자리산업 관광기업생태계</li> <li>▶ 산물을 통한 향노화사업화 역량 강화</li> <li>▶ 체험관광을 통한 향노화 수요 창출</li> </ul> </td> <td> <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 기능제품과 체험 및 의료관광이 결합된 고도화된 서비스중간과 핵심요소 지속적 성장 견인</li> <li>▶ 고도화된 산업생태계 조력</li> </ul> </td> <td> <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 국내외 대개방 네트워크 구축 및 공동 해외시장 진출 협력</li> <li>▶ SIACOP, GAP인증 기업 육성을 통한 신뢰성 확보</li> </ul> </td> <td> <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 전문특화사업의 생산, 가공, 유통, 서비스, 관광의 융합</li> <li>▶ 제품, 서비스, 관광의 융합</li> </ul> </td> </tr> </tbody> </table>	관광 (Sightseeing)	고도화 (Advancement)	네트워크 (Network)	융합 (Convergence)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 관광일자리산업 관광기업생태계</li> <li>▶ 산물을 통한 향노화사업화 역량 강화</li> <li>▶ 체험관광을 통한 향노화 수요 창출</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 기능제품과 체험 및 의료관광이 결합된 고도화된 서비스중간과 핵심요소 지속적 성장 견인</li> <li>▶ 고도화된 산업생태계 조력</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 국내외 대개방 네트워크 구축 및 공동 해외시장 진출 협력</li> <li>▶ SIACOP, GAP인증 기업 육성을 통한 신뢰성 확보</li> </ul>
관광 (Sightseeing)	고도화 (Advancement)	네트워크 (Network)	융합 (Convergence)					
<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 관광일자리산업 관광기업생태계</li> <li>▶ 산물을 통한 향노화사업화 역량 강화</li> <li>▶ 체험관광을 통한 향노화 수요 창출</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 기능제품과 체험 및 의료관광이 결합된 고도화된 서비스중간과 핵심요소 지속적 성장 견인</li> <li>▶ 고도화된 산업생태계 조력</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 국내외 대개방 네트워크 구축 및 공동 해외시장 진출 협력</li> <li>▶ SIACOP, GAP인증 기업 육성을 통한 신뢰성 확보</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 전문특화사업의 생산, 가공, 유통, 서비스, 관광의 융합</li> <li>▶ 제품, 서비스, 관광의 융합</li> </ul>					
4대 사업 분야 (SANC platform)	<b>1. 기반구축사업</b> ① 동의보감촌 중심의 한방향노화 힐링·체류 ② 산청한방약초타운 중심의 한방향노화 산업 ③ 동산산악관광지 중심의 한방향노화 관광							
	<b>2. 기술개발 역량강화사업</b> ① 경남한방약초연구소 중심의 R&D 강화 및 기술 집적화 ② 약초 천연물을 이용한 소재 및 제품 개발							
	<b>3. 기업지원시스템 구축사업</b> ① 관내 향노화 제품-서비스 연계를 통한 융합·고도화 ② 향노화산업 사업화 및 공동마케팅을 통한 기업지원 ③ 한방향노화 MAFH 6차산업 플랫폼 구축							
	<b>4. 연계협력사업</b> ① 거-광-산-잡 한방향노화 연계협력 ② 한방특화 웰니스 관광벨트 구축을 통한 동반성장							



산청군이 1차 산청한방향노화 포럼을 통해 산청 한방향노화 로드맵을 수립해 제시했다. 지난 3일 동의보감촌 다목적실에서 열린 이날 포럼에는 허가도 교수, 정영수 군의회 부의장, 박우봉 의회총장 100여명이 참석했다.

이 로드맵은 산청군 향노화산업 육성을 위한 2557억원의 사업비로 추진 중인 21개 중점과제를 꼽아 관광(Sightseeing), 고도화(Advancement), 네트워크(Network), 융합(Convergence) 4가지 추진전략의 하나임을 띤 SANC(산청) 플랫폼을 도출했다.

이 로드맵은 산업과 관광을 연계한 특성을 가진다. 경남한방약초연구소, 산청약초시장, 대학·비대응 크 등 기존 인프라가 구축되어 있는 산청한방약초타운을 중심으로 한방향노화 제품산업 육성을 추진한다. 웰니스벨트, 한방자연휴양림, 휴재 등의 기존 인프라가 구축되어 있는 동의보감촌을 중심으로 한방향노화 관광·일자리서비스산업을 육성한다. 웰니스 벨트가 중심이 돼 한방향노화 관광산업을 육성한다. 웰니스 벨트와 연계해 산청군의 관광지는 동의보감촌, 산청한방약초타운, 향재산, 남사해인촌, 후삼궁 관광지 등이다.

산청군은 2016년을 한방향노화산업 원년의 해로 선포한 후 전국 최초로 748억원 규모의 한방향노화산업단지 유치와 100% 시업인주 MOU 체결의 성과를 올렸다. 이어 더욱 체계적인 향노화산업 육성을






산청한방약초타운 AgroMedi Center, 동의보감촌 국제힐링문화단지, 웰니스벨트관광 경관조력



단기(2016-2018), 중기(2019-2021), 장기(2022-2025) 계획. 산청대표향노화산업특화기업 육성(2개), 관련특산(5개), 향노화특화기업(10개), 향노화 산업 전략기업(10개) 등.

【그림 11-5】 산청한방향노화포럼 주요 활동 사항 및 산청 한방향노화산업 로드맵 내용



【그림 11-5】 산청 한방향노화산업 로드맵 내용



【그림 11-6】 산청 한방향노화산업 로드맵 ‘산청(SANC) 플랫폼’ 중 6차산업관련 모델 제시

### 산청한방항노화포럼서 로드맵 29개 집중토론

백사명원장(가산대)이 11월 11일 오후 2시

지난 10일 산청군 동북보건소 다목적실에서 석기호 산청군수와 포럼 위원 30여 명이 참석한 가운데 산청한방항노화포럼 2016년도 제2차 회의가 개최됐다.

이날 토론회는 산청 한방항노화 로드맵 시급과제 의견수렴을 위해 6영역 29개 항목의 주제별 주요 참석인 위원 전원과 참여하는 중점부서로 진행됐다.



산청군수 석기호(가산대)가 11월 11일 산청한방항노화포럼에서 29개 주제별 중점부서와 의견을 나누고 있다.

산청한방항노화로드맵(이하 로드맵)은 지난해 8월 산청군 한방항노화산업지원과, 인제대학교가 구축을 위해 정립됐다.

#### II 기본방향

##### 1. 로드맵 비전 및 목표



## 2016년도 산청 한방항노화 로드맵 (최종안)

2016. 12.

산청 산청군 (항노화산업과)



##### 2. 로드맵 Action Plan

##### □ 한방 항노화 제품산업

- 국가중요과제 수행, 과학연 연계 제품개발 등을 통한 단일상품 매출액 5억원 이상의 R&D 스타상품(건강기능식품, 화장품, 천연물 신약 등) 개발을 통해 매출액 10억원 이상의 스타기업 육성한 스타상품에 소요되는 약초자원은 스타약초로 삼아 군에서 약초재배 단지를 집중적으로 육성하고, 약초유전자원센터를 통해 종 보존 및 개량에 노력함. 스타약초는 다시 스타상품을 생산하는 스타기업프로의 수배시스템 확립하여 실용화 구조화 이룸

【그림 11-7】 산청 한방항노화산업 로드맵 1차안에 대한 토의

(마) 2017년 1차 및 2차 포럼 : 2017년 05월 18일 및 2016년 07월 21일

항노화기업 애로사항 해소(1차) 및 제4차 산업혁명과 한방항노화 발전 방향(2차)

- ① 산청군 관내 항노화기업 애로사항을 해소를 위한 원탁 토의
- ② 주제발표와 포럼위원의 자유토론

### 산청한방항노화포럼, 항노화기업 해결사

2017년 05월 18일 | 산청군청 | 054-830-0000



산청한방항노화포럼이 지역 한방항노화기업 애로사항 해소에 나섰다. 군은 지난 18일 동의모강촌 다목적실에서 '2017년도 제1차 산청한방항노화포럼'을 개최했다.

이날 포럼은 허기도, 산청군수, 산청한방항노화포럼 위원, 외부전문가, RTT 참가기업, 청강 기업, 관련 실과 공무원 등 40여 명이 참석했다.

특히 이번 포럼은 지역 항노화기업과 항노화 포럼 위원이 라운드 테이블에 앉아 수평적인 관계에서 자유롭게 토론하는 RTT(Round Table Talk) 형식으로 진행돼 이목을 끌었다.

RTT에 참가한 7개 기업이 지사 주력제품, 향후 추진사업, 문제점과 애로사항 등에 대해 브리핑한 후 포럼위원과 외부전문가가 기업진단, 제품 시장연명, 사업 아이디어 제공, 문제점과 애로사항 해결방안 등을 제시했다.

### 2017년 제2차 산청한방항노화포럼 성료

제4차 산업혁명과 한방항노화 발전 방향 주제발표 포럼

2017년 07월 21일 | 산청군청



▲ 지난 21일 산청군청에서 개최된 산청한방항노화포럼 제2차 회의는 제4차 산업혁명과 한방항노화 발전 방향을 주제로, 산청군수, 산청한방항노화포럼 위원, 외부전문가, 청강 기업, 관련 실과 공무원 등 40여 명이 참석했다.

이날 포럼에는 초청위원과 청강기업, 한방항노화기업, 중소기업 등 7개 기업이 참석했다. 한국과학기술기획평가원 박재홍 원장은 '제4차 산업혁명과 한방항노화산업의 발전 방향'이라는 주제발표로 산업부문의 지원요청사항을 발표했다.

박재홍 원장은 연구위원은 '4차 산업혁명'이란 '누구나 상상 가능한 모든 것을 생산할 수 있는' 즉각적인 인공지능, 빅데이터, 클라우드, 사물인터넷, 증강현실 등 첨단기술의 융합으로 이루어진다고 설명했다.

이날 포럼에서는 박재홍 원장을 비롯해, 김형우 대표, 박승호 대표를 비롯해 소초 또는 예초, 김형우 대표, 김형우 대표, 김형우 대표 등 4개 기업에 대해 1시간 30분 동안 토의했다.

산청한방항노화포럼 위원과 대우는 기업별 사업현황에 대한 점검과 문제점을 점검하면서 7개 기업은

### 2017년도 제1차 산청한방항노화포럼 결과보고

#### 1 포럼개요

- 일 시 2017. 5. 18(목) 15:00 - 18:30
- 장 소 산청군청 회의모강촌 다목적실
- 주 관 산청군, 산청한방항노화포럼
- 참 석 자 43명
  - 산청한방항노화포럼위원 8명(해 상임대표 포함 6명)
  - 중앙중소기업청 비즈니스지원단 김진희 상담위원 등 외부전문가 4명
  - RTT 참가기업 호성식품영농조합법인 김기후 포함 7명
  - 참가기업 동아에너텍에이 신계규 포함 6명
  - 산청군수 최항 군 관계자 17명
- 주요내용 : 관내 항노화기업과 산청한방항노화포럼 위원 및 외부전문가인 라운드 테이블 토크(Round Table Talk)로 기업의 애로사항 등 즉각해서 해결해주는 고충해결의 길을 마련

#### ○ 결과연계계획 : 강민철 이사

결과사항	계정할인 계획
생거할 협약서 작성 의 결정의 사항	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 김윤근, 중앙한방항노화연구소 연구개발담당                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 생거할을 독점하는 것보다 일정 기간이 지나면 이 번하는 경우 기 비용, 중기까지 정액에 의한 산하로 일어나는 현상으로 원만 협상 조치가 내반이 될 수 있음</li> </ul> </li> <li>● 최은은 시스텍과유망기업 지원팀                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 생거할 수출 하는 제조업체와의 문제부 판단되지 관련 내용은 "중소 제조업체의 R&amp;D를 위한 특례조 연구" 등 관련 기술개발 및 정책제정을 참고 하향</li> <li>- 융합과 관련된 내용은 관계노사라도 생략하 과학 출연액 제조공급 기술 관련 내용 참조 하향</li> </ul> </li> </ul>



### 제4차산업혁명과 산청한방항노화산업 발전방향

2017. 7. 21.

한국과학기술기획평가원

오세훈 Ph.D

#### 산청, 한방항노화 산업의 테마는?(약재?)



【그림 11-8】 산청한방항노화포럼 기업애로사항 토의 및 4차산업혁명 대비 항노화산업 발전방향 토의

## 나. 생약자원연구회 발족 및 워크숍

- 경남 약용작물의 6차산업화 전략 -  
**생약자원연구회 발족 및 워크숍계획**

생약자원연구회 발족 및 워크숍을 개최하여 지역전략작목산학연협력사업 사무관리 및 특·약용작물 6차산업 활성화 도모.

**□ 워크숍개요**

- 일 시 : 2015. 10. 27.(화) 10:30~17:00
- 장 소 : 경남과학기술대학교 산학협력단 1층 대회의실
- 참석인원 : 49명 (농업인 44, 도립 대학 유관기관 5)
- 주 최 : 경남농업기술원
- 주 관 : 동의보감촌사업단, 지리산권역 약용작물 6차산업 육성사업단

**□ 일정 및 주요내용**

시 간	소요 (분)	내 용	비 고
10:30~10:35	25	등록·개회	소독기술담당
10:55~11:00	5	현 사(관행사)	기술보급과장
11:00~12:00	60	특강(경남 약용작물의 6차산업 전망)	경남과학기술대 신용욱 교수
12:00~13:00	60	중식	
13:00~15:00	120	도자기 6차산업 성공전략	한국농어촌방송 최인식 부도원장국장
15:00~15:10	10	Break Time	
15:10~16:00	50	생약자원 연구회 발족	경남과학기술대 이진우 교수
16:00~17:00	60	현장견학 - 동의보감촌 사업단	동의보감촌 R2S사업단 최철호 실장
17:00~		폐 회	

**□ 기대효과**

- 고품질 약용작물 안전생산 수입농산물 대체 농가소득 증대
- 약용작물 6차산업화 지역 주민 참여 확대와 웰 커뮤니티 활성화 유도

【그림 11-11】 생약자원연구회 조직 및 워크숍.

