

11-15430
00-00263
3-01

기능성
농산물
생산을
위한
제제개발
최종보고서

2019

농림축산식품부

Development of pharmaceuticals for the
production of functional agricultural products

보안과제(), 일반과제(○) / 공개(○), 비공개()

생명자원 생산·관리기술사업 제1차년도 보고서

발간등록번호

11-1543000-002633-01

기능성 농산물 생산을 위한
제제개발
최종보고서

2019 . 03 . 29 .

주관연구기관 / (주)퓨톤

농림축산식품부

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “기능성 농산물 생산을 위한 제제개발”(개발기간 : 2018.01.01. ~ 2018.12.31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019 . 02 . 10 .

주관연구기관명 :	(주)퓨톤	(김세은)	(인)
협동연구기관명 :		(대표자)	(인)
참여기관명 :		(대표자)	(인)



주관연구책임자 : 김형국
협동연구책임자 :
참여기관책임자 :

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	117119-1	해 당 단 계 연 구 기 간	2018.01.01.~ 2018.12.31	단 계 구 분	1단계/ 1단계
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	생산자원 생산 · 관리기술사업			
연구과제명	대 과 제 명	기능성 농산물 생산을 위한 제제개발			
	세부 과제명				
연구책임자	김형국	해당단계 참여연구원 수	총: 2 명 내부: 2 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 49,175천원 민간: 1,667 천원 계: 50,842천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 2 명 내부: 2 명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 49,175천원 민간: 1,667 천원 계: 50,847천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)퓨톤			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호		10-201 8-0167 588									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약

- 호두청피 추출물 침투용이 제형 최적화
- 호두청피 추출물 농도 최적화
- 기능성 성분의 유효물질 전이 확인
- 기능성 성분 및 알레로파시 증진 효과 구명
- 현장실험을 통한 생산성 검증

보고서 면수
P. 43

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 산림자원 부산물 (호두청피 부산물)로부터 기능성 농산물 제제 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 농도 및 흡수용이한 제제 개발 - 기능성 성분의 유효물질 전이 확인 - 전이방법 연구 및 확정 ○ 현장농가 적용실험 <ul style="list-style-type: none"> - 현장실험을 통한 생산성 검증 - 작물 생육시기 및 생산량 등 상품성 평가 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 호두청피 부산물 수집 <ul style="list-style-type: none"> - 탈곡 후 버려지는 호두청피 부산물 수집 ○ 호두청피 부산물의 가공 <ul style="list-style-type: none"> - 기능성 토마토 재배 제제를 위한 원재료 가공 ○ 성분별 추출 조건 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 시간별, 온도별 등 추출조건 확립 - 호두청피 추출물 성분분석을 통한 차별화 검증 및 최적화 ○ 기능성 토마토 재배 <ul style="list-style-type: none"> - 현장농가 적용실험 ○ 지적재산권 출원 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기술적 측면 <ul style="list-style-type: none"> - 초음파 추출방법의 일반화를 통한 제품의 다양화 - 초음파 추출방법을 통해 과잉생산, 낙과 등으로 인해 버려지는 농산물로의 확대적용 - 천연물 추출물 생산과정 확립을 통한 농산물시장의 확대 - 농가의 소득창출을 위한 생산, 보관, 상품화 활용법 제시 ○ 경제적·산업적 측면 <ul style="list-style-type: none"> - 버려지는 호두청피를 활용하여 고부가가치의 농가소득원으로 창출 - 호두청피 추출물을 이용해 키운 저렴한 작물을 통해 소비자들에게 질 좋은 상품 제공 - 호두청피 추출물로 키운 작물을 통해 농산물시장과 농가소득의 증대 - 기능성 농산물은 고품질 상품이라는 역할에서 한 부분을 담당할 수 있을 것으로 기대 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>기능성</p>	<p>농산물</p>	<p>알레로 파시</p>	<p>호두청피 추출물</p>	<p>생장</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Functionality</p>	<p>Agricultural produce</p>	<p>allelopathy</p>	<p>Walnut Shell Extract</p>	<p>Growth</p>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	1
2. 연구수행 내용 및 결과	3
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	31
4. 연구결과의 활용 계획 등	31
붙임. 참고 문헌	32

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

- 가. 호두청피 추출물을 이용한 lycopene 증가 토마토 생산
- 나. 호두청피 추출물을 이용한 기능성증강제 개발
- 다. Lycopene 증가 토마토 생산성 검증

1-2. 연구개발의 필요성

○ 산림자원 부산물(호두 부산물)로부터 기능성 농산물 제제 개발의 필요성

1) 산림자원의 특징 및 부산물 활용 연구의 필요성

- 산림자원의 2차 대사산물은 생리대사 촉진과 외부 환경으로 부터 자신을 보호하는 기능을 하며, 이들은 생물 고유의 색상이나 냄새 등을 가지게 하는 물질로서 대표적으로 플라보노이드, 카로티노이드, 알칼로이드, 테르펜 계열 물질 등이 이에 속한다.
- 산림자원으로부터 생성되는 살균성 자가 보호물이 산림자원 각종 세균이나 미생물, 중금속 및 해충으로부터 스스로를 보호하기 위해 발생시키는 방향성 물질로써 Terpene 계열의 유기화합물이 주를 이룬다.
- 우리나라에 한해 버려지는 산림자원의 부산물은 약 626만 톤으로, 그 중 목재부산물은 160만 톤에 달하며, 목재자원 자급률은 15%에 머물고 있고, 업계에선 폐목재를 수거해 재활용하면 연간 600억 원의 수입 대체 효과를 거둘 수 있다고 전망하고 있다.

