

발간등록번호  
11-1543000-002736-01

# 경남 한방 향노화산업 전략약초 이용 스타상품 개발

최종보고서

2019. 02. 08.

주관연구기관 / 주식회사 자연애제약  
1위탁연구기관 / 경남과학기술대학교 산학협력단  
2위탁연구기관 / 주식회사 아이피온  
협동연구기관 / 경상대학교 산학협력단

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “경남 한방 향노화산업 전략약초 이용 스타상품 개발” (개발 기간 : 2016.07.07. ~ 2018.12.31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 02. 08.

주관연구기관명 : ㈜자연에제약

(대표자) 장 미정



1위탁연구기관명 : 경남과학기술대학교 산학협력단

(대표자) 이 상원



2위탁연구기관명 : ㈜아이피온

(대표자) 김 영범



협동연구기관명 : 경상대학교 산학협력단

(대표자) 정 종일



주관연구책임자 : 강 민철

1위탁연구책임자 : 조 계만

2위탁연구책임자 : 김 영범

협동연구책임자 : 박 상원

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

# 보고서 요약서

과제고유번호	116009-03	해당 단계 연구 기간	2016.07.07.~ 2018.12.31.	단 계 구 분	종료 단계
연구 사업 명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구 과제 명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	경남 한방 향노화산업 전략약초 이용 스타상품 개발			
연구 책임자	강민철	해당 단계 참여 연구원 수	총: 16명 내부: 4명 외부: 11명	해당단계 연구 개발비	정부: 450,000천원 민간: 180,000천원 계: 630,000천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 20명 내부: 4명 외부: 16명	총 연구개발비	정부: 450,000천원 민간: 180,000천원 계: 630,000천원
연구기관명 및 소속부서명	주식회사 자연애제약 기업부설연구소			참여기업명: 주식회사 자연애제약	
협동/위탁연구	연구기관명: 경상대학교 산학협력단 경남과학기술대학교 산학협력단 (주)아이피온			연구책임자: 박 상원 조 계만 김 영범	

## 1. 연구결과 요약

- 고온숙성법을 이용한 활성과 안전성이 증가된 십전대보환 제조 기술 확립
- 고온숙성법의 십전대보환 기술 적용 경옥고환, 침향환 등의 환 제품 개발 및 상품화
- 제품화를 분말과 액상원료 제형 개발과 액상원료를 이용한 스틱 액상 제품인 ‘숙성도라지 ‘플러스업’ 제품 개발 완료
- 발효도라지 차 및 활성도라지 제조용 발효미생물인 효모균주 2종과 유산균 3종 확보
- 소재와 제품의 표준화를 위한 triterpenoides, phenolic acids 및 flavonols 화합물 분석법 확립
- 효모균를 이용한 발효도라지 차 제조 기술 확립
- 고온숙성 기술 적용 숙성(홍도라지와 흑도라지)도라지와 유산균 이용 발효숙성도라지 제조 기술 확립
- 도라지 원료와 가공 소재의 영양성분, 생리활성물질 및 *in vitro* 항산화와 소화효소 저해활성 분석
- 도라지 원료보다 활성도라지(숙성도라지와 숙성발효도라지)의 경우 triterpenoides는 감소하였으나, phenolic acids와 flavonols 및 *in vitro* 활성은 증가
- 세포실험과 동물실험을 통해 도라지 원료와 가공 소재의 안전성, 효능(간 기능, 비만 및 염증) 및 기전을 분석
- 도라지 원료보다 가공 소재의 경우 세포독성이 낮음
- 가공 소재(활성도라지)의 경우 지방간 억제 효과는 미비, 간 손상, 면역 및 염증 개선 효과
- 간 기능(숙취해소 포함)과 면역기능 시장조사, 특허동향 분석을 통한 도라지의 사업화를 BM 모델 개발

## 2. 연구성과 요약

- 사업화 지표 : 특허출원 5건과 등록 2건, 기술실시 2건, 기술료 194.12백만원, 제품화 4건, 고용창출 1건, 매출액 194.12백만원
- 연구기반 지표 : KSCI급 논문 1편, 학술대회 발표 6건, 교육지도 4건, 인력양성 4명, 홍보/전시 5건, 타 연구 활용 2건

보고서 면수 : 316

# 국문 요약문

	코드번호	D-01
연구의 목적 및 내용	<p><b>1. 최종목표</b></p> <p><b>(1) 정성적 목표 :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 활성도라지를 이용한 경남 향노화산업 대표 스타상품 개발</li> <li>○ 국내 토종약초의 글로벌 식·의약 소재 개발</li> </ul> <p><b>(2) 정량적 목표 :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 사업화 지표 : 특허출원 5건과 등록 4건, 기술이전(실시) 2건, 기술료 60백만원 제품화 3건, 고용창출 1건, 매출액 82.8백만원</li> <li>○ 연구기반 지표 : SCI급 논문 3편, KSCI급 논문 1편, 학술대회 발표 5건, 교육지도 4건, 인력양성 4명, 홍보/전시 2건, 타 연구 활용 1건</li> </ul> <p><b>2. 연구내용</b></p> <p><b>(1) 주관기관 : 경남 한방 향노화산업 전략약초 이용 스타상품 개발</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 혼합 약재의 숙성 제조 확립</li> <li>○ 숙성 혼합약재 재료 이용 십전대보환 제품화</li> <li>○ 활성도라지 제조 최적화 확립</li> <li>○ 활성도라지의 최적 추출기술 및 표준화</li> <li>○ 활성도라지 대량 추출조건 확립</li> <li>○ 활성도라지 추출물 이용 제형화 연구</li> <li>○ 최적 제형 선정을 통한 대사질환 개선 (시)제품화</li> </ul> <p><b>(2) 1위탁기관 : 활성도라지의 발효공정 최적화 및 표준화</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 도라지 발효를 위한 최적 미생물(효모 및 유산균) 선발</li> <li>○ 활성도라지의 표준화를 위한 분석법 개발</li> <li>○ 발효도라지차 제조 및 (시)제품화</li> <li>○ 활성도라지 추출물/발효물의 품질 표준화</li> <li>○ 활성도라지 발효물 이용 기능성 음료 (시)제품화</li> <li>○ 제조 공정별 유효성분 분석 : 사포닌, 가바, 폴리페놀 등</li> </ul> <p><b>(3) 2위탁기관 : 활성도라지 산업화를 위한 사업화 연계 방안 구축</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 간 기능 개선음료 등 관련된 시장조사</li> <li>○ 간 기능 개선음료 등 관련 기술 특허 동향 분석</li> <li>○ 실현 가능한 생산전략, 판매전략 등의 비즈니스모델 수립</li> <li>○ 가공원료(추출물 혹은 발효물)의 ‘B2B’ 사업화 연계 전략 구축</li> </ul> <p><b>(4) 협동기관 : 활성도라지 소재의 안전성 및 효능 평가</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 간세포에서 세포독성 확인 및 제한용량 설정</li> <li>○ 간세포/지방세포에서 지질축적 억제/지질대사 개선의 유효용량 결정</li> <li>○ 면역세포에서 십전대보환 추출물의 면역기능 효능평가</li> <li>○ 고지방식이 동물모델에서 대사질환(혈당/체지방) 개선 효능 평가</li> <li>○ 고지방식이 동물모델에서 지방간 억제/개선 효능 평가</li> <li>○ 알코올성 급/만성 간 손상 동물모델에서 간 기능 개선 효능 평가</li> <li>○ 비알코올성 급성 간 손상 동물모델에서 간 기능 개선 효능 평가</li> <li>○ 급/만성 간 손상 동물모델에서 염증 및 산화적 스트레스 관련 효능 기전 분석</li> <li>○ 활성도라지 추출물 혹은 발효물의 안전성 평가: 일반 및 세포 독성</li> </ul>	

1. 정성적 연구 결과

(1) 주관기관 : 경남 한방 항노화산업 전략약초 이용 스타상품 개발

- 활성도라지 제조 최적 공정 개발 : 1위탁과 공조
- 숙성 혼합 약재 재료 이용 십전대보환 (시)제품화
  - 도라지와 기타 9가지 약재의 생리활성 확인 :
    - HPLC 기반 phenolic acids/flavonols 화합물 확인 (1위탁 협조)
    - 라디칼 소거활성과 소화효소 저해활성 확인
  - 고온숙성법 제조 공정 확립 :
    - 영양성분 (지방산/유리아미노산)과 생리활성물질 (phenolic acids/flavonols) 확인
    - 라디칼 소거활성과 소화효소 저해활성 확인
- 활성도라지로부터 최적 추출조건 확립
  - 고온숙성 기반 발효숙성도라지 제조 (소규모 파일럿트)
    - 주정농도별 및 온도별 추출조건 확립
    - 추출조건별 특수성분 (triterpenoids/phenolic acids/flavonols 화합물) 분석
    - 라디칼 소거활성과 소화효소 저해활성 확인
- 장백도라지 품종의 숙성(혹)도라지 제조 및 특성
  - 특화 품종 장백도라지 이용 숙성(혹)도라지 제조 (소규모 파일럿트)
    - 영양성분 : 이화학적 특성/5대 일반성분/지방산/유리아미노산 분석
    - 특수성분 : triterpenoids/phenolic acids/flavonols 분석
- 도라지 이용 제품화 : 도라지 경옥고환 등 제조
- 소환 제품 제조를 위한 분말원료 제조 및 특성
  - 활성(숙성)도라지 등을 고온숙성법을 이용하여 분말원료 제조
    - 영양성분 : 이화학적 특성/9대 영양소/지방산/유리아미노산 분석
    - 위해성분 : 미생물/대장균, 중금속(카드뮴/비소/납), 타르색소
    - 특수성분 : triterpenoids/phenolic acids/flavonols 분석
    - 라디칼 소거활성과 소화효소 저해활성 확인
- 스틱 액상 제품 제조를 위한 액상원료 제조 및 특성
  - 활성(숙성)도라지 등을 이용하여 액상원료 제조
    - 영양성분 : 이화학적 특성/9대 영양소/지방산/유리아미노산 분석
    - 위해성분 : 미생물/대장균, 중금속(카드뮴/비소/납), 타르색소
    - 특수성분 : triterpenoids/phenolic acids/flavonols 분석
    - 라디칼 소거활성과 소화효소 저해활성 확인
- 스틱 액상 제품 제조 : 숙성도라지 플러스업
  - 스틱 액상 제품인 ‘숙성도라지 플러스업’의 상품기획 진행
  - 액상원료를 바탕으로 스틱 액상 제품 제조
    - 영양성분 : 이화학적 특성/9대 영양소/지방산/유리아미노산 분석
    - 위해성분 : 미생물/대장균, 중금속(카드뮴/비소/납), 타르색소
    - 특수성분 : triterpenoids/phenolic acids/flavonols 분석
    - 라디칼 소거활성과 소화효소 저해활성 확인

(2) 1위탁기관 : 활성도라지의 발효공정 최적화 및 표준화

- 도라지 발효를 위한 유산균 3종과 효모균 5종 확보
- 도라지 볶음처리 조건 및 효모 균주별 발효도라지 제조 조건
  - 볶음 처리조건과 발효도라지 제조
    - 영양성분 : 5대 일반성분/지방산/유리아미노산 분석
    - 특수성분 : triterpenoids/phenolic acids/flavonols 분석
    - 라디칼 소거활성과 소화효소 저해활성 검증

연구  
개발  
성과

- 활성도라지 제조 공정 확립
  - 증자, 유산발효, 유산발효-고온숙성, 고온숙성을 통한 활성도라지 제조
  - 영양성분 : 이화학적 특성/5대 일반성분/지방산/유리아미노산 분석
  - 특수성분 : triterpenoids/phenolic acids/flavonols 분석
  - 라디칼 소거활성과 소화효소 저해활성 확인
- 도라지 triterpenoid 계열 화합물 표준화
  - 도라지 triperpenoid 화합물 4종에 대한 HPLC 분석
  - 도라지 triperpenoid 화합물 분석 : 원료 및 가공 소재 등
- 효모발효 도라지 차 제조 및 특성 확인
  - 효모균 5종을 이용한 발효도라지 차 제조
  - 영양성분 : 이화학적 특성/5대 일반성분/지방산/유리아미노산 분석
  - 특수성분 : triterpenoids/phenolic acids/flavonols 분석
  - 라디칼 소거활성과 소화효소 저해활성 확인
- 숙성·발효도라지 제조 및 특성 확인
  - 활성도라지 제조 : 홍도라지, 흑도라지, 발효홍도라지, 발효흑도라지 제조
  - 영양성분 : 이화학적 특성/5대 일반성분/지방산/유리아미노산 분석
  - 특수성분 : triterpenoids/phenolic acids/flavonols 분석
  - 라디칼 소거활성과 소화효소 저해활성 확인
- 활성도라지 이용 에너지 음료 제조 및 특성
  - 활성도라지와 활성산양삼, 카페인, 타우린 등을 혼합하여 에너지 음료 제조
  - 영양성분 : 이화학적 특성/유리아미노산 분석
  - 특수성분 : triterpenoids/phenolic acids/flavonols 분석
  - 라디칼 소거활성과 소화효소 저해활성 확인
- 경남 한방 전략약초인 하수오의 숙성·발효 하수오 제조 및 특성
  - 숙성·발효도라지 제조 기술을 적용하여 숙성·발효하수오 제조
  - 영양성분 : 이화학적 특성, 지방산, 유리아미노산, 무기질 분석
  - 생리활성물질 분석 및 항산화 확인
- (3) 2위탁기관 : 활성도라지 산업화를 위한 사업화 연계 방안 구축**
  - 간 기능 개선 음료 등 관련된 시장조사
    - 도라지 재배 현황, 간 건강 관련 건강기능성식품 시장, 간 건강 관련 숙취해소 음료 시장, 간 건강 관련 주요 기업 보유 특허 조사 등
  - 간 기능 및 면역 기능 등의 특허 동향 분석
    - 간 기능과 면역기능 중심 시장 동향 조사
    - 간 기능과 면역기능 중심 특허 동향 조사
  - 사업화 가능 시장조사 및 분석
    - 간 기능 관련 건강기능식품 및 숙취해소 음료 시장 동향 조사 및 분석
  - 사업화 가능 시장 선행특허 조사 및 분석
    - 간 기능 관련 건강기능식품 및 숙취해소 음료 국내 선행특허 조사 및 분석
  - 인허가 전략 및 BM 수립
- (4) 협동기관 : 활성도라지 소재의 안전성 및 효능 평가**
  - 간세포(HepG2 및 FL83B)과 대식세포주(Raw264.7)에서 세포독성 확인
    - 활성도라지는 원료도라지에 비해 세포독성이 낮음
  - 활성도라지의 지방간 축적 억제 효능 분석
    - 간세포에서 지방간 축적 억제에는 별다른 효과가 미비
  - 활성도라지의 염증성 간 손상 억제 효능 분석
    - 염증성 간 손상 동물모델에서 간 손상 억제 효능
  - 십전대보환/활성도라지의 면역기능 개선 효능 분석
    - 대식세포 및 비장세포에서 면역세포 활성화 및 면역조절 인자 발현을 유발

<p>연구 개발 성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 활성도라지의 비알코올성 간 손상 모델에서 염증성 간 손상 억제 효능 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 염증성 간손상 동물모델에서 간손상 개선 효과 및 염증 억제 효과</li> </ul> </li> <li>○ 활성도라지의 비알코올성 간 손상 모델에서 염증 억제 효능 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 대식세포에서 LPS에 의해 증가된 염증 단백질 및 유전자들의 발현을 억제</li> </ul> </li> <li>○ 활성도라지의 비알코올성 간 손상 모델에서 항염증 효능 기전 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>• p38 및 ERK 신호경로를 통해 염증 단백질들의 발현을 억제</li> </ul> </li> </ul> <p><b>2. 정량적 연구결과</b></p> <p><b>(1) 사업화 지표 :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 특허출원 5건과 등록 2건, 기술실시 2건, 기술료 194.12백만원, 제품화 4건, 고용창출 1건, 매출액 194.12백만원</li> </ul> <p><b>(2) 연구기반 지표 :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ KSCI급 논문 1편, 학술대회 발표 6건, 교육지도 4건, 인력양성 4명, 홍보/전시 5건, 타 연구 활용 2건</li> </ul>				
<p>연구 개발 성과의 활용 계획 (기대 효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 활성도라지 이용 경남 대표상품 및 수출전략 상품 개발</li> <li>○ 활성도라지 활용 기능성음료 개발을 통한 신규 기능성음료 시장 개척</li> <li>○ 참여기업 기술이전을 통한 산업화</li> <li>○ 활성도라지 추출물 혹은 발효물의 임상효능 검정 필요</li> <li>○ 국내토착 생물자원의 확보 효과</li> <li>○ 식품관련 기술 진보 효과</li> <li>○ 항노화 타겟 질병 개선에 대한 과학적 근거 마련</li> <li>○ 우리 토종 약초의 고부가가치 창출 효과</li> <li>○ 1:2:3차 산업의 동반상승에 따른 6차산업 육성 효과</li> <li>○ 산청군 혹은 경상남도 항노화산업화를 가속화시키는 시너지 효과</li> <li>○ 약초산업의 글로벌 리더로 성장 효과</li> </ul>				
<p>중심어 (5개 이내)</p>	<p>항노화</p>	<p>생물공정</p>	<p>활성도라지*</p>	<p>간 기능</p>	<p>산업화</p>

\*활성도라지: 숙성공정, 발효공정 혹은 숙성-발효 혼합공정을 통한 유효성분과 생리활성이 증진된 도라지 (숙성도라지, 발효도라지 혹은 숙성-발효도라지)

# SUMMARY

	코드번호	D-02
Purpose & Contents	<p><b>1. Final purpose</b></p> <p><b>(1) Qualitative purpose :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Development of outstanding anti-aging commodity using active balloon-flower for fostering a Gyeongnam anti-aging industry</li> <li>○ International industrialization of food and medicinal commodity developed using Korean traditional herb</li> </ul> <p><b>(2) Quantitative purpose :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Industrializing products : 5 patent application for 4 registration, 2 technology transfer (total 60 million won), 1 new employments, 3 final products, 2 technical certification, and total turnover: 82.8 millions</li> <li>○ Scientific products : 3 SCI journal publications, 1 KCI journal publication, 5 conference presentation, 4 technical guidances, 4 manpower cultivation, 2 exhibitions, and 1 other study</li> </ul> <p><b>2. Research contents</b></p> <p><b>(1) Jayeonaejeyak : Development of star-commodity using the strategy herbs of Gyeongnam herbal anti-aging industry</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Manufacturing process of mixed medicinal herbs</li> <li>○ Development of Shiquandabuhwan targeting a global market</li> <li>○ Optimization of active balloon flower (ABF) manufacturing process</li> <li>○ Standardization of ABF extraction</li> <li>○ Protocol optimization of big scale extraction of ABF</li> <li>○ Study on formulation using ABF</li> <li>○ Development of prototype product improving metabolic disorder</li> </ul> <p><b>(2) Gntech : Optimization and standardization of fermentation process using ABF</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Selection of optimal microorganism (yeast and lactobacillus) for balloon-flower fermentation</li> <li>○ Protocol development for standardize ABF analysis</li> <li>○ Development of prototype product using fermented balloon flower (FBF) tea</li> <li>○ Qualitative standardization of ABF extracts</li> <li>○ Development of prototype functional beverage using ABF extracts</li> <li>○ Analysis of active compounds on process steps : triterpenoids, phenolic acids, and flavonols etc.</li> </ul> <p><b>(3) IPON : Designing commercialization plan for industrialization of ABF</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Market Research (Beverage related to liver damage treatment)</li> <li>○ Analysis of Patent Trend (Beverage related to liver damage treatment)</li> <li>○ Establishment of approval strategy and Business model</li> </ul> <p><b>(4) GNU : Efficacy and toxicity test of ABF</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Cytotoxicity of ABF in hepatocyte cell lines</li> <li>○ Efficacy of ABF on lipid accumulation in hepatocyte cell/fat cells lines</li> <li>○ Efficacy of Sipjeondaebohwan extracts on immune cell lines</li> <li>○ Effect of ABF against steatosis in high-fat diet-fed mice</li> </ul>	



<p><b>Purpose &amp; Contents</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Effect of ABF against steatosis in high-fat diet-fed mice</li> <li>○ Effect of ABF against metabolic complication in steatotic mice</li> <li>○ Action mechanism of ABF against metabolic disorder in <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> models</li> <li>○ Effect of ABF for improving hepatic function in alcoholic liver injury</li> <li>○ Effect of ABF for improving hepatic function in non-alcoholic liver injury</li> <li>○ Action mechanism of ABF on inflammation and oxidative damage in acute or chronic liver injury</li> <li>○ Safety test of ABF : general or cell toxicity</li> </ul>
<p><b>Results</b></p>	<p><b>1. Results</b></p> <p><b>(1) Jayeonaejeyak : Development of star-commodity using the strategy herbs of Gyeongnam herbal anti-aging industry</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Optimization of ABF manufacturing process : Partners with Gntech</li> <li>○ Produced Shiquandabuhwan using mixed medicinal herbs <ul style="list-style-type: none"> <li>• Confirmation of biological activity of balloon flower and 9 medicinal herbs <ul style="list-style-type: none"> <li>- Analysis of phenolic acids/flavonols based on HPLC</li> <li>- Identification of radical scavenging and digestive enzyme inhibitory activities</li> </ul> </li> <li>• Produced Shiquandabuhwan by high-temperature aging process (HTAP) <ul style="list-style-type: none"> <li>- Analysis of nutritive compounds (fatty acids/free amino acids) and active compounds (phenolic acids/flavonols)</li> <li>- Identification of radical scavenging and digestive enzyme inhibitory activities</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>○ Protocol optimization of extraction of ABF <ul style="list-style-type: none"> <li>• Manufacture of fermented and aged balloon flower based on HTAP <ul style="list-style-type: none"> <li>- Assessment of extraction condition based on EtOH concentration and extraction temperature</li> <li>- Analysis of active compounds such as triterpenoids, phenolic acids, and flavonols</li> <li>- Identification of radical scavenging and digestive enzyme inhibitory activities</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>○ Produced ABF with Jangbaek cultivar and its characterization <ul style="list-style-type: none"> <li>• Produced ABF with Jangbaek cultivar <ul style="list-style-type: none"> <li>- Analysis of nutritive compounds such as physicochemical property, 5 nutrients, fatty acids, and free amino acids</li> <li>- Analysis of active compounds such as triterpenoids, phenolic acids, and flavonols</li> <li>- Identification of radical scavenging and digestive enzyme inhibitory activities</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>○ Production using balloon flower : Gyeonggoghwan etc.</li> <li>○ Production and characterization of powder materials for produced small Hwan <ul style="list-style-type: none"> <li>• Produced ABF powder materials using HTAP <ul style="list-style-type: none"> <li>- Analysis of nutritive compounds such as physicochemical property, 9 nutrients, fatty acids, and free amino acids</li> <li>- Analysis of hazard components such as microorganisms/<i>E. coli</i>, heavy metals (Cd/As/Pb), and tar color.</li> <li>- Analysis of active compounds such as triterpenoids, phenolic acids, and flavonols</li> <li>- Identification of radical scavenging and digestive enzyme inhibitory activities</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>○ Production and characterization of liquid materials for produced stick liquid type <ul style="list-style-type: none"> <li>• Produced liquid materials using ABF</li> </ul> </li> </ul>

Results	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Analysis of nutritive compounds such as physicochemical property, 9 nutrients, fatty acids, and free amino acids</li> <li>- Analysis of hazard components such as microorganisms/<i>E. coli</i>, heavy metals (Cd/As/Pb), and tar color.</li> <li>- Analysis of active compounds such as triterpenoids, phenolic acids, and flavonols</li> <li>- Identification of radical scavenging and digestive enzyme inhibitory activities</li> <li>○ Produced stick liquid type : Aged balloon flower plus-up <ul style="list-style-type: none"> <li>• Product planning of stick liquid type ‘Aged balloon flower plus-up’</li> <li>• Produced stick liquid type based on liquid materials</li> </ul> </li> <li>- Analysis of nutritive compounds such as physicochemical property, 9 nutrients, fatty acids, and free amino acids</li> <li>- Analysis of hazard components such as microorganisms/<i>E. coli</i>, heavy metals (Cd/As/Pb), and tar color.</li> <li>- Analysis of active compounds such as triterpenoids, phenolic acids, and flavonols</li> <li>- Identification of radical scavenging and digestive enzyme inhibitory activities</li> <li><b>(2) Gntech : Optimization and standardization of fermentation process using ABF</b></li> <li>○ Selection of optimal microorganism for balloon-flower fermentation : 2 yeast and 3 lactobacillus strains</li> <li>○ Optimization of roasting and fermentation for produced FBF tea <ul style="list-style-type: none"> <li>• Roasting and produced FBF tea</li> <li>- Analysis of nutritive compounds such as physicochemical property, 5 nutrients, fatty acids, and free amino acids</li> <li>- Analysis of active compounds such as triterpenoids, phenolic acids, and flavonols</li> <li>- Identification of radical scavenging and digestive enzyme inhibitory activities</li> </ul> </li> <li>○ Optimization of ABF manufacturing process <ul style="list-style-type: none"> <li>• Produced ABF through steam, lactic acid fermentation (LAF), LAF-HTA, and HTA process</li> <li>- Analysis of nutritive compounds such as physicochemical property, 5 nutrients, fatty acids, and free amino acids</li> <li>- Analysis of active compounds such as triterpenoids, phenolic acids, and flavonols</li> <li>- Identification of radical scavenging and digestive enzyme inhibitory activities</li> </ul> </li> <li>○ Protocol development for standardize ABF analysis : triterpenoids <ul style="list-style-type: none"> <li>• Analysis of 4 triperpenoid derivatives with origin balloon flower based on HPLC</li> <li>• Analysis of triperpenoid derivatives from materials and processs materials</li> </ul> </li> <li>○ Produced FBF tea with yeasts and its characterization <ul style="list-style-type: none"> <li>• Produced FBF tea using 5 yeast strains</li> <li>- Analysis of nutritive compounds such as physicochemical property, 5 nutrients, fatty acids, and free amino acids</li> <li>- Analysis of active compounds such as triterpenoids, phenolic acids, and flavonols</li> <li>- Identification of radical scavenging and digestive enzyme inhibitory activities</li> </ul> </li> <li>○ Produced ABF and its characterization <ul style="list-style-type: none"> <li>• ABFs : red balloon flower (BF), black BF, fermented red BF, fermented black BF</li> </ul> </li> </ul>
---------	---

Results	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Analysis of nutritive compounds such as physicochemical property, 5 nutrients, fatty acids, and free amino acids</li> <li>- Analysis of active compounds such as triterpenoids, phenolic acids, and flavonols</li> <li>- Identification of radical scavenging and digestive enzyme inhibitory activities</li> <li>○ Production of aged and fermented <i>Polygoni multifori Radix</i> (PMR) (strategy herbal of Gyeongnam herbal anti-aging industry) and its characterization <ul style="list-style-type: none"> <li>• Aged and fermented PMR based on produced technology of ABF</li> <li>- Analysis of nutritive compounds such as physicochemical property, fatty acids, free amino acids, and minerals</li> <li>- Analysis of active compounds and identification of antioxidant activity</li> </ul> </li> </ul> <p><b>(3) IPON : Designing commercialization plan for industrialization of ABF</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Market Research : related to liver damage treatment <ul style="list-style-type: none"> <li>• Balloon flower cultivation status, competitive products, key Player and market size/share/growth</li> </ul> </li> <li>○ Analysis of patent trend : related to hepatic function and immune function <ul style="list-style-type: none"> <li>• Competitive products, key Player and market size/share/growth</li> <li>• Major applicant/patent map analysis</li> </ul> </li> <li>○ Investigation and analysis of target markets <ul style="list-style-type: none"> <li>• Investigation and analysis of patents related to target markets</li> </ul> </li> <li>○ Establishment of approval strategy and Business model : 1 of report on Functional food for liver health</li> </ul> <p><b>(4) GNU : Efficacy and toxicity test of ABF</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Cytotoxicity of BF and ABF in hepatocyte cell lines (HepG2/FL83B) and macrophage cell (Raw264.7) <ul style="list-style-type: none"> <li>• ABF is less cytotoxicity than BF</li> </ul> </li> <li>○ Efficacy of ABF on lipid accumulation in hepatocyte cells <ul style="list-style-type: none"> <li>• Effect of inhibiting hepatic lipid accumulation in hepatocytes was poor</li> </ul> </li> <li>○ Efficacy of ABF on inflammatory liver injury <ul style="list-style-type: none"> <li>• Effect of improving liver damage in inflammatory liver injury mice</li> </ul> </li> <li>○ Efficacy of Shiquandabuhwan/ABF on immune cell lines <ul style="list-style-type: none"> <li>• Effect of immune cell activation and immunoregulatory expression in splenocyte and macrophage cells</li> </ul> </li> <li>○ Effect of ABF for improving hepatic function in non-alcoholic liver injury <ul style="list-style-type: none"> <li>• Effect of improving liver damage and inhibiting inflammatory in inflammatory liver injury mice</li> <li>• Effect of inhibiting inflammatory protein and gene expression in macrophage cells</li> <li>• Suppression of inflammatory proteins through p38 and EPK signaling pathways</li> </ul> </li> <li>○ Safety test of ABF : general or cell toxicity or gene toxicity</li> </ul> <p><b>2. Achievement :</b></p> <p><b>(1) Industrializing products :</b> 5 patent application for 2 registration, 2 technology transfer (total 194.12 million won), 1 new employments, 4 final products, and total turnover: 194.12 millions</p> <p><b>(2) Scientific products :</b> 2 KCI journal publication, 6 conference presentation, 4 technical guidances, 4 manpower cultivation, 5 exhibitions, and 2 other study</p>
---------	--

<p><b>Expected Contribution</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Development of outstanding anti-aging commodity using active balloon flower for fostering a Gyeongnam anti-aging industry</li> <li>○ International industrialization of food and medicinal commodity developed using Korean traditional herb</li> <li>○ Pioneering a new market with active balloon-flower based functional beverage</li> <li>○ Industrialization through technology licensing</li> <li>○ Useful reference for clinical trials of active balloon-flower products</li> <li>○ Technical advance in the field of food science</li> <li>○ Scientific profiling of novel anti-aging materials</li> <li>○ Creating a higher value-added business using Korean traditional herbs</li> <li>○ Harmonious growth of primary, secondary and tertiary industries</li> <li>○ Rapid growth of anti-aging industry based on Sancheong and Gyeongnam</li> <li>○ Growth to a global company in traditional herb industry</li> <li>○ Accelerating Commercialization by Establishment of BM</li> </ul>				
<p><b>Keywords</b></p>	<p>anti-aging</p>	<p>bio-processing</p>	<p>active balloon-flower*</p>	<p>hepatic function</p>	<p>industrialization</p>

\*Active balloon-flower (ABF) : Enhanced active balloon-flower through aging process, fermentation process, and mixture process of aging and fermentation. (aging balloon flower, fermentative balloon-flower and aging-fermentative balloon-flower)

# 〈 CONTENTS 〉

Chapter 1. Introduction .....	1
Chapter 2. The status of domestic and foreign technical development .....	14
Chapter 3. Contents and results of study .....	19
Chapter 4. Attainment of Objectives and Contribution .....	275
Chapter 5. Applications of the Results .....	281
Chapter 6. Scientific and Technological information from Abroad .....	285
Chapter 7. Security grade of R&D result .....	288
Chapter 8. Facilities and Equipments. ....	288
Chapter 9. Safety Management of Lab. ....	288
Chapter 10. Typical research performance in R&D subject .....	293
Chapter 11. Other things .....	294
Chapter 12. Reference .....	300

〈Attachment〉 Abstract

Self-assessment report

Application plan of research achievement report

# 〈 목 차 〉

제1장. 연구개발과제의 개요 .....	1
제2장. 국내외 기술개발 현황 .....	14
제3장. 연구수행 내용 및 결과 .....	19
제4장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	275
제5장. 연구결과의 활용계획 등 .....	281
제6장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	285
제7장. 연구개발성과의 보안등급 .....	288
제8장. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황 .....	288
제9장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	288
제10장. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	293
제11장. 기타사항 .....	294
제12장. 참고문헌 .....	300

## 〈별첨〉 초록

자체평가의견서

연구성과 활용계획서

## 제1절 연구개발의 목적

### 1. 최종목표 :

- 가. 활성도라지를 이용한 경남 향노화산업 대표 스타상품 개발
- 나. 국내 토종 약초의 글로벌 식·의약 소재 개발



그림 1-1. 본 연구의 목표 및 연구배경.