## 다. 경남향노화산업발전위원회

- (1) 총괄 연구책임자 조계만 : 경남향노화산업발전연구원 서비스 분과 위원 위촉
- (2) 참여기업 책임자 강민철 : 경남향노화산업발전연구원 산업 분과 위원 위촉
- (3) 세부 연구책임자 김윤근 : 경남향노화산업발전연구원 소재 분과 위원 위촉

'향노화산업의 견본을 타워' 경남향노화산업발전위원회 출범

경남향노화산업발전위원회가 28일 발대식을 갖고 본격적인 활동에 들어갔다.

경남도 향노화산업의 정책지원기구인 '경남향노화산업발전위원회'가 출범했다.

경남도는 28일 경남도청 사무원사 중회의실에서 조규일 사무부처장 주재로 향노화분야 관계 선진기업 34명이 참석한 가운데 "경남향노화산업발전위원회의" 발대식을 열어 위촉장을 전달하고 본격적인 활동에 들어간다고 밝혔다.

지문위원회는 향노화산업의 특화된 광범위한 산업분야를 효율적으로 연계하고 개별적 사업성과를 향노화산업 전체로 확산하기 위해 전문가들의 의견을 듣고자 구성하게 되었다.

지문위원회는 황스퀘어, 스키계량, 신업리, 서비스 등 산업별 4개 분과와 신업리 분과를 연계-조정할 기획조정분과 등 총 5개 분과에 34명으로 구성되었고, 분과별로 대학교수, 국책연구원 연구원, 기업인, 직능 대표 등 전문가들이 활동하게 된다.

지문위원회는 앞으로 ▲향노화산업의 비전 목표 및 전략 설정에 관한 자문 ▲사업권 중점투자 개선 ▲사업성과의 연계 확산방안에 대한 자문 등의 활동을 하게 된다.

【그림 11-12】 경남향노화산업발전위원회 출범.



### 3. 박람회 기획, 심포지엄, 워크숍, 세미나 및 보고서 자료

#### 가. 박람회 기획, 심포지엄, 워크숍, 세미나 자료집



【그림 11-13】진주국제농식품박람회 6차산업관 기획 및 2014년 지리산권역 6차산업 관련 심포지엄 자료집

## 지리산권역 6차산업 육성을 위한 네트워크 구성 워크숍

주최 : 지리산권역농작물6차산업육성사업단, 산청한방약초연구소  
 후원 : 동의보감총재단사업단  
 지원 : 농림축산식품부(과제번호 : 314021-3)  
 일시 : 2015년 2월 24일 오후 2:00 ~ 5:00  
 장소 : 산청한방약초연구소 세미나실

## 지리산권역 6차산업 육성을 위한 네트워크 구성 워크숍

- 참가대상 : 참여기업(지역내외), 참여기업 협찬기업(자원에 제약 변경기업), 참여연구관
- 일시 : 2015년 2월 24일 오후 2:00 ~ 5:00
- 장소 : 산청한방약초연구소 세미나실
- 워크숍 진행 순서

내 용	진 행	시간(오후)
산청한방약초 연구소 - 인사말	김윤근 박사	2:20 ~ 2:30
대이스팅센터미팅 및 네트워크	손성훈 교수	2:30 ~ 3:00
지리산권역 6차산업 내침 및 전략	조계만 교수	3:00 ~ 3:20
기업가정신과 자막생태계	이강익 대표	3:20 ~ 4:20
지역생태계 구축을 위한 실태 현황 논의	박삼학 교수	4:20 ~ 4:50
일 질	손성훈 교수	4:50 ~ 5:00
최석익사 및 네트워크 구성	조계만 교수	5:00 ~ 7:00

산청한방약초의 6차 산업화 전략 및 비전 워크숍

## 지리산권역 약용작물의 고품가치 제품 및 6차 산업화 모델 개발

주최 : (재)경남한방약초연구소, 경남과학기술대학교 공동  
 후원 : 지리산권역농작물6차산업육성사업단, 동의보감총재단사업단,  
 향노화산업리플렛개발사업단, 봉곡식물(주), (사)한방대학  
 지원 : 농림축산식품부 농정발전기술개발(과제번호 : 314021-3)

## 산청한방약초의 6차 산업화 전략 및 비전 워크숍

- 참가대상 : 호, 주한농농업연구원, 호, 한일경노회산업과장, 호, 농업기술원, 국립연구과장, 지역약초양양담당부원, 관내기업체, 학생 등
- 일 시 : 2015. 5. 8(금), 14:00 ~ 18:00
- 장 소 : 경남한방약초연구소 세미나실
- 주제발표 : 경남과학기술대학교 조계만 교수
- 주요내용 : 산청한방약초 6차 산업화 전략 및 사례 발표
- 세미나 일정 :

시 간	주 요 내 용	비 고
14:00	• 등록	
14:00-14:30	• 개회식 - 환영사, 내빈소개 - 대회사 - 환영사	사회자 주한농농업연구원 산청군수
14:30-14:50	• 지리산권 약용작물 6차 산업화 전략	조계만 교수 (경남과학기술대)
14:50-15:20	• 농업·농촌의 6차 산업화 추진전략	손성훈 교수 (농부미래대)
15:20-15:40	• 휴식	
15:40-16:10	• 동의보감총재단의 전통, 미래와 사례	최석익 대표 (동의보감총재단)
16:10-16:40	• 지리산 약용작물 VDRON	김영애 대표 (농업발전기술원)
16:40-17:20	• 한방지형지물의 부른 및 융기 기술	김영선 대표 (한국후지화학공업)
17:10-17:30	• 토론 및 질의	사회자
17:30	• 폐회	

【그림 11-14】 2015년 지리산권역 6차산업 관련 워크숍 자료집

## 지리산권역 약용작물 6차산업 육성을 위한 협력 및 발전 방안

주최 : 경남한방약초연구소, 지리산권역약용작물6차산업육성사업단  
 후원 : 동의보감촌RIS사업단, 향노화산업화플랫폼개발사업단  
 산청한방향노화포럼  
 일시 : 2016년 2월 3일 수요일, 14:00 ~ 17:00  
 장소 : 경남한방약초연구소 세미나실(2층)  
 지원 : 농림축산식품부 농생명산업기술개발(과제번호 : 314021-3)

## 지리산권역 약용작물 6차산업 육성을 위한 협력 및 발전 방안

- 개 요
- 일 정 : 2016. 2. 3.(수), 14:00 ~ 17:00
  - 장 소 : 경남한방약초연구소 세미나실(2층)
  - 주 최 : 경남한방약초연구소  
지리산권역약용작물6차산업육성사업단
  - 후 원 : 동의보감촌RIS사업단  
향노화산업화플랫폼개발사업단  
산청한방향노화포럼
  - 참석인원 : 약 40여명  
- 경상남도농업기술원(4명), 농업기술원 약용자원담당(2명)  
경남한방약초연구소(6명), 경상남도 한방향노화산업과(2명)  
산청군 향노화산업과(2명), 경남과학기술대학교(10명)  
경상대학교(5명), 기업체(10명)

□ 개 요

시 간	주 요 내 용	비 고
14:00-14:20	20' • 등록	
14:20-14:30	20' • 개회식 및 환영사	연구소 소장 6차사업단 단장
14:30-14:50	20' • 경남한방약초연구소 발표	경남한방약초연구소 김원근 상임
14:50-15:30	30' • 지리산권역약용작물6차산업육성 사업단 발표	경남과기대 조계만 교수
15:20-15:35	10' • Break time	
15:35-16:05	20' • 향노화산업화플랫폼개발사업단 발표	경상대학교 박성원 교수
16:05-16:20	20' • Break time	
16:20-17:00	30' • 종합토론	진행: 조계만 교수

【그림 11-15】 2016년 지리산권역 6차산업 관련 워크숍 자료집

## 지리산권역 6차산업화 심포지엄 청년창업을 6차산업으로

■ 일 시 : 2016. 4. 28(목) 오후 2~5시  
■ 장 소 : 전남과기대 공동실험실습관 1층 대강홀

- 주최: 전남과학기술대학교 지리산권역 약용작물 6차산업육성사업단
- 주관: 전남과학기술대학교 농업대학원
- 후원: (주)경남생명약초연구소, 전남과학기술대학교농생명사업단, 농지보급원, RDS사업단, (사)한국생물약재개발사업지원연구원
- 지원: 농림축산식품부 농생명산업기술개발(과제번호: 314021-3)

### 지리산권역 6차산업화 심포지엄

- 주 제  
- '청년창업을 6차산업으로'
- 참가대상  
- 6차산업 전공 학부생(식물과학부, 농림생명공학부, 지리산권역스쿨 등)을 비롯, 농업대학원 학부 및 졸업생, 그 외 6차산업 관심자
- 일 시  
- 2016. 4. 28(목), 14:00 ~ 17:00
- 장 소  
- 전남과학기술대학교 공동실험실습관 1층 대강홀
- 심포지엄 세부일정

시 간	주요 내용	강 령
- 14:00	~>> 출 격 ~>>	
14:05 ~ 14:15	▶ 오프닝 및 4년소개	이동혁 (지리산권역기술대학교) 교장
14:15 ~ 14:20	▶ 기조연사	이정현 (지리산권역기술대학교) 직장수
14:22 ~ 14:30	▶ 농업의 잠재력은 얼마나 많은지에 대해	이은희 (농업기술진흥원) 차장
14:30 ~ 14:40	▶ 6차산업 진입로 열린 농업창업	이정현 (농수산물유통공사) 차장
14:40 ~ 15:00	~>> 쉬는 시간 10분 ~>>	
15:00 ~ 15:30	▶ 창조농업, 청년이 만든다	조원호 수목교양의 전문기술사, 대표
15:30 ~ 15:50	▶ 철저관리 및 모종	이정현 (지리산권역기술대학교)
15:50 ~ 17:00	~>> 질의 응답 및 폐회 ~>>	

### 농생명산업기술개발사업 심포지엄

## 지리산권역 약용작물의 6차산업 고부가가치 전략

■ 일 시 : 2016. 10. 7(금) 14:00  
■ 장 소 : 경남생명약초연구소 세미나실

주최: ©경남생명약초연구소, 지리산권역약용작물 6차산업육성사업단  
후원: 영농육성사업지원사업단, 산청생명노의보림, (주)자연에베라

### 농생명산업개발사업 3차년도 심포지엄 개최

#### □ 심포지엄 개요

- 주 제 : 지리산권역 약용작물 6차산업 고부가가치 전략
- 일 시 : 2016. 10. 7(금) 14:00 ~ 17:00
- 장 소 : 경남생명약초연구소 세미나실
- 주최 및 후원
  - 주최: 경남생명약초연구소, 지리산권역약용작물 6차산업육성사업단
  - 후원: 영농육성사업지원사업단, 산청생명노의보림, (주)자연에베라

#### □ 행사일정

시 간	내 용	리 스포
14:00~14:30 (30)	▶ 등록	
14:30~14:40 (10)	▶ 기조연사 ▶ 환영사 ▶ 축사	4차산업혁명 4차산업 경남생명약초연구소 소장 조석문 농업기술원, 원장, 김성호
14:40~14:50 (10)	▶ 약용작물 생산현황과 육성방향	문선애 이용기 부장
14:50~15:30 (40)	▶ 농산물용 유용한 기능성 성분추출의 개발	송희재 이국일 교수
15:30~15:40 (10)	▶ 질의응답	
15:40~16:15 (35)	▶ 건강기능식품 진입 전략	KGC(가이스트)벤처 박재호 부장
16:15~16:30 (15)	▶ 산청 생명연구소의 농산물 유통망 방안	경남생명연구소 김재경 차장
16:30~17:00 (30)	▶ 후원후원	

【그림 11-16】 2016년 지리산권역 6차산업 관련 심포지엄 자료집

나. 각종 보고서 자료집



【그림 11-17】 항노화산업 육성 법제화를 토론회 자료집 및 2016 미래건강 경남항노화 콘퍼런스 기획보고서 자료집



# 지리산권역 6차산업 비즈니스모델 연구 보고서

2017년 8월

작성 자 박상혁  
 조 계 만  
 박 정 선  
 김 영 락

경남과학기술대학교

가. 비즈니스모델 및 서비스 제공

<p>본 사업의 추진을 위하여 2017년 8월 10일(수)부터 12일(금)까지 3일간 현장 실습을 실시하였다. 현장 실습은 2017년 8월 10일(수)부터 12일(금)까지 3일간 현장 실습을 실시하였다. 현장 실습은 2017년 8월 10일(수)부터 12일(금)까지 3일간 현장 실습을 실시하였다.</p>	<p>본 사업의 추진을 위하여 2017년 8월 10일(수)부터 12일(금)까지 3일간 현장 실습을 실시하였다. 현장 실습은 2017년 8월 10일(수)부터 12일(금)까지 3일간 현장 실습을 실시하였다. 현장 실습은 2017년 8월 10일(수)부터 12일(금)까지 3일간 현장 실습을 실시하였다.</p>	<p>본 사업의 추진을 위하여 2017년 8월 10일(수)부터 12일(금)까지 3일간 현장 실습을 실시하였다. 현장 실습은 2017년 8월 10일(수)부터 12일(금)까지 3일간 현장 실습을 실시하였다. 현장 실습은 2017년 8월 10일(수)부터 12일(금)까지 3일간 현장 실습을 실시하였다.</p>
---	---	---