○ FTA를 비롯한 각종 무역협정 체결로 인한 농산물 위기

- 2004년 칠레 FTA를 체결한 이후 유럽자유무역연합(EFTA), 싱가포르, 아세안, 인도, 미국, EU, 페루 등과 FTA를 체결하고, 캐나다, 멕시코, 걸프협력기구(GCC) 등과 협상을 진행 중이다.
- 이와 같이 FTA 추진이 가속화되고 체결된 협정의 수가 증가함에 따라 ‘체결 이후’ 이행에 대한 관심이 높아지고 있다. 특히 개방에 대한 민감도가 높은 농업부문에서는 개방에 대한 프로그램이 필요하다는 지적은 WTO 체제 출범부터 있어 왔고, 개방의 폭이 광범위한 한미 FTA 체결을 계기로 이러한 논의가 심화된 측면이 있다.
- 우선 FTA 발효 이후 농업분야 피해가 전면적으로 발생하고 있지는 않지만 가시화되고 있음을 알 수 있다. 그 이유는 상대국 농산물에 대한 관세철폐가 점진적으로 진행되고 있기 때문이며 농산물 수입비중이 가장 높은 미국, EU 등과의 FTA가 발효 된지 얼마 되지 않았기 때문이다. 그럼에도 불구하고 직접적인 농업피해가 가시화되고 있음을 확인할 수 있다.
- 농산물 수입증가로 인해 무역적자는 2004년 1억 1천만 달러에서 2013년 133억 3천4백만 달러로 급속도로 증가하고 있으며, 수입농산물의 국내 농산물 시장 점유율이 2003년 16.3%에서 2013년 23%로 확대 증가하고 있고, 관세감축 확대에 향후 매년 관세 감축률이 확대되므

로 피해는 증가할 것이며 동식물 위생검역조치가 해제 될 경우 피해는 가시화되고 있는 것으로 나타났으며 또한, 농산물 수요증가에 따른 농가기대소득의 손실액은 포도의 경우 연간 20억 원이 발생할 것으로 분석되고 있다.

○ 타감작용

- 식물이 성장하면서 일정한 화학물질이 분비되어 경쟁되는 주변의 식물의 성장이나 발아를 억제하는 작용을 말한다. 이 억제를 통하여 자신의 생존을 확보하고 성장을 촉진하는 결과를 억제되는 작용이다. 하지만 때로는 자신의 생존에 이익이 되는 주변 식물의 성장을 촉진하는 작용을 하기도 하며 타감작용은 이를 포함한다.
- 호두청피에서의 타감물질은 탄닌이며, 토마토에서의 타감물질은 라이코펜이다. 토마토에 호두 추출물을 제공할 경우 이를 방어하기 위해 타감물질인 라이코펜을 많이 생성하게 되는 점을 활용해 본 연구에서는 라이코펜이 증가된 토마토를 기능성 농산물 및 향후 이를 추출한 건강기능식품으로 활용하고자 한다.

○ 기존 PGR 식물성장 조절제의 현황

- PRG식물성장 조절제(plant growth regulators, PGR)는 농작물의 생리기능을 증진 또는 억제하는데 사용되는 약제라고 정의하고 있으며, 식물생장에 관여하는 식물호르몬이다. 식물호르몬은 식물의 어떠한 조직이나 기관에서 생합성 되고 다른 조직이나 기관으로 이동되어 매우 낮은 농도로도 식물체에 형태적, 생리적인 특수한 변화를 일으키는 물질이다.
- 국내에서는 Chitosan을 농업에 이용하려는 시도는 여러 group에서 토마토, 벼, 고추, 마늘, 보리 등 여러 작물에 처리하여 효과를 보았다. 하지만 이런 연구는 대부분이 작물의 성장, 수확증가 등에 초점이 맞춰져 병에 대한 저항성 증가 등의 연구는 극히 드물다.
- 콩나물에 chitosan 처리 효과를 본 연구는 성장, lipoxxygenase(콩나물의 비린내에 영향을 주기 때문에 조사)의 변화에 대해 조사했지만 식물면역활성의 개념을 갖고 연구되지는 않았다. tryptophan 함량을 증가시키려는 방법은 없었다.
- 미국 조지아 대학 탄수화물 연구소는 탄수화물의 식물면역활성제 연구를 가장 많이 하는데 주로 β -glucan, oilgogalacturonide가 생성되고 식물세포에 주는 영향, 식물이 인식하는 방법 등을 규명하고 있다.
- 캐나다에서는 chitosan을 처리하여 토마토 등의 병에 대한 저항성을 증가시키는 연구를 하고 있으며, 일본 등 세계 여러 나라에서 chitosan을 농업에 이용하려는 노력은 활발하게 이루어지지만 성장 촉진제로 많이 실험하였다.

1-3. 연구개발 범위

- 호두청피 부산물 수집
 - 탈곡 후 버려지는 호두청피 부산물 수집
- 성분별 추출 조건 확립
 - 호두청피 추출물 성분분석을 통한 최적화
- 칩투용 제제 연구
 - 흡수 용이한 제형 최적화 및 성능평가
 - 전이 방법 연구 및 확정

- 기능성 토마토의 품질평가를 통한 사업화 기반 확립
- 기능성 토마토 제제 조성물 확정에 따른 원재료 확보전략 수립
- 기능성 토마토 생산지원 및 사업화 추진
 - 현장적용에 따른 기능성 토마토 생산지원
 - 농가 계약에 따른 기능성 토마토 제제 활용 확보
 - 기능성 원료 개발을 위한 기능성 토마토 확보

2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 호두청피 추출물 추출조건 최적화

가. 호두청피 부산물 수집 및 가공

영동, 단양 등 호두 주 생산지 영농조합법인과 협업해서 원재료 확보하였으며, 실험을 위해 단양에서 직접 수거하여 사용하였다.

추출을 위해 50L 중탕기에 70% 주정 20L와 호두청피 500g을 넣은 후 50°C로 온도를 올린 후 초음파 기기를 이용해 20kHz에서 10분간 처리하여 추출하였다.



[그림 1] 호두청피 추출물 보관 및 제품



[그림 2] 호두청피 추출 기기

나. 탄닌 분석방법

수용성 탄닌 함량은 Folin-Denis법에 의해 Cas-tello ML 등(2011)의 방법을 변형하여 측정하였다. 조건별로 추출한 호두청피추출물 1mL에 증류수 1.8mL을 혼합하고, 1N Folin-Denis용액 0.2mL을 첨가한 후 3분 동안 반응시켰다. 포화 Na_2CO_3 용액 0.4mL을 첨가한 후 20분 방치한 후 UV-Vis spectrophotometer를 이용하여 725nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선으로부터 수용성 탄닌 함량을 계산하였다.