## 2. 세부목표

### 가. 정성적 목표

- (1) 도라지로부터 수출전략상품 십전대보환 제품화
- (2) 발효미생물 선발 및 활성도라지 제조 최적 공정 개발
- (3) 간 기능 개선음료 등의 시장조사
- (4) 세포모델에서 활성도라지의 효능 스크리닝
- (5) 발효도라지차 제품화 및 활성도라지 대량생산 최적화
- (6) 활성도라지 추출 최적화 및 발효 최적화 기술 개발
- (7) 간 기능 개선음료 등 관련 기술 특허동향 분석
- (8) 고지방식이 동물모델에서 활성도라지의 대사질환 및 지방간 개선 효능 평가 및 기전 분석
- (9) 활성도라지 추출물 혹은 발효물의 제품화
- (10) 활성도라지 추출물 및 발효물 품질 표준화
- (11) 개발과제의 상용화 전략 수립
- (12) 급/만성 간 손상 동물모델에서 활성도라지의 알코올성 및 비알코올성 간 손상 개선 효능 평가 및 기전 분석

### 나. 정량적 목표 (사업종료 후 3년)

- (1) 사업화 지표 : 특허출원 5건과 등록 4건, 기술실시(이전) 2건, 기술이전료 60백만원, 제품화 3건, 매출액 1,677.6백만원, 수출액 375.3백만원, 고용창출 2건
- (2) 연구기반 지표 : SCI급 논문 3편, 비SCI급 논문 1건, 학술대회 발표 5건, 교육지도 4건, 인력양성 4건, 홍보 전시 2건, 타 연구활용 등 1건

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인 증	학술성과			교육 지도	인 력 양 성	정책 활용·홍보		기 타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SCI	비 SCI						
최종목표	5	4		2	60	3	1677.6	375.3	2		3	1	5	4	4		2	1	
1차년도	1												1	1					
2차년도	2			1	10	1	36			1		1	2	2	2		1		
3차년도	2	4		1	50	2	82.8		1	1	3		2	1	2		1	1	
소 계	5	4		2	60	3	118.8		1	2	3	1	5	4	4		2	1	
종료 1차년도							176.4	81	1										
종료 2차년도							460.8	1296											
종료 3차년도							921.6	1647											
소 계							1588	375.3	1										
합 계	5	4		2	60	3	1677.6	375.3	2		3	1	5	4	4		2	1	



## 제2절 연구개발의 필요성

### 1. 고령사회 진입과 웰빙 트렌드가 건강기능식품 시장 성장 견인

○ 한국은 이미 2000년부터 65세 이상 노인 인구 비율이 전체 인구의 7% 이상을 차지하는 사회, 즉 고령화 사회에 들어섰으며, 2012년 현재 총인구에서 65세 이상 고령자가 차지하는 비중은 12%로 1970년 3%에서 지속적으로 증가하여 2030년 24%, 2050년 37%에 이를 것으로 전망. 이에 따라 2016년에는 65세이상 고령자 비중이 14%를 넘으며 고령사회에 진입할 것으로 예상되며, 2025년에는 20%를 상회하며 초고령 사회가 될 것으로 전망(그림 1-2).

■ 선진국에서도 고령사회 진입과 질병예방, 높은 의료비 때문에 건강기능식품시장이 지속적으로 성장하고 있으며, 한국도 빠르게 진행되고 있는 고령화추세와 자기건강 관리(Self-Health Care)에 대한 관심증가로 건강기능식품산업의 성장 추세는 이어질 것으로 예상

■ 1970년, 1971년 출생아수는 100만 명, 102만 명으로 대한민국에서 100만 명 이상 태어난 유일한 두 해. 통계청 장래 인구추계자료에 따르면 68~73년생은 현재 대한민국인구의 10%(2013년 추계인구 5,022만명 기준)로 인구 구조 피라미드상 가장 두터운 연령층이며, 만41~46세로 대한민국 소비의 주축을 이루고 있음. 이들은 40대 초중반으로 건강에 높은 관심을 가지고 있으며, 실제로 많은 건강기능식품을 소비하고 있는 사회의 중추 세대(그림 1-3).

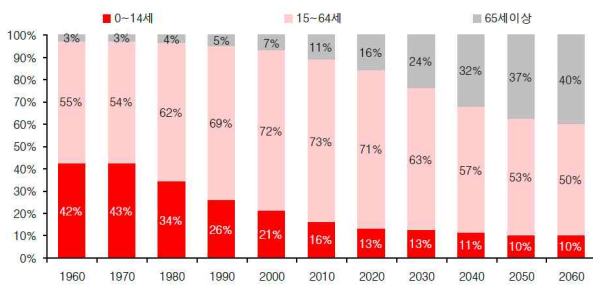


그림 1-2. 대한민국 인구비중 변화.

(출처: 통계청, 유진투자증권)

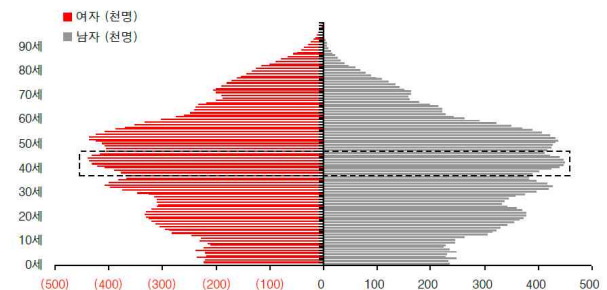


그림 1-3. 2013년 대한민국 인구 구조.

(출처: 통계청, 유진투자증권)

○ 항노화산업, 창조경제의 주역으로 대두

■ 저출산·고령화 및 건강관리 중심의 의료패러다임 전환으로 인한 성장성이 빠른 산업 (CAGR 10%)

- 글로벌 항노화 시장규모는 2010년 237조 → 2015년 365조원 전망(CAGR 9.0%)

- 국내 항노화산업 시장규모는 2011년 11.9조 → 2020년 28.3조원 전망(CAGR 10.1%)

■ 현 정부에서도 140대 국정과제(2013.2)의 하나인 ‘고령 친화산업 육성’ 사업에 항노화산업을 포함하여 강한 육성 의지를 표명

○ 항노화산업 육성을 통한 국가경제 및 지역경제 활성화 견인

■ 정부의 창조경제 구현에 부합하는 대표적인 첨단 융합산업으로 기술우위 선점을 통한 글로벌 항노화산업 선도 가능

- 의약품, 식품·한방, 화장품, ICT, 맞춤형 진단·예측 기기 및 시스템과 새로운 형태의 건강관리·의료서비스를 포괄하는 다학제간 첨단 융합산업

■ 항노화산업 육성은 국민건강 증진 및 건강수명 연장을 통해 생산가능인구 확대와 양질의 일자리 창출에 기여

○ 전 세계적으로 고령화의 급속한 진행과 함께 기대수명 증가, 노년화 지수 증가 등에 따라 개인 및 사회 차원에서 건강하게 노년 생활을 보내는 것에 대한 관심과 중요성이 급속히 증가(그림 1-12)

■ 65세 이상 비율 : 2013년 (12.5%) → 2030년 (23.1%)

■ 이러한 수요를 반영하여 의약품, 식품, 화장품 등 항노화산업은 9% 이상의 빠른 성장세를 보이며, 특히 항노화 관련 의약 및 건강기능식품시장은 12.5% 수준의 높은 성장세를

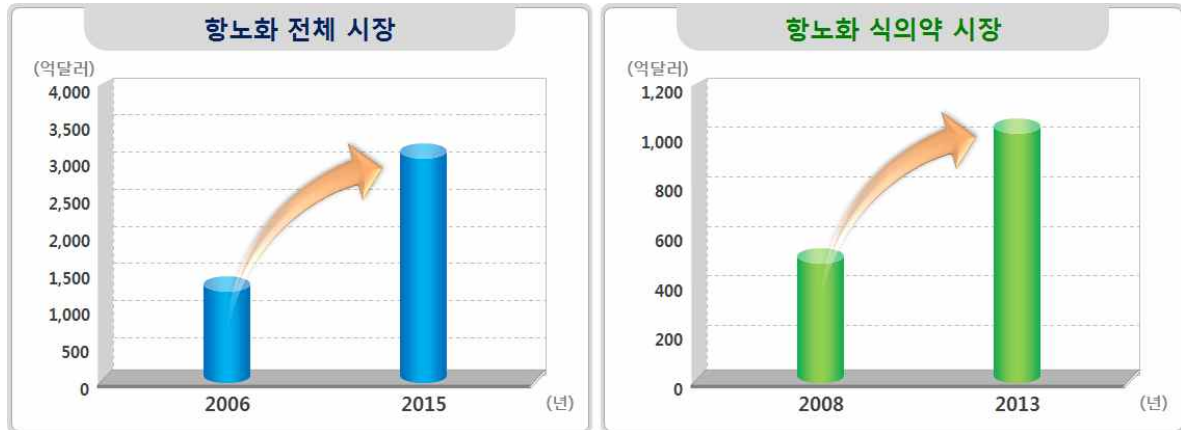


그림 1-4. 항노화 식의약 시장 규모.

## 2. 국산 토종 약초 활용 대사질환 및 갱년기질환 개선 기능성 식의약 소재 개발이 필요

○ 농산물 혹은 약용작물은 기능성 물질을 다량 함유하고 있으나 가공 방법의 제한성 및 활성 지표물질의 관계 명확하지 않아 건강기능식품 및 의약품 소재 개발에 한계

○ 기능성 식의약 소재의 대부분은 해외에서 수입하고 있어 해외 의존도가 심화 우려 제기

○ 관련 업계에서는 상품화가 쉽거나, 기반 연구가 다수 진행 되어온 일부의 농산물만 이용 또는 상품화 되고 있는 실정으로 다양한 농산물로부터 고부가가치 창출이 가능한 연구가 필요

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

■ 최근 국민건강영양조사에 따르면 20~29세의 초고도 비만율이 1998년도 0.17%에서 2010년 1.63%로 늘어 10배 이상 증가

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

■ 건강보험공단 건강보험정책연구원은 ‘건강위험요인으로 인한 건강보험 진료비 지출 분석’ 보고서에 흡연·음주·비만에 따른 진료비가 2007년 4조 6,540억원에서 2011년 6조 6,888억원으로 44%가량 급등했다고 했고 과체중 때문에 2011년에 발생한 진료비도 고혈압(36.17%), 당뇨(20.07%), 뇌졸중(12.03%), 허혈성 심장질환(9.22%) 등을 중심으로 2조 6,919억원에 달하며, 이는 2007년 1조 8,971억원보다 41.89% 늘어난 규모라고 보고

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

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

○ 만성적인 대사 장애로 인하여 내당능장애(당뇨의 전 단계, 공복 혈당이 100 mg/dL보다 높은 상태), 고혈압, 고지혈증, 비만, 심혈관계 죽상동맥 경화증 등의 여러 가지 질환이 한 개인에게서 한꺼번에 나타나는 것을 ‘대사증후군(metabolic syndrome)’ 이라고 정의

■ 대사증후군의 임상적인 중요성은 그 관련인들이 죽상경화증에 의한 문제인 뇌졸중, 심장질환 등, 우리나라의 사망 원인 2,3,4,7,9위를 차지하는 질환들(2006년 통계청 자료 74,165명)이 포진하고 있다는 점이며 이들을 종합하면 사망 원인 1위인 암(65,909명)을 능가하는 상황임(그림 1-5)



그림 1-5. 대사증후군 관련 의료 지출비 및 보도자료.

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

■ 최근 비만 관련 연구에서 비만이 염증유전자 네트워크를 활성화시켜 그 위험성을 증가시키고 있으며 염증이 대사성증후군을 유발하는 원인인자로 지목되고 있음

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

■ 고혈압은 30대가 30.2%였으며 50대 51.7%, 70대 77.9%, 80대는 81.5%가 앓았다고 함.

■ 당뇨는 60대 46%, 70대 49%, 80대 50% 위험요인을 안고 있음(그림 1-6)



그림 1-6. 연령별 대사증후군 위험요인 보유자 비율.

○ 대사증후군, ‘복부비만’ 이 원인 일 것으로 추정하고 있음.

■ 우리나라 30세 이상 성인의 30%(출처: 보건복지부, 2010년) 이상이 각종 심혈관 질환의 원인이 되는 대사증후군에 걸린 것으로 보고

■ 미국의 경우 현재 4,000만명 이상의 성인이 대사증후군에 해당되는 것으로 보고

○ 빠르게 진행되는 고령화와 동시에 건강에 대한 의식수준이 높아지면서 세계적으로 건강기능식품 시장 성장이 지속되고 있으며, 2014년 경우 국내 건강기능식품 시장규모는 1조 4천 900억 원으로 2011년 대비 44.7% 성장(식약처 ‘2015 식품 의약품 통계연보’)하였으며, 세계 시장 성장세는 더욱 가속화돼 2020년 6394억 달러(약 646조 원) 규모로 성장할 것으로 전망

○ 식품의약품안전처는 2013년 건강기능식품 생산실적을 분석한 결과, 개별인정형 건강기능식품의 생산은 2,324억원으로 2012년 1,807억원에 비해 29% 증가

■ 제품별로는 백수오등복합추출물(갱년기 여성 건강)이 전체의 30%(704억원)를 차지하여 가장 많았으며, 헛개나무과병추출분말(간 건강) 23%(541억원), 당귀혼합추출물(면역기능) 14%(314억원), 마태열수추출물(체지방 감소) 10%(229억원) 등의 순(표 1-1)

표 1-1. 개별인정형 원료별 건강기능식품 생산실적 (출처: 식품의약품안전처, 유진투자증권)

순위	구분	총 생산액						기능성 내용
		2008년	2009년	2010년	2011년	2012년	2013년	
	총생산액(억원)	416	800	1,129	1,435	1,807	416	
1	백수오 등 복합추출물			14	40	100	704	갱년기 여성건강
2	헛개나무과병추출분말		145	441	349	502	541	간건강
3	당귀혼합추출물	22	62	87	140	245	314	면역기능
4	그린미때추출물			6	4	147	229	체지방감소
5	들외잎주정추출분말						63	체지방감소
6	히알루론산나트륨		3	11	71	41	48	피부건강
7	초록입홍합추출오일 복합물		36	32	29	28	36	관절건강
8	대두배아열수추출물등 복합물					61	27	체지방감소
9	시탕수수엑스알코올				23	19	23	콜레스테롤 수치 개선
10	알로에추출물				29	21	22	변비 방지
	소계	22	246	591	685	1,164	2,007	

자료: 식품의약품안전처, 유진투자증권

■ 또한, 상위 5위 제품군 중 지난해 가장 높은 성장세를 보인 제품은 체지방 감소 제품으로 201.2%(78→235억원)이었으며, 갱년기 여성 건강 103.1%(64→130억원), 간 건강 41.6%(531→752억원) 등의 순이며, 이들 제품의 급성장 요인은 젊음을 유지하고 싶은 욕구 증대와 몸매관리를 중시하는 사회적 환경 때문인 것으로 풀이(그림 1-7)

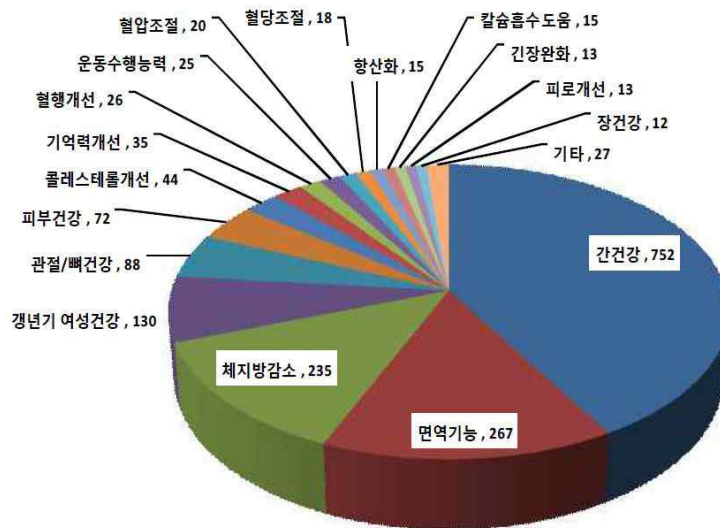


그림 1-7. 개별인정형 건강기능식품 기능성 별 생산실적. (출처: 식약처 2012/억원)

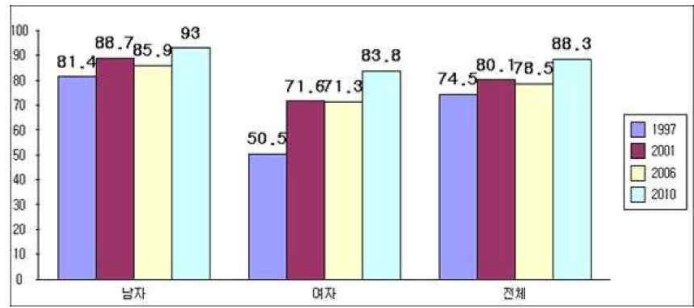
○ 간의 기능이 저하되면 간염, 간경화, 간성뇌증, 지방간, 알코올성 간 질환 등과 같은 간 질환이 발생하며, 간 기능 저하의 가장 일반적인 원인은 바이러스와 과량의 알코올 섭취가 주요인이고 이 밖에도 약물, 영양불량, 대상이상, 비만 등에 의해 발생

■ 특히 2010년도 기준으로 남성 93% 및 여성 83.8%의 음주율을 나타내며, 1997년 이후 약 13년에 걸쳐 여성의 음주율은 50.5%에서 83.8%로 급격히 증가하고 있어 한국인 경우 음주문화 간 손상의 주요인이라고 할 수 있음(그림 1-8)

■ 식약처 설문조사결과 건강기능식품을 구입한 경험이 있다고 응답한 사람은 전체응답자의 절반이상을 차지한 가운데, 연령별로는 30대가 64%, 40대가 59%로 구입 경험이 높은 반면, 60대 이상에서는 36%로 상대적으로 구입 경험이 낮은 것으로 조사되었고, 특히 한국에서 가장

두터운 인구층을 가지고 있는 68~73년생이 건강기능식품을 본격적으로 소비하기 시작하는 40대 초중반에 들어가 있으며, 또한 사회적으로 가장 왕성하게 활동한 시기로 음주율 가장 높은 연령이기도 함

■ 이에 따라 간 기능 보호의 숙취해소음료 시장 역시 급속도로 성장하여 그 규모는 2005년 600억 원에서 2008년 1,140억 원, 2011년 2,058억 원으로 성장하여 현재 2,000억 원대의 시장을 형성



출처: 한국음주문화연구센터

그림 1-8. 한국의 음주 소비 비율.

(출처: 한국음주문화연구센터)

### 3. 경남 한방 웰니스 관광 특구 전략약초 이용 기능성식품 소재 및 제품 개발이 필요

#### ○ 경상남도의 신산업인 항노화산업 활성화

■ 서부경남은 농업 비중이 약 70%로 대한민국 대표 청정지역인 지리산·덕유산·가야산 국립공원 지역(산청, 하동, 거창 및 함천)과 한려수도 국립공원 지역(남해, 하동, 사천, 고성) 농업의 비중은 70% 이상 상회하며, 특히 서부경남지역은 타 경남지역보다 경제적 자립도가 낮음 이에 한방 항노화 소재인 약초를 활용한 새로운 농가소득창출 모델과 새로운 사업 비즈니스 모델 개발이 필요

■ 경상남도는 바이오산업을 경상남도 4대 전략사업으로 선정하고 2000년부터 진주 바이오 21센터를 중심으로 체계적으로 육성하기 시작하여 김해지역 중심의 의생명분야, 통영지역 중심의 해양생물분야를 각각 육성하고 있음

■ 진주지역을 중심으로 한 바이오산업은 R&D 비교우위에 있고 산업화 입지가 유리한 생물화학소재(기능성물질)분야의 산업화에 역점을 두고 클러스터가 조성됨

■ 지자체연구소육성사업은 2005년부터 하동녹차연구소, 남해마늘연구소, 산청한방약초연구소 등 3개 사업으로 완료 및 추진되고 있음.

■ 경남지역의 특화산업은 역외 비교우위 산업 군으로서 2011년부터 생물-한방자원, 천연물을 특화산업으로 선정되어 있음

■ 최근 항노화 산업의 성장에 따라 그간 육성해 온 바이오산업을 ‘항노화바이오산업’으로 전환하고 신성장동력산업으로 육성하기 위해, 2012년 새로 취임한 지사가 서부경남지역에 한방 항노화산업 육성을 공약으로 제시하여, 경상남도 미래 50년 전략추진 사업으로 항노화 사업을 선정하여 5,000억 이상 투자계획을 발표

#### ○ 경남 한방항노화산업과는 관광산업 접목 ‘한방특화 웰니스산업’ 비즈니스 모델 발표

■ 경남 한방항노화산업과는 관광산업을 접목해 비즈니스 모델을 정착시키고, 체계적인 육성을 위한 컨트롤타워를 구성하는 등 종합적인 산업 육성방안 등의 내용의 ‘항노화 산업 클러스터 조기 정착을 위한 추진방안’을 발표(2016년 3월 9일)

■ 한방특화 웰니스산업은 산청 동의보감촌, 산청한방약초산업특구 등 기존의 인프라를 활용해 경남 서북부권(산청-함양-거창-함천)의 한방항노화 관련 분야의 의료, 웰니스서비스, 항노화제품, 체류형관광을 추진하는 융복합 산업으로 산청군을 비롯한 서북부권의 항노화 신시장 및 신수요 창출을 위해 경남도에서 중점적으로 육성하고 있는 산업

■ 특히 산청군은 지리산 권역을 활용한 한방특화 웰니스관광산업과 연계하는 ‘지리산 중심 웰니스산업 육성 투자 협약’을 체결(2016년 4월 27일)하고, 참여한 기관은 한방 특화 웰니스관광산업 중 특히, ‘한방애(韓方愛) 브라보 원외탕전원’의 설립 중요성을 인식하여 지리산을 중심으로 하는 웰니스산업을 우선 육성을 발표

■ 또한 주관기관인 (주)자연애제약은 산청 한방향노화산업단지 투자 협약(MOU)을 경상남도 및 산청군과 체결하였으며(2016년 3월 11일), 총괄책임자는 현재 경남향노화발전연구위원회 자문위원으로 활동하면서 향후 원외탕전원에 사업 계획 및 운영 등을 기획 중(그림 1-9)



그림 1-9. 산청한방향노화산업단지 투자협약 체결

○ 국내 도라지 생산량 2위 경상남도의 한방향노화 소재 공동 전략약초로 선정

■ 한방특화 웰니스산업 중심인 산청군-함양군-거창군-합천군의 공동 전략약초로서 도라지를 선정하여 한방향노화산업 소재로 육성할 계획을 수립(그림 1-10)



그림 1-10. 한방특화 웰니스 관광산업 벨트 조성. (출처: 2016년 3월, 경남 한방향노화산업과)

■ 도라지[*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.]는 아시아에 국한되어 생산되며 특히 중국 및 일본과 함께 우리나라에서만 유일하게 자생하는 식물로 예로부터 채소뿐만 아니라 다년생 약용으로 중요하게 인식

■ 농림부의 통계자료에 의하면 1991년도부터 2011년도까지 국내의 도라지 생산량을 조사한 바에 의하면 1991년도에는 5,255톤이었으나 점차 감소하여 2002년도에는 2,697톤으로 약 절반까지 감소하였으나, 2006년도부터 다시 증가하기 시작하여 2011년도에는 6,759톤으로 다시 2.5배까지 증가하였으며 이러한 추세는 향후 수년간 지속될 것으로 전망

■ 경상남도는 최근 도라지의 재배농가가 크게 증가하여 생산량 역시 증가하여 2019년 912

톤, 2010년 1,100톤, 2011년 719톤 생산하여 이는 전국에서 강원도에 이어 두 번째로 많은 것으로 조사

■ 경상남도의 시·군별 도라지 생산 현황을 보면 거창군에서 가장 많은 생산량을 보여 2009년도에는 447톤, 2010년도에는 743톤이었으나 2011년도에는 다소 감소하여 299톤을 생산, 두 번째로는 산청군으로서 2009년도에 185톤, 2010년도에 155톤, 2011년도에 143톤을 생산 및 그 외의 시군은 20톤에서 50톤을 생산. 특히, 한방 특화 웰니스산업 중심 네 개 군에서 약 90% 이상을 생산하고 있음(그림 1-11)

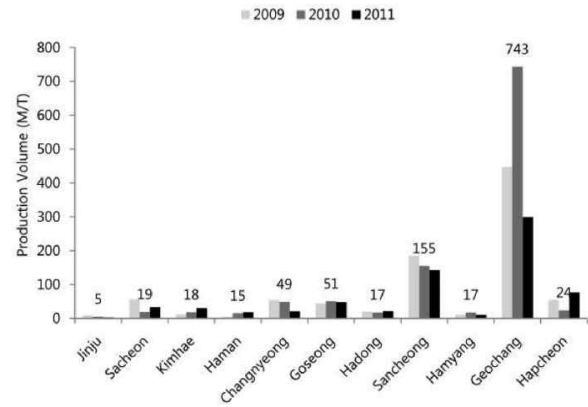


그림 1-11. 경상남도 도라지 생산량.