- 4 -

# 「자연애제약 함양군 이전」 6 차 산 업 사 업 계 획 서

2017년 8월

(주)자연애제약 강민철  
 장미정  
 윤영식  
 경남과학기술대학교 조계만  
 한만선  
 고세욱

(주)자연애제약

## 목 차

1. 일제 현황	1
1.1 휴식 현황	1
2. 계획	3
3. 사업의 필요성	3
4. 사업의 목적	4
5. 주요사업	4
6. 사업의 기대효과	4
7. 예산 및 기금지원	5
8. 사업의 성과 측정	5
9. 사업의 추진 일정	5
10. 사업의 추진 계획	5
1. 사업의 추진 계획	5
1.1 사업의 추진 계획	5
1.2 사업의 추진 계획	5
1.3 사업의 추진 계획	5
1.4 사업의 추진 계획	5
1.5 사업의 추진 계획	5
1.6 사업의 추진 계획	5
1.7 사업의 추진 계획	5
1.8 사업의 추진 계획	5
1.9 사업의 추진 계획	5
1.10 사업의 추진 계획	5
1.11 사업의 추진 계획	5
1.12 사업의 추진 계획	5
1.13 사업의 추진 계획	5
1.14 사업의 추진 계획	5
1.15 사업의 추진 계획	5
1.16 사업의 추진 계획	5
1.17 사업의 추진 계획	5
1.18 사업의 추진 계획	5
1.19 사업의 추진 계획	5
1.20 사업의 추진 계획	5
1.21 사업의 추진 계획	5
1.22 사업의 추진 계획	5
1.23 사업의 추진 계획	5
1.24 사업의 추진 계획	5
1.25 사업의 추진 계획	5
1.26 사업의 추진 계획	5
1.27 사업의 추진 계획	5
1.28 사업의 추진 계획	5
1.29 사업의 추진 계획	5
1.30 사업의 추진 계획	5
1.31 사업의 추진 계획	5
1.32 사업의 추진 계획	5
1.33 사업의 추진 계획	5
1.34 사업의 추진 계획	5
1.35 사업의 추진 계획	5
1.36 사업의 추진 계획	5
1.37 사업의 추진 계획	5
1.38 사업의 추진 계획	5
1.39 사업의 추진 계획	5
1.40 사업의 추진 계획	5
1.41 사업의 추진 계획	5
1.42 사업의 추진 계획	5
1.43 사업의 추진 계획	5
1.44 사업의 추진 계획	5
1.45 사업의 추진 계획	5
1.46 사업의 추진 계획	5
1.47 사업의 추진 계획	5
1.48 사업의 추진 계획	5
1.49 사업의 추진 계획	5
1.50 사업의 추진 계획	5
1.51 사업의 추진 계획	5
1.52 사업의 추진 계획	5
1.53 사업의 추진 계획	5
1.54 사업의 추진 계획	5
1.55 사업의 추진 계획	5
1.56 사업의 추진 계획	5
1.57 사업의 추진 계획	5
1.58 사업의 추진 계획	5
1.59 사업의 추진 계획	5
1.60 사업의 추진 계획	5
1.61 사업의 추진 계획	5
1.62 사업의 추진 계획	5
1.63 사업의 추진 계획	5
1.64 사업의 추진 계획	5
1.65 사업의 추진 계획	5
1.66 사업의 추진 계획	5
1.67 사업의 추진 계획	5
1.68 사업의 추진 계획	5
1.69 사업의 추진 계획	5
1.70 사업의 추진 계획	5
1.71 사업의 추진 계획	5
1.72 사업의 추진 계획	5
1.73 사업의 추진 계획	5
1.74 사업의 추진 계획	5
1.75 사업의 추진 계획	5
1.76 사업의 추진 계획	5
1.77 사업의 추진 계획	5
1.78 사업의 추진 계획	5
1.79 사업의 추진 계획	5
1.80 사업의 추진 계획	5
1.81 사업의 추진 계획	5
1.82 사업의 추진 계획	5
1.83 사업의 추진 계획	5
1.84 사업의 추진 계획	5
1.85 사업의 추진 계획	5
1.86 사업의 추진 계획	5
1.87 사업의 추진 계획	5
1.88 사업의 추진 계획	5
1.89 사업의 추진 계획	5
1.90 사업의 추진 계획	5
1.91 사업의 추진 계획	5
1.92 사업의 추진 계획	5
1.93 사업의 추진 계획	5
1.94 사업의 추진 계획	5
1.95 사업의 추진 계획	5
1.96 사업의 추진 계획	5
1.97 사업의 추진 계획	5
1.98 사업의 추진 계획	5
1.99 사업의 추진 계획	5
1.100 사업의 추진 계획	5

【그림 11-19】 지리산권 6차산업 비즈니스 모델 연구 보고서 자료집 및 자연애제약 함양군 이전 6차산업 사업계획서

#### 4. 2016년 국가연구개발 우수성과 100선 추천을 위한 자료 제출

**농림수산식품기술기획평가원**

수신처: 행정안전부 연구담당자

제목: 2016년 국가연구개발 우수성과 100선 추천을 위한 자료제출 요청

1. 귀원의 무궁한 발전을 기원합니다.

2. 미래창조과학부에서는 국가연구개발의 우수성과 경종·권위·홍보 및 과학기술인 자긍심 고취를 위해 매년 국가연구개발사업 우수 연구실장(팀) 선발·상장하고 있습니다.

3. 이를 위해 평가위원회는 농림수산식품 연구개발사업으로 귀원장서 수행하신 연구·과제를 우수사례로 발굴하고, 「2016년 국가연구개발 우수성과 100선」에 추천코자 관련 자료를 제공하오니 요청하오니 협조를 주시기 바랍니다.

가. 요청대상 : 「2016년 국가연구개발 우수성과」 추천 관련 제출서류(붙임 참조.)  
 나. 제출기간: 2016. 2. 15.(금) ~ 2. 26(목)  
 다. 제출처 : 전자메일 yirae@nifds.go.kr  
 라. 담당자 : 조경민(팀장) 직위번호 091-450-9770

붙임: 2016년 국가연구개발 우수성과 선정 추천 안내 및 제출자료 양식 1부. 끝.

**별첨2-1** 우수성과 후보 추천서

**2016년 국가연구개발  
분야별 우수성과 추천서**

**성 과 명** : 지리산 권역 약용작물 고품가가치 제품  
산업화 및 6차산업 연계 모델 개발  
**연구자명** : 조 계만

위 성과를 우수성과 사례로 추천합니다.

**기관명** : 경남과학기술대학교 산학협력단

☑ 정부R&D 과제정보

사업명	농성농산업기술개발
사업부처명	농림축산식품부
대표제명	지리산 권역 약용작물 고품가가치 제품 산업화 및 6차산업 연계 모델 개발
세부과제번호	1545007968, 1545008341, 1545008313, 1545008284, 1545008345, 1545008632, 1545010227
세부과제명	약용작물 이용 천연주미료 개발, 약용작물 이용 음료 개발, 제품의 관능평가 및 표준화, 약용작물의 생합성관성 유능 평가, 약용작물 유전자원 보존 기술, 6차산업 비즈니스 모델 개발
연구개발단계	기초연구( ) 응용연구( ) 개발연구(●) 기타( )
총연구기간 (연/월)	2014년 7월 29일 ~ 2017년 7월 28일
총연구비 (백만원 기준)	총 1,800백만원 (정부: 1,290백만원 / 지방: 60백만원 / 민간: 450백만원)
공동연구자 (R&D 참여자)	남상태, 신의철, 이신우, 박상학(경남과학기술대학교 산학협력단), 김연준(경상대학교 산학협력단), 김윤근(경남현방약초연구소)
연구특성	지리산 권역 약용작물 복합주출물 활용 제품개발 및 효능 검증 지리산 권역 약용작물 복합주출물 미 유전자원 확보, 재배기술 개발 및 대량생산 기술 지리산 권역 약용작물 활용 6차 산업 및 수익창출 모델 개발
연구내용	지리산 권역 약용작물 복합주출물 활용 천연소스·조미 재료화 기술 및 6차 산업 네트워크 구축 지리산 권역 약용작물 복합주출물 활용 기능성 음료·드링크 제품화 기술 지리산 권역 약용작물 복합주출물 활용 제품의 표준화 및 관능평가 지리산 권역 약용작물 복합주출물의 생합성관성 질환 개선 효과 검증 지리산 권역 약용작물의 관능 미각 및 보존 기술 개발 지리산 권역 약용작물의 대량생산 및 표준화 지리산 권역 약용작물 활용 6차 산업 및 수익창출 모델 개발
포상명	2014년 대한민국 창조경영대상 (2014.12.19)

【그림 11-20】 2015년 연구결과를 바탕으로 국가 연구개발 분야별 우수성과 추천대상 선정




## 5. 연구과제 진행 중 개발 제품

### 가. 몽고식품(주)

제품명	제품 사진	주요 내용
몽고 육수 불고기 소스		누구나 쉽게 요리할 수 있는 간편 소스 고기 1 + 소스 1 + 물 2  제품 원재료: 몽고간장, 사과농축액 등 제품용도: 불고기전골, 덮밥류, 볶음요리 유통기한: 1년

### 나. (주)자연애제약

제품명	제품 사진	주요 내용
한의용 납품용 대환 제품		-홍삼활력환 : 대표적인 건강식품인 “홍삼”을 주원료로 만든 제품 -도라지함유 십전대보환: 자연애제약 기술인 고온숙성법을 이용하여 저장성과 안정성 등이 향상된 제품 (특허출원 : 2016년 11월 21일) -녹용진환: 녹용과 약재를 혼합하여 제조한 제품 -한의원 납품용으로 10환과 30환 제품 각 2종

## 6. 주요 변경 사항

### 가. 제2협동 : 경남한방약초연구소

○ 협동책임자 변경사항 : 연구 계획에서 등록된 협동책임자 김준영 박사는 식품의약품안전처 연구사 채용되어 불가피하게 연구소를 퇴사함에 따라 김윤근 연구개발실장으로 협동책임자로 변경

○ 연구소 명칭 및 대표자 변경사항 : 재단법인 산청한방약초연구소가 경상남도 이관에 따라 법인명은 경남한방약초연구소, 대표자는 경상남도 도지사로 변경

### 나. 제1협동 : 경상대학교 산학협력단

○ 협동책임자 변경사항 : 연구 계획에서 등록된 협동책임자 김현준 교수는 미국의 장기출장(연구년 파견 1년)으로 책임자로 연구 수행이 어려워 박상원 교수로 협동책임자로 변경

- 고광만, 2012, “기업가정신 및 사회적자본이 지식경영과 혁신에 미치는 영향”, 상지대학교 대학원 박사학위논문.
- 권중섭·장우환, 2011, “어메니티관광형 농업경영체의 특성에 관한 연구”, 동북아관광연구 제7권 제4호, 동북아관광학회.
- 김성수·오세익·전은경·조경만·최찬호, 2012, “농업·농촌의 이해”, 한국방송통신대학교출판부.
- 김윤희, 2001, “농산업을 위한 산업연관분석 - 전·후방연쇄효과를 중심으로”, 석사학위논문, 서울대학교.
- 김응규, 2014, “「농업 6차산업화」의 국내외 추진 동향과 과제”, CEO Focus 제 324호, 농협경제연구소
- 김정섭 · 마상진 · 김미복, 2012, “협동조합기본법 제정의 시사점과 농업 · 농촌 정책의 과제”, 한국농촌경제연구원 정책연구보고서, pp. 1-115.
- 김종선·김정호·박문호·김창호, 2013. 12, “지역농업 활성화를 위한 협동조합의 역할과 발전방안”, 한국농촌경제연구원 기본연구보고서, pp. 1-158,
- 김종안 · 김진희 · 김가영 · 이소진, 2015, “농업 · 농촌자원 활용한 서비스산업 경영체의 비즈니스 모델 진단지표 개발에 관한 연구 - 6차산업 경영체를 중심으로”, 관광연구 제30권 제6호, pp. 387-409.
- 김태곤·허주녕, 2011, “농업의 6차산업화와 부가가치 창출방안”, 커뮤니티비즈니스 중장기 육성방안(1/3차년도), 한국농촌경제연구소
- 니콜라 아자르, 2013, “(따뜻한 세상을 만드는) 임팩트 비즈니스”, 서울 : Edit the world : MYSC.
- 도현명, 2011. 9., “경제적·사회적 가치 모두 생산하는 임팩트 비즈니스가 온다”, DBR(동아비즈니스리뷰).
- 박상용 · 김연정, 2004, “벤처기업 CEO의 기업가정신, 구성원의 임파워먼트와 벤처조직유효성의 상호관계”, 한국중소기업학회, 벤처경영연구, 제7권 제3호 통권17호,p.3-31.
- 박상혁·한만선·전형광, 2014, “전략과 인프라의 전략적 연계를 통한 농업벤처기업 경영혁신 사례 연구”, 벤처창업연구 제 9권 제 2호
- 배종태 · 차민석, 2009, “기업가정신의 확장과 활성화”, 중소기업연구 제31권 제1호 통권74호 pp.109-128
- 사이먼 사이넵, 2013, “나는 왜 이 일을 하는가?”, 타임비즈.
- 서운정, 2013, “6차산업 융복합 혁명, 융복합 산업의 원리와 실제”, HNCOM, p162-p182
- 신인식, 1995, “농업관련산업론”, 선진문화사, 서울.
- 오내원·김창호·권인혜·오세익, 2010, “농촌지역 사회적기업의 성과 평가와 지원방안”, 한국농촌경제연구원 기본연구보고서, pp. 1-85.
- 오은주·김선기, 2012, “협동조합 활성화를 위한 정책방안”, KRILAFocus 제 51호, 한국지방행정연구원.
- 유니타스브랜드 매거북, 2010, “<http://www.unitasbrand.com/brand/>”
- 이남중, 2012. 2., “전후방산업 연관효과”, 농수축산신문 오피니언 칼럼, 농수축산신문.