표준곡선은 Gallic acid를 이용하여 시료와 같은 방법으로 측정하였고,

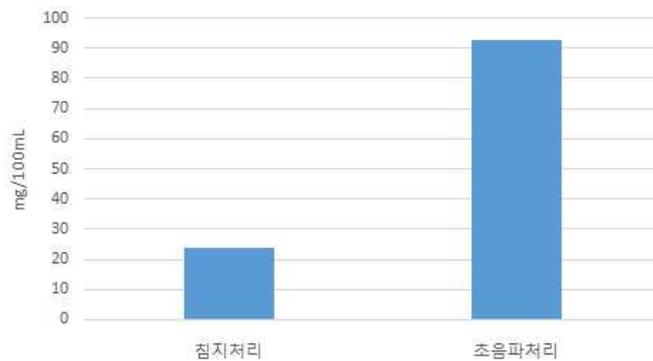
표준곡선식은 $Y = 1.1427x + 0.1435$ ($R^2 = 0.996$)로 이때 x은 100mL당 Gallic acid 함량(g)으로 호두청피추출물의 수용성 탄닌 함량은 mg GAE(Gallic acid)/ Sample mL로 계산되어 나타내었다.

다. 추출방법

70% 주정을 이용하여 침지처리와 초음파 처리를 통해 호두청피 속 탄닌함량을 비교하였다.

침지처리와 초음파처리를 위해 호두청피 100g과 70% 주정 2L를 넣었으며, 초음파 처리의 경우 20kHz에서 10분간 처리하였으며, 침지는 8시간 동안 수행하였다.

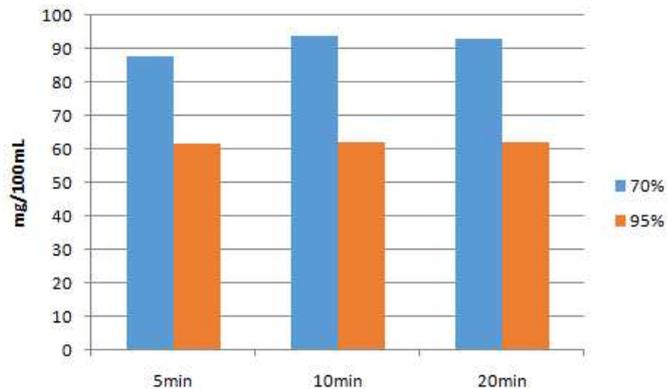
침지처리보다 초음파로 처리한 군에서 탄닌함량이 90%정도 높은 함량을 보였기에, 최종 공정방법으로 선정하였다.



[그림3] 추출방법에 따른 탄닌 함량

라. 초음파처리 시간별 탄닌 추출율

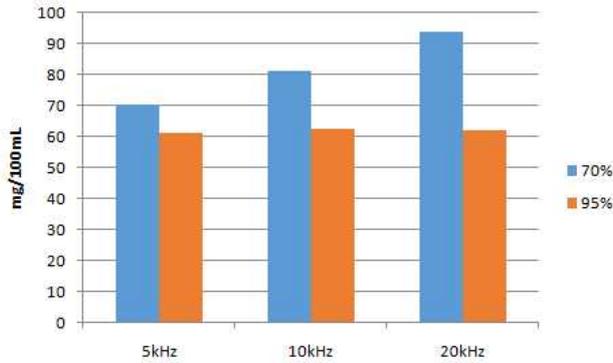
초음파 처리 시간별 탄닌의 함량분석위해 호두청피 100g과 70%주정과 95%주정 2L에 20kHz에서 5분, 10분, 15분간 처리하였다. 95% 주정의 경우 시간이 지나도 큰 유의차가 없으며, 70% 주정의 경우 5분보다는 10분 이상에서 탄닌 함량이 높았으며, 10분과 20분은 유의한 차이가 없어 처리시간 10분을 공정방법으로 설정하였다.



[그림 4] 초음파 시간별 탄닌 추출율

마. 초음파 세기별 탄닌 함량

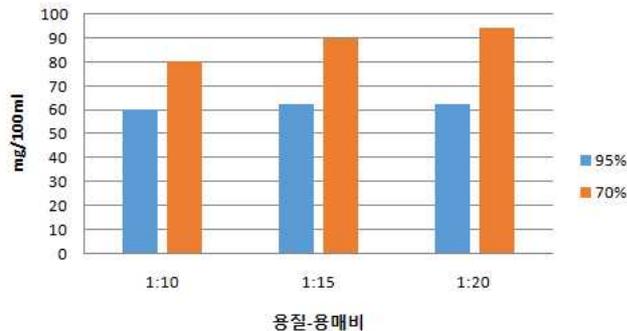
초음파 세기별 추출 함량을 알아보기 위해 호두청피 100g과 70% 주정 및 95%주정 2L를 5L 스테인리스 볼에 넣은 후 5kHz, 10kHz 그리고 20kHz에서 10분간 처리한 후 분석하였다. 95% 주정의 경우 초음파 세기가 높아져도 큰 유의차가 없으며, 70% 주정의 경우 세기가 강해질수록 탄닌 함량이 증가하였다. 최종적으로 탄닌 함량이 높게 나온 20kHz로 설정하여 추출하는 공정방법을 확정하였다.



[그림 5] 초음파 세기별 탄닌 추출율

바. 추출용매 비율

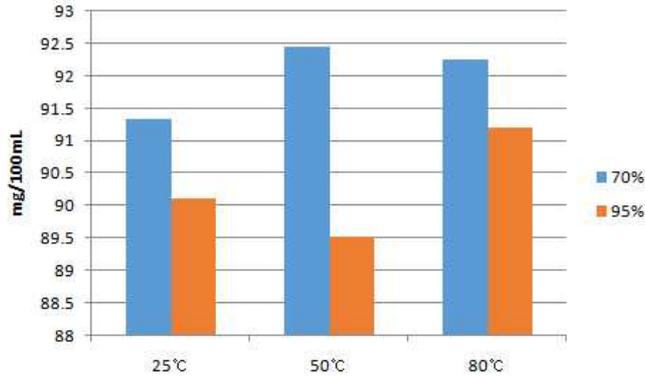
용질인 호두청피와 용매인 70% 주정 그리고 95% 주정을 초음파 처리하여 배합 비율에 따른 탄닌 함량을 확인하였다. 추출조건은 호두청피 100g과 주정 2L를 1:20비율로 추출하였으며, 초음파처리는 20kHz에서 10분만 처리하였다. 그림에 나타난 것과 같이 95% 주정을 사용하였을 때 큰 유의차가 없었지만, 70% 주정에서는 용매가 증가될수록 탄닌 추출량이 95% 주정 추출보다 효율이 더 높기에 70% 주정을 가지고 추출 제 조하기로 선정하였다.



