

(옆면)

(앞면)

116145-1

보안 과제(), 일반 과제(○) / 공개(), 비공개(○)발간등록번호(○)

발간등록번호

11-1543000-002259-01

음료개발
최종보고서
홍삼발효물과 제비집
효소추출물을 이용한 면역력
강화

2018

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

홍삼 발효물과 제비집 효소추출물을 이용한 수출용 면역력 강화 음료개발

최종보고서

2018. 03. 23.

주관연구기관 / 대구대학교 산학협력단

농림축산식품부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 ‘홍삼 발효물과 제비집 효소추출물을 이용한 수출용 면역력 강화 음료개발’(연구 개발 기간 : 2016. 12. 05. ~ 2017. 12. 04.) 과제의 최종보고서 1부를 제출합니다.

2018. 03. 23.

주관연구기관 명 : 대구대학교 산학협력단 (대표자) 윤재웅 (인)
협동연구기관명 : (대표자) (인)
참여기관명 : (주) 프레쉬벨 (대표자) 김근화 (인)

주관연구기관책임자: 김성호
협동연구기관책임자:
참여기관책임자: 김근화

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 최종보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제 고유 번호	116145-1	해당 단계 연구 기간	2016. 12. 05 ~ 2017. 12. 04.	단계구분	(해당단계)/ (총단계)
연구사업명	중사업명	농식품기술개발사업			
	세부사업명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대과제명				
	세부과제명	홍삼 발효물과 제비집 효소추출물을 이용한 수출용 면역력 강화 음료개발			
연구책임자	김성호	해당단계 참여연구원 수	총: 9명 내부: 6명 외부: 3명	해당단계 연구개발비	정부: 90,000천원 민간: 33,000천원 계: 123,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 명 내부: 명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 90,000천원 민간: 33,000천원 계: 123,000천원
연구기관명 및 소속 부서명	대구대학교 산학협력단 대구대학교 공과대학 식품공학과			참여기업명	(주) 프레쉬벨
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내·외의 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		10-2017-184744							KCTC 13411 BP		

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

<p>요약 - 음료시제품 개발 : 주원료인 제비집 효소추출물 및 홍삼발효액을 기반으로 한 면역강화 활성능과 향산화능이 우수한 음료의 개발.</p> <p>- 균주기탁 : 홍삼 발효 최적화 분리 유산균을 동정하고, 특허출원을 위하여 발효용 유산균주를 공인기탁기관(한국생명공학원)에 특허 기탁함(기탁번호 : KCTC 13411BP).- 매뉴얼 개발 및 제공 : 음료 조성과 배합비 등 생산기술에 필요한 매뉴얼을 제작하고 참여기업에 제공함.- 특허출원 번호:10-2017- 184744, 출원명 : 신규한 락토바실러스 프란타럼 균주 DU.LAB.H01를 이용한 바다제비집-홍삼 복합 발효물 및 이의 제조방법)</p>	보고서 면수 121
--	------------

국문요약문

연구의 목적 및 내용	홍삼 발효물과 제비집 효소처리물을 이용한 수출용 면역력 강화 음료 개발 - 효소처리 제비집과 발효홍삼액의 항산화 생리활성 효과 - 효소처리 제비집의 면역증강 효과 - 홍삼 발효 조건 및 발효홍삼의 면역 증강 효과 - 발효홍삼 주성분인 진세노사이드와 제비집 주성분 sialic acid의 성분 데이터 확보				
연구개발성과	- 음료시제품 개발 : 주원료인 제비집 효소추출물 및 홍삼발효액을 기반으로 한 면역강화 활성능과 항산화능이 우수한 음료의 개발(베트남 수출용 음료제품의 특성상 베트남 유학생과 베트남 현지인의 관능검사를 통한 음료 조성 and formulation 확정 함) - 균주기탁 : 홍삼 발효 최적화 분리 유산균을 동정하고 본 연구결과의 특허출원 위하여 발효용 유산균주를 공인기탁기관(한국생명공학원)에 특허 기탁함 (기탁번호 : KCTC 13411BP) - 매뉴얼 개발 및 제공 : 본 연구결과를 바탕으로 음료제작에 필요한 제비집의 효소 처리 기술, 홍삼을 이용한 발효생산기술 및 두 처리물을 활용한 음료 조성 and 배합비 등 생산기술에 필요한 매뉴얼을 제작하여 참여기업에 제공 함. - 특허출원 : 본 연구결과물인 제비집 효소추출물 제조법과 발효홍삼 제조법 등 이를 결합한 음료 조성물에 관한 특허 출원 함.(특허출원 번호:10-2017-0184744, 출원명 : 신규한 락토바실러스 프란타럼(<i>Lactobacillus plantarum</i>) 균주 DU.LAB.H01를 이용한 바다제비집-홍삼 복합 발효물 및 이의 제조방법)				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	- 발효홍삼과 효소처리 제비집이 결합된 음료 개발 후 베트남 수출 - 국내 대기업과 공동 launching, 대형 market 입점 및 판매 - 베트남 공기업인 ITPC와의 MOU를 통한 기술 공유 및 관련 후속연구 - 시알산과 진세노사이드의 흡수율을 높이는 기술 개발				
국문핵심어 (5개 이내)	홍삼	제비집	효소	면역력	음료
영문핵심어 (5개 이내)					

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

영문 요약문
< SUMMARY >

		코드번호	D-02			
Purpose& Contents	Development of export purpose beverage for immunity enhancement using the enzyme treatments of sea swallow nest(SSN) and fermentations of red ginseng. - Antioxidant activity effect of the enzyme treatments of SSN and ferments of red ginseng. - Effect on immunity activity enhancement of the enzyme treatments of SSN. - Fermentation condition of red ginseng and effect on immunity activity enhancement of ferments. - Acquisition the data for ginsenoside of fermented red ginseng main component and sialic acid of enzyme treated SSN main component.					
Results	- Development of prototype beverage for the purpose of export to Vietnam : export purpose beverage to enhance the immunity activity and the antioxidant characteristics based on enzyme treatments of SSN and ferments of red ginseng as main material (beverage preparation and formulation through sensory evaluation of the natives and Vietnam students in Korea). - Deposition of isolated lactic acid bacteria : identify the optimized strain for fermentation of red ginseng and then deposit to official recognition deposition institution for patent application.(International deposition authority : KCTC 13411BP). - Manual development and providing : manual to product beverage using this results to participation company. - Patent application : related technologies to product beverage using this results as to prduct enzyme treatments of SSN and ferments of red ginseng, etc. (Patent application No. :10-2017-0184744, Patent application title : Complex fermentation composition of sea swallow bird's nest enzyme hydrolysates and red ginseng using novel <i>Lactobacillus plantarum</i> strain DU.LAB.H01 and manufacturing method thereof).					
Expected Contribution	- Expectation the export to Vietnam it after development of beverage combined the fermented red ginseng and enzyme treated SSN. - Collaboration launching with domestic major companies, stores at major market and sales - Co-ownership and related subsequent research of technology through MOU with IPTC public enterprise of Vietnam - Technology development to improve the digestibility of sialic acid and ginsenoside					
Keywords	Red ginseng	Sea swallow nest(SSN)	Enzyme	Immunity activity	Beverage	

< 영 문 목 차 >

1. Overview of R&D project	7
2. Research content and results	21
3. Achievement of goal and contribution to related field	95
4. Plan to use research results, etc.	112
5. Reference	114

<Attached paper> Self-assessment opinion

〈 국 문 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요	7
2. 연구수행내용 및 성과	21
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	95
4. 연구개발성과의 활용 계획 등	112
붙임. 참고 문헌	114

<별첨> 주관연구기관의 자체평가 의견서

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

- 홍삼 발효물과 효소처리 제비집을 이용한 수출용 면역력 강화 음료 개발
- 홍삼의 주성분인 고흡수성 진세노사이드, 폴리페놀 및 제비집의 시알산 등의 성분을 활용하여 면역력 강화에 뛰어난 음료를 개발하여 현대인들의 건강증진에 활용 할 수 있도록 복용이 편리하게 가공하여 면역력 증강에 효과가 있는 성분을 활용한 제품을 개발하여 베트남 등 동남아 지역으로 수출하는 것이 주목적이다.

목표 : 제비집 sialic acid 및 홍삼의 고흡수성 gensenoside를 함유한 면역활성 증강 음료
사양 : 유리 sialic acid (10 mg/100 ml 이상), 총 gensenoside (5mg/ml)
유형 : 혼합음료
기능 : 면역활성 강화

1-2. 연구개발의 필요성

- 제비집을 활용한 음료는 관련 특허만 있을 뿐 국내에서는 시판되지 않아 찾아보기 힘든 실정이며, 태국등 동남아 등지에서 수입해서 국내에 유통이 되는 음료들만 소량 있을 뿐 관련 분야 연구도 미비한 상태이다.
- 또한 현재 제비집과 홍삼을 발효 후 배합하여 효능을 극대화 한 제품은 찾아볼 수 없다.
- 홍삼이 가지는 약리작용을 과학적으로 적용한 맞춤형 제품의 개발이 요구되고 있다. 따라서 항암, 항노화, 항스트레스 및 면역활성능의 특성을 지닌 홍삼의 효능을 선택적으로 강화한 제품의 개발이 필요하다. 본 연구과제를 통하여 고부가가치 원료인 베트남의 제비집과 국내의 홍삼을 이용하여 면역력 강화하는 수출용 음료 제품의 개발이 필요하다.
- 따라서 종래의 제비집 음용화에 따른 문제점을 해결하고 제비집 고유 효능에 더욱 상승적 작용을 부각시켜주는 홍삼을 발효기술을 통하여 효능물질을 극대화하여 배합함으로써 본과제가 추구하는 면역력 증강의 기능에 대한 효능 검증과 제품화를 통하여 베트남 및 동남아 대상의 수출화 제품을 개발하고자 한다.

○ 기술적 중요성

- 홍삼 등의 사포닌계 비배당체는 배당체보다 더 빨리 흡수되고 비배당체가 많은 물질이 관상동맥 심장질환과 같은 만성질환을 예방하는데 효과적이고 비배당체를 섭취했을 때 배당체를 섭취한 것보다 혈중 농도가 더 높다고 보고되어 있다.
- 홍삼의 사포닌 배당체의 **완전 혹은 부분 deglycosidation**은 **부작용의 완화와 함께 새로운 생물활성체**로서의 접근으로 이용될 수 있다.
- 식품이나 생약 소재 배당체의 구조를 식품 미생물을 통해 안전하게 전환시키면 그에 따라 독성, 활성 등이 변화해 새로운 성질을 가진 유도체를 만들어 낼 수 있고, 이러한 전환체는 상대적으로 높은 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있다.

- 인체에 안전한 유산균(GRAS)을 사용하여 독성 및 부작용이 거의 없는 다양한 식품 제형에서 소재로 사용될 수 있다.
- 젖산균이 생산하는 다양한 glycosidase 중 β -glucosidase는 셀룰로스나 β -1,4 당쇄결합을 지니고 있는 기질로부터 포도당을 유리시키는 효소이다.
- 천연물질 배당체는 비 배당체와 당의 결합으로 이루어져 있으며 식물, 동물, 미생물 등 다양한 생물체에 존재하고 있다. 이들 배당체는 다양한 호르몬, 알칼로이드, 플라보노이드 등의 구조를 이루며 다양한 약물과 기능성 물질의 개발에 이용되고 있다.
- 배당체는 자연계에서 존재할 때는 수용성을 부여하여 조직과 세포내에 골고루 분포되어 있으나 인체 내로 섭취된 후에는 상대적으로 장을 통한 혈액내로의 흡수가 낮은 것으로 알려져 있다. 배당체는 생물전환 또는 효소적 전환에 의하여 당이 가수분해 될 수 있다.
- 일반적으로 배당체는 인체의 장내에 있는 미생물에 의하여 비배당체로 전환되어지면 흡수율이 증가하지만 사람마다 장 내의 미생물에 의한 전환율과 전환 결과에 차이가 있다.
- 산과 알칼리의 화학적 처리는 epimerization, hydration, hydroxylation 등을 일으켜 다양한 부 반응산물을 생성하는 단점이 있고 효소 또는 타 미생물을 사용하는 경우에는 안정성에 대하여 고려하여야 한다.
- 이와 같은 점들을 고려하여 볼 때 건강증진 작용을 갖는 프로바이오틱스 균주와 식용 가능한 미생물을 이용하여 천연물 중에 존재하는 배당체의 생리활성 및 관능성을 증가시킬 수 있어 새로운 기능성 식품의 개발에 활용할 수 있다.
- β -Glucosidase등의 효소를 생산하는 유산균을 사용하여 홍삼을 발효시키면 배당체인 사포닌을 비배당체인 ginsenoside로 효율적으로 전환할 수 있고 궁극적으로 생리작용이 우수한 기능성 식품으로 개발 가능하다.
- 면역 (immunity)이란?. 개체가 병원체에 대하여 감수성을 가지고 있지 않거나 또는 감수성이 현저히 약한 상태를 말한다. 전염병을 이겨내거나 약독병원체의 인공감염 또는 각종 병원체에서 만들어진 백신의 주사 등에 의하여 얻어지는데, 후천적으로 얻어지는 면역을 획득면역 또는 후천면역(acquired immunity)이라고 하며 이에 대하여 태어날 때부터 중의 특성으로서 가지고 있는 면역을 천연면역 또는 자연면역 (natural immunity)이라고 한다.
- 천연물로부터 유래한 면역 증강 물질은 면역반응을 강화시키거나 저하된 면역능을 원상회복시킴으로써 암, 면역결핍증, 그리고 만성감염 등의 치료를 위해 사용되고 있다.
- 면역 조절 작용은 생명유지에 있어 가장 근본이 되는 과정으로 암을 비롯한 각종 질병의 발생과 예방이 생체 면역능과 밀접한 관계가 있으며 최근 천연 식물자원을 대상으로 면역능을 강화하고 면역세포를 활성화시킬 수 있는 다양한 연구가 진행되고 있다.

면역질환의 종류와 면역기작

○ 면역질환의 종류



자연면역 (innate immunity)



획득면역 (adaptive immunity)



1-3. 연구개발 범위

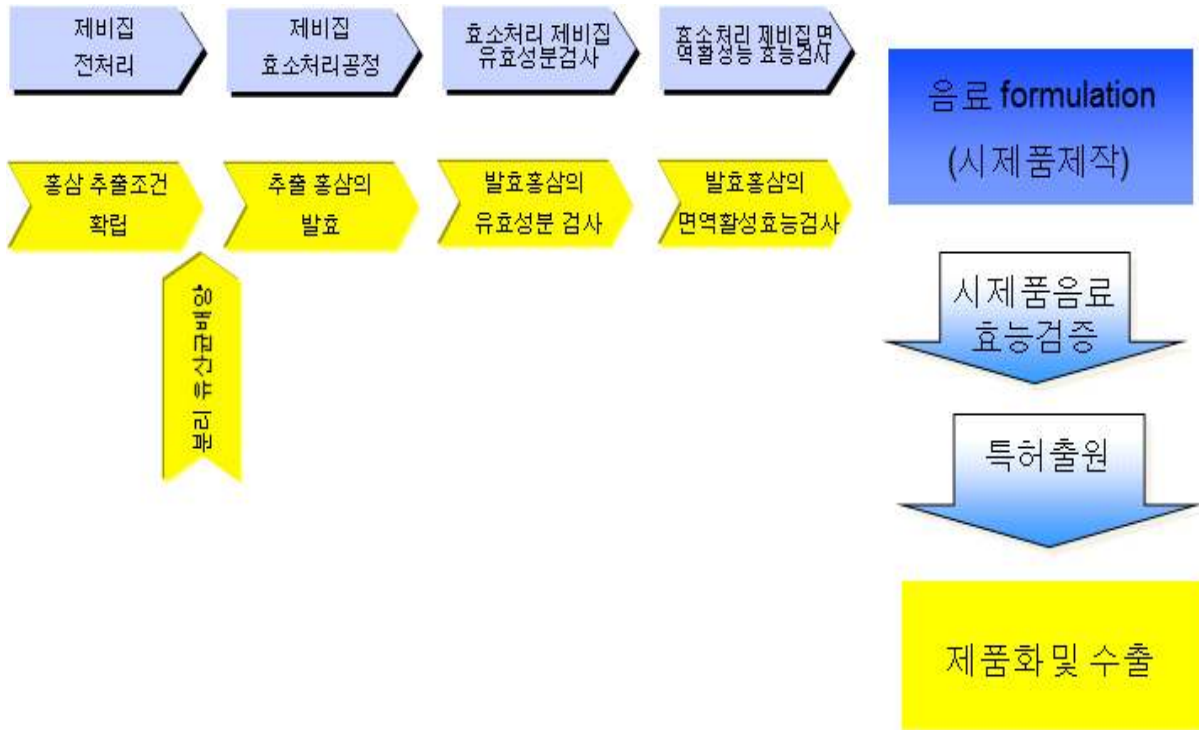
- 효소처리 제비집과 발효홍삼액의 항산화 생리활성 효과
- 효소처리 제비집의 면역증강 효과
- 홍삼 발효 조건 및 발효홍삼의 면역 증강 효과
- 발효홍삼 주성분인 진세노사이드와 제비집 주성분 sialic acid의 성분 데이터 확보
- 음료 시제품 개발

1) 주관연구기관(대구대학교 산학협력단) : 음료개발을 위한 제비집 효소처리 조건 및 홍삼 발효조건

- 주원료(제비집)처리와 활성검증
 - 주원료(제비집)의 유효성분(sialic acid) 검사
 - 원료 처리조건과 원료대비 효소선택과 처리조건 검토
 - 효소처리물의 sialic acid 등의 함량검사
 - 원료액과 효소 처리물의 항산화 검증
 - 효소처리물의 면역활성능 검증
- 주원료(홍삼)의 발효조건과 활성검증
 - 주원료(홍삼)의 발효용 균주의 분리 및 동정
 - 홍삼의 전처리 조건 검토(추출 또는 농축액)
 - 최적발효조건 검토
 - 진세노사이드 등 유효성분 함량 검사
 - Free radical scavenging activity 등 항산화 검증
 - 발효물의 면역활성능 검증
 - fomulation과 관능검사
- 음료 시제품 formulation 및 특허출원

2) 참여기업 1 ((주)프레쉬벨) : 시제품 생산(MOQ) / 패키지 디자인

○ 연구개발 대상의 개념도



1-4. 국내외 기술개발 현황

가. 국내·외 기술 수준 및 시장 현황

(1) 기술현황

(가) 홍삼이란?

- 홍삼은 인삼의 재배 적지에서 생산된 좋은 품질의 6년근 수삼을 엄선하여 껍질을 벗기지 않은 상태로 장시간 증기로 찌서 건조시킨 담황갈색 또는 담적갈색을 띠는 인삼가공품. 즉, 발에서 캔 수삼은 우선 크기와 모양 등을 따져 1~5등급으로 분류하여 씻기, 찌기, 건조를 거쳐 홍삼으로 변한다.
- 홍삼은 인삼과 더불어 우리나라를 비롯한 동양에서 보혈강장 및 불로장생의 영약으로 널리 이용되어 왔다.
- 홍삼은 예부터 한방에서 널리 사용되어진 약용식물로서 사포닌, 관련 화합물과 기타 유용성분의 효능이 과학적으로 널리 입증되어 있다.
- 주성분으로는 사포닌, 정유성분(박테리아와 바이러스 박멸), 폴리아세틸렌(항암작용), 폴리페놀(항산화작용), 알칼로이드(면역기능 조절)등이 있는 것으로 알려져 있다.
- 인삼과 홍삼의 대표적인 효용물질인 인삼 saponin의 gensenoside의 종류는 현재 약 38종이 알려져 있다.

- Major ginsenoside인 Rb₁, Rb₂, Rc, Re, Rg₁이 전체의 80%이상을 차지하고 주로 배당체가 생체에 비특이적으로 작용하고 단백질과 핵산의 합성을 촉진시키고 조혈작용, 간기능회복, 혈당강하, 간기능 향진, 운동수행능력 증대, 항피로작용, 면역력 증대, 항암, 항비만 및 항산화 효과가 있는 것으로 문헌상으로 보고되어 있다.
- 최근에는 Rd, Rg₃, Rh₂ 및 compound K등의 minor ginsenoside의 뛰어난 약리 효능도 밝혀지고 있다.
- 또한 인삼 및 홍삼의 사포닌 성분이 심장과 혈관보강, 혈액기능 회복, 혈류개선 및 혈중 콜레스테롤 함량저하와 배설촉진, 고콜레스테롤 혈중으로 야기되는 혈관병변을 예방하는 효과가 있다고 보고되었다.

(나) 제비집이란?

- 최근에 식품 성분의 기능성이 과학적으로 증명되면서 많은 종류의 재료를 식품 소재로 활용함. 중국 식문화에서 전통식품의 하나인 제비집에 대해서도 상피세포 성장인자 유사 작용과 인플루엔자 바이러스의 감염억제 효능이 보고되어 있다.
- 제비집은 제비가 번식기에 타액을 실 모양으로 길게 뽑아 단단하게 만든 길이 약 6cm, 폭 약 4cm의 반원형의 새 둥우리로 식용이 가능하다.
- 본초강목습유에는 ‘피부를 윤택하게 하며 혈액에 유익해서 생기를 나게 한다’ 라고 소개되어 있으며, 또한 가래를 없애고 천식을 조절하며, 기관지염이나 기침에 특히 효과적인 것으로 기록되어 있다.
- 주요 성분으로는 sialic acid(인플루엔자 바이러스 감염 저해), N-acetylneuraminic acid(세포 간 상호작용 증진) 등이 있는 것으로 알려져 있다.
- 제비집의 주성분은 시알산(sialic acid)을 함유하는 당단백질의 뮤신(mucin)이며 시알산의 함량은 제비집 고형분 중 약 10%를 차지하는 것으로 알려져 있다.
- 시알산은 acetylneuraminic acid 유도체의 총칭으로 9개의 탄소를 갖는 당으로 N-acetylneuraminic acid 및 N-glycoylneuraminic acid의 2종류가 자연계에 존재하는 주요한 분자로 알려져 있다.
- 조류나 사람의 조직에 존재하는 주요 시알산 분자는 주로 N-acetylneuraminic acid이다.
- 시알산은 뮤신 등의 당단백질이나 당지질에서 상쇄의 비환원말단부위에 존재하며 세포막의 수용체로서, 또는 세포 간 상호작용에 중요한 인자로 작용이 알려져 있다.
- 바다제비집(연와)은 동남아시아 여러 나라의 바다 주변의 산과 절벽에 사는 바다제비의 일종인 “금사연”이 목구멍 속의 침샘에서 끈적이는 분비물을 뱉어 내어 누에가 누에고치를 짓듯이 만들며, 산란기에 발달한 침샘으로부터 분비되는 타액을 굳여 약 1개월에 걸쳐 만든다.
- 이들 바다제비집은 현지에서도 특별한 채취인에게만 채취를 허용할 만큼 엄중한 감시 하에 행해지며 연간 채취량도 제한되고 있어 귀중한 식재료로서 현재에도 귀하게 여겨지고 있다.

- 바다제비집으로부터 추출한 추출물의 효능, 효과로는 항바이러스 작용, 미백효과 등이 있다. 각종 인플루엔자바이러스에 대한 저해효과는 Antibiral Res. 70(3) 140-146, 2006에 발표되었으며, 바이러스를 저해하는 효과를 가진 당쇄구조는 제52회 일본약학회(2005)에 발표된바 있다.
- 자연상태의 제비집은 물이나 온수에 잘 녹지 않으며, 20시간 침윤시킨 제비집 물 추출물 중의 단백질 함량은 0%이며 유리 시알산이 약 0.2% 함유되어 있는 것으로 알려져 있다.
- 효소처리 제비집은 효소 처리에 의해 제비집의 단백질은 펩타이드로 분해되지만 시알산을 함유하는 당쇄 부분은 분해되지 않아 제비집의 생리활성 부위를 유지하게 됨.
- 제비집의 음료제조 기술 개발은 국내·외에서 몇가지 방법으로 진행되고 있다.
- 특허 출원번호 10-2005-0056106에는 제비집 및 홍삼엑기스를 활용하고 다양한 첨가물을 활용하여 음료를 조성하는 방법이 기재된바 있다.
- 특허 출원번호 10-2010-0086013은 바다제비집 추출물을 유효성분으로 포함하는 구강위생 증진용 조성물에 대한 내용이 기재되어 있다.
- 특허 출원번호 10-2014-0092286은 콜로이드달 골드 용액을 용매로 하여 제비집 유효성분을 추출하는 방법이 기재되어 있다.
- 바다제비집에 다량의 단백질, 아미노산, 당, 미네랄 및 항산화물질이 함유되어 있으며, 세포재생 촉진, 면역력 증강 등의 효과가 있는 것으로 보고된바 있다.
- 또한 바다제비집내 시알산은 세포내 영양과 보습 및 수분의 함수를 돕고 비타민 C 및 E 함량이 높으며 알부틴과 교질 단백질을 함유하기 때문에 음주로 인한 세포의 기능 보호 및 손상된 간세포의 회복에 도움을 주는 것으로 알려져 있다.
- 기존의 국내 제비집을 활용한 2차상품은 음용이 가능한 제품으로는 제비집과 홍삼엑기스를 함유하는 기능성 음료조성물과 피부미용과 관련한 특허 및 제품들이 있다.

(2) 시장 현황

- 전통적으로 베트남인은 보신(補身)에 관심이 높기 때문에 체력을 보충하고 병을 예방하고자 다양한 기능보조식품을 구매함.
- 베트남의 기능성 식품 성장율은 매년 25~30%로 급성장 중이다. 베트남의 전체 기능성 식품은 수입산 58%, 베트남산 42%로 조사되었다. 해외 기능성식품 수입량이 빠르게 증가 중이며, 2017년까지 수입제품이 전체 기능성 제품 시장의 65~70%를 차지할 것이라고 예상 된다. (출처 : 2014 Kora webzine 해외시장동향)
- 베트남 현지 업체의 제품 개발 요청으로 제품 연구 개발 완료 후 베트남 수출이 가능하고 현재 바이어와 마지막 조율중이다.

- 본 과제의 참여기업인 프레쉬벨은 경상북도 주관 2014~2017년 경북 농식품 무역사절단 10개 업체 중 하나로 선정되어 베트남(호치민, 하노이)과 태국(방콕)에 현지 바이어 섭외 및 수출 상담에 참가하였다.
- 베트남 aT(한국농수산물유통공사)의 소개를 통해 제비집을 공급하는 현지 기업인 **HOANGGIA YEN COMPANY와 국내 홍삼과 제비집을 혼합한 기능성 음료 개발에 관한 기술 협약을 체결한바 있다.**
- 또한 호치민에 위치한 **NAATMING FOODS JSC와 홍삼 및 산양산삼을 활용한 기능성 식품에 관한 유통협약 또한 체결한바 있다.**
- 베트남 시장에서 불고 있는 한류의 열풍으로 인해 한국 제품에 대한 선호도가 증가하고 있는 시점에서 한국산 홍삼과 베트남 및 동남아 등지에서 고급 건강식품으로 선호되는 있는 제비집을 결합한 제품을 출시한다면 충분히 경쟁력이 있을 것으로 예상된다.
- 최근 베트남에서 인삼제품 소비는 증가일로에 있으며, 현지 무역상들은 베트남의 인삼 관련 제품 수입으로 연간 250~300만 달러를 소비했을 것으로 추정된다.
- 하지만 홍삼 및 인삼제품의 경우 중국산의 한국산 둔갑 및 가짜 및 품질이 낮은 제품들로 문제를 겪고 있는 것으로 알려져 있다.
- 베트남 소비자들은 안전, 위생이 검증된 화약제품을 첨가하지 않은 제품이 유익하다고 인식하고 있다.
- 또한, 조사 결과 베트남 양대 도시인 하노이와 호찌민 시에 거주하는 50%가 넘는 성인 인구가 건강보조식품을 구입하는 것으로 나타났다.
- 베트남 건강식품협회는 외국산 수입 기능성 식품은 연간 65~75% 성장할 것으로 예상된다. (출처 : 한국농산물유통공사)
- 기존의 홍삼업체들과 같이 한국에서 인기 있는 제품의 경우도, 실제로는 베트남 시장에서 그리 관심을 받지 못한 경우가 빈번한 것을 알려져 있다.
- 가격협상, 상품개발 및 포장 디자인까지 많은 시간이 소요 됐지만, 결국 성공의 요인인 바이어와 직접적인 교감이 성공의 요소임이 알려져 있다(2014 KBS 하노이).
- 본 과제의 참여기업인 프레쉬벨은 베트남 aT유통공사의 지원 아래 베트남 현지 기업과의 지속적인 교류로 서로 교감한 상태이며, 현지 시장 파악 및 제품 개발 후 베트남 수출 및 공동 마케팅 계획을 수립한 상태이다.
- 베트남에서는 2015년부터 제비집을 원료로 한 다양한 제품들이 출시되어 인기를 끌고 있다.
- 화장품의 경우 제비집 마스크는 2015년 주목해야할 K-beauty 아이템으로 선정된바 있고, 중국에서는 서태후가 바다 제비집을 먹고 동안을 유지했다고 알려져 2014년부터 제비집을 이용한 화장품이 국내 및 중국에서 각광을 받고 있다. ‘새로운 제품에서 승산은 새로운 소재로부터 시작된다.’(근거 :2015. 01 한국경제)

<p>2014 경북농식품 무역사절단 참가 기간:2014 11.23~11.29</p>	<p>파견지역: 베트남(하노이, 호치민)태 국(방콕)</p>
	
	<p>베트남 하노이 현지 기업 NAATMING FOODS. JSC과 산양산삼액기스 판매계약 체결 . 현재 귀사의 베트남 식품 공급 파트너 회사로 새로운 한국의 홍삼 제품 개발 완료시 현지 마트에 입점 진행.</p>
	<p>베트남 제비집 회사의 제품개발 의뢰. 18세기부터베트남 왕궁에 제비집을 가공하고 보관한 가문의 회사로 1950년에 설립. 제비집을 일본 및 해외로 수출하고 있으며 당사에 홍삼과 제비집을 활용한 건강음료 개발을 의뢰.</p>

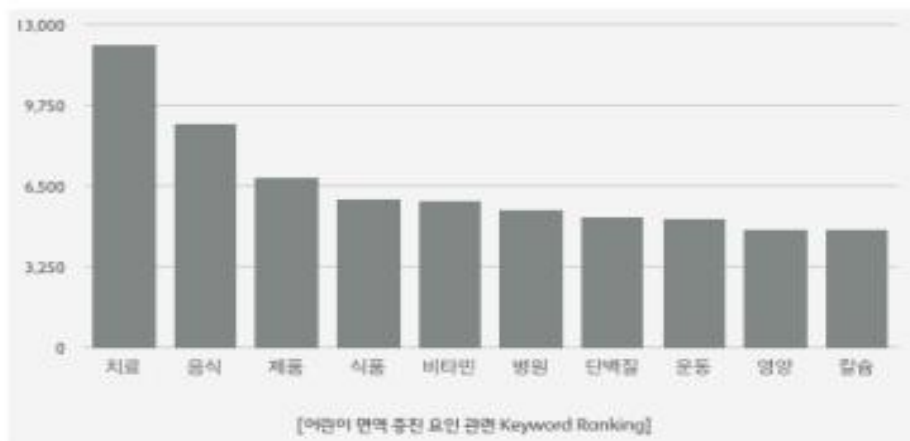
- 또 다른 동남아국가인 태국은 건강에 대한 관심의 증가로 2012년 기준 건강식품에 40억달러 (약 4조4000억)을 지출하였다고 보고되었다.
- 이중 건강음료의 수요는 날로 증가하며, 태국 건강음료시장 규모는 200억에서 255억 바트로 비타민음료에서부터 제비집음료까지 다양한 브랜드와 제품으로 세분화되어 있다.
- 그 중 태국인의 건강음료시장에서 오래도록 굳건하게 자리를 지킨 제품이 바로 제비둥지음료(bird's nest beverage) 인 것으로 알려져 있다.
- 이들은 고영양이 특징으로 명절, 병문안 선물, 수험생을 위한 선물로 인기가 있으며, 특히 Scotch社는 제비둥지음료에 다양한 성분을 첨가해 맛과 영양을 함께 고려하며, 한국산 인삼을 첨가하는 것이 특징인 것으로 알려져 있다. (근거 : KOTRA 보고자료)
- 태국내 한국식품의 인기가 좋아지는 점 등을 고려해 한국에서 식품 소재로 각광 받고 있는 홍삼을 결합한 제비집 음료의 출시를 통한 베트남외 타동남아 시장 진출을 모색할 필요가 있다.

(다) 경제 산업적 중요성

- 천연소재를 미생물의 다양한 효소와 생물전화 시스템에 의해 매우 안전한 새로운 기능 식·의약품을 창출하는 촉매로 작용한다.
- 유산균으로 대표되는 프로바이오틱스 시장이 이처럼 성장한 배경으로는 어린이 장 건강과 인체면역력 증진에 좋다는 소비 인식이 높아지고 있음으로 풀이된다.
- 실제 국내 유산균 시장은 2011년 이후 30%에 가까운 성장률을 기록하고 있고, 업계에서는 2014년 프로바이오틱스의 국내 시장 규모가 1000억 원대로 분석되고 있다.



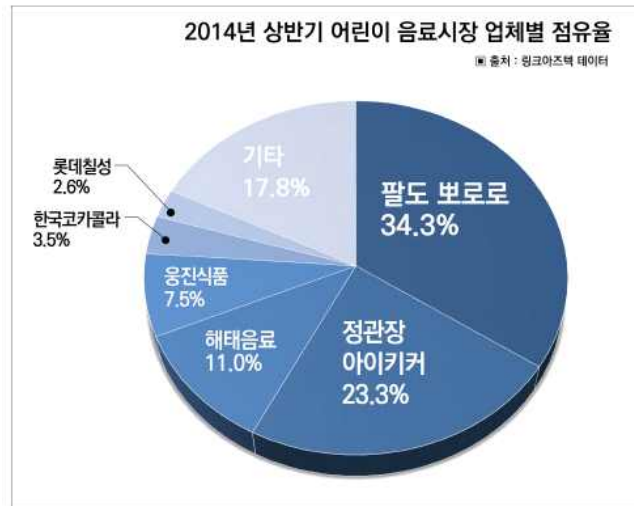
- 면역 시장 Trend 분석



(라) 국내·외 시장 규모

- 전 세계적으로 다양한 생물전환기술을 이용하여 생산되는 제품의 비중은 점차 증가하고 있는 추세로 2010년에는 약 10~20%, 2050년경에는 약 50%에 이를 것으로 전망되고 있다.
- 또한 최근 자녀 건강에 신경 쓰는 부모들이 탄산음료나 고열량 음료보다 맛과 영양을 지녀, 어린이 건강에 맞춘 무첨가 음료를 선호하면서 어린이를 겨냥한 제품도 쏟아지고 있다.

- 식음료업계에 따르면 과즙음료와 홍삼음료가 주를 이루는 어린이 음료시장은 매년 시장 규모가 약 20% 이상 성장하는 추세를 가지고 있다.
- 2010년 한국건강기능식품협회에서 건강기능식품 판매업체 상위 23개사를 대상으로 ‘2009년 건강기능식품 매출액 및 향후 트렌드 전망’ 조사 결과 발표에 따르면, ‘09년 기준 약 2조8000억원, ’10년 규모는 ‘06~’09 연평균 성장률(9.2%)을 감안하여 약 3조원 규모로 추산된다.
- 이러한 성장추세는 인구의 고령화 속도 등을 감안할 때 향후 약 15%대의 성장률로 시장이 확대되어 나갈 것으로 예상된다.



(마) 목표시장의 경쟁현황

□ 국내 시장 현황

- 최근 웰빙이나 로하스 등 건강 지향적 사회 트렌드가 형성되고 있다.
- 식생활의 서구화에 따른 성인병과 생활습관병의 증가로 건강기능식품에 대한 관심과 수요가 증가하고 있다.
- 국내 건강기능식품 매출 통계에 따르면 2009년까지는 수출에 대한 매출액은 거의 전무했으나, 2010년 이후로 해외 매출액은 292억을 이르고 있다.
- 국내 건강기능식품 매출은 2010년 이후로 계속 증가하였고 앞으로도 계속 성장할 것으로 예상되고 있다.
- 국내 시장은 한국인삼공사의 홍삼 매출이 전체 시장의 33%를 차지하고 있어, 특정 기업, 특정 브랜드, 특정 소재의 점유도가 매우 높았고 그 외 한국야쿠르트(4.9%), 코스맥스 바이오(3.5%), 마임(3.5%) 순으로, 1위 업체와의 차이가 매우 크다.
- 건강기능식품 업체 수는 꾸준히 증가(4.8%, 2012)하고 있으며, 최근 LG 생명과학, CJ 등의 식품 대기업과 의약품 업체들도 진출하고 있어 경쟁이 더욱 치열해지고 있다.
- 현재 출시된 건강기능식품의 기능에 따라 살펴보면 체중조절, 간건강, 면역증대, 심혈관, 뼈건강 등을 중심으로 활성화되고 있다.