(출처: 한국국제농업개발학회지, 2014년)

■ 한편 도라지는 전통적으로 기관지 질환에 사용되어 왔는데, 기관지, 천식의 효능이 알려져 있으며, 주요 약리 성분으로는 triterpenoid계 saponin으로 platycodin A, C, D와 polygalacin D 등의 성분이 알려져 있고 이 중에서 platycodin D는 동물실험에서 진해 거담작용, 중추신경 억제작용, 혈당강화작용 및 콜레스테롤 대사개선작용, 항암활성 효과, 항염증 효과, 항비만 효과가 밝혀져 있음

⇒ 그러나, 도라지 가공품으로는 경남 진주 소재 (주)장생도라지를 필두로 도라지환, 도라지 사탕, 도라지 침출주, 도라지청, 도라지 절편 등의 단순 1차 가공품이 주를 이루고 있어 한방 항노화 소재로써 가치를 창조하고 한방특화 웰니스 관광산업과의 연계를 위해 고부가가치 건강기능식품 개발이 절실한 실정으로 이에 대한 정부지원은 절대적으로 필요하며 향후 이를 바탕으로 건강기능식품 원료등록을 위한 임상시험 기초자료 확보와 경남 대표 항노화산업 스타 상품 개발이 매우 중요함

#### 4. 기술융합을 통한 경남 한방항노화 전략약초의 ‘Blue Ocean’ 창출이 필요

○ 현재와 같이 먹거리 중심의 농식품산업으로 낮은 성장세(0.5%)가 지속될 경우 2020년에는 국내 총생산(GDP)이 1.2% 수준으로 위축될 전망, 전통산업에서 농생물체로부터 건강기능식품 소재 생산 등 고부가 생물소재산업으로 영역확대가 불가피

■ 건강장수 및 웰빙(well-being)과 관련된 천연물 소재 시장의 요구 증가와 더불어 기존 소재(화합물)의 단점을 극복할 수 있을 것으로 기대되는 생물자원 소재에 대한 기대감이 급부상

■ 2010년 10월 일본 나고야에서 열린 제10차 생물다양성협약 당사국총회에서 유전자원 접근 및 이익 공유에 관한 나고야 의정서가 채택되었고 발효되면 협약을 거쳐 원료 원산지 국가에 로열티를 지불

■ 나고야의정서에서 부각된 생물주권경쟁에 대처하고 국내식·의약산업의 글로벌 시장의 독점가치향상을 통한 시장경쟁력 제고를 위해 기능성 소재의 산업화 전략은 필수이며, 이에 독점적 원천 소재 및 기술력 확보가 필요

○ 농산물의 부가가치 창출관계를 보게 되면 1세대(원물), 2세대(가공), 3세대(기술융합)으로 갈수록 부가가치율 증대로 인한 국부증대와 농산물소비의 증대를 일으킬 수 있음.

■ 최근 웰빙 열풍으로 미국, 유럽의 경우 지속적인 농산물 소비가 증가 되고 있으며, 특히

항노화 관련 대사증후군과 갱년기가 증가

- 원물의 경우 해외시장의 경쟁력이 낮지만 3세대인 기술융합형 건강기능식품으로 갈수록 높은 부가가치로 해외 경쟁력이 높다는 점에서 농산물 유래 건강기능식품의 해외 수출 가능성은 매우 높다고 판단

○ 대사질환 관련 비만, 당뇨, 고혈압 및 간 기능에 대한 관심 증가는 약용작물에 대한 관심 증가로 이루어지고 있으며, 소비 역시 지속적인 증가 상태

- 외식문화의 발달로 인하여 농산물의 섭취에는 한계가 있으며, 특히 농산부산물에 대한 소비 형태는 사료 이외에는 거의 전무하여 새로운 부가가치 창출이 미흡

- 한국과 유럽의 식습관 차이는 한국의 경우 영양성분의 대부분을 식재료에서 얻다 보니 영양 균형적 식단 구성이 우선이며, 유럽의 경우 식재료는 칼로리 보충 수단으로 인식하고 생활에 필요한 영양성분을 별도의 영양제로 섭취하는 것으로 생각

- 특히 육류 위주의 고단백, 고지방식단으로 인하여 대사증후군(비만)이 급속도로 증가되고 있는 시점에서, 누구나 쉽게 접할 수 있고 인삼과 비슷한 우위가 있는 도라지 활용 대사질환 및 간 기능 개선 건강기능식품 개발이 필요하며 이를 통해 소비자의 접근성을 높일 필요가 있음.

⇒ 분자식품학, 유전체학, 단백질공학 및 기능성 대사체학 등의 신기술과 천연물화학, 전통미생물학, 발효학 및 생물공학 등의 전통기술을 접목하여 대사질환 및 간질환 개선 활성도라지 유래 기능성 소재(건강기능식품 및 의약품)의 제품화 기술 개발과 상품화를 통하여 한 방향노화 소재의 전략약초 도라지 활용성 증대를 통해 식품산업의 새로운 'Blue Ocean' 을 창출할 수 있음(그림 1-12).

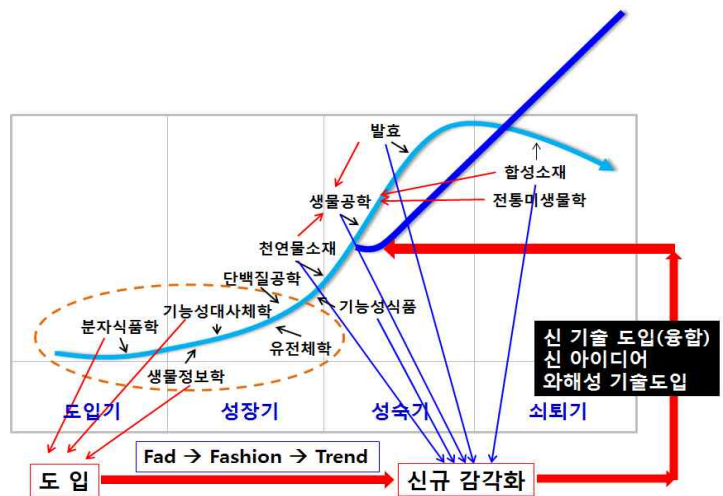


그림 1-12. 항노화 소재 전략약초 유래 기능성 신소재의 'Blue Ocean' 창출 개념.



### 제3절 연구개발 범위

#### 1. 1차년도 : 2016년 7월 7일 ~ 2016년 12월 31일

세부과제명	세부연구목표	가중치 (%)	연구개발 수행 범위
제1세부 : 활성도라지 이용 제품화 기술	도라지와 기타 10가지 약재의 비교	10	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 도라지와 기타 10가지 약재의 비색법을 기초로 한 유효성분 분석</li> <li>• 도라지와 기타 10가지 약재의 <i>in vitro</i> 상의 라디칼 소거활성과 소화효소 저해활성 확인</li> </ul>
	십전대보환 제품화 기술	20	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 고온숙성법 통한 도라지 함유 십전대보환 제조 기술 확립</li> <li>• 십전대보환의 비색법을 기초로 한 유효성분 분석</li> <li>• 십전대보환의 <i>in vitro</i> 상의 라디칼 소거활성과 소화효소 저해활성 확인</li> </ul>
제1세부-위탁1 과제 : 활성도라지의 발효공정 최적화 및 표준화 기술	우수미생물 확보	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 발효식품으로부터 발효 유산균과 효모균 선발</li> <li>• 유산균의 생균제능과 가바 생성능 확인</li> <li>• 효모의 당, 알코올과 산 내성 확인</li> </ul>
	볶음처리 조건 확립	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 볶음 온도와 시간을 고려하여 확인</li> <li>• 볶음 도라지의 비색법을 기초로 한 유효성분 분석</li> <li>• 볶음 도라지의 <i>in vitro</i> 상의 라디칼 소거활성과 소화효소 저해활성 확인</li> </ul>
	발효도라지 제조	10	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 효모 균주별 발효도라지 특성 확인</li> <li>• 발효도라지의 비색법을 기초로한 유효성분 분석</li> <li>• 발효도라지의 <i>in vitro</i> 상의 라디칼 소거활성과 소화효소 저해활성 확인</li> </ul>
	활성도라지 제조 공정 확립 (2차년 연계)	10	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 지역별 도라지의 고온숙성법을 통하여 활성도라지 제조 조건 검토</li> <li>• 물리적(고온숙성)과 생물학적(유산발효)를 통하여 활성도라지 제조 조건 검토</li> <li>• 활성도라지의 비색법을 기초로 한 유효성분 분석</li> <li>• 활성도라지의 <i>in vitro</i> 상의 라디칼 소거활성과 소화효소 저해활성 확인</li> </ul>
	활성도라지의 표준화 기술 확립	10	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 도라지 유래 4종 사포닌 화합물의 분석법 개발 및 표준화</li> </ul>
제1세부-위탁2 : 활성도라지 산업화를 위한 사업화 연계 방안 구축	간 기능 중심의 시장조사	10	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 문헌(논문, 통계자료), 제품, 특허 등의 분석을 통한 경쟁력 분석</li> </ul>
제1협동 : 활성도라지 소재의 안전성 및 효능 평가	세포독성	10	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 간세포주 및 면역세포주에서 세포독성 분석</li> </ul>
	지방간 개선 효능	10	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 간세포주에서 지방축적 억제 효능 분석</li> </ul>
	면역기능 조절 효능	10	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 면역세포주에서 면역기능 조절 기능 분석</li> </ul>

## 2. 2차년도 : 2017년 1월 1일 ~ 2017년 12월 31일

세부과제명	세부연구목표	가중치 (%)	연구개발 수행 범위
제1세부 : 활성도라지 이용 제품화 기술	숙성도라지로부터 최적 추출조건 확립	20	<ul style="list-style-type: none"> <li>1차년도 기반 고온숙성법을 이용한 숙성(후)도라지 제조와 성분 분석</li> <li>주정 농도별 및 온도별 추출물 제조</li> <li>추출 조건별의 특수성분(도라지 triterpenoid, phenolic acid, flavonol 화합물) 분석 및 <i>in vitro</i> 상의 라디칼 소거활성과 소화효소 저해 활성 확인</li> </ul>
	장백도라지 품종의 숙성(후)도라지 제조 및 특성	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>경남지역 특화 도라지 품종 장백 도라지 이용 숙성(후)도라지 제조와 성분 분석</li> <li>50% 주정에서 추출물 제조</li> <li>추출물의 특수성분(도라지 triterpenoid, phenolic acid, flavonol 화합물) 분석 및 <i>in vitro</i> 상의 라디칼 소거활성과 소화효소 저해 활성 확인</li> </ul>
	도라지 이용 제품화	10	<ul style="list-style-type: none"> <li>도라지 경옥고환 제품화와 발효침향환 제품화</li> </ul>
제1세부-위탁1 과제 : 활성도라지의 발효공정 최적화 및 표준화 기술	도라지 triterpenoid 계열 화합물 표준화	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>도라지 triterpenoid 4종의 표준물질 확보</li> <li>도라지 triterpenoid 분석을 위한 HPLC 조건 확립</li> <li>도라지 triterpenoid 3종에 대한 표준화(정량) 분석법 확립</li> <li>1차년도와 주관기업 등의 시료를 대상으로 분석기술 적용</li> </ul>
	효모발효도라지 차 제조	10	<ul style="list-style-type: none"> <li>효모 균주별 발효도라지 차 특성 확인</li> <li>발효도라지의 비색법과 HPLC 분석법을 기초로 한 유효성분 분석</li> <li>발효도라지 차의 <i>in vitro</i> 상의 라디칼 소거활성과 소화효소 저해활성 확인</li> </ul>
	숙성·발효 방식 검토를 통한 활성도라지 제조	10	<ul style="list-style-type: none"> <li>숙성방식(개방형과 밀폐형)과 유산 발효를 통한 활성도라지 제조</li> <li>가공조건별 특성 확인</li> <li>가공조건별 비색법과 HPLC 분석법을 기초로 한 유효성분 분석</li> <li>가공조건별 차의 <i>in vitro</i> 상의 라디칼 소거활성과 소화효소 저해활성 확인</li> </ul>
제1세부-위탁2 : 활성도라지 산업화를 위한 사업화 연계 방안 구축	간 기능 중심의 특허동향 조사	10	<ul style="list-style-type: none"> <li>문헌(논문, 통계자료), 제품, 특허 등의 분석을 통한 경쟁력 분석</li> </ul>
제1협동 : 활성도라지 소재의 안전성 및 효능 평가	간기능 개선 효능	15	<ul style="list-style-type: none"> <li>지방간 축적 억제 효능 분석</li> <li>염증성 간손상 억제 효능 분석</li> </ul>
	면역 기능 개선 효능	15	<ul style="list-style-type: none"> <li>면역 기능 개선 효능 분석</li> <li>면역세포에서 항염증 작용 효능 분석</li> </ul>

### 3. 3차년도 : 2018년 1월 1일 ~ 2018년 12월 31일

세부과제명	세부연구목표	가중치 (%)	연구개발 수행 범위
제1세부 : 활성도라지 이용 제품화 기술	소환 제품 제조를 위한 분말원료 제조 및 특성	10	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 활성(숙성)도라지 등을 고온숙성법을 이용하여 분말원료 제조</li> <li>• 영양성분 및 특수성분 분석</li> <li>• <i>In vitro</i> 항산화 및 소화효소 저해 활성 확인</li> </ul>
	스틱 액상 제품 제조를 위한 액상원료 제조 및 특성	10	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 활성(숙성)도라지 등을 이용하여 액상원료 제조</li> <li>• 영양성분 및 특수성분 분석</li> <li>• <i>In vitro</i> 항산화 및 소화효소 저해 활성 확인</li> </ul>
	스틱 액상 제품 제조 : 숙성도라지 플러스업	10	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 스틱 액상 제품인 숙성도라지 플러스업의 상품기획행 (제1위탁기관과 공동진행)</li> <li>• 상기 액상원료를 바탕으로 스틱 액상 제품 제조</li> <li>• 영양성분 및 특수성분 분석</li> <li>• <i>In vitro</i> 항산화 및 소화효소 저해 활성 확인</li> </ul>
제1세부-위탁1 과제 : 활성도라지의 발효공정 최적화 및 표준화 기술	2차년도 실험결과 일부 진행	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 효모발효 도라지 차의 지방산 조성 분석</li> <li>• 숙성·발효도라지의 영양성분, 지방산, 유리아미노산 조성 분석</li> </ul>
	활성도라지 이용 에너지 음료 제조 및 특성	10	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 활성도라지 함유 에너지 음료 제조</li> <li>• 영양성분 및 특수성분 분석</li> <li>• <i>In vitro</i> 항산화 및 소화효소 저해 활성 확인</li> </ul>
	경남 한방 전략약초인 하수오의 숙성·발효 하수오 제조 및 특성	10	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 상기 숙성·발효도라지 제조 기술을 적용하여 숙성·발효 하수오 제조 및 특성 분석</li> <li>• 이화학적 특성, 지방산, 유리아미노산, 무기질 분석</li> <li>• 생리활성물질 분석</li> <li>• <i>In vitro</i> 항산화 확인</li> </ul>
제1세부-위탁2 : 활성도라지 산업화를 위한 사업화 연계 방안 구축	사업화 가능 시장에 대한 조사 및 분석	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 간 기능 관련 건강기능식품 및 숙취해소 음료 시장동향 조사</li> </ul>
	사업화 가능 시장에 대한 국내 선행특허 조사 및 분석	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 간 기능 관련 건강기능식품 및 숙취해소 음료 국내 선행특허 조사</li> </ul>
	사업화 연계 방안 및 BM 수립	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 간 기능 개선 분야 건강기능식품 분야로 사업화 추진</li> </ul>
제1협동 : 활성도라지 소재의 안전성 및 효능 평가	염증성 간 손상 억제 효능 분석	10	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 염증성 간손상 동물모델에서 간손상 개선 효과 및 염증 억제 효과</li> </ul>
	염증 억제 효능 분석	10	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 대식세포를 이용한 실험에서 LPS에 의해 증가된 염증 단백질 및 유전자들의 발현</li> </ul>
	항염증 효능 기전 분석	10	<ul style="list-style-type: none"> <li>• p38 및 ERK 신호경로를 통해 염증 단백질들의 발현</li> </ul>

## 제1절 국내·외 기술현황

### 1. 국내 기술 수준

#### 가. 기술 현황

○ 간 건강 기능 천연물 소재와 관련하여 밀크씨슬(카르두스마리아누스) 추출물, 브로콜리스 프라우트 분말, 표고버섯 균사체 추출물, 표고버섯 균사체, 복분자 추출물, 발효 울금, 강황 추출물 등에 대한 효능 이 식품의약품안전처로부터 인정되었고 제품화가 다수 이루어져 있음

○ 헛개나무과병 추출물 및 유산균 발효다시마 추출물 등은 알콜성 손상으로부터 간 보호에 도움을 주는 것으로 식품의약품안전처 인정을 받은 바 있음

○ 2012년 기준 개별인전형 세부 품목을 보면 간 건강과 관련된 품목이 가장 많은 비율을 차지(37%)하는 것으로 나타났으며, 상기 효능이 인정된 소재들을 위주로 현재 간 건강 기능성 음료 등의 개발이 활발히 이루어지고 있는 것으로 사료됨

○ 도라지 음료 특허 출원 추이 :

■ 국내에서 도라지를 단독 또는 혼합하여 제조되는 음료 관련 특허 출원은 141건인 것으로 조사되었으며, 1995년도부터 상승추세에 들어섰고 2007년도에는 저조한 모습을 나타내지만 이후 다시 출원이 증가하는 양상을 보임

■ 이러한 양상을 볼 때 도라지는 건강기능성 식·의약 소재로서 꾸준히 관심을 받고 있는 것으로 사료됨

#### 나. 지식재산권 현황

○ 국내 간 기능 음료 특허 출원 추이 :

■ 국내 간 기능 음료와 관련한 특허 출원은 398건인 것으로 조사되었으며, 1998년도부터 출원이 급증하기 시작해 2001년에 가장 많은 출원이 이루어진 것으로 나타남(그림 2-1)

■ 이후 증감을 반복하나 꾸준히 특허 출원이 이루어지고 있는 경향을 보이고 있음. 국내 간 기능 음료 발명의 주요 출원인으로는 김원규님으로 11건의 출원을 한 것으로 조사되었으며, 그 뒤를 이어 한국 과학기술연구원이 간 기능성 관련하여 상당 수의 출원을 한 것으로 보임(그림 2-2)

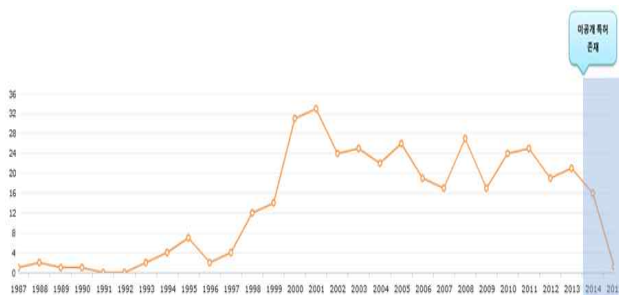


그림 2-1. 국내 간 기능 음료관련 발명 연도별 출원 건수.

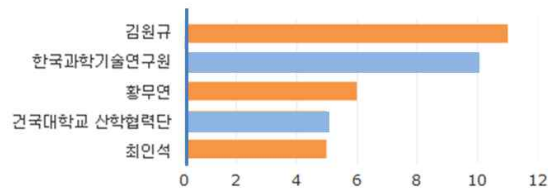


그림 2-2. 국내 간 기능 음료 발명 주요 출원인.

○ 도라지 음료 특허 출원 추이 :

■ 국내에서 도라지를 단독 또는 혼합하여 제조되는 음료 관련 특허 출원은 141건인 것으로 조사되었으며, 1995년도부터 상승추세에 들어섰고 2007년도에는 저조한 모습을 나타내지만 이후 다시 출원이 증가하는 양상을 보임

■ 이러한 양상을 볼 때 도라지는 건강기능성 식·의약 소재로서 꾸준히 관심을 받고 있는 것으로 사료됨

#### 다. 도라지 관련 건강기능식품 개별인정 현황 (표준화 현황)

○ 도라지와 관련된 건강기능식품 개별인정 등록은 2건이며, 모두 2013년 등록되었음

○ 인정 현황 1

■ 원료명 : 도라지추출물 (DRJ-AD)

■ 인정번호 : 기능성원료 인정 제2013-13호 ('13.06.05) ((주)장생도라지)

■ 기능성 내용 : 노인의 인지능력 개선에 도움을 줄 수 있으나, 인체적용시험이 미흡 (생리활성기능 3등급)

■ 일일섭취량 : 도라지추출분말로서 3 g/일

■ 섭취 시 주의사항 : -

○ 인정 현황 2

■ 원료명 : 도라지추출물

■ 인정번호 : 기능성원료 인정 제2013-26호 ('13.08.28) ((주)비엔씨바이오팜)

■ 기능성 내용 : 간 건강에 도움을 줄 수 있음 (생리활성기능 2등급)

■ 일일섭취량 : 도라지추출물로서 3 g/일

■ 섭취 시 주의사항 :

- 임신부·수유부 섭취에 주의

- 알레르기 체질이거나 특정질환이 있는 분은 의사와 상담 후 섭취

## 2. 국외 기술 수준

### 가. 기술 현황

○ 간 건강 기능 천연물 소재와 관련하여 국외에서는 강황(울금)과 밀크씨슬을 이용한 기술 및 제품이 강세를 이루고 있는 것으로 사료됨(표 2-1)

○ 특히 일본의 경우 울금을 사용한 건강기능 음료 및 식품에 대한 개발이 다수 이루어져 이러한 기술이 수입 등을 통하여 국내에 도입되어 경쟁이 이루어지고 있음(예를 들어 일본 '우콘의 힘' 수입)

표 2-1. 2013년 미국 판매 Top 20 허브 식이보충제

(출처: SPINScan Natural)

Herb <sup>†</sup>	Latin Name	US Dollar Sales	% Change 2012
1. Turmeric <sup>‡</sup>	<i>Curcuma longa</i>	\$21,321,593	26.2%
2. Grass (Wheat and/or Barley)	<i>Triticum aestivum</i> or <i>Hordeum vulgare</i>	\$20,821,442	17.3%
3. Flaxseed and/or Oil	<i>Linum usitatissimum</i>	\$17,735,699	-2.0%
4. Aloe Vera	<i>Aloe vera</i>	\$13,800,150	0.9%
5. Spirulina Blue Green Algae	<i>Arthrospira</i> spp.	\$10,583,256	15.1%
6. Milk Thistle	<i>Silybum marianum</i>	\$8,867,146	6.4%
7. Elderberry	<i>Sambucus nigra</i>	\$8,188,624	31.0%
8. Echinacea <sup>§</sup>	<i>Echinacea</i> spp.	\$6,937,809	18.9%
9. Maca	<i>Lepidium meyenii</i>	\$6,553,459	36.1%
10. Saw Palmetto	<i>Serenoa repens</i>	\$6,370,276	5.2%
11. Oregano <sup>§</sup>	<i>Origanum vulgare</i>	\$5,991,068	36.6%
12. Chia Seed and/or Oil	<i>Salvia hispanica</i> , <i>Salvia</i> spp.	\$5,547,925	35.2%
13. Cranberry	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	\$5,518,746	8.6%
14. Valerian	<i>Valeriana officinalis</i>	\$5,312,752	5.1%
15. Garlic	<i>Allium sativum</i>	\$4,965,794	4.5%
16. Echinacea-Goldenseal Combo	<i>Echinacea</i> spp.- <i>Hydrastis canadensis</i>	\$4,792,452	15.1%
17. Chlorophyll/Chlorella™	NA/ <i>Chlorella vulgaris</i>	\$4,758,896	1.9%
18. Stevia	<i>Stevia rebaudiana</i>	\$4,466,214	-2.1%
19. Red Yeast Rice	<i>Monascus purpureus</i>	\$4,302,556	-5.3%
20. Ginkgo	<i>Ginkgo biloba</i>	\$3,929,359	-3.8%
Subtotal Top-20 Herbs		\$170,765,216	
Subtotal All Other Herbs		\$149,957,382	
<b>Total Herb Sales</b>		<b>\$320,722,598</b>	<b>9.9%</b>

나. 지식재산권 현황 :

○ 5개국(한국, 미국, 일본, 중국, 유럽) 간 기능 음료 특허 출원 추이

○ 세계적으로 간 기능 음료 관련 발명의 출원건수가 4038건인 것으로 조사되었으며, 1991년도 이래로 증가하는 추세에 있음. 중국에서 가장 많은 출원이 이루어지고 있는 것으로 나타남. 주요 출원인으로는 The Invention Science Fund I, LLC , Washington Research Foundation 등이 있음(그림 2-3)

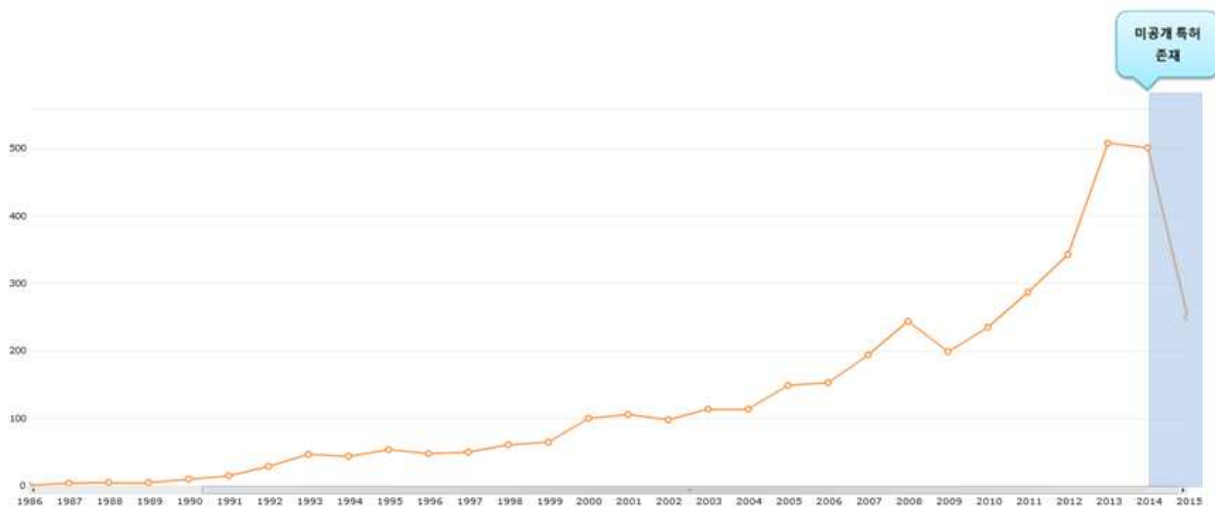


그림 2-3. 해외 간 기능 음료관련 발명 연도별 출원 건수.

## 제2절 제품 생산 및 시장현황

### 1. 국내 시장현황

#### 가. 국내 시장 현황

○ 기능성 음료 시장 규모는 2012년 기준 약 1조8000억원에 이르며, 연간 기준 성장률 41.5%로 음료 시장 중에서도 가장 큰 폭으로 성장하고 있는 추세임

○ 기능성 음료 시장에서 가장 높은 판매액을 보이는 것은 숙취해소 기능성 음료로서, 이들은 보통 간 건강을 표방하는 경우가 많은 것으로 사료됨(표 2-2)

○ 특히 숙취해소 기능성 음료 시장은 CJ헬스케어의 CJ헛개컨디션(점유율 43.6%)과 그래미의 여명808(31.7%), 동아제약의 모닝케어(13.9%)의 3강 구도를 이루고 있음

○ 숙취해소 음료 시장은 기존에 헛개음료를 위주로 시장이 형성되어있었는데, 최근 강황(울금) 주재로 한 숙취해소 음료가 맞붙고 있는 형세를 보임(현대경제신문)

표 2-2. 기능성 음료시장 제품군별 판매 규모 및 성장률

(출처: 링크아즈텍)

	판매액(억)			
	2011	2012	2013	2014 상반기
전체 기능성음료	4,857	6,050	5,920	2,826
숙취해소	2,284	2,247	2,202	1,029
비타민	1,992	1,983	1,867	896
에너지	133	1,022	884	338
드링크	186	520	652	401
식이섬유	228	250	246	122
기타 기능성	34	29	68	41

#### 나. 국내 경쟁기관 현황

○ 한국야쿠르트가 최근 ‘쿠퍼스 프리미엄’ 제품을 선보이며, 기존 헛개나무 과병 추출물을 주성분으로 하였던 제품에 밀크시슬, 비타민B군 및 울금 추출물 등을 추가하여 간 기능성 성분을 강화하는데 주력함.