[그림 6] 추출 용매비율에 따른 탄닌 함량

사. 추출온도에 따른 탄닌 함량

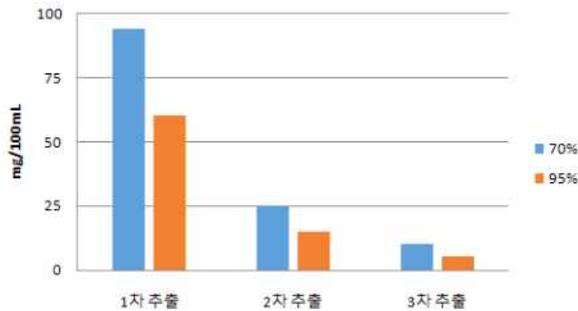
추출온도 80℃, 50℃, 상온(25℃)로 온도조건을 달리하여 초음파 처리하여 추출하였을 때, 70%주정처리에서는 50℃이상 이였을 때 탄닌 함량이 높게 나온 것으로 확인되어 제조공정 시 추출온도를 50℃로 정하였다.



[그림 7] 추출온도에 따른 추출율

아. 추출 횟수에 따른 함량

추출방식으로는 호두청피 100g과 70%주정 및 95%주정 2L를 초음파로 10분간 처리하여 1차, 2차 그리고 3차를 30분마다 추출액을 회수하고 용매를 다시 채우는 방식으로 추출하였다. 70%주정 및 95%주정 모두 2차,3차로 갈수록 탄닌 함량이 줄어드는 것을 확인하여 제조 비용을 줄이기 위해 1차 추출만 하기로 결정하였다.



[그림 8] 추출 횟수에 따른 탄닌 함량

자. 호두청피 후숙 기간별 함량 비교 분석

후숙 기간별로 호두청피를 이용하여 주정 추출을 통한 탄닌의 함량을 분석하였다. 후숙 기준은 호두 알맹이를 이탈한 기준으로부터 상온에서 0일, 20일, 30일로 구분하여 실험한 결과 20일 이상에서 탄닌 함량이 높게 나온 것을 확인했다. 이는 후숙 기간이 길어질수록 호두청피 속 탄닌 함량이 증가되는 것으로 판단되기에 원재료 공급기간 및 추출기간 변수를 감안하여 20일 이상 후숙된 호두청피를 사용하고자 한다.

[표 1] 호두청피 후숙 기간에 따른 탄닌 함량

호두청피 후숙별	추출법	탄닌 함량(mg/100mL)
호두청피 0일 후숙	70% 주정, 50℃, 초음파10분	55.23
	95% 주정, 50℃, 초음파10분	49.43
호두청피 20일 후숙	70% 주정, 50℃, 초음파10분	92.65
	95% 주정, 50℃, 초음파10분	62.02
호두청피 30일 후숙	70% 주정, 50℃, 초음파10분	77.78
	95% 주정, 50℃, 초음파10분	64.29

차. 70% 및 95% 주정처리 호두청피 추출물 내 탄닌 함량 측정

측정 결과 70% 주정처리 호두청피 추출물 내의 탄닌 함량은 94.17mg/100mL으로 확인되었으며, 95% 주정처리 호두청피 추출물 내의 탄닌 함량은 65.72mg/100mL으로 확인되어 적정 범위인 75.33mg/100mL ~113.00mg/100mL 이내로 규격을 설정하고자한다.

[표 2] 호두청피 추출물의 탄닌 함량 비교

호두청피 추출물 탄닌 함량(mg/100mL)		
70% 주정 추출물	95% 주정 추출물	비교
94.17	65.72	

카. 70% 및 95% 주정처리 추출물에 대한 이화학적 특성 비교

70% 및 95% 주정처리 추출물의 이화학적 특성은 아래 표와 같이 큰 유의차가 없는 것으로 나타났다.

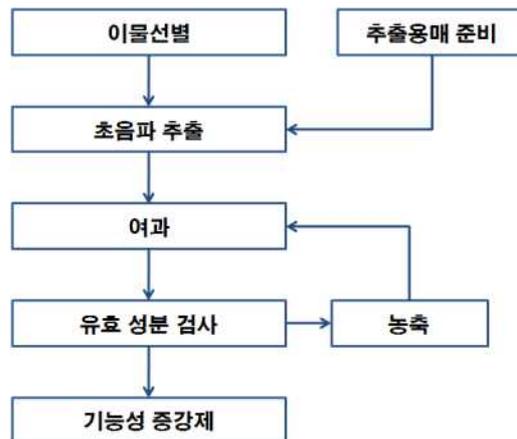
[표 3] 호두청피 추출물의 이화학적 특성

구분	pH	총 산도(%)	가용성 고형분 농도	색도		
				L	a	b
70% 주정 추출물	5.63	0.44	4.5	4.68	1.66	2.49
95% 주정 추출물	5.62	0.45	4.6	4.69	1.68	2.48

타. 호두청피 추출물 제조과정

(1) 호두청피 추출물 최종제조과정

20일 이상 된 호두청피를 세척한 후 50℃의 70%주정 안에 넣은 후 초음파 20kHz에서 10분간 처리하여 추출한다. 이후 여과를 한 후 UV-Vis를 이용하여 탄닌의 함량은 분석한 후 75.33mg/100mL ~113.00mg/100mL 범위에 들어가면 20리터 스테인리스 통에 보관하며, 범위 안에 들지 않을 경우 농축과정을 거쳐 탄닌 함량을 높인 후 보관한다.



[그림 9] 호두청피 추출물 제조과정

(2) 효율적 제조과정

추출 및 농축에 필요한 설비와 제조하는데 소요되는 시간을 검토하여 생산하는데 적합한 모델을 확인하였다. 호두청피를 원료로 한 추출 및 농축공정을 통하여 제품을 완성하는데 있어서 설비와 생산 공정을 합리적으로 디자인해야 효율적인 사업화가 가능하다. 이를 위하여 추출 및 농축의 전 공정을 종합적으로 검토하여 설비와 인력의 가동을 최적화하는 생산관리 방안을 검토하였다.

먼저 호두청피를 선별하고 추출하는 1단계 과정과, 여과하는 2단계 과정, 그리고 유효성분 검사 및 농축 3단계로 구분하여 효율적인 호두청피 추출액 제조방법을 검토하여 이를 최종 추출액 제조방법으로 설정하였다.