- 이주량·정운정, 2010, “농산업 R&D 투자/생산성 국제비교 및 포트폴리오 분석”, 정책연구 10-28, 과학기술정책연구원 연구보고서.
- 이춘우·한유진·김도현·서유미·이경원·이희우·이영달, 2014, “기업가정신의 이해”, 중소기업청, (재)한국청년기업가정신재단, p14, p16, p21, p100, p176
- 이향은, 이순종, 2009, “하이컨셉(High Concept) 시대의 디자이너 역량에 대한 연구”, 한국디자인학회 국제학술대회 논문집, 166-167.
- 임준형·김장호·전의천, 2013, “협동조합을 통한 지역경제 활성화 - 광주광역시 대상으로”, 산업경제연구 제26권 제1호 pp. 377-407, 한국산업경제학회.
- 장성희·김희대·최문중, 2011, “기업가정신을 기반으로 한 혁신성, 표준화가 유연성과 소프트웨어 기업의 성과에 영향을 미치는 요인”, 인터넷전자상거래연구 제11권 제4호, pp01~19.
- 조용호, 2013, “비즈니스모델 Zen“, (주)비전아레나, 서울.
- 조용호, 2015, “임팩트 비즈니스를 위한 비즈니스모델 디자인”, <http://businessmodelzen.co.kr>.
- 최양부.2012. “협동조합기본법시대의 새로운 협동조합운동의 방향과 농업·농촌의 실천과제.” 협동조합기본법 제정과 농업·농촌의 대응과제 .제21차 지역리더포럼.지역재단
- 태량량, 2011, “중국벤처기업 창업가의 성취욕구와 위험감수성향이 경영성과에 미치는 영향”, 조선대학교 대학원 석사학위논문.
- 한국관광공사, 2014, “빅데이터 활용 관광사업 성과 시범분석 : 2013 문화관광축제를 중심으로 “
- 홍서연·이상영·김경희, 2015, “사회적 경제의 과제와 농촌 사회적 기업의 실천“, 공공사회연구 제5권 제3호, pp. 29-64.
- 황영모, 2011, “농업 농촌6차산업화의 이해와 사례: 일본의 논의와 전북의 사례를 중심으로”, 충남농어업 6차산업화 포럼 발표자료.
- Ma Q, Wang LH andJ iang JG. 2016. Hepatoprotective effect of flavonoids from DC on hepatotoxicity in comparison with silymarin. *Food Funct.* 18,7(5): 2179-2184.
- Adams P, Nelson DE, Yamada S, Chmara W, Jensen RG, Bohnert HJ, Griffiths H. 1998. Growth and development of *Mesembryanthemum crystallinum* (*Aizoaceae*). *New Phytol* 138: 171-190.
- Agarie S, Kawaguchi A, Kodera A, Sunagawa H, Kojima H, Nose A, Nakahara T. 2009. Potential of the common ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum* as a new high-functional food as evaluated by polyol accumulation. *Plant Prod Sci* 12: 37-46.
- Ahn CH, Park PB. 2009. Increase of the D-*chiro*-inositol and D-pinitol contents by abiotic stress in the buckwheat seedlings. *J Life Sci* 19: 1456-1462.
- Alvarez I, Wendel JF (2003) Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol Phylogenet Evol* 29:417-434
- Ancerewicz J, Migliavacca E, Carrupt PA, Testa B, Bree F, Zini R, Tillement JP, Lavidalle S, Guyot D, Chauvet-Monges AM, Crevet A, Le Ridant A. 1998. Structure-property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. *Free Radical Bio Med* 25: 113-120.
- Aneja, R.P. and Murthy, T.N. 1990. Conjugated linoleic acid contents of Indian curds and

- ghee. *Indian J. Dairy Sci.* 43, 231-238.
- AOAC. 1995. *Official methods of analysis*. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA. p 1110.
- AOAC. 1995. *Official methods of analysis*. 16th ed. Association of official analytical chemists. Washington, DC, USA, p 2.
- Bae SH, Kim DH, Bae YS, Lee KJ, Kim DW, Yoon JB, Hong JH, Kim SH. 2010. Toxic hepatitis associated with *Polygoni multiflori*. *Korean J Hepatol* 16: 182-186.
- Bang KH, Yu HS, Koo DH, Cho JH, Park HW, Seong NS, Park SI, Kim HS (2002) Selection of RAPD marker to discriminate the bolting-resistant varieties and commercial dried medicinal materials of *Angelica* species. *Kor J Med Crop Sci* 10:46-50
- Bauer G. 2000. Reactive oxygen and nitrogen species: efficient, selective, and interactive signals during intercellular induction of apoptosis. *Anticancer Research* 20: 4115-4139.
- Benzie IFF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power" : the FRAP assay. *Anal Biochem* 239: 70-76.
- Blois MA. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-2000.
- Branen AL. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J Am Oil Chem Soc* 52: 59-63.
- Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Haase SL, Longo DL, Jameson JL. 2011. *Harrison's principles of internal medicine*. 15th ed, McGraw-Hill, New York, NY, USA. p 2109-2137.
- Budak HN, Guzel-Seydim ZB. 2010. Antioxidant activity and phenolic content of wine vinegars produced by two different techniques. *J Sci Food Agric* 90: 2021-2026.
- Buddhachat K, Osathanunkul M, Madesis P, Chomdej S, Ongchai S (2015) Authenticity analyses of *Phyllanthus amarus* using barcoding coupled with HRM analysis to control its quality for medicinal plant product. *Gene* 573:84-90
- Cha MN, Oh MS. 1996. Changes in mineral content in several leaf vegetables by various cooking methods. *Korean J Food Cook Sci* 12: 34-39
- Cha, J. Y., Jin, J. S. and Cho, Y. S. 2011. Biological activity of methanolic extract from *Ganoderma lucidum*, *Momordica charantia*, *Fagopyrum tataricum*, and their mixtures. *J Life Sci*:21,1016-1024.
- Chen S, Yao H, Han J, Liu C, Song J, Shi L, Zhu Y, Ma X, Gao T, Pang X, Luo K, Li Y, Li X, Jia X, Lin Y, Leon C (2010) Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS One* 5:8613
- Cheung, L. M., Cheung, C. K. and Vincent, E. C. O. 2003. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chem*.81,249-255.
- China Plant BOL Group, Li DZ, Gao LM, Li HT, Wang H, Ge XJ, Liu JQ, Chen ZD, Zhou SL, Chen SL, Yang JB, Fu CX, Zeng CX, Yan HF, Zhu YJ, Sun YS, Chen SY, Zhao L, Wang K, Yang T, Duan GW (2011) Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:19641-19646

- Cho EJ and Yoon SH. 1999. Protective effect of Asiasari radix on rat liver. *J. Kor. Soc. Hygi. Sci.* 5, 85-91.
- Cho EK, Choi YJ. 2013. Antioxidant, antidiabetic, and anti-inflammatory effects of extracts and fractions from *Parthenocissus tricuspidata* stems. *J Life Sci* 23: 399-405.
- Cho YJ, Ju IS, Chun SS, An BJ, Kim JH, Kim MW, Kwon OJ. 2008. Screening of biological activities of extracts from *Rhododendrom mucronulatum* Turez flowers. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 276-281.
- Cho, J. H., Lee, J. Y., Lee, M. J., Oh, H. N., Kang, D. H. and Jhune, C. S. 2013. Comparative analysis of useful  $\beta$ -glucan and polyphenol in the fruiting bodies of *Ganoderma* spp. *J. Mushroom Sci. Prod.* 11, 164-170.
- Cho, J. H., Noh, H. J., Kang, D. H., Lee, J. Y., Lee, M. J., Park, H. S., Sung, G. H. and Jhune, C. S. 2012. Comparative analysis of amino acid contents of the fruiting bodies in *Ganoderma* spp. *J. Mushroom Sci. Prod.* 10, 208-215.
- Choi HS, Zhu MF, Kim CS, Lee JH. 2003. Studies of name and herbal origins of Ha-Soo-Oh. *Korean J Oriental Medicine* 9: 81-89.
- Choi HW, Song H, Koo DH, Bang JW, Hur Y (2007) Molecular and cytological characterization of species-specific repetitive DNA sequences for *Angelica acutiloba*. *Kor J Gen* 29:503-511
- Choi HY, Choi YJ, Lee JH, Ham I (2004) Sequencing analysis on the ITS region and AFLP analysis to identify dried medicinal *Angelica* species. *Kor J Herbol* 19:91-99
- Choi J, Lee H, Kim Y, Kim B, Kim I, Lee C. 2012. Effect of *Polygonum multiflorum* Thunberg extract on lipid metabolism in rats fed high-cholesterol diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 957-962.
- Choi YJ. 1987. Cultivation and Utilization of Wild Edible. Osung Press, Seoul, Korea. p 337.
- Choi, I., Kim, Y., Park, Y., Seog, H., & Choi, H. 2007. Anti-obesity activities of fermented soygerm isoflavones by *Bifidobacterium breve*. *Biofactors*, 29, 105-112.
- Choi, J. Y., Jeon, J. E., Jang, S. Y., Jeong, Y. J., Jeon, S. M., Park, H. J., & Choi, M. S. 2011. Differential effects of powdered whole soy milk and its hydrolysate on antiobesity and antihyperlipidemic response to high-fat treatment in C57BL/6N mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2584-2591
- Choi, S. J., Lee, Y. S., Kim, J. K., Kim, J. K. and Lim, S. S. 2010. Physiological activities of extract from edible mushrooms. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 39, 1087-1096.
- Chun, J., Kim, G. M., Lee, K. W., Choi, I. D., Kwon, G. H., Park, J. Y., Jeong, S. J., Kim, J.S., & Kim, J. H. 2007. Conversion of isoflavone glucosides to aglycones in soymilk by fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Food Science*, 72, M39-M44.
- Chung HJ, Jang SH, Cho HY, Lim ST. 2009. Effects of steeping and anaerobic treatment on GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid) content in germination waxy hull-less barley. *LWT-Food Sci Technol* 42: 1712-1716.
- Corner, P. D., Kinicki, A. J., and Keats, B. W. ,1994, "Integrating Organizational and Individual Information Processing Perspectives on Choice" , *Organization Science*, 5(3),

294-308.

- Darley-Usmar V, Wiseman H, Halliwell B. 1995. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett* 369: 131-135.
- Dhanda JS, Pegg RB, Shand PJ. 2003. Tenderness and chemical composition of elk (*Cervus elaphus*) meat: Effects of muscle type, marinade composition, and cooking method. *J Food Sci* 68: 1882-1888.
- Drenkard E, Richter BG, Rozen S, Stutius LM, Angell NA, Mindrinis M, Cho RJ, Oefner PJ, Davis RW, Ausubel FM: A simple procedure for the analysis of single nucleotide polymorphisms facilitates map-based cloning in Arabidopsis. *Plant Physiol* 2000, 124:1483-1492.
- Feng T, Downie SR, Yu Y, Zhang X, Chen W, He X, Liu S. (2009) Molecular systematics of *Angelica* and allied genera (*Apiaceae*) from the Hengduan Mountains of China based on nrDNA ITS sequences: phylogenetic affinities and biogeographic implications. *J Plant Res.* 122:403-414
- Folin O, Denis W. 1912. On phosphotungstic phosphomolybdic compounds as color reagent. *J Biological Chemistry* 12: 239-249.
- Gantz, J. & Reinsel, D., "Extracting Value from Chaos", IDC VIEW June, 2011, p. 6.
- Gao H, Kawabata J. 2005.  $\alpha$ -Glucosidase inhibition of 6-hydroxyflavones. part 3: synthesis and evaluation of 2,3,4-trihydroxybenzoyl-containing flavonoid analogs and 6-aminoflavones as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 13: 1661-1671.
- Garcia, Rosanna, and Roger Calantone, 2002, "A critical look at technological innovation typology and innovativeness terminology: a literature review." *Journal of product innovation management* 19.2 : 110-132.
- Gorissen, L., De Vuyst, L., Raes, K., De Smet, S., and Leroy, F. 2012. Conjugated linoleic acid and linolenic acid production kinetics by *Lactobacillus* differ among strains. *Int. J. Food Microbiol.* 155, 234-240.
- Ha GJ, Jeong CH, Jeong HR, Heo HJ, Shon GM, Rho CW and Kim NK. 2011. Antioxidant activities from the different parts of *Artemisia argyi* H. using an *in vitro* system. *J. Agric. Life Sci.* 45, 109-117.
- Ha, Y.L., Grimm, N.K., and Pariza, M.W. 1987. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 8, 1881-1887.
- Han DS, Chung BH, Yoo HG, Kim YO, Beak SH. 1994. Studies on the cytotoxicity and antitumor activity of *Perilla frutescens*. *Korean J Pharmacogn* 25: 249-257.
- Han HK, Je HS and Kim GH. 2010. Effects of *Cirsium japonicum* powder on plasma glucose and lipid level in streptozotocin induced diabetic rats. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 42, 343-349.
- Hanen F, Riadh K, Samia O, Sylvain G, Christian M, Chedly A. 2009. Interspecific variability of antioxidant activities and phenolic composition in *Mesembryanthemum* genus. *Food Chem Toxicol* 47: 2308-2313.