□ 해외 시장 현황

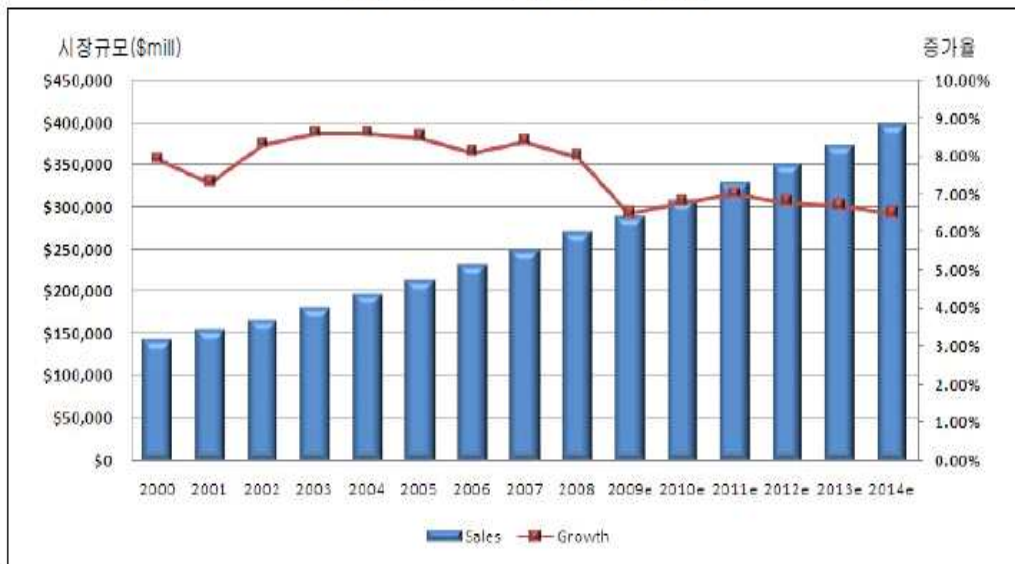
- 전 세계적인 웰빙 트렌드와 고령화 등으로 인하여 건강기능성식품에 대한 수요는 지속적으로 증가하고 있다.
- 미국 시장에는 세계 50여 개의 식품 상위 기업의 1/3 정도가 진출해 있으며 주요 기업으로는 Royal Numico, GNC, Herbal life, NBTY, Wyeth 등이 있다.
- Kellogg, Heinz, Quaker, Unilever, Dupont, Novartis, Abbott laboratories, Glaxo smith kline 등의 식품회사 및 제약회사가 진출하는 움직임을 보이고 있다.

(바) 국내·외 시장 규모

(단위 : 억원)

구 분	현재의 시장규모(2014년)	예상 시장규모(2015년)
세계 시장규모	50,967	53,057
국내 시장규모	15,535	16,312
산출 근거	"Global supplement & nutrition industry report", NBI, 2 "Global nutraceutical industry", frost and surlivan, 2010 "건강기능식품 국내 생산액", 식약처, 2012	

연도별 세계 기능성식품 시장현황



자료: NBJ(Nutrition Business Journal), 2010

가. 연구개발 추진전략

○ 홍삼 발효물과 제비집 효소추출물을 이용한 수출용 면역력 강화 음료 개발

- 대구대학교 산학협력단(주관기관)

: 제비집의 흡수율을 높인 효소처리 생산 기술 개발

: 홍삼의 유산균 발효 상용화 기술개발

: 면역활성능 조사

: 음료의 formulation

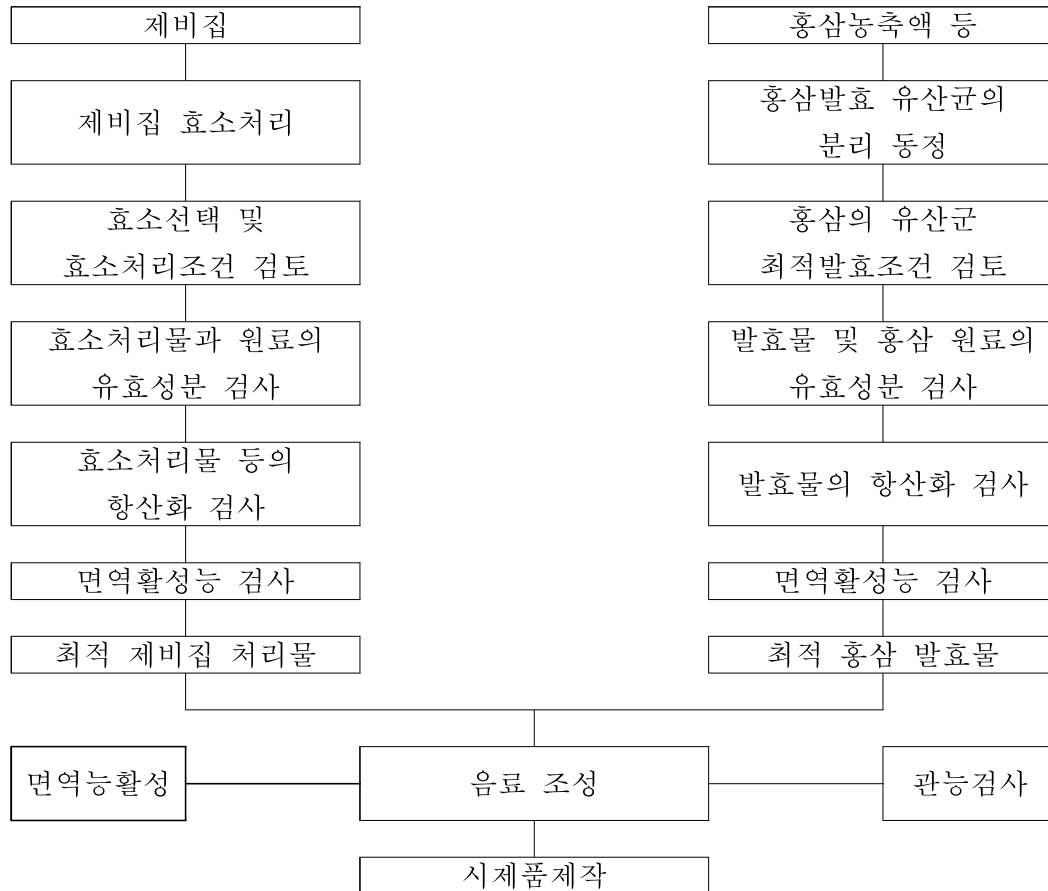
- (주)프레쉬벨(산업체)

: 연구결과 상용화 및 테스트 담당.

: 시제품 생산 및 패키지 디자인 제작 / 베트남 등 해외 관능(미감)테스트 진행

: 해외 수출 마케팅 방안 구축

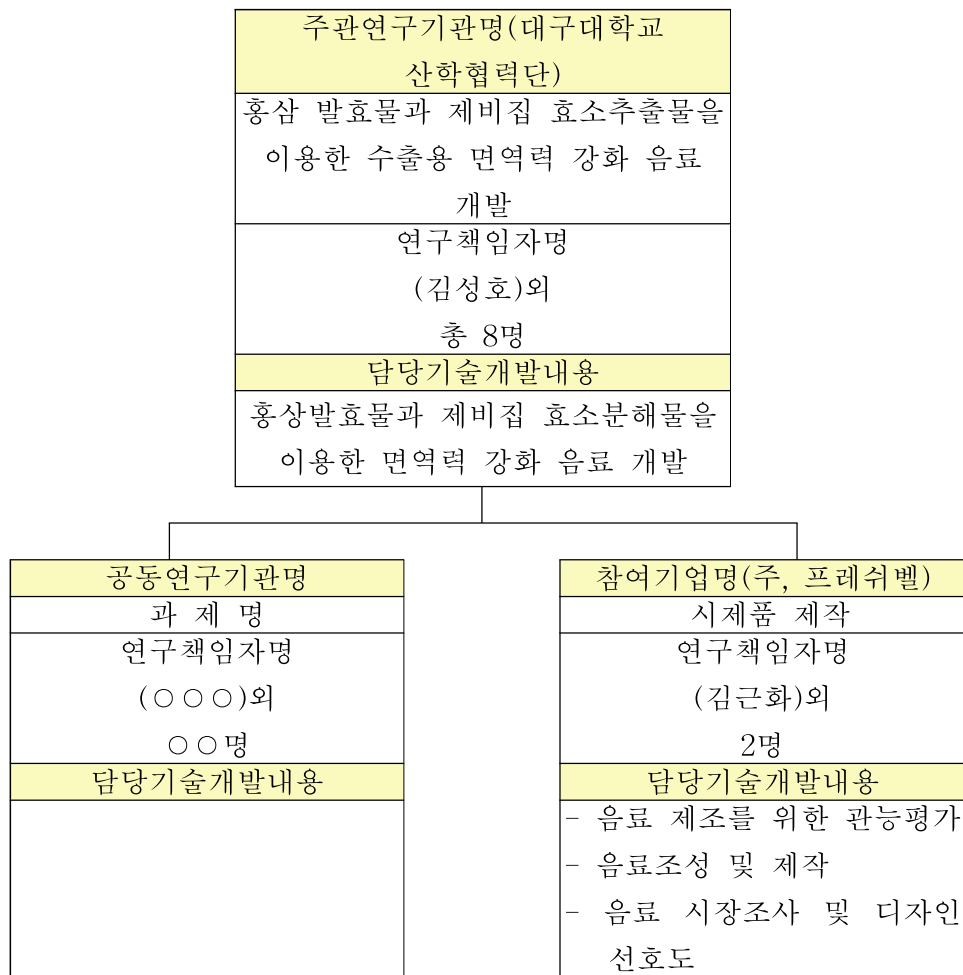
나. 연구개발 추진방법



다. 연구개발 추진체계

연구개발과제		총 참여 연구원
과제명	홍삼 발효물과 제비집 분해물을 이용한 수출용 면역력 강화 음료 개발	주관연구책임자 (김성호)외 총 8명

기관별 참여 현황		
구분	연구기관수	참여연구원수
대학	1	7
중소기업	1	2



라. 연구개발 추진일정

1차년도															
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임 (소속 기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	계획수립 및 자료조사	■													김성 (대구)
2	제비집 효소처리 조건		■	■	■										김성 (대구)
3	제비집 면역활성능				■	■	■								김성 (대구)
4	홍삼 처리 조건				■	■	■								김성 (대구)
5	홍삼 발효 조건					■	■	■	■						김성 (대구)
6	홍삼발효물의 면역활성능							■	■	■					김성 (대구)
7	음료조성 및 관능검사									■	■				김성 (대구)
8	시제품 생산											■	■		김근 (프레쉬)
9	특허출원 1건												■		김성 (대구)

2. 연구수행내용 및 성과

가. 재료 및 방법

실험재료

본 연구에서 사용된 제비집은 2016년에 베트남에서 수입된 것을 (주)프레쉬벨에서 제공 받아 실험에 사용하였으며, 홍삼농축액(일화홍삼농축액, 60 °Brix, 홍삼 100% (6년근 국산; 홍삼근:홍미삼=6:4)은 (주)신우코퍼레이션(ShinWoo Co., Ltd, Anyang Korea)에서 구입한 것으로 4℃ 냉장보관하면서 사용하였다.

유산균 분리

유산균 분리에 사용한 김치 시료는 대구와 경상시 부근의 가정집 및 음식점에서 담근 김치 수십 종을 수집하여 시료로 사용하였으며, 각 김치의 김치액을 멸균증류수로 10^{-1} ~ 10^{-5} 으로 희석한 후 0.004% Bromocresol purple(BCP)가 첨가된 MRS agar 배지에 100 µl씩 도말하고, 37℃에서 24시간 배양 후 나타난 독립된 colony 중 특징적인 colony를 순수 분리하였다. 순수 분리한 유산균은 MRS agar plate에 접종하여 37℃에서 24시간 배양한 후 4℃ 냉장 보관하면서 사용하였다.

β-Glucosidase 활성 균주 선발

β-glucosidase 활성을 갖는 균주의 선발을 위해 esculin agar(esculin 0.1%, peptones 1.8%, ferric citrate 0.1%, agar 2%)¹⁾을 이용하여 esculin이 함유된 esculin agar 배지에 균주를 접종하여 배지 내에서의 색깔 변화를 관찰하였다. Esculin은 β-glucosidase에 의하여 glucose와 esculin으로 분리되며 esculin은 ferric ammonium citrate와 반응하여 colony 주위에 black complex를 형성하게 된다(Fig 1). 따라서 colony 주위에 black complex를 형성하는 균주를 β-glucosidase 활성을 가지는 균주로 판단하였다.

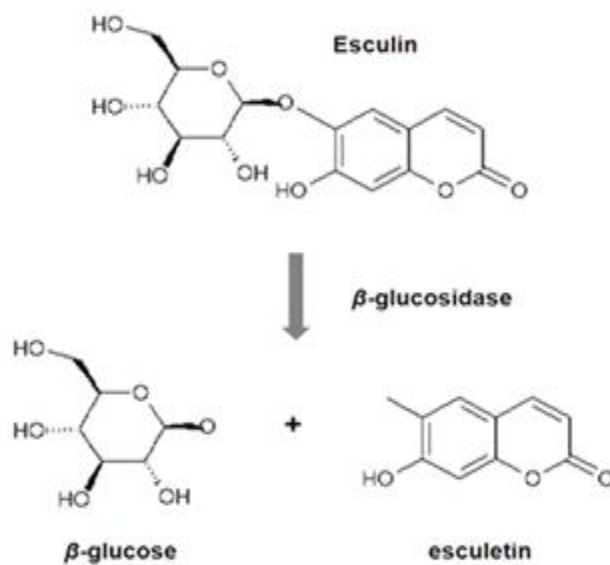


Fig 1. Decomposition of esculin into β-glucose and esculetin by β-glucosidase.

β-Glucosidase 활성능 측정

β-Glucosidase 활성 측정²⁾은 1% CMC(carboxymethyl cellulose)가 첨가된 MRS 배지에 12시간 전배양한 균주를 접종하여 37°C에서 24시간 배양 후, 배양액을 4°C에서 5,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 세포를 제거하고, 상층액 0.5 ml를 취하여 1 ml의 5 mM p-NPG 용액과 혼합한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응액은 1 ml의 1M Na₂CO₃용액을 첨가하여 반응을 중지시키고, 생성된 p-NP(p-nitrophenol) 405 nm에서 흡광도를 측정 한 후 p-NP의 검량곡선을 이용하여 농도를 환산하였다.

선발균주의 염기서열분석과 계통분류

선발균주의 16S rRNA gene은 sequencing을 통하여 분석하였으며, NCBI data base를 이용하여 분리된 균주와 type strain의 similarity(%)를 확인하였다³⁾.

내담즙성 시험

분리된 균주의 내담즙성은 MRS 액체배지에 0.3% bile extract을 첨가하고, 분리된 균주들을 2%씩 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였으며, 배양종료 후 BCP 한천배지에서 생균수를 측정하였다⁴⁾.

내산성 시험

분리된 균주의 내산성 시험은 1N HCl을 증류수에 희석하여 MRS 산성 broth (pH 1, 2, 3, 4)를 준비하고 37°C MRS broth에서 24시간 배양된 균주를 10⁷ CFU/ml 수준으로 접종하여 37°C에서 3시간 동안 배양하고, BCP 한천배지에서 생균수를 측정하였다.

홍삼 농축액의 유산발효 검토

위 선별된 유산균의 생장을 조사하기 위해 5% 홍삼 농축액과 5% 홍삼 농축액에 과즙 농축액을 1% 첨가하여 홍삼-과즙 혼합물을 시험액으로 사용하였으며, 85°C에서 30분간 살균 후, 12시간 전배양한 균주를 3% 접종 후 37°C에서 12일간 발효하였다.

pH 및 산도 변화

pH는 pH meter(Mettler Toledo Group, Switzerland)를 사용하였으며, 적정산도는 0.1 N NaOH용액으로 pH 8.3으로 중화 적정하여 소비된 0.1 N NaOH용액을 lactic acid 함량 (%)으로 환산하였다.

진세노사이드 함량 변화

진세노사이드 함량⁵⁾은 시료 용액을 0.45 μm membrane filter로 여과한 후, Alliance e2695 HPLC System (Waters Co., Milford, MA, USA)로 분석하였다. 이때의 HPLC의 분석조건은 Table 1에 나타내었다. 표준품은 ginsenoside Rg1, Re, Rb1, Rd, Rg3, Compound-K(ChromaDex Co., Irvine, CA, USA)를 이용하여 표준 검량선을 작성한 후 각각의 함량을 계산하였다.

Table 1. Operating conditions of HPLC for the analysis of gallic acid

Instrument	Conditions		
Column	XBridge™ C18 column (150 × 4.6 mm I.d., particle size 5 μm)		
Mobile phase A	Water		
Mobile phase B	Acetonitrile		
Flow rate	1.0 ml/min		
Gradient(%)	Time (min)	Profile	
		A	B
	0	80	20
	5	80	20
	20	77	23
	25	70	30
	30	60	40
	35	50	50
	60	15	85
	62	15	85
65	80	20	
70	80	20	
Injection volume	10 μl		
Oven temperature	30°C		
Detection	PDA 203 nm		

제비집 가수분해 효소

실험에 사용한 단백질 분해 효소로는 Alcalase 2.4 L(Novozyme, Bagsvaerd, Denmark), Flavourzyme 500 MG(Novozyme), Neutrase 0.8 L(Novozyme), Protamex(Novozyme)를 사용하였다. 실험에 사용한 가수분해 효소의 최적온도와 pH는 Alcalase 2.4 L(60°C, pH 7.0), Flavourzyme 500 MG(50°C, pH 7.0), Neutrase 0.8 L(50°C, pH 6.5), Protamex(50°C, pH 6.0)이었다.

제비집의 효소처리

제비집은 분말시료를 증류수 100배에 분산시킨 후 90°C에서 30분간 열처리 후 냉각하여 실험에 사용하였다. 효소처리를 위한 효소의 양은 기질 대비 20%로 하였으며, 가수분해는 효소의 최적온도와 pH에서 90분 동안 처리하였다. 처리가 끝난 즉시 효소처리균은 85°C에서 15분간 열처리 하여 효소를 불활성화하고 원심분리를 이용하여 원심분리 한 후 상등액을 취하여 sialic acid 함량 측정의 시료를 사용하였다.

Sialic acid 함량 분석

Sialic acid 함량⁶⁾은 시료 용액을 8 mM 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene dihydrochloride (DMB), 1.5 M acetic acid, 14 mM sodium hydrosulfite and 0.8 M β -mercaptoethanol) reagent를 혼합 후 80°C의 heater block에서 60분 반응 후 실온으로 냉각하여 0.45 μ m membrane filter로 여과한 후, Alliance e2695 HPLC System (Waters Co., Milford, MA, USA)로 분석하였다. 분석조건은 Table 2에 나타내었다. 표준품은 sialic acid(Sigma Chemical Co.)를 이용하여 표준 검량선을 작성한 후 각각의 함량을 계산하였다.

Table 2. Operating conditions of HPLC for the analysis of sialic acid

Instrument	Conditions
Column	Venusil XBP C18 (250 × 4.6 mm I.d., particle size 5 μ m)
Mobile phase	Water : Methanol : Acetonitrile = 85 : 7 : 8 (v/v/v)
Flow rate	0.9 ml/min
Injection volume	10 μ l
Oven temperature	33°C
Detector	λ_{exc} = 373 nm, λ_{em} = 448 nm, gain 1, attenuation 64, response 5s

효소분해 조건 최적화를 위한 실험계획

제비집의 효소처리조건을 최적화하기 위하여 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)⁷⁾을 이용하였다. 효소처리조건은 중심합성계획법(Central Composite Design, CCD)⁸⁾을 이용하여 효소농도(7~23%), 반응온도(40~60°C) 및 반응시간(90~210 min)의 범위를 설정하였다. 독립변수로서 효소농도(X_1 , %), 반응온도(X_2 , °C) 및 반응 시간(X_3 , min)을 설정하고 종속변수는 효소분해 후 생성된 sialic acid(Y_{SA} , mg/100 g)로 지정하여 실험을 설계하였으며 Table 3과 4에 나타냈다. 또한 효소분해 조건이 제비집 효소분해물의 sialic acid 함량에 미치는 영향을 예측된 모델식을 바탕으로 Mathematica program⁹⁾을 이용하여 4차원 반응표면분석으로 해석하였다.

Table 3. Experimental design of enzyme hydrolysis condition for bird's(Sea swallow) nest

Parameter	-2	-1	0	1	2
X_1 E/S (%)	7	11	15	19	23
X_2 Temp.(°C)	40	45	50	55	60
X_3 Time (minutes)	90	120	150	180	210

Table 4. Central composite design for the optimization of hydrolysis condition for bird's(Sea swallow) nest

Experiment number ¹⁾	Hydrolysis condition		
	E/S (%)	Temp.(°C)	Time (minutes)
1	19	55	180
2	19	55	120
3	19	45	180
4	19	45	120
5	11	55	180
6	11	55	120
7	11	45	180
8	11	45	120
9	15	50	150
10	15	50	150
11	15	50	150
12	15	50	150
13	15	50	150
14	15	50	150
15	23	50	150
16	7	50	150
17	15	60	150
18	15	40	150
19	15	50	180
20	15	50	90

¹⁾The number of experimental condition by central composite design.

홍삼농축액 유산발효조건 최적화

진세노사이드 전환을 위한 홍삼농축액의 유산발효조건을 최적화하기 위하여 중심합성 계획법(central composite design)에 따라 Table 5와 같은 발효시간(X_1)과 과즙농축액 첨가 농도(X_2)를 독립변수로 설정하고, 반응표면분석(response surface methodology, RSM)¹⁰⁾에 의하여 설정한 13가지 발효조건으로 홍삼농축액을 발효하였다(Table 6). 각 종속변수에 대한 회귀 방정식을 얻어 발효조건에서 독립변수의 상호영향 및 최적 발효조건을 구하였다. 발효조건에 의한 예측은 SAS(Statistical Analysis System) program을 사용하였다. 중심합성계획에서 독립변수(X_n)는 발효시간(4~20일, X_1) 및 과즙농축액 첨가 농도(0~2%, X_2)이며 실험계획은 -2, -1, 0, 1, 2 다섯 단계로 부화화하여 실험값을 나타내었다. 최적 발효조건과 관련된 종속변수(Y_n)으로는 생육도, pH, 산도, 진세노사이드 함량 및 유기산 함량으로 각각 나타내었다.

Table 5. Experimental design of fermentation conditions for red ginseng extract

Parameter	-2	-1	0	1	2
X_1 Time (day)	4	8	12	16	20
X_2 Sub material concentration (%)	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0

Table 6. Central composite design for the optimization of lactic acid bacteria fermentation condition for red ginseng extract

Exp. No ¹⁾	Fermentation conditions	
	Time (day)	Sub material concentration (%)
1	16	1.5
2	16	0.5
3	8	1.5
4	8	0.5
5	12	1.0
6	12	1.0
7	12	1.0
8	12	1.0
9	12	1.0
10	20	1.0
11	4	1.0
12	12	2.0
13	12	0.0

¹⁾The number of experimental condition by central composite design.

발효

5% 홍삼농축액을 기본 배지로 하여 실험계획에 따라 과즙농축액(62 °brix) 첨가량을 달리하여, MRS broth 배지에 12시간 전배양된 최종분리된 유산균주 *Lactobacillus plantarum* DU. LAB. H01을 종균으로 하여 3% 접종 후 발효시간을 달리하여 발효하였다.

생육도, pH 및 산도 측정

유산균의 생육도는 Spectrophotometer(Optizen 2120UV, Mecasys co., Ltd., Korea)로 660nm에서 흡광도를 측정하였다. pH는 pH meter(Metter Toledo Group, Switzerland)를 사용하여, 적정 산도는 0.1 N NaOH용액으로 pH 8.3으로 중화 적정하여 소비된 0.1 N NaOH용액을 lactic acid 함량(%)으로 환산하였다.

유기산 분석 함량 측정

유기산 분석을 위해 시료를 0.45 µm membrane filter로 여과하여 HPLC로 분석하였다. 유기산 분석조건은 Aminex[®]HPX-87H(7.5×300 mm, 9 µm, BIO-RAD Laboratories, USA)를 사용하여 5 mM sulfuric acid를 유속 0.6 ml/min의 조건으로 PDA 214 nm에서 분석하였다¹¹⁾. 모든 표준물질은 Sigma-Aldrich Co.(St, Louis, MO, USA) 제품으로 사용하였다.

총 페놀성 화합물 함량 측정

시료의 총 페놀성 화합물 함량은 Folin-Denis 법¹²⁾에 의해 비색정량하였다. 시료 1 ml에 phenol reagent 1 ml를 가하여 3분간 정치한 후 10% Na₂CO₃ 1 ml를 혼합하고 1시간 실온에서 방치하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 gallic acid 용액으로 작성하였다.

DPPH 라디칼 소거능

시료의 전자공여능은 α,α'-diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH)¹³⁾을 사용한 방법으로 측정하였다. 즉, DPPH 시약 12 mg을 absolute ethanol 100 ml에 용해한 후 50% ethanol 용액을 첨가하여 DPPH 용액의 흡광도를 517 nm에서 약 1.0으로 조정한 후, 추출액 0.5 ml에 DPPH 용액 5 ml를 혼합하여 흡광도를 측정하였다.

세포 배양

본 연구에 사용된 대식세포주인 RAW 264.7(KTCC No. 40071) 세포와 T세포주인 Molt-4(KTCC No. 21582) 세포는 한국세포주은행(KTCC, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. RAW 264.7 세포는 DMEM 배지에 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin 을 첨가해 만든 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 또한 Molt-4 세포는 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin을 함유한 RPMI 1640 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂로 조절된 incubator에서 배양하였다¹⁴⁾.

세포독성

발효홍삼액과 제비집 가수분해물이 RAW 264.7 세포에 나타내는 세포독성 유발 효과를 알아보기 위하여 각 시료의 세포독성은 MTT assay를 통해 측정하였다¹⁵⁾. RAW 264.7 세포(1×10^4 cells/well)를 96-well plate에 100 μ l씩 분주하고 24시간 동안 안정화 시킨 뒤 발효홍삼액과 제비집 가수분해물을 농도별(25, 50, 100 μ g/ml)로 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배양 후 5 mg/ml 농도의 MTT 시약을 20 μ l씩 첨가하여 2시간 추가배양하고 MTT 시약을 제거하였다. 그 후 각 well에 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가하여 생성된 formazan을 녹여 이를 Microplate reader(BioTek Etx 800-PC, Winoski, VT, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생존율은 대조군에 대한 처리군의 흡광도 비를 백분율로 표시하여 계산하였다.

T세포 증식

발효홍삼액과 제비집 가수분해물의 T세포에 대한 증식능을 확인하기 위하여 Molt-4 세포를 96-well plate에 1×10^4 cells/well 농도로 분주 후 양성대조군으로 concanvalin A (Con A) 5 μ g/ml와 발효홍삼액과 제비집 가수분해물을 25, 50, 100 μ g/ml로 각각 처리한 후 96시간 배양하여 MTT assay를 실시하였다. 배양 후 5 mg/ml 농도의 MTT를 넣고, 빛을 차단한 상태에서 4시간 동안 37°C incubator에서 반응시킨 후 DMSO로 형성된 formazan을 용해하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 증식능은 시료 대신 동량의 배지를 넣은 대조군의 흡광도 대비 상대적인 값으로 나타내었다.

Nitric oxide(NO) 생성량 측정

Griess 반응¹⁶⁾을 이용하여 배양액 내에 존재하는 nitrite 농도를 측정하였다. RAW 264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 2.5×10^5 cells/ml의 농도로 96-well plate에 접종하고, 5% CO₂ incubator (MCO-15AC, Sanyo, Japan)에서 20시간 전 배양하였다. 세포에 1 μ g/ml의 LPS와 발효홍삼농축액과 제비집가수분해물을 각 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. 배양액의 상층액을 얻은 후, 상층액과 griess 시약(1% sulfanilamide + 0.1% naphthylendiamine dihydrochloride, 1:1)을 실온에서 10분간 반응시키고, microplate reader (Model 550)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 배양액 내 NO의 농도는 sodium nitrite (NaNO₂)의 농도별 표준곡선과 비교하여 산출하였다.

Cytokine 생성량

Cytokine인 TNF- α , IL-2, IL-6, IL-10의 생성량 측정¹⁷⁾은 RAW 264.7 세포를 96-well plate에 2.5×10^5 cells/ml의 농도로 분주 24시간 후 각 시료를 농도별로 처리하고 24시간 배양 후 세포의 배양액을 이용하여 ELISA kit(Komabiotech Inc., Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였다. 측정방법은 단일클론항체가 코팅된 micro plate를 세척한 후 시료를

넣은 다음 실온에서 반응시킨 후 제공된 washing solution으로 세척하였다. 이어 다중클론성 항체를 넣어 각각의 cytokine을 plate에 부착시킨 후 실온에서 반응시키고, 세척 후 측정하고자 하는 cytokine의 conjugate 용액을 넣고 반응시켰다. 반응시킨 후 plate를 washing solution으로 다시 세척하고 color development reagent로 실온에서 발색시킨 다음 stop solution을 넣어 발색반응을 정지시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

나. 결과 및 고찰

발효식품으로부터 유산균 분리

가정집과 식당 및 시장 등지에서 수집한 각종 김치 시료를 멸균증류수를 이용하여 $10^1 \sim 10^5$ 으로 희석하여 MRS agar plate에 도말하여 37°C에서 배양한 후, 균주의 크기, 색, 모양, 투명도 등을 관찰하여, 15종의 유산균을 1차 분리하였다. 일부 발효식품에서는 숙성에 따라 유산균이 거의 검출되지 않는 시료도 있었으며, 발효식품의 종류와 숙성도에 따른 colony의 분포는 달랐으며 희석배수가 $10^{-3} \sim 10^{-5}$ 일때 균주의 분리가 가장 용이하였다. 발효식품으로부터 분리한 균주는 LAB DUIH 1~LAB DUIH 16으로 명명하였으며 분리한 균주는 계대배양을 실시하여 단독 colony를 순수분리 하였다. 최종 분리된 유산균은 MRS 배지상 BCP를 환원하여 전형적인 노란색으로 변화시켰고 전형적인 유산균종의 형태를 보였다(Fig. 2).

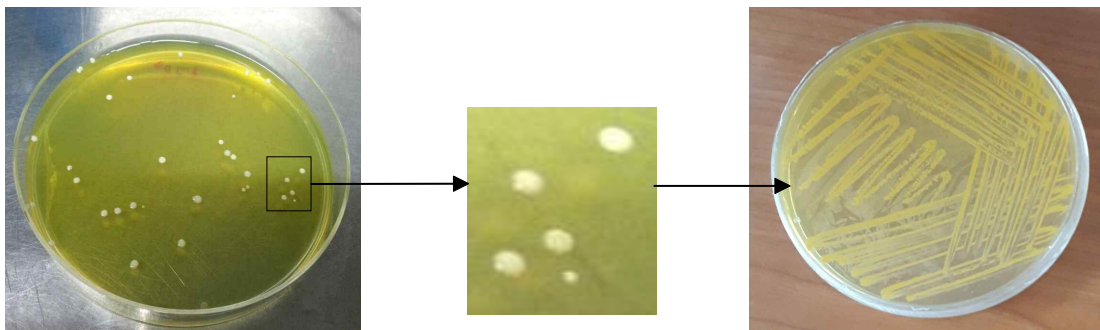


Fig. 2. Screening of lactic acid bacteria on MRS medium from fermentation food

β -glucosidase 활성 균주 Screening

β -glucosidase는 esculin의 beta-glucose를 절단하고 이때 생성된 esculetin이 배지 내에 있던 ferric ammonium citrate와 반응하여 plate 상의 colony 주위에 black complex를 형성하게 된다¹⁾. 발효식품에서 분리한 유산균주들을 esculin agar를 이용하여 배양을 실시한 후 colony 주변에 black complex를 형성한 균주를 β -glucosidase 활성 균주로 간주 하였다. 분리한 균주 16주 중, 12주에서 colony 주변에 black circle을 형성하여 β -glucosidase 활성이있는 것으로 나타났다(Fig. 3).

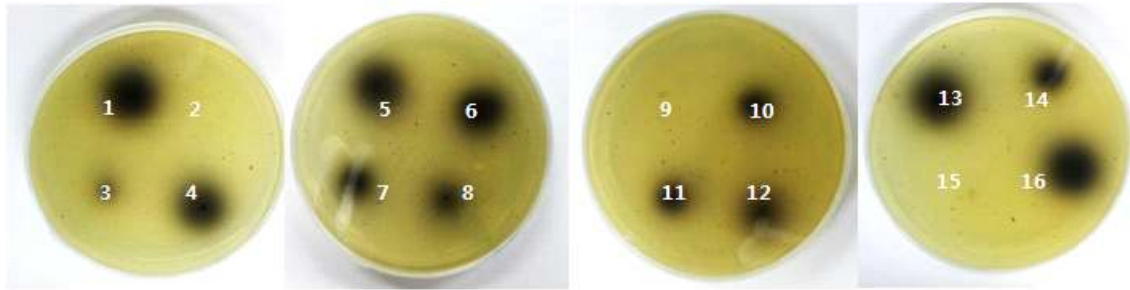


Fig. 3. Esculin agar to screening lactic acid bacteria producing β -glucosidase activity.

분리 유산균주의 β -glucosidase 활성능 측정

Esculin agar를 이용하여 colony 주변에 black complex를 형성 여부에 따라 β -glucosidase 활성을 확인한 균주를 in vitro 법에 따라 정확한 효소활성¹⁸⁾을 다시 측정하였다. 그 결과는 Table 7에서 보는 바와 같이 DU. LAB. H01 13.36 U/ml, DU. LAB. H16 11.56 U/ml, DU. LAB. H05 10.04 U/ml, DU. LAB. H13 9.91 U/ml 순으로 16 균주 중 높은 활성을 보였으며, 그 중 LAB DU. LAB. H01이 가장 높은 활성을 나타냈다.

Table 7. β -Glucosidase activity of screening lactic acid bacteria

Sample	Activity(U/mL)
DU. LAB. H01	13.36±1.73
DU. LAB. H02	0.61±0.05
DU. LAB. H03	1.12±0.13
DU. LAB. H04	5.99±1.46
DU. LAB. H05	10.04±2.71
DU. LAB. H06	9.82±1.89
DU. LAB. H07	5.44±0.66
DU. LAB. H08	3.82±0.51
DU. LAB. H09	0.33±0.02
DU. LAB. H10	6.70±0.67
DU. LAB. H11	6.24±0.99
DU. LAB. H12	6.11±1.40
DU. LAB. H13	9.91±1.39
DU. LAB. H14	4.36±0.96
DU. LAB. H15	0.10±0.01
DU. LAB. H16	11.56±1.19

β-glucosidase 활성균주의 염기서열분석과 계통분류

최종 분리된 균주 중 β-glucosidase활성능이 가장 높은 1균주를 16S rRNA gene의 염기서열을 분석하여 NCBI blast DB와 비교한 결과(Table 8) *Lactobacillus plantarum* strain JCM 1149 균주와 100%의 유사성을 보여 분리된 균주를 *Lactobacillus plantarum* 으로 동정하고 *Lactobacillus plantarum* DU. LAB. H01로 명명하였다.

Table 8. Result of 16s rDNA partial sequencing

Standard strain	Difference/compared	Similarity
<i>Lactobacillus plantarum</i> strain JCM 1149	0/1435	100%
<i>Lactobacillus plantarum</i> strain NBRC 15891	1/1435	99%
<i>Lactobacillus plantarum</i> strain CIP 103151	1/1435	99%
<i>Lactobacillus plantarum</i> strain JCM 1149	1/1435	99%
<i>Lactobacillus pentosus</i> strain 124-2	1/1435	99%

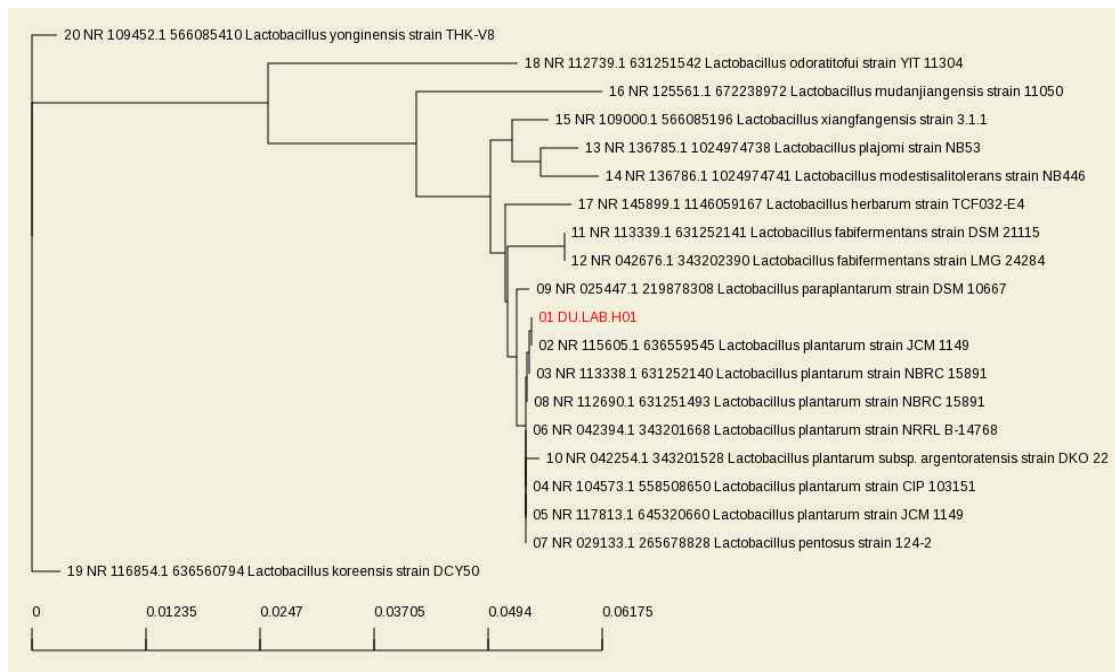


Fig 4. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence, showing the phylogenetic relationships among strain DU. LAB. H01 isolated and related species.