○ 광동제약은 ‘힘찬하루 헛개차’를 출시하며 기존 제품에 비해 깊은 맛과 풍미를 내는데 주력하여, 제품 선호도를 높힘

○ 동아제약에서도 신제품인 ‘모닝케어 강황’을 출시해, 숙취해소 및 간 건강 기능성을 강화함

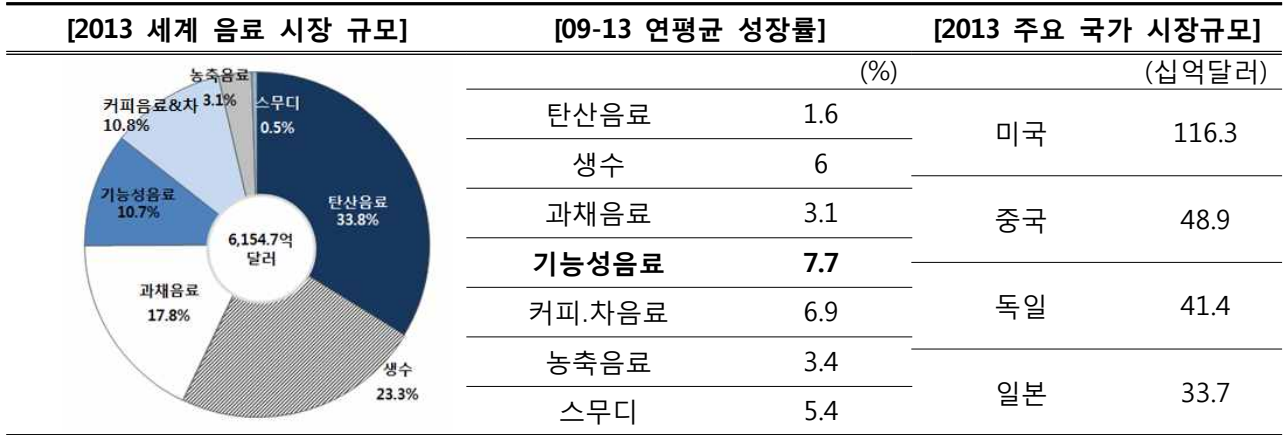
#### 다. 국외 시장 현황

○ 2013년도 기준 기능성 음료는 세계 음료시장 중 10.7%를 차지하고 있으며, 연평균 성장률에 있어서는 7.7%로 가장 높은 성장률을 보이고 있음(표 2-3)

○ 특히 일본의 경우, 2003년부터 다른 기능성에 비해 간기능 개선(성장률 235%)에 대한 건강기능 식품이 크게 성장한 것으로 조사되었으며(출처: 건강기능식품 주요국가별 시장동향 분석, 삼일회계법인), 일본의 ‘우콘노 치카라(울금의 힘)’는 일본 숙취해소 시장 점유율이 70%에 이를 정도로 인기를 끌고 있는 상품으로 조사됨

표 2-3. 세계음료시장 규모

(출처: 2014년 식품산업 분석 보고서, 한국보건산업진흥원)



라. 국외 경쟁기관 현황

○ 하우스웰니스푸드社가 제작한 일본 숙취해소 1위 음료인 ‘우콘노 치카라(울금의 힘)’ 이 국내 디알엑스플러스社를 통해 국내에 정식 수입되어, 국내 숙취해소 상품들과 경쟁

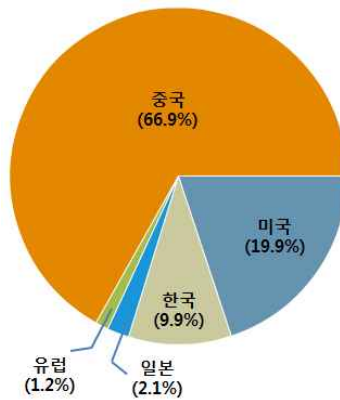


그림 2-5. 간 기능 음료 국가별 점유율.

마. 도라지 관련 수출 현황

○ 도라지는 아시아에 국한되어 생산되며 특히 중국 및 일본과 함께 우리나라에서만 유일하게 자생하는 식·약용 작물임

○ 도라지의 수출 현황을 보면 건 도라지는 2011년도에 약 6.9톤 생도라지는 2010년도에 22.3톤을 수출한 것으로 조사되었으며 다른 해에는 아주 미미한 수준임. 주요수출국은 중국, 일본, 사우디아라비아, 캐나다, 영국, 아랍에미리트, 미국, 알제리, 영국, 오스트레일리아, 인도네시아 등 현지 거주 교민들의 수요에 의한 것으로 조사됨

○ 한편 (주)장생도라지는 엑기스, 환, 캔디, 분말 등 다양한 가공제품으로 소비자 공략하여 최근 연간 100억원의 매출을 올리고 있는 (주)지오나와 계약을 체결, 200만 달러의 수출(출처: 농수산식품뉴스, 1334호, 2013년)

○ 그리고 위타기관인 경남과학기술대학교 동의보감촌브랜드마케팅사업단과 경남생약협동조합 공동으로 도라지절편, 도라지청 등의 중국과 베트남 수출 계약을 체결

○ 그러나, 국내 도라지는 고려인삼을 모델로 하여 고려홍삼 제품 형태의 고부가가치를 위한 전략이 수립과 제품 개발이 필요한 사항인 것으로 사료됨



## 제1절 연구개발 추진전략, 추진체계 및 추진일정

### 1. 연구개발 추진전략

#### 가. 추진전략

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

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

■ 이에 대한 국가 차원의 대응방안이 필요한 시점에 창조경제 실현을 위한 향노화산업 및 농업6차산업화와 ‘Golden seed project’ 를 국가 정책으로 진행하고 있음

■ 도라지는 한국, 중국, 일본의 아시아에서 생산되는 작물로서 고려인삼가 더불어 글로벌 소재로서 잠재성이 큰 생물자원 임. 한편 도라지 생산량은 전국에서 강원 지역 다음으로 경남 지역이 많이 생산되는 식·약용작물로서 특히, **경남 지역에서도 한방특화 웰니스 관광 벨트인 산청-함양-거창-합천에서 경남의 약 90% 정도를 생산하고 있는 대표 향노화 소재 전략약초** 임

○ 도라지는 다양한 생리활성을 지닌 사포닌, flavonoid 등의 기능성 화합물들이 풍부함

■ 도라지에는 풍부한 칼슘과 섬유질, 철분을 비롯하여 사포닌, 무기질, 단백질, 비타민 등이 들어있어 우수한 알칼리성 식품으로서 옛로부터 기관지 관련에 탁월한 효능이 알려져 있으며, 최근 **혈당강화작용, 콜레스테롤 대사개선작용, 항염증 효과 및 항비만 효과 등의 대사질환 개선 효능이 보고되고 있음**

■ 한편 생물공정기술 이용 도라지로부터 활성이 증진된 활성도라지는 홍삼과 견주어 건강 기능성 원료로 개발할 수 있는 큰 잠재성이 지니고 있음

○ 본 연구 전략은 경남 대표 향노화기업, 대학, 지자체 및 농가 산·학·관 구성으로 이들 기관의 긴밀한 협조관계를 통해 연구를 추진하고자 함 (**그림 3-1**)

■ 주관기관 (향노화 대표기업+대학+기술사업화 기업)

• 제1세부과제 (자연애제약) : 주관기관인 (주)자연애제약의 향노화산업 대표기업으로 산청군 향노화산업단지 투자 협약을 체결하여 향노화산업 관련 제품을 생산을 준비하는 과정 중에 산청을 비롯한 경남 공통 전략약초인 도라지를 이용하여 고부가가치 식품을 개발하고자 계획하였으며, 십전대보환 제품의 자체 기술개발과 제품화를 시작(2017년부터 사업화: 미국유통업체 연계 수출전략 계획 수립)으로 발효도라지차 및 활성도라지 추출물·발효물의 가공원료 생산을 통한 다양한 루트를 통해 홍보·마케팅을 병행하여 개발할 제품에 대해서 판매할 예정이며, 3차년도에는 ‘향노화산업화플랫폼개발사업단’ 과 연계하여 GLP 독성평가와 임상시험 방안을 모색할 예정임

• 제1위탁과제 (경남과기대) : 본 위탁책임자는 생물전환공정 기능성 소재 강화의 원천 핵심기술을 보유하고 있었으며, 특히 지역특화 작물을 기능성 소재 가공을 통한 70억원(3년 누적) 사업실적을 지니고 있으며, 다수의 기술이전을 통하여 산업화와 직결된 연구를 진행하고 있어 경남 향노화산업 전략약초 도라지 이용 발효도라지차, 활성도라지 추출물 및 활성도라지

발효물 제조를 통하여 지방간/간 기능 개선 관련 건강기능식품 제조 최적화 실험으로 진행

- 위탁기관 2 (아이피온) : 전문 변리사를 통하여 IP 등의 기술력을 분석하고 이를 통하여 IP 설계 컨설팅, 비즈니스 모델 개발, 기술사업화, 투자 펀딩 매칭 등을 실시하는 전문기업체 임

■ 협동기관 (경상대)

- 경상대학교 의학전문대학원은 지난 10년부터 지금까지 MRC 센터를 통해 구축한 뇌·심혈관질환, 대사성질환 및 갱년기질환 관련 안전성과 효능평가 시스템을 구축하고 있음

- 한편, 제1협동과제 책임자는 최근 5년간 대사질환 및 간 기능 등 관련 효능평가 국제저널 60여편 게재하였으며, 특히 간 기능 치료제 부분에 현재 임상 3상 수준을 진행하고 있어 대사질환 및 간 기능 관련 최고 수준의 연구자로 본 활성도라지 추출물 혹은 발효물의 식품건강기능식품 가이드라인에 맞추어 효능평가와 기전 연구로 진행할 예정임

■ 지자체 (산청군 한방향노화산업실)

- 산청군 1998년부터 한방약초 특구산업을 지정하여 현재까지 다양한 사업과 인프라를 구축하였으며, 올해 2016년을 향노화산업 원년으로 지정하고 작년부터 한방향노화포럼 개최하여 향노화산업 법제화, 산청군 향노화산업 로드맵 등을 수립해가고 있으며, 향노화산업을 위한 다양한 행사(포럼 등)와 행정적 지원 체계를 마련할 예정임

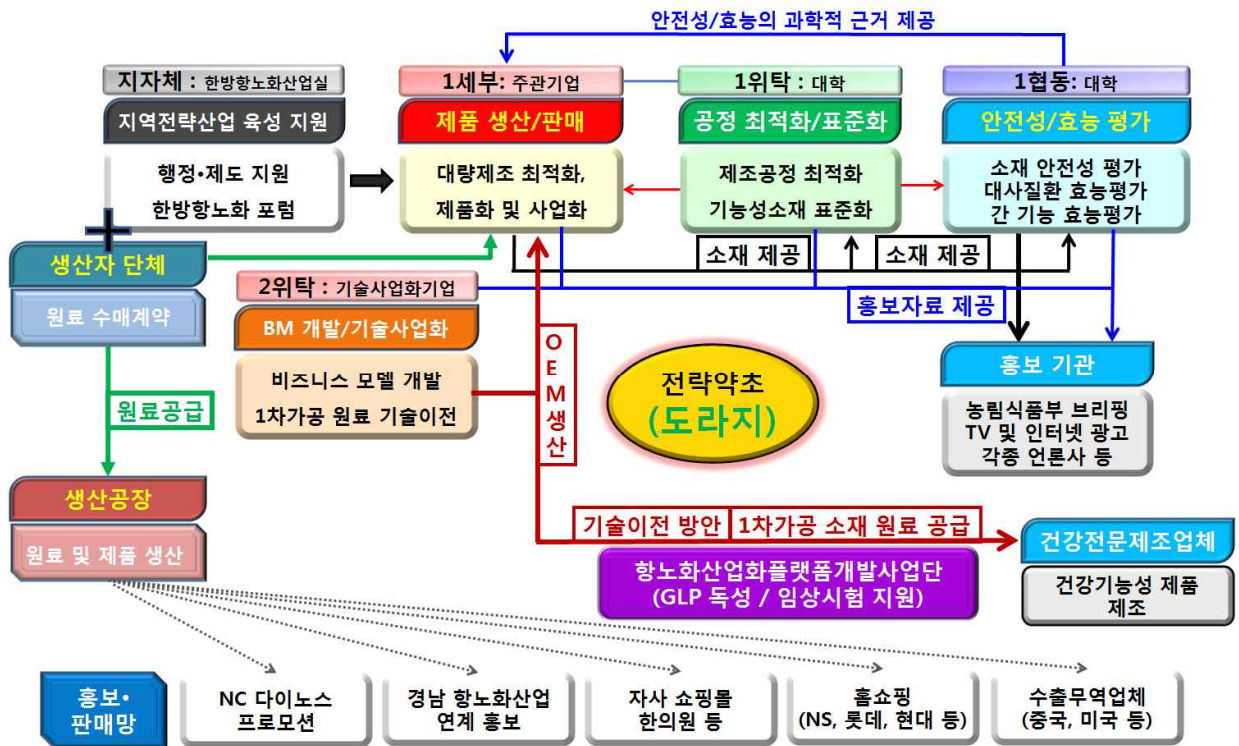


그림 3-1. 본 연구의 추진전략

나. 경남 전략약초 도라지의 산업화 추진전략

○ 활성도라지 기능성 소재 산업화 전략은 아래와 같음 (그림 3-2 & 3-3)

- 본 연구의 목표성과 달성을 위한 로드맵은 아래 그림 3-2와 같음

- 특히 활성도라지의 전임상시험을 통해 효능이 탁월할 경우 개별인정을 진행할 예정임



그림 3-2. 본 연구의 목표성과 달성을 위한 로드맵



그림 3-3. 본 연구의 참여기관 연계 방안 및 산업화 추진전략

○ 경남 전략약초 도라지 산업화 단계별 추진 전략 (그림 3-4)

■ 기존 도라지 제품과 차별화 계획

- 기존 도라지 제품의 경우 사탕, 침출주, 추출음료 및 도라지 절편 등으로 단순 1차 가공품 주를 이루고 있음
- 본 연구에서는 1차적으로 참여기업의 핵심기술을 이용하여 안전성이 확보되고 효능이

증진된 대환(공진단 형태) 제조 기술을 이용하여 수출전략 상품 개발을 필두로 발효도라지차, 활성도라지 제조 후 활성도라지 추출물과 발효기술 이용 활성도라지 발효물을 이용한 대사질 환/간 기능 개선 관련 건강기능식품을 개발하고자 함

- 1 단계 (생산·수매) : 산청-함양-거창-합천 도라지 수거 시스템 구축
  - 도라지 수거 시스템 구축과 수매 계약 (지차제 협의 및 참여기업 주도)
- 2 단계 (가공·추출·발효) : 제품화 및 효능 검증, 제품 양산 계획
  - 활용성 증대를 위한 활성도라지 제조 및 생산라인 이용 제품 생산
  - 활성도라지 기능성 소재 활용 제품의 공정 최적화 및 (시)제품 제조
  - 활성도라지 기능성 소재의 안전성 및 효능 평가
  - (시)제품의 소비자 반응 테스트
  - 1차 가공원료(추출물 혹은 발효물)의 대량생산 체계 및 원료 공급 체계 구축
  - 지적재산권 확보, 상표 디자인 및 등록
  - 개별인정형 원료 등록 : GLP 독성평가 및 임상시험 (항노화산업화플랫폼개발사업단 연계)
- 3 단계 (홍보·마케팅, 유통·판매, 문화·관광) : 도라지 기반 항노화-6차산업지구 육성
  - 제품의 마케팅, 홍보, 광고, 판매 전략 수립 및 지원
  - 오프라인 및 온라인 마켓 확대
  - 국내외 식품박람회 참가를 통한 제품 홍보, 광고, 마케팅 및 판매
  - 기존 판매점 및 대리점을 이용한 제품 판매, 신규 판매라인 개척
  - 도라지 기반 경남 항노화-6차산업 육성을 위한 비즈니스 모델 개발
  - 기존 도라지 산업 기반을 이용한 농촌체험, 관광 등의 상품 개발과 확장



그림 3-4. 활성도라지 기능성 소재 산업화 단계별 추진전략

○ 기술개발 전략 및 비즈니스 및 수익 모델

■ 지식재산권 확보 방안

• 도라지는 경남에 약 1,000톤 정도 생산되고 있어 원료 확보가 용이하며, 경남 전략산업  
가 일치하는 소재 임

• 또한 생물공정기술 이용 활성 강화 활성도라지 제조를 통한 지식재산권 확보 가능하고  
이로부터 파생되는 제품 역시 산업재산권 확보가 가능

• 활성도라지를 기초로 대사질환과 간 기능 개선 효과 규명을 통한 지식재산권을 확보도  
가능할 것으로 판단

■ 선행특허 회피 전략

• 복합 생물공정기술을 이용한 활성도라지 제조 기술과 안전성이 확보된 십전대보환(공지  
단 형태)의 등은 기존의 특허와 충분히 차별성이 있음

• 활성도라지 제조 기술 기반 제품 및 효능의 지식재산권 및 산업재산권은 확보 다양할  
것으로 판단되며, 이들의 기술이전을 통한 산업화가 바로 가능할 것으로 판단

■ 핵심기술

• 농산물 이용 고부가가치식품의 산업화에서 중요한 것은 **효능이 탁월한 원천 기능성 소  
재와 관련 기술력 및 기업의 잠재적인 역량(제품 생산능, 홍보·마케팅, 유통·판매망)**이 뒷받침 되  
어야 하고 여기에 **지자체의 강한 의지와 지역 전략산업 연계 시 시너지 효과를 거둘 수 있음**

• 본 경남 공통 전략약초 도라지의 경우 한국 등 아시아의 원산지로서 인삼과 비슷한 수  
준의 효능으로 고부가가치 소재로서 잠재성이 있음

■ 비즈니스/수익창출 모델

• 기존 참여기업에서 독점적인 기술력을 기초로 하여 비즈니스 및 수익창출 모델을 개발  
하는 것과 동시에 1차가공원료(추출물 혹은 발효물)

○ 활성도라지 기능성 소재 활용 제품 양산 계획

■ 활성도라지 원료 확보 및 추출물 원료 확보 방안

• 도라지 원료 수급 : 100톤/년/생체량 (지차제 협의 및 농가, 작목반 계약체결)

• 활성도라지로부터 대량추출물 확보를 위한 자체 추출 혹은 1차 원료가공업체와 계약체결

■ 제품은 참여기업 공장의 생산라인 및 제조 노하우를 바탕으로 상품화할 계획

• 제품 대량생산체계 구축과 품질관리

• 제품의 디자인 및 상품 등록을 수행

■ 개발된 공정을 기존 생산라인에 적용할 수 있는 대량공정화 확립

• Pilot 규모의 시 생산을 통해 공정이 대량화되면서 발생하는 문제점 파악

• 생산량의 대형화에 따라 품질안전성 확인

■ 완제품의 시 생산

• 농산물 원료를 이용한 완제품의 생산은 제품의 마케팅과도 밀접한 관계

• (주)자연애제약은 독점적인 약초 활용 제형화 기술(공지단 형태) 노하우를 보유

■ 제품 품질관리 시스템 구축

• 참여기업 부설연구소 신규 인력 채용 후 소재 제품의 품질관리 실시

• 유통기한 설정시험 : 제품의 생물학적, 이화학적 유통기한 설정시험

• 자체품질검사 및 필요 시 공인분석기관에 의뢰하여 유통기한 설정

■ 제품 디자인 및 상품 등록

• 마케팅 전략 수립을 통해 소비자에게 쉽게 다가갈 수 있도록 상품 디자인을 설계하고 다른 제품과 차별화함으로써 소비자의 감성과 신뢰성을 확보할 수 있는 상품을 등록

○ 판로 확보, 마케팅 및 상품화 계획

■ 국내 판로 및 마케팅

• 기존 참여기업의 1,000여점의 한의원, 자사 쇼핑몰의 기존 유통, 판매망을 활용함  
 • 인터넷, TV 광고, 홈쇼핑 등과 같은 새로운 채널화를 통해 농산물 건강제품의 우수성을 홍보하여 판매할 계획이며, 특히 홈쇼핑을 통해 초기 제품에 대한 홍보를 통해 판매할 계획임

■ 국외 판로 및 마케팅

• 현 미국 및 중국의 연결 무역업체와 연계하여 수출을 본격화할 것임

다. 기술정보수집 및 전문가 확보 방안

○ On-line 상 기술정보수집 : 연구를 위한 논문, 특허 등의 기존 연구자료 수집은 Pub-med, Science-direct, springer, kiss, NCBI 및 kripp 등에서 연구관련 자료들을 수집할 예정임

○ Off-line 상 기술정보수집 : 농림축산식품부, 농림수산식품기술기획평가원, 농촌진흥청, 중소기업청, 한국식품개발원, 한국식품공업협회, 한국농어촌공사, NTIS 등을 통해 지속적인 정보를 수집하여 연구동향에 파악하고 연구개발에 반영함

○ 전문가 확보 방안 : 본 연구팀은 주관기업과 기술사업화 기업, 경남 2개의 국립대학 및 산청군 향노화산업과를 비롯하여 산·학·관의 분야별 전문가로 구성되어 있어 특별한 자문은 필요하지 않으나, 산청 한방향노화포럼 및 경남향노화발전연구원 등을 통해 각 분야의 다양한 전문가를 교류하여 전략을 수립하고자 함

라. 다른 기관과의 협조방안 (그림 3-5)

○ 본 연구팀 소재인 경남 대표 향노화산업 소재이며, 또한 선행연구 및 연구실적을 확보하고 있어 본 지역의 미래주력산업으로 향노화산업 벨트를 조성으로 본 연구지원 이외에 향후 산업화를 위한 다양한 지원을 받을 수 있는 장점을 보유하고 있음

○ 한편 참여기업은 한의학 및 건강식품 전문업체로서 도라 기능성 소재 활용 제품의 산업화로 직결시킬 수 있는 장점을 보유하고 있음

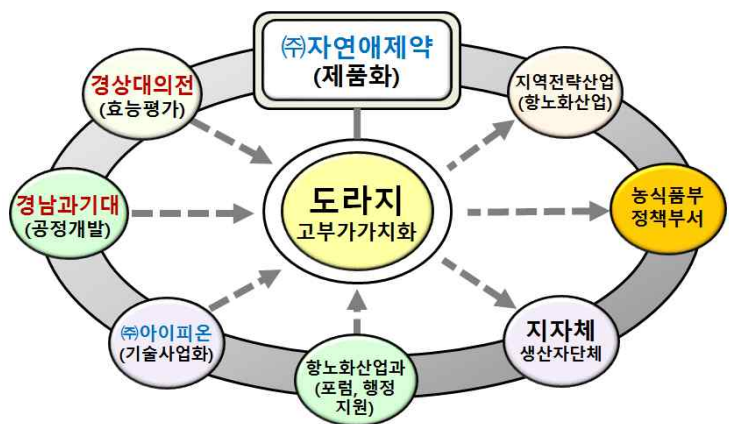


그림 3-5. 다른 기관과의 협조방안

## 2. 연구개발 추진체계

○ DDA 및 FTA 대응을 위하여 다양한 농업구조개선 정책들이 시행되었지만 농림수산업이 전체 GDP에서 차지하는 비중은 1980년 13.3%에서 2011년에는 2.7%로 급감하는 등 규모의 영세성, 생산성의 둔화, 농가소득구조의 취약성 등을 볼 때 더 이상 생산요소(토지, 노동, 자본) 투입의 효율화만을 가지고는 농업의 지속성이 유지될 수 없다는 위기감을 고조시키고 있음

○ 한편 본 연구는 FTA 발효와 친환경 농·축산물 수요 증가에 따른 범정부차원의 정책이 추진 중이며, ABS 나고야의정서(2010년)에 의한 한국 토종 생물유전자원의 중요성이 부각되는 시점에 따른 경남 향노화산업 전략약초 도라지 기능성 소재를 이용한 향노화(비만, 당뇨, 간 기능 개선 등) 관련 제품 개발로 경남 대표 약초 도라지에 대한 활용성을 극대화하고자하는 연구이기도 함

○ 본 연구팀은 새로운 부가가치 창출을 통한 도라지 기능성 소재의 산업화를 위하여 연차별 추진체계도는 아래 그림과 같음 (그림 3-6)

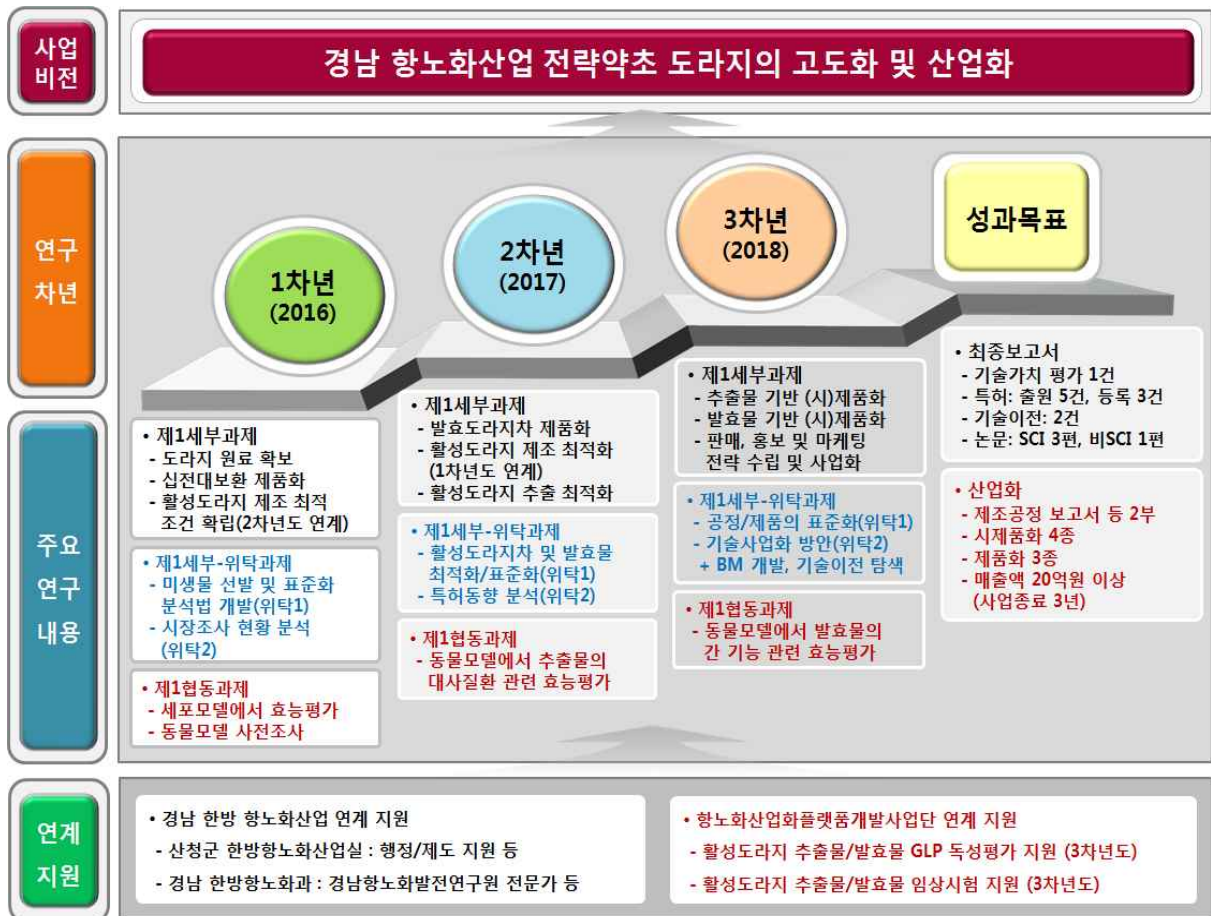


그림 3-6. 본 연구의 연차별 추진체계도

○ 한편 참여기관별 연계적 추진체계도는 아래 그림과 같음 (그림 3-7)

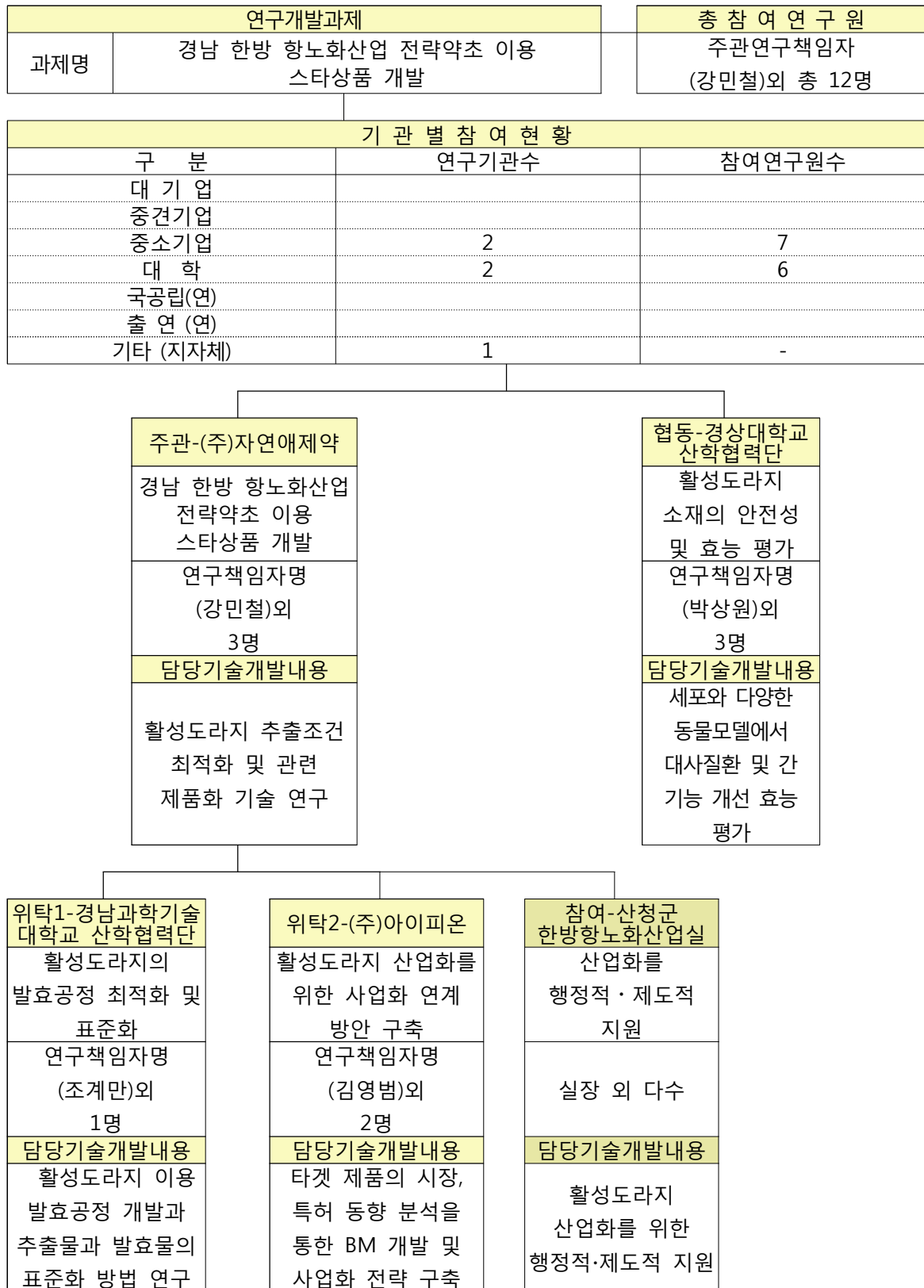


그림 3-7. 본 연구의 추진체계도



### 3. 연구개발 추진일정

#### 가. 1차년도 (2016.07.07. ~ 2016.12.31.)

일련번호	연구내용	월별 추진 일정												연구개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	과제 진행 협의													65,000	강민철 (자연애 제약)
2	십전대보환 개발 및 제품화														
3	활성도라지 제조 공정 개발														
4	십전대보환 수출 진행													-	산청군 행정지원
5	우수 발효 미생물 확보													18,000	조계만 (경남 과기대)
6	시장 조사 및 현황 분석													4,000	김영범 (아이피온)
7	세포독성 확인 및 용량 설정													33,000	박상원 (경상대)

#### 나. 2차년도 (2017.01.01. ~ 2017.12.31.)

일련번호	연구내용	추진 일정												연구개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	활성도라지 제조 공정 최적화													135,600	강민철 (자연애 제약)
2	활성도라지 추출물 제조 공정 표준화														
3	활성도라지 추출물 기반 시제품화														
4	발효도라지차 공정 최적화 및 제품화													38,400	조계만 (경남 과기대)
5	특허 동향 분석													14,000	김영범 (아이피온)
6	HFD 동물모델 지방간 개선 효능 평가													72,000	박상원 (경상대)
7	HFD 동물모델 대사질환 개선 분석														
8	홍보·판매 등 지원 (포럼, 세미나, 축제 등)													5,000	산청군 한방향노화실

다. 3차년도 (2018.01.01. ~ 2018.12.31.)