- Hayashi K, Hashimoto N, Daigen M, Ashikawa I: Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the Piz locus. *Theor Appl Genet* 2004, 108:1212–1220.
- Hennessy, A.A., Ross, R.P., Devery, R., and Stanton, C. 2009. Optimization of a reconstituted skim milk based medium for enhanced CLA production by Bifidobacteria. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1315–1327.
- Heo JC, Lee DY, Son MS, Yun CY, Hwang JS, Kang SW, Kim TH, Lee SH. 2008. Effects of mole crickets (*Gryllotalpa orientalis*) extracts on anti-oxidant and anti-inflammatory activities. *J Life Sci* 18: 509–514.
- Hirotsu N, Murakami N, Kashiwagi T, Ujiie K, Ishimaru K: Protocol: a simple gel-free method for SNP genotyping using allele-specific primers in rice and other plant species. *Plant Methods* 2010, 6:12.
- Hosokawa KI, Hishida A, Nakamura I, Shibata T (2006) The sequences of the spacer region between the *atpF* and *atpA* genes in the plastid genome allows discrimination among three varieties of medicinal *Angelica*. *Planta Med.* 72:570–571
- Hosseini, E. S., Kermanshahi, R. K., Hosseinkhani, S., Shojaosadati, S. A., & Nazari, M. 2015. Conjugated linoleic acid production from various substrates by probiotic *Lactobacillus plantarum*. *Annals of Microbiology*, 65, 27–32.
- Huang, Y., Xiajun, F.W., Wang, X.J., Sui, Y.J., Yang, L.G., and Wang, J.F. 2013. Characterization of *Lactobacillus plantarum* Lp27 isolated from Tibetan kefir grains: A potential probiotic bacterium with cholesterol lowering effects. *J. Dairy Sci.* 96, 2816–2825.
- Hur, H. 2008. Analysis of biological activities of medicinal mushrooms. *Kor. J. Pharmacogn.* 39, 265–269.
- Hur, S.J., Lee, J.I., Ha, Y.L., Park, G.B., and Joo, S.T. 2002. Biological activities of conjugated linoleic acid (CLA) and animal products. *J. Ani. Sci. Technol.* 44, 427–442.
- Hwang, C. E., An, M. J., Lee, H. Y., Lee, B. W., Kim, H. T., Ko, J. M., Baek, I. Y., Seo, W. T. and Cho, K. M. 2014. Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* P1201 to produce soy-yogurt with enhanced antioxidant activity. *Korean J. Food Sci. Technol.* 46, 556–565.
- Hwang, C.E., An, M.J., Lee, H.Y., Lee, B.W., Kim, H.T., Ko, J.M., Baek, I.Y., Seo, W.T., and Cho, K.M. 2014. Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* P1201 to produce soy-yogurt with enhanced antioxidant activity. *Korean J. Food Sci. Technol.* 46, 556–565.
- Ibtissem B, Abdelly C, Sfar S. 2012. Antioxidant and antibacterial properties of *Mesembryanthemum crystallinum* and *Carpobrotus edulis* extracts. *Adv Chem Eng Sci* 2: 359–365.
- Inoue, M., Ohtake, T., Motomura, W., Takahashi, N., Hosoki, Y., Miyoshi, S., Suzuki, Y., Saito, H., Kohgo, Y., & Okumura, T. 2005. Increased expression of PPAR  $\gamma$  in high fat diet-induced liver steatosis in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336, 215–222.

- Ishida H, Umino T, Tsuji K and Kosuge T. 1987. Studies on antihemorrhagic substance in herbs classified as hemostatics in Chinese medicine VII. On the antihemorrhagic principle in *Cirsium japonicum* DC. *Chem. Pharm. Bull.* 35, 861-864.
- J Med Plant Res 35:2584-2589
- Jang SM, Noh SH, Park SD. 1999. Botany of herbal resource. *Hak-mun publishing Co*, Seoul, Korea. p 473-476.
- Jang, S., 1998, "A Survey on the Resource-based and the Evolutionary Approaches to Strategic Theories of the Firm" *Journal of Strategic Management*, 1(1), 49-73.
- Jeon JY. 2011. Volatile flavor compounds of green tea by the addition of *Puerariae* Radix, Adlay, naked barley and *Cynanchi* Radix. *MS Thesis*. Donggeui University, Busan, Korea.
- Jeong CH, Choi SG, Heo HJ. 2008. Analysis of nutritional components and evaluation of functional activities of *Sasa borealis* leaf Tea. *Korean J Food Sci Technol* 40: 586-592.
- Jeong HJ, Lee SG, Lee EJ, Park WD, Kim JB, Kim HJ. 2010. Antioxidant activity and Anti-hyperglycemic activity of Medicinal Herbal extracts according to extraction methods. *Korean J Food Sci Technol* 42: 571-577.
- Jeong HJ, Park SB, Kim SN, Kim HK. 2007. Total polyphenol content and antioxidative activity of Wild Grape (*Vitis coignetiae*) extracts depending on ethanol concentrations. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 1491-1496.
- Jeong IK, Chung JH, Min YK, Lee MS, Lee MK, Kim KW, Chung YE, Park JY, Hong SK, Lee KU. 2002. Comparative study about the effects of acarbose and voglibose in type 2 diabetic patients. *J Korean Diabetes Assoc* 26: 134-145.
- Jeong, G. L., Shin, H. J. and Cha, W. S. 2006. Analysis of amino acids, vitamins and minerals of fruiting body of *Fanitopsis pinicola*. *J. Life Sci.*16,1123-1126.
- Ji IH, Kim MN, Chung CK, Ham SS. 2000. Antimutagenic and cytotoxicity effects of *Phellinus linteus* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 322-328.
- Jia, Z. Tang, M. and Wu, J. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.*64,555-559.
- Jiang ZQ, Xu JM, Long MH, Tu ZM, Yang GX, He GY. 2009. 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D-glucoside (THSG) induces melanogenesis in B16 cells by MAP kinase activation and tyrosinase upregulation. *Life Sci* 85: 345-350.
- Jiang, J., Bjorck, L., and Fonden, R. 1998. Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures. *J. Appl. Microbiol.* 85, 95-102.
- Jin DC, Sung JS, Bang KH, In DS, Kim DH, Park HW, Seong NS (2005) Selection of PCR markers and its application for discriminating dried root of three species of *Angelica*. *Kor J Med Crop Sci* 13:121-125
- Joo, O. S. 2008. Chemical components and physiological activities of *Neungee* Mushroom (*Sarcodon aspratus*). *Korean J. Food Preserv.*15,864-871.
- Jung J, Kim KH, Yang K, Bang KH, Yang TJ (2014) Practical application of DNA markers for high-throughput authentication of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* from commercial ginseng products. *J Ginseng Res* 38:123-129



- Kashima Y, Nakaya S, Miyazawa M. 2014. Volatile Composition and Sensory Properties of Indian Herbal Medicine-Pavonia odorata-used in Ayurveda. *J Oleo Sci* 63: 149-158.
- Katiyar SK, Mantena SK and Meeran SM. 2011. Silymarin protects epidermal keratinocytes from ultraviolet radiation-induced apoptosis and DNA damage by nucleotide excision repair mechanism. *PLoS. One* 6:e21410.
- KFDA. 2008. *Food Code*. Korea Food and Drug Administration. Seoul, Korea. p 10-6-13.
- Kim H. 2004. Effects of *Cynanchum wilfordii* extract on serum lipid components and enzyme activities in hyperlipidemic and streptozotocin induced diabetic rat. *Korean J Human Ecol* 7: 1-11.
- Kim HK, Kim YA, Lee AY, Ko BS. 2003. Pattern analysis of *Cynanchi wilfordii* Radix and *Polygoni Multiflori* Radix. *Korean J Pharmacogn* 34: 278-281.
- Kim IC. 2008. Antioxidative properties and whitening effects of the *Polygoni Multiflori* Radix, *Polygonati Rhizoma* and *Ephedrae Herba*. *J Korean Oil Chemists' Soc* 25: 533-538.
- Kim JH, Kim JY, Choi HI, Kim NH, Park JY, Lee Y, Yang TJ (2013) Diverse and evolution of major Panax species revealed by scanning the entire chloroplast intergenic spacer sequences. *Genet Resour Crop Evol* 60:413-425
- Kim JI, Kim JC, Joo HJ, Jung SH, Kim JJ. 2005. Determination of total *chiro*-inositol content in selected natural materials and evaluation of the antihyperglycemic effect of pinitol isolated from soybean and carob. *Food Sci Biotechnol* 14: 441-445.
- Kim JM, Cho ML, Seo KE, Kim YS, Jung TD, Kim YH, Kim DB, Shin GH, Oh JW, Lee JS, Lee JH, Kim JY, Lee DW, Lee OH. 2015. Effect of extraction conditions on in vitro antioxidant activities of root bark extract from *Ulmus pumila* L., *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 1172-1179.
- Kim JM, Kim DJ, Kim TH, Kim HS, Choe M. 2010. Anti-oxidative and anti-inflammatory effect of water extract from *Perillae Semen* in RBL-2H3 Cells. *Korean J Nutr* 43: 367-373.
- Kim MJ, Kim IJ, Choi SY, Han DH, Kim YH, Lim SC, Kim TJ, Nam SY, Song BH, Oh BU, Park CG (2014) Comparison of *Cynanchum wilfordii*, *C. auriculatum*, *Metaplexis japonica* and *Polygonum multiflorum* by morphological characters. *Kor J Medicinal Crop Sci* 22:113-120
- Kim MK, Wang H, Kim YJ, Sathiyamoorthy S, Kwon WS, Yang DC (2013) Molecular authentication by multiplex-PCR of three similar medicinal plant species: *Cynanchum wilfordii*, *Cynanchum auriculatum* and *Polygonum multiflorum* (*Fallopia multiflorum*).
- Kim YE, Yang JW, Lee CH, Kwon EK. 2009. ABTS radical scavenging and anti-tumor effects of *Tricholoma matsutake* Sing.(Pine mushroom). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 555-560.
- Kim YS, Huh MR, Park JC. 2001. Effects of culture media and seawater on growth and mineral concentrations in glasswort (*Salicornia herbacea*). *Korean J Hort Sci Technol* 19: 324-337.
- Kim YS, Hwang JW, Park PJ and Jeong JH. 2014. Antioxidant activity and protective effects of extracts from *Chrysanthemum boreale* on t-BHP induced oxidative stress in chang

- cells. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 43, 60-66.
- Kim, J. E., Joo, S. J., Seo, J. H. and Lee, S. P. 2009. Antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effect of tartary buckwheat extract obtained by the treatment of different solvent and enzymes. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 38, 989-995.
- Kim, J. H., Lee, S. C. and Ju, Y. C. 2007. Effect of far-infrared irradiation on the antioxidant activity of extracts from *Phellinus igniarius* and *Ganoderma lucium*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 39, 386-389.
- Kim, O. J., Ho, J. N., Nam, D. E., Jun, W. J., Hwang, K. T., Kang, J. E., Chae, O. S. and Lee, J. M. 2012. Hepatoprotective effect of *Curdrania tricuspidata* extracts against oxidative damage. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 41, 7-13.
- Kim, S. J., Heo, M. Y., Bae, K. H., Kang, S. S. and Kim, H. P. 2003. Tyrosinase inhibitory activity of plant extract (III): fatty acid Korean indigenous plants. *J. Appl. Pharmacol.* 11, 245-248.
- Kishino, S., Ogawa, J., Yokozeki, K., and Shimizu, S. 2011. Linoleic acid isomerase in *Lactobacillus plantarum* AKU1009a proved to be a multicomponent enzyme system requiring oxidoreduction cofactors. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75, 318-322.
- Ko KH, Nam SH. 2012. Antioxidant activities of volatile aroma components from *Cudrania tricuspidata* (Carr.) Bureau extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1493-1501.
- Korea Food and Drug Administration (2008) The 9th Korean Herbal Pharmacopoeia, vol 255. Korea Food and Drug Administration, Seoul, pp 107-1088
- Korean Food Standard Codex. KFDA, 10. 2010. General test methods, [http://fse.foodnara.go.kr/residue/RS/jsp/menu\\_02\\_01\\_01.jsp](http://fse.foodnara.go.kr/residue/RS/jsp/menu_02_01_01.jsp). Korea Food Drug Administration, Seoul, Korea.
- Kwak JH, Choi GN, Park JH, Kim JH, Jeong HR, Jeong CH, Heo HJ. 2010. Antioxidant and neuronal cell protective effect of purple sweet potato extract. *J Agric Life Sci* 44: 57-66.
- Kwon SH, Kim CN, Kim CY, Kwon ST, Park KM, Hwangbo S. 2003. Antitumor activities of protein-bound polysaccharide extracted from mycelia of mushroom. *Korean J Food Nutr* 16: 15-21.
- Kwon, O. J., Lee, H. Y., Kim, T. H. and Kim SG. 2014. Antioxidant and pancreatic lipase inhibitory activities of *Anemarrhena asphodeloides*. *Korean J. Food Preserv.* 21, 421-426.
- Larner J. 1994. Multiple pathways in insulin signalling-fitting the covalent and allosteric puzzle pieces together. *Endocrine J* 2: 167-171.
- Larner J. 2001. D-chiro-Inositol in insulin action and insulin resistance—Old-fashioned biochemistry still at work. *IUBMB Life* 51: 139-148.
- Lee BB, Park SR, Han CS, Park E, Park HR, Lee SC. 2008. Antioxidant activity and inhibition activity against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase of *Viola mandshurica* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 405-409.
- Lee BY, Kwak M, Han JE, Kim SJ (2011) The taxonomic status of *Angelica purpuraefolia* and