내담즙성 및 내산성

최종 분리·동정된 *Lactobacillus plantarum* DU. LAB. H01의 내담즙성과 내산성 측정은 bile extract 0.3%와 pH 2.5의 조건에서 성장상태를 bile extract 무첨가구(control)와 pH 5.7(control)에서의 성장과 비교¹⁹⁾하였으며, 37°C에서 24시간 동안 실험하여 실험한 결과는 Fig. 5와 같다. Bile extract 첨가구에서는 무첨가구와 비교할 때 성장율이 다소 억제되기는 하였으나, 내성이 강한 성장상태를 보였다. 분리균의 내산성은 위산과 유사한 pH에서 유산균주의 생존여부를 관찰한 결과 pH 2.5에서 어느 정도 생존력을 보였다.

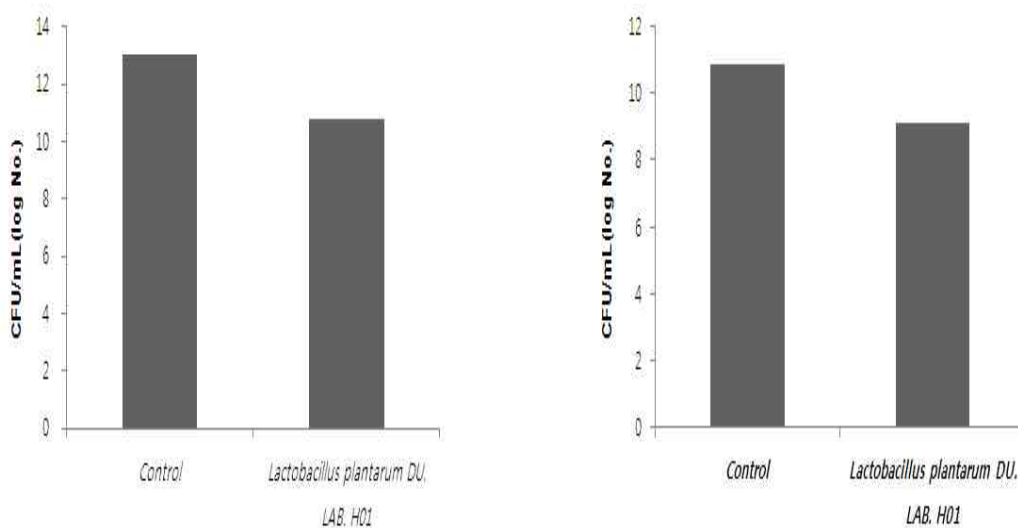


Fig. 5. Bile and acid tolerance of *Lactobacillus plantarum* DU. LAB. H01

홍삼농축액의 발효시 pH 및 산도 변화

37°C에서 12일간 발효 과정 시 2~3일 간격으로 pH 변화를 측정된 결과 Fig. 5와 같다. 발효 전, 5% 홍삼 농축액의 pH는 4.96이었고, 3일째 3.95로 급격히 pH가 떨어졌으며, 발효 3일 이후에는 pH의 변화가 거의 나타나지 않았다. 또한 5% 홍삼 농축액에 과즙농축액을 1% 첨가하여 발효한 결과는 발효 전 pH가 5.09였으며, 발효 3일째 3.91이었으며, 그 후의 발효과정 동안에는 pH 변화가 거의 없는 것으로 나타났다. 5% 홍삼농축액을 단독 발효 한 것 보다 과즙 농축액 1%를 첨가한 5% 홍삼농축액 발효물의 pH가 낮은 것으로 나타나 효과적인 유산 발효가 일어난 것으로 보인다. 12일간의 발효 과정 중 5% 홍삼농축액과 5% 홍삼농축액-1% 과즙농축액 혼합액의 산도 변화는 Fig. 6과 같다. 발효 0일째 두 시험군의 산도는 0.30%이었고, 발효가 진행됨에 따라 산도는 점점 증가하여 발효 3일째 각각 0.85%와 1.04%로 나타났으며, 그 이후에는 큰 변화가 없었다. 5% 홍삼 농축액의 경우 발효 전 홍삼농축액 보다 산도가 0.55% 증가하였으며, 홍삼-과즙 농축액 혼합의 경우는 산도가 0.74% 증가하여 홍삼농축액 단독 발효보다는 과즙 농축액을 첨가하여 발효할 경우 산도의 증가량이 더 큰 것으로 나타났다.

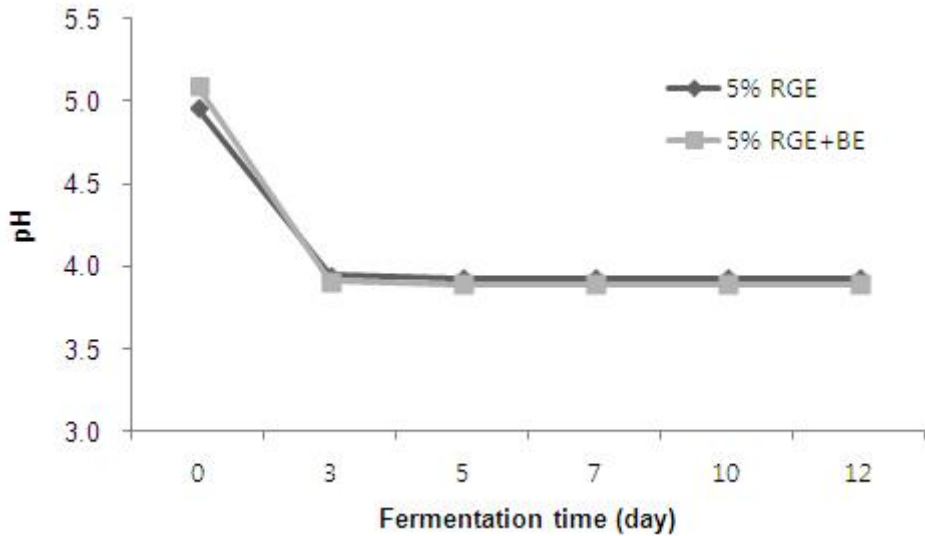


Fig. 5. Change of pH in fermented 5% red ginseng extract using *Lactobacillus plantarum* DU. LAB. H01

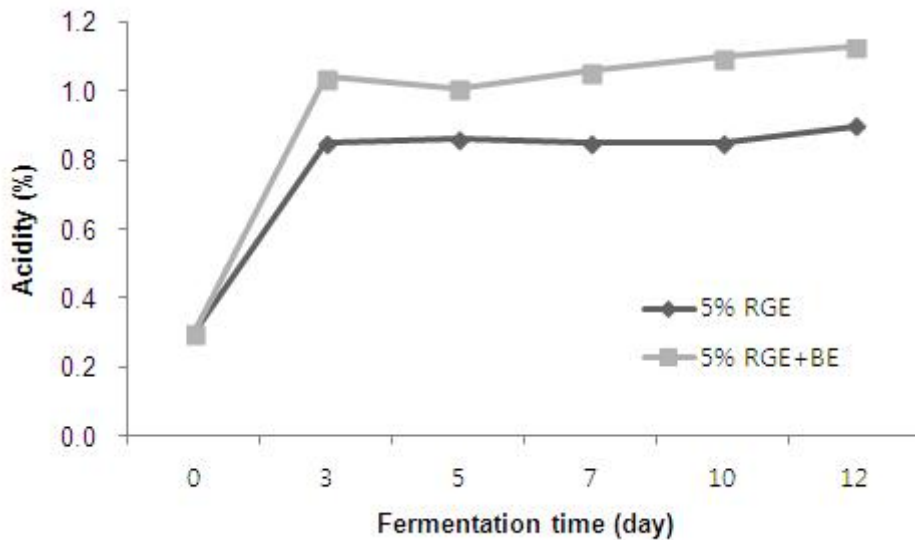


Fig. 6. Change of acidity in fermented 5% red ginseng extract using *Lactobacillus plantarum* DU. LAB. H01.

발효 홍삼액의 진세노사이드 함량 변화²⁰⁾

발효 홍삼액의 진세노사이드 함량 변화는 Table 9와 같다. 전반적으로 major saponin(Rg₁, Re, Rb₁, Rd)함량은 발효시간이 길어질수록 점점 감소하고 minor saponin(Rg₃, compound-K)의 함량은 발효시간이 길어질수록 점점 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 *Lactobacillus plantarum* DU. LAB. H01균주를 이용하여 홍삼을 발효할 경우의 진세노사이드 전환이 일어남을 알 수 있었다.

Table 9. Change of acidity in fermented 5% red ginseng extract using *Lactobacillus plantarum* DU. LAB. H01

Ginsenosides ($\mu\text{g/ml}$)	Materials ¹⁾	Fermentation time (Day)					
		0	3	5	7	9	12
Rg1	5% RGC	88.16	67.90	44.83	38.12	22.02	17.81
	5% RGE + 1% FC	80.63	31.06	45.39	35.39	20.34	12.11
Re	5% RGC	128.55	118.07	67.22	52.02	35.89	30.92
	5% RGE + 1% FC	151.17	45.66	72.34	53.12	35.07	22.79
Rb1	5% RGC	450.02	381.84	375.27	371.68	321.59	294.33
	5% RGE + 1% FC	470.72	341.90	378.35	328.12	300.96	281.06
Rc	5% RGC	108.82	112.86	106.33	100.18	90.38	82.02
	5% RGE + 1% FC	80.56	93.12	94.01	91.36	97.53	95.93
Rd	5% RGC	64.51	74.04	63.67	65.42	61.10	56.79
	5% RGE + 1% FC	77.46	63.89	62.71	92.05	63.40	63.37
Rg3	5% RGC	32.76	55.31	64.75	68.98	70.52	69.93
	5% RGE + 1% FC	36.31	44.05	64.77	72.71	97.59	108.45
Compound- K	5% RGC	74.92	116.34	144.06	170.55	198.46	209.27
	5% RGE + 1% FC	99.99	140.96	150.83	170.31	221.84	249.34

¹⁾RGE : red ginseng conc. (62 °Brix)

FC : Fruit conc. (62 °Brix)

제비집 가수분해를 위해 효소 선별

제비집의 효소적 가수분해를 위한 효소 선택을 위하여, 상업적으로 판매되고 사용하고 있는 4종의 protease에 대한 영향을 조사한 결과는 Table 10과 같다. 효소를 처리하여 얻은 제비집 가수분해물의 sialic acid 함량은 효소 종류에 따라 Flavourzyme 500 MG (0.32 mg/ml) > Protamex (0.29mg/ml) > Nertrase 0.8 L (0.23 mg/ml) > Alcalase 2.4 L(0.22 mg/ml) 순으로 차이를 보였으며, 모든 실험구에서 대조군(0.11 mg/ml)보다 월등히 높은 함량을 나타내었다. 이상의 결과로 효소제를 처리한 모든 구간에서 대조구보다 sialic acid 함량이 높았으며, sialic acid 함량을 고려하였을 때 Flavourzyme 500 MG로 가수분해시킨 제비집 가수분해물이 우수한 것으로 판단되어 최적조건 효소제로 선별하여 다음 단계의 실험에 사용하였다.

Table 10. Comparison of degree of hydrolysis and sialic acid content in bird's(Sea swallow) nest by different enzyme

Enzyme	Sialic acid (mg/mL)
Control	0.11
Alcalase 2.4 1 FG	0.22
Flavourzyme 500MG	0.32
Neutrased 0.8 I	0.23
Protamex 1.5MG	0.29

반응표면분석법을 이용한 제비집 효소분해 최적화

제비집²¹⁾으로부터 최적 효소처리 조건을 설정하기 위해 효소농도, 반응온도 및 반응시간을 독립변수로 하여 중심합성계획에 의해 설계된 20구의 효소처리조건에서 얻어진 sialic acid 함량은 Table 11과 같다. Sialic acid 함량 측정 결과를 이용하여 반응표면분석을 실시하고, 종속변수 즉, sialic acid 함량에 대한 회귀식을 얻었다(Table 12). 또한 변수별 최적 효소처리조건과 각 효소분해물의 특성값을 예측하여 Table 15에 나타내었으며, 이들의 4차원 반응표면을 효소농도, 반응온도 및 반응시간을 독립변수로 하여 Fig. 7에 나타내었다.

Table 11. Experimental data on sialic acid content of bird's(Sea swallow) nest under different hydrolysis condition based on central composite design by response surface analysis

Exp. No ¹⁾	Hydrolysis conditions			Sialic acid (mg/ml)
	E/S (%)	Temp.(°C)	Time (minutes)	
1	19	55	180	0.46
2	19	55	120	0.37
3	19	45	180	0.43
4	19	45	120	0.39
5	11	55	180	0.39
6	11	55	120	0.36
7	11	45	180	0.43
8	11	45	120	0.40
9	15	50	150	0.39
10	15	50	150	0.37
11	15	50	150	0.36
12	15	50	150	0.39
13	15	50	150	0.40
14	15	50	150	0.40
15	23	50	150	0.36
16	7	50	150	0.24
17	15	60	150	0.39
18	15	40	150	0.44
19	15	50	180	0.41
20	15	50	90	0.36

¹⁾The number of experimental condition by central composite design.

※ Control's sialic acid content : 0.09 mg/ml

중심합성계획법에 따라 Table 3과 같은 각 독립변수의 범위를 설정한 후, Design Expert를 이용하여 Table 4와 같이 20가지의 효소처리 조건을 설정하고 제비집을 효소분해 하였다²³⁾. Flavourzyme 500 MG 효소를 사용하여 조건별로 처리된 제비집 효소분해물의 sialic acid 함량은 0.24~0.46 mg/ml의 범위로 나타났으며(Table 11), 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 12와 같다. Sialic acid 함량에 대한 R²값은 0.8472으로 높은 신뢰도를 보였으며, P-value는 1% 이내 유의수준을 보였다. 효소분해 처리조건에 대한 영향은 Table 13에서와 같이 효소처리 조건 모두에서 영향을 받고 있는 것으로 나타났으며, 효소농도>반응시간>반응온도의 순으로 효소농도의 영향이 가장 크며, 반응온도의 영향이 가장 낮은 것으로 나타났다. 한편 lack of fit(적합결여검정) 값은 model의 적합도를 검정하는 통계량으로 P값이 0.05보다 작을 때 model의 적합성에 문제가 있으며, 이보다 클 때 model이 적합하다고 판단하는 통계값이다²²⁾. Sialic acid 함량 값의 model에 대한 lack of fit의 P-value는 0.1063으로 나타나 model이 적합한 것으로 나타났다.(Table 14). 효소 처리에 따라 반응표면모델로 예측된 회귀분석 결과 정상점이 안장점으로 나타났으며, 최적점을 산출한 결과 sialic acid 함량의 최대값은 0.45 mg/mL이고 이때의 효소분해조건은 효소농도 14.37%, 반응온도 40.10℃ 및 반응시간 140.33 min으로 나타났다(Table 15). 실험조건에 따라 얻은 효소분해물의 sialic acid 함량에 대한 반응표면은 Fig. 7에 나타내었으며, 효소농도 10~20% 범위에서 반응온도가 낮고 반응시간이 길어질수록 함량이 증가하는 경향을 나타내었다.

Table 12. Polynomial equations calculated by RSM program for hydrolysis conditions of bird's(Sea swallow) nest

Response	Second order polynomials	R ²	Significance
Sialic acid content	$Y = 2.213997 - 0.007956X_1 - 0.056077X_2 - 0.005418X_3 - 0.001178X_1^2 + 0.000688X_1X_2 + 0.000396X_2^2 + 0.000093750X_1X_3 + 0.000025000X_2X_3 + 0.000011966X_3^2$	0.8472	0.0044

Table 13. Regression analysis for hydrolysis conditions of bird's(Sea swallow) nest

Response	F-Ratio		
	E/S (%)	Temp.(℃)	Time (minutes)
Sialic acid content	7.91***	2.74*	3.26*

*Significant at 10% level; **significant at 5% level; ***significant at 1% level.

Table 14. Analysis of variance for response of dependent variables

Respo- nses	Sources	Degree of freedom	Sum of squares	Means squares	F-value	p-value
Sialic acid content	Model	9	0.032432	-	6.16	0.0044
	Linear	3	0.013736	-	7.83	0.0056
	Quadratic	3	0.016059	-	9.15	0.0032
	Cross-product	3	0.002637		1.50	0.2730
	Residual	10	0.005848	0.000585	-	-
	Lack of fit	5	0.004498	0.000900	3.33	0.1063
	Pure error	5	0.001350	0.000270	-	-
Total		19	-	-	-	-

Table 15. Predicted levels of optimum hydrolysis conditions for the maximum responses of bird's(Sea swallow) nest by the ridge analysis

Response	Predicted response					Morphology
	Response	E/S (%)	Temp. (°C)	Time (minutes)	Result (mg/ml)	
Sialic acid content	Min	7.33	52.86	136.45	0.25	saddle point
	Max	14.37	40.10	140.33	0.45	

Response	Before enzyme treatment	Predicted condition(A) ¹⁾	Observed condition(B) ²⁾	B/A×100(%)
Sialic acid content(mg/ml)	0.09	0.45	0.43	95.56

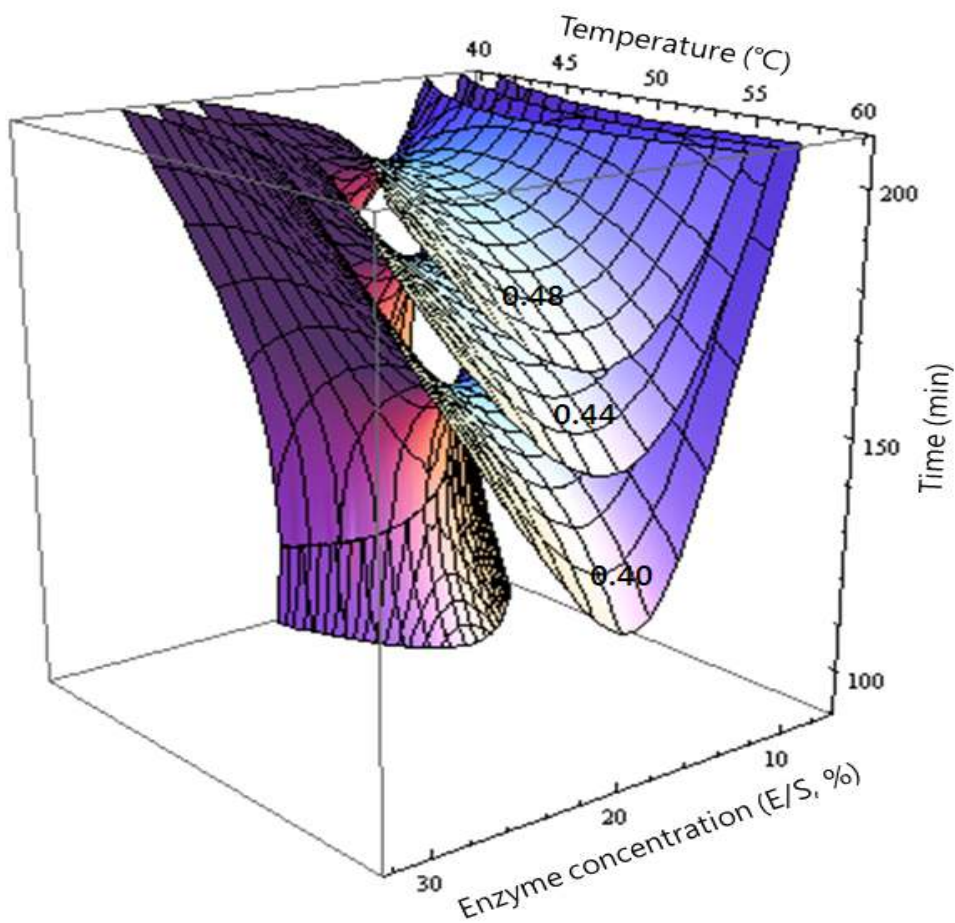
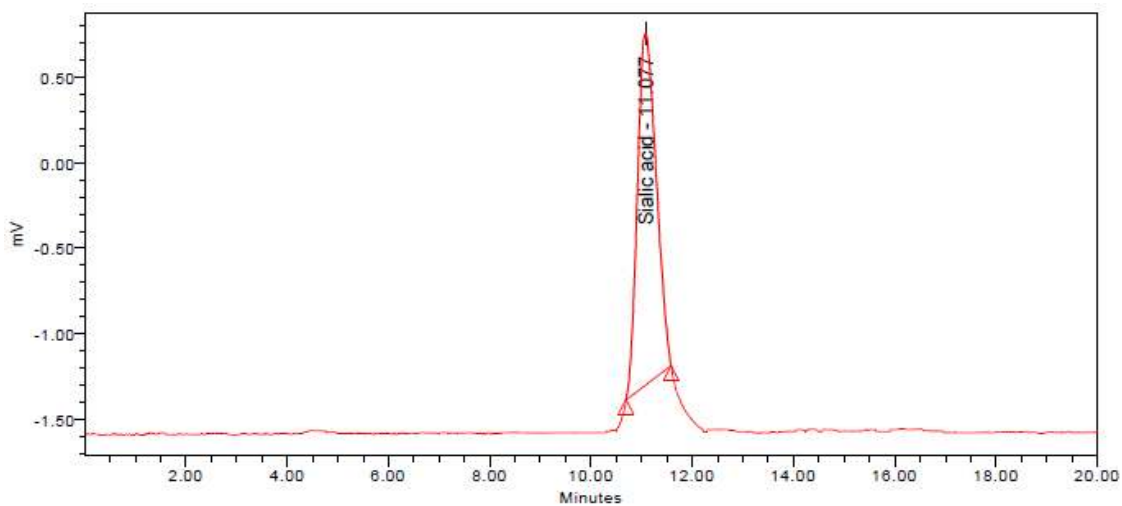


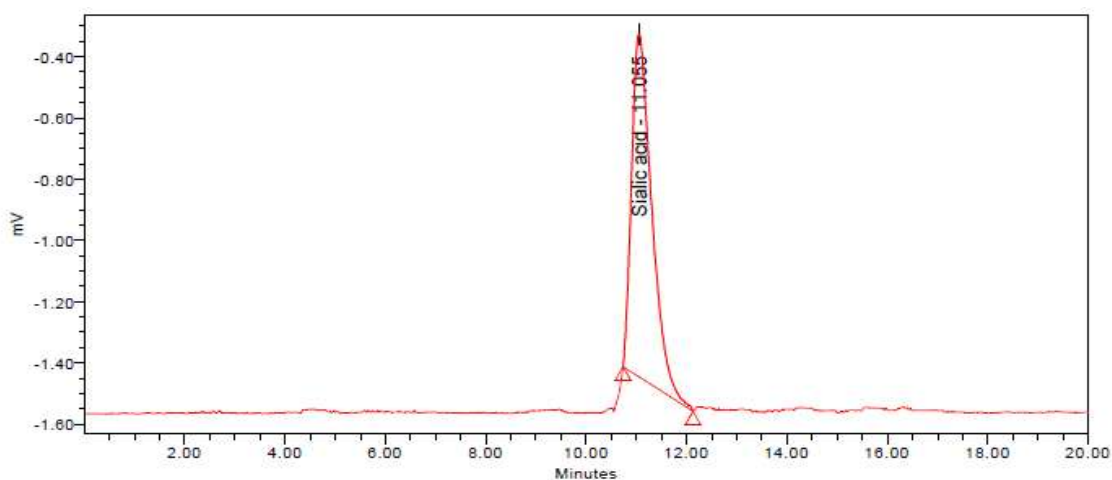
Fig. 7. Response surface for sialic acid content in bird's(Sea swallow) nest hydrolysis at constant values (sialic content : 0.40-0.44-0.48 mg/ml) according to enzyme concentration, temperature and time

Chromatogram of sialic acid by HPLC analysis

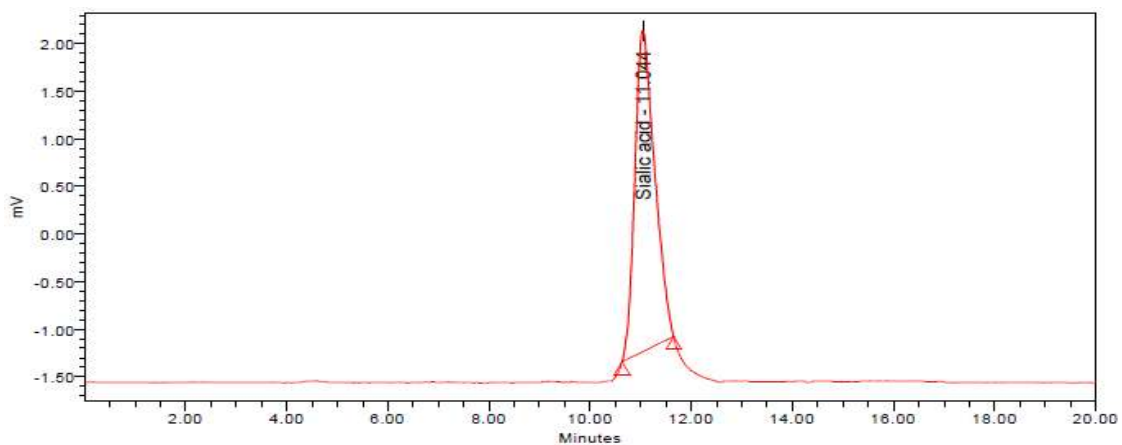
1. Standard



2. Sialic acid chromatogram in bird's (Sea swallow) nest before enzyme treatment



3. Sialic acid chromatogram in bird's (Sea swallow) nest after enzyme treatment



반응표면분석법을 이용한 홍삼농축액의 유산발효조건 최적화

홍삼농축액으로부터 진세노사이드 전환을 위한 최적 발효조건을 설정하기 위해 발효시간과 과즙 농축액 첨가 농도를 독립변수로 하여 중심합성계획²⁴⁾에 의해 설계된 13구의 발효조건에서 얻어진 발효적 특성 즉, 생육도, pH 및 산도는 Table 16과 같다. 각각의 결과를 이용하여 반응표면분석을 실시하고, 각 종속변수 즉, 생육도, pH, 산도에 대한 회귀식을 얻었다(Table 17). 또한 변수별 최적 발효조건과 각 발효액의 특성값을 예측하여 Table 18에 나타내었다.

Table 16. Experimental data cell growth, pH and acidity of red ginseng concentrates under different fermentation conditions based on central composite design by response surface analysis

Exp. No ¹⁾	Cell growth (O.D. 600 nm)	pH	Acidity (%)
1	1.658	3.92	1.16
2	1.546	3.90	1.10
3	1.457	3.93	1.10
4	1.418	3.91	1.05
5	1.618	3.90	1.12
6	1.647	3.90	1.14
7	1.632	3.89	1.18
8	1.624	3.90	1.16
9	1.635	3.90	1.14
10	1.611	3.88	1.14
11	1.204	3.91	1.06
12	1.546	3.93	1.12
13	1.314	3.97	0.91

¹⁾The number of experimental condition by central composite design.

중심합성계획법에 따라 Table 5와 같은 각 독립변수의 범위를 설정한 후, Design Expert를 이용하여 Table 6과 같이 13가지의 발효조건을 설정하고 홍삼농축액을 유산발효 하였다. 발효조건에 따른 홍삼농축액 발효물의 생육도는 1.204~1.658 O.D. 600 nm의 범위로 나타났으며(Table 16), 이를 바탕으로 한 생육도의 회귀식은 Table 17과 같고 R² 값은 0.9891로 1% 이내의 수준에서 유의성이 확인되었다. ANOVA 분석을 통한 모형에 대한 적합성을 검증하기 위해서는 Lack of fit의 *P*-value가 0.0592로 나타나 모형의 적합성이 인정되었다(Table 17). 발효조건에 따라 반응표면모델로 예측된 회귀분석결과 임계점이 최대점으로 나타났으며, 발효조건에 대한 영향은 Table 18에서와 같이 발효시간과 부원료인 과즙농도 모두에 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 최적점을 산출한 결과 최적값은 1.693 O.D. 600 nm이며, 이때의 발효 조건은 발효시간 15.91일 및 과즙 농도 1.34%로 나타났다(Table 19).

Table 17. Regression coefficient and *t*-value of the predicted quadratic polynomial models on cell growth, pH and acidity of fermented red ginseng concentrates

Term	Cell growth		pH		Acidity	
	Coefficient	<i>t</i> -value	Coefficient	<i>t</i> -value	Coefficient	<i>t</i> -value
Intercept						
β_0	0.645312	8.81	3.972292	80.13	0.766042	8.67
Linear						
β_1	0.098710	12.40	-0.000665	-0.12	0.022381	2.33
β_2	0.396121	5.82	-0.111322	-2.42	0.339368	4.13
Quadratic						
β_{11}	-0.003501	-13.72	-0.000041756	-0.24	-0.000750	-2.44
β_{22}	-0.201560	-12.34	0.052328	4.73	-0.133017	-6.75
Cross product						
β_{12}	0.009125	1.87	0	0.00	0.001250	0.21
R ²	0.9891		0.8052		0.9338	
Lack of fit	0.0592		0.0078		0.4268	

발효조건별로 처리된 홍삼농축액 발효물의 pH는 3.88~3.97의 범위로 나타났으며(Table 16) 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 17과 같다. pH에 대한 R²값은 0.8502로 높은 신뢰도를 보였으며, *P*-value는 5% 이내 유의수준을 보였다. 발효조건에 대한 영향에서 pH의 경우 부원료 농도에 영향을 받는 것으로 나타났으나, 설정된 범위 내에서 발효시간에 대한 영향은 거의 나타나지 않았다(Table 18). 한편 lack of fit(적합결여검정) 값은 model의 적합도를 검정하는 통계량으로 *P*값이 0.05보다 작을 때 model의 적합성에 문제가 있으며, 이보다 클 때 model이 적합하다고 판단하는 통계 값이다.

pH의 model에 대한 lack of fit의 P -value는 0.0078로 나타나 model이 적합하지 않은 것으로 나타났다(Table 17). 발효조건에 따라 반응표면모델로 예측된 회귀분석 결과 정상점은 안장점으로 나타났으며, 최적점을 산출한 결과 pH의 최대값은 3.96이고 이때의 발효조건은 발효시간 11.08일 및 부원료 농도 0.01%로 나타났다(Table 19). 실험조건에 따라 얻은 홍삼농축액 발효물의 pH에 대한 반응표면은 Fig. 9에 나타내었으며, 발효시간이 길수록 pH가 감소하는 것으로 나타났다.

Table 18. Regression analysis for fermentation conditions of red ginseng concentrates

Response	F-Ratio	
	Time (day)	Sub materials conc. (%)
Cell growth	158.92***	79.45***
pH	1.03	7.72**
Acidity	5.63**	29.20***

*Significant at 10% level; **significant at 5% level; ***significant at 1% level.

Table 19. Predicted levels of optimum fermentation conditions for the maximum responses of red ginseng concentrates by the ridge analysis

Response	Predicted response				Morphology
	Response	Time (day)	Sub materials conc. (%)	Result	
Cell growth	Min	4.07	0.86	1.213	Maximum
	Max	15.91	1.34	1.693	
pH	Min	19.98	1.05	3.88	Saddle
	Max	11.08	0.01	3.96	
Acidity	Min	10.91	0.01	0.92	Maximum
	Max	15.91	1.34	1.17	

발효조건에 따른 홍삼농축액 발효물의 산도 변화는 0.91~1.18%의 범위로 나타났으며 (Table 16), 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 17과 같으며, 이 모델에 대한 회귀식의 R^2 값은 0.9338로 1% 이내의 유의성이 인정되었다. ANOVA 결과는 Table 17과 같다. 산도를 위한 발효조건 model에 대한 lack of fit의 P -value는 0.4268로 나타나 model이 적합한 것으로 나타났다.

산도는 발효온도와 부원료 농도의 발효조건 모두에서 영향을 받고 있는 것으로 나타났으며(Table 18), 부원료 농도가 높고 발효시간이 길수록 산도가 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 10). Table 19와 같이 산도의 예측된 정상점은 최대점으로 최댓값이 1.17%이었고, 이때 발효시간 15.91일 및 부원료 농도 1.34%이었다.

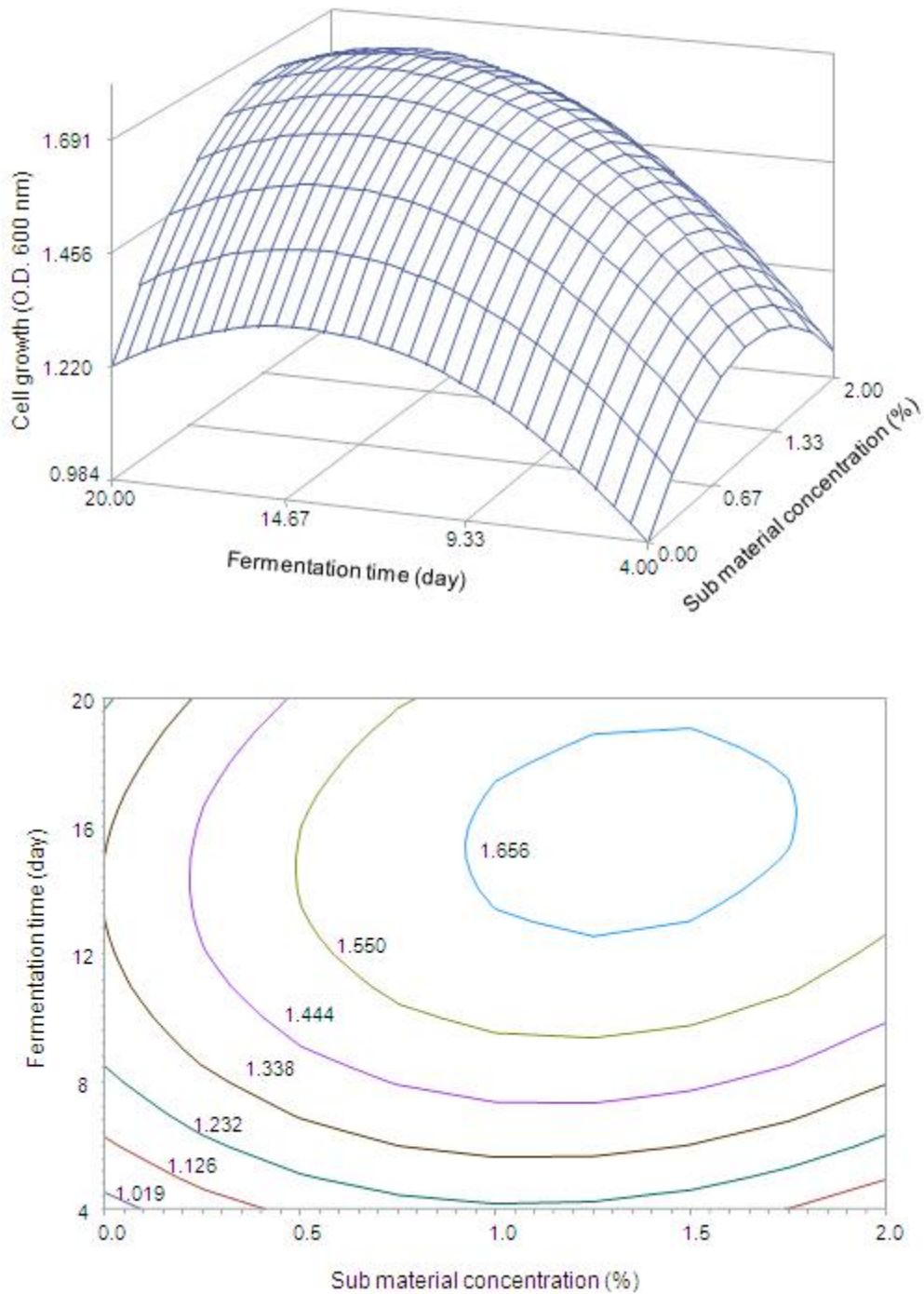


Fig. 8. Contour map(top) and response surface(bottom) for cell growth of fermented red ginseng concentrates as a fermentation condition of time and sub material concentration.