[표 4] 추출액 제조과정 설명도

순서	공정명	제조과정 주요 내용	비고
1	호두청피 수집	20일에서 30일 이내로 숙성된 호두청피 사용	
2	선별 및 세척	먼지, 잡티 등 이물질 제거	
3	추출용매 준비	95% 주정을 70% 주정으로 조제	주정, 정제수
3	추출	초음파 20kHz, 10min, 50°C 의 70%주정, 1:20비율	초음파 추출기
4	여과	추출한 호두청피와 추출물질과의 분리	300 mesh sieve
5	성분검사	가용성 고형분 농도 및 수용성 탄닌 함량 등	Spectrophotometer
6	농축	유효성분 미달인 경우 시행	농축기
7	보관	제품 출고 전 보관창고에 보관	drum, 건냉 창고

2-2. 기능성 토마토 시험생산을 통한 생산성 검증 및 최적 시용조건 설정

가. 토마토 모종

본 실험에 사용한 토마토 모종은 농장 근처 모종농장에서 구입하여 사용하였다.

모종 심기 전 퇴비를 이용해 로터리한 후 비닐멀칭과 비가림막을 위해 비닐을 덮어 비닐하우스를 만들었다.

나. 토마토 재배지 및 방법

- 실험농장: 경기도 성남시 분당구 서현동



[그림 10] 실험 농장 위치

[표 5] 기능성 증강제 시비 일자

	날짜	비고
비닐멀칭	2018.04.25	
정식	2018.05.12	
1차 엽면시비	2018.05.31	0.5L 실험액 시비
2차 엽면시비	2018.06.01	0.5L 실험액 시비
3차 엽면시비	2018.06.07	0.5L 실험액 시비
4차 엽면시비	2018.06.14	0.5L 실험액 시비
5차 엽면시비	2018.06.21	1L 실험액 시비
6차 엽면시비	2018.06.29	1L 실험액 시비
7차 엽면시비	2018.07.05	1L 실험액 시비
8차 엽면시비	2018.07.12	1L 실험액 시비
9차 엽면시비	2018.07.19	1L 실험액 시비
10차 엽면시비	2018.07.26	1L 실험액 시비
11차 엽면시비	2018.08.02	1L 실험액 시비
12차 수확	2018.08.09	



[그림 11] 토마토 모종 정식



토마토 생육과정



대조군 생육과정



A처리군 생육과정
꽃 생성됨.



E처리군 생육과정

[그림 12] 정식 2주 후 생육과정



B처리군 생육과정



B처리군 생육과정



D처리군 생육과정
실험액처리로 인해 약해 발생



D처리군 생육과정

[그림 13] 정식 3주 후 생육현황



대조군 생육과정



A처리군 생육과정



E처리군 생육과정



E처리군 열매

[그림 14] 정식 4주 후 생육현황



토마토 생육 사진



대조군 생육과정



B처리군 생육과정

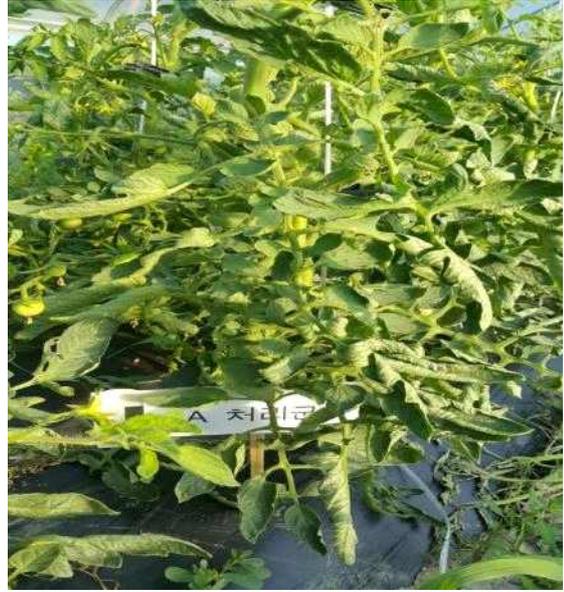


D처리군 생육과정

[그림 15] 정식 5주 후 생육현황



대조군 생육과정



A처리군 생육과정



B처리군 생육과정



D처리군 생육과정

[그림 16] 정식 6주 후 생육현황



대조군 생육과정



A처리군 생육과정



D처리군 생육과정



토마토 재배

[그림 17] 정식 7주 후 생육현황



대조군 열매



A처리군 열매



C처리군 생육과정



E처리군 생육과정

[그림 18] 정식 8주 후 생육현황



대조군 생육과정



B처리군 생육과정



D처리군 생육과정



E처리군 열매

[그림 19] 정식 9주 후 생육현황



대조군 생육과정



A처리군 생육과정



A처리군 일부 병해발생으로 고사



C처리군 생육과정

[그림 20] 정식 10주 후 생육현황



대조군 생육과정



A처리군 생육과정



B처리군 일부 병해발생으로 고사



D처리군 생육과정

[그림 21] 정식 10주 후 생육현황



대조군 생육과정



C처리군 일부 뿌리 병해발생



D처리군 생육과정



E처리군 생육과정

[그림 22] 정식 11주 후 생육현황



C처리군 일부 병해발생으로 고사



C처리군 생육과정



D처리군 생육과정



D처리군 생육과정
완숙된 토마토 모두 수확

[그림 23] 정식 12주 후 생육현황

- 경기도 성남시 서현동에 위치한 토마토 재배 농장 비닐하우스 1개소를 지정(그림 10)하여 2018년 05월부터 2018년 10월까지 실험하였다.
- 측정항목은 길이, 과실의 성숙, 약해 등을 발육속도는 환경 요소로부터 측정하였다. 작물이 증산을 시작한 후, 일반적으로 일출 후 2시간 전후이며, 광량을 고려하여 설정하는데 맑은 날에는 일출 1시간 30분~2시간 후에 시작하는 것을 기준으로 하는 것이 좋기에 매주 새벽 6시 기준, 시험구별로 각각의 농도별 시험액을 시비하였으며, 이때 시비량은 정식부터 초장이 100cm까지는 10그루당 0.5L 정도를 시비하였고, 그 이후부터는 1L 정도를 시비하였다.
- 현장에서 많이 사용하는 방법을 기준으로 실험하였으며, 최종적으로 라이코펜 함량이 높게 나온 균을 대상으로 최적화를 잡았다.

다. 기능성 증강제 투입방법 및 농도 설정

호두청피 추출물을 농도별로 1주 간격으로 엽면살포하여 성장상태를 관찰하고 열매의 특성을 분석하였다.