- its allies in Korea: inferences based on ITS molecular phylogenetic analyses. *Kor J Plant Tax* 41:209-214
- Lee HK, Kim JS, Kim NY, Kim MJ, Park SU and Yu CY. 2003. Antioxidant, Antimutagenicity and Anticancer Activities of extract from *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* KITAMURA. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* 11, 53-61.
- Lee JY, Wang LF, Baik JH, Park SK. 2007. Changes in volatile compounds of green tea during growing season at different culture areas. *Korean J Food Sci Technol* 39: 246-254.
- Lee KG, Shibamoto T. 2001. Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds [*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry]. *Food Chem* 74: 443-448.
- Lee SJ, Bang WS, Hong JY, Kwon OJ, Shin SR, Yoon KY. 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of black Doraji (*Platycodon grandiflorum*). *Korean J Food Preserv* 20: 510-517.
- Lee SJ. 1966. Korean Folk Medicine. Seoul National University Press, Seoul, Korea. p 145-146.
- Lee SY, Choi HD, Yu SN, Kim SH, Park SK, Ahn SC. 2015. Biological activities of *Mesembryanthemum crystallinum* (ice plant) extract. *J Life Sci* 25: 638-645.
- Lee TB. 1993. *Illustrated guide to Korean flora*. HyangMoonSa, Seoul, Korea. p 304.
- Lee WC, Kim AJ, Kim SY. 2003. The study on the functional materials and effects of mulberry leaf. *Food Sci* 36: 2-14.
- Lee WC, Ku HO, Lee HS, Lee KR. 1999. Hypoglycemic effect of mulberry leaves with anaerobic treatment in alloxan induced diabetic mice. *Korean J Pharmacogn* 30: 123-129.
- Lee, H. A., Kim, B. K. and Hyun, J. W. 2004. Free amino acids and their derivatives of *Ganoderma lucidum*. *Environ. Muta. Carcino.*24,67-72.
- Lee, H. J., Do, J. R., Jung, S. K. and Kim, H. K. 2014. Physiological properties of *Sarcodon aspratus* extracts by ethanol concentration. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*43,656-660.
- Lee, J. K., Song, J. H. and Lee, J. S. 2010. Purification of anti-obesity lipase inhibitor from the fruiting body of *Phellinus linteus*. *Kor. J. Mycol.*38,57-61.
- Lee, J.H., Lee, B.W., Kim, B., Kim, H.T., Ko, J.M., Baek, I.Y., Seo, W.T., Kang, Y.M., and Cho, K.M. 2013. Changes in phenolic compounds (isoflavones and phenolic acids) and antioxidant properties in high-protein soybean (*Glycine max* L., cv. Saedanbaek) for different roasting conditions. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 56, 605-612.
- Lee, K. J., Yun, I. J., Kim, H. Y., Park, Y. H., Ham, H. J., Park, Y. H., Joo, J. H., Lim, S. H. and Kim, K. H. 2009. Analysis of general components and vitamin and mineral contents of the mushroom *Agrocybe chaxingu*. *Korean J. Food Preserv.* 16, 549-553.
- Lee, K., Peak, K., Lee, H.Y., Park, J.H., and Lee, Y. 2007. Antiobesity effect of trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid-producing *Lactobacillus plantarum* PL62 on diet-induced obese mice. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1140-1146.
- Lee, M. R., Hou, J. G., Begum, S. Wang, Y. B., Oh, D. S., Wi, A. J., Yoon, B. S. and Sung, C. K. 2014. Anti-obesity effects of *Sprassis crispæon* high-fat diet-induced obese mice. *J.*

*Life Sci.* 24, 952–958.

- Lee, MY, Im SH, Ju YS, Han KS, Jeong GJ, An DG, Kang HC, Ko BS (2000) Discrimination of the three *Angelica* species using the RAPDs and internal root structure. *Kor J Med Crop Sci* 8:243–249
- Lee, S. H., Kim, N. W. and Shin, S. R. 2003. Studies on the nutritional components of mushroom (*Sarcodon aspratus*). *Korean J. Food Preserv.*10,65–69.
- Lee, S. J., Park, H. J., Song, Y. O., Jang, S. H., Goo, A. J., Ko, Y. G. and Cho, J. H. 2014. Antioxidant activity and anti-obesity effect of *Coprinus comatus* in Zucker rat (*fa/fa*). *Korean J. Vet. Serv.*37,51–58.
- Lee, S. K., Yoo, Y. J. and Kim, C. S. 1989. Studies on the chemical components on *Ganoderma lucidum*. *Korean J. Food Sci. Technol.*21,890–894.
- Lee, S. Y., Kim, J. H., Park, J. M., Lee, I. C. and Lee, J. Y. 2014. Antioxidant activity and inhibition activity against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase of *Smilax China*L. *Korean J. Food Preserv.*21,254–263.
- Lee, S.G., Lee, K.W., Park, T.H., Park, J.Y., Han, N.S., and Kim, J.H. 2012. Proteomic analysis of proteins increased or reduced by ethanol of *Lactobacillus plantarum* ST4 isolated from makgeolli, traditional Korean rice wine. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 516–525.
- Li, H., Liu, Y., Bao, Y., Liu, X., and Zhang, H. 2012. Conjugated linoleic acid conversion by six *Lactobacillus plantarum* strains cultured in MRS broth supplemented with sunflower oil and soymilk. *J. Food Sci.* 77, 330–336.
- Li, J., Zhang, L., Han, X., Yi, H., Guo, C., Zhang, Y., Du, M., Luo, X., Zhang, Y., and Shan, Y. 2013. Effect of incubation conditions and possible intestinal nutrients on cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid production by *Lactobacillus acidophilus* F0221. *Int. Dairy J.* 29, 93–98.
- Liang Z, Chen H, Yu Z, Zhao Z. 2010. Comparison of raw and processed *Radix Polygoni Multiflori* (*Heshouwu*) by high performance liquid chromatography and mass spectrometry. *Chin Med* 5: 29.
- Liang Z, Leung NN, Chen H, Zhao Z (2012) Quality evaluation of various commercial specifications of *Polygoni multiflori* radix and its dregs by determination of active compounds. *Chem Cent J* 6:53
- Lim DG. 2004. Oxidative stress: reactive oxygen species and nitric oxide. *Korean J Crit Care Med* 19: 81–85.
- Little S (1994) Amplification refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. In: Current protocols in human molecular genetics. (Eds. Nicholas C Dracopoli et al.) John Wiley & Sons, Inc. New York, pp9.8.1–9.8.12
- Liu J, Huang S, Sun M, Liu S, Liu Y, Wang W, Zhang X, Wang H, Hua W (2012) An improved allele-specific PCR primer design method for SNP marker analysis and its application. *Plant Method* 8:34
- Liu QL, Xiao JH, Ma R, Ban Y, Wang JL. 2007. Effect of

- 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-beta-D-glucoside on lipoprotein oxidation and proliferation of coronary arterial smooth cells. *J Asian Nat Prod Res* 9: 689-697.
- Liu, P., Shen, S.R., Ruan, H., Zhou, Q., Ma, L.L., and He, G.Q. 2011. Production of conjugated linoleic acids by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from naturally fermented chinese pickles. *J. Zhejiang University Sci. B.* 12, 923-930.
- Lovatt A (2002) Applications of quantitative PCR in the biosafety and genetic stability assessment of biotechnology products. *J Biotechnol* 82:279-300
- Lumpkin, G. T. and Dess, G. G., 1996, "Clarifying the Entrepreneurial Orientation Construct and Linking its Performance," *Academy of Management Review*, Vol. 2, No. 1, : 135-172.
- Lv LS, Gu XH, Tang J, Ho CT, Tang J. 2006. Stilbene glycosides from the roots of *Polygonum multiflorum* Thunb and their *in vitro* antioxidant activities. *J Food Lipids* 13: 131-144.
- Lv LS, Gu XH, Tang J, Ho CT. 2007. Antioxidant activity of stilbene glycoside from *Polygonum multiflorum* Thunb *in vivo*. *Food Chem* 104: 1678-1681.
- Mackay JF, Wright CD, Bonfiglioli RG (2008) A new approach to varietal identification in plants by microsatellite high resolution melting analysis: application to the verification of grapevine and olive cultivars. *Plant Method* 4:8
- Matough FA, Budin SB, Hamid ZA, Alwahaibi N, Mohamed J. 2012. The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications. *Sultan Qaboos Univ Med J* 12: 5-18.
- McCauley DE (1995) The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of gene flow in plants. *Trends Ecol Evol* 10:198-202
- McNeel RL, Mersmann HJ. 2003. Effects of isomers of conjugated linoleic acid on porcine adipocyte growth and differentiation, *J Nutr Biochem* 14: 266-274.
- Miquel J, Quintaniha AT, Weber H. 1989. *Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. p 223-244.
- Mizukami H (1995) Amplification and sequence of a 5s-rRNA gene spacer region from the crude drug "angelica root". *Biol Pharm Bull* 18:1299-1301
- Mok JY, Kang HJ, Cho JK, Jeon IH, Kim HS, Park JM, Jeong SI, Shim JS and Jang SI. 2011. Antioxidative and anti-inflammatory effects of extracts from different organs of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense*. *Kor. J. Herbology* 26, 39-47.
- Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol* 26: 211-219.
- Moon BC, Choo BK, Cheon MS, Yoon T, Ji Y, Kim BB, Lee AY, Kim HK (2010) Rapid molecular authentication of three medicinal plant species, *Cynanchum wilfordii*, *Cynanchum auriculatum*, and *Polygonum multiflorum* (*Fallopia multiflorum*), by the development of RAPD-derived SCAR markers and multiplex-PCR. *Plant Biotechnol Rep* 4:1-7
- Morris, M. H., & Paul, G. W., 1987, "The Relationship Between Entrepreneurship and Marketing in Established Firms" *Journal of Business Venturing*, Vol2(3): 247-259.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to

- proliferation and cytotoxic assay. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Muleo R, Colao MC, Miano D, Cirilli M, Intrieri MC, Baldoni L, Rugini E (2009) Mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis in olive germplasm. *Genome* 52:252–260
- Murakami T., Kim, T. and Nakamura, H. 1998. Invited. Hepatitis, cirrhosis, and hepatoma. *J. Magn. Reson. Imaging* 8, 346–358.
- Nam SH, Jang HW, Shibamoto T. 2012. Antioxidant activities of extracts from teas prepared from medicinal plants, *Morus alba* L., *Camellia sinensis* L., and *Cudrania tricuspidata*, and their volatile components. *J Agric Food Chem* 60: 9097–9105.
- Narayan VS, Nair PM. 1990. Metabolism, enzymology, and possible roles of 4-aminobutyrate in higher plants. *Phytochemistry* 39: 367–375.
- Newton CR, Graham A and Heptinstall LE (1989) Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucl Acids Res* 17:2503–2516
- Newton CR, Graham A, Heptinstall LE (1989) Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucl Acids Res* 17:2503–2516
- Noh SH, Kim SH, Lee Kh, Ahn DK, Lee YJ, Kang BS, Ko WC, Song HJ, Joo YS. 1991. Medicinal plants. *Young Lim Publishing Co*, Seoul, Korea. p 125–128.
- Oboh G, Akindahunsi AA. 2004. Change in the ascorbic acid, total phenol and antioxidant activity of sun-dried commonly consumed green leafy vegetables in Nigeria, *Nutr Health* 18: 29–36.
- Ogawa, J., Matsumura, K., Kishino, S., Omura, Y., and Shimizu, S. 2001. Conjugated linoleic acid accumulation via 10-hydroxy-12-octadecaenoic acid during microaerobic transformation of linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1246–1252.
- Oh HI, Lee HJ, Moon TW, Noh BS, Kim SJ. 2011. *Food Chemistry*. Soohaksa, Seoul, Korea.
- Oh S, Hong SS, Kim YH, Koh SC. 2008. Screening of biological activities in fern plants native to Jeju Island. *Koeran J Plant Res* 21: 12–18.
- Oh, S. I. and Lee, M. S. 2005. Antioxidant and antimutagenic effects of *Ganoderma lucidum* extracts. *Korean J. Food & Nutr.* 18, 54–62.
- Old JM (1996) Haemoglobinopathies. Community clues to mutation detection, in *Methods in Molecular Medicine, Molecular diagnosis of Genetic diseases* (Elles, R ed), Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 169–183
- Omaye ST, Reddy KA, Cross CE. 1997. Effect of butylated hydroxytoluene and other antioxidants on mouse lung metabolism. *J Toxicol Environ Health* 3: 829–836.
- Omri MT, Tano J, Okamoto T, Tshajida T, Higuchi MM. 1987. Effect of anaerobically treated tea (Gabaron tea) on blood pressure of spontaneously hypertensive rat. *Nippon Nigeikagaku Kaishi* 61: 1449–1451.
- Osathanunkul M, Suwannapoom C, Osathanunkul K, Madesis P, de Boer H (2016) Evaluation of DNA barcoding coupled high resolution melting for discrimination of closely related species in phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*. doi:10.1016/j.phymed. 2015.11.018

- Pak Y, Paule CR, Bao YD, Huang LC, Larner J. 1993. Insulin stimulates the biosynthesis of *chi-ro*-inositol-containing phospholipids in a rat fibroblast line expressing the human insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci* 90: 7759-7763.
- Park EJ, Ahn JJ, Kwon JH. 2013. Effect of reflux conditions on extraction properties and antioxidant activity of freeze dried-*Schisandra chinensis*. *Korean J Food Sci Technol* 45: 550-556.
- Park HJ, Zhang N, Park DK. 2011. Topical application of *Polygonum multiflorum* extract induces hair growth of resting hair follicles through upregulating Shh and  $\beta$ -catenin expression in C57BL/6 mice. *J Ethnopharmacol* 135: 369-375.
- Park JC, Her JM, Park JG, Kim SC, Park JR, Choi SH and Choi JW. 2004. Effects of methanol extract of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* and its principle, hispidulin-7-O-neohesperidoside on hepatic alcohol-metabolizing enzymes and lipid peroxidation in ethanol-treated rats. *Phytother. Res.* 18, 19-24.
- Park JJ, Lee J, Hwang JT, Park IJ, Shin JI, Lee YK, Lee SK, Bail HW, Ha JH, Park OJ. 2005. Genistein, EGCG, and capsaicin inhibit adipocyte differentiation process via activating AMP-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 694-699.
- Park MJ, Kim MK, In JG, Yang DC (2006) Molecular identification of Korean ginseng by amplification refractory mutation system-PCR. *Food Res Int* 39:568-574
- Park SI, Kim S, Gil J, Lee Y, Kim HB, Lee JH, Kim SC, Jung CS, Um Y (2016) Development of chloroplast DNA-based simple sequence repeat markers for *Angelica* species differentiation. *J Med Crop Sci* 317-322
- Park SJ, Lee IS, Lee SP, Yu MH. 2013. Inhibition of adipocyte differentiation and adipogenesis by supercritical fluid extracts and marc from *Cinnamomum verum*. *J Life Sci* 23: 510-517.
- Park, J. H., Baek, M. R., Lee, B. H., Yon, G. H., Ryu, S. Y., Kim, Y. S., Park, S. U. and Hong, K. S. 2009.  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of compounds from roots extract of *Pueraria thunbergiana*. *Korean J. Medicinal Crop Sci.*17,357-362.
- Park, J. S. 2013. Effect on the inhibition of pancreatic lipase and lipid metabolism of *Zanthoxylum piperitum* extracts. *Korean J. Food & Nutr.*26,615-619.
- Park, J.G., Song, W.H., Hong, S.M., and Kim, C.H. 2008. Production of conjugated linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus* isolated from breast-fed infants. *Korean J. Food Sci. An.* 28, 580-586.
- Park, Y. J., Nam, J. Y., Yoon, D. E., Kwon, O. C., Kim, H. I., Yoo, Y. B., Kong, W. S. and Lee, C. S. 2013. Comparison of anti-inflammatory, antioxidant and anti-allergic effects of *Ganoderma* species mycelial extracts. *J. Mushroom Sci. Prod.*11,111-115.
- Partanen, G., Emmanuelle, V., Catherine, C.V., and Olivier, D. 2007. Dietary antioxidants as inhibitors of the heme induced peroxidation of linoleic acid: mechanism of action and synergism. *Free Radic. Biol. Med.* 43, 933-946.
- Porras, J. I. and Robertson, P. J., 1987, "Organizational Development Theory: A Typology and Evaluation, in Richard W. Woodman and William A. Pasmore (eds.)", Research in