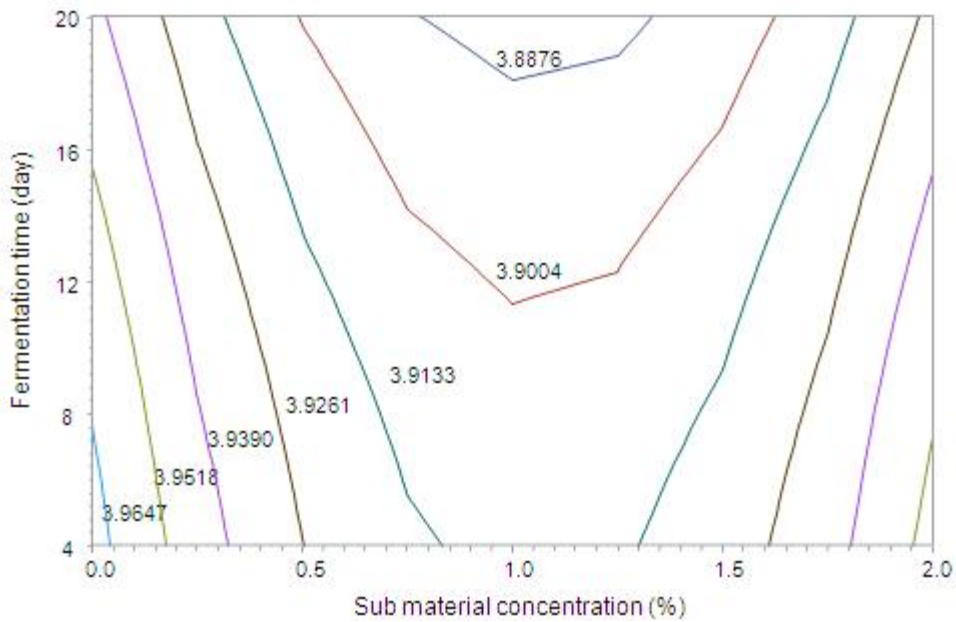
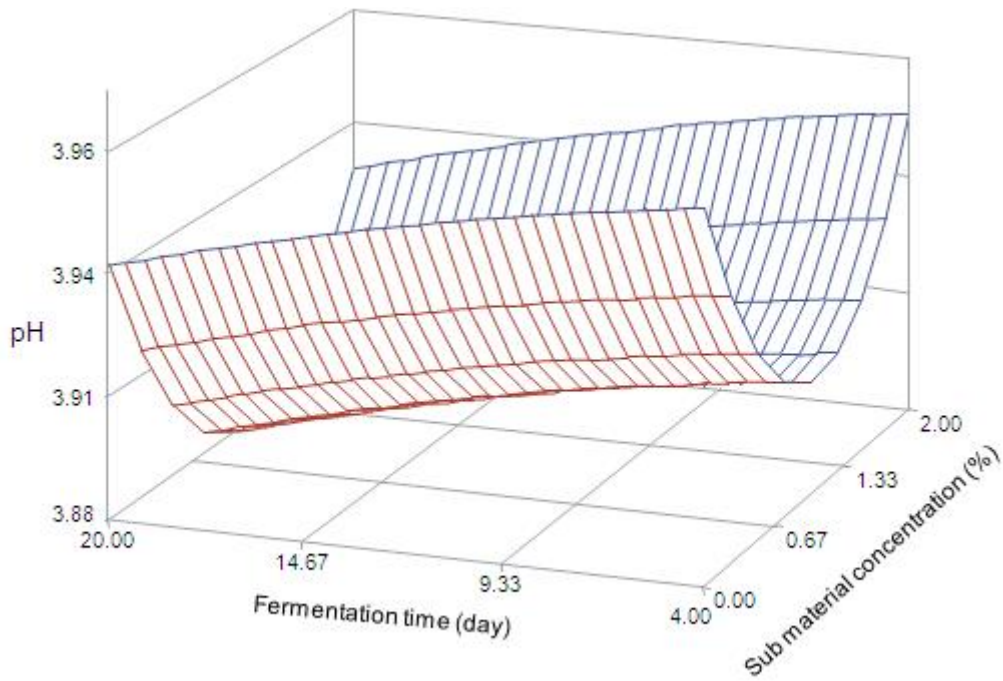


Fig. 9. Contour map(top) and response surface(bottom) for pH of fermented red ginseng concentrates as a fermentation condition of time and sub material concentration.

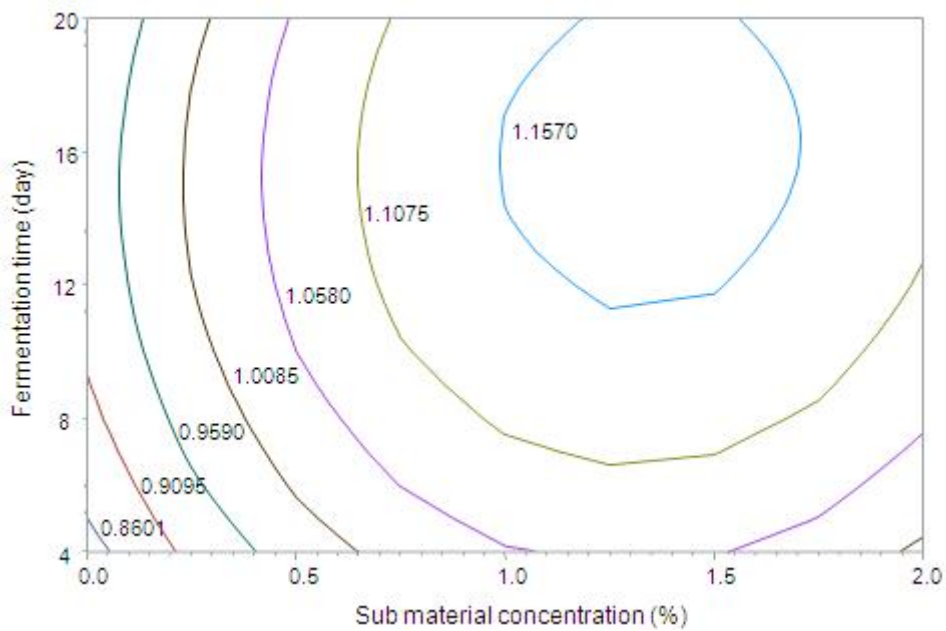
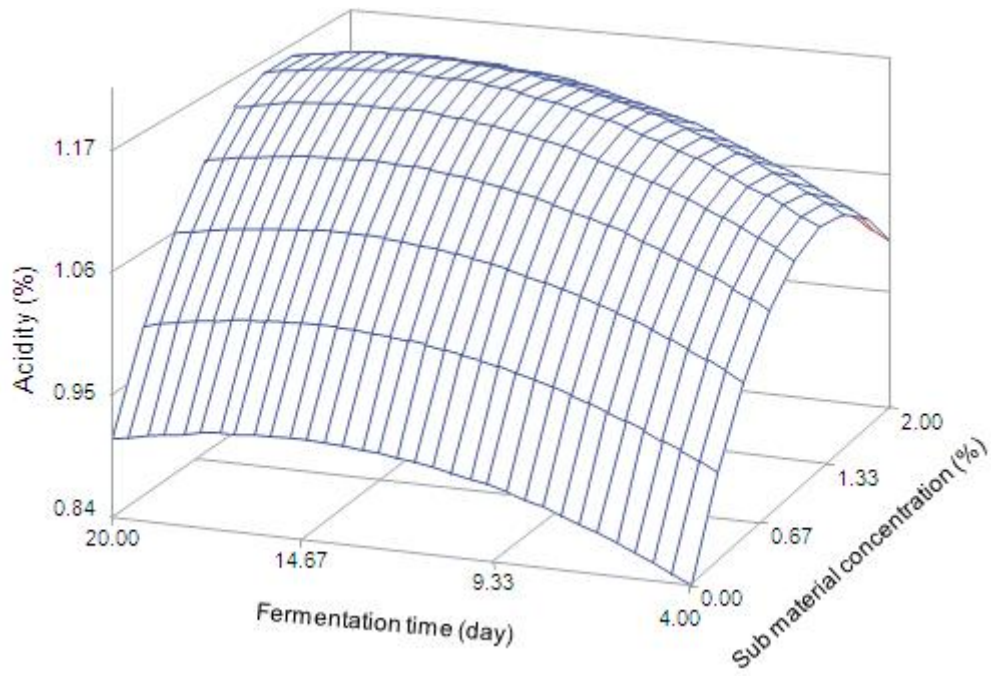


Fig. 10. Contour map(top) and response surface(bottom) for acidity fermented red ginseng concentrates as a fermentation condition of time and sub material concentration.

홍삼농축액으로부터 최적 발효조건을 설정하기 위해 발효시간과 부원료인 과즙농도를 독립변수로 하여 중심합성계획에 의해 설계된 13구의 발효조건에서 얻어진 진세노사이드 함량은 Table 20과 같다. 각각의 결과를 이용하여 반응표면분석을 실시하고, 각 종속변수 즉, 진세노사이드 함량에 대한 회귀식을 얻었다(Table 21). 또한 변수별 최적 발효조건과 각 발효물의 진세노사이드 함량값을 예측하여 Table 23에 나타내었으며, 이들의 3차원 반응표면을 발효시간 및 부원료 농도를 독립변수로 하여 Fig. 11~16에 나타내었다.

Table 20. Experimental data ginsenosides content of red ginseng concentrates under different fermentation conditions based on central composite design by response surface analysis

Exp. No ¹⁾	Ginsenoside content (µg/ml)					
	Rg ₁	Re	Rb ₁	Rd	Rg ₃	Compound-K
1	22.24	24.66	217.64	53.45	159.11	96.10
2	19.82	22.33	203.80	51.11	150.73	95.33
3	39.12	52.52	251.82	54.81	147.29	66.35
4	35.54	51.91	246.11	55.00	146.39	74.27
5	27.32	29.52	227.29	53.90	161.26	81.20
6	27.14	27.04	230.96	56.34	165.52	83.49
7	28.01	27.67	227.81	54.76	168.39	85.62
8	28.80	33.93	234.45	56.79	169.09	86.22
9	27.52	26.77	232.02	55.79	169.42	83.33
10	15.61	16.22	196.30	49.50	124.11	106.93
11	50.42	103.94	310.80	51.14	126.67	54.70
12	31.62	38.93	243.50	57.03	162.09	81.31
13	30.25	36.90	243.04	55.92	133.42	76.88

¹⁾The number of experimental condition by central composite design.

발효조건에 따른 홍삼농축액 발효물의 진세노사이드 Rg₁ 함량을 측정된 결과는 Table 20과 같으며, 15.61~50.42 µg/ml의 범위로 측정되었다. 조건에 따른 값을 이용한 진세노사이드 Rg₁ 함량의 회귀식은 Table 21과 같으며, 이 모델에 대한 회귀식의 R²값은 0.9685으로 회귀방정식에 대한 적합도가 높았으며, *P*-value는 1% 이내 유의 수준을 보였다. ANOVA 분석을 통한 Lack of fit의 *P*-value는 0.0976로 분석되어 반응표면 모형에 대한 적합성이 인정되었다(Table 21). 반응표면을 통한 홍삼농축액 발효물의 진세노사이드 Rg₁ 함량 변화는 Fig. 11과 같으며, 발효시간의 영향이 가장 크며, 다음으로 부원료 농도의 영향을 받는 것으로 나타났다(Table 22). 발효조건에 따라 반응표면모델로 예측된 정상점은 최저점으로 구하였고, 진세노사이드 Rg₁의 최저 함량은 15.73 µg/ml이었고, 이때의 발효 조건은 발효시간 19.99일, 부원료 농도 0.97%로 나타났다(Table 23).

발효조건별 진세노사이드 Re 함량은 Table 20에 나타내었고, 이를 회귀분석하여 본 결과의 회귀식은 Table 21과 같다. 회귀식의 R²는 0.9823으로 1% 이내의 수준에서 유의성이 인정되었다. ANOVA 분석을 통한 Lack of fit의 *P*-value가 0.0591이므로 모형에 대한 적합성이 인정되었다(Table 21). 발효조건의 영향은 Table 22에서와 같이 발효시간의 큰 영향을 받고 있는 것으로 나타났으나, 부원료의 농도에는 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 또한 발효시간과 부원료 농도의 발효조건에 따른 진세노사이드 Re 함량의 반응표면분석에서 예측된 정상점이 최저점으로 진세노사이드 Re의 최저값은 19.12 µg/ml이었고, 이때의 발효조건은 발효시간 18.52일, 부원료 농도 0.42%이었다(Table 23). 진세노사이드 Re의 발효조건에 따른 반응표면에서 볼 때 발효시간이 길수록 함량이 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 12).

Table 21. Regression coefficient and *t*-value of the predicted quadratic polynomial models on ginsenoside of fermented red ginseng concentrates

Term	Rg ₁		Re		Rb ₁	
	Coefficient	<i>t</i> -value	Coefficient	<i>t</i> -value	Coefficient	<i>t</i> -value
Intercept						
β ₀	64.778333	16.74	166.941458	8.52	412.217083	22.02
Linear						
β ₁	-3.938204	-9.36	-16.697518	-7.83	-18.514828	-9.10
β ₂	-3.062644	-0.85	-19.114540	-1.05	-63.605747	-3.66
Quadratic						
β ₁₁	0.081401	6.04	0.484619	7.09	0.354550	5.43
β ₂₂	3.129655	3.63	8.850603	2.02	12.411207	2.97
Cross product						
β ₁₂	-0.145000	-0.56	0.215000	0.16	3.266250	2.61
R ²	0.9920		0.9685		0.9823	
Lack of fit	0.0976		0.0591		0.0725	

Term	Rd		Rg ₃		Compound-K	
	Coefficient	<i>t</i> -value	Coefficient	<i>t</i> -value	Coefficient	<i>t</i> -value
Intercept						
β_0	49.551042	11.08	51.66042	2.80	46.448750	5.07
Linear						
β_1	1.476893	3.04	14.819774	7.39	3.305287	3.32
β_2	-4.865460	-1.17	37.952126	2.21	-3.140690	-0.37
Quadratic						
β_{11}	-0.082119	-5.27	-0.646866	-10.06	-0.048198	-1.51
β_{22}	0.899397	0.90	-19.034397	-4.63	-1.804655	-2.35
Cross product						
β_{12}	0.316250	1.06	0.935000	0.76	1.086250	1.78
R^2	0.8257		0.9453		0.9802	
Lack of fit	0.0459		0.1295		0.2391	

발효조건에 따른 홍삼농축액 발효물의 진세노사이드 Rb₁ 함량을 측정된 결과는 196.30 ~ 251.82 µg/ml의 범위로 나타났으며(Table 20), 이를 이용한 회귀식은 Table 21에 나타내었다. 반응표면 모델의 회귀식의 R² 값은 0.8527로 확인되었으며, ANOVA 분석을 통한 Lack of fit의 *P*-value가 0.0725이므로 반응표면 모형에 대한 적합성이 인정되었다(Table 21). 반응표면을 통한 발효조건에 따른 홍삼농축액 발효물의 진세노사이드 Rb₁ 함량 변화는 Fig. 13과 같으며, 발효시간에 큰 영향을 받고 있었으며, 다음으로 부원료 농도의 영향을 받는 것으로 나타났다(Table 22). 발효조건에 따라 반응표면모델로 예측된 정상점은 최저점으로 구하였고, 진세노사이드 Rb₁의 최저값은 190.87 µg/ml이었으며, 이때의 발효조건은 발효시간 19.14일, 부원료 농도 0.55%로 나타났다(Table 23).

발효조건에 따른 홍삼농축액 발효물의 진세노사이드 Rd 함량은 49.50~57.03 µg/ml의 범위로 나타났으며(Table 20), 이를 바탕으로 한 진세노사이드 Rd 함량의 회귀식은 Table 21과 같고 R² 값은 0.8527으로 1% 이내의 수준에서 유의성이 확인되었다. ANOVA 분석을 통한 모형에 대한 적합성을 검증하기 위해서는 Lack of fit의 *P*-value가 0.0459로 나타나 모형의 적합성이 인정되지 않았다(Table 21). 발효조건에 대한 영향은 Table 22에서와 같이 발효시간에서 영향을 크게 받고 있는 것으로 나타났으며, 부원료 농도의 영향은 낮은 것으로 나타났다. 발효조건에 따라 반응표면모델로 예측된 회귀분석 결과 임계점이 최대점이 아닌 안장점으로 나타났으며, 능선분석을 하여 최적점을 산출한 결과 최댓값은 56.95 µg/ml이며, 이때의 발효조건은 발효시간 12.66일, 부원료 농도 1.99%으로 나타났다(Table 23). 반응표면을 통한 발효조건에 따른 홍삼농축액 발효물의 진세노사이드 Rd 함량의 변화는 Fig. 14와 같이 발효시간이 길어질수록 함량이 증가하는 경향을 나타내었다.

Table 22. Regression analysis for fermentation conditions of red ginseng concentrates

Response	F-Ratio	
	Time (day)	Sub materials conc. (%)
Rg ₁ content	284.36***	6.48**
Re content	71.80***	1.42
Rb ₁ content	128.54***	5.23**
Rd content	11.05***	1.02
Rg ₃ content	34.09***	12.41***
Compound-K content	113.91***	2.91

*Significant at 10% level; **significant at 5% level; ***significant at 1% level.

발효조건별로 처리된 홍삼농축액 발효물의 진세노사이드 Rg₃ 함량은 124.11~169.42 μ g/ml의 범위로 나타났으며(Table 20), 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 21과 같다. 진세노사이드 Rg₃ 함량에 대한 R²값은 0.9453으로 높은 신뢰도를 보였으며, *P*-value는 1% 이내 유의수준을 보였다. 진세노사이드 Rg₃ 함량 값의 model에 대한 lack of fit의 *P*-value는 0.1295로 나타나 model이 적합한 것으로 나타났다(Table 21). 발효조건에 대한 영향에서 진세노사이드 Rg₃ 함량의 경우 발효시간>부원료 농도 순으로 두 조건 모두에서 영향을 받고 있는 것으로 나타났다(Table 22). 발효조건에 따라 반응표면모델로 예측된 회귀분석 결과 정상점이 최대점으로 나타났으며, 최적점을 산출한 결과 진세노사이드 Rg₃ 함량의 최대값은 168.24 μ g/mL이고 이때의 발효조건은 발효시간 12.38일, 부원료 농도 1.29%로 나타났다(Table 23). 실험조건에 따라 얻은 홍삼농축액 발효물의 진세노사이드 Rg₃ 함량에 대한 반응표면은 Fig. 15에 나타내었다.

발효조건에 따른 홍삼농축액 발효물의 진세노사이드 compound-K 함량의 54.70~106.93 μ g/ml의 범위로 나타났으며(Table 20), 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 21과 같으며, 이 모델에 대한 회귀식의 R² 값은 0.9802로 1% 이내의 유의성이 인정되었다. ANOVA 결과, 진세노사이드 compound-K 함량을 위한 발효조건 model에 대한 lack of fit의 *P*-value는 0.2391로 나타나 model이 적합한 것으로 나타났다(Table 21). 진세노사이드 compound-K 함량은 발효시간에서 아주 큰 영향을 받고 있는 것으로 나타났으며, 설정된 범위내에서 부원료의 농도는 영향을 받지 않는 것으로 나타났다(Table 22). Table 23과 같이 진세노사이드 compound-K 함량의 예측된 정상점은 안장점으로 능선분석을 한 결과 최대값이 108.30 μ g/ml이었고, 이때 발효시간 19.71일, 부원료 농도 1.26%이었다. 홍삼농축액 발효물의 진세노사이드 compound-K함량의 발효조건에 따른 반응표면에서 볼 때 발효시간이 길어질수록 함량이 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 16).

Table 23. Predicted levels of optimum fermentation conditions for the maximum responses of fermented red ginseng concentrates by the ridge analysis

Response	Predicted response				Morphology
	Response	Time (day)	Sub materials conc. (%)	Result ($\mu\text{g/ml}$)	
Rg ₁ content	Min	19.99	0.97	15.73	Minimum
	Max	4.05	1.12	49.97	
Re content	Min	18.52	0.42	19.12	Minimum
	Max	4.00	0.99	98.50	
Rb ₁ content	Min	19.14	0.55	190.87	Minimum
	Max	4.34	0.71	309.65	
Rd content	Min	19.79	0.77	48.22	Saddle
	Max	12.66	1.99	56.95	
Rg ₃ content	Min	4.02	0.92	123.14	Maximum
	Max	12.38	1.29	168.24	
Compound-K content	Min	4.37	1.30	53.93	Saddle
	Max	19.71	1.26	108.30	

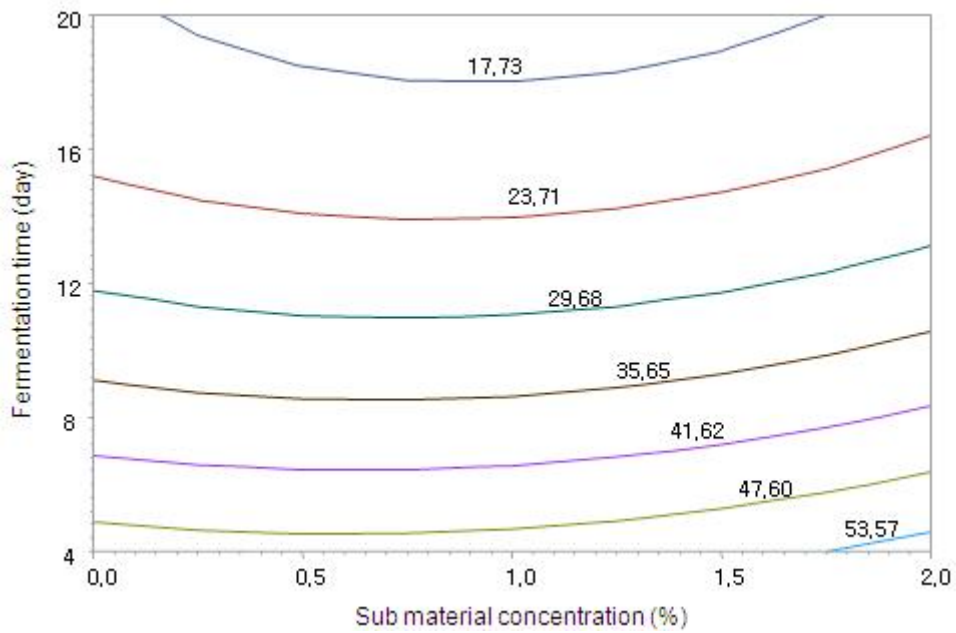
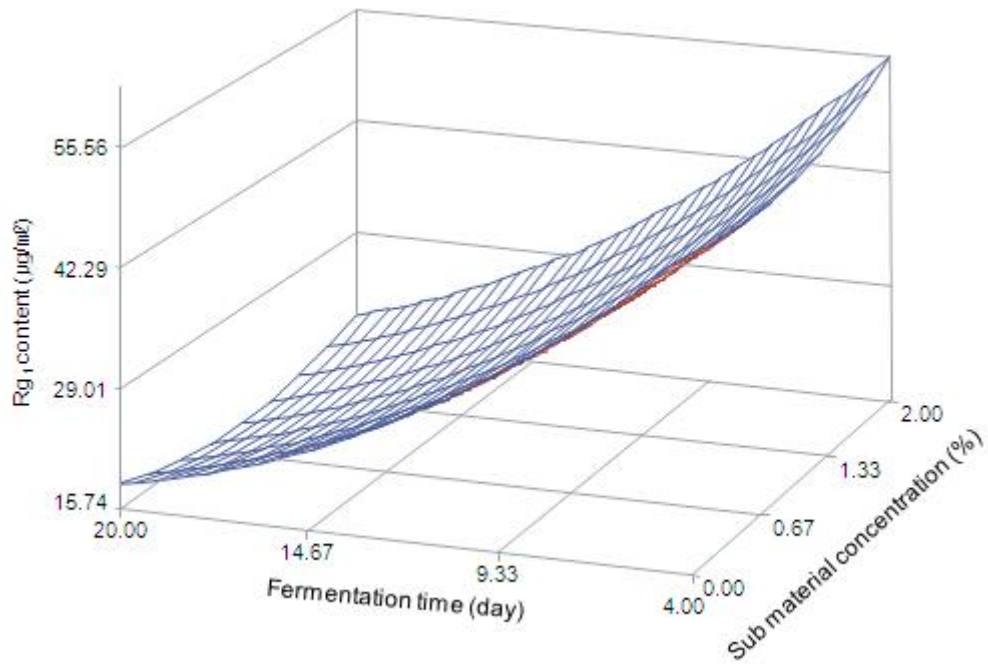


Fig. 11. Contour map(top) and response surface(bottom) for ginsenoside Rg₁ content of fermented red ginseng concentrates as a fermentation condition of time and sub material concentration.

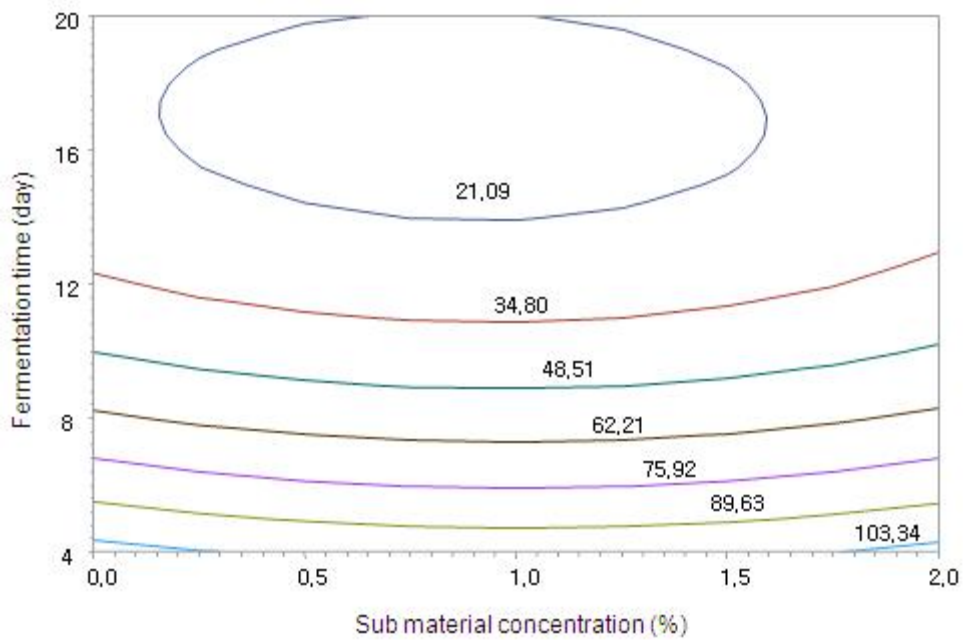
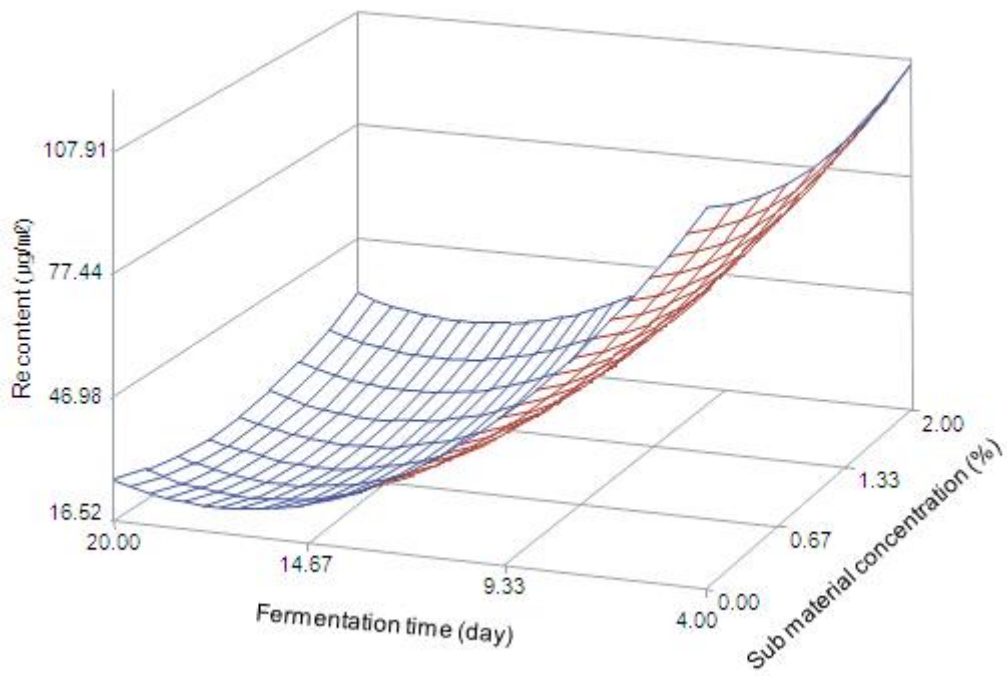


Fig. 12. Contour map(top) and response surface(bottom) for ginsenoside Re content of fermented red ginseng concentrates as a fermentation condition of time and sub material concentration.

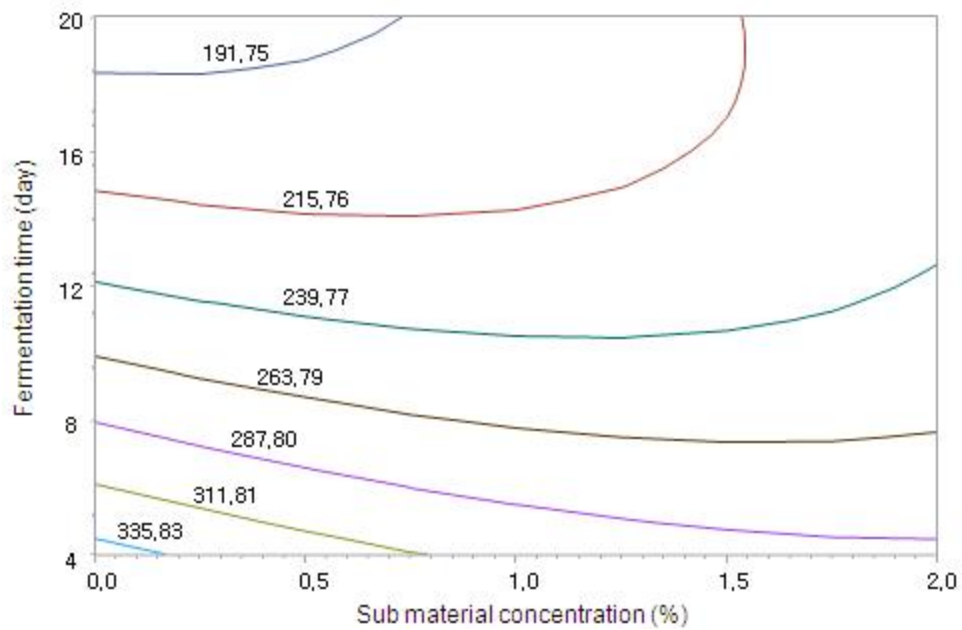
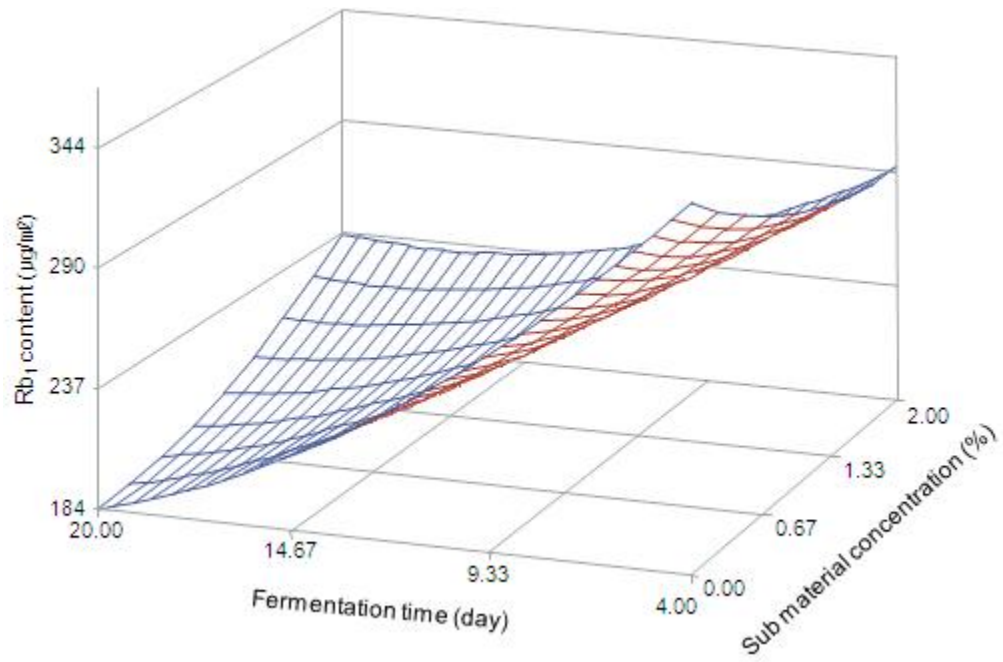


Fig. 13. Contour map(top) and response surface(bottom) for ginsenoside Rb₁ content of fermented red ginseng concentrates as a fermentation condition of time and sub material concentration.

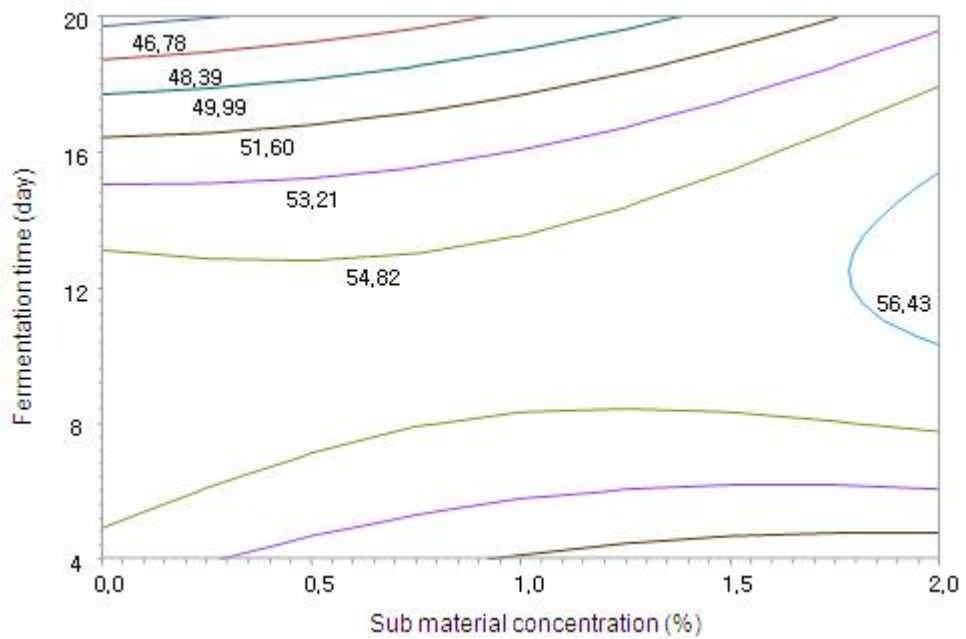
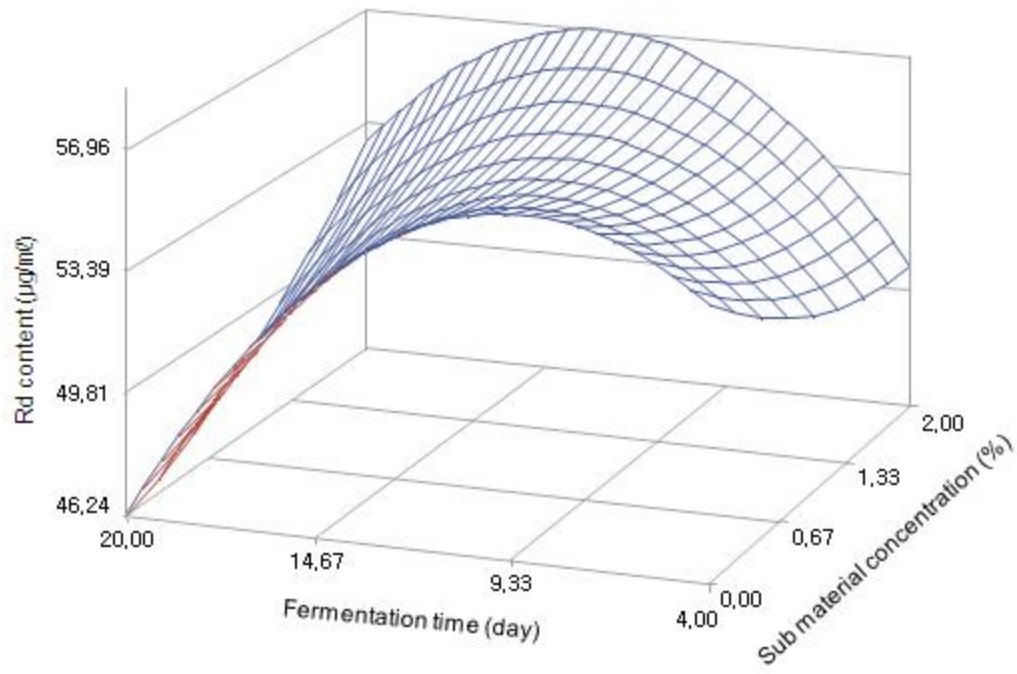


Fig. 14. Contour map(top) and response surface(bottom) for ginsenoside Rd content of fermented red ginseng concentrates as a fermentation condition of time and sub material concentration.