[표 8] 기능성 증강제 처리농도

농도(ppm)	0	WN 5	WN 10	WN 20	WN 50	WN 100
그루 수	10	10	10	10	10	10
시험구	대조군	A	B	C	D	E

라. Lycopene 함량 분석

미리 분쇄한 토마토 과육을 homogenizer로 균질화한 후 5g을 취하여 lycopene extraction solution(0.05% butylated hydrotoluene/ acetone: ethanol: hexane= 1:1:1)을 45mL 가한 뒤 180rpm에서 20분간 shaking후 6mL의 cold distilled water를 가하여 180rpm에서 분간 shaking하였다.

극성 및 비극성 물질의 분리를 돕기 위해 상온에서 20분간 분리시킨 후 상층액(헥산층)을 취하여 UV-Vis spectrophotometer를 이용하여 530nm에서 흡광도를 측정한 후 아래의 식을 이용하여 라이코펜 함량을 환산하였다.

$$[Lycopene(mg/kg) = hexane(mL)/sample(g) \times A_{503} \times 3.12]$$

마. 호두청피 추출물처리에 따른 토마토 유묘 생장의 차이

호두청피 추출물 처리가 토마토 유묘 생장에 미치는 영향을 알아보기 위해 농도별로 호두청피 추출물을 처리하여 유묘 생장을 조사한 결과는 표 9와 같다. 처리농도는 농도별로 엽면살포하고 유묘 생장을 조사하였다. 처리농도는 대조군, 호두청피 추출물 5ppm, 10ppm, 20ppm, 50ppm, 100ppm으로 맞춰 처리하였다. 호두청피 추출물 50ppm에서 대조군보다 더 높은 생육량을 보였으며, 호두청피 추출물 5ppm에서는 대조군보다 3.2%정도 낮았으나 나머지 농도에서는 대조군보다 다소 높은 편으로 나타내었다. 종합하면 호두청피 추출물의 농도가 높아질수록 수관을 깨끗하게 해서 생육활성 효과를 보인 것으로 나타낸다. 전체적으로 사용된 농도수준에서 호두청피 추출물은 유묘 성장 촉진에 도움을 주는 반면 억제효과는 없었다.

[표 9] 호두청피 추출물 처리에 따른 토마토 생장을 비교

구분	제제의 탄닌 농도(ppm)	평균 초장(cm)
대조군	0	123.8
처리군	5	119.8
	10	122
	20	123
	50	125.2
	100	121

바. 호두청피 추출물 처리에 따른 토마토 수량 차이

표 10의 결과를 기준으로 각 호두청피 추출물 농도별 차이를 간략하게 본 것인데, 전체적으로 유의한 결과를 얻지 못했으나 호두청피 추출물의 농도가 낮을수록 수량이 높았으며, 5ppm과 10ppm에서 각각 11.2, 12.6으로 높게 나타났다. 대조군보다 처리구에서 10ppm까지는 높은 수량을 보였으나, 무계의 경우 농도가 높을수록 대조군에 비해 10% 정도 증가하였으나, 적정 농도가 넘어감에 따라 대조군과 비슷한 중량을 보여 이 부분은 향후 추가 연구가 필요하다.

[표 10] 호두청피 추출물 처리에 따른 토마토 수량차이

구분	제제의 탄닌 농도(ppm)	평균 수량(개)	과실중(g/개)
대조군	0	12	138
처리군	5	11.2	161
	10	12.6	190
	20	8.8	153
	50	9.2	136
	100	9.6	132

사. 호두청피 추출물 처리에 따른 라이코펜 함량

기능성 증강제인 호두청피 추출물을 처리하여 재배된 토마토의 과실 내 함유된 lycopene 성분 함량을 조사한 결과는 표 11과 같다. 호두청피 추출물 10ppm으로 처리한 것이 대조군보다 높게 타났다. 하지만 호두청피 추출물의 농도가 높아질수록 예상과 다르게 lycopene함량이 낮아짐을 확인하였다. 이는 적정 농도에서 방어들질이 높아졌다가 그 이후 더 이상 오르지 않는 최대치가 있음을 확인하게 되었다.

[표 11] 호두청피 추출물 처리에 따른 lycopene 함량

구분	처리농도(ppm)	Lycopene 함량 (mg/kg)			Average (mg/kg)
		1	2	3	
대조군	0	70.33	69.98	70.49	70.26
처리군	5	286.02	285	284.01	285.01
	10	366.25	364.7	365.12	365.35
	20	279.88	280.02	279.94	279.94
	50	288.16	290.22	290.11	289.49
	100	276.96	276.26	274.8	276

바. 기능성 토마토의 품질평가를 통한 사업화 기반 확립

농장에서 키운 호두청피 추출물을 처리한 토마토와 대조군 토마토에 대한 관능적 품질을 평가한 결과는 표12와 같다. 호두청피 추출물로 처리한 토마토의 색상, 향기, 씹힘성, 감미도에서 높은 점수를 보였으며, 종합적인 기호도에서도 호두청피 추출물로 처리한 토마토가 대조군 보다 점수가 높은 편으로, 이는 처리군이 토마토의 맛과 향기에 영향을 미치는 것으로 확인되었다.

[표 12] 토마토 관능평가

	sample	$M \pm SD^{1-3)}$
색상	대조군	3.24 ± 0.69
	처리군	3.80 ± 0.69
향기	대조군	2.52 ± 0.80
	처리군	3.94 ± 0.61
씹힘성	대조군	3.11 ± 0.62
	처리군	3.72 ± 0.80
감미도	대조군	3.17 ± 0.90
	처리군	3.77 ± 0.80
종합적인 기호도	대조군	3.01 ± 0.88
	처리군	3.80 ± 0.72

1) Each item was evaluated in 5 hedonic scale. 5: very good, 4: good ~ 2: poor, 1: very poor

2) Each value was represented as mean \pm SD(Standard deviation).

The number of panelists was 17.

3) Significantly different from the control at $p < 0.05$ by student's t-test.

사. 기능성 토마토 공인기관 분석 결과

단국대학교 피톤치드연구소를 통해 라이코펜 분석한 결과는 다음과 같다.(표 13) 무처리군보다 처리군에서 149.77% 증가한 22.33mg/kg 증가된 것이 확인되었으며, 이는 호두 추출물 속 탄닌 성분이 타감작용을 하여 대조군보다 처리군에서 높은 라이코펜함량을 보이는 것으로 확인된다.