일련번호	연구내용	월별 추진 일정												연구개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	활성도라지 추출물 기반 제형화	■												140,600	강민철 (자연애제약)
2	활성도라지 발효물 기반 시제품화						■	■	■	■	■	■			
3	활성도라지 발효물 기반 시제품화						■	■	■	■	■	■			
4	개별인정형 원료 등록 검토(GLP 독성 및 임상시험)								■	■	■	■	■	-	항노화산업화 플랫폼개발사업단 연계
5	활성도라지 발효물 제조 공정 표준화	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	38,400	조계만 (경남과기대)
6	IP 기반 기술사업 및 상업화 전략 방안 모색		■	■	■	■	■			■	■	■	■	14,000	김영범 (아이피온)
7	동물모델(알코올성 간 손상) 간 기능 개선 효능 평가	■	■	■	■									72,000	박상원 (경상대)
8	동물모델(비알코올성 간 손상) 간 기능 개선 효능 평가				■	■	■	■	■						
9	활성도라지의 면역 혹은 항염증 효능평가							■	■	■	■	■	■		

## 제2절 경남 한방 향노화산업 전략약초 이용 스타상품 개발 [주관, 주식회사 자연애제약]

### 1-1. 1차년도 연구수행 방법

#### 가. 도라지와 기타 10가지 약재의 활성 검정 (*in vitro*)

(1) 재료 : 아래와 그림과 같이 십전대보환 제조에 필요한 도라지(길경)를 비롯하여 11가지 약재를 준비하였다.



그림. 본 실험에 사용한 십전대보환 재료 약재.

(2) 추출물 제조 : 건조 약재를 분쇄기로 분쇄하여 분쇄 시료 5 g을 칭량하고 여기에 10배의 80% 발효주정(50 ml)을 첨가한 후 300 rpm에서 12시간 추출하였다. 추출액을 여과하여 여과액을 얻은 후 여과액 일부는 0.45  $\mu\text{m}$  필터로 여과하여 총 페놀릭스 함량 및 총 플라보노이드 분석을 위한 검정 시료에 사용하였다. 나머지 여과액 모두를 감압농축기를 이용하여 농축한 후  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 하루 정도 동결한 후 동결건조기를 이용하여 건조분말을 얻고, 추출용매인 80% 발효주정을 녹여 0.5 및 1.0 mg/ml 농도로 제조하여 그 외 기능성의 분석 시료로 사용하였다.

#### (3) 총 phenolics, flavonoids 및 갈변물질 함량 :

(가) 총 phenolics : Folin-Denis법을 약간 변형하여 측정하였다. 추출물 0.5 mL를 시험관에 분주하고 25%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  용액 0.5 mL를 첨가하여 3분간 정치시켰다. 그 후 2 N Folin-Ciocalteu phenol 용액 0.25 mL 첨가 및 혼합한 다음  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 발색시켰다. 발색된 시료는 750 nm에서 분광광도계(Spectronic 2D)를 사용하여 흡광도를 측정하였고, gallic acid를 이용하여 작성한 표준 검량곡선으로부터 값을 산출하였다.

(나) 총 flavonoids : Davis변법(Davis, 1947)으로 측정하였다. 총 flavonoids 함량은 10배 희석한 추출물 0.5 mL를 시험관에 분주하고 diethylene glycol용액 1 mL, 1 N NaOH 0.01 mL를 첨가한 다음  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 방치하여 발색시킨 후 분광광도계(Spectronic 2D)를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 flavonoid 함량은 rutin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구한다.

(4) Phenolic acids 및 flavonols 함량 : Cho 등(2011)의 분석법을 변형하여 High Press Liquid Chromatogram(HPLC, Agilent 1200 series, Agilent Co., Forest Hill, Vic, Australia)로 분석하였다. 이동상 용매는 2.0% glacial acetic acid in water(solution A) 와 2.0% glacial acetic acid in acetonitrile(solution B)로 분석하였고, 이동상 조건은 solvent B 기준으로 각각 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 55 및 60 min 동안 15%, 5%, 15%, 5%, 10%, 50%, 50%, 60%, 80% 및 90%로 유지시켰다. 시료는 20  $\mu$ L를 주입하였고 이동상의 속도는 30°C에서 1 mL/min로 유지하였고 phenolic acids 물질은 diode array UV detector(Agilent 1200 series, Agilent Co.)의 흡광도 280 nm에서 정량하였고, flavonols 물질은 흡광도 270 nm에서 분석하였다.

(5) 라디칼 소거활성:

(가) DPPH : Hwang 등(2013)의 방법에 따라 측정하였다. 즉 DPPH 용액 0.8 mL와 농도별 추출물(0.25, 0.50, 및 1.00 mg/mL) 0.2 mL를 가해 암실에서 30분간 방치 후 분광광도계(Spectronic 2D)를 사용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(나) ABTS : Hwang 등(2013)의 방법과 동일하게 측정하였다. 2.45 mM  $K_2S_2O_8$  5 mL과 7 mM ABTS<sup>•+</sup> 5 mL를 혼합한 후 암실에서 16시간가량 방치시켜 ABTS 라디칼을 형성시킨 후 732 nm에서 대조구의 흡광도 값이  $0.7 \pm 0.02$ 가 되도록 조절한 ABTS 용액 0.9 mL과 농도별 추출물 0.1 mL를 첨가하여 3분간 정치 시켜 732 nm에서 분광광도계를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

(다) Hydroxyl( $\bullet$ OH) : 10 mM  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ -EDTA 0.2 mL, 10 mM 2-deoxyribose 0.2 mL, 10 mM  $H_2O_2$  0.2 mL 및 농도별 추출물 1.4 mL를 혼합하고 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 이 혼합액에 1% thiobarbituric acid와 2.8% trichloroacetic acid를 각각 1 mL를 가하여 100°C에서 20분간 가열하여 발색 및 냉각시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조구 실험은 시료 대신에 PBS 완충액(NaCl 8.76 g,  $NaH_2PO_4$  0.11 g,  $Na_2HPO_4$  0.596 g)을 사용하였고 라디칼 소거능은 시료용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도의 차이를 백분율(%)로 나타내었다(Shin 등, 2012).

(6) 소화효소 저해활성:

(가)  $\alpha$ -Glucosidase : 각 추출물 50  $\mu$ L,  $\alpha$ -glucosidase(0.5 U/mL) 효소용액 50  $\mu$ L, 200 mM 인산나트륨 완충용액(pH 6.8) 50  $\mu$ L를 혼합하여 37°C에서 10분간 예비반응 시켰다. 이 후 인산나트륨 완충용액(pH 6.8)에 녹인 *p*-NPG(5 mM) 100  $\mu$ L를 가하여 다시 37°C에서 10분 반응시켰다. 이 반응액에  $Na_2CO_3$ (100 mM) 0.75 mL를 가해 최종 반응을 정지시킨 후 420 nm에서 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

(나)  $\alpha$ -Amylase : 각 추출물 50  $\mu$ L를 시험관에 분주한 후  $\alpha$ -amylase(1.0 U/mL) 효소용액 50  $\mu$ L와 200 mM 인산나트륨 완충용액(pH 6.8) 50  $\mu$ L를 첨가하여 37°C에서 10분간 예비 반응을 시켰다. 이 반응액에 200 mM 인산나트륨 완충용액(pH 6.8)에 녹인 1% 전분용액을 0.25 mL를 가하여 다시 37°C에서 10분간 반응 시켰다. 이후에는 0.5 N-NaOH 및 30% 타르타르산나트륨칼륨을 용해한 48 mM DNS 시약을 0.25 mL 첨가하여 100°C에서 20분간 끓여 발색 및 냉각시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다(20).

(다) Pancreatic lipase : Kwon 등(21)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 추출물 50  $\mu$ L, lipase(1.0 U/mL) 효소용액 50  $\mu$ L, 및 200 mM 인산나트륨 완충용액(pH 6.8) 50  $\mu$ L를 혼합하여 37°C에서 10분간 예비 반응시켰다. 반응 후 인산나트륨 완충용액에 녹인 *p*-NPB(5 mM) 100  $\mu$ L를 가하여 동일하게 10분간 반응시킨 후 100 mM  $Na_2CO_3$  0.75 mL를 가해 반응을 종결시켜

420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 효소 저해능의 음성대조구는 시료 대신에 추출용매를 취하였으며 시료용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

**나. 십전대보환 제조**

(1) **십전대보환 제조** : 도라지 함유 고온숙성법을 이용한 십전대보환 제조를 위한 재료의 혼합비율과 제조공정도는 아래 표와 같았다. 즉, 고온숙성법은 도라지 분말과 그 외 10가지 재료 분말에 물과 벌꿀을 첨가하여 혼합하고 숙성 용기에 담아 80℃ 이상에서 10일간 정도 고온 숙성하여 고를 제조하고 이를 더 농축하여 대환 형태로 제형하고 포장하여 십전대보환 제품을 제조하였다.

(2) **일반성분** : 5대 영양성분, 지방산은 식품공전법 기준으로 분석하였다.

(3) **식품위해미생물** : 식품위해미생물 역시 식품공전법에 준하여 확인하였다.

(4) **경도와 기호성 평가** : 한달간 보관 환 시료의 경도는 물성기와 손과 입의 감각으로 측정하였으며, 향은 패널을 이용하여 측정하였다.

**표. 십전대보환 제조를 위한 혼합비율**

	일반환	고온숙성환
십전대보분말*	2,200 g	2,200 g
물	-	200 g
벌꿀	1,800 g	1,600 g
합계	4,000 g	4,000 g



\*십전대보분말 구성 : 도라지 200 g, 백복령 200 g, 백출 20 g, 숙지황 200 g, 백작약 200 g, 감초 200 g, 황기 200 g, 육계 200 g, 당귀 200 g, 천궁 200 g, 대추 200 g

(5) **추출물 제조** : 십전대보환(일반환과 고온숙성환)을 각각 동결건조한 후 분쇄기로 분쇄하여 분쇄 시료 5 g을 칭량하고 여기에 10배의 80% 발효주정(50 ml)을 첨가한 후 300 rpm에서 12시간 추출하였다. 추출액을 여과하여 여과액을 얻은 후 여과액 일부는 0.45 μm 필터로 여과하여 총 phenolics 및 총 flavonolids 분석을 위한 검정 시료에 사용하였다. 나머지 여과액 모두를 감압농축기를 이용하여 농축한 후 -70℃에서 하루 정도 동결한 후 동결건조기를 이용하여 건조분말을 얻고, 추출용매인 50% 에 발효주정을 녹여 0.25, 0.5 및 1.0 mg/ml 농도로 제조하여 그 외 기능성의 분석 시료로 사용하였다.

**(6) 총 phenolics, flavonoids 및 갈변물질 함량 :**

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

(나) 갈변물질 : 갈변물질의 함량은 비효소적 갈변도 측정 방법을 이용하였다. 그 여과액을 분광광도계(Spectronic 2D)를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(7) **Phenolic acids 및 flavonols 함량** : 상기에 기술된 바와 동일하게 수행하였다.

(8) **라디칼 소거활성과 소화효소 저해활성** : 상기에 기술된 바와 동일하게 수행하였다.

## 1-2. 1차년도 연구수행 결과

### 가. 도라지와 기타 10가지 약재의 활성 검정 (*in vitro*)

#### (1) 도라지와 기타 10가지 약재의 총 phenolics 및 총 flavonoids 함량

(가) 총 phenolics : 도라지(길경)과 기타 10가지 약재의 총 phenolics 함량은 숙지황이 4.29 mg/g으로 가장 높았고, 복령이 0.58 mg/g으로 가장 낮았다. 한편 도라지는 3.84 mg/g 있었고, 11가지 약재를 혼합 것은 4.01 mg/g 있었다(그림 1-1A).

(나) 총 flavonoids : 도라지(길경)과 기타 10가지 약재의 총 flavonoids 함량 역시 숙지황이 0.43 mg/g으로 가장 높았고, 복령이 0.01 mg/g으로 가장 낮았다. 한 편 도라지는 0.34 mg/g 있었고, 11가지 약재를 혼합 것은 0.37 mg/g 있었다(그림 1-1B).

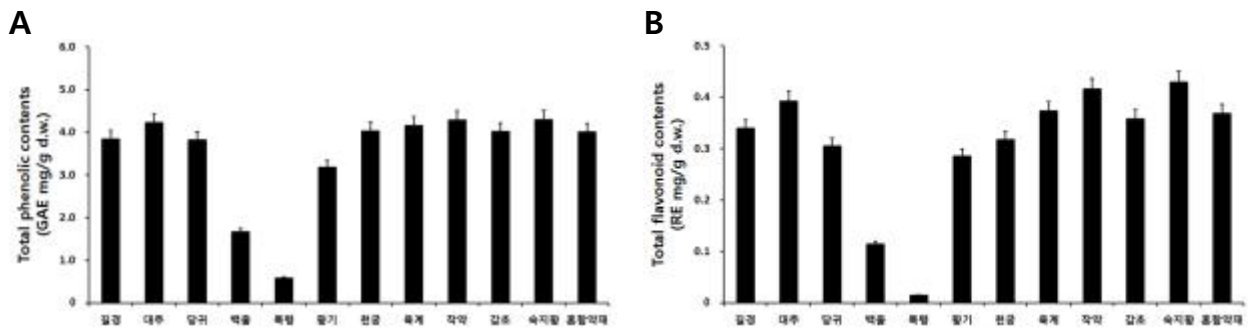


그림 1-1. 십전대보환 재료 약재의 총 phenolics 및 총 flavonoids 함량 비교.

A, 총 phenolics 함량 및 B, 총 flavonoids 함량.

#### (2) 도라지와 기타 10가지 약재의 phenolic acids 및 flavonols 화합물 함량

(가) Phenolic acids : 도라지(길경)과 기타 10가지 약재의 phenolic acids 화합물 분석 결과, 총 phenolic acids 화합물이 가장 높은 약재는 당귀 있었으며, 복령은 검출되지 않았다. 도라지는 5종의 화합물이 검출되었고 protocatechuic acid (59.48  $\mu$ g/g)와 *p*-coumaric acid (53.09  $\mu$ g/g) 주요 화합물 있었고, 대추는 4종의 화합물이 검출되었고 protocatechuic acid (163.6  $\mu$ g/g)와 ferulic acid (146.44  $\mu$ g/g) 주요 화합물 있었고, 당귀는 8종의 화합물이 검출되었고 protocatechuic acid (102.04  $\mu$ g/g)와 *p*-coumaric acid (130.24  $\mu$ g/g) 주요 화합물 있었고, 백출은 4종의 화합물이 검출되었고 *p*-coumaric acid (130.24  $\mu$ g/g) 주요 화합물 있었고, 황기는 6종의 화합물이 검출되었고 chlorogenic acid (79.97  $\mu$ g/g)와 *p*-hydrobenzoic acid (85.19  $\mu$ g/g) 주요 화합물 있었고, 천궁은 7종의 화합물이 검출되었고 protocatechuic acid (70.92  $\mu$ g/g)와 chlorogenic acid (102  $\mu$ g/g) 주요 화합물 있었고, 육계는 3종의 화합물이 검출되었고 protocatechuic acid (146.14  $\mu$ g/g)와 chlorogenic acid (117.2  $\mu$ g/g) 주요 화합물 있었고, 작약은 6종의 화합물이 검출되었고 protocatechuic acid (111.39  $\mu$ g/g)와 chlorogenic acid (109.34  $\mu$ g/g) 주요 화합물 있었고, 감초는 7종의 화합물이 검출되었고 protocatechuic acid (159.9  $\mu$ g/g)와 *p*-hydrobenzoic acid (132.53  $\mu$ g/g) 주요 화합물 있었고, 숙지황은 3종의 화합물이 검출되었고 protocatechuic acid (145.1  $\mu$ g/g)와 chlorogenic acid (107.28  $\mu$ g/g) 주요 화합물 있었고, 혼합약재는 5종의 화합물이 검출되었고 protocatechuic acid (101.49  $\mu$ g/g)와 chlorogenic acid (96.23  $\mu$ g/g) 주요 화합물 있었다(표 1-1 & 그림 1-2).

표 1-1. 십전대보환 재료 약재의 phenolic acids 및 flavonols 화합물 함량 비교

Contents ( $\mu\text{g/g}$ ) <sup>1)</sup>	십전대보환 재료 약재											
	길경	대추	당귀	백출	복령	황기	천궁	육계	작약	감초	숙지황	혼합약재
<b>Phenolic acids</b>												
Gallic acid	nd	99.73	15.12	13.35	nd	16.75	65.02	nd	52.39	nd	nd	nd
Protocatechuic acid	59.18	163.60	102.04	29.37	nd	10.10	70.92	146.14	111.39	159.90	145.10	101.49
Chlorogenic acid	nd	nd	45.18	nd	nd	79.97	102.0	117.20	109.34	nd	107.28	96.23
p-Hydrobenzoic acid	32.99	nd	27.31	nd	nd	85.19	16.77	nd	nd	132.53	nd	nd
Vanilic acid	nd	nd	21.83	nd	nd	16.84	nd	nd	12.95	16.79	nd	17.92
p-Coumaric acid	53.09	89.09	130.24	72.38	nd	nd	37.89	52.84	nd	66.71	nd	54.66
Ferulic acid	20.11	146.44	99.66	nd	nd	59.90	41.79	nd	48.31	55.68	56.24	nd
Vertaric acid	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	11.40	nd	nd
t-Cinnamic acid	26.29	nd	91.36	15.14	nd	nd	21.29	nd	25.78	55.14	nd	23.11
Total	191.66	498.86	532.74	130.24	0	268.75	355.68	316.18	360.16	498.15	308.62	293.41
<b>Flavonols</b>												
Epigallocatechin	33.06	nd	32.86	nd	nd	19.80	82.47	77.66	21.34	nd	31.95	49.63
Catechin	73.90	nd	24.20	52.25	nd	167.78	55.04	153.24	107.49	nd	110.67	50.74
Epicatechin	nd	nd	10.55	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Epigallocatechin gallate	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Vanilin	nd	nd	8.70	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Rutin	50.51	nd	nd	nd	nd	77.40	23.77	nd	128.36	nd	nd	51.57
Catechin gallate	nd	nd	28.38	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Quercetin	nd	nd	51.2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	30.39	nd	nd
Naringin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	90.23	nd	nd
Naringenin	nd	102.60	53.48	41.89	nd	53.36	49.50	nd	nd	nd	nd	47.26
Formonoetin	nd	nd	19.61	nd	nd	nd	32.27	nd	nd	27.66	nd	31.10
Total	157.47	102.6	228.98	94.14	0	318.34	243.05	230.9	257.19	148.28	142.62	230.3

<sup>1)</sup> Value indicated the mean's of three replication ( $n=3$ ).

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

(나) Flavonols : 도라지(길경)과 기타 10가지 약재의 flavonols 화합물 분석 결과, 총 flavonols 화합물이 가장 높은 약재는 황기 있었으며, 복령은 검출되지 않았다. 도라지는 3종의 화합물이 검출되었고 catechin (53.09  $\mu\text{g/g}$ ) 주요 화합물 있었고, 대추는 naringenin (102.61  $\mu\text{g/g}$ )의 화합물이 검출되었고, 당귀는 8종의 화합물이 검출되었고 quercetin (51.2  $\mu\text{g/g}$ )와 naringenin (53.48  $\mu\text{g/g}$ ) 주요 화합물 있었고, 백출은 2종의 화합물이 검출되었고 catechin (52.25  $\mu\text{g/g}$ ) 주요 화합물 있었고, 황기는 4종의 화합물이 검출되었고 catechin (117.78  $\mu\text{g/g}$ ) 주요 화합물 있었고, 천궁은 5종의 화합물이 검출되었고 epigallocatechin (82.47  $\mu\text{g/g}$ ) 주요 화합물 있었고, 육계는 2종의 화합물이 검출되었고 catechin (153.24  $\mu\text{g/g}$ ) 주요 화합물 있었고, 작약은 3종의 화합물이 검출되었고 catechin (107.49  $\mu\text{g/g}$ )와 rutin (128.36  $\mu\text{g/g}$ ) 주요 화합물 있었고, 감초는 3종의 화합물이 검출되었고 naringenin (90.23  $\mu\text{g/g}$ ) 주요 화합물 있었고, 숙지황은 2종의 화합물이 검출되었고 catechin (110.67  $\mu\text{g/g}$ ) 주요 화합물 있었고, 혼합약재는 5종의 화합물이 검출되었고 epigallocatechin 49.63  $\mu\text{g/g}$ , catechin 50.74  $\mu\text{g/g}$ , rutin 51.57  $\mu\text{g/g}$ , naringenin 47.26  $\mu\text{g/g}$ 과 formonoetin 31.1  $\mu\text{g/g}$  검출되었다(표 1-1 & 그림 1-2).

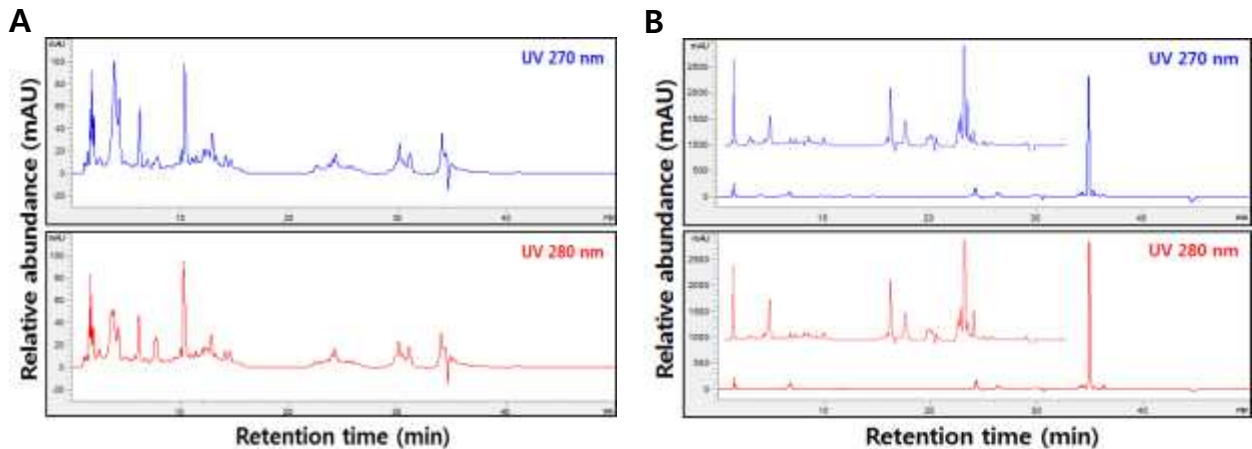


그림 1-2. Phenolic acids (280 nm) 및 flavonols (270 nm) 화합물의 HPLC 크로마토그램. A, 길경(도라지) 및 B, 혼합약재.

### (3) 도라지와 기타 10가지 약재의 라디칼 소거활성

(가) DPPH : 도라지(길경)과 기타 10가지 약재의 DPPH 라디칼 소거활성은 1 mg/ml 처리시 숙지황이 90.22%로 가장 높았고, 복령이 13.83%로 가장 낮았다. 한편 도라지는 72.77% 있었고, 11가지 약재를 혼합 것은 80.87% 있었다(그림 1-3A).

(나) ABTS : 도라지(길경)과 기타 10가지 약재의 ABTS 라디칼 소거활성은 0.25 mg/ml 처리시 숙지황이 34.12%로 가장 높았고, 복령이 4.44%로 가장 낮았다. 한편 도라지는 29.13% 있었고, 11가지 약재를 혼합 것은 30.65% 있었다(그림 1-3B).

(다) Hydroxyl : 도라지(길경)과 기타 10가지 약재의  $\bullet\text{OH}$  라디칼 소거활성은 1 mg/ml 처리시 대추가 73.55%로 가장 높았고 그 다음은 당귀가 65.69%, 숙지황이 61.48% 있었고, 복령이 12.8%로 가장 낮았다. 한편 도라지는 43.21% 있었고, 11가지 약재를 혼합 것은 53.56% 있었다(그림 1-3C).



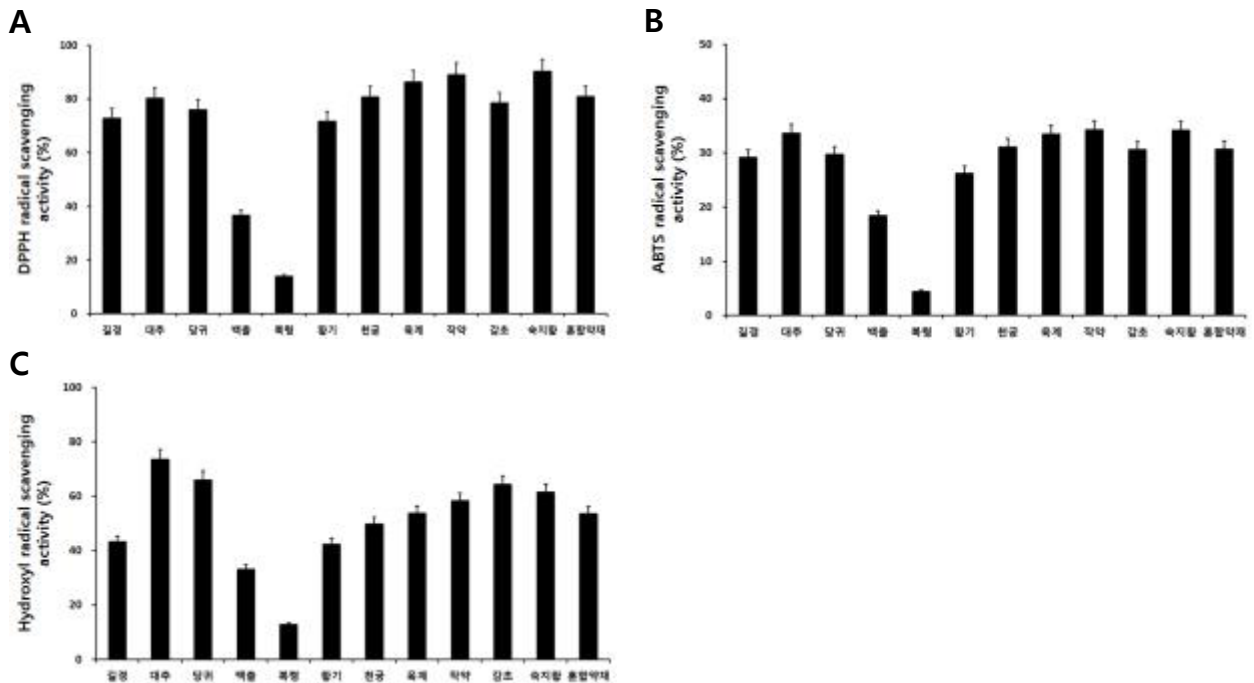


그림 1-3. 십전대보환 재료 약재의 라디칼 소거활성. A, DPPH 라디칼 소거활성; B, ABTS 라디칼 소거활성; 및 C, Hydroxyl 라디칼 소거활성.