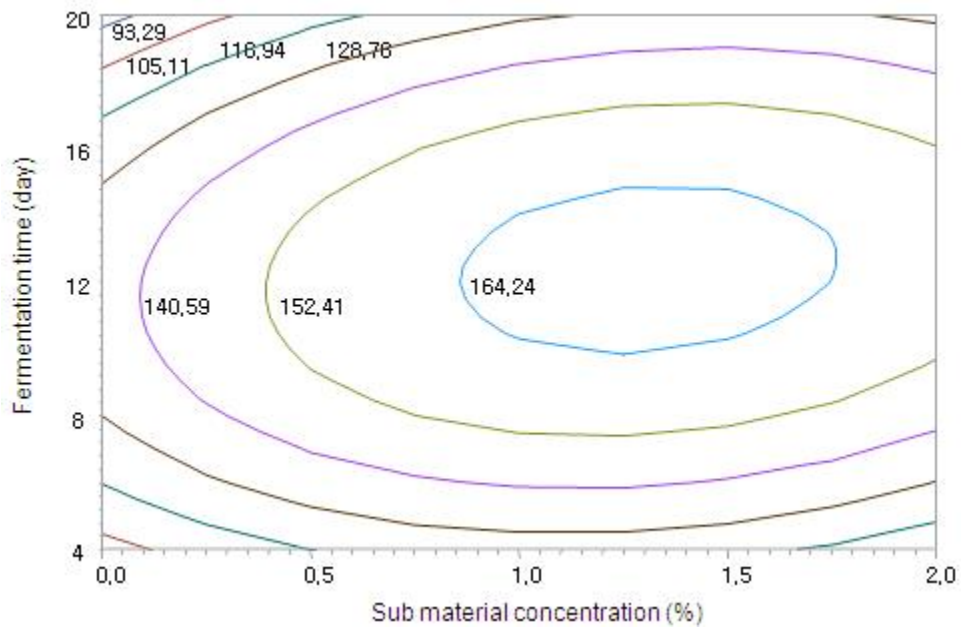
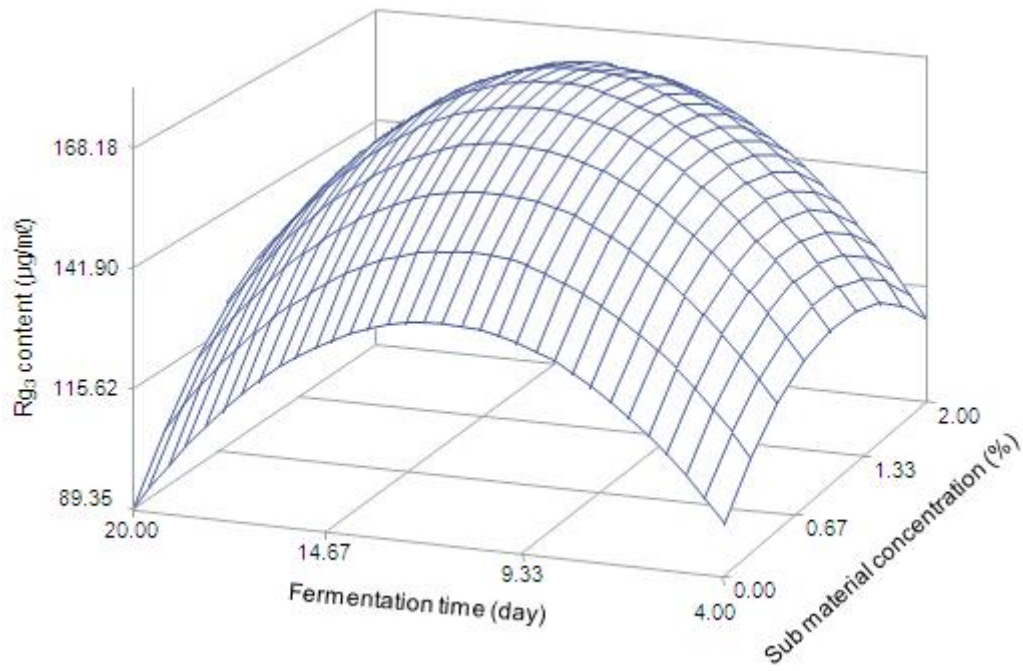


Fig. 15. Contour map(top) and response surface(bottom) for ginsenoside Rg₃ content of fermented red ginseng concentrates as a fermentation condition of time and sub material concentration.

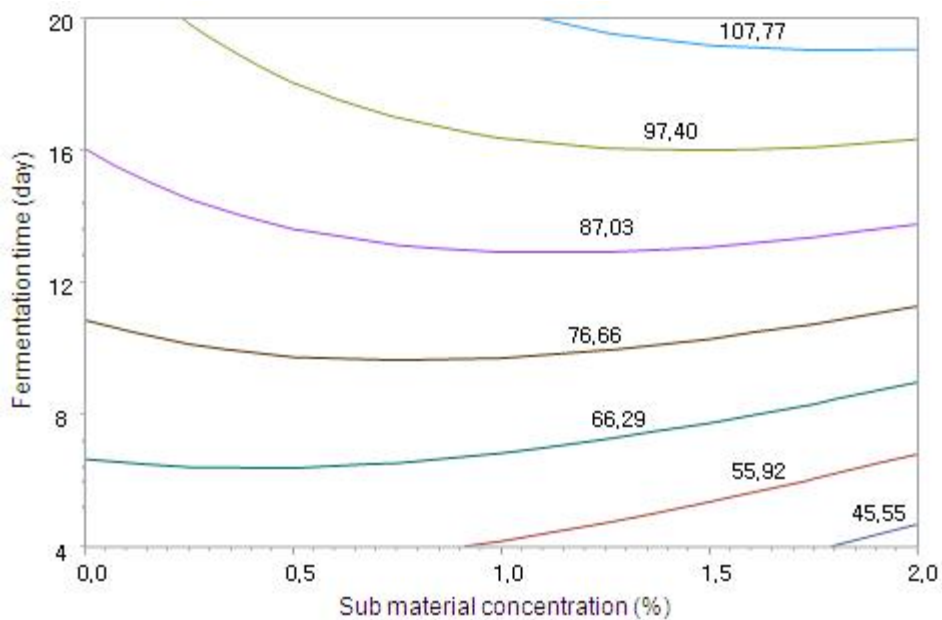
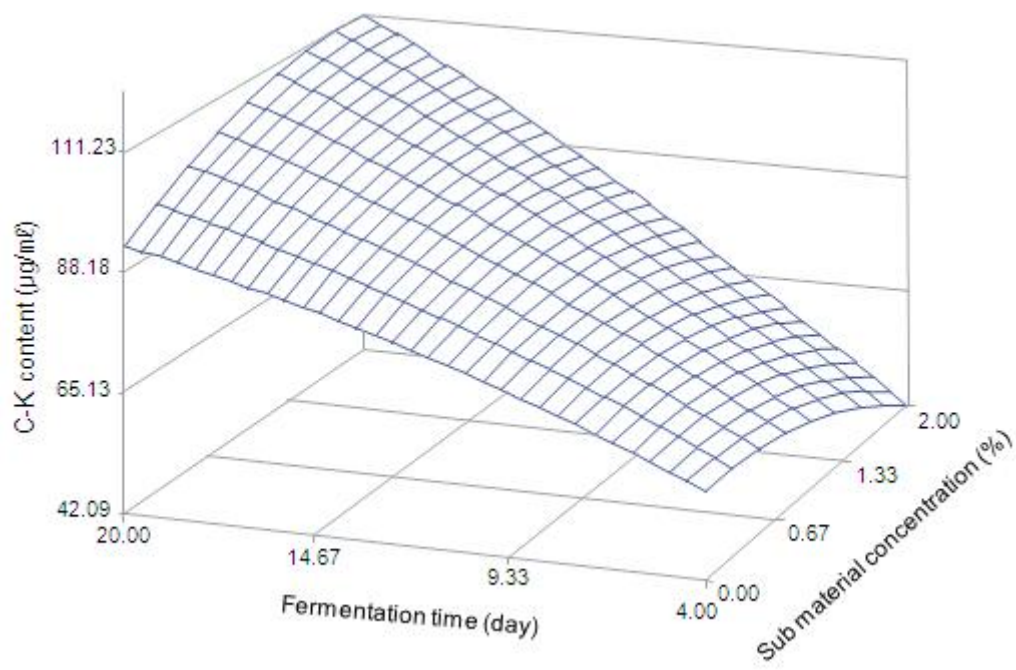


Fig. 16. Contour map(top) and response surface(bottom) for ginsenoside compound K content of fermented red ginseng concentrates as a fermentation condition of time and sub material concentration.

홍삼농축액의 최적 유산발효 조건을 설정하기 위해 발효시간과 부원료 농도를 독립변수로 하여 중심합성계획에 의해 설계된 13구의 유산발효조건에서 얻어진 유기산 함량²⁵⁾은 Table 24과 같다. 각각의 결과를 이용하여 반응표면분석을 실시하고, 각 종속변수 즉, 유기산 함량에 대한 회귀식을 얻었다(Table 25). 또한 변수별 최적 유산발효조건과 각 발효물의 유기산 함량을 예측하여 Table 27에 나타내었으며, 이들의 반응표면을 발효시간 및 부원료 농도를 독립변수로 하여 Fig. 17~22에 나타내었다.

Table 24. Experimental data organic acid content of red ginseng extract under different fermentation conditions based on central composite design by response surface analysis

Exp. No ¹⁾	Organic acid content (µg/ml)					
	Oxalic acid	Citric acid	Malic acid	Succinic acid	Lactic acid	Acetic acid
1	41.43	44.69	716.11	121.91	7565.38	350.79
2	43.85	18.08	699.03	127.34	7299.66	333.55
3	37.04	29.16	586.73	115.14	7103.99	334.56
4	33.52	12.10	538.97	103.25	6571.44	287.33
5	38.28	14.32	631.86	113.96	7288.07	312.54
6	37.80	16.86	614.61	117.66	7255.15	317.66
7	38.94	18.25	629.41	119.48	7343.32	323.40
8	39.35	19.34	632.39	118.15	7250.35	320.76
9	37.88	20.61	621.28	115.07	7304.11	319.98
10	48.31	18.34	807.97	125.01	8274.04	400.21
11	29.68	6.91	481.97	106.44	7096.06	317.43
12	37.46	101.75	628.49	110.10	7026.32	323.63
13	34.91	16.56	566.62	118.13	5880.36	295.56

¹⁾The number of experimental condition by central composite design.

중심합성계획법에 따라 Table 4와 같은 각 독립변수의 범위를 설정한 후, Design Expert를 이용하여 Table 5와 같이 13가지의 발효조건을 설정하고 홍삼농축액을 유산발효 하였다. 발효조건에 따른 홍삼농축액 발효물의 oxalic acid 함량은 29.68~48.31 $\mu\text{g/ml}$ 의 범위로 나타났으며(Table 24), 이를 바탕으로 한 oxalic acid 함량의 회귀식은 Table 25과 같고 R^2 값은 0.9718로 1% 이내의 수준에서 유의성이 확인되었다. ANOVA 분석을 통한 모형에 대한 적합성을 검증하기 위해서는 Lack of fit의 P -value가 0.1110로 나타나 모형의 적합성이 인정되었다(Table 25). 발효조건에 대한 영향은 Table 26에서와 같이 발효시간과 부원료 농도 모두에 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 발효조건에 따라 반응표면모델로 예측된 회귀분석결과 oxalic acid 함량의 임계점은 안장점으로 나타났으며, 최적점을 산출한 결과 최대값은 48.72 $\mu\text{g/ml}$ 이며, 이때의 발효 조건은 발효시간 19.67일 및 부원료 농도 0.71%로 나타났다(Table 27).

발효조건에 따른 홍삼농축액 발효물의 citric acid 함량의 6.91~101.75 $\mu\text{g/ml}$ 의 범위로 나타났으며(Table 24), 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 25와 같으며, 이 모형에 대한 회귀식의 R^2 값은 0.9543로 1% 이내의 유의성이 인정되었다. ANOVA 결과, citric acid 함량을 위한 발효조건 model에 대한 lack of fit의 P -value는 0.0092로 나타나 model이 적합하지 않은 것으로 나타났다(Table 25). Citric acid 함량은 부원료 농도에서 큰 영향을 받고 있는 것으로 나타났으며, 설정된 범위 내에서 발효시간에는 영향을 받지 않는 것으로 나타났다(Table 26). Table 27과 같이 citric acid 함량의 예측된 정상점은 안장점으로 능선분석을 한 결과 최대값이 95.63 $\mu\text{g/ml}$ 이었고, 이때 발효시간 13.03일, 부원료 농도 1.99%이었다. 홍삼농축액 발효물의 citric acid 함량의 발효조건에 따른 반응표면에서 볼 때 부원료 농도가 높아질수록 함량이 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 18).

발효조건별로 처리된 홍삼농축액 발효물의 malic acid 함량은 481.97~807.97 $\mu\text{g/ml}$ 의 범위로 나타났으며(Table 24), 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 25와 같다. Malic acid 함량에 대한 R^2 값은 0.9895로 높은 신뢰도를 보였으며, P -value는 1% 이내 유의수준을 보였다. Malic acid 함량의 model에 대한 lack of fit의 P -value는 0.1407로 나타나 model이 적합한 것으로 나타났다(Table 25). 발효조건에 대한 영향에서 malic acid 함량의 경우 부원료 농도>발효시간 순으로 영향을 받는 것으로 나타났다(Table 26). 발효조건에 따라 반응표면모델로 예측된 회귀분석 결과 정상점이 안장점으로 나타났으며, 최적점을 산출한 결과 malic acid 함량의 최대값은 805.89 $\mu\text{g/ml}$ 이고 이때의 발효조건은 발효시간 19.99일 및 부원료 농도 1.00%로 나타났다(Table 27). 실험조건에 따라 얻은 홍삼농축액 발효물의 malic acid 함량에 대한 반응표면은 Fig. 19에 나타내었으며, 발효시간이 길수록 malic acid 함량이 증가하는 것으로 나타났다.

Table 25. Regression coefficient and t -value of the predicted quadratic polynomial models on cell growth, pH and acidity of fermented red ginseng extract

Term	Oxalic acid		Citric acid		Malic acid	
	Coefficient	t -value	Coefficient	t -value	Coefficient	t -value
Intercept						
β_0	14.942917	3.94	14.450000	0.56	333.541875	8.12
Linear						
β_1	1.596731	3.88	1.722392	0.62	15.984702	3.58
β_2	14.343678	4.07	-61.087241	-2.56	132.473966	3.47
Quadratic						
β_{11}	0.009529	0.72	-0.082990	-0.93	0.310985	2.17
β_{22}	-2.200172	-2.60	41.218621	7.19	-27.511983	-3.00
C r o s s product						
β_{12}	-0.742500	-2.94	1.193750	0.70	-3.835000	-1.40
R^2	0.9718		0.9543		0.9895	
Lack of fit	0.1110		0.0092		0.1407	

Term	Succinic acid		Lactic acid		Acetic acid	
	Coefficient	t -value	Coefficient	t -value	Coefficient	t -value
Intercept						
β_0	70.681250	5.45	5522.793333	22.07	277.407708	10.37
Linear						
β_1	3.982464	2.83	-40.471889	-1.49	-6.483552	-2.23
β_2	29.737586	2.47	2591.007701	11.14	83.629943	3.36
Quadratic						
β_{11}	-0.016700	-0.37	6.153820	7.06	0.624271	6.70
β_{22}	-2.678793	-0.93	-837.865517	-15.01	-9.271638	-1.55
Cross product						
β_{12}	-2.165000	-2.50	-33.353750	-2.00	-3.748750	-2.10
R^2	0.8509		0.9911		0.9607	
Lack of fit	0.1053		0.0609		0.0616	

발효조건에 따른 홍삼농축액 발효물의 succinic acid 함량 변화는 103.25~127.34 µg/ml의 범위로 나타났으며(Table 24), 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 25와 같으며, 이 모델에 대한 회귀식의 R² 값은 0.8509로 1% 이내의 유의성이 인정되었다. ANOVA 결과, succinic acid 함량을 위한 발효조건 model에 대한 lack of fit의 P-value는 0.1053로 나타나 model이 적합한 것으로 나타났다(Table 25). Succinic acid 함량은 발효시간에 큰 영향을 받고 있는 것으로 나타났으며(Table 26), 발효시간이 길수록 succinic acid 함량이 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 20). Table 27과 같이 succinic acid 함량의 예측된 정상점은 안장점으로 최댓값이 133.89 µg/ml이었고, 이때 발효시간 18.63일 및 부원료 농도 0.44%이었다.

Table 26. Regression analysis for fermentation conditions of red ginseng extract

Response	F-Ratio	
	Time (day)	Sub materials conc. (%)
Oxalic acid content	76.40***	6.18**
Citric acid content	1.61	44.39***
Malic acid content	207.01***	11.87***
Succinic acid content	12.86***	2.59
Lactic acid content	96.21***	135.92***
Acetic acid content	44.78***	10.21***

*Significant at 10% level; **significant at 5% level; ***significant at 1% level.

Table 27. Predicted levels of optimum fermentation conditions for the maximum responses of fermented red ginseng extract by the ridge analysis

Response	Predicted response				Morphology
	Response	Time (day)	Sub materials conc. (%)	Result (µg/ml)	
Oxalic acid content	Min	5.59	0.40	27.90	Saddle
	Max	19.67	0.71	48.72	
Citric acid content	Min	4.29	0.72	1.44	Saddle
	Max	13.03	1.99	95.63	
Malic acid content	Min	5.20	0.47	472.16	Saddle
	Max	19.99	1.00	805.89	
Succinic acid content	Min	5.40	0.43	99.04	Saddle
	Max	18.63	0.44	133.89	
Lactic acid content	Min	9.79	0.03	5803.23	Saddle
	Max	19.97	1.08	8271.10	
Acetic acid content	Min	8.24	0.11	272.43	Saddle
	Max	19.97	0.92	397.18	

발효조건에 따른 홍삼농축액 발효물의 lactic acid 함량을 측정한 결과는 Table 24와 같으며, 5880.36~8274.04 $\mu\text{g/ml}$ 의 범위로 측정되었다. 조건에 따른 값을 이용한 lactic acid 함량의 회귀식은 Table 25와 같으며, 이 모델에 대한 회귀식의 R^2 값은 0.9911으로 회귀방정식에 대한 적합도가 높았으며, P -value는 1% 이내 유의 수준을 보였다. ANOVA 분석을 통한 Lack of fit의 P -value는 0.0609로 분석되어 반응표면 모형에 대한 적합성이 인정되었다(Table 25). 발효조건에 따라 반응표면모델로 예측된 정상점은 안장점으로 나타났다, 반응표면을 통한 홍삼농축액 발효물의 lactic acid 함량 변화는 Fig. 21와 같으며, 부원료 농도의 영향이 가장 크며, 다음으로 발효시간에 영향을 받는 것으로 나타났다(Table 26). Lactic acid의 최대 함량은 8271.10 $\mu\text{g/ml}$ 이었고, 이때의 발효조건은 발효시간 19.97일, 부원료 농도 1.08%로 나타났다(Table 27).

발효조건별 acetic acid 함량은 Table 24에 나타내었고, 이를 회귀분석하여 본 결과 회귀식의 R^2 는 0.9607으로 1% 이내의 수준에서 유의성이 인정되었고, 회귀식은 Table 25와 같다. ANOVA 분석을 통한 Lack of fit의 P -value가 0.0616이므로 모형에 대한 적합성이 인정되었다(Table 25). Acetic acid 함량의 발효조건에 따른 반응표면에서 볼 때 발효시간이 길수록 함량이 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 22). 발효조건의 영향은 Table 26에서와 같이 발효시간과 부원료 농도 모두에서 큰 영향을 받고 있는 것으로 나타났다. 또한 발효시간과 부원료 농도의 발효조건에 따른 acetic acid 함량의 반응표면분석에서 (Fig. 22) 예측된 정상점이 안장점으로 acetic acid 함량의 최댓값은 397.18 $\mu\text{g/ml}$ 이었고, 이때의 발효조건은 발효시간 19.97일, 부원료 농도 0.92%이었다(Table 27).

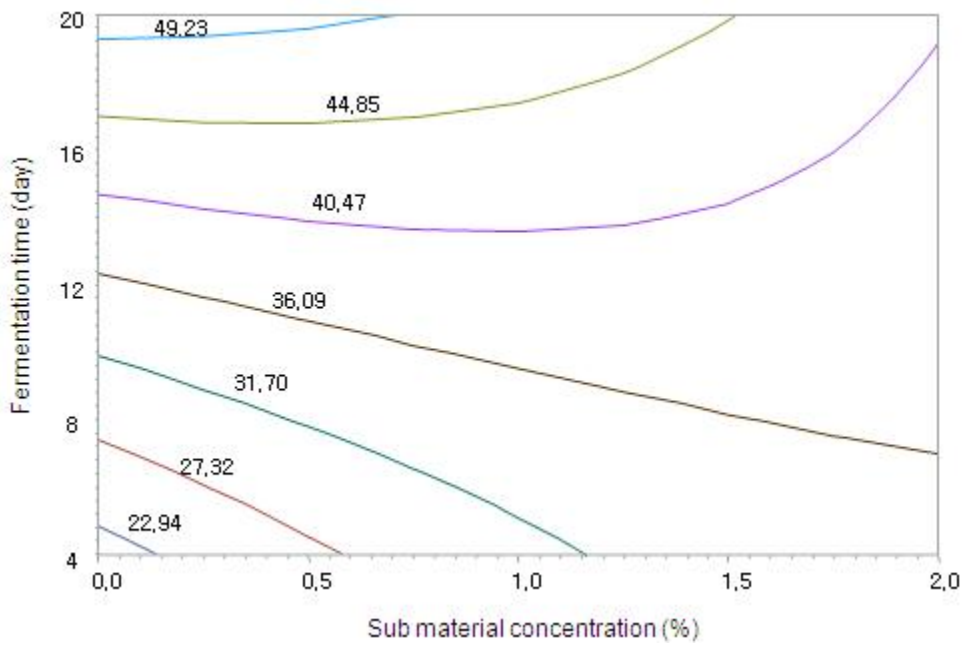
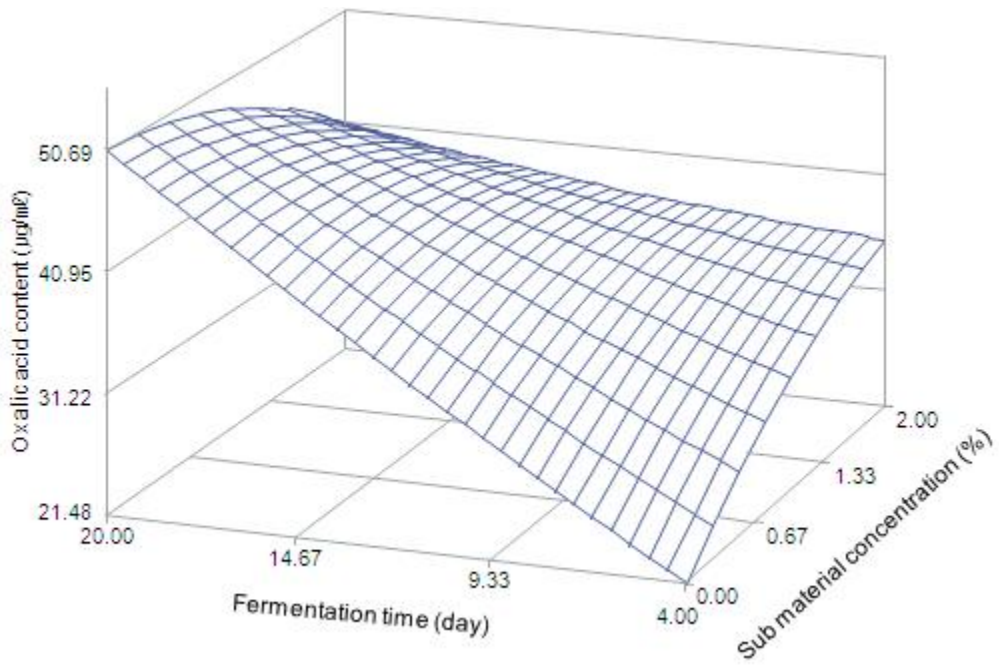


Fig. 17. Contour map(top) and response surface(bottom) for oxalic acid content of fermented red ginseng concentrates as a fermentation condition of time and sub material concentration.

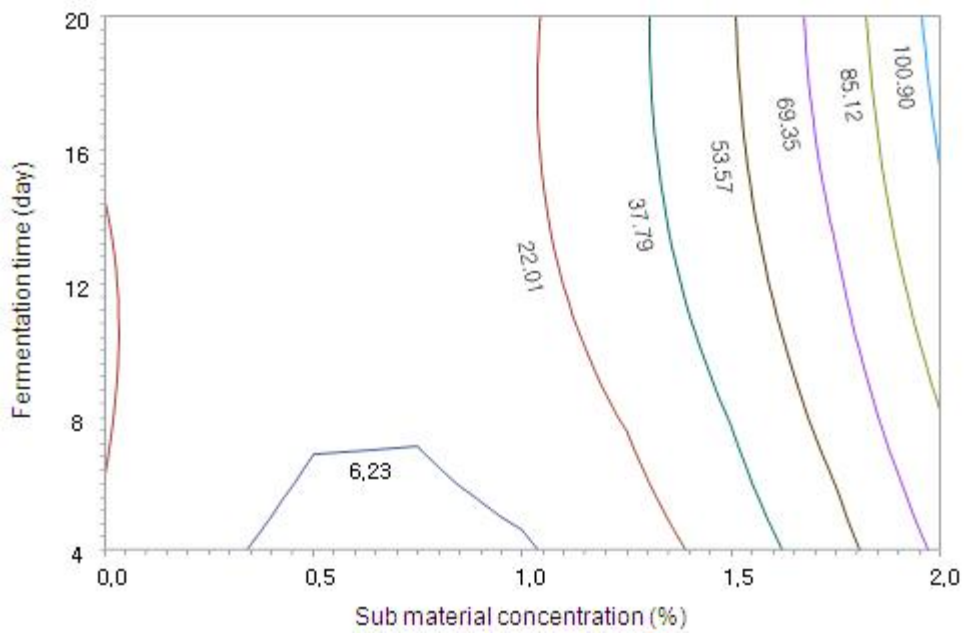
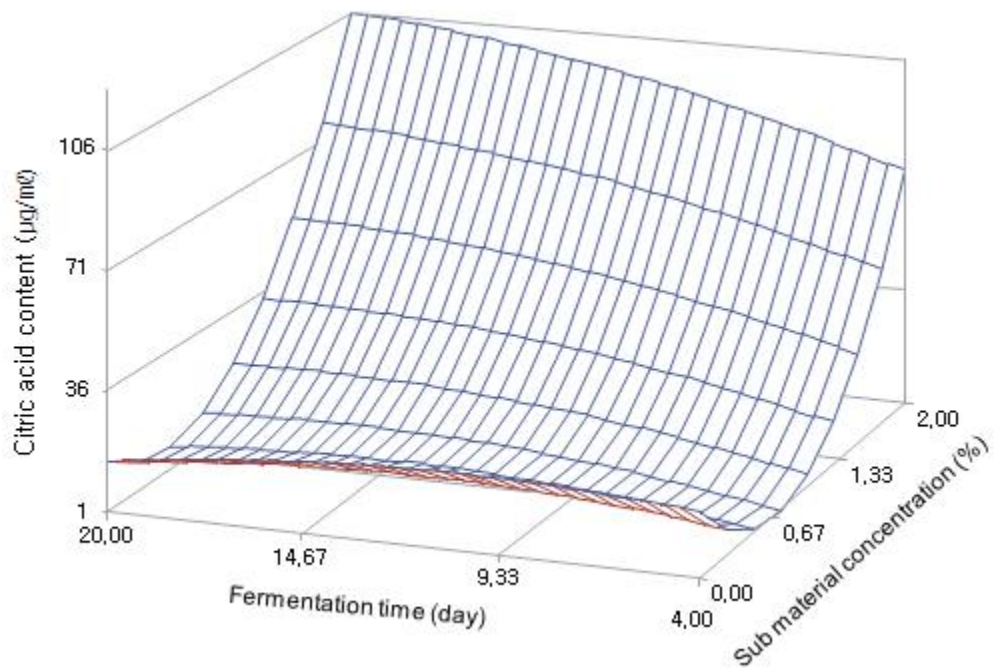


Fig. 18. Contour map(top) and response surface(bottom) for citric acid content of fermented red ginseng concentrates as a fermentation condition of time and sub material concentration.

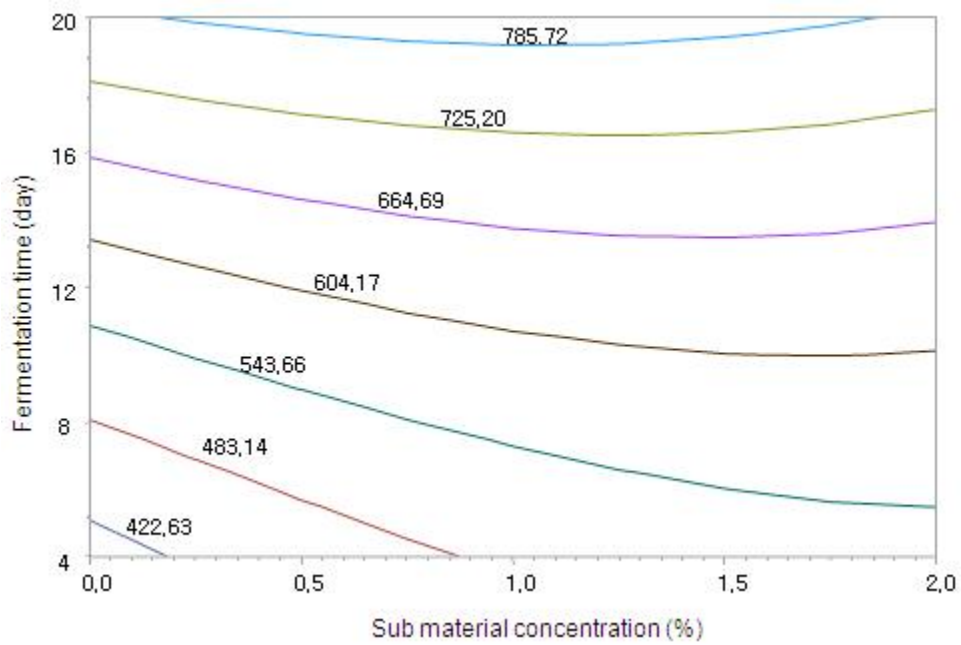
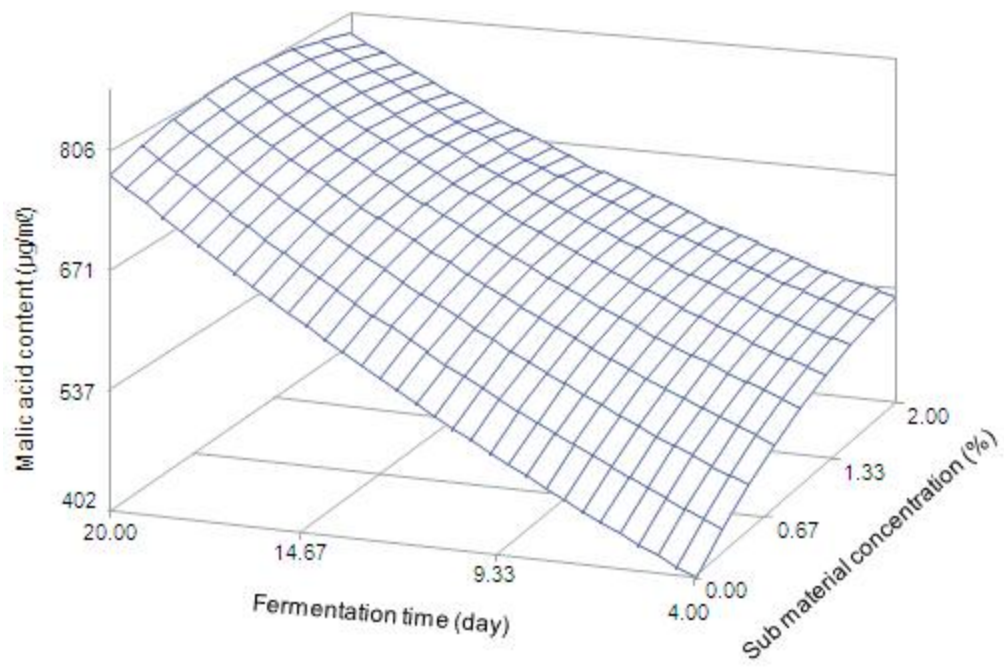


Fig. 19. Contour map(top) and response surface(bottom) for malic acid content of fermented red ginseng concentrates as a fermentation condition of time and sub material concentration.

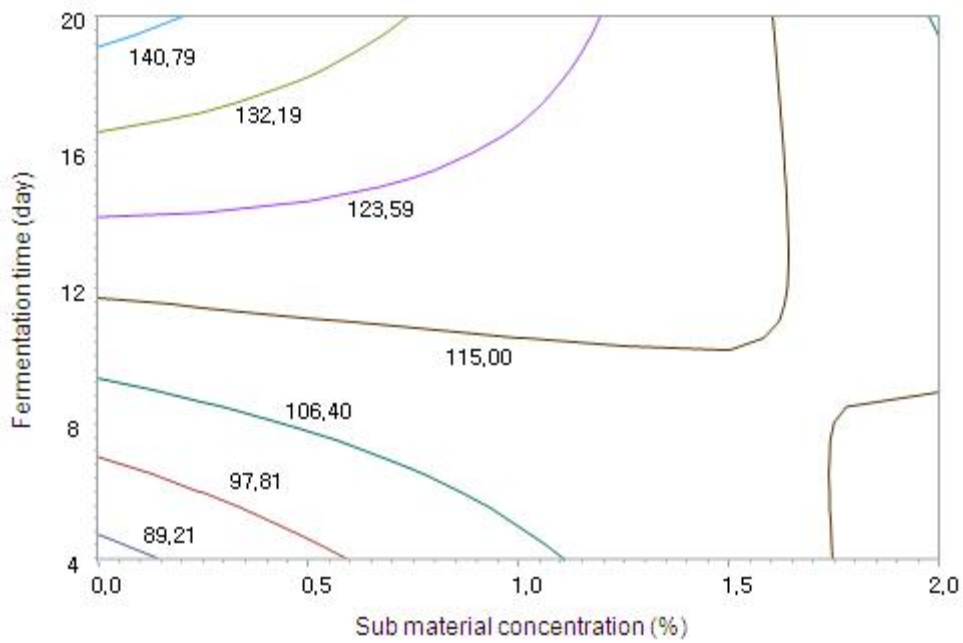
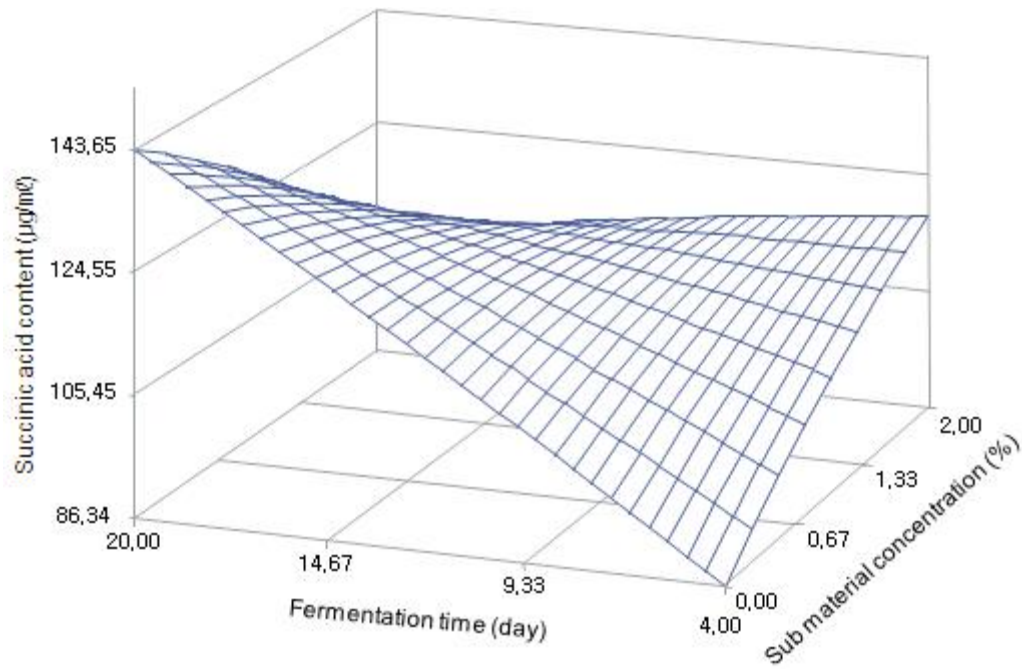


Fig. 20. Contour map(top) and response surface(bottom) for succinic acid content of fermented red ginseng concentrates as a fermentation condition of time and sub material concentration.

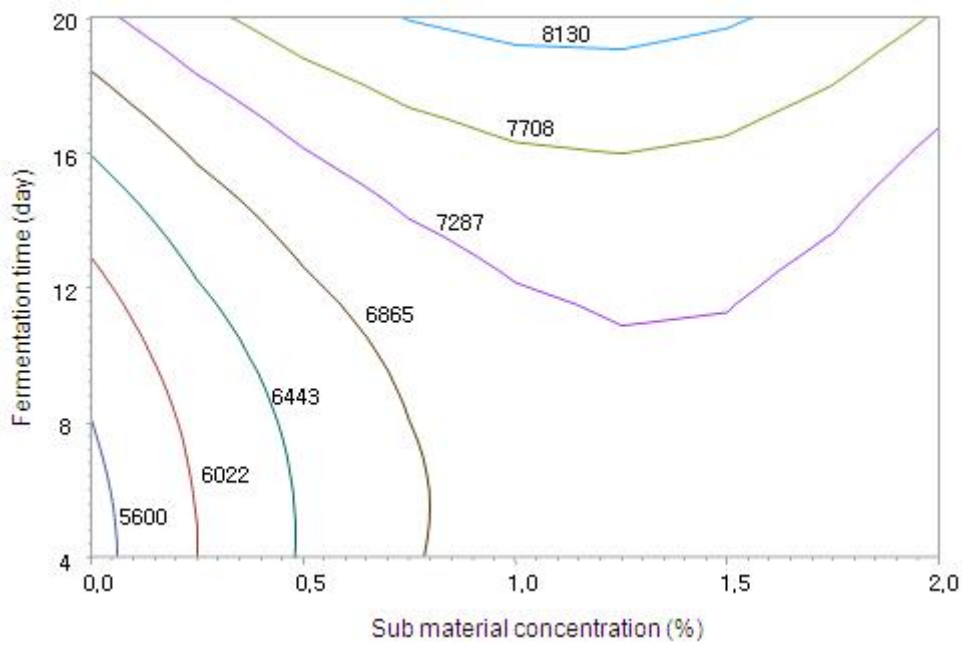
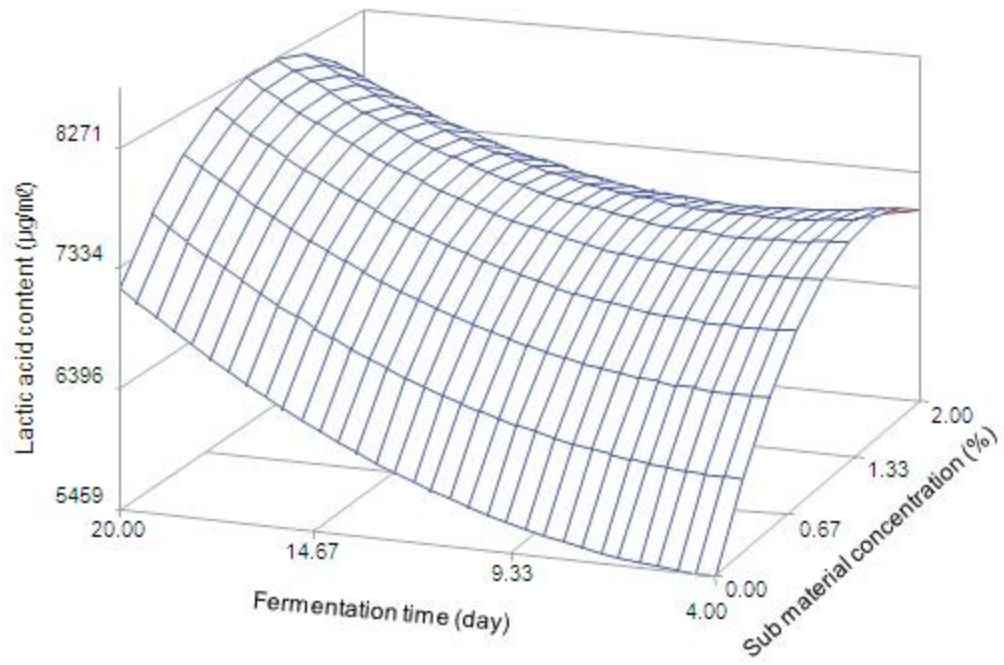


Fig. 21. Contour map(top) and response surface(bottom) for lactic acid content of fermented red ginseng concentrates as a fermentation condition of time and sub material concentration.