[표 13] 기능성 증강 토마토 라이코펜 분석 결과

시험항목	시료명	분석결과(mg/kg)	시험방법	비고
라이코펜	무처리군	8.94	HPLC분석법	149.77% 증가
	처리군	22.33		

시험 성적서

의뢰인	성명	비류준	사업자등록번호 (법인등록번호)
	주소	경기도 불만시 수지구 동천동	
의뢰내용	시료명	A처리군	
	내용	생물토마토를 엑서르 같은 상태의 시료	

시험결과

담당자: 이우정 책임자: 김태용

시험항목	분석결과	단위	시험방법(비고)
라이코펜	8.94	mg/kg	HPLC분석법

2018.11.30.

단국대학교 피톤치드연구소장



시험 성적서

의뢰인	성명	비류준	사업자등록번호 (법인등록번호)
	주소	경기도 불만시 수지구 동천동	
의뢰내용	시료명	B처리군	
	내용	생물토마토를 엑서르 같은 상태의 시료	

시험결과

담당자: 이우정 책임자: 김태용

시험항목	분석결과	단위	시험방법(비고)
라이코펜	22.33	mg/kg	HPLC분석법

2018.11.30.

단국대학교 피톤치드연구소장



[그림 24] 라이코펜 성적서

아. 지식재산권

특허 출원 “ 천연추출물을 이용한 농산물의 생리활성성분 증강제의 제조”

본 발명은 호두추출물을 이용한 과채류 기능성 2차대사산물 증강에 관한 것이다. 농산물은 탄수화물을 중심으로 한 주곡의 에너지 자원을 보충해주는 비타민 등 미네랄 공급원으로서의 역할을 담당해왔으나, 최근 면역체계의 증강을 통해 질병예방 등의 차원에서 항산화제의 발견, interferon의 보강체계의 활성연구가 진전되고 있으나 의약품이 아닌 우리가 주식으로 먹는 농산물에 항암, 항산화, 성인병에 탁월한 치료효과가 있는 생리활성물질을 증강시키는 기술에 관한 것이다.

【서지사항】

【서유명】	특허출원서
【출원구분】	특허출원
【출원인】	
【명칭】	(주)퓨톤
【특허고객번호】	
【출원인】	
【성명】	
【특허고객번호】	
【발명의 국문명칭】	천연추출물을 이용한 농산물의 생리활성성분 증강제의 제조 기술
【발명의 영문명칭】	Technique for manufacturing physiologically active ingredient enhancer of agricultural products using natural extract

[그림 25] 지식재산권 서지 사항

2-3. 기능성 토마토 제제 조성물 확정에 따른 원재료 확보전략수립

영동, 단양 등 호두 주 생산지의 영농조합법인과 협업하여 원재료를 확보키로 하였으며, 이후의 사업화 추진으로는 조인그룹의 홍성 토마토 농장과 부여 스마트 팜 농장에서 현재 기능성 증강제를 활용한 기능성 토마토 재배 시험 중에 있으며, 현대 그린푸드 신규 도시락 사업부문에 기능성 토마토 납품 관련해서 제안해 놓은 상태이며, 향후 기능성 증강제를 활용한 과채류를 생산하여 환자식으로 응용이 가능할 것으로 본다.



[그림 26] 조인그룹의 홍성 토마토 농장 기능성 토마토 재배



[그림 27] 부여 스마트 팜 농장 기능성 토마토 재배

2-4. 경제성 분석

1kg 호두청피에서 5%의 수율을 얻을 수 있으며, 이를 농축 및 추출 시 50g/ 500ml의 소재를 얻을 수 있다. 원가의 경우 용매비 2,000원과 인건비 1,500원 그리고 재료비 500원이 들어가 총 4,000원의 값이 나오게 되며, 이를 납품하게 될 경우 15,000원/500ml로 11,000원의 차액이 발생한다. 또한 현재 시장에 나와 있는 기능성 증강제보다 평균 8,000원 저렴하며, 천연물질이지만 국내에서 원료 공급이 용이하며, 버려지는 재료를 사용하기 때문에 원재료 가격문제도 없기에 기존 시장에 나와 있는 제품보다 가격 경쟁력이 높다.

[표 14] 기능성 증강제 경제성 분석

1kg 호두청피	5% 수율	
청피추출물	50g/500mL	
원가	용매	2,000원
	인건비	1,500원
	재료비	500원
총합	4,000원	
납품가	15,000원/500mL	

[표 15] 기능성 증강제 경쟁사 제품

	제품명	용량	가격	비고
	홀멘트	1L	30,000원	
	아탈라엑스	500ml	25,000원	주요성분 - 원형 질대사활성물질, NPK, 미량요소, 해조추출물, 각종미네랄
	옥제놀	1L	10,000원	주요성분 - 일소, 수용성인산, 수용성 가리
	알기펙트	1L	30,000원	주요성분 - 해조추출물, 아미노산, 베타1-3글루칸, 베타일
	DOF마린35	1L	20,000원	주요성분 - 마그네슘, 알기닌, 마니톨, 해조추출물

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

- 호두청피 부산물 수집 및 기능성 토마토 제제 개발을 위한 원재료 가공, 성분별
- 호두청피 추출물을 활용한 기능성 토마토 제제 확정을 통한 기능성 농산물 생산

3-2. 목표 달성여부

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도	기능성 농산물 생산을 위한 제제 개발	호두청피 부산물의 기능성 농산물 생산위한 기능성 물질 추출물 제조	100	70% 추정 추출을 통한 추출물 제조
		흡수용이한 침투용 제형 최적화 및 전이방법 확정	100	다양한 제형을 통한 식물제공방법 및 증강실험
		생리활성물질 증강 성분의 기능성 강화 조건 탐색	100	추출 조건에 따른 기능성분 함량 확인
		시험생산을 통한 생산성 검증 및 최적 제제 조성	100	제공방법, 제형별 등 조건에 따른
		원재료 표준	100	채취시기, 부패시기 고려 원재료 지표물질 모니터링 및 원재료 공급 방법 설정
		제조공정 표준화	100	용매, 추출온도, 추출횟수, 최종 수율 고려 제조 공정 표준화
		기능성 토마토 생산지원 및 사업화 추진	100	현장적용에 따른 기능성 토마토 제제 활용

4. 연구결과의 활용 계획 등

- 호두청피 부산물의 경우 현재 버려지는 폐기물이기에 이들을 사용하기 위해서는 각 지역의 호두 농장의 협조가 필요하다. 관련 농장과의 협의를 지속적으로 실시하여 기능성 소재로서 가공이 원활히 이루어 질 수 있도록 할 계획이다.
- 호두청피 추출물을 통한 기능성 토마토 재배
- 임산물을 활용한 신소재 개발로 타 산업 분야의 확산적용