- Organizational Change and Development, JAI Press, 1-57.
- Porter, M. E. & Kramer, M. R., 2011, "The Big Idea: Creating Shared Value", Harvard Business Review, Winter 2011, Boston, MA.
- Porter, M. E., 1985, "Competitive Advantage : Creating and Sustaining Superior Performance" , Free Press.
- Pyke KA (1999) Plastid division and development. *Plant Cell* 11:549-556
- Qiao, Y., Sun, J., Xia, S., Li, L., Li, Y., Wang, P., Shi, Y. H., & Le, G. 2015. Effects of different *Lactobacillus reuteri* inflammatory and fat storage in high-fat diet-induced obesity mice model. *Journal of Functional Foods*, 14, 424-434.
- Radjabian T et al. 2008. Analytical of silymarin components in the seed extracts of some milk thistle ecotypes from Iran by HPLC. *Iran. J. Sci. Technol., Trans. A: Sci.* 32, 141-146.
- Raychowdhury, M.K., Goswami, R., and Charkabarti, P. 1985. Effect of unsaturated fatty acids in growth inhibition of some penicillin- resistant and sensitive bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 59, 183-188.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pananla A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biology and Medicine* 26: 1231-1237.
- Reboud X, Zeyl C (1994) Organelle inheritance in plants. *Heredity* 72:132-140
- Rocha, H. O., 2004, "Entrepreneurship and Development: The Role of Clusters" , *Small Business Economics* 23 : 363-400.
- Ryu, H. J., Um, M. Y., Ahn, J. Y., Jung, C. H., Huh, D. Kim, T. W. and Ha, T. Y. 2011. Anti-obesity effect of *Hypsizygus marmoreus* in high fat-fed mice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 40, 1708-1714.
- Sargent JM, Taylor CG. 1989. Appraisal of the MTT assay as a rapid test of chemosensitivity in acute myeloid leukaemia. *British J Cancer* 60: 206-210.
- Schultz TH, Flath RA, Mon TR, Egging SB, Teranishi R. 1977. Isolation of volatile components from a model system. *J Agric Food Chem* 25: 446-449.
- Schumpeter, J. A., 1934, "The theory of economic development" , Cambridge, MA, Harvard University Press.
- Schweizer TF, Horman J, Wurch P. 1978. Low molecular weight carbohydrates from leguminous seeds; a new disaccharide: Galactopinitol. *J Sci Food Agric* 29: 148-154.
- Seo JC, Han SW, Choi HY, Choi YJ, Leem KH (2004) Identification of *Angelica* species by pyrosequencing. *Kor J Ori Med* 25:147-151
- Seo, Y. C., No, R. H., Kwon, H. S. and Lee, H. Y. 2013. Enhancement of the cosmeceutical activity by nano-encapsulation of thiamine di-lauryl sulfate (TDS) with antimicrobial efficacy. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea.* 39, 205-213.
- Serafeimidou, A., Zlatanov, S., Kritikos, G., and Tourianis, A. 2013. Change of fatty acid profile, including conjugated linoleic acid (CLA) content, during refrigerated storage of yogurt made of cow and sheep milk. *J. Food Compos. Anal.* 31, 24-30.
- Serafeimidou, A., Zlatanov, S., Laskaridis, K., and Sagredos A. 2012. Chemical characteristics,



- fatty acid composition and conjugated linoleic acid (CLA) content of traditional Greek yogurts. *Food Chem.* 134, 1839–1846.
- Shao L, Zhao SJ, Cui TB, Liu ZY, Zhao W. 2012. 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D-glycoside biosynthesis by suspension cells cultures of *Polygonum multiflorum* Thunb and production enhancement by methyl jasmonate and salicylic acid. *Molecules* 17: 2240–2247.
- Shi, M. Zhang, Z. and Yang, Y. 2013. Antioxidant and immunoregulatory activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharide (GLP). *Carbohydr. polym.* 95, 200–206.
- Shin, E. C., Hwang, C. E., Lee, B. W., Kim, H. T, Ko, J. M., Baek, I. Y., Lee, Y. B., Choi, J. S., Seo, W. T. and Cho, K. M. 2012. Chemometric approach to fatty acid profiles in soybean cultivars by principal component analysis (PCA). *Prev. Nutr. Food Sci.* 17, 184–191.
- Sin, S. M., Mok, S. Y., Lee, S. H., Cho, K. M., Cho, E. J. and Kim, H. Y. 2011. Protective effect of Bitter Melon (*Momordica charantia*) against oxidative stress. *Cancer Prev. Res.* 16, 86–92.
- Skottova N. and V, Krecman. 1998. Silymarin as a potential hypocholesterolaemic drug. *Physiol. Res.* 47, 1–8.
- Sohn DH, Kim YC, Oh SH, Park EJ, Li X. and Lee, B. H. 2003. Hepatoprotective and free radical scavenging effects of *Nelumbo nucifera*. *Phytomedicine* 10, 165–169.
- Son HU, Heo JC, Seo MS, Lee SH. 2010. Effects of *Perilla frutescens* L. on antioxidant and antiinflammation activity. *Korean J Food Preserv* 17: 757–761.
- Song KS, Shin CG, Ju YS (2004) External and internal morphological standard of original plants and herbal states in *Polygoni multiflori* and *Cynanchi wilfordii radix*. *Kor J Herbol* 19:55–66
- Stevenson, H. H., and J. C. Jarillo –Mossi, 1990, “A Paradigm of Entrepreneurship: Entrepreneurial Management” , *Strategic Management Journal* 11 (summer 1990).
- Takasaki M, Konoshima T, Tokuda H, Masuda K, Arai Y, Shiojima K, Ageta H. 1989. Anti-carcinogenic activity of *Taraxacum* plant. II. *Biol Pharm Bull* 22: 606–610.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729
- Tibbot BK, Skadsen RW. 1996. Molecular cloning and characterization of a gibberellin-inducible, putative alpha-glucosidase gene from barley. *Plant Mol Biol* 30: 229–241.
- Timmons, J. A., 1994, “New Venture Creation : Entrepreneurship for the 21st Century” , Fourth edition, Mc-Graw-Hill, Boston.
- Tsujimoto T, Shioyama E, Moriya K, Kawaratani H, Shirai Y, Toyohara M, Mitoro A, Yamao J, Fujii H, Fukui H. 2008. Pneumatosis cystoides intestinalis following alpha-glucosidase inhibitor treatment: a case report and review of the literature. *World J Gastroenterol* 14: 6087–6092.
- Wang H, Zou H, Ni J, Kong L, Gao S, Guo B. 2000. Fractionation and analysis of *Artemisia capillaris* Thunb. by affinity chromatography with human serum albumin as stationary

- phase. *Journal of Chromatography A* 870: 501-510.
- Wang W, Cao CY, Wang DQ, Zhao DZ. 2006. Effect of prepared *Polygonum multiflorum* on striatum extracellular acetylcholine and choline in rats of intracerebral perfusion with sodium azide. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 31: 751-753.
- Wang X, Liu Y, Wang L, Han J, Chen S (2016) A nucleotide signature for the identification of *Angelicae Sinensis* Radix (Danggui) and its products. *Sci. Rep.* 6, 34940; doi: 10.1038/srep34940 (2016).
- Wang X, Zhao L, Han T, Chen S, Wang J. 2008. Protective effects of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-beta-D-glucoside, an active component of *Polygonum multiflorum* Thunb, on experimental colitis in mice. *Eur J Pharmacol* 578: 339-348.
- Wang, M. F., Li, J. G., Rangarajan, M. R., Yu Shao, J., LaVoie, E. M., Hung, T. C. and Ho, C. T. 1998. Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *J. Agric. Food Chem.*46,4869-4873.
- Wangkumhang P, Chaichoompu K, Ngamphiw C, Ruangrit U, Chanprasert J, Assawamakin A, Tongsimma S: WASP: a Web-based Allele-Specific PCR assay designing tool for detecting SNPs and mutations. *BMC Genomics*, 2007, 8:275.
- Wen KC, Huang CY, Lu FL. 1993. Determination of baicalin and puerarin in traditional Chinese medicinal preparations by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 631: 241-250.
- Xu ML, Wang L, Xu GF, Wang MH. 2011. Antidiabetes and angiotensin converting enzyme inhibitory activity of *Sonchus asper* (L) hill extract. *Kor J Pharmacogn* 42: 61- 67.
- Yang JY, Jang SY, Kim HK, Park SJ (2012) Development of a molecular marker to discriminate Korean Rubus species medicinal plants based on the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer and chloroplast trnL-F intergenic region sequences. *J Kor Soc Appl Biol Chem* 55:281-289
- Yang, B. K., Kim, D. H. and Song, C. H. 2002. Production of *Lentinus edodes* mycelia in submerged culture and its hypoglycemic effect in diabetic rats. *Kor. J. Mycol.*30,131-135.
- Yim TK, Wu WK, Mak DH, Ko KM. 1998. Myocardial protective effect of an anthraquinone-containing extract of *Polygonum multiflorum ex vivo*. *Planta Med* 64: 607-611.
- Yin, H. H., Cho, B. O., Fang, C. Z., Shim, J. S. and Jang, S. I. 2015. Anti-obesity effects of water extracts from different organs of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense*. *J. Physiol. Pathol. Kor. Med.* 29, 322-329.
- Yoon, D. E., Park, Y. J., Kwon, O. C., Nam, J. Y., Kim, H. I., Yoo, Y. B., Kong, W. S. and Lee, C. S. 2013. Study on HPLC conditions for chemotaxonomy of *Ganoderma* species. *J. Mushroom Sci. Prod.*11,107-110.
- Yoshizawa S, Horiuchi T, Fujiki H, Yoshida T, Okuda T, Sugimura T. 1987. Antitumor promoting activity of (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of tannin in green tea. *Phytotherapy Res* 1: 44-47.

- Yu et al., 2004, Kor. J. of Med. Crop Sci. 12:43-46,
- Bang et al., 2002, Kor. J. of Med. Crop Sci. 10:46-50,
- Yuan QJ, Zhang B, Jiang D, Zhang WJ, Lin TY, Wang NH, Chiou SJ, Huang LQ (2014) Identification of species and materia medica within *Angelica* L. (*Umbelliferae*) based on phylogeny inferred from DNA barcodes. Mol Ecol Resour 15:358-371
- Zhao KJ, Dong TT, Tu PF, Song ZH, Lo CK, Tsim KW (2003) Molecular genetic and chemical assessment of radix *Angelica* (Danggui) in China. J Agric Food Chem 51:2576-2583
- Zhu S, Fushimi H, Cai S, Komatsu K (2004) Species identification from ginseng drugs by multiplex amplification refractory mutation system (MARMS). Planta Med 70:189-192
- Zou, Y., Li, J., Lu, C., Wang, J., Ge, J., Huang, Y., Zhang, L., & Wang, Y. 2006, High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Life Sciences*, 79, 1100-1107.
- Zuo Y, Chen Z, Kondo K, Funamoto T, Wen J, Zhou S (2011) DNA barcoding of *Panax* species. Planta Med 77:182-187.