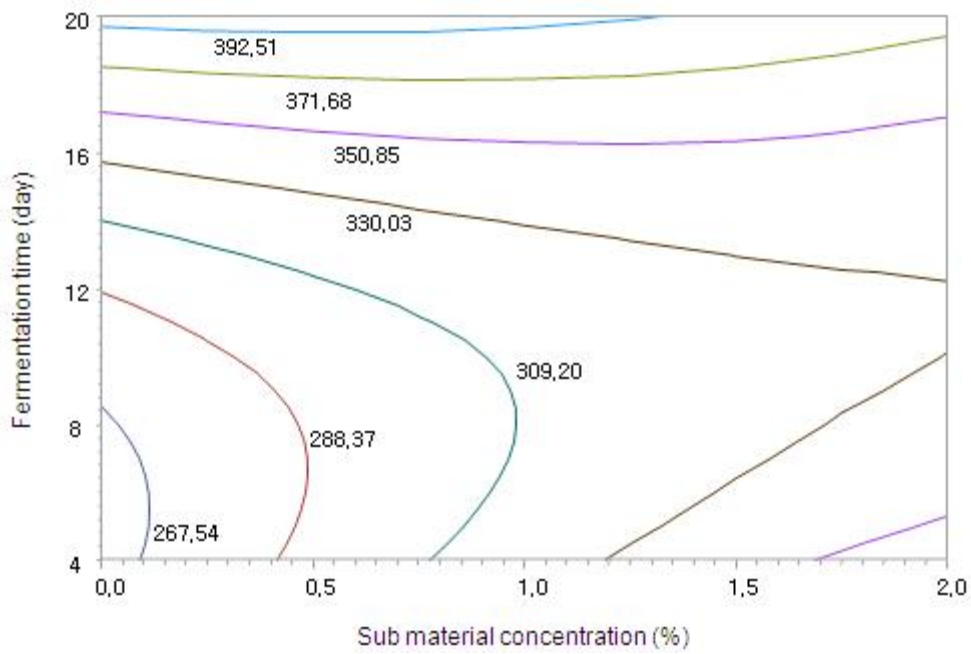
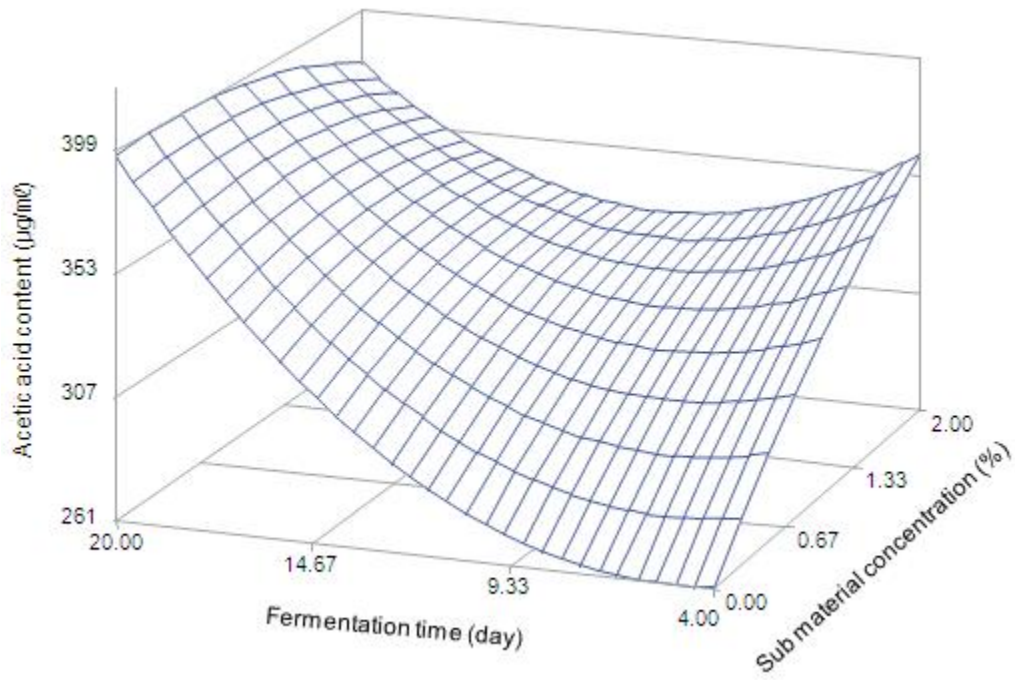


Fig. 22. Contour map(top) and response surface(bottom) for acetic acid content of fermented red ginseng extract as a fermentation condition of time and sub material concentration.

반응표면분석법의 반응조건에 따라 홍삼농축액을 발효 한 후 항산화적 특성을 측정한 결과는 Table 28과 같았다.

Table 28. Experimental data total phenolics compound content and DPPH radical scavenging ability of red ginseng concentrates under different fermentation conditions based on central composite design by response surface analysis

Exp. No ¹⁾	Total phenolics compound content (mg/100 ml)	DPPH radical scavenging ability (%)
1	57.61	67.29
2	56.05	68.13
3	55.39	71.33
4	55.77	71.51
5	56.05	69.75
6	57.07	70.07
7	56.91	68.85
8	56.45	69.42
9	56.55	68.85
10	59.13	68.97
11	54.84	73.93
12	58.14	68.88
13	56.25	70.55

¹⁾The number of experimental condition by central composite design.

Table 29. Regression coefficient and *t*-value of the predicted quadratic polynomial models on total phenolics compound content and DPPH radical scavenging ability of fermented red ginseng concentrates

Term	Total phenolics compound content		DPPH radical scavenging ability	
	Coefficient	<i>t</i> -value	Coefficient	<i>t</i> -value
Intercept				
β_0	57.039583	25.99	78.216042	33.35
Linear				
β_1	-0.137162	-0.57	-1.041131	-4.08
β_2	-3.172644	-1.56	-0.332701	-0.15
Quadratic				
β_{11}	0.005229	0.68	0.031766	3.89
β_{22}	0.544655	1.11	0.298017	0.57
Cross product				
β_{12}	0.242500	1.16	-0.082500	-0.53
R^2	0.8507		0.9226	
Lack of fit	0.1221		0.2907	

발효조건에 따른 홍삼농축액 발효물의 총 페놀성 화합물 함량을 측정한 결과는 54.84~59.13 mg/100 ml의 범위로 나타났으며(Table 28), 이를 이용한 회귀식은 Table 29에 나타내었다. 반응표면 모델의 회귀식의 R^2 값은 0.8507로 확인되었으며, ANOVA 분석을 통한 Lack of fit의 *P*-value가 0.1221이므로 반응표면 모형에 대한 적합성이 인정되었다(Table 29). 반응표면을 통한 발효조건에 따른 홍삼농축액 발효물의 총 페놀성 화합물 함량 변화는 Fig. 23과 같으며, 발효시간에 큰 영향을 받고 있었으며, 다음으로 부원료 농도의 영향을 받는 것으로 나타났다(Table 30). 발효조건에 따라 반응표면모델로 예측된 정상점은 안장점으로 나타났으며, 능선분석을 하여 최적점을 산출한 결과, 총 페놀성 화합물 함량의 최댓값은 59.75 mg/100 ml였으며, 이때의 발효조건은 발효시간 18.13일, 부원료 농도 1.64%로 나타났다(Table 31).

Table 30. Regression analysis for fermentation conditions of red ginseng extract

Response	F-Ratio	
	Time (day)	Sub materials conc. (%)
Total phenolics compound content	11.00***	3.32*
DPPH radical scavenging ability	26.45***	1.55

*Significant at 10% level; **significant at 5% level; ***significant at 1% level.

Table 31. Predicted levels of optimum fermentation conditions for the maximum responses of fermented red ginseng extract by the ridge analysis

Response	Predicted response				Morphology
	Response	Time (day)	Sub materials conc. (%)	Result	
Total phenolics compound content	Min	4.44	1.32	54.71 (mg/100 ml)	Saddle
	Max	18.13	1.64	59.75 (mg/100 ml)	
DPPH radical scavenging ability	Min	17.36	1.74	67.54 (%)	Minimum
	Max	4.00	0.98	74.19 (%)	

발효조건에 따른 홍삼농축액 발효물의 DPPH 라디칼 소거능은 67.29~73.93%의 범위로 나타났으며(Table 28), 이를 바탕으로 한 DPPH 라디칼 소거능의 회귀식은 Table 29와 같고 R² 값은 0.9228으로 1% 이내의 수준에서 유의성이 확인되었다. ANOVA 분석을 통한 모형에 대한 적합성을 검증하기 위해서는 Lack of fit의 P-value가 0.2907로 나타나 모형의 적합성이 인정되었다(Table 29). 반응표면을 통한 발효조건에 따른 홍삼농축액 발효물의 DPPH 라디칼 소거능의 변화는 Fig. 24과 같이 발효시간이 짧아질수록 함량이 증가하는 경향을 나타내었다. 발효조건에 대한 영향은 Table 30에서와 같이 발효시간에 큰 영향을 받고 있는 것으로 나타났으며, 설정된 범위 내에서 부원료 농도에는 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 발효조건에 따라 반응표면모델로 예측된 회귀분석결과 임계점이 최대점이 아닌 최저점으로 나타났으며, 최적점을 산출한 결과 최댓값은 74.19%이며, 이때의 발효조건은 발효시간 4.00일, 부원료 농도 0.98%으로 나타났다(Table 31).

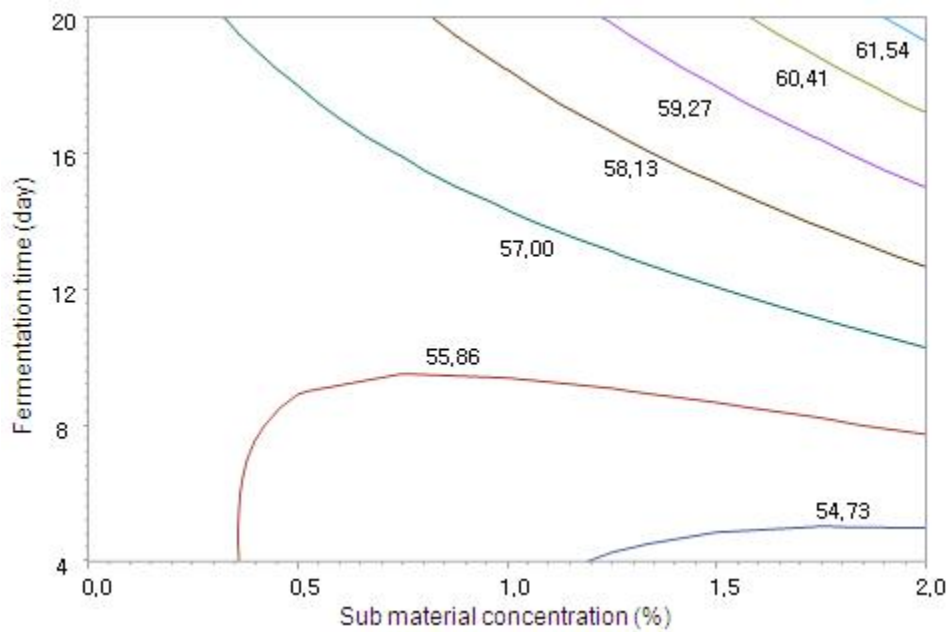
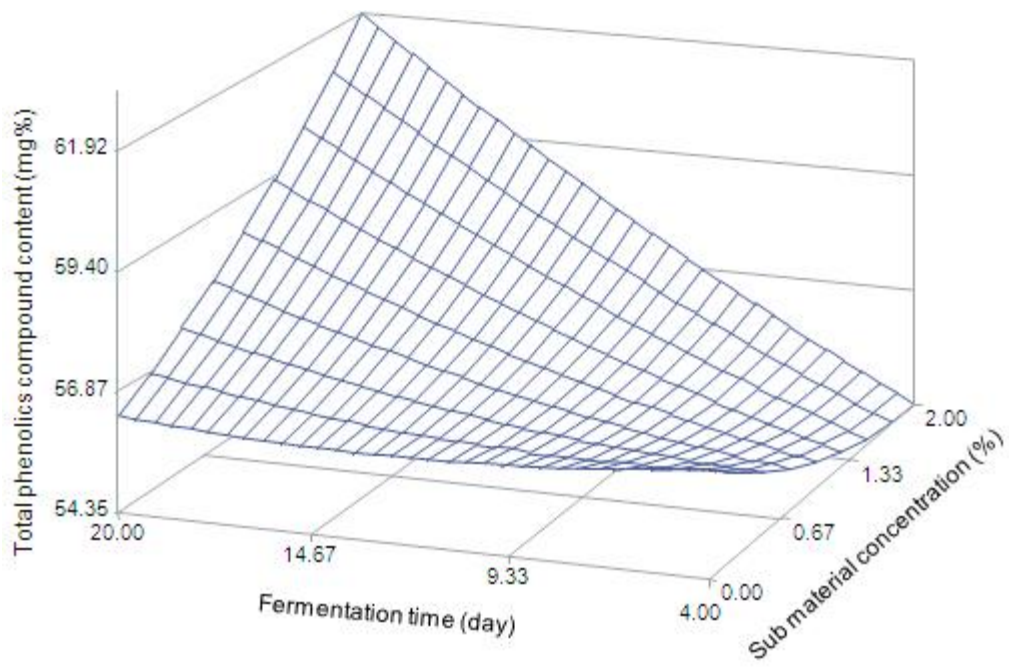


Fig. 23. Contour map(top) and response surface(bottom) for total phenolics compound content of fermented red ginseng concentrates as a fermentation condition of time and sub material concentration.

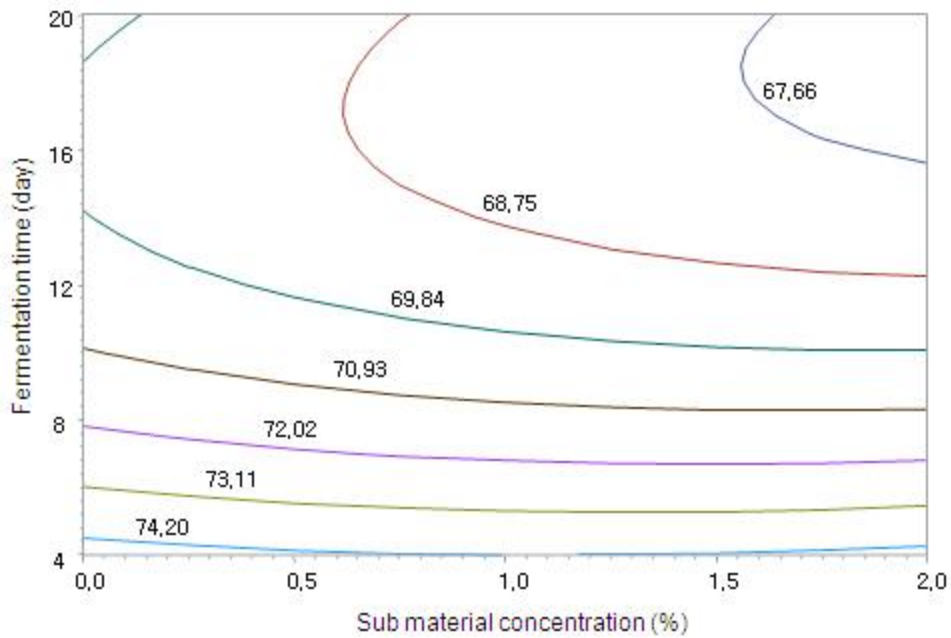
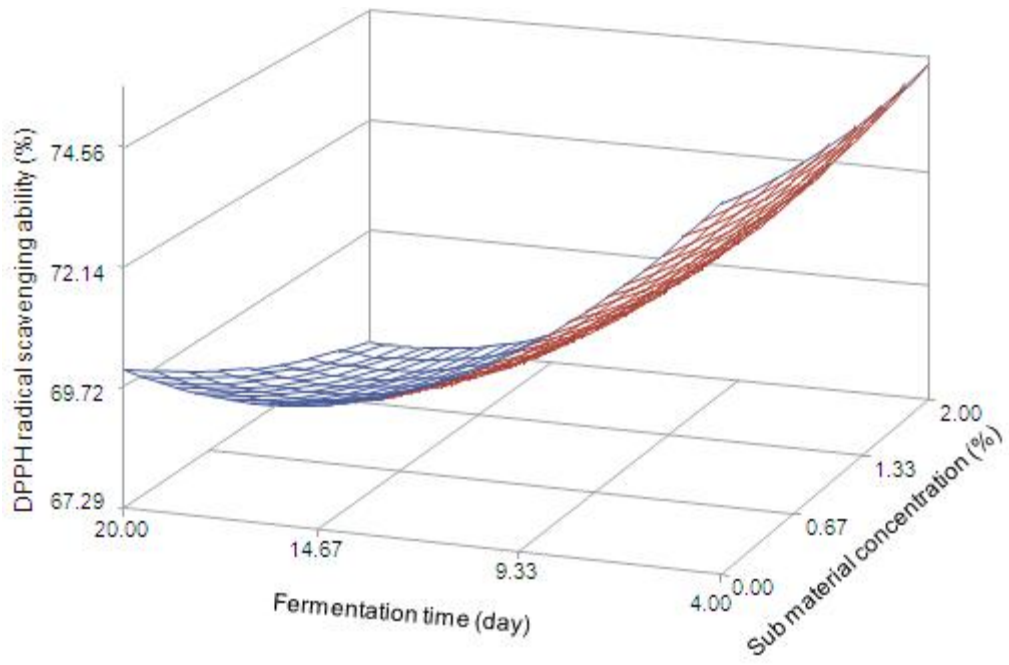


Fig. 24. Contour map(top) and response surface(bottom) for DPPH radical scavenging ability of fermented red ginseng concentrates as a fermentation condition of time and sub material concentration.

최적 발효조건 예측

진세노사이드 전환을 위한 홍삼농축액의 최적 발효조건을 설정하기 위하여 발효적 특성, 진세노사이드 함량 및 유기산 함량을 모두 만족시켜주는 최적 발효조건을 얻고자 각 반응표면을 superimposing⁹⁾하여 Fig. 25의 겹쳐진 부분으로써 Table 32에 최적 발효조건을 나타내었다. 홍삼농축액의 최적 발효조건 범위는 발효시간 12 ~ 16일 및 부원료 농도 1.0 ~ 1.8%로 나타났다. 따라서 이와 같은 예측 결과에 대한 모델식의 신뢰성을 확인하기 위하여 예측된 최적 조건 범위 내에서 임의의 조건 즉, 발효시간 14일 및 부원료 농도 1.5%를 대입하여 실제 유산발효를 실시하고, 홍삼농축액 발효물의 발효적 특성, 진세노사이드 함량 및 유기산 함량을 측정된 결과 예측된 값들과 유사한 수준으로 비교되었다 (Table 33).

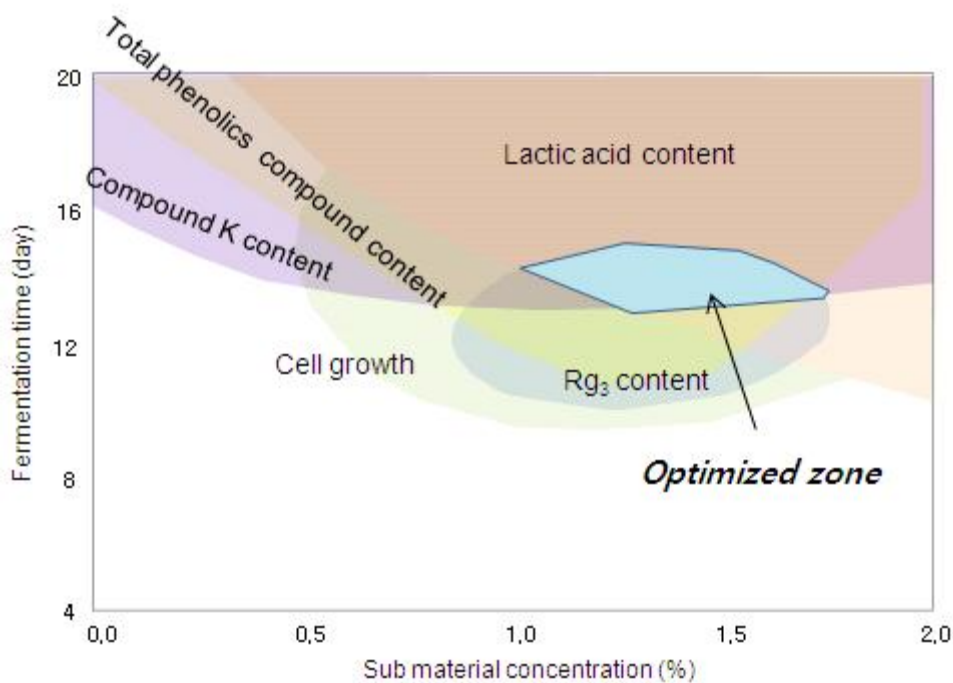


Fig 25. Superimposed contour map for the optimization of cell growth, ginsenoside Rg₃, ginsenoside C-K and lactic acid content as function of fermentation time and sub material concentration of fermented red ginseng concentrates.

Table 32. The optimum fermentation condition of fermented red ginseng concentrates by superimposed response surface

Fermentation conditions	Range of predicted condition
Fermentation time (day)	12 ~ 16
Sub material concentration (%)	1.0 ~ 1.8

Table 33. Comparison between predicted and observed condition for physicochemical qualities of fermented red ginseng concentrates

Physicochemical qualities	Predicted condition(A) ¹⁾	Observed condition(B) ²⁾	B/A×100(%)	
Cell growth (O.D. 600 nm)	1.673	1.752	104.72	
pH	3.90	3.88	99.48	
Acidity (%)	1.16	1.12	96.55	
Ginsenosides content (µg/ml)	Rg ₁	25.00	27.33	109.32
	Re	23.92	27.76	157.85
	Rb ₁	223.61	241.67	108.07
	Rd	55.50	49.62	89.40
	Rg ₃	166.09	109.92	66.18
	C-K	97.32	90.63	93.12
	합계	591.44	546.93	92.47
Organic acid content (µg/ml)	Oxalic acid	40.14	46.37	115.52
	Citric acid	47.12	82.01	174.04
	Malic acid	674.53	1027.11	152.27
	Succinic acid	116.28	98.80	84.96
	Lactic acid	7463.22	9258.51	124.05
Total phenolics compound content(mg/100 ml)	Acetic acid	334.86	606.32	181.06
		57.70	58.14	100.76
DPPH radical scavenging ability (%)	68.31	69.48	101.71	

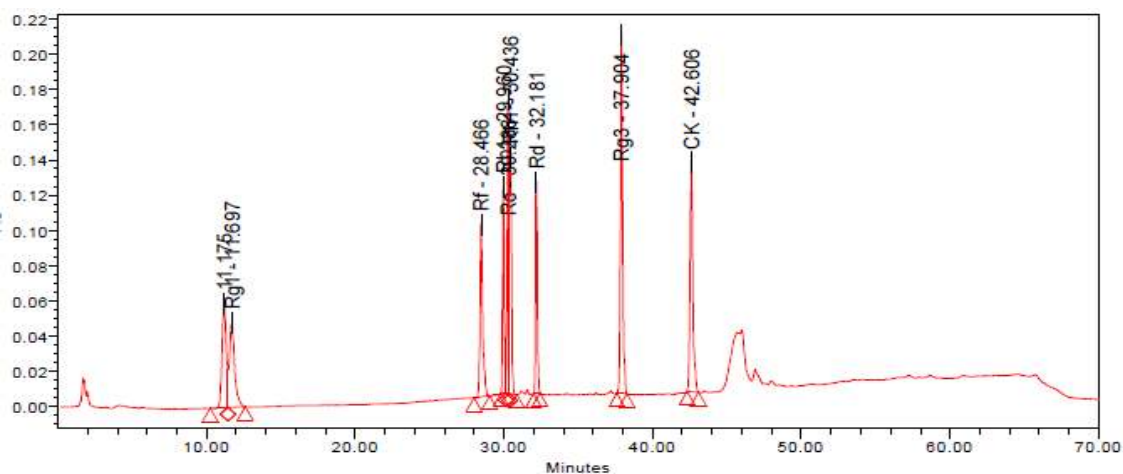
¹⁾ Calculated using the predicted equations for response variables.

Given optimal condition of independent variables : fermentation time 14 day and sub material concentration 1.5%

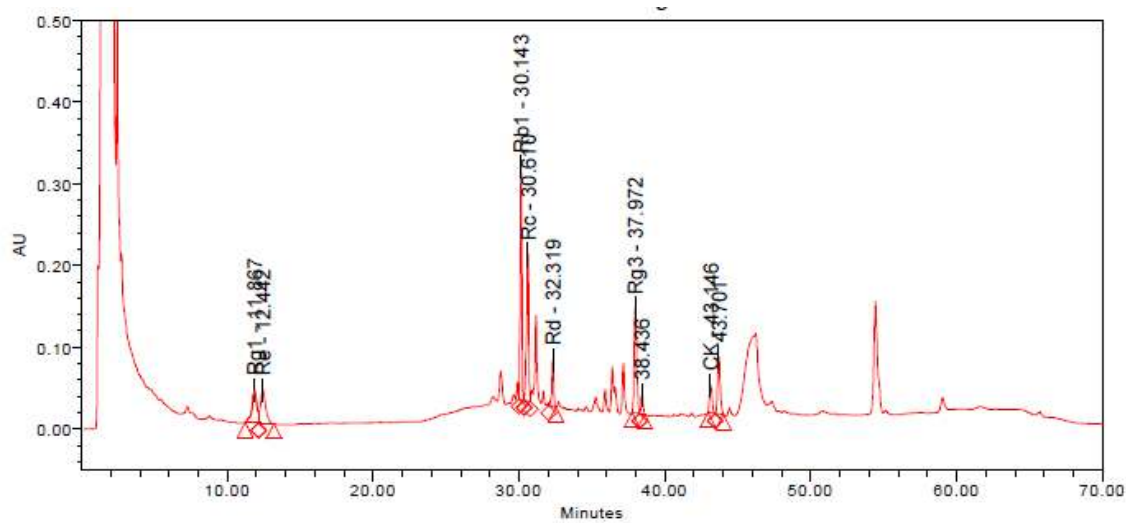
* Cf. Ginsenoside content 5% red ginseng concentrates before fermentation

	Ginsenoside content (µg/ml)					
	Rg ₁	Re	Rb ₁	Rd	Rg ₃	Compound-K
Con.	128.03	151.87	366.60	57.75	99.71	43.13

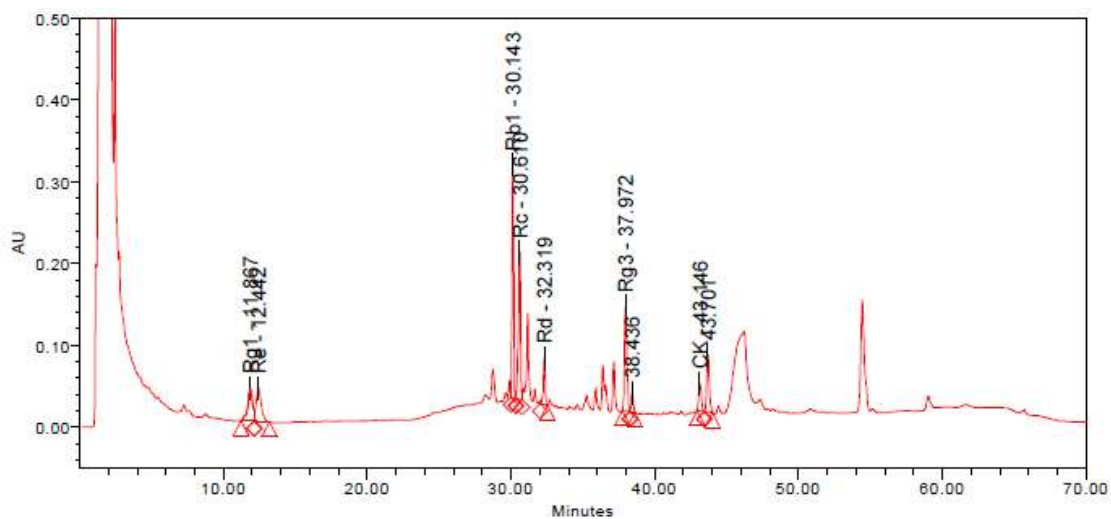
1. Standard



2. 5% red ginseng concentrates before fermentation

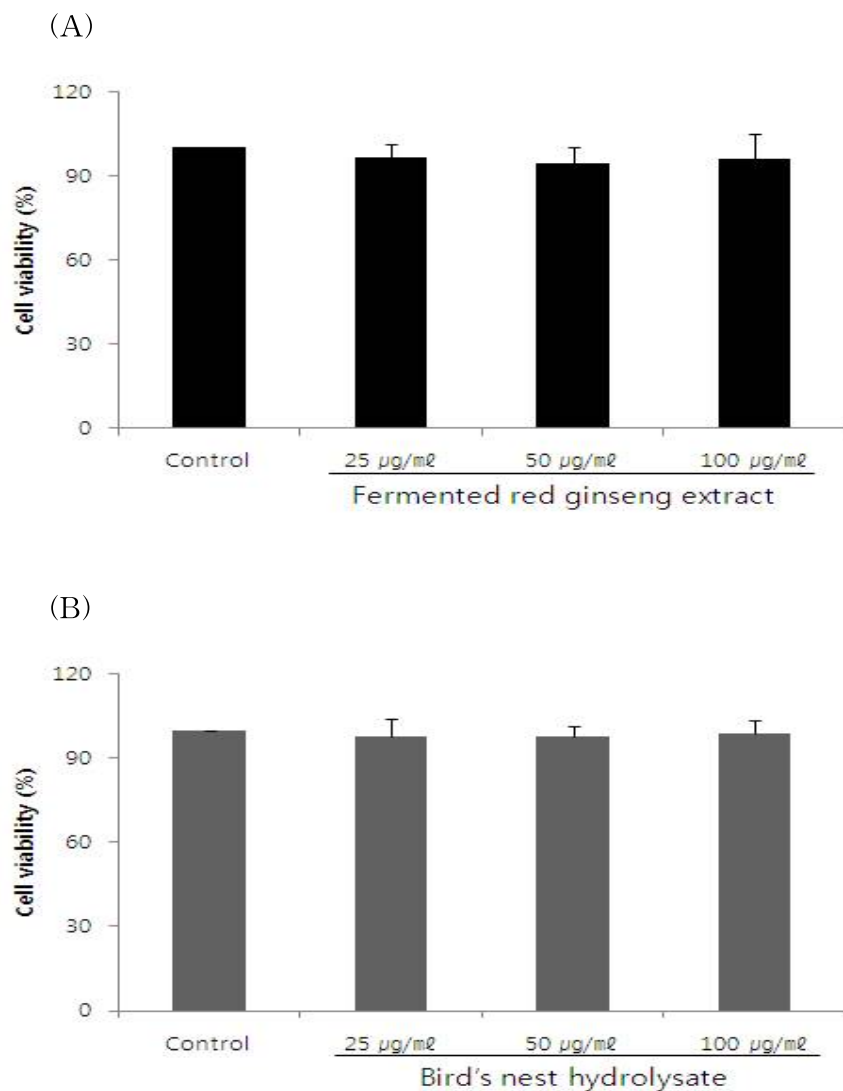


3. 5% red ginseng concentrates after fermentation



세포 독성

발효홍삼액, 제비집가수분해물, 발효홍삼액+제비집가수분해물 혼합물이 대식세포의 증식능에 미치는 영향을 측정하기 위해 RAW 264.7 세포에 이들 각각을 농도별로 처리하여 세포 독성을 MTT assay²⁶⁾를 이용하여 측정하였다. 그 결과 세포의 생존율은 Fig. 26에서 보는 바와 같이 대조군과 비교 시 모든 농도에서 차이가 나타나지 않음을 알 수 있었으며, 세포 MTT 반응에서 80% 이상의 생존율을 보이는 경우 세포 독성이 없는 것으로 판단되는데, 발효홍삼액, 제비집가수분해물 및 이들 혼합물은 25, 50, 100 µg/ml 농도에서 모두 90% 이상의 세포 생존율을 나타내어 세포독성에 큰 영향을 미치지 않아 독성이 없는 것으로 나타나 안전한 것으로 확인되었다.



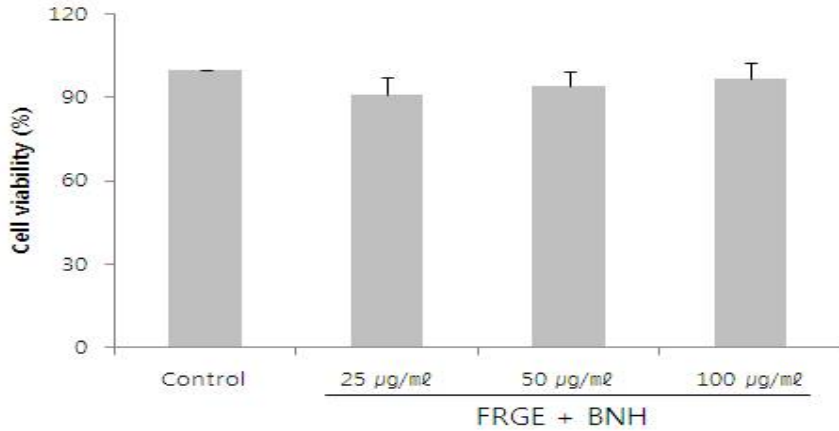
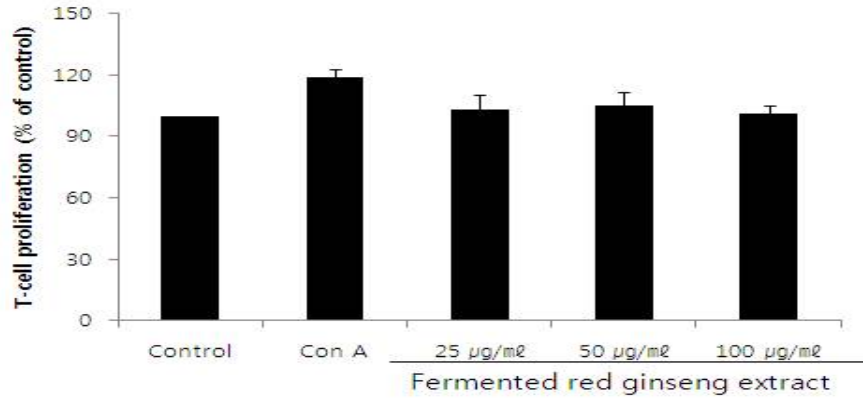


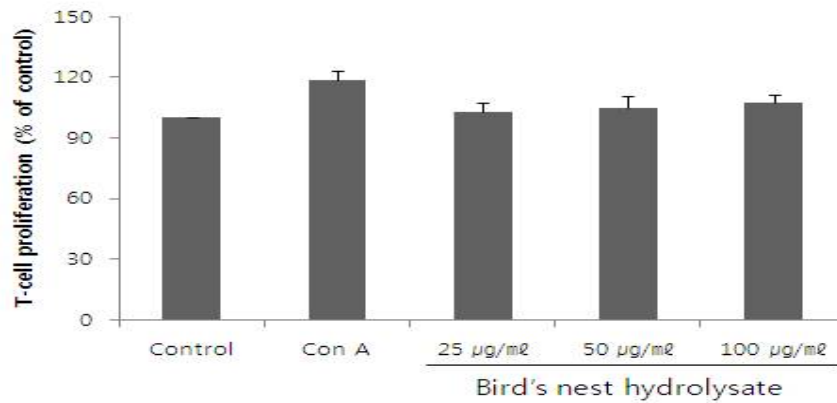
Fig. 26. Cell cytotoxicity of FRGE, BNH and FRGE+BNH in RAW 264.7 cells. Each cell was treated with 25, 50 and 100 µg/ml of various sample for 24hr. Cell viability was measured using an MTT assay. Control : Only treated with media. (A) FRGE : Fermented red ginseng extract, (B) BNH : Bird's nest hydrolysate, (C) FRGE+BNH : Fermented red ginseng concentrates + Bird's nest hydrolysate

T세포 증식능

비장은 혈액으로부터 항원을 수집하며, 항원에 의해 자극을 받은 후에 림프구의 분화가 이루어지는 주요 림프기관으로 비장 내 림프구의 증식을 면역 시스템에서 매우 중요한 의미를 갖는다²⁷⁾. 우리 몸의 전체 림프구 중 비장에 분포되어 있는 림프구는 T세포가 60%, B세포가 30% 정도로 T세포의 비율이 높다. T세포는 외부 이물질이 체내로 유입되면 항원에 특이적 반응성을 보여 직접 면역반응에 관여하는 세포성 면역반응을 일으킨다²⁸⁾. 본 연구에서는 T세포주인 Molt-4 세포에 FRGE, BNH, FRGE+BNH 시료를 25, 50, 100 µg/ml의 농도로 처리하여 증식능을 측정한 결과를 Fig. 27에 나타내었다. 그 결과 발효홍삼액의 경우 모든 농도에서 대조군에 비해 높았고, 50 µg/ml 농도에서 가장 높게 증가하였다. 제비집가수분해물의 경우 또한 모든 농도에서 대조군보다 높은 생존율을 보였으며, 100 > 50 > 25 µg/ml 순으로 농도 의존적으로 T세포 증식능이 높은 것으로 나타났다. 또한 발효홍삼액과 제비집가수분해물을 혼합하여 처리한 경우는 발효홍삼액과 제비집가수분해물을 단독처리한 것보다 높은 것으로 나타났으며, 50 µg/ml의 농도는 대조군에 비해 약 15%이상 증가하였으며, 양성 대조군인 Con A를 처리한 것과 유사한 증식을 보였다.