#### (4) 도라지와 기타 10가지 약재의 소화효소 저해활성

(가)  $\alpha$ -Glucosidase : 도라지(길경)과 기타 10가지 약재의  $\alpha$ -glucosidase 저해활성은 1 mg/ml 처리시 대추가 40.12%로 가장 높았고 그 다음은 당귀가 65.69%, 감초가 36.56%, 작약이 35.11%, 숙지황이 34.12% 있었고, 복령이 5.66%로 가장 낮았다. 한편 도라지는 27.72% 있었고, 11가지 약재를 혼합 것은 30.91% 있었다(그림 1-4A).

(나)  $\alpha$ -Amylase : 도라지(길경)과 기타 10가지 약재의 DPPH 라디칼 소거활성은 1 mg/ml 처리시 대추가 21.55%로 가장 높았고, 복령이 0.21%로 가장 낮았다. 한편 도라지는 14.22% 있었고, 11가지 약재를 혼합 것은 15.22% 있었다(그림 1-4B).

(다) 췌장-lipase : 도라지(길경)과 기타 10가지 약재의 DPPH 라디칼 소거활성은 1 mg/ml 처리시 대추가 19.55%로 가장 높았고, 복령이 1.55%로 가장 낮았다. 한편 도라지는 13.39% 있었고, 11가지 약재를 혼합 것은 14.9% 있었다(그림 1-4C).

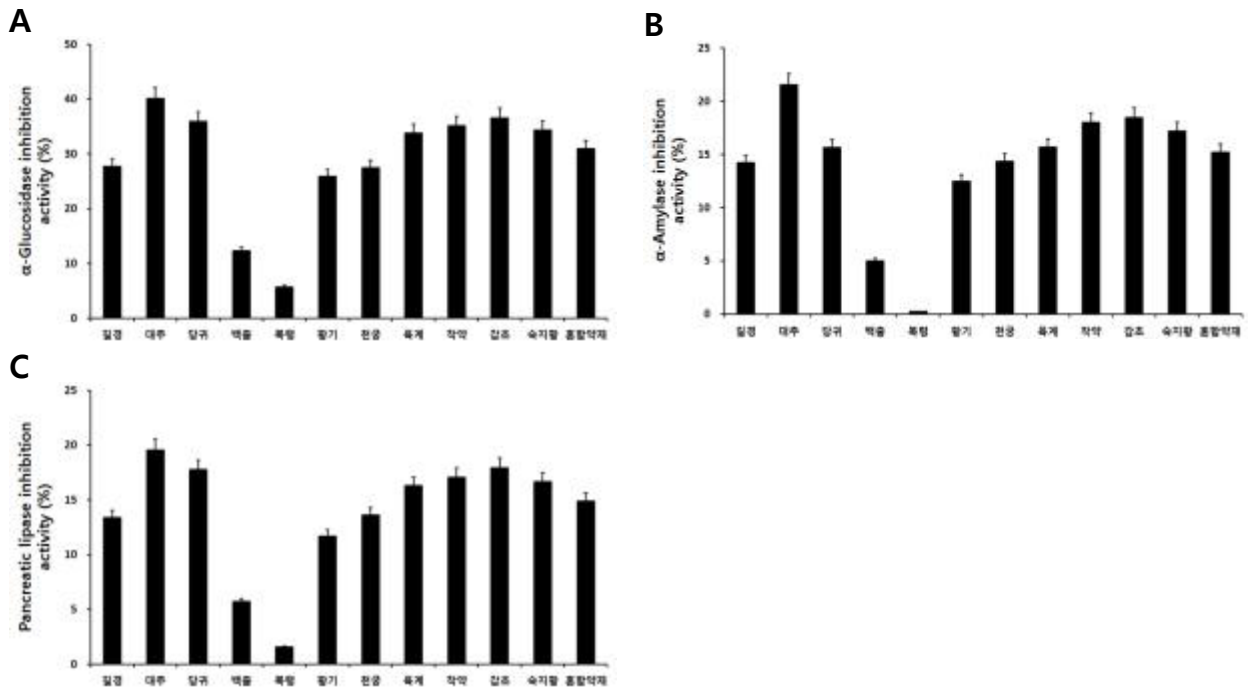


그림 1-4. 십전대보환 재료 약재의 소화효소 저해활성. A,  $\alpha$ -glucosidase 저해활성; B,  $\alpha$ -amylase 저해활성; 및 C, 췌장-lipase 저해활성.

## 나. 십전대보환 제조 및 제품화

### (1) 십전대보환의 일반성분 및 식품위해미생물

(가) 5대 영양성분 : 일반환과 고온숙성환의 5대 영양성분 분석 결과, 일반환은 수분이 18.6 g/100 g, 조회분 1.7 g/100 g, 조지방 1.0 g/100 g, 조단백질 4.8 g/100 g 및 탄수화물 73.9 g/100 g 있었으며, 고온숙성환은 수분이 23.4 g/100 g, 조회분 1.4 g/100 g, 조지방 0.6 g/100 g, 조단백질 4.4 g/100 g 및 탄수화물 70.2 g/100 g 있었다(표 1-2).

표 1-2. 십전대보환의 5대 영양성분 비교

Contents <sup>1)</sup> (g/100 g)	십전대보환	
	일반환	고온숙성환
Moisture	18.6±1.02	23.4±1.19
Crude ash	1.7±0.04	1.4±0.02
Crude fat	1.0±0.02	0.6±0.00
Crude protein	4.8±0.03	4.4±0.02
Carbohydrate	73.9±3.23	70.2±2.78

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

(나) 지방산 : 일반환과 고온숙성환의 지방산 조성 분석 결과, 일반환은 3 종의 지방산이 검출되었고, 고온숙성환은 7 종의 지방산이 검출되었다. 한편 일반환은 palmitic acid 13.6 mg/100 g, oleic acid 40.4 g/100 g 및 linoleic acid 24.8 mg/100 g 있었으며, 고온숙성환은 palmitic acid 13.6 mg/100 g, stearic acid 2 mg/100 g, behenic acid 0.8 mg/100 g, oleic acid

6.6 g/100 g, linoleic acid 24.8 mg/100 g,  $\alpha$ -linolenic acid 1.9 mg/100 g 및 DHA 3.1 mg/100 g 있었다(표 1-3).

표 1-3. 십전대보환의 지방산 조성 비교

Fatty acid contents <sup>1)</sup> (mg/100 g)	십전대보환	
	일반환	고온숙성환
<b>Unsaturated fatty acids</b>		
C16:0 Palmitic acid	13.6±1.22	11.8±0.78
C18:0 Stearic acid	nd	2.0±0.04
C22:0 Behenic acid	nd	0.8±0.00
<b>Saturated fatty acids</b>		
C18:1n9c Oleic acid	40.4±2.67	6.6±0.54
C18:2n6c Linoleic acid	24.8±1.89	40.6±2.71
C18:3n3 $\alpha$ -Linolenic acid	nd	1.9±0.03
C22:6n3 Docosahexaenoic acid	nd	3.1±0.15
<b>Total fatty acids</b>	<b>78.8</b>	<b>66.8</b>

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

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

(다) 식품위해미생물 : 일반환과 고온숙성환의 식품위해미생물을 조사한 결과, 일반환의 경우 총 균수는 3.38 log cfu/g, 총 효모수는 1.22 log cfu/g, 바실러스 세레우스는 1.6 log cfu/g 있었고, 대장균, 살모넬라, 황색포도상구균 및 리스테리아는 검출되지 않았다. 한편 고온숙성환의 경우 총 균수는 1.07 log cfu/g 있었으며, 나머지는 검출되지 않았다(표 1-4).

표 1-4. 십전대보환의 식품위생미생물 비교

Viable cell numbers <sup>1)</sup> (log cfu/g)	십전대보환	
	일반환	고온숙성환
Total viable cells	3.38±0.15	1.07±0.05
Total yeast cells	1.22±0.10	nd <sup>2)</sup>
<i>Eschenichia coli</i>	nd	nd
<i>Salmonella</i> sp.	nd	nd
<i>Staphylococcus aureus</i>	nd	nd
<i>Listeria monocytogenes</i>	nd	nd
<i>Bacillus cereus</i>	1.60±0.08	nd

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

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

(라) 보관 기간 : 일반환과 고온숙성환을 제조하여 냉장실에서 1개월 보관한 후 경도, 맛과 향을 평가하였다.

(마) 경도 측정 : 경도 측정은 물성기(TAXT express 20140, Stable Micro Systems, UK) 및 손과 입의 감각 두 가지 방법을 통하여 측정하였다. 기계적 경도는 물성기를 이용하여 십전대보환의 경도 정도를 측정하였고, 또 하나의 방법은 기호성 평가를 실시 동일한 패널을 이용하

여 손과 입의 씹힘 정도를 측정된 결과, 고온숙성법으로 고를 제조한 후 환으로 제조한다.

(바) 맛과 향 측정 : 일반환의 경우 육계의 매운맛과 한약재 특유의 향이 많이 났고, 고온숙성환의 경우 육계의 매운맛이 거의 없었으며, 한약재 냄새 역시 많이 감소된 것으로 평가되었다(표 1-5).

표 1-5. 십전대보환의 정도, 맛과 향 비교

측정 항목	십전대보환	
	일반환	고온숙성환
<b>경도</b>		
기계적 물성기 이용 정도 측정값	1,000 이상	243
손 감각과 입의 씹힘 정도	아주 딱딱함, 돌 정도로 아주 딱딱하여 입에 씹지 못함	부드러움, 말랑말랑한 젤리보다는 딱딱하지만 상당히 부드러우며 입에 충분히 씹힘
<b>맛</b>	아주 매운맛 즉, 육계 맛이 많아 먹기에 불편	육계의 매운맛이 거의 없어지고 맛이 한층 부드러워짐
<b>향</b>	한약재 냄새가 많이 남	한약재 냄새가 많이 감소함

(3) 십전대보환의 총 phenolics, 총 flavonoids 및 갈변물질 함량

(가) 총 phenolics : 일반환과 고온숙성환의 총 phenolics 함량은 그림 1-5A와 같았다. 일반환은 1.56 mg/g 있었고, 고온숙성환은 2.21 mg/g 있었다.

(나) 총 flavonoids : 일반환과 고온숙성환의 총 phenolics 함량 분석 결과, 일반환은 0.16 mg/g 있었고, 고온숙성환은 0.23 mg/g 있었다(그림 1-5B).

(다) 갈변물질 : 일반환과 고온숙성환의 총 phenolics 함량은 그림 1-5C와 같았다. 일반환은 3.31 있었고, 고온숙성환은 4.04 있었다.

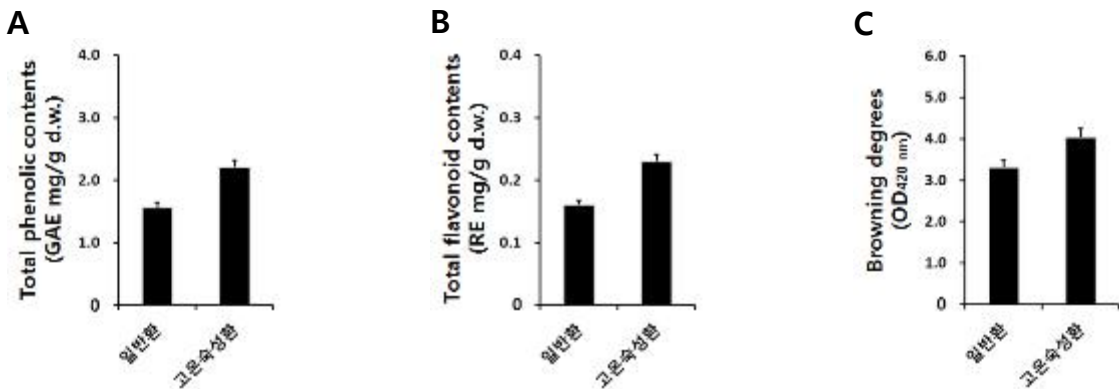


그림 1-5. 십전대보환의 총 phenolics, 총 flavonoids 및 갈변물질 함량 비교.

A, 총 phenolics 함량; B, 총 flavonoids 함량 및 C, 갈변물질 함량.

(4) 십전대보환의 phenolic acids 및 flavonols 화합물 함량

(가) Phenolic acids : 일반환과 고온숙성환의 phenolic acids 화합물 분석 결과, 총 phenolic acids 화합물은 고온숙성법으로 제조한 환이 높았다. 일반환의 경우 6종의 화합물이 검출되었고, gallic acid 53.54 μg/g, protocatechuic acid 66.22 μg/g, chlorogenic acid 23.09 μg/g,

*p*-hydrobenzoic acid 1.38  $\mu\text{g/g}$ , ferulic acid 49.88  $\mu\text{g/g}$ , vetaric acid 58.78 및 *t*-cinnamic acid 19.14  $\mu\text{g/g}$ 이 검출되었고, 고온숙성환의 경우 6종의 화합물이 검출되었고, gallic acid 29.55  $\mu\text{g/g}$ , protocatechuic acid 98.92  $\mu\text{g/g}$ , chlorogenic acid 108.08  $\mu\text{g/g}$ , *p*-coumaric acid 2.33  $\mu\text{g/g}$ , ferulic acid 19.41  $\mu\text{g/g}$ , vetaric acid 17.58 및 *t*-cinnamic acid 27.44  $\mu\text{g/g}$ 이 검출되었다(표 1-6 & 그림 1-6).

(나) Flavonols : 일반환과 고온숙성환의 flavonols 화합물 분석 결과, 총 flavonols 화합물은 고온숙성법으로 제조한 환이 높았다. 복령은 검출되지 않았다. 일반환의 경우 8종의 화합물이 검출되었고 catechin (63.27  $\mu\text{g/g}$ ), epicatechin (60.66  $\mu\text{g/g}$ ) 및 quercetin (90.9  $\mu\text{g/g}$ )이 주요 화합물 있었고, 고온숙성환의 경우 10종의 화합물이 검출되었고 catechin (75.77  $\mu\text{g/g}$ ), epicatechin (66.96  $\mu\text{g/g}$ ) 및 quercetin (84.83  $\mu\text{g/g}$ )이 주요 화합물 있었다(표 1-6 & 그림 1-6).

**표 1-6.** 십전대보환의 henolic acids 및 flavonols 화합물 함량 비교

Contents <sup>1)</sup> ( $\mu\text{g/g}$ )	십전대보환	
	일반환	고온숙성환
<b>Phenolic acids</b>		
Gallic acid	53.54	29.55
Protocatechuic acid	66.22	98.92
Chlorogenic acid	23.09	108.08
<i>p</i> -Hydrobenzoic acid	1.38	nd
Vanilic acid	nd	nd
<i>p</i> -Coumaric acid	nd	2.33
Ferulic acid	49.88	19.41
Vertaric acid	58.78	17.58
<i>t</i> -Cinnamic acid	19.14	27.44
Total	272.03	303.31
<b>Flavonols</b>		
Epigallocatechin	10.18	18.82
Catechin	63.27	75.77
Epicatechin	60.66	66.96
Epigallocatechin gallate	22.92	39.0
Vanilin	nd	nd
Rutin	3.26	24.46
Catechin gallate	39.41	48.03
Quercetin	90.9	84.83
Naringin	nd	1.21
Naringenin	nd	2.99
Formonoetin	20.11	10.51
Total	310.71	372.58

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

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

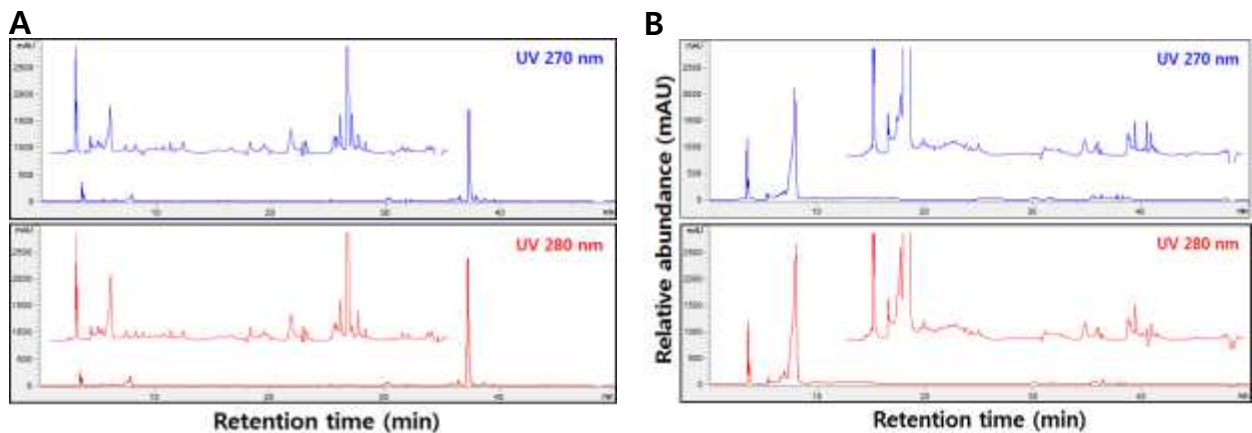


그림 1-6. Phenolic acids (280 nm) 및 flavonols (270 nm) 화합물의 HPLC 크로마토그램. A, 일반환 및 B, 고온숙성환.

### (5) 십전대보환의 항산화 활성

(가) DPPH : 일반환과 고온숙성환의 DPPH 라디칼 소거활성을 살펴본 결과, 농도 의존적으로 활성은 증가하였고 일반환보다는 고온숙성환이 높았다. 한편 1 mg/ml 처리 시 일반환 환의 경우 68.64% 있었으나, 고온숙성환의 경우 85.65%로 활성이 높았다(그림 1-7A).

(나) ABTS : 일반환과 고온숙성환의 ABTS 라디칼 소거활성을 살펴본 결과, 일반환보다는 고온숙성환이 라디칼 소거활성이 더 높았다. 한편 1 mg/ml 처리 시 일반환 환의 경우 70.76% 있었으나, 고온숙성환의 경우 89.93%를 나타내었다(그림 1-7B).

(다) Hydroxyl : 일반환과 고온숙성환의  $\bullet\text{OH}$  라디칼 소거활성을 살펴본 결과, 농도 의존적으로 활성은 증가하였고 일반환보다는 고온숙성환이 높았다. 한편 1 mg/ml 처리 시 일반환 환의 경우 48.04% 있었으나, 고온숙성환의 경우 63.69%로 활성이 높았다(그림 1-7C).

### (6) 십전대보환의 소화효소 저해활성

(가)  $\alpha$ -Glucosidase : 일반환과 고온숙성환의  $\alpha$ -glucosidase 저해활성은 그림 1-8A와 같았고, 일반환보다는 고온숙성환이 저해활성이 더 높았다. 한편 1 mg/ml 처리 시 일반환 환의 경우 22.05% 있었으나, 고온숙성환의 경우 61.06%를 나타내었다

(나)  $\alpha$ -Amylase : 일반환과 고온숙성환의  $\alpha$ -amylase 저해활성을 살펴본 결과, 농도 의존적으로 활성은 증가하였고 일반환보다는 고온숙성환이 높았다. 한편 1 mg/ml 처리 시 일반환 환의 경우 15.05% 있었으나, 고온숙성환의 경우 34.21%로 활성이 높았다(그림 1-8B).

(다) 췌장-lipase : 일반환과 고온숙성환의 췌장-lipase 저해활성을 살펴본 결과, 농도 의존적으로 활성은 증가하였고 일반환보다는 고온숙성환이 높았다. 한편 1 mg/ml 처리 시 일반환 환의 경우 48.14% 있었으나, 고온숙성환의 경우 64.89%로 활성이 높았다(그림 1-8C).

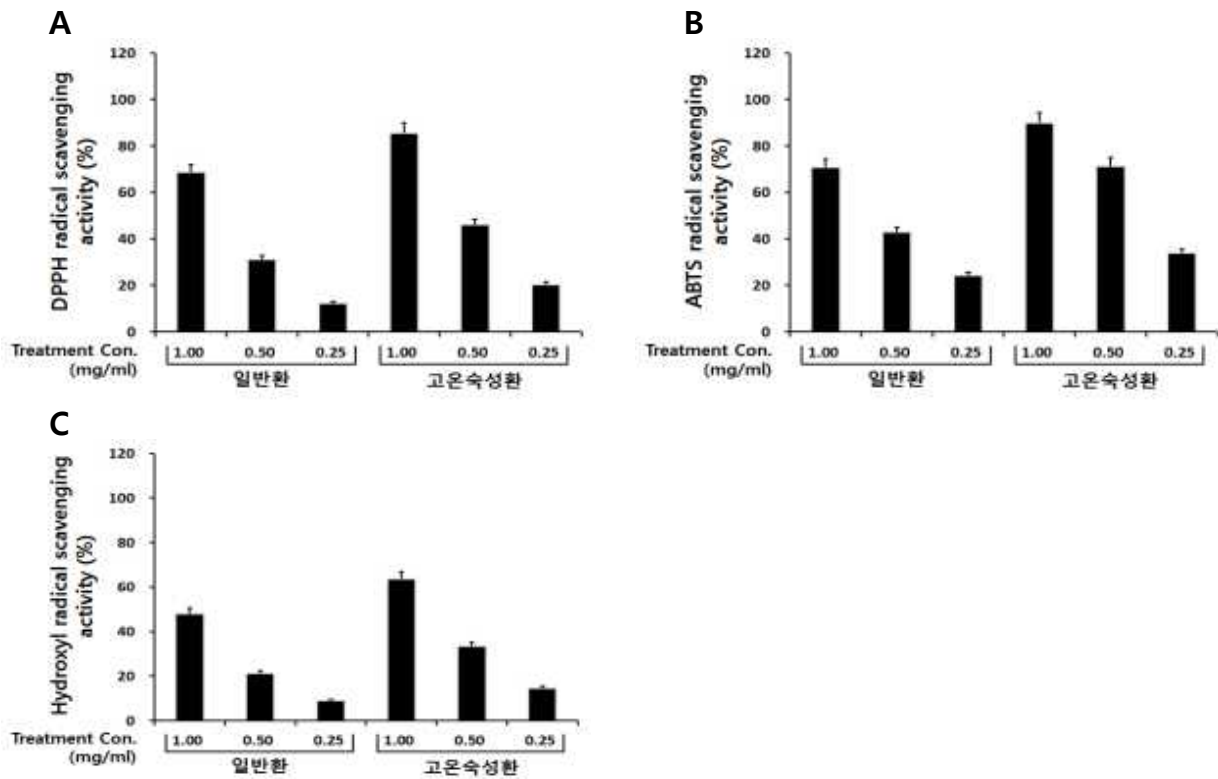


그림 1-7. 십전대보환의 라디칼 소거활성 비교. A, DPPH 라디칼 소거활성; B, ABTS 라디칼 소거활성; 및 C, Hydroxyl 라디칼 소거활성.

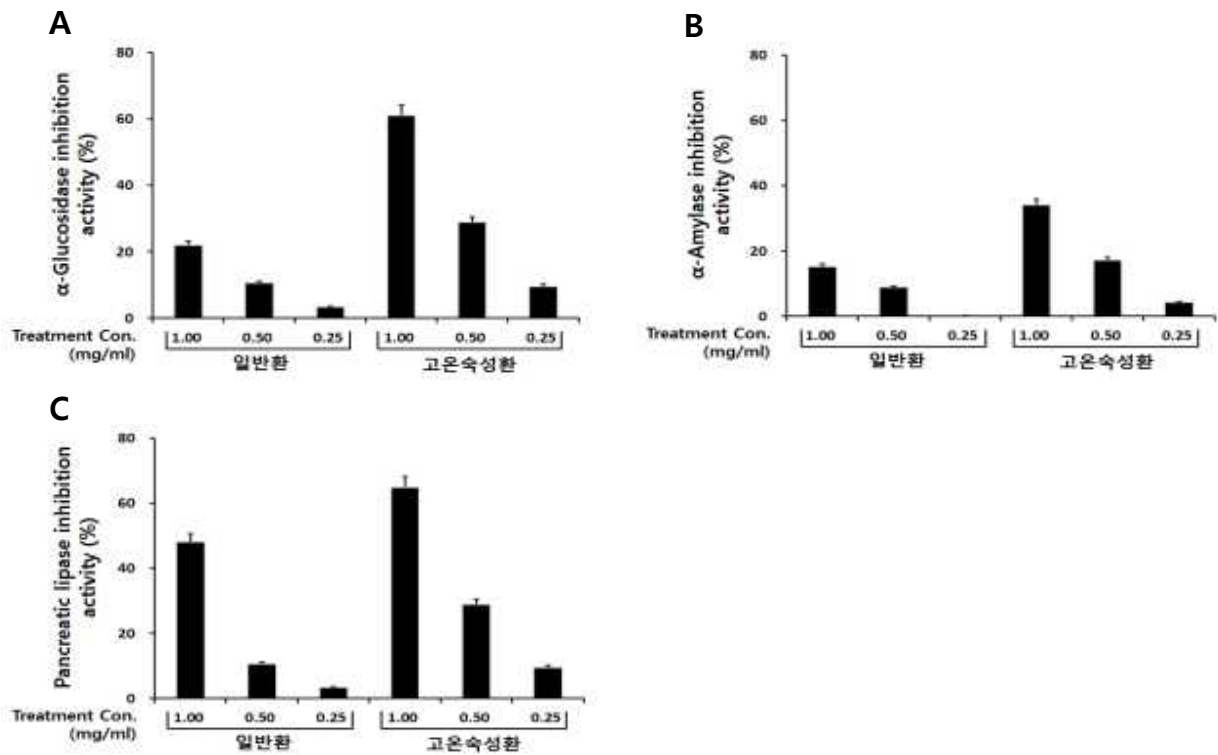


그림 1-8. 십전대보환의 소화효소 저해활성. A,  $\alpha$ -glucosidase 저해활성; B,  $\alpha$ -amylase 저해활성; 및 C, 췌장-lipase 저해활성.

(7) **십전대보환 제품화** : 한의원 납품용 : 현재 상기의 고온숙성법을 이용하여 도라지 함유 십전대보환을 제품화 한의원에 납품 중으로 한의원 공급용으로 십전대보환이 명칭을 그대로 사용하였으나, 차년도 식품가공품으로 제조 허가시에는 명칭 변경하고 영양성분의 분석을 통하여 관할 군청에 품목제조신고 후 판매할 예정임(그림 1-9).



**도라지 함유 십전대보환 10환 제품**

**도라지 함유 십전대보환 30환 제품**

Fig. 1-9. 도라지 함유 십전대보환 제품 : 한의원 납품용.

## 2-1. 2차년도 연구수행 방법

### 가. 소규모 제조의 숙성(혹)도라지 제조 및 추출조건 확립

(1) **숙성(활성)도라지 제조** : 도라지는 산청군에서 생산된 1년 이상의 생도라지를 구입하여 사용하였다. 도라지를 흐르는 물에 3회 세척한 후 물기를 제거하고 100℃에서 30~60분에 증자한 후 70~80℃에서 10일간 숙성하여 건조하여 숙성(활성)도라지를 제조하였고, 이를 분쇄기로 분쇄하여 분말로 준비하여 실험을 진행하였다(그림 2-1).



Fig. 2-1. 고온숙성법 이용 활성도라지의 제조 과정.



(2) pH, 산도 및 환원당 : pH 측정은 각각의 분말 1 g에 증류수 10 ml를 첨가하여 분산시킨 후 pH meter(S20 SevenEasy™, Mettler Toledo, Co., Korea)로 측정하였다. 산도 측정은 분말 1 g에 증류수 50 ml를 첨가 및 용해하고 여기에 1% phenolphthalein 시약을 2방울 첨가한 후 선홍색으로 변할때까지 0.1 N-NaOH 용액을 소비하여 소비 ml 수를 구하여 젖산(lactic acid)양으로 총산도를 환산하였다. 환원당 측정은 Miller의 DNS법(Miller, 1959)을 이용하여 분석하였다. 3,5-Dinitrosalicylic acid 0.5 g과 potassium sodium tartrate 150 g을 2N-NaOH 100 mL에 녹인 후, 증류수로 500 mL을 정용하여 A 용액을 제조하고 phenol 5 mL을 10% NaOH 용액에 녹인 후 증류수를 첨가해 50 mL을 정용 하였다. 이 용액 35 ml에 NaHSO<sub>3</sub> 3.5 g을 녹여 B 용액을 제조하여 A 용액과 B 용액을 혼합한 것을 사용하여 측정하였다. 각각의 분말 1 g에 증류수 10 ml를 첨가 및 혼합하여 일부(0.1 ml)를 시험관에 분주한 후 DNS 시약 1 ml 첨가 후 100°C에서 10분간 발색시켰다. 발색된 반응물은 냉각 후 분광광도계를 사용하여 570 nm에 측정하여 표준 검량곡선과 비교 산출하여 측정하였다. 표준 검량곡선은 glucose를 표준물질로 사용하였다.