붙임. 참고문헌

1. 고병국, 길봉섭, 1985. 식물의 발아와 생장에 미치는 일본잎갈나무의 알레로패티. 한국생태학회지 8(1):15~19.
2. 권순하. 1990. 애기수영의 Allelopathy 효과. 원광대 석사학위논문.
3. 길봉섭. 1988. 리기다소나무의 Allelopathy 효과. 한국생태학회지 11(2):65~76.
4. 길봉섭. 1999. 다른 식물에 미치는 사철쭉의 알레로파시 효과. 한국생태학회지 22(1): 59~63.
5. 길봉섭. 1999. Principles and Practices on Allelopathic Research. 한국생태학회심포지움: 7~17.
6. 길봉섭, 김영식, 윤경원. 1991. 쭉에 들어있는 생장 억제물질의 작용. 한국생태학회지 14(2): 121~135.
7. 길봉섭, 김두영, 김영식, 이승엽. 1991. 잣나무의 천연화학물질이 다른 식물에 미치는 독성작용. 한국생태학회지 14(2): 149~157.
8. 길봉섭, 김영식, 이승엽, 윤경원. 1993. 잣나무 천연화학물질이 Callus 유기 및 세균배양에 미치는 영향. 한국생태학회지 16(3): 275~285.
9. 길봉섭, 오석훈, 김영식. 1989. 곰솔에 들어있는 생장억제물질의 작용. 한국생태학회지 12(1):21~35.
10. 길봉섭, 윤경원, 이승엽, 한동민. 1994. 황해쭉에 함유된 화학물질이 다른 식물과 미생물의 생장에 미치는 영향. 한국생태학회지 17(1):23~35.
11. 김성조 외 15인. 1988. 치주과학. 지영문화사.
12. 김영식, 길봉섭, 1989. 토마토식물의 독성물질 확인화 생장억제작용. 식물학회지. 32(1):41~49.
13. 김종희. 1999. 식물 Terpenoids의 생태학적 역할. 한국생태학회 심포지움: 19~25.
14. 김재길. 1984. 원색천연약물대사전. 남산당.
15. 박광호. 1999. Allelopathci 벼의 연구와 논 잡초 방제. 한국생태학회 심포지움: 27~40
16. 신성은. 1996. 환삼덩굴이 수용체식물에 미치는 알레로파시 효과. 원광대 석사학위논문.
17. 우현경. 1992. 비쭉의 천연화학물질이 다른 식물에 미치는 알레로패티 효과. 원광대 석사학위논문
18. 유형근. 1999. 민들레와 서양민들레의 Allelochemicals가 종자발아와 유식물 생장 및 항균력에 미치는 영향. 건국대 석사학위논문.
19. 윤경원, 길봉섭. 1989. 쭉(*Artemisia princeps* var. *orientalis*)에 들어있는 화학물질이 다른 식물에 미치는 독성 효과. 한국생태학회지 12(3):161~170.
20. 이호준, 김용옥, 장남기. 1997. 수 종 식물의 분비물질이 종자 발아와 균류 생장에 미치는 알레로파시 효과. 한국생태학회지. 20(3):181~189.
21. Bossy-Wefzel E. et. al. 2003. Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15:706-716.
22. Zong H, Ren JM, Young LH et al. 2002. AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in response to chronic energy deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 25, 15983-15987.

23. Charles T. Putman et. al. 2003. AMPK activation increases uncoupling protein-3 expression and mitochondrial enzyme activities in rat muscle without fiber type transitions. *J . Physiol.* 551, 169-178.
24. Puigserver P. et. al. 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev.* 24(1):78-90.
25. Anil Kumar et al. 2011. Nitric oxide modulation in protective role of antidepressants against chronic fatigue syndrome in mice. *Indian J Pharmacol.* 43(4): 324-329
26. Niloofar Afari and Dedra Buchwald 2003. Chronic fatigue syndrome: a review. *Am. J . Psychiatry* 160: 221-236
27. Vanphawng Lalremruta and Gurunath S. Prassanna 2012. Evaluation of protective effect of *Aegle marmelos* Corr. in an animal model of chronic fatigue syndrome. *Indian J . Pharmacol.* 44(3): 351-356
28. Anil Kumar, Aditi Vashist and Puneet Kumar. 2010. Potential role of pioglitazone, caffeic acid and their combination against fatigue syndrome-induced behavioural, biochemical and mitochondrial alterations in mice *Inflam. pharmacol.* 18: 241-251
29. Joon-Young Park et al. 2009. p53 impoveves aerobic exercise capacity and augments skeletal muscle mitochondrial DNA content *Circ. Res.* 105: 705-712
30. Shuzhe Ding et al. 2012. Mild stress of caffeine increased mtDNA content in skeletal muscle cells: the interplay between Ca²⁺ transients and nitric oxide. *J . Muscle Res. Cell Motil.* 33: 327-337
31. Carles Canto. et. al. 2010. Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. *Cell Metabol.* 11, 213-219.
32. C. S. Na. et. al. 2013. The effects of *Hovenia dulcis* fruit hot water extracts on anti-fatigue and improvement of the exercise performance in SD rats. *J . Pharm. Soc. Korea.* 57(5). 348-356.
33. Richard C. Scarpulla. 2011. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the GC-1 family regulatory network. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1813. 1236-1278
34. Kunkel SD, Elmore CJ, Bongers KS, et al. 2012. Ursolic acid increases skeletal muscle and brown fat and decreases diet-induced obesity, glucose intolerance and fatty liver disease. *PLOS One.* 7:e39332.
35. Kimura Y, Sumiyoshi M. 2004. Effects of various *Eleutherococcus senticosus* cortex on swimming time, natural killer activity and corticosterone level in forced swimming stressed mice. *J . Ethnopharmacol.* 95:447-453.
36. Calders P, Matthys D, Derave W, Pannier JL. 1999. Effect of branched-chain amino acids (BCAA), glucose, and glucose plus BCAA on endurance performance in rats. *Med. Sci. Sport Exer.* 31:583-587.
37. Cairns SP. 2006. Lactic acid and exercise performance : culprit or friend? *Sports Med.* 36:279-291.

38. Anderson FH, Zeng L, Rock NR, Yoshida EM. 2000. An assessment of the clinical utility of serum ALT and AST in chronic hepatitis C. *Hepatol. Res.* 18:63-71.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명자원 생산·관리기술사업 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명자원 생산·관리기술사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.