(B)



(C)

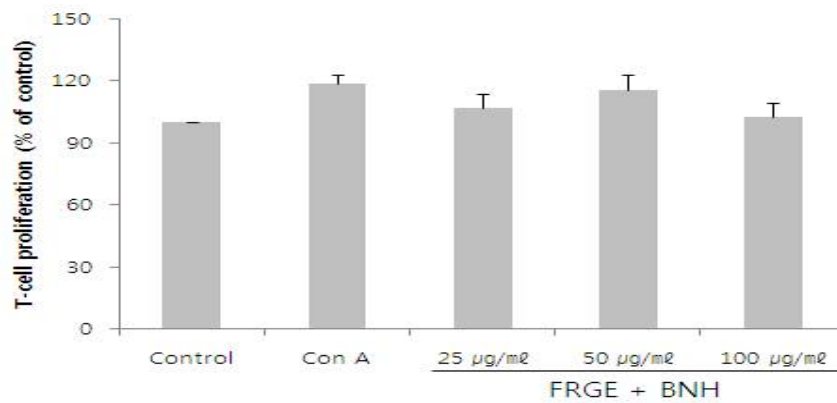
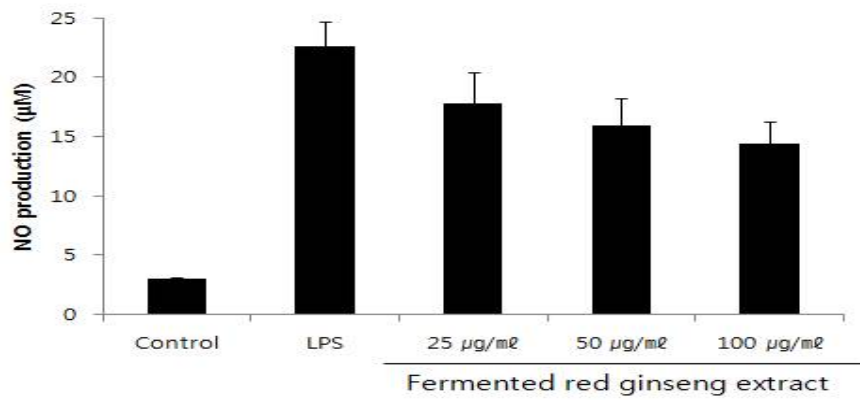


Fig. 27. Effect of FRGE, BNH and FRGE+BNH on proliferation rate of T-cell(Molt-4 cell). Cells were treated with the indicated doses of the fermented red ginseng concentrates and bird's nest hydrolysate for 96 hr. Cell viability was determined by MTT assay. Control : Only treated with media. Con A : 5 µg/ml concanavalin A. (A) FRGE : Fermented red ginseng concentrates, (B) BNH : Bird's nest hydrolysate, (C) FRGE+BNH : Fermented red ginseng concentrates + Bird's nest hydrolysate

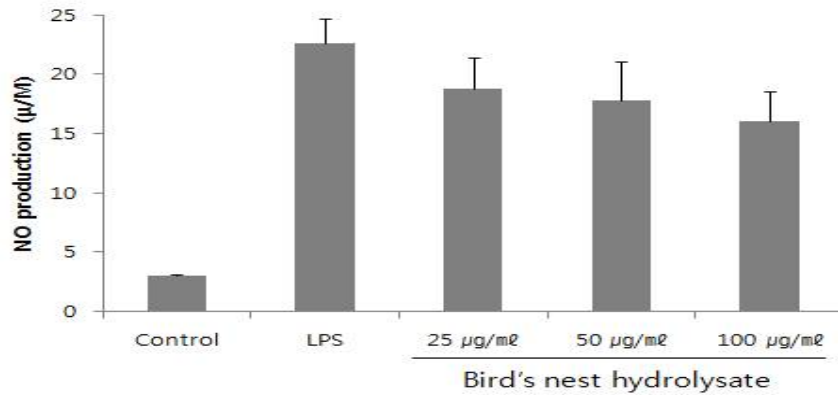
NO(Nitric oxide) 생성량

대표적인 활성 산소 중 하나인 Nitric oxide(NO)의 생성은 면역반응에 있어 중요한 역할을 하며, 과잉 생산 시 산화적 스트레스 상태를 유발하여 세포 손상의 원인으로 작용한다²⁹⁾. 발효홍삼액과 제비집가수분해물 및 이들 혼합물이 RAW 264.7 세포에 LPS로 유도하여 NO의 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 각각의 시료를 다양한 농도로 전 처리하고 LPS로 자극하였다. 24시간 후에 세포 상층액에서 NO의 생성을 측정된 결과, LPS로 자극한 대조군에 비해 모든 시험군에서 농도 의존적으로 NO 생성이 감소하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 28). 또한 발효홍삼액과 제비집가수분해물 단독처리군에 비해 발효홍삼액과 제비집가수분해물 혼합 처리한 군에서 NO의 생성을 더욱 효과적으로 저해하였다. 홍삼과 발효홍삼의 경우 NO의 생성을 억제하는 것으로 보고되어 있다³⁰⁾.

(A)



(B)



(C)

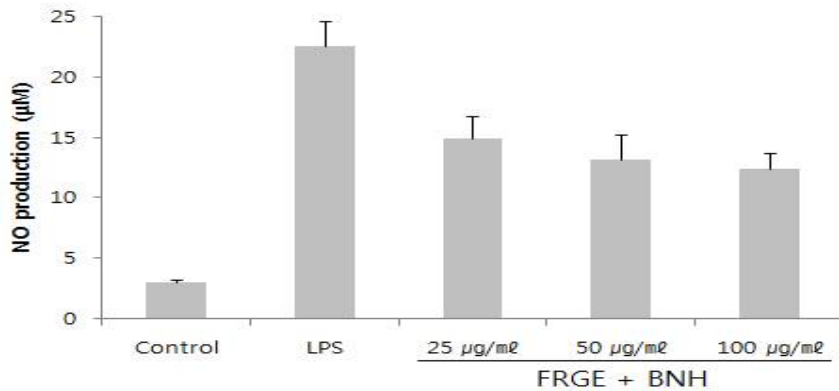


Fig. 28. Effect of FRGE, BNH and FRGE+BNH on LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with LPS (2 µg/ml) and combined with FRGE, BNH and FRGE+BNH for 24 hr. Nitrite was measured by Griess reagent. LPS : 2 µg/ml (A) FRGE : Fermented red ginseng concentrates, (B) BNH : Bird's nest hydrolysate, (C) FRGE+BNH : Fermented red ginseng concentrates + Bird's nest hydrolysate

TFN- α 생성 억제

LPS에 의해 유도되는 염증사이토카인인 TFN- α 의 생성을 억제 시키는지를 조사하기 위하여 시료와 LPS를 RAW 264.7 세포에 각각 처리한 다음 24시간 후, LPS에 의해 활성화된 세포로부터 분비되는 cytokine의 양을 측정³¹⁾하였다. 그 결과 Fig. 29와 같이 LPS 단독처리군에서의 TFN- α 는 96.71 pg/ml로 증가를 보였으며, 100 μ g/l 농도의 발효홍삼액으로 처리한 시료에서는 75.9 pg/ml, 제비집가수분해물에서는 86.41 pg/ml, 발효홍삼액과 제비집가수분해물 혼합에서는 73.78 pg/ml의 생성량을 보여, 모든 시료 처리군에서 LPS 단독처리군보다 TFN- α 의 생성을 유의적으로 억제하는 것으로 나타났다.

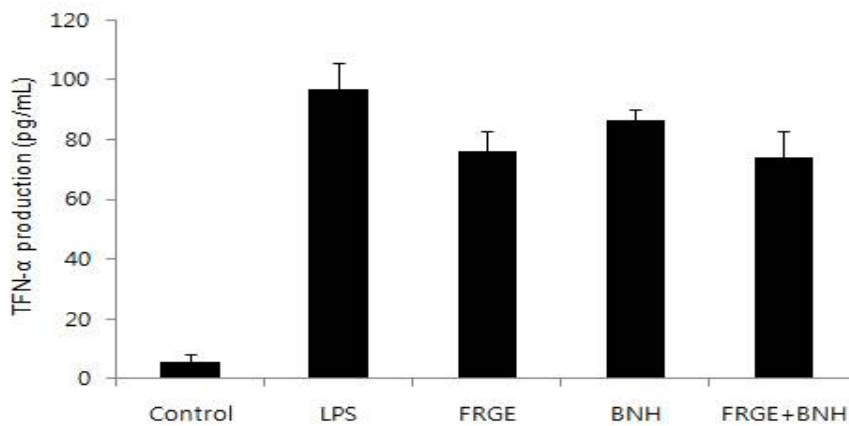


Fig. 29. Effect of FRGE, BNH and FRGE+BNH on LPS-induced TFN- α production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with LPS (2 μ g/ml) and combined with FRGE, BNH and FRGE+BNH for 24 hr. TFN- α was measured by ELISA for TFN- α kit. LPS : 2 μ g/ml (A) FRGE : Fermented red ginseng concentrates, (B) BNH : Bird's nest hydrolysate, (C) FRGE+BNH : Fermented red ginseng concentrates + Bird's nest hydrolysate

IL-2 생성 억제

IL-2는 주로 T cell proliferation factor로서 활성화된 T 림프구에 의해 분비되거나 활성화된 T cell의 증식에 필수적인 cytokine로 알려져 있다¹⁷⁾. 자극제 LPS의 유도에 의해 면역반응의 과정 중 IL-2의 생성은 Fig. 30에 나타내었으며, FRGE+BNH > FRGE > BNH 처리군 순으로 LPS 단독처리군보다 낮은 분비량을 나타내어 IL-2의 생성이 억제됨을 확인하였다.

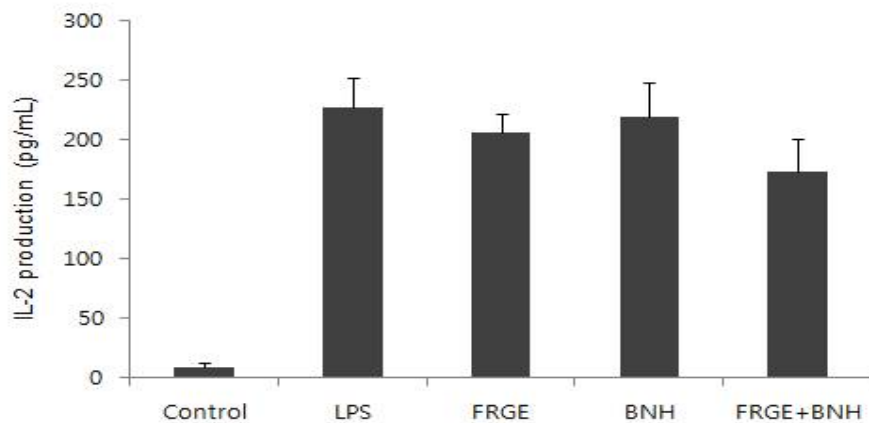


Fig. 30. Effect of FRGE, BNH and FRGE+BNH on LPS-induced IL-2 production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with LPS (2 μ g/ml) and combined with FRGE, BNH and FRGE+BNH for 24 hr. TFN- α was measured by ELISA for TFN- α kit. LPS : 2 μ g/ml (A) FRGE : Fermented red ginseng concentrates, (B) BNH : Bird's nest hydrolysate, (C) FRGE+BNH : Fermented red ginseng concentrates + Bird's nest hydrolysate

IL-6 생성 억제

IL-6은 B-cell이 plasma 세포로의 분화 촉진, Ig의 생성유도 및 T-cell의 분화 증식, 항체의 분비 자극 등에 관여하며 염증 부위에서 수치가 급격히 증가되는 특징을 보인다³³⁾. 발효홍삼액과 제비집가수분해물 및 이들 혼합물의 IL-6 생성량을 측정한 결과는 Fig. 31과 같다. LPS 단독처리군이 73.20 pg/ml의 생성량을 보였으며, FRGE군은 56.37 pg/ml, BNH군은 59.76 pg/ml, FRGE+BNH군은 53.38 pg/ml의 생성량을 보여 LPS 단독처리군보다 낮은 함량을 나타내었다. 따라서 모든 시료 처리군에서 IL-6의 생성량이 대조군보다 적은 생성량을 보였으며, 특히 발효홍삼액과 제비집가수분해물을 혼합처리한군이 IL-6 생성량의 감소에 미치는 영향이 큰 것으로 나타났다.

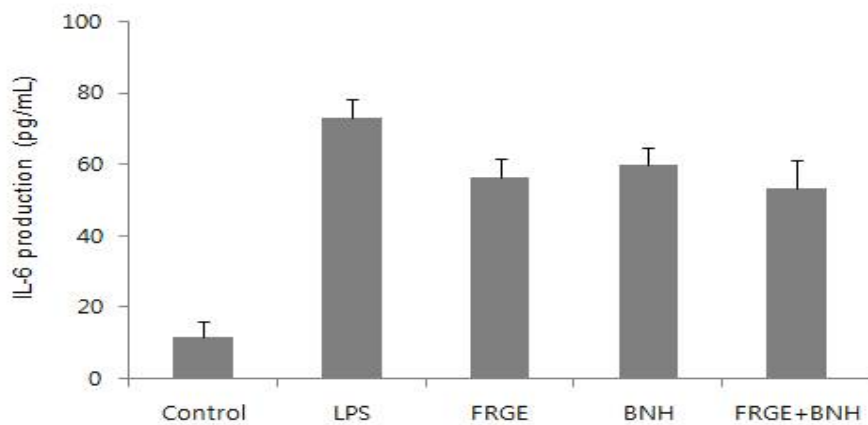


Fig. 31. Effect of FRGE, BNH and FRGE+BNH on LPS-induced IL-6 production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with LPS (2 μ g/ml) and combined with FRGE, BNH and FRGE+BNH for 24 hr. TNF- α was measured by ELISA for TNF- α kit. LPS : 2 μ g/ml (A) FRGE : Fermented red ginseng concentrates, (B) BNH : Bird's nest hydrolysate, (C) FRGE+BNH : Fermented red ginseng concentrates + Bird's nest hydrolysate

IL-10의 생성 억제

IL-10은 IL-1 β 나 IL-6 및 TNF- α 의 분비를 조절하여 면역 조절작용에 관여하는 것으로 알려져 있다. 또한 전염증성 cytokine들이 과량 분비되어 IL-10과 균형을 이루지 못할 경우, 숙주의 생존력에 영향을 줄 수 있으므로 염증반응에서 IL-10의 분비는 매우 중요하다³⁴). LPS(2 μ g/ml)와 함께 100 μ g/ml 농도의 발효홍삼액과 제비집가수분해물 및 이들 혼합물 각각을 포함한 배지에 RAW 267.4 cell을 24시간 동안 배양한 결과, LPS로 인한 IL-10 생성량은 각각의 시료처리군이 FRGE+BNH > FRGE > BNH 순으로 적게 생성되었다. 따라서 발효홍삼액과 제비집가수분해물이 혼합액은 면역과 관련한 각종 지표의 활성화에 영향을 주는 것으로 나타나, 이들 혼합액을 활용한 면역활성 증가와 관련한 제품에 첨가하여 제조가 가능할 것으로 생각된다.

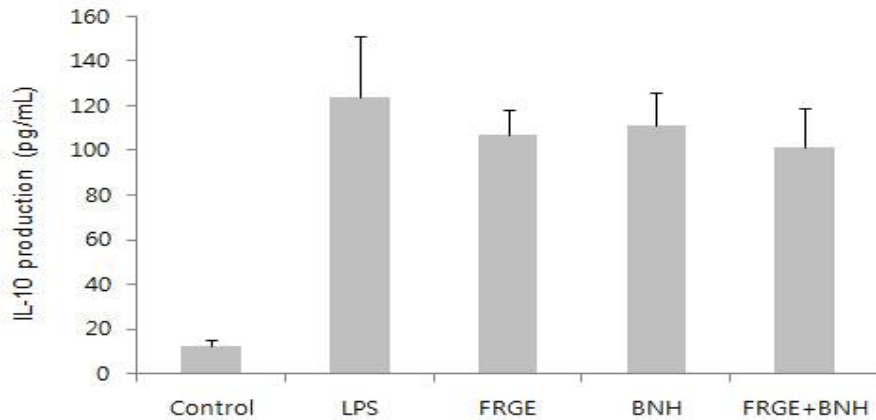


Fig. 32. Effect of FRGE, BNH and FRGE+BNH on LPS-induced IL-10 production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with LPS (2 μ g/ml) and combined with FRGE, BNH and FRGE+BNH for 24 hr. TNF- α was measured by ELISA for TNF- α kit. LPS : 2 μ g/ml (A) FRGE : Fermented red ginseng concentrates, (B) BNH : Bird's nest hydrolysate, (C) FRGE+BNH : Fermented red ginseng concentrates + Bird's nest hydrolysate

제비집 가수분해물과 발효홍삼액을 첨가한 음료 제조

음료 소재화를 위한 처리 공정도

면역력 강화 음료 제조를 위한 제비집과 홍삼농축액의 전처리는 최적의 가수분해조건 (Flavourzyme 500 MG 15%, 40°C, 140분)과 최적발효조건(5% 홍삼농축액, 부원료 1.5%, 37°C, 14일)이었으며, 이를 활용하여 다음의 전처리 과정으로 소재화 하였다.



음료 배합비 결정

위의 전처리 공정에 따라 제조된 제비집 가수분해물과 홍삼농축액 유산발효를 이용한 면역력강화 음료 조성의 배합비율은 Table 34와 같다. 제품의 이화학적 및 관능적 특성을 측정한 후, 부드럽고 자연스런 맛의 기호도가 가장 높은 비율을 선택하여 음료의 최적 배합 조건으로 설정하였다.

Table 34. Formula for preparation of beverage added lactic acid fermented red ginseng concentrates and bird's nest hydrolysate

Ingredients	Mixing ratio (% , v/v)
Bird's nest hydrolysate	15
Lactic acid fermented red ginseng concentrates	16
Persimmon concentrate	2.0
Appel concentrate	1.0
pear concentrate	1.0
High fructose corn syrup	8.0
Vitamin C	0.01
Citric acid	0.05
Xylitol	0.5
<i>Paecilomyces tenuipes</i> concentrate	0.01
Lingzhi mushroom concentrate	0.01
Jujube concentrate	0.01
Red ginseng flavor	0.01
Nuroong-gi flavor	0.01
Refined water	56.39
Total	100

제조공정도

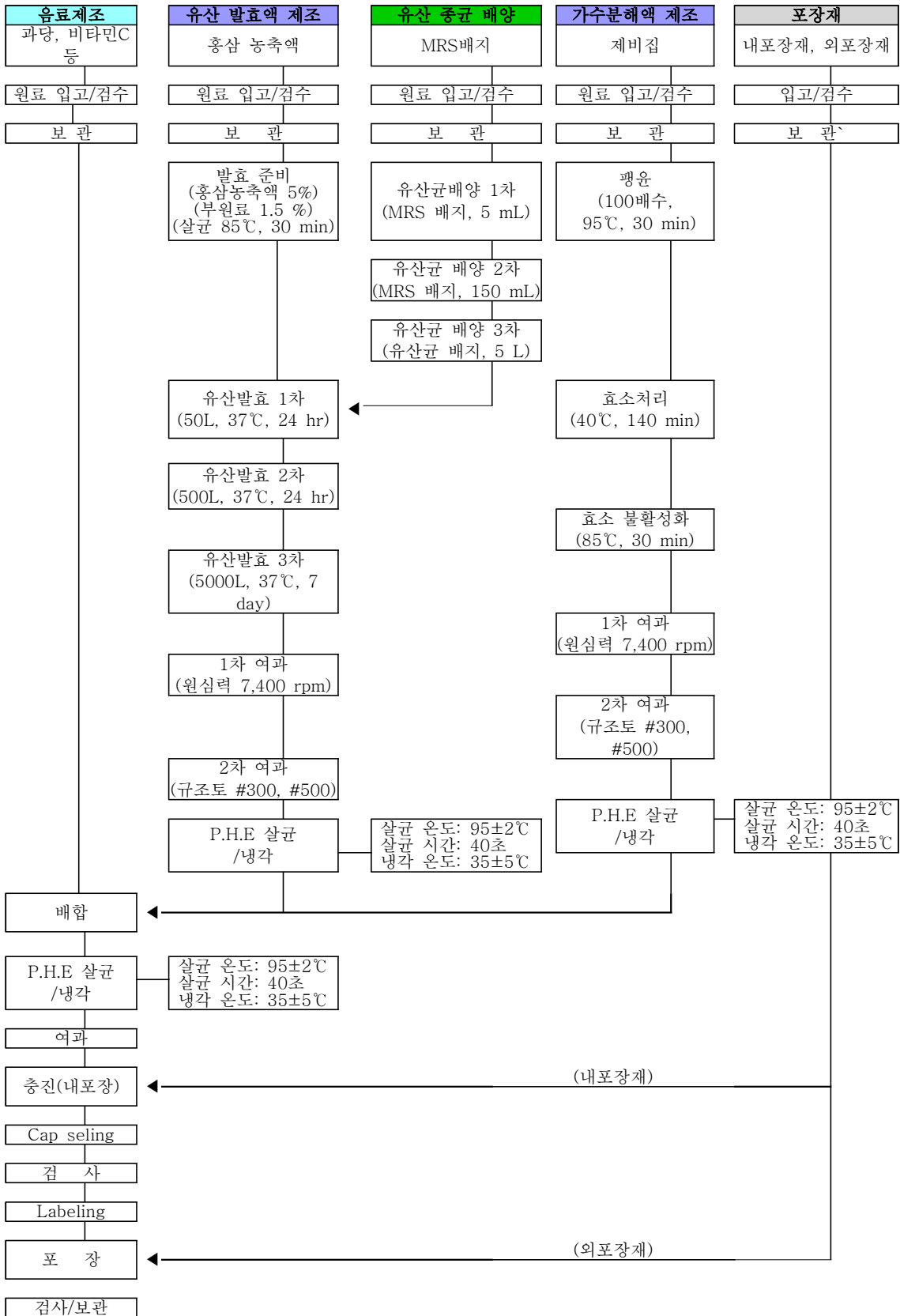
유산발효홍삼농축액과 제비집 가수분해물을 이용한 음료 제조의 공정도는 Fig. 33과 같다. 그림과 같은 9단계의 공정도를 거친 음료는 pH, 당도, 산도 등의 여러 가지 검수 후 적합한 제품에 한하여 완제품으로 출하될 수 있다.



1. 원료 검사 : 모든 원료는 식품 및 식품첨가물공전 규격에 적합한 원료만을 검수하여 사용
2. 배합 : 원료를 정제수와 같이 비율에 따라 배합
3. 교반 : 원료를 60℃에서 20분 교반 및 용해 후 산도, 당도 등 검사
4. HTST 살균 : 배합된 액을 90℃에서 30초간 순간 살균
5. 여과 : 부직포 여과 및 0.5 마이크론 여과기 통과
6. 주입 : 살균 및 여과된 액을 100 mL / 550 mL 용기에 충전
7. 봉인 : 용기에 캡을 덮고 자동실링기로 봉인
8. 살균/냉각 : 90℃에서 15분간 살균 후 40℃가 되도록 냉각
9. 포장 : 상표 부착 및 상자 포장

Fig. 33. Flowchart for beverages production using lactic acid fermented red ginseng concentrates and bird's nest hydrolysate

< 음료 제조공정도 >



시제품 제조

유산발효홍삼농축액과 제비집 가수분해물을 이용한 면역강화 음료의 배합비율 및 제조 공정도에 준하여 음료 시제품을 생산하였으며 Fig. 34와 같다.



Fig. 34. Photograph of prototype beverages produced using lactic acid fermented red ginseng concentrates and bird's nest hydrolysate

라. 연구개발 성과

- 논문게재 및 발표 성과 : 연구발표(proceeding)(일시: 2017. 10. 26., 장소; 제 38차 한국식품저장유통학회 학술발표대회, 대구 경북대학교 글로벌 플라자, 제목; Optimization of fermentation condition for improvement of ginsenosides content in res ginseng extracts, 발표자; 김인호, 김이슬, 엄인주, 김성호)

- 특허성과 : 특허출원(출원연도; 2017. 12. 29., 특허명; 신규한 락토바실러스 프란타럼 (*Lactobacillus plantarum*)균주 DU.LAB.H01를 이용한 바다제비집-홍삼 복합발효물 및 이의 제조방법, 출원인;(주)프레쉬벨, 출원국; 한국, 출원번호; 10-2017-0184744)

- 생명정보 : 생물자원(연도; 2017년, 생물자원명; *Lactobacillus plantarum* DU.LAB.H01, 기탁일; 2017. 12. 04, 등록·기탁 번호; KCTC 13411BP)

마. 연구개발 결과

(1) 기술적 성과 : 음료 시제품 1건에 대한 품질검사

TMR 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터
TRADITIONAL MICROORGANISM RESOURCES CENTER
http://www.tmr.or.kr

제 17-2-03921 호
발급번호 : 제 R20171207-004 호

시 험 성 적 서

검 체 명	발효홍삼음료		
제 품 유 형	일반성분검사		
의뢰인 주소 및 성명	대구대학교 산학협력단	대 표 자	윤재웅
	경상북도 경산시 진량읍 대구대로 201 (대구대학교 내)		
접 수 년 월 일	2017년 11월 28일	검사완료일	2017년 12월 06일
시 험 의뢰 목적	참고용		

귀하가 시험 의뢰한 결과 및 판정은 의뢰된 시험항목에 한하며 다음과 같습니다.

결과 :

시 험 항 목	규 격 기 준	결 과
열량	-	43.197Kcal/100mL
나트륨	-	3.124mg/100mL
탄수화물	-	10.400g/100mL
당류	-	6.872g/100mL
지방	-	0.109g/100mL
트랜스지방	-	불검출
포화지방	-	0.008g/100mL
콜레스테롤	-	불검출
단백질	-	0.154g/100mL
진세노사이드 Rb1	-	0.008mg/g
진세노사이드 Fg1	-	0.022mg/g
진세노사이드 Rg3	-	0.007mg/g

식품위생검사항목지정기준 제4호의 2 규정에 의하여 위와같이 검사성적서를 발급합니다.

2017년 12월 07일

계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터장

대구지방식품의약품안전청 식품등 시험검사기관 제112호
대구지방식품의약품안전청 축산물 시험검사기관 제13호

이 검사결과는 제출된 검체에 한하며 의뢰목적 이외의 상업적인 광고 및
법적인 해결수단으로 사용할 수 없습니다.

[42601] 대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 | TEL : (053)580-6460~2 | FAX : (053)580-6465 | 센터장 : 이삼빈 | 담당자 : 이순영

- 기술수준 : 국내외 동일한 제품은 없음.
- 기술적 의의 : 본제품은 우리나라의 홍삼발효물과 동남아의 제비집을 효소처리하여 효능성분을 극대화하여 이를 음료화한 것으로서 홍삼발효물의 진세노사이드와 제비집의 sialic acid가 다량 함유된 것으로 외국산의 제비집 음료의 sialic acid 함량보다 함량이 고함유되어 있음.

(2) 경제적 성과

- 채용인력 : 1명
- 시제품 수출 : 샘플 test를 위한 수출 선적 280\$, Vietnam, 2017. Vietnam Intl Retail and Franchise Show,
- 상표 출원 : Vietnam 상표 출원 2건
- MOU 체결 : 구매 협약 등 2건
- 상품소개 잡지 게재 : 베트남 현지 잡지 게재 1건
- 상품전시박람회 참여 : 3건
- 상품 홍보 전단지 : 2건

○ 사업화성과 및 매출실적

- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0.003억원
			향후 3년간 매출	5억원
		관련제품	개발후 현재까지	1억원
			향후 3년간 매출	19억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0% 국외 : 0%
			향후 3년간 매출	국내 : 3% 국외 : 5%
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 5% 국외 : 10%
			향후 3년간 매출	국내 : 10% 국외 : 15%
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		0위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		10위

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	1			
	소요예산(백만원)	200			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		0.003	5	10	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0	3	5
국외		0	5	10	
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	유아용 건강음료, 진세노사이드와 시알산 함유량을 높인 캡슐 또는 고형제품			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	0	5	10	
	수 출	0	5	10	

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

성과항목	단 위	성과목표	가중치 (%)	달성도	성과목표평가방법
					시험증
1. 제비집 유리 sialic acid함량		≥10 mg/100 ml	25	100	자체시험 HPLC data 및 외부분석기관 data
2. 발효홍삼의 진세노사이드 총합량		5 mg/ml (진세노사이드 총합량)	25	100	자체 HPLC data 외부분석기관 data
3. 면역활성	%	기존제품(양성대조군)의 120%이상	25	100	자체시험 in vitro test 및 외부 전문가 검증
4. 분리균주기탁	건	유산균 1종	10	100	균주 기탁증 (공인기탁기관)
5. 특허	건	출원 1건	10	100	특허 출원증(특허청)
6. 시제품(음료)	종	1	5	100	영양성분 검사 or 품목제조신고
<input type="checkbox"/> 측정결과의 증빙방법 제시 ○ 성능항목의 시험규격 1, 자체평가 수행, 2. 외부분석기관 - 제비집 유리 sialic acid함량 및 발효홍삼진세노사이드 함량 외부분석기관 data. - 면역활성 외부전문가 data 검증					

3-2. 목표 달성여부

1) 제비집 유리 sialic acid함량

: 자체 시험 결과 (보고서 37-39페이지, data & chromatogram) : 실험결과 45 mg/ 100 ml로서 성과 목표인 10 mg/100 ml 이상으로 나타났음. 외부 분석기관에서 분석한 시험 결과값(Fig. 35~39, 보고서 97~101페이지)은 68 mg/100 ml으로 나타나 자체 시험 결과가 유의한 것으로 검증되었다. 성과 목표도 100% 달성 함.

2) 발효홍삼의 진세노사이드함량

: 자체 시험 결과 (보고서 74-45페이지, data & chromatogram) : 실험결과 60 °Brix 홍삼 농축액 5%의 발효액의 총gensenoside 함량이 591.44 µg/ml 이며 이를 100%로 환산하면 11,829 µg/ml로 약 11. 83 mg/ml 이었다. 외부분석기관에서 분석한 시험 결과 값(Fig. 40~44, 보고서 102~110페이지)은 1,117.5 µg/ml이었고 이를 100%로 환산하면 22,350 µg/ml로 약 22.35 mg/ml로 나타나, 자체 시험결과가 유의한 것으로 검증되었다. 성과 목표도 100% 달성 함.

3) 면역활성 : 본연구의 실험결과 면역활성능 100% 달성

: T세포증식능 측정 - 발효홍삼액과 효소분해된 제비집을 혼합한 시험액 50 µg/ml 처리 물은 양성대조군인 5 µg/ml의 concanavalin A의 활성과 유사하였음.

: TFN-α 생성량 억제시험 - LPS 단독처리군에서의 96.71 pg/ml이었으나 발효홍삼액과 제비집가수분해물 혼합물은 73.78 pg/ml의 생성량을 보여 LPS 단독처리군 대비 약 123.7% 이상의 억제효과를 보임.

: IL-2 생성 억제시험 - LPS 단독처리군 232 pg/ml이었으나 발효홍삼액과 제비집가수 분해액과의 혼합물은 171 pg/ml로 나타나 LPS 단독처리군 대비 약 125.9%이상의 억제능을 보임.

: IL-6 생성 억제시험 - LPS 단독처리군이 73.20 pg/ml의 생성량을 보였으나, 발효홍삼액과 제비집가수분해액과의 혼합물은 53.38 pg/ml의 생성량을 보여 LPS 단독처리군 대비 약 127.08% 억제능을 보임.

: IL-10 생성 억제시험 - LPS 단독처리군이 123.12 pg/ml의 생성량을 보였으나, 발효홍삼액과 제비집가수분해액과의 혼합물은 97.28 pg/ml의 생성량을 보여 LPS 단독처리군 대비 약 120.99% 억제능을 보임.

이상의 본 연구 결과에 대한 전문가의 검증의 결과(Fig. 45) 본 연구의 면역 활성의 결과가 유의한 것으로 검증되었다. 성과 목표도 100% 달성 함.