(2) 5대 영양성분 : 5대 영양성분 분석은 식품공전법(KFDA, 2010)에 따라 시행하였다. 수분과 회분 함량은 각각 상압가열건조법과 건열회화법으로 측정하였고 조지방과 조단백 함량은 속실렛과 마이크로켈달법으로 측정하였다. 탄수화물 함량은 100에서 상기 각 성분 합의 뺀 값을 %로 표시하였다.

(3) 지방산 : 지방산 전처리는 각각의 시료 1 g에 0.5 N 메탄올성 NaOH 3 ml를 가하고 100°C에서 10분간 가열하였다. 가열 후 삼불화붕소(BF<sub>3</sub>) 2 ml를 첨가 및 혼합하고 30분간 다시 100°C에서 가열시켜 지방산 메틸레이션 과정을 수행하였다. 반응이 끝난 후에는 이소옥탄 1 ml를 첨가하고 격렬히 흔든 후 방치시켜 분리된 상등액을 무수아황산과 함께 탈수시키고 0.45 µm 필터로 여과한 여액을 gaschromatography(GC, Agilent 5890 series, Agilent Co., Forest Hill, Vic, Australia)로 분석하였다.

(4) 유리 아미노산 : 숙성(혹)도라지 건조 분말 100 mg에 HPLC water 5 ml를 가하여 60°C에서 1시간 가수분해 과정을 실시하였다. 이후 10% 5-sulfosalicylic acid 1 ml를 첨가하고 4°C에서 2시간 방치시켜 단백질을 침전시켰다. 이후 3,000 rpm 속도에서 5분간 원심분리 하여 얻은 상등액을 0.45 µm 필터로 여과하고 이 여과액을 60°C에서 감압 농축을 실시하였다. 감압 농축 후 lithium buffer(pH 2.2) 2 ml를 첨가 및 용해하고 다시 한번 0.45 µm 필터로 여과시킨 것을 자동아미노산 분석기(L-8900, Hitachi, Japan)로 정량 분석하였다.

(5) 추출물 제조 : 숙성도라지 추출 분말 제조는 주정 농도와 추출 온도를 각기 다르게 설정한 후 추출하여 추출 분말을 제조하였다. 즉, 건조 숙성도라지 분말 50 g에 각 주정 농도별 (0, 30, 50, 70, 95%) 20배(2 L)를 가수한 후 추출 온도(30와 70°C)를 달리하여 4시간 추출한 후 여과하는 과정을 2회 반복하여 추출물을 획득하고 60°C에서 감압 농축하여 동결시킨 후 동결 건조를 통해 최종적으로 추출 분말을 제조하였다. 이 추출 분말에 대해 상기 기술된 바와 동일하게 농도별 추출 용매를 사용하여 최종 농도가 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 및 10 mg/ml으로 녹여 여과한 후 실험에 사용하였다.

#### (6) 총 phenolics, flavonoids 및 갈변물질 함량 :

(가) 총 phenolics : 총 페놀릭스 측정은 Folin-Denis법으로 측정하였다. 장백도라지 원료 및 숙성(혹)도라지 추출물을 각각의 시험관에 0.5 ml씩 분주하고 여기에 25% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 0.5 ml

첨가 후 3분간 정치시켰다. 3분 반응 후 2 N Folin-Ciocalteu phenol 용액 0.25 ml를 첨가 및 혼합하고 30°C에서 1시간 발색시켰다. 발색된 시료는 13,500 rpm의 속도로 3분간 원심분리하여 상등액만을 750 nm에서 분광광도계(UV-1800, 240 V, Shimadzu, Japan)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 이때 총 페놀릭스 함량은 gallic acid를 이용하여 작성한 표준 검량곡선으로부터 값을 산출하였다.

(나) 총 flavonoids : 총 플라보노이드 측정은 Davis변법(Davis, 1947)으로 측정하였다. 즉 장백도라지 원료와 숙성(혹)도라지 각각의 추출물 0.5 ml를 시험관에 분주하고 diethylene glycol 시약 1 ml와 함께 1 N NaOH 0.01 mL를 첨가한 다음 37°C의 수욕상에서 1시간 동안 방치하여 반응을 일으킨 후 분광광도계를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 표준 검량곡선은 rutin을 이용하여 값을 산출하였다.

(다) 갈변물질 함량 : 갈변물질 함량 측정은 각각의 건조 분말 1 g에 10배수의 증류수를 첨가하여 4시간 상온에서 추출한 후 0.45  $\mu$ m 필터로 여과한 여과액을 420 nm에서 흡광도 값을 측정하여 나타내었다.

#### (7) Triterpenoides, Phenolic acids 및 flavonols 함량 : (제1세부-위탁1과제 협조)

(가) Triterpenoides 함량 : Triterpenoid 함량 분석은 전처리의 경우 건강기능식품분석법의 인삼 진세노사이드 분석 조건을 변형하여 HPLC를 이용하여 실시하였다. 즉, 전처리의 경우 각각의 분말 1 g을 250 ml 환류용 플라스크에 칭량하고 70% 메탄올 50 ml를 가하여 80°C 수욕상에서 1시간 환류 및 냉각 후 나머지 잔사에 대해 1회 더 반복 실시하여 추출물을 제조하였다. 제조된 추출물을 환저 플라스크에 옮겨 닦고 60°C에서 감압 농축하고 농축물에 증류수 2 ml를 첨가 및 용해시켜 . 0.45  $\mu$ m 멤브레인 필터로 여과한 것을 시험용액으로 사용하였다. 제조된 시험용액은 C18(TSKgel ODS 100-z) 칼럼이 장착된 High Performance Liquid Chromatography(HPLC, Agilent 1200 series, Agilent Co., Forest Hill, Vic, Australia)로 분석하였다. 이동상 용매는 HPLC water(solution A)와 acetonitrile(solution B)을 사용하였으며 이동상 조건은 A 용액 기준으로 각각 10, 15, 40, 42, 75, 80, 90, 100, 105분간 81, 81, 80, 77, 70, 65, 30, 10, 10, 10, 81%로 유지시켰으며 이동상의 유속은 30°C에서 10  $\mu$ l를 주입하고 1분당 1 ml의 속도로 203 nm에서 정량하였다.

(나) Phenolic acids 및 flavonol 함량 : Cho 등(2011)의 방법을 약간 변형하여 HPLC로 분석하였다. 이동상 용매는 2.0% glacial acetic acid in water(solution A) 와 2.0% glacial acetic acid in acetonitrile(solution B)로 분석하였고, 이동상 조건은 solvent B를 기준으로 각각 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 55 및 60분간 15%, 5%, 15%, 5%, 10%, 50%, 50%, 60%, 80% 및 90%로 유지시켰다. 시료는 20  $\mu$ l를 주입하였고 이동상의 속도는 30°C 칼럼에서 1분당 1 ml의 속도로 유지하였고 phenolic acids 함량은 diode array UV detector(Agilent 1200 series, Agilent Co.)의 흡광도 280 nm에서 정량하였고, flavonols 함량은 270 nm에서 정량 분석하였다.

#### (8) 항산화 활성 측정:

(가) DPPH radical : DPPH 시약 0.8 ml와 각각의 추출물 0.2 ml를 가해 암실에서 30분간 방치 후 분광광도계를 사용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(나) ABTS radical : 2.45 mM K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 5 mL과 7 mM ABTS<sup>•+</sup> 5 mL를 혼합한 후 암실에서 16시간가량 방치시켜 ABTS<sup>•+</sup> 양이온 라디칼을 형성시킨 후 732 nm에서 대조구의 흡광도 값이

0.7±0.02가 되도록 조절한 ABTS<sup>•+</sup> 용액 0.9 ml와 추출물 0.1 ml를 첨가하여 3분간 정치 시켜 732 nm에서 분광광도계를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

(다) Hydroxyl(•OH) radical : 10 mM FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O-EDTA 0.2 mL, 10 mM 2-deoxyribose 0.2 mL, 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.2 mL 및 농도별 추출물 1.4 mL를 혼합하고 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 이 반응액에 1% thiobarbituric acid와 2.8% trichloroacetic acid를 각각 1 ml를 가하여 10°C에서 20분간 가열하고 발색 및 냉각시켜 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조구 실험은 시료 대신에 PBS 완충액(NaCl 8.76 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.11 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.596 g)을 사용하였고 전자공여능은 시료용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도의 차이를 백분율(%)로 나타내었다 (Shin 등, 2012).

(라) Ferruic Reducing Antioxidant Power(FRAP) assay : FRAP 환원력 측정은 먼저 acetate buffer(30 mM, pH 3.6), TPTZ 시약(10 mM, in 40 mM HCl), 및 FeCl<sub>3</sub> 용액(20 mM in DW)을 일련의 방법에 따라 제조 후 10:1:1(v/v/v)의 비율로 혼합한 시약 0.95 ml에 시료 0.05 ml를 첨가하고 37°C의 수욕상에서 15분간 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도 값을 측정하여 나타내었다.

#### (9) 소화효소 저해활성 :

(가) α-Glucosidase : 각 농도별 추출물 50 μl, α-glucosidase(0.5 U/ml) 효소용액 50 μl, 200 mM 인산나트륨 완충용액(pH 6.8) 50 μl를 혼합하여 37°C에서 10분간 예비반응 시켰다. 이후 인산나트륨 완충용액(pH 6.8)에 녹인 p-NPG(5 mM) 100 μl를 가하여 다시 37°C에서 10분 반응시켰다. 이 반응액에 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(100 mM) 0.75 ml를 가해 최종 반응을 정지시킨 후 420 nm에서 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

(나) Pancreatic lipase : Kwon 등(21)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 추출물 50 μl, lipase(1.0 U/ml) 효소용액 50 μl, 및 200 mM 인산나트륨 완충용액(pH 6.8) 50 μl를 혼합하여 37°C에서 10분간 예비 반응시켰다. 반응 후 인산나트륨 완충용액에 녹인 p-NPB(5 mM) 100 μl를 가하여 동일하게 10분간 반응시킨 후 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.75 ml를 가해 반응을 종결시켜 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 효소 저해능의 음성대조구는 시료 대신에 추출용매를 취하였으며 시료용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

### 나. 장백도라지 품종의 숙성(혹)도라지 제조 및 특성

(1) 숙성(활성)도라지 제조 : 장백도라지는 함양군에서 생산된 2년 이상의 생도라지를 구입하여 사용하였다. 숙성(활성)도라지는 상기와 동일하게 진행하여 제조하였다.

(2) 5대 영양성분 : 상기 방법과 동일하게 장백도라지 품종의 숙성(혹)도라지 제조 및 특성과 동일하게 실시하였다.

(3) 지방산 : 상기 방법과 동일하게 장백도라지 품종의 숙성(혹)도라지 제조 및 특성과 동일하게 실시하였다.

(4) 유리아미노산 : 상기 방법과 동일하게 장백도라지 품종의 숙성(혹)도라지 제조 및 특성과 동일하게 실시하였다.

(5) pH, 산도 및 환원당 : 상기 방법과 동일하게 장백도라지 품종의 숙성(혹)도라지 제조 및 특성과 동일하게 실시하였다.

(6) 추출물 제조 : 상기에서 선정한 최적 추출조건으로 장백도라지 원료와 숙성(혹)도라지 분말로부터 추출물 혹은 추출 분말을 제조하였다. 즉, 장백도라지 원료와 숙성(혹)도라지 건조

분말 500 g에 50% 발효주정 10 L를 가하여 30℃에서 4시간 2회 반복하여 추출물을 제조하였다. 필터로 일부를 여과하여 총 페놀릭스와 총 플라보노이드 함량 및 phenolic acid, flavanol, 및 saponin 함량 분석과 항산화 활성 측정에 사용하였다. 일부 추출물 분말은 최종 농도가 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 및 10 mg/ml가 되게끔 추출용매인 50% 발효주정에 녹여 제조하여 항산화 활성 등의 기능성 물질 측정에 사용하였다(그림 2-2).



Fig. 2-2. 장백도라지 원료와 숙성(흑)도라지 추출물 혹은 분말 제조 과정.

**(7) 총 phenolics, flavonoids 및 갈변물질 함량 :**

(가) 총 phenolics : 상기 방법과 동일하게 장백도라지 품종의 숙성(흑)도라지 제조 및 특성과 동일하게 실시하였다.

(나) 총 flavonoids : 상기 방법과 동일하게 장백도라지 품종의 숙성(흑)도라지 제조 및 특성과 동일하게 실시하였다.

(다) 갈변물질 함량 : 상기 방법과 동일하게 장백도라지 품종의 숙성(흑)도라지 제조 및 특성과 동일하게 실시하였다.

**(8) Triterpenoides, Phenolic acids 및 flavonols 함량 :**

(가) 총 Triterpenoides 함량 : 상기 방법과 동일하게 장백도라지 품종의 숙성(흑)도라지 제조 및 특성과 동일하게 실시하였다.

(나) 총 Phenolic acids 및 flavanol 함량 : 상기 방법과 동일하게 장백도라지 품종의 숙성(흑)도라지 제조 및 특성과 동일하게 실시하였다.

**(9) 항산화 활성 측정:**

(가) DPPH radical : 상기 방법과 동일하게 장백도라지 품종의 숙성(흑)도라지 제조 및 특성과 동일하게 실시하였으며 발효주정 농도별 추출물에 한하여 측정하였다.

(나) ABTS radical : 상기 방법과 동일하게 장백도라지 품종의 숙성(흑)도라지 제조 및 특성과 동일하게 실시하였으며 발효주정 농도별 추출물에 한하여 측정하였다.

(다) Hydroxyl( $\bullet$ OH) radical : 상기 방법과 동일하게 장백도라지 품종의 숙성(흑)도라지 제조

및 특성과 동일하게 실시하였으며 발효주정 농도별 추출물에 한하여 측정하였다.

(라) Ferruic Reducing Antioxidant Power(FRAP) assay : 상기 방법과 동일하게 장백도라지 품종의 숙성(흑)도라지 제조 및 특성과 동일하게 실시하였으며 발효주정 농도별 추출물에 한하여 측정하였다.

**다. 도라지 이용 경옥고환 제품화**

(1) 도라지 이용 경옥고환 제품화 : 1차년도 도라지 함유 고온숙성법을 이용한 십전대보환 제조 기술을 적용하여 아래 그림같이 도라지 경옥고환을 제조하였다. 즉, 고온숙성법은 도라지 분말에 물과 벌꿀을 첨가하여 혼합하고 숙성 용기에 담아 80℃ 이상에서 10일간 정도 고온 숙성하여 경옥고를 제조하고 이를 더 농축과 저온건조를 통해 대환 형태로 제형하고 포장하여 도라지 경옥고환 제품을 제조하였고, 부가적으로 본 기술을 적용하여 발효침향환 역시 제조하였다(그림 2-3).



Fig. 2-3. 고온숙성법 이용 도라지 경옥고환 제조공정도.

**2-2. 2차년도 연구수행 방법**

**가. 숙성(흑)도라지 제조 및 추출조건 확립**

(1) 이화학적 특성 : 소규모 파일럿터 형태로 제조한 숙성(흑)도라지의 pH는 3.79, 산도는 1.25%, 환원당은 3.80 mg/g, 갈변도는 3.005를 나타내었다(Table 2-1).

Table 2-1. 숙성(흑)도라지의 이화학적 특성

pH	Acidity (% as lactic acid)	Reducing sugar (mg/g d.w.)	Browning (OD420 nm)
3.79	1.25	3.80	3.005

All values are means of determinations in three independent experiments.

## (2) 영양성분

(가) 5대 일반성분 : 소규모 파일럿터 형태로 제조한 숙성(혹)도라지의 수분은 3.3 g/100 g 이었고 회분 5.6 g/100 g, 지방 0.9 g/100 g, 단백질 17.7 g/100 g, 탄수화물은 72.5 g/100 g으로 가장 많은 양을 나타내었다(Table 2-2).

**Table 2-2.** 숙성(혹)도라지의 5대 영양성분

Moisture	Crude ash	Crude fat	Crude protein	Carbohydrate
3.3	5.6	0.9	17.7	72.5

All values are means of determinations in three independent experiments.

(나) 지방산 : 소규모 파일럿터 숙성(혹)도라지의 지방산 분석 결과 포화지방산은 palmitic acid(C16:0)가 11.7 mg/100 g으로 가장 많은 양이 검출되었다. Butyric acid(C4:0)는 0.2 mg/100 g, lauric acid(C12:0)와 myristic acid(C14:0)는 0.1 mg/100 g씩 검출되었으며 stearic acid(C18:0)는 1.5 mg/100 g, heneicosanoic acid(C21:0)는 0.4 mg/100 g이 검출되었고 포화지방산 총 함량은 14.0 mg/100 g이 검출되었다. 한편 불포화지방산 중에서는 linoleic acid(C18:2c)가 22.1 mg/100 g으로 가장 많은 양이 검출되었고 palmitoleic acid(C16:1)와 elaidic acid(C18:1t)는 0.4 mg/100 g씩 검출되었다. Oleic acid(C18:1c)는 7.0 mg/100 g으로 비교적 많은 양을 함유하고 있었으며 불포화지방산 총 함량은 36.1 mg/100 g이었고 지방산 총 함량은 50.1 mg/100 g으로 나타났다(Table 2-3).

**Table 2-3.** 숙성(혹)도라지의 지방산 조성

Fatty acids	Contents <sup>1)</sup> (mg/100 g d.w.)
Saturated fatty acid	
Lauric acid(C12:0)	0.1
Myristic acid(C14:0)	0.1
Palmitic acid(C16:0)	11.7
Stearic acid(C18:0)	1.5
Total	14.0
Un-saturated fatty acid	
Palmitoleic acid(C16:1)	0.4
Elaidic acid(C18:1t)	0.4
Oleic acid(C18:1c)	7.0
Linoleic acid(C18:2c)	22.1
$\alpha$ -Linoleic acid(C18:3n3)	0.2
$\gamma$ -Linoleic acid(C18:3n6)	1.6
Eicosenic acid(C20:1)	1.2
Eicosatrienoic acid(C20:3n3)	1.6
Arachidonic acid(C20:4n6)	0.2
Eiosapentaenoic acid(C20:5n3)	0.9
Erucic acid(C22:1n9)	0.2
Docosadienoic acid(C22:2)	0.1
Nervonic acid(C22:6n3)	0.2
Total	36.1
Total fatty acid contents	50.1

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

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

(다) 유리아미노산 : 소규모 제조의 숙성(혹)도라지의 유리아미노산 분석 결과 Table 2-4에 나타내었다. 일반 아미노산 중에서는 glutamic acid가 140.81 mg/100 g으로 가장 많은 양을 나타내었고 agginine이 115.09 mg/100 g으로 비교적 많은 양이 검출되었다. 한편 phosphoserine, taurine, phosphoetanolamine, urea, hydroxyproline, aspartic acid- NH<sub>2</sub>, citrulline, cystine, cystathionine, ornithine, 1-methylhistidine, 3-methylhistidine, anserine이 검출되지 않았다. 일반 아미노산 총 함량은 658 mg/100 g이었으며 필수 아미노산 총 함량은 347.11 mg/100 g이 검출되었고 유리아미노산 총 함량은 1005.11 mg/100 g이 검출되었다.

**Table 2-4.** 숙성(혹)도라지의 유리아미노산 조성

Free amino acids	Contents <sup>1)</sup> (mg/100 g d.w.)
General amino acids	
Taurine	nd
Proline	7.02
Hydroxyproline	nd
Aspartic acid	59.75
Serine	29.44
Aspartic acid - NH <sub>2</sub>	nd
Glutamic acid	140.81
Sarcosine	26.92
Aminoadipic acid	19.27
Glycine	15.88
Alanine	88.51
$\alpha$ -aminobutyric acid	33.14
Cystine	nd
Tyrosine	23.71
$\beta$ -alanine	21.68
$\beta$ -aminoisobutyric acid	13.10
$\gamma$ -aminobutyric acid	49.80
Aminoethanol	5.33
Hydroxylysine	1.80
Ornithine	3.96
Anserine	nd
Carnosine	2.79
Arginine	115.09
Totals	658.00
Essential amino acids	
Threonine	30.47
Valine	164.79
Methionine	10.39
Isoleucine	110.18
Leucine	8.27
Phenylalanine	20.16
Lysine	2.34
Histidine	0.52
Total	347.11
Total amino acids	1005.11
Ammonia	28.39

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

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

### (3) Phytochemicals 화합물 함량

(가) Triterpenoides : 흑도라지 분말을 이용하여 제조한 시제품의 saponin 함량을 분석한 결과는 Table 2-5와 같았다. Saponin 3종류의 유도체 중 polygalcin D 형태는 검출되지 않았고 platycodin D3 형태는 2.99  $\mu\text{g/g}$ 이 검출되었고 deapioplatycodin D 형태는 0.24  $\mu\text{g/g}$ 이 검출되었으며 saponin 총 함량은 5.23  $\mu\text{g/g}$ 으로 검출되었다(Fig. 2-4A & Table 2-5).

(나) Phenolic acids : Phenolic acid 분석 결과 p-coumaric acid와 ferulic acid가 검출되지 않았다. 한편 chlorogenic acid는 264.14  $\mu\text{g/g}$ 으로 주요 phenolic acid 유도체로 확인되어졌고 가장 많은 함량을 나타내었다. p-hydrobenzoic acid 역시 152.13  $\mu\text{g/g}$ 으로 많은 함량을 나타내었고 phenolic acid 총 함량은 600.63  $\mu\text{g/g}$ 이 검출되었다(Fig. 2-4B & Table 2-5).

(다) Flavonols : Flavonols 화합물은 catechin gallate를 제외하고 모든 유도체들이 검출되었다. 특히 가장 많은 함량을 나타낸 유도체는 epigallocatechin이었고 1672.53  $\mu\text{g/g}$ 이 검출되었다. Quercetin 역시 719.61  $\mu\text{g/g}$ 으로 비교적 많은 함량을 나타내었고 이를 이어 catechin 유도체가 317.42  $\mu\text{g/g}$ 으로 많은 양이 검출되었다. 이 외 각각의 유도체 함량은 1.29(vanillin) ~ 171.31  $\mu\text{g/g}$ (rutin) 등 다양한 함량을 나타내었으며 flavonols 총 함량은 3,142.34  $\mu\text{g/g}$ 으로 saponin 및 phenolic acid와 비교하였을 시 가장 많은 함량을 나타내었다(Fig. 2-4C & Table 2-5).

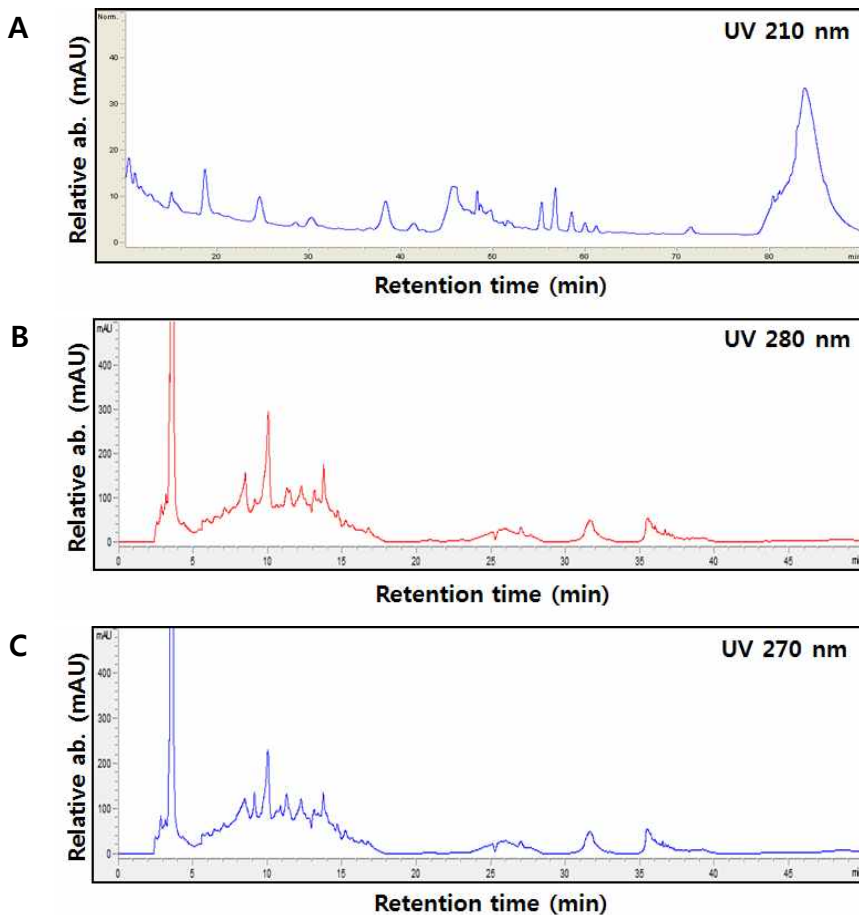


Fig. 2-4. 숙성(흑)도라지 추출물의 triterpenoides (A), phenolic acids (B) 및 flavonols (C) 화합물 HPLC 크로마토그램.



**Table 2-5.** 숙성(후)도라지의 phytochemical 화합물 조성

Phytochemical compounds	Contents ( $\mu\text{g/g d.w.}$ ) <sup>1)</sup>
Triterpenoides	
Platycodin D3	2.99
Deapioplatycodin D	0.24
Polygalcin D	tr <sup>2)</sup>
Total	5.23
Phenolic acids	
Gallic acid	70.21
Protocatechuic acid	53.63
Chlorogenic acid	264.14
p-Hydrobenzoic acid	152.13
Vanilic acid	34.22
p-Coumaric acid	nd <sup>2)</sup>
Ferulic acid	nd
Ventarinic acid	23.51
trans-Cinnamic acid	0.79
Total	600.63
Flavonols	
Epigallocatechin	1672.53
Catechin	317.42
Epicatechin	141.15
Epigallocatechin gallate	68.31
Vanillin	1.29
Rutin	171.31
Catechin gallate	nd <sup>2)</sup>
Quercetin	719.61
Naringin	31.08
Naringenin	13.02
Formonoetin	4.62
Total	3,142.34

<sup>1)</sup>Value indicated the mean's of three replication ( $n=3$ ).

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

#### (4) 추출조건별(주정농도와 추출온도) 추출물의 생리활성물질 함량

(가) 총 phenolics 및 총 flavonoids : 주정 농도별 추출물의 총 페놀릭스 함량 측정 결과 주정을 첨가하지 않은 물 추출물의 경우에는 추출 온도 30°C 일 때 48.72 mg/g으로 70°C(44.14 mg/g)보다 좀 더 많은 양을 나타내었으나 전체적으로 주정 농도 50%, 추출 온도는 30°C 일 때 76.20 mg/g으로 70°C(75.03 mg/g)일 때 보다 좀 더 많은 양이 검출되었다(Fig. 2-5A). 총 플라보노이드 함량 역시 물 추출물의 경우 추출 온도 30°C 일 때 약간 더 많은 양이 검출되었으나 30%와 50% 주정 농도에서 많은 양이 검출되었고 총 페놀릭스와 동일한 결과로서 주정 농도가 클수록 즉, 70%와 95%의 경우 총 페놀릭스 및 총 플라보노이드 함량은 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 2-5B).

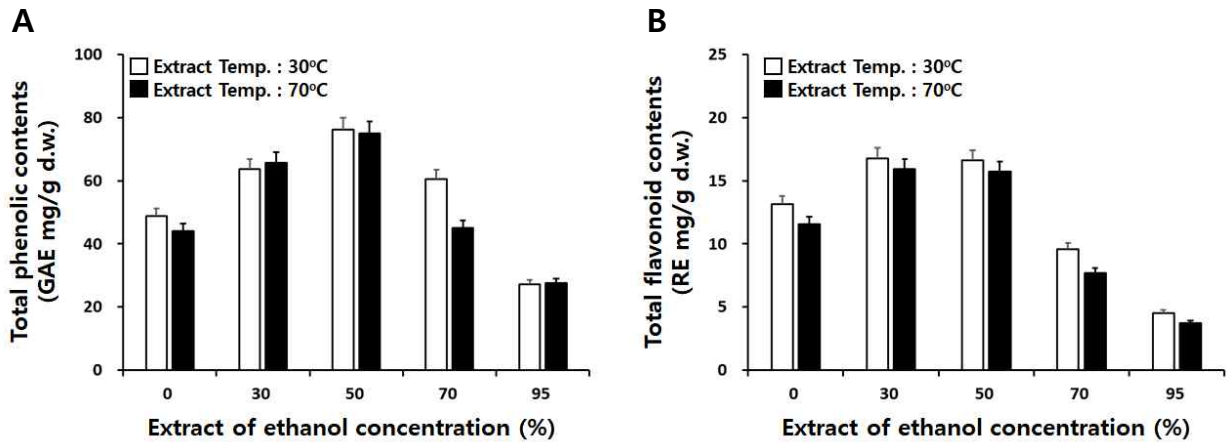


Fig. 2-5. 추출 조건별 총 phenolics (A)와 총 flavonoids (B) 화합물 조성.

(나) Triterpenoides : Triterpenoid 분석 결과 추출온도 30°C에서 주정 농도 30%와 70%의 경우에는 saponin이 모두 검출되지 않았고 물 추출물의 경우 triterpenoid 총 함량은 0.04  $\mu$ g/g, 50% 주정 농도에서는 0.05  $\mu$ g/g, 95%에서는 0.03  $\mu$ g/g으로 주정 농도에 따른 변화는 없었다. 한편 추출온도 70°C의 경우도 마찬가지로 30% 주정 농도에서는 triterpenoid이 검출되지 않았으며 물 추출물의 경우 0.17  $\mu$ g/g, 50% 주정에서는 0.64  $\mu$ g/g, 70%의 경우 0.66  $\mu$ g/g, 95% 주정에서는 0.04  $\mu$ g/g이 검출되었다(Table 2-6 & Fig. 2-6).

(다) Phenolic acids : Gallic acid와 protocatechuic acid는 추출온도 30°C, 주정 농도 95%에서 각각 140.55  $\mu$ g/g과 116.64  $\mu$ g/g으로 가장 많은 양이 검출되었고 chlorogenic acid(353.97  $\mu$ g/g), p-hydrobenzoic acid(93.32  $\mu$ g/g), vanilic acid(71.28  $\mu$ g/g)는 50% 주정 농도에서 가장 높게 검출되었다. Phenolic acid 총 함량은 주정 농도에 따른 차이는 크게 나타나지 않았으며 50% 주정에서 804.82  $\mu$ g/g으로 가장 높은 것으로 나타났다. 한편 추출 온도 70°C에서는 gallic acid(126.69  $\mu$ g/g), chlorogenic acid(324.13  $\mu$ g/g), p-hydrobenzoic acid(94.56  $\mu$ g/g), vanilic acid(73.36  $\mu$ g/g)가 다른 주정 농도에 비해 높게 검출되었으며 총 함량 역시 772.63  $\mu$ g/g으로 이들 중 가장 높은 양이 검출되었다(Table 2-7 & Fig. 2-7).

(라) Flavonols : 추출온도 30°C의 물 추출물에서는 epicatechin이 213.87  $\mu$ g/g으로 가장 많은 양이 검출되었고 30% 주정 추출물은 naringin이 110.25  $\mu$ g/g으로 가장 많았다. 50% 주정 추출물에서는 epigallocatechin과 catechin이 각각 385.81 및 120.08  $\mu$ g/g으로 가장 많았으며 catechin gallate 역시 368.88  $\mu$ g/g으로 이들 중 가장 많은 함량을 나타내었다. 이 외 70% 주정 추출물 역시 총 함량이 1,111.09  $\mu$ g/g으로 비교적 높은 함량을 나타내었고 50% 주정 추출물에서 1,208.15  $\mu$ g/g으로 총 flavonols 함량이 가장 높았다. 70°C, 30% 주정 농도에서는 epigallocatechin이 349.97  $\mu$ g/g으로 가장 많았고 50%에서는 catechin과 catechin gallate이 각각 132.32  $\mu$ g/g과 369.41  $\mu$ g/g으로 가장 높았다. 70% 주정 농도에서는 epicatechin이 237.42  $\mu$ g/g으로 이들 중 가장 많은 양을 나타내었고 총 함량은 50% 주정 농도에서 1,190.76  $\mu$ g/g으로 가장 높았으나 30%와 70% 주정 농도와 큰 차이는 없었다(Table 2-8 & Fig. 2-8).

Table 2-6. 추출 조건별(주정농도와 추출온도)의 triterpenoid 화합물 조성

Contents <sup>1)</sup> (mg/g d.w.)	Extract of Temp. (°C) & of ethanol Con. (%)									
	30°C					70°C				
	0%	30%	50%	70%	95%	0%	30%	50%	70%	95%
Platycodin D3	nd	nd	0.4	0.44	nd	nd	nd	0.6	0.66	nd
Deapioplatycodin D	0.04	nd	0.05	nd	0.03	0.17	nd	0.04	nd	0.04
Polygalcin D	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Total	0.04	0	0.45	0.44	0.03	0.17	0	0.64	0.66	0.04

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

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

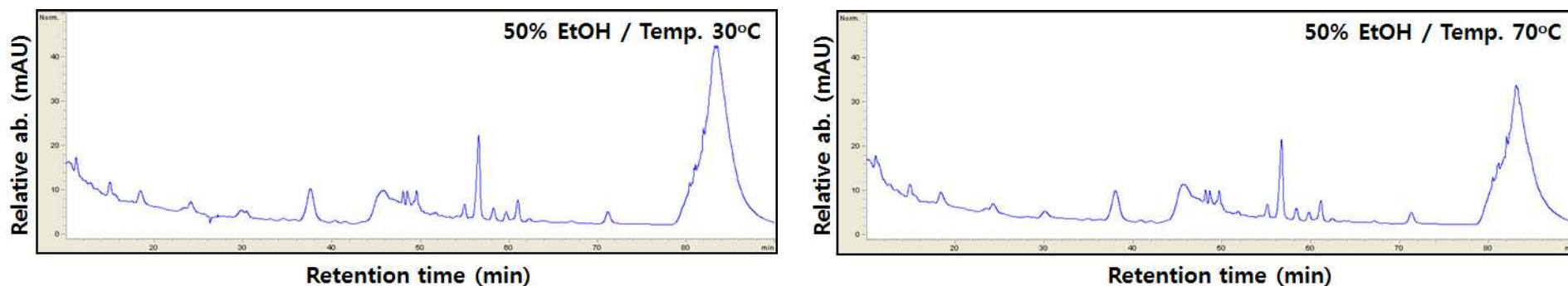


Fig. 2-6. 숙성(혹)도라지 추출분말 triterpenoid 화합물의 HPLC 크로마토그램.

Table 2-7. 추출 조건별(추정농도와 추출온도)의 phenolic acid 화합물 조성

Contents <sup>1)</sup> (mg/g d.w.)	Extract of Temp. (°C) & of ethanol Con. (%)									
	30°C					70°C				
	0%	30%	50%	70%	95%	0%	30%	50%	70%	95%
Gallic acid	139.92	100.83	133.33	119.42	140.55	124.91	121.34	126.69	126.33	100.55
Protocatechuic acid	97.25	102.92	103.09	98.62	116.64	102.82	103.74	102.89	123.48	116.64
Chlorogenic acid	206.33	296.78	353.97	251.02	208.44	196.34	270.23	324.13	243.70	198.44
p-Hydrobenzoic acid	66.22	88.80	93.32	82.78	40.83	34.48	55.28	94.56	45.42	40.83
Vanilic acid	62.97	68.77	71.28	64.92	57.10	64.43	71.46	73.36	60.53	57.10
p-Coumaric acid	nd	nd	nd	nd	19.48	nd	nd	nd	27.45	19.48
Ferulic acid	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Vertaric acid	62.01	76.18	48.84	67.36	42.03	43.93	80.60	49.92	43.33	42.03
t-Cinnamic acid	1.10	1.83	0.99	0.55	1.53	1.06	1.95	1.08	3.13	1.53
Total	635.8	736.11	804.82	684.67	626.6	567.97	704.6	772.63	673.37	576.6

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

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

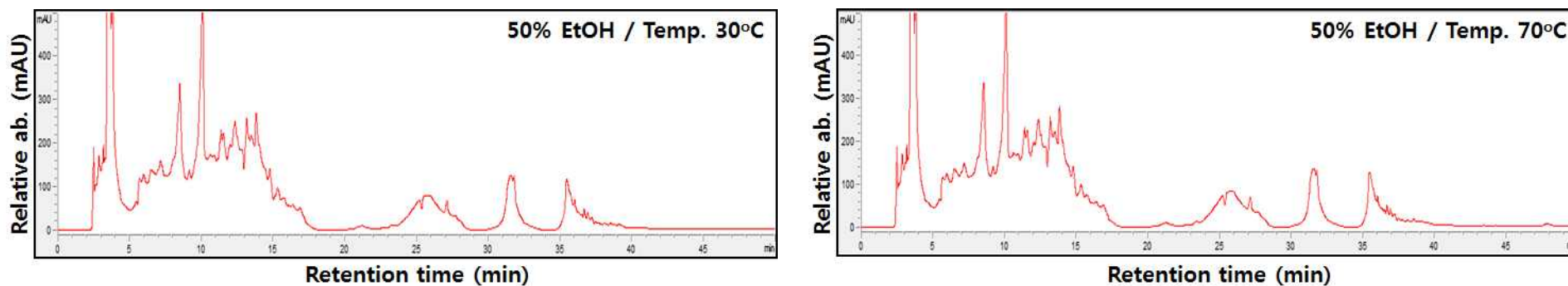


Fig. 2-7. 숙성(혹)도라지 추출분말 phenolic acid 화합물의 HPLC 크로마토그램. (A) 추출온도 30°C, (B) 추출온도 50°C.

Table 2-8. 추출 조건별(추정농도와 추출온도)의 flavonol 화합물 조성

Contents <sup>1)</sup> (mg/g d.w.)	Extract of Temp. (°C) & of ethanol Con. (%)									
	30°C					70°C				
	0%	30%	50%	70%	95%	0%	30%	50%	70%	95%
Epigallocatechin	268.78	342.49	385.81	343.13	196.88	233.25	349.97	343.91	296.11	173.14
Catechin	61.03	119.63	120.08	103.02	55.39	61.49	117.81	132.32	94.61	53.66
Epicatechin	213.87	182.92	189.74	170.25	152.52	221.77	179.83	197.57	237.42	144.64
Epigallocatechin gallate	90.26	38.74	40.10	37.77	31.09	nd	39.39	39.09	nd	31.98
Vanillin	nd	4.89	5.12	4.38	nd	nd	5.11	5.38	5.47	6.05
Rutin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Catechin gallate	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Quercetin	277.80	366.83	368.88	333.71	127.17	251.58	344.37	369.41	308.21	116.30
Naringin	nd	110.25	67.94	98.74	56.78	59.87	117.59	69.07	60.39	55.26
Naringenin	8.08	17.15	21.71	11.90	40.54	20.33	19.20	24.35	23.94	51.24
Formonoetin	5.96	7.38	8.77	8.19	13.05	8.73	5.97	9.66	6.25	9.34
Total	925.78	1,190.28	1,208.15	1,111.09	673.42	857.02	1,179.24	1,190.76	1,032.4	641.61

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

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

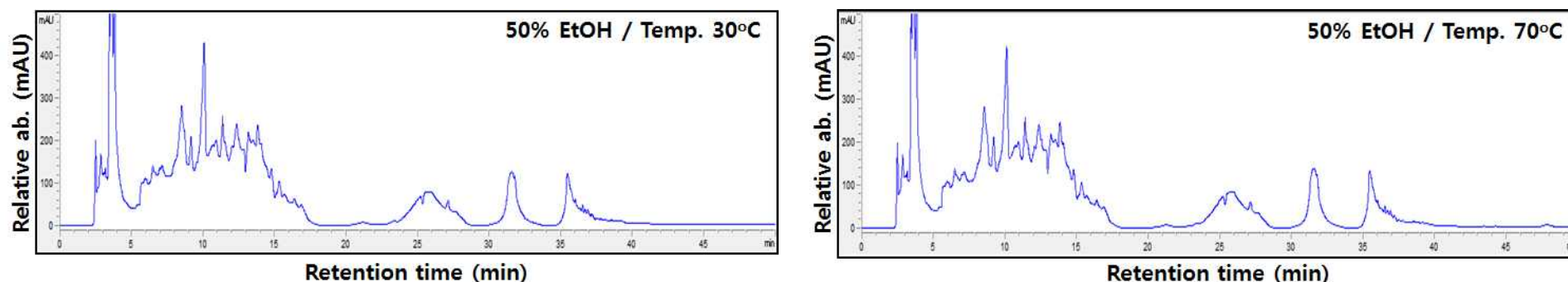


Fig. 2-8. 숙성(혹)도라지 추출분말 flavonol 화합물의 HPLC 크로마토그램. (A) 추출온도 30°C, (B) 추출온도 50°C.

**(5) 추출조건별(주정농도와 추출온도) 추출물의 항산화 활성**

(가) DPPH 라디칼 소거활성 : 추출온도 30°C와 70°C에서의 비교 실험한 결과는 Fig. 2-9와 같았다. 전체적인 결과로서는 물 추출물보다는 주정 농도가 커질수록 DPPH 라디칼 소거활성도 점차적으로 증가하는 경향을 나타내었으나 95% 주정에서는 약간 활성이 감소하는 것으로 나타났다. 각각의 추출물을 10 mg 처리 하였을 시 물 추출물은 76%를 나타내었고 30%는 83.17%, 50%는 85.40%, 70%는 87.36%로 수치 상 가장 높게 나타났으나 큰 차이는 없었다. 한편 95% 주정 농도에서는 이들보다는 약간 감소하여 83.41%를 나타내었다(Fig. 2-9A). 추출 온도 70°C의 경우 역시 주정 농도가 커질수록 증가하는 경향을 나타내었고 최종적으로 95% 농도에서는 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 10 mg 농도 처리 시 물 추출물은 79%를 나타내었고 30%는 81.15%, 50%는 이보다 약간 더 증가한 88.18%를 나타내었고 70%는 86%, 95% 농도에서는 79%로 약간 감소하였다(Fig 2-9B).

(나) ABTS 라디칼 소거활성 : 추출물의 농도별에 따른 라디칼 소거활성을 측정한 결과 농도가 클수록 ABTS 라디칼 소거활성도 비례적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 특히 10 mg 농도 처리 시 물 추출물은 97.94%, 30%-98.57%, 50%-99.89%, 70%-99.68%, 95%-99.21%로 전체적으로 아주 우수한 소거활성을 나타내었다. 또한 추출물의 농도가 2.5 ~ 10 mg 사이에서는 우수한 라디칼 소거활성을 나타내었으나 0.25~1 mg 농도에서는 농도에 따라 점차적으로 ABTS 라디칼 소거활성이 조금씩 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 2-10A). 한편 추출온도 70°C 역시 추출물의 농도가 커질수록 라디칼 소거활성 또한 크게 증가하였으며 2.5 ~ 10 mg 농도 사이에서는 큰 차이 없이 평균 90%가 넘는 소거활성을 보였다. 또한 추출온도 30°C와 유사한 결과로 0.25~1 mg 사이에서는 조금씩 감소하는 농도의존형의 결과를 나타내었다(Fig. 2-10B).

(다) Hydroxyl 라디칼 소거활성 : Hydroxyl 라디칼 소거활성은 전체적으로 아주 우수한 활성을 나타내었으나 DPPH 및 ABTS와 비교하였을 시에는 활성이 조금 낮은 경향을 나타내었다. 추출온도 30°C의 경우 주정 농도 50%일 때 89%(10 mg/ml)로 가장 높았고 95% 농도에서는 81.83%로 약간 감소하였으나 이 역시 우수한 라디칼 소거활성을 나타내었다(Fig. 2-11A). 70°C에서도 마찬가지로 50% 주정 추출물이 84.99%의 활성을 보였고 이는 DPPH 및 ABTS와 동일한 결과로 농도의존적인 라디칼 소거활성을 나타내었다(Fig. 2-11B).

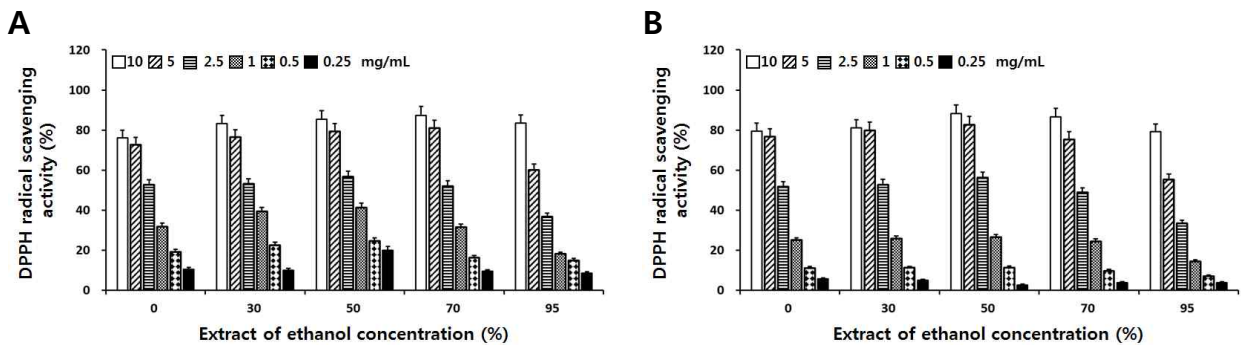


Fig. 2-9. 추출 조건별(주정농도와 추출온도)의 DPPH 라디칼 소거활성. (A) 추출온도 30°C, (B) 추출온도 50°C.

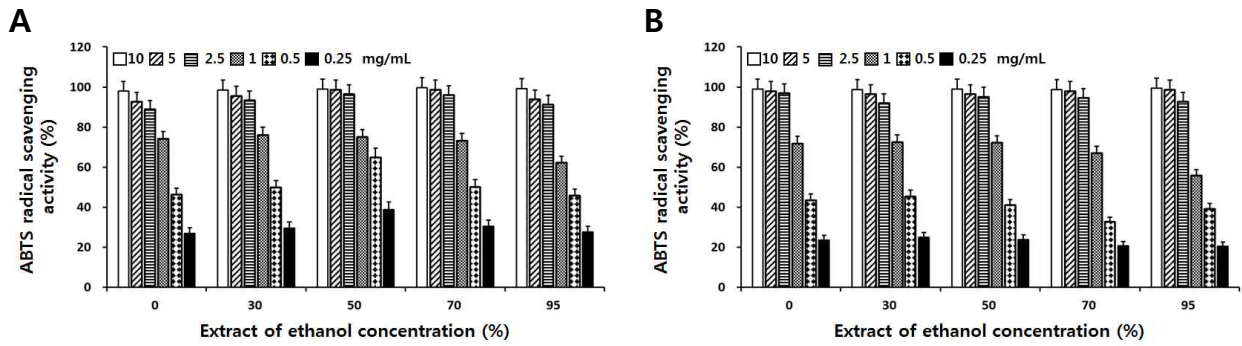


Fig. 2-10. 추출 조건별(주정농도와 추출온도)의 ABTS 라디칼 소거활성. (A) 추출온도 30°C, (B) 추출온도 50°C.

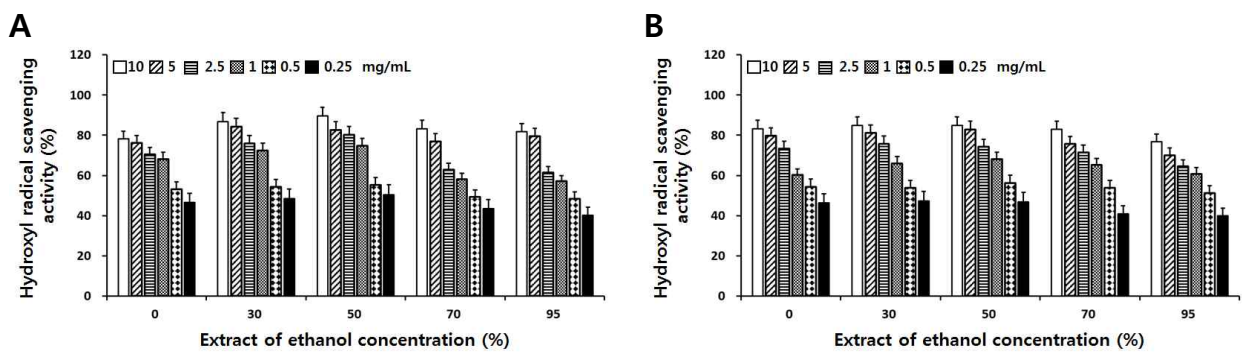


Fig. 2-11. 추출 조건별(주정농도와 추출온도)의 hydroxyl 라디칼 소거활성. (A) 추출온도 30°C, (B) 추출온도 50°C.

(라) FRAP 환원력 : FRAP 환원력은 30°C 및 10 mg 농도에서 물 추출물은 2.67, 30% 주정은 2.79, 50%-2.75, 70%-2.67, 95%는 2.37의 환원력을 나타내었다. 항산화 활성의 경우 2.5 ~ 10 mg 농도에서는 큰 차이 없이 유사한 활성을 나타내었으나 FRAP 환원력은 5 mg 농도에서는 급격히 감소하는 경향을 나타내었고 이는 농도가 적을수록 점차적으로 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 2-11A). 한편 추출온도 70°C의 경우 역시 10 mg 농도가 가장 우수한 환원력을 나타내었으며 특히 30% 주정 추출물에서 2.72로 환원력이 가장 우수하였고 50%는 2.69, 70%는 2.61, 95%는 2.64로 나타났으나 주정 농도에 따른 큰 차이없이 모두 우수한 FRAP 환원력을 나타내었다(Fig. 2-11B).

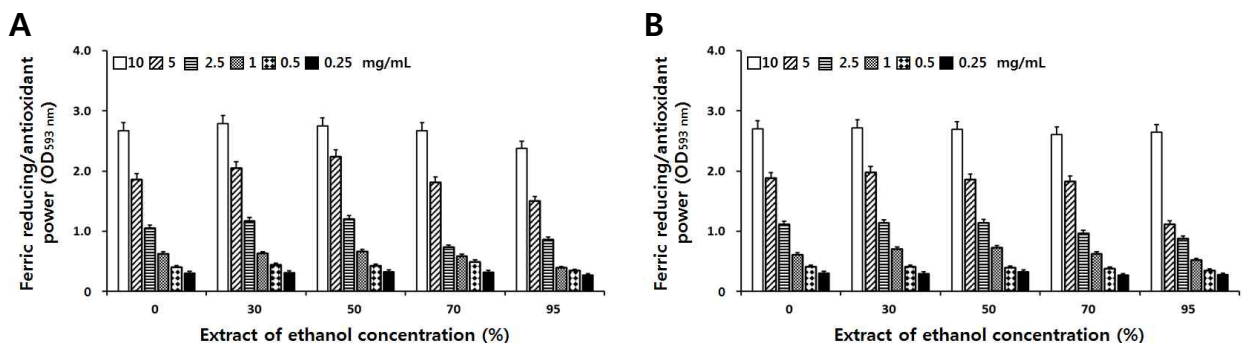


Fig. 2-11. 추출 조건별(주정농도와 추출온도)의 FRAP 환원력. (A) 추출온도 30°C, (B) 추출온도 50°C.

**나. 장백도라지 품종의 숙성(혹)도라지 제조 및 특성**

(1) **이화학적 특성** : 장백도라지 원료와 숙성(혹)도라지의 pH 값은 각각 5.61과 3.68로 측정되어졌다. 이는 원료보다는 숙성 후에 pH가 급격히 감소하는 결과로 나타났고 pH 감소에 비례적으로 산도 역시 1.98% → 8.71%로 크게 증가하였다. 환원당은 장백도라지 원료가 3.77 mg/g 이었고 숙성(혹)도라지는 3.78 mg/g으로 나타나 원료와 숙성과의 관계는 없었다(Table 2-9).

**Table 2-9. 장백도라지 품종의 숙성(혹)도라지 이화학적 특성**

시료	Contents		
	pH	Acidity (% as lactic acid)	Reducing sugar (mg/g d.w.)
도라지	5.61	1.98	3.77
숙성(혹)도라지	3.68	8.71	3.78

All values are means of determinations in three independent experiments.

**(2) 영양성분**

(가) 5대 일반성분 : 장백도라지 원료와 장백도라지 이용 숙성(혹)도라지의 5대 영양소 분석 결과 Table 2-10과 같았다. 장백 도라지 원료의 수분 함유량은 1.6 g/100 g이었고 회분은 4.2 g/100 g, 조지방 2.6 g/100 g, 조단백 9.4 g/100 g, 탄수화물 82.2 g/100 g으로 나타났다. 숙성(혹)도라지의 수분은 1.9 g/100 g으로 원료보다 좀 더 많은 함유량을 나타내었으며 회분 역시 6.9 g/100 g으로 좀 더 많은 함유량을 나타내었다. 조지방은 2.1 g/100 g으로 약간 낮았고 조단백은 11.0 g/100 g이었고 탄수화물은 78.1 g/100 g을 함유하고 있었다.

**Table 2-10. 장백도라지 품종의 숙성(혹)도라지 5대 영양성분 조성**

시료	Contents				
	Moisture	Crude ash	Crude fat	Crude protein	Carbohydrate
도라지	1.6	4.2	2.6	9.4	82.2
숙성(혹)도라지	1.9	6.9	2.1	11.0	78.1

All values are means of determinations in three independent experiments.

(나) 지방산 : 장백 도라지 원료 및 숙성(혹)도라지의 지방산 함량 분석 결과 포화지방산 6종류와 불포화지방산 13종류가 검출되었다. 포화지방산은 장백 도라지 원료에서 palmitic acid(C16:0) 함량이 35.6 mg/100 g으로 가장 많았고 숙성(혹)도라지는 16.5 35.6 mg/100 g으로 낮은 함량을 나타내었다. 포화지방산은 숙성 후 모두 조금씩 감소된 함량을 나타내었고 포화지방산 총 함량은 도라지 원료가 46.5 mg/100 g을 함유하고 있었고 숙성(혹)도라지는 19.3 mg/100 g을 함유하고 있었다. 한편 불포화지방산 중에서는 linoleic acid(C18:2c)가 주요 지방산으로 나타났고 원료에서는 123.5 mg/100 g, 숙성 후에는 45.6 mg/100 g의 함유량을 나타내었다. Oleic acid(C18:1c) 역시 linoleic acid(C18:2c) 다음으로 많은 함량이 검출되었고 원료에서는 13.3 mg/100 g이 검출되었고 숙성(혹)도라지에서는 4.4 mg/100 g이 검출되었다. 이 외 나머지 불포화지방산 역시 숙성 후에 조금씩 감소되는 경향을 나타내었고 지방산 총 함량은 장백 도라지 원료가 209.1 mg/100 g이었고 숙성(혹)도라지는 79.4 mg/100 g을 함유하고 있었다(Table 2-11).



**Table 2-11. 장백도라지 품종의 숙성(혹)도라지 지방산 조성**

Contents <sup>1)</sup> (mg/100 g)	도라지	숙성(혹)도라지
Saturated fatty acid		
Lauric acid(C12:0)	nd <sup>2)</sup>	0.1
Myristic acid(C14:0)	0.6	0.2
Palmitic acid(C16:0)	35.6	16.5
Stearic acid(C18:0)	7.1	1.8
Total	45.3	18.6
Un-saturated fatty acid		
Palmitoleic acid(C16:1)	0.9	0.3
Elaidic acid(C18:1t)	0.8	0.1
Oleic acid(C18:1c)	13.3	4.4
Linoleic acid(C18:2c)	123.5	45.6
α-Linoleic acid(C18:3n3)	nd	0.3
γ-Linoleic acid(C18:3n6)	9.6	4.3
Eicosenic acid(C20:1)	4.0	1.5
Eicosatrienoic acid(C20:3n3)	4.3	1.6
Arachidonic acid(C20:4n6)	0.7	0.3
Eiosapentaenoic acid(C20:5n3)	3.6	1.0
Erucic acid(C22:1n9)	1.0	0.3
Docosadienoic acid(C22:2)	nd	0.1
Nervonic acid(C22:6n3)	0.9	0.3
Total	162.6	60.1
Total fatty acid contents	209.1	79.4

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

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

(다) 유리아미노산 : 비필수 아미노산은 28종류 중 장백도라지 원료와 숙성(혹)도라지 모두 공통적으로 4종류(phosphoserine, 3-methylhistidine, anserine, carnosine)가 검출되지 않았다. 필수아미노산은 장백도라지 원료에서 8종류 모두 검출되었다. 원료의 경우 비필수 아미노산 중 agrinine이 1051.95 mg/100 g으로 가장 많은 함량을 나타내었고 이를 이어 glutamic acid가 159.09 mg/100 g으로 가장 많은 것으로 나타났다. Phosphoserine(nd → 25.28 mg/100 g), taurine(5.82 → 36.68 mg/100 g), β-aminoisobutyric acid(9.09 → 15.01 mg/100 g), hydroxylproline(0.47 → 1.22 mg/100 g)은 원료보다는 숙성 후에 증가하였다. 필수 아미노산 중에서는 valine(50.54 → 76.76 mg/100 g)을 제외한 모든 필수아미노산들은 숙성 후 감소하는 결과를 나타내었다. 이는 비필수 아미노산 역시 같은 결과로 나타났고 총 유리아미노산 함량 역시 1652.73 mg/100 g에서 416.37 mg/100 g으로 대부분 감소하였다(Table 2-12). 이러한 결과는 숙성 과정 중 고온에 의해 유리형의 아미노산들이 대부분 파괴 및 소실되는 것으로 판단된다.

**Table 2-12.** 장백도라지 품종의 숙성(혹)도라지 유리아미노산 조성

Contents <sup>1)</sup> (mg/100 g)	도라지	숙성(혹)도라지
Non-essential amino acids		
Phosphoserine	nd	nd
Taurine	5.82	25.28
Phosphoetanolamine	nd	36.68
Urea	nd	nd
Proline	44.08	nd
Aspartic acid	52.69	12.62
Serine	26.96	3.43
Glutamic acid	159.09	75.46
Sarcosine