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

			코드번호	D-15	
			과제번호	314021-3	
사업구분	지정공모과제				
연구분야	농촌 사회·문화/식품가공	과제구분		단위	
사업명	농생명산업기술사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	지리산 권역 약용작물의 고부가가치 산업화 제품 및 6차 산업화 연계모델 개발		과제유형	(기초,응용,개발)	
연구기관	경남과학기술대학교 산학협력단		연구책임자	조계만	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2014.07.29.~ 2015.07.28	430,000	170,000	600,000
	2차년도	2015.07.29.~ 2016.07.28	430,000	170,000	600,000
	3차년도	2016.07.29.~ 2017.07.28	430,000	170,000	600,000
	4차년도	-	-	-	-
	5차년도	-	-	-	-
	계	2014.07.29.~ 2017.07.28	1,290,000	510,000	1,800,000
참여기업	몽고식품(주), (주)자연애제약, 경남생약농업협동조합				
상대국	상대국연구기관				

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2017.09.11

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
경남과학기술대학교 산학협력단	부교수	조계만

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	조계만
----	-----

## I. 연구개발실적

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구는 결과 중 과즙 혹은 효소반응과 발효 기술을 이용한 천연조미료 제조기술은 현재의 산분해를 통해 이루어지는 통상의 천연조미료 제조기술에 비해 우수, 활성증진 도라지 제조기술은 원료 대비 향상된 기능성 소재 제조 기술이며, 또한 통상적인 관능평가 수준에서 전자코를 이용한 후각테스트를 통한 관능평가 기술은 다가오는 제4차산업혁명에 중요한 기술로 사용 가능한 우수한 기술이며, 특히 2014년 건기식 원료의 과동(백수오 과동사건)에 따른 원료의 원산지, 혼입 여부 등의 판별이 중요한 화두로 부상함에 따라 본 연구의 백수오와 이엽우피소 판별기술뿐만 아니라 영경귀, 당귀, 도라지, 구찌뿌 등 다양한 약용작물의 기원 혹은 원산지 판별기술은 향후 건기식 원료 개발에 아주 중요하게 사용할 수 있음. 본 연구결과들은 기존의 실험을 바탕으로 다양한 접근법을 통한 새로운 기술을 도출한데 있어 그 창의성이 매우 높은 것으로 판단됨

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구결과의 파급효과로는 한방약초 재료 및 약초 추출물을 이용한 소비자 맞춤형 기능성이 향상된 천연조미 및 음료 생산을 통한 기술우위 선점, 약용식물자원의 기원 판별 기술 확보. 한편 다양한 발효식품으로부터 우수 발효미생물의 지속적인 확보를 통한 국가 생물자원 확보에 기여 및 국내 토종 한방약초로부터 다양한 기능성 대사체 확보에 기여, 한방약초 제품의 향 및 기능성 물질 탐색 기술은 다른 식품 혹은 요리 개발의 기초자료로서 활용, 본 연구결과의 효능평가 시스템을 활용한 식품섭취에 의한 혈당개선, 혈압개선, 간지질 대사 개선에 대한 종합적인 연구가 이루어질 것으로 기대, 산청군 한방 약초의 소비촉진 및 농가 소득증대에 기여 (1차 산업), 약초 생산업, 발효산업 및 약초 가공사업 등의 기능성 식품산업, 포장재 제조업 등의 2차 산업으로 파급, 한방 약초를 이용한 요식산업, 한방약초 축제 등 한방약초축제(3차 산업)과 연계된 부가가치 창출, 농가 및 가공업체의 간접적인 광고효과와 이익 창출 효과(3.5차 산업) 등 산업 전반에 걸친 동반 상승 및 파급 효과가 기대되며, 한방약초 재배부터 가공, 문화·관광산업 연계적인 육성을 통한 6차 산업 육성이 기대와 산청한방향노화포럼을 활용한 4차산업혁명 선제적 대응이 가능할 것으로 기대, 한류로 인한 한방 화장품의 성공으로 한방에 대한 긍정적 이미지 형성, 신비한 고장이라는 지역의 스토리텔링 관광 상품 개발과 약초 한방 상품에 대한 브랜드 선점, 국내 성공을 기반으로 해외로 진출하는 글로벌 브랜드 마케팅에 기여 및 경남은 향노화산업을 미래먹거리 산업으로 육성하고 있으며, 특히 산청군 2016년 한방향노화산업 원년으로 선포하고 한방향노화산업 육성을 위해 행정력을 전적으로 투입하고 있음. 한방향노화산업의 기본 개념은 전략약초 대량생산 체계 구축을 통하여 고부가가치 기능성 스타상품(식품, 화장품 혹은 천연물의약품) 개발을 통해 향노화 웰니스 관광과 연계시키는 것이 기본 틀임

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구결과의 파급효과로 생균제제 유산균은 유효성분이 증가된 콩발효식품 혹은 균주 자체로 다양한 제품개발이 가능한 결과 제시, 단백질 분해효소를 함유한 것으로 알려진 천연물 소재 및 효소를 이용한 액상조미 소재의 제조공정 및 천연 액상조미료의 제조 기술 개발은 향후 제품 출시 경우 액상조미료의 시장 판도를 바꿀 수 있는 기술적 우위점을 제시, 활성증진 도라지 제조기술은 다양한 뿌리약용작물의 활성 증진을 통한 향후 기능성 소재 개발에 기여, 다양한 약용작물 복합추출물 베이스 기능성 음료 제조 기술은 향후 항산화, 항고혈압, 간기능, 항당뇨 음료로 개발할 수 있는 자료를 제시, 약용작물의 영양성분 및 기능성 성분의 표준화 결과는 실험에 사용되는 약용작물을 이용하여 제품개발 과정에서 기초자료로써 이용이 가능한 결과를 제시, 분자유전학적 기반 약용작물 판별기술은 약용작물 기반 건강기능식품 개발 시 소재의 원산지, 혼입 여부 등을 정확하게 판단할 수 있는 기준을 제시, 컨버젠 기반 비즈니스 모델은 다양한 6차산업자 혹은 기업의 비즈니스 모델 개발에 크게 활용, 효능평가와 첨단 기기분석 기술을 이용한 기능성 대사체 분석 기술은 향후 건강기능식품 원료 개발 시 유용하게 사용 및 산청 한방향노화포럼에서 제시한 한방향노화산업 로드맵은 산청군과 유사한 전국 각 군소도시의 특화작물을 이용한 신산업 육성의 로드맵 제시가 가능함

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구는 약용작물 이용 고부가가치 제품 개발과 이를 연계한 산청군의 한방약초산업 6차산업 육성을 목표로 3년간 진행하였음, 본 연구기관 내 연구 성과로 특허출원 17건과 등록 1건 (1건 진행 중), 기술가치평가 1건, 기술인증 1건, SCI급 논문 5편, KSCI급 논문 13편, 학술대회 발표 49건, 교육지도 30건, 인력양성 22명(박사후 1명, 박사 5명, 석사 13명, 학사 3명), 정책활용 1건, 홍보전시 25건, 보고서 4건, 수상 5건, 민간조직 3건 등으로 다양한 성과를 창출하였고, 산청군 기반 6차산업 비즈니스모델을 연구하여 제시하였음. 현재 미흡한 성과인 기술거래 2건은 진행 중이며 제품 출시를 통하여 매출 발생을 위하여 홍보, 판매를 진행하고 있음. 그리고 산청 한방약초산업의 제2의 부흥을 위하여 산청한방향노화포럼을 조직하여 경남 혹은 산청군 미래먹거리 산업으로 향노화산업을 전략산업으로 지정하여 육성하고 있는 중이라 이에 맞게 포럼에서 산청한방향노화산업 로드맵을 제시하여 산청군 한방약초산업의 제2의 부흥을 위한 초석을 마련할 수 있었음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구 수행 중 2016년 국가연구개발 우수성과 100선 추천에 선정되어 추천 대상으로 보고되었고, 총괄책임자는 ‘2014년 국정감사 우수 국회의원 및 대한민국 창조경영 대상’에 선정되었을 뿐만 아니라 백수오·이엽우피소 구별 분자마커 개발 기술로 ‘Molecular Biology Reports(43호)’에 게재된 SCI 논문은 다양한 언론매체에 홍보되었으며, 농가실증시험에 활용하였음. 이외에도 산청한방항노화포럼을 통해 항노화산업 법제화를 위해 국회세미나실(전 신성범 국회의원 주최)에 토론회를 개최하였고, 이외에도 사업 중 심포지엄, 워크숍 및 교육을 통해 경남 항노화산업 연계 6산업에 대한 기본 틀을 제공하였음. 또한 본 연구 사업을 바탕으로 산청 한방항노화산업 육성 로드맵에서 약용작물 6차산업을 근거한 한방항노화산업 방향을 제시하였음

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
약용작물/약용버섯 활용 천연소스/조미 제품화 기술 개발	15	100	천연소스/조미료 제조 발효미생물 확보를 통한 제조공정 등 특허출원 및 시제품화, 상품 출시(몽고불고기소스)와 도라지 베이스 제품화(십전대보환)
약용작물 활용 기능성 음료/드링크 제품화 기술 개발	15	100	약용복합추출물을 이용 기능성(항산화, 항고혈압, 간기능, 항당뇨) 음료 레시피 확립과 특허출원 완료
약용작물 활용 제품의 영양특수성분 표준화 및 관능평가	10	100	약용작물의 영양특수성분 분석과 향기성분과 후각테스트 진행을 통한 관능평가 완료
약용작물의 유전자원 수집, 판별, 보존 및 보급 체계 구축	15	100	백수오, 이엽우피소 등의 유전자원 수집과 판별 마커 개발을 통한 SCI 논문 발표를 통한 농가적용시험 완료와 기내배양을 통한 약초 보존과 보급 체계 완료
산청군 한방약초를 기반으로 하는 6차 산업 비즈니스 모델 제시	10	100	산청군 한방약초의 생태계 기반 6차산업 비즈니스 모델 개발과 참여기업 컨설팅 진행 완료
약용작물/약용버섯의 비만/고지혈증/당뇨 개선효과	10	100	약용작물 복합추출물, 적하수오, 영지버섯의 대사질환 개선 효능평가
약용작물 기반 기능성 대사체 대량추출 및 표준화	10	100	지리산권 대표 약용작물의 지표물질 표준화, 기능성대사체 분석 및 대량추출 체계 확립과 생산 시스템 구축
산청군 한방약초 6차산업 육성을 위한 산·학·연·관 네트워크 구축	15	100	산청군 한방약초 6차산업 육성을 위한 심포지엄, 워크숍, 교육 등을 실시하였으며 특히 산청군 한방약초산업 제2의 부흥을 산청한방항노화포럼을 조직하고, 항노화법제화 등의 정책제안과 산청한방항노화산업 로드맵 제시
합계	100점		

### III. 종합의견

#### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구에서 지리산 권역 약용작물이 고부가가치 제품 개발을 위하여 제조공정과 레시피 확립을 통하여 특허출원과 사업 중 천연소스 상품화, 약용작물(도라지)을 이용한 제품화를 진행하였으며, 후각테스법을 활용한 향기성분(냄새) 연계 관능평가 기술을 제4차산업혁명 대응 농식품산업에 중요한 역할을 할 것으로 판단, 약용작물의 안전성과 전임상 효능평가를 완료하여 향후 기능성 원료 개발에 대한 기초자료를 확보하였음. 또한 2014년 건강기능식품의 원료 파동인 백수오 파동사건에 계기로 원료에 대한 판별 기술 중요성이 제시됨에 따라 본 연구팀에서 분자유전학적 기반 백수오와 이엽우피소 판별 기술에 대한 SCI 논문을 발표하고 이를 통한 언론 홍보를 실시와 농가실증시험을 진행하였고, 이를 계기로 다양한 약용작물의 기원, 판별 기술을 확립하였고, 산청군 6차산업 비즈니스 모델 제시와 참여기업의 생산성 향상과 신규 사업 개척을 위한 컨설팅을 진행하였음. 또한 산청군과 산청한방향노화포럼을 조직하여 항노화법제화 등의 정책제안과 산청한방향노화산업 로드맵 제시

#### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

본 연구는 약용작물 이용 고부가가치 제품 개발과 이를 연계한 산청군의 한방약초산업 6차 산업 육성이 목표에 초점을 맞추어 평가 시 고려해주시고, 연구성과로 특허출원 17건과 등록 1건 (1건 진행 중), 기술가치평가 1건, 기술인증 1건, SCI급 논문 5편, KSCI급 논문 13편, 학술대회 발표 49건, 교육지도 30건, 인력양성 22명(박사후 1명, 박사 5명, 석사 13명, 학사 3명), 정책활용 1건, 홍보전시 25건, 보고서 3건, 수상 5건, 민간조직 3건 등으로 다양한 성과를 창출하였고, 현재 미흡한 성과인 기술거래 2건은 진행 중이며 제품 출시를 통하여 매출 발생을 위하여 홍보, 판매를 진행하고 있음. 그리고 산청 한방약초산업의 제2의 부흥을 위하여 산청 한방향노화포럼을 조직하여 경남 혹은 산청군 미래먹거리 산업으로 항노화산업을 전략산업으로 지정하여 육성하고 있는 중이라 이에 맞게 포럼에서 산청한방향노화산업 로드맵을 제시하였으므로 이를 고려하여 평가 해주시길 바람



### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 연구의 결과에서 ① 과즙 혹은 효소반응 기술 기반 약초 함유 자연조미료 상품화를 통한 4세대 자연조미료의 국내 시장 확장과 수출 판로 개척에 활용, ② 복합 생균제 유산균 발효 기반 항비만과 항당뇨 콩 조성물의 상품화뿐만 아니라 복합 생균제 유산균 제품으로 활용이 가능, ③ 생물공정(발효, 숙성 혹은 발효-숙성 혼합)을 통한 유효성분과 생리활성물질 증진 도라지를 이용 기능성음료뿐만 아니라 건기식 상품화와 타 뿌리작물에 적용하여 다양한 기능성소재 개발 가능, ④ 약용복합추출물 기반 대사질환(간기능, 고혈압, 혈당) 개선 기능성 음료 상품화와 향후 건기식 기능성 소재 개발에 활용 가능, ⑤ 후각테스트를 통한 향기성분 연계 관능평가 기술은 다가오는 제4차산업혁명에 중요한 기술에 아주 중요하게 활용, ⑥ 백수오와 이엽우피소 판별 분자바이오마커 기술은 식품의 원료 혼입 여부 판단에 중요하게 사용될 수 있고, 실제 농가 생산단계 부터 관리가 가능하여 식품원료에 대한 소비자인식을 제고가 가능, ⑦ 적하수오 추출물의 대사질환(지방간, 혈당) 개선 효과를 바탕으로 음료, 환 등의 식품개발이 가능하고 향후 건기식 상품화와 다양한 기능성소재 개발 가능 및 ⑧ 산청 한방항노화산업 육성 로드맵을 통해 산청관내 한방항노화 기업 육성과 이를 통한 관광-체험 연결을 통한 제2의 산청 한방 약초산업 부흥에 활용할 것임. 특히, 몇 가지 기술에 대해서는 기술이전을 협의 중에 있어 조속히 기술이전을 마무리하여 상품화 될 수 있도록 할 것임

## IV. 보안성 검토

지정공모과제로서 보완과제에 해당되지 않으며, 일부 제품화를 위한 제품공정은 보완

### 1. 연구책임자의 의견

지정공모과제로 특별한 보장은 없으나, 기업에 최종 제품개발에 필요한 제조비율과 공정 등은 보완요청으로 보고서에 기지하지 않음

### 2. 연구기관 자체의 검토결과

연구책임자 의견과 동일함

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.