4) 분리균주기탁 : 공인기탁기관 균주 기탁 달성도 100%

5) 특허 출원 : 출원 달성도 100%




6) 시제품(음료): 개발 및 생산 달성도 100%

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

해당사항 없음

● 실험·분석 결과지

접수번호	2018-02256
접수일	2018-03-21 14:22:23

의뢰	회사명	대구대학교 산학협력단	책임자	김성호	대리인	김인호
	소속	대구대학교 식품공학과			전화번호	
연구과제명 (실험목적)	시료 중 성분 검사					
사용기기명	고성능 액체크로마토그래프(High Performance Liquid Chromatograph (HPLC))					
시료수	10/14(사용/의뢰)	실험·분석결과 희망일	-			
실험·분석조건						
첨부파일						
실험·분석일	2018.03.26 ~ 2018.03.26	소요시간	20 시간 0 분			
의뢰/분석내용	분석요금(원)	수량	단위	소계(원)	비고	
column 미준비시	20,000	10	시료	140,000	협력30% 할인	
vial	1,200	10	개	8,400	협력30% 할인	
필터	5,000	4	개	14,000	협력30% 할인	
용매(ACN, Merck)	8,000	2	100mL	11,200	협력30% 할인	
실험·분석요금	173,600 원		- 실험분석요금 산출 내역 -			
실험·분석결과						
※ 첨부파일 ※  02256 results.zip						
주 : 본 실험·분석결과는 학술, 연구, 교육 외의 용도로는 사용할 수 없습니다.						
기기담당자	황인정	전화번호	053-950-8191			
실험·분석 결과가 위와 같음을 보고 합니다. 2018.03.26 실험·분석자 : 황인정						
경북대학교 공동실험실습관 						

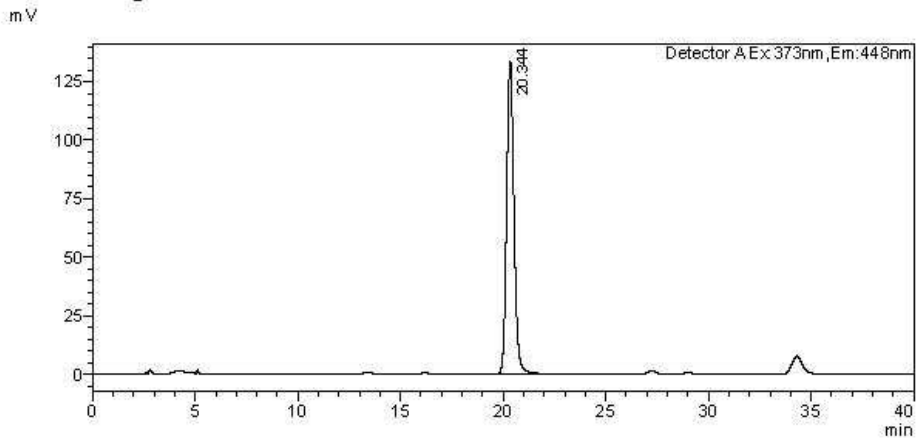
(외부분석기관 data)

SHIMADZU LabSolutions Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name	sialic 5		Sample Type	: Standard
Sample ID			Level	: 1
Data Filename	sialic 5.lcd		Acquired by	: System Administrator
Method Filename	sialic acidM.lcm		Processed by	: System Administrator
Batch Filename	sialicB.lcb			
Vial #	1-31			
Injection Volume	10 uL			
Date Acquired	2018-03-23	11:58:15		
Date Processed	2018-03-23	4:13:42		

<Chromatogram>



<Peak Table>

Detector A Ex: 373nm, Em: 448nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	20.344	3353406	133699	5.173	mg/L		sialic acid
Total		3353406	133699				

D:\DATA\2018\02256

\sialic 5.lcd

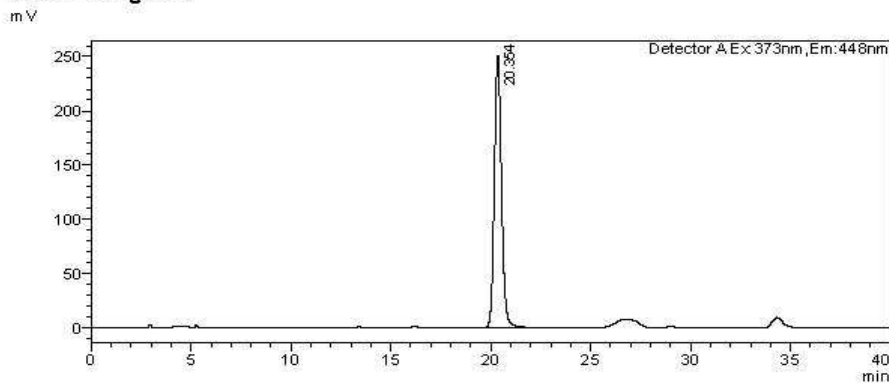
Fig. 35. Sialic acid standard(5 mg/L) chromatography(외부분석기관 data)

SHIMADZU LabSolutions Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name	sialic 10		Sample Type	Standard
Sample ID			Level	2
Data Filename	sialic 10.lcd		Acquired by	System Administrator
Method Filename	sialic_acidM.lcm		Processed by	System Administrator
Batch Filename	sialicB.lcb			
Vial #	1-32			
Injection Volume	10 uL			
Date Acquired	2018-03-23	12:38:40		
Date Processed	2018-03-23	4:13:42		

<Chromatogram>



<Peak Table>

Detector A Ex:373nm,Em:448nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	20.354	6294885	250531	9.741	mg/L		sialic acid
Total		6294885	250531				

D:\DATA\2018\02256

\sialic 10.lcd

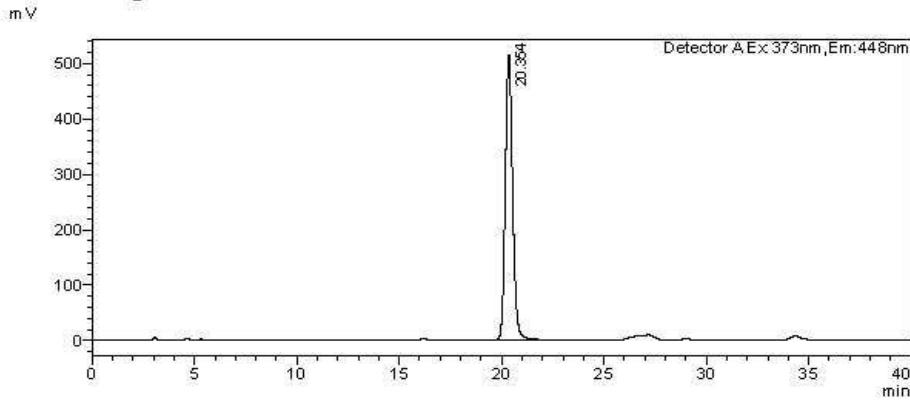
Fig. 36. Sialic acid standard(10 mg/L) chromatography(외부분석기관 data)

SHIMADZU
LabSolutions Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name	: sialic 20	Sample Type	: Standard
Sample ID		Level	: 3
Data Filename	: sialic 20.lcd	Acquired by	: System Administrator
Method Filename	: sialic acidM.lcm	Processed by	: System Administrator
Batch Filename	: sialicB.lcb		
Vial #	: 1-33		
Injection Volume	: 10 uL		
Date Acquired	: 2018-03-23 1:19:05		
Date Processed	: 2018-03-23 4:13:42		

<Chromatogram>



<Peak Table>

Detector A Ex: 373nm, Em: 448nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	20.354	12957270	514637	20.086	mg/L		sialic acid
Total		12957270	514637				

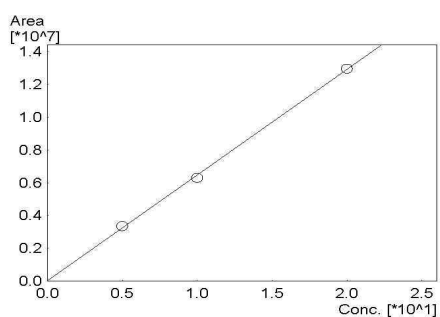
D:\DATA\2018\02256

\sialic 20.lcd

Fig. 37. Sialic acid standard(20 mg/L) chromatography(외부분석기관 data)

==== Shimadzu LabSolutions Calibration Curve ====

ID# : 1
 Name : sialic acid
 Quantitative Method : External Standard
 Function : f(x)=643969*x+22213.1
 Rr1=0.9995519 Rr2=0.9991039 RSS=4.339321e+010
 MeanRF: 6.493444e+005 RFSD: 2.063620e+004 RFRSD: 3.178005
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 Weighted Regression : None
 Detector Name : Detector A



#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	5	3353406	3353406
2	10	6294885	6294885
3	20	12957270	12957270

D:\DATA\2018\02256

\sialic acidM.lcm

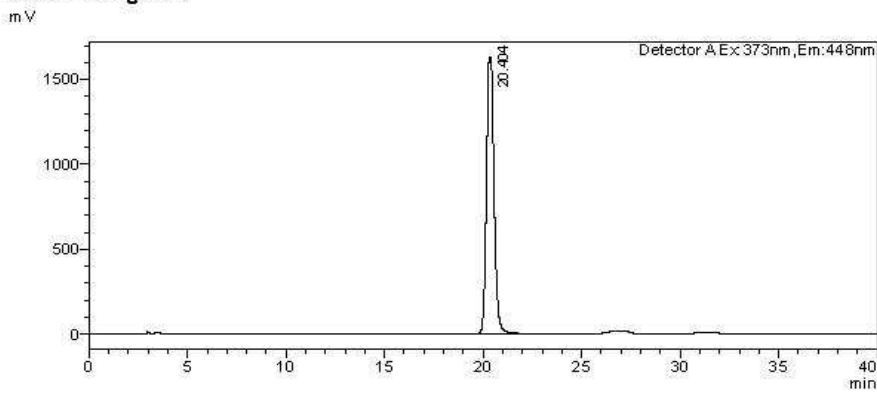
Fig. 38. Sialic acid standard chromatography calibration curve(외부분석기관 data)

SHIMADZU LabSolutions Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name : Bird's nest hydrolysate
 Sample ID :
 Data Filename : .lcd
 Method Filename : sialic acidM.lcm
 Batch Filename : sialicB.lcb
 Vial # : 1-35
 Injection Volume : 10 uL
 Date Acquired : 2018-03-23 2:39:55
 Date Processed : 2018-03-23 4:12:15
 Sample Type : Sample
 Acquired by : System Administrator
 Processed by : System Administrator

<Chrom atogram>



<Peak Table>

Detector A Ex: 373nm, Em: 448nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	20.404	44053566	1631792	68.375	mg/L		sialic acid
Total		44053566	1631792				

D:\DATA\2018\02256 \ .lcd

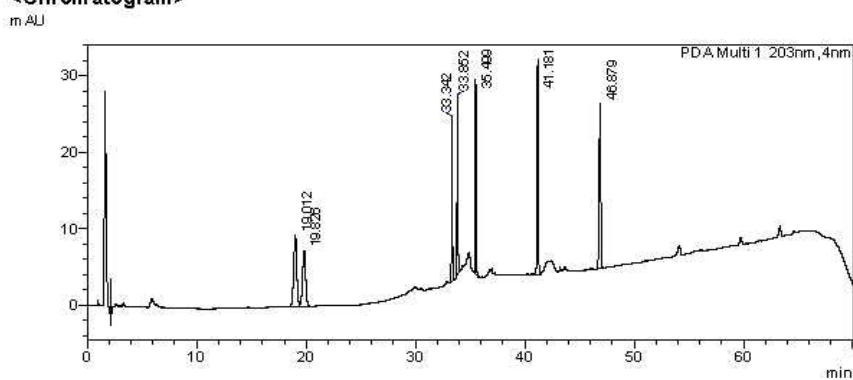
Fig. 39. Bird' s nest hydrolysates chromatography(외부분석기관 data)

SHIMADZU LabSolutions Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name	STD50		Sample Type	Standard
Sample ID			Level	1
Data Filename	STD50.lcd		Acquired by	System Administrator
Method Filename	gin.lcm		Processed by	System Administrator
Batch Filename	ginsenoside.lcb			
Vial #	1-61			
Injection Volume	10 uL			
Date Acquired	2018-03-23	6:47:06		
Date Processed	2018-03-26	5:32:30		

<Chromatogram>



<Peak Table>

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	19.012	184025	9356	50.735	mg/L		Rg1
2	19.826	143324	7290	50.556	mg/L	V	Re
3	33.342	117256	21582	50.568	mg/L		Rb1
4	33.852	128098	23614	50.027	mg/L		Rc
5	35.499	145496	25429	50.028	mg/L		Rd
6	41.181	213691	28075	50.336	mg/L		Rg3
7	46.879	222767	21550	50.039	mg/L		K
Total		1154657	136896				

D:\DATA\2018\02256

\STD50.lcd

Fig. 40. Gensenoside standard(50 mg/L) chromatography(외부분석기관 data)

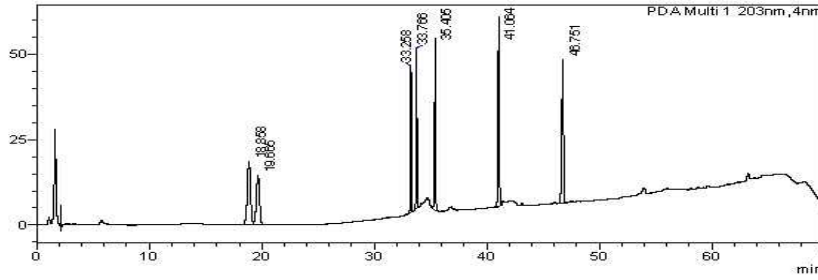
SHIMADZU LabSolutions Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name	: STD100	Sample Type	: Standard
Sample ID		Level	: 2
Data Filename	: STD101.lcd	Acquired by	: System Administrator
Method Filename	: gin.lcm	Processed by	: System Administrator
Batch Filename	: ginsenoside.lcb		
Vial #	: 1-62		
Injection Volume	: 10 uL		
Date Acquired	: 2018-03-26 3:17:58		
Date Processed	: 2018-03-26 5:32:30		

<Chromatogram>

m.AU



<Peak Table>

PDA Ch1 203nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	18.858	363753	18584	98.897	mg/L		Rg1
2	19.665	285653	14504	99.166	mg/L	V	Re
3	33.258	232084	43174	99.147	mg/L		Rb1
4	33.766	258723	47163	99.959	mg/L		Rc
5	35.406	289722	50188	99.958	mg/L		Rd
6	41.064	426193	55558	99.496	mg/L		Rg3
7	46.751	447087	42075	99.941	mg/L	M	K
Total		2303215	271246				

D:\DATA\2018\02256

\STD101.lcd

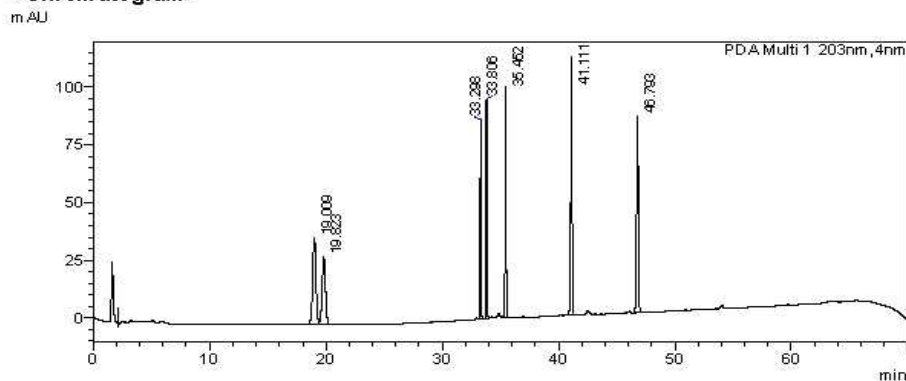
Fig. 41. Gensenoside standard(100 mg/L) chromatography(외부분석기관 data)

SHIMADZU LabSolutions Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name : STD200
 Sample ID :
 Data Filename : STD200.lcd
 Method Filename : gin.lcm
 Batch Filename : ginsenoside.lcb
 Vial # : 1-83
 Injection Volume : 10 uL
 Date Acquired : 2018-03-23 9:08:02
 Date Processed : 2018-03-26 5:32:30
 Sample Type : Standard
 Level : 3
 Acquired by : System Administrator
 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch1 203nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	19.009	742419	37247	200.368	mg/L		Rg1
2	19.823	581710	29007	200.278	mg/L	V	Re
3	33.298	471143	86603	200.284	mg/L		Rb1
4	33.806	520470	94949	200.014	mg/L		Rc
5	35.462	578737	99929	200.014	mg/L		Rd
6	41.111	861363	111849	200.168	mg/L		Rg3
7	46.793	898957	84947	200.020	mg/L		K
Total		4652799	544531				

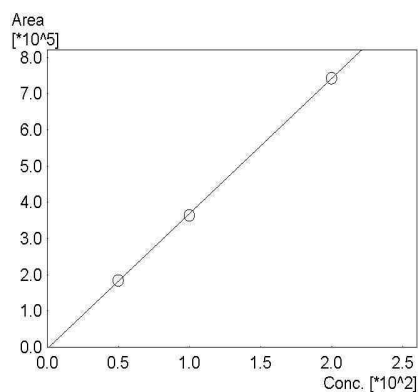
D:\DATA\2018\02256

\STD200.lcd

Fig. 42. Gensenoside standard(200 mg/L) chromatography(외부분석기관 data)

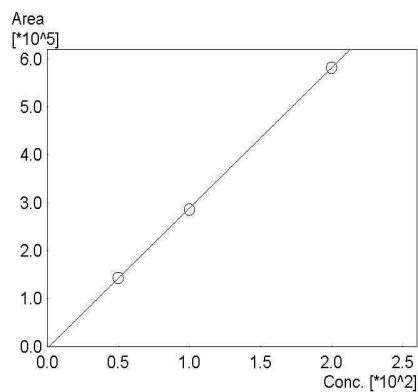
==== Shimadzu LabSolutions Calibration Curve ====

ID# : 1
 Name : Rg1
 Quantitative Method : External Standard
 Function : f(x)=3731.77x-5307.93
 Rr1=0.9999189 Rr2=0.9998378 RSS=2.635494e+007
 MeanRF: 3.676708e+003 RFSD: 3.742465e+001 RFRSD: 1.017885
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 Weighted Regression : None
 Detector Name : PDA



#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	50	184025	184025
2	100	363753	363753
3	200	742419	742419

ID# : 2
 Name : Re
 Quantitative Method : External Standard
 Function : f(x)=2928.00x-4704.90
 Rr1=0.9999536 Rr2=0.9999072 RSS=9.278957e+006
 MeanRF: 2.877185e+003 RFSD: 2.761460e+001 RFRSD: 0.959778
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 Weighted Regression : None
 Detector Name : PDA



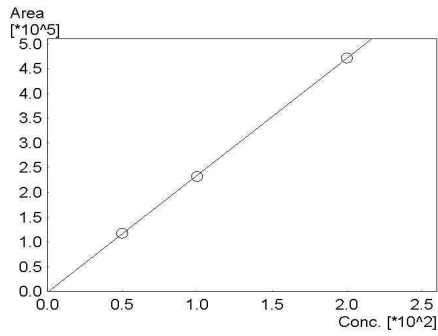
#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	50	143324	143324
2	100	285653	285653
3	200	581710	581710

D:\DATA\2018\02256

\gin.lcm

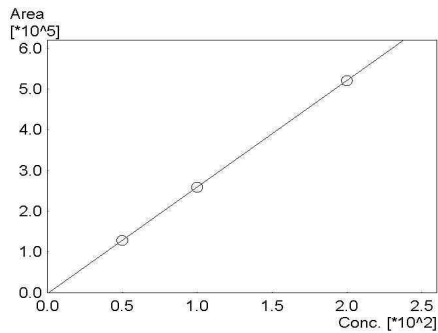
Fig. 43-1. Gensenoside standard chromatography calibration curve(외부분석기관 data)

ID# : 3
 Name : Rb1
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=2363.72 \cdot x-2273.20$
 Rr1=0.9999515 Rr2=0.9999031 RSS=6.317343e+006
 MeanRF: 2.340561e+003 RFSD: 1.788153e+001 RFRSD: 0.763985
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 Weighted Regression : None
 Detector Name : PDA



#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	50	117256	117256
2	100	232084	232084
3	200	471143	471143

ID# : 4
 Name : Rc
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=2618.05 \cdot x-2775.51$
 Rr1=0.9999999 Rr2=0.9999998 RSS=1.755489e+004
 MeanRF: 2.583847e+003 RFSD: 2.040846e+001 RFRSD: 0.789848
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 Weighted Regression : None
 Detector Name : PDA



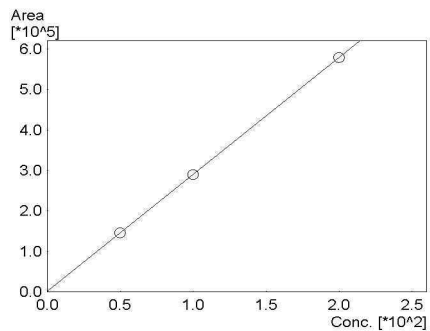
#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	50	128098	128098
2	100	258723	258723
3	200	520470	520470

D:\DATA\2018\02256

\gin.lcm

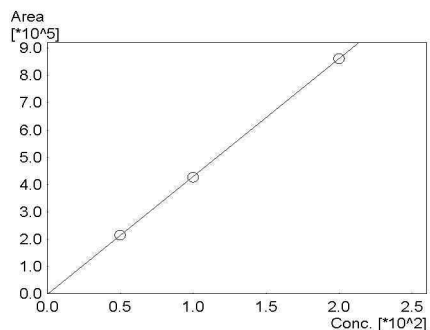
Fig. 43-2. Gensenoside standard chromatography calibration curve(외부분석기관 data)

ID# : 5
 Name : Rd
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=2888.54x+988.501$
 Rr1=0.9999999 Rr2=0.9999998 RSS=2.248789e+004
 MeanRF: 2.900273e+003 RFSD: 8.534243e+000 RFRSD: 0.294257
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 Weighted Regression : None
 Detector Name : PDA



#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	50	145496	145496
2	100	289722	289722
3	200	578737	578737

ID# : 6
 Name : Rg3
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=4322.65x-3893.96$
 Rr1=0.9999831 Rr2=0.9999661 RSS=7.383088e+006
 MeanRF: 4.280856e+003 RFSD: 2.325511e+001 RFRSD: 0.543235
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 Weighted Regression : None
 Detector Name : PDA



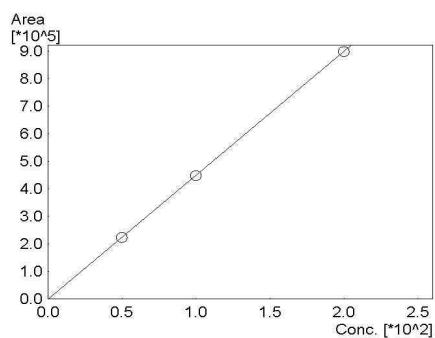
#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	50	213691	213691
2	100	426193	426193
3	200	861363	861363

D:\DATA\2018\02256

\gin.lcm

Fig. 43-3. Gensenoside standard chromatography calibration curve(외부분석기관 data)

ID# : 7
 Name : K
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=4495.19x-2167.97$
 Rr1=0.9999998 Rr2=0.9999995 RSS=1.083907e+005
 MeanRF: 4.470332e+003 RFSD: 1.472718e+001 RFRSD: 0.329443
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 Weighted Regression : None
 Detector Name : PDA



#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	50	222767	222767
2	100	447087	447087
3	200	896957	896957

D:\DATA\2018\02256

\gin.lcm

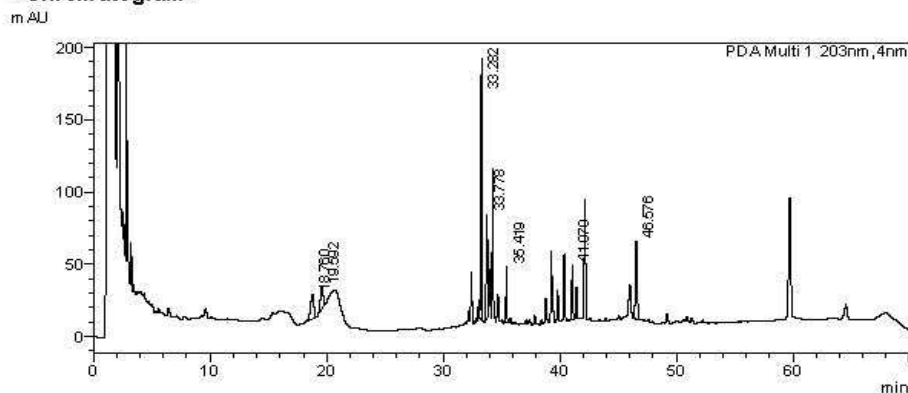
Fig. 43-4. Gensenoside standard chromatography calibration curve(외부분석기관 data)

SHIMADZU LabSolutions Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name :
 Sample ID :
 Data Filename : .lcd
 Method Filename : gin.lcm
 Batch Filename : ginsenoside.lcb
 Vial # : 1-64
 Injection Volume : 10 uL
 Date Acquired : 2018-03-23 10:18:30
 Date Processed : 2018-03-26 6:04:52
 Sample Type : Unknown
 Acquired by : System Administrator
 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA.Ch1 203nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	18.760	357483	17112	97.217	mg/L		Rg1
2	19.592	277114	15223	96.249	mg/L		Re
3	33.282	1049571	180889	444.995	mg/L		Rb1
4	33.778	530038	71831	203.671	mg/L		Rc
5	35.419	248573	38714	85.713	mg/L		Rd
6	41.070	285403	37731	66.926	mg/L		Rg3
7	46.576	549544	53555	122.734	mg/L	M	CK
Total		3297726	415065				

D:\DATA\2018\02256 \ .lcd

Fig. 44. Ferment broth of 5% red ginsen concentrates chromatography(외부분석기관 data)

평가 의견서

과제제목 : 홍삼 발효물과 제비집 효소추출물을 이용한 수축용 면역력 강화 음료개발
평가 항목 : 홍삼 발효물과 제비집 효소추출물의 면역 활성 연구결과에 대한 내용 검증

본 평가가 연구자가 제출한 연구내용과 연구결과 등으로 본 연구내용을 평가하였다. 본 연구내용은 분리유산균주에 의한 홍삼발효물과 제비집의 효소분해물 및 이들 혼합물에 대한 면역활성에 대한 연구 결과를 검토한 결과는 다음과 같다.

1. T세포증식능 측정시험 결과 발효홍삼액과 효소분해된 제비집을 혼합 시험액의 50 µg/ml을 처리한 시험구가 양성대조군으로서 처리한 5 µg/ml의 concanavalin A의 활성과 유사한 결과를 보여 증식능의 유의한 결과로 사료된다.
2. TFN-α 생성량 억제시험에서 LPS 단독처리군이 96.71 pg/ml의 생성량이었으나 발효홍삼액과 제비집가수분해물 혼합물은 73.78 pg/ml의 생성량을 보여 LPS 단독처리군과 비교하여 약 120% 이상의 억제효과를 보이는 결과를 보여 TFN-α 생성량 억제의 활성이 유의한 결과인 것으로 판단된다.
3. IL-2 생성 억제시험에서는 LPS 단독처리군 232 pg/ml이었으나 발효홍삼액과 제비집가수분해액 혼합물이 171 pg/ml으로 나타나 LPS 단독처리군과 비교하여 대비 125%이상의 억제능을 보여, IL-2 생성 억제 활성의 결과가 유의한 것으로 판단된다.
4. IL-6 생성 억제시험에서는 LPS 단독처리군이 73.20 pg/ml의 생성량 대비, 발효홍삼액과 제비집가수분해액과의 혼합물은 53.38 pg/ml의 생성량을 보여 LPS 단독처리군 대비 약 127% 이상의 억제능을 보여 IL-6 생성 억제 활성의 결과가 유의한 것으로 판단된다.
5. IL-10 생성 억제시험에서 LPS 단독처리군이 123.12 pg/ml의 생성량 대비, 발효홍삼액과 제비집가수분해액과의 혼합물은 97.28 pg/ml의 생성량을 보여 LPS 단독처리군 대비 약 120% 이상의 억제능을 보여 활성능이 유의한 것으로 판단된다.

따라서 위의 5가지 결과를 검토한 결과 면역 활성능에 대한 유의한 실험의 결과로 판단된다.

평가자 : 동아대학교 서권일



Fig. 45.Verification for data of immune activity(외부전문가)

4. 연구개발성과의 활용 계획 등

○ 사업화 방안

- 베트남 현지 업체와 공급 및 유통협약 MOU체결
 - 'HOANGGIA YEN COMPANY'와 제비집 공급 및 제품개발 협약 체결
 - 'NAATMING FOODS.ISC'와 유통협약 체결

○ 국내 마케팅을 위한 단계별 추진내용

- 단계별 추진내용

구분	시장접근단계	시장확보단계	시장확대단계
핵심	우량시장 발굴, 신상품 판매	Keyman 확보 및 세미나마케팅 추진	소개마케팅
이벤트	←	이벤트성 캠페인	→
	직장인 건강/소비 면역활성 이벤트	고객 보장 이벤트	Upgrade 이벤트

- 시장접근 단계

이슈	활용점
타겟시장/고객 list 지원	- 활동 지역내 타겟시장(직장/아파트 등) 선정 - 타겟시장 내 고객, 연고, Keyman조사
직장인 건강/소비 면역활성 이벤트	- 타겟시장 내 고객접근 및 고객정보 확보 - 시장접근용 증서가 보급형 신상품 적극 활용
신상품 타겟고객 SNS 활용	- SNS활용 고객 조회 - SNS활용 고객에 대한 2~3차 연계

- 시장확보 단계

이슈	활용점
Keyman 확보 세미나 마케팅 지원	- 샘플 활용 Keyman 공략 - Keyman 중심 세미나 마케팅 추진
고객 보장 지원	- 활동 지역별 거주고객 정보 확보 - 세미나 마케팅 확대, 참여자 2~3차 연계

- 시장확대단계

이슈	활용점
Keyman 활용 컨설팅 서비스	- Keyman 활용 지속성 서비스 - Keyman 중심 컨설팅 마케팅 추진
고객 보장 upgrade	- 활동 지역별 잠재고객 지속적 연계 - 소개 마케팅 영역으로 확대

- 시장 진입은 기존 홍삼에 대한 인지도를 활용하고 홍삼에 대한 기능성에 대한 장점, 다양한 제형에 대한 장점을 중점 selling point로 시장 진입을 추진.
- 시장 진입 시 바이럴 마케팅을 실시하여 주요 소비자 층을 확보하고 충성도 높은 고객을 구축함과 동시에 지속적인 제품 및 제형에 대한 소비자의 feedback을 활용하여 원활한 시장 진입을 추진

붙임. 참고문헌

1. Atlas RM. 1993. Handbook of microbiological Media. Edited by L. C. Parks. Boca Raton, FL: CRC Press.
2. Ko Ja, Park JY, Kwon HJ, Ryu YB, Jeung HJ, Park SJ, Kim CY, Oh HM, Park CS, Lim YH, et al. 2014. Purification and functional characterization of the first stilbene glucoside-specific β -glucosidase isolated from *Lactobacillus kimchi*. *Enzyme Microb Technol.* 67. 59-66.
3. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ, 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173: 697-703.
4. Jung, S. E. & Kim, S. H. 2015. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from commercial raw makgeolli. *Korean J Food Sci Technol*, 47, 44-50.
5. Hong HD, Choi, SY, Kim YC, Lee YC and Cho CW. 2009. Rapid determination of ginsenosides Rb1 Rf, and Rg1 in Korean ginseng using HPLC. *J. Ginseng Res.* 33. 8-12.
6. Jaime S, Ramon L, Amparo A, Reyes B, Esther M, Jesus L, 2011. Comparison of spectrophotometric and HPLC methods for determining sialic acid in infant formulas. *Food Chemistry* 127, 1905-1910.
7. Myers RH, 1971. Response surface methodology. pp. 127-139, Allyn and Bacon Inc. Boston.
8. Wamasimbara, P. K. J. P. D. and F. Shahi. 1996. Optimization of hexameta-phosphate-assited extraction of flaxseed proteins using response surface methodology. *Kor. J. Food Sci.* 61, 604-607.
9. Bas D, Boyacı IH, 2007. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *J. Food Eng.* 78: 836-845.
10. Abell, M, L. & Braselton, J, P. 1992. The mathematica handbook: compatible with mathematica version 2.0. Academic press Inc., Boston, MA, USA. p 15-511.
11. Quan LH, Pial JY, Min JW, Kim HB, Kim SR, Yang DC. 2011. Biotransformation of ginsenoside Rb1 to prosapogenins, gypenoside XVII, ginsenoside Rd, ginsenoside F2 and compound K by *Leuconosotc mesenteroides* DC 102. *J Ginseng Res.* 35. 344-351.
12. Lee, J. M., Rovert, W. & Ronald, E. 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverage, natural colorants and wines by the pH, differential method collaborative study. *J AOAC International*, 88, 1269-1278.
13. Choi, H. Y. 2011. Antioxidant activity and quality characteristics of pine needle cookies. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 38, 1414-1421.

14. YU AR, Park HY, Kim YS., Ha SK, Hong HE, Choi HD. 2012. Immuno-enhancing effect of seed extracts on a RAW 264.7 macrophage cell line. J Korea Soc Food Sci Nutr. 41. 1671-1676
15. Kim YJ, Son DY. 2012. Antioxidant and inhibitory effects of Korean Panax ginseng extract of pro-inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. J Korean Soc Food Sci Nutr. 41. 1371-1377
16. Kang IS, Kim RI, Kim GS, Kim NR, Shin JY, Kim CK. 2015. Effects of *Agaricus blazei Murill* water extract on immune response in BALB/c mice. J Korean Soc Food Sci Nutr. 44. 1629-1636.
17. Byun SH, Yang CH, Kim SC. 2005. Inhibitory effect of scrophulariae radix extract on TNF- α , IL-1 β , IL-6 and nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated Raw 246.7 cells. Kor. J. Herbology. 20. 7-16.
18. Chang KH, JO MN, Kim KT, Park HD. 2014. Evaluation of glucosidases of *Aspergillus niger* strain comparing with other glucosidases in transformation of ginsenoside Rb1 to ginsenosides Rg3. J Ginseng Res. 38. 47-51.
19. Kim EA, Yi DH. 2008. The probiotic characteristics of Lactobacillus acidophilus isolated from infant feces. J Korean Soc Appl Biol Chem. 51, 93-101.
20. Kim BG, Choi SY, Kim MR, Suh HJ, Park HJ. 2010. Changes of ginsenosides in Korean red ginseng(Panax ginseng) fermented by *Lactobacillus plantarum* M1. Process Biochem. 45. 1319-1324.
21. Koon, L. C. 2000. Features -. Bird's nest soup -Market demand for this expensive gastronomic delicacy threatens the aptly named edible-nest SwiXets with extinction in the east. Wildlife Conservation, 103(1), 30-5.
22. SAS Institute. 2005. *SAS/STAT User's Guide* (Version 9.1.3). SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA.
23. Son MI, Kim TO, 1997. Optimum Conditions of Cellulose-Hydrolysis Reaction with Mixed Enzymes of Cellulase and β -Glucosidase. Korean J. Biotechnol. Bioeng. Vol. 13, No. 1. 20~25.
24. Myers RH. 1971. *Response surface methodology*. Allyn and Bacon, Inc., Boston, MA, USA. p 126.
25. Kim, KO, Kim SM, Kim SM, Kim DY, Jo D, Yeo SH. Jeong YJ, Kwon JH. 2013. Physicochemical properties of commercial fruit vinegars with different fermentation methods. J Korean Soc Food Sci Nutr. 42, 736-742.
26. Bae II, Min HY, Han AR, Seo EK, Lee SK. 2005. Suppression of lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase by brazilin in RAW 264.7 macrophage cells. Eur J Pharmacol 513, 237-242.
27. Seo YS, Shin KS. 2012. Immune system-stimulating activities of mucilage polysaccharides isolated from *Opuntia humifusa*. J Korea Soc Food Sci Nutr. 41. 95-102.

28. Park SH, Choung SY, Choi YJ. 2011. Immune regulating effect of polysaccharide fraction from sea hare(*Aplysia kurodai*). J Korea Soc Food Sci Nutr. 40. 372-378
29. Kalyanaraman B, (2013) Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. Redox Biol. 1. 244-257
30. Park WS. 2013. Effect of white ginseng-ejung-tang water extract on cytokine production in LPS-induced RAW 264.7 mouse macrophages. Korean J. Oriental Physiology & Pathology. 27. 738-744.
31. Jang AY, Sueng YC, Ji JG. 2016. The comparative study on physiological activity of white ginseng, red ginseng and black ginseng extract. Journal of Digital Convergence. 10. 459-471.
32. Seo MJ, Kang BW, Park JU, Kim MJ, Lee HH, Kim NH, Kim KH, Rhu EJ, Jeong YK. 2013. Effect of fermented *Cudrania tricuspidata* fruit extract on the generation of the cytokines in mouse spleen cells. Journal of Life Science. 23. 682-688.
33. Kim YJ, Son DY. 2012. Antioxidant and inhibitory effects of Korean Panax ginseng extract of pro-inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. J Korean Soc Food Sci Nutr. 41. 1371-1377.
34. Shon EH, Yoon JW, Koo HJ, Park DW, Jeong YJ, Namkoong S, Han HS, Kang SC. 2012. Immunomodulation effects of red ginseng on the regulation of cytokine release in vivo. Korean J. Plant Res. 25. 578-585.

자체평가의견서

1. 과제현황

			코드번호	D-15	
			과제번호	116145-1	
사업구분	농식품기술개발사업				
연구분야	식품		과제구분	단위	
사업명	농생명산업기술개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	홍삼 발효물과 제비집 효소추출물을 이용한 수출용 면역력 강화 음료개발		과제유형	(기초,응용,√개발)	
연구기관	대구대학교 산학협력단		연구책임자	김성호	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2016. 12. 05 ~ 2017. 12.04	90,000	33,000	123,000
	2차년도				
	3차년도				
	4차년도				
	5차년도				
	계		90,000	33,000	123,000
참여기업	(주)프레쉬벨				
상대국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2018. 3. 23.

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
대구대학교 산학협력단	교수	김성호

4. 평가자(연구책임자) 확인 : 김성호

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

확약	
----	---

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, ■우수, 보통, 미흡, 불량)

실적

- 음료시제품 개발 : 주원료인 제비집 효소추출물 및 홍삼발효액을 기반으로 한 음료의 개발
- 균주기탁 : (기탁기관-한국생명공학원, 기탁번호- KCTC 13411BP)
- 매뉴얼 개발 및 제공 : 제비집의 효소 처리 기술, 홍삼을 이용한 발효생산기술 및 음료 조성과 배합비 등 생산기술에 필요한 매뉴얼 제작 및 참여기업에 제공 함.
- 특허출원 : (특허출원 번호:10-2017-0184744, 출원명: 신규한 락토바실러스 프란타럼 (*Lactobacillus plantarum*)균주 DU.LAB.H01를 이용한 바다제비집-홍삼 복합 발효물 및 이의 제조방법)

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, ■우수, 보통, 미흡, 불량)

- 외국에 널리 알려진 우리나라 홍삼과 동남아의 제비집을 활용한 음료개발로 인한 동남아 등지의 수출기대 됨.
- 현재 베트남과 구매 관련한 상담 진행중 임.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, ■우수, 보통, 미흡, 불량)

- 발효홍삼과 효소처리 제비집이 결합된 음료 개발 후 베트남 수출 상담 : 진행중
- 국내 대기업과 공동 launching, 대형 market 입점 및 판매 : 논의중
- 베트남 공기업인 ITPC와의 MOU를 통한 기술 공유 및 관련 후속연구 : MOU 체결

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (■아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 목표 및 연구계획서상의 모든 항목 성실히 수행함.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, ■우수, 보통, 미흡, 불량)

- 관련 기술의 특허 출원 함.
- 관련 기술의 노출을 꺼린 기업의 요구로 논문 등의 발표는 제품화 및 특허등록 이후 추후에 하기로 함.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
제비집 효소분해 및 유리 sialic acid 고함유 조건설정	25	100	자체시험&외부분석기관 HPLC data
홍삼액의 최적발효조건과 고흡수 진세노사이드의 전환 설정	25	100	자체시험&외부분석기관 HPLC data
제비집 가수분해물과 홍삼발효액의 면역활성	25	100	자체시험&외부전문가 검증
분리균주 동정 및 기탁	10	100	균주기탁증
특허	10	100	특허출원증
시제품(음료)	5	100	영양성분 검사 성적서
합계	100점		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구의 세부연구 목표 달성을 위하여 제반 연구과정을 성실히 수행하여 목적하는 결과를 도출하였고 당초 계획된 목표를 달성하였음.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 본연구 결과의 제품화
- 동남아 등지의 수출화를 위한 target형 수출상품화 제품

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 현지 참여기업의 실시에 의하여 제반적인 실천사항 이행 중 임.
- 관련 제품의 바이어의 요청으로 시생산 과정중 일부 변경될 가능성 있음.
- 국내 대리인을 통한 대기업 상품화 가능성도 함께 추진하고 있음.

IV. 보안성 검토

○ 참여업체에서 기술실시 계획 : 참여업체의 요청에 의하여 특허 등록시 까지 공개하지 않기를 원함.

1. 연구책임자의 의견

참여업체의 요청에 의하여 특허 등록시까지 공개하지 않는 것이 연구책임자의 의견임.

2. 연구기관 자체의 검토결과

연구책임자의 의견에 의하여 공개하지 않는 것이 연구기관 자체의 의견임.

주 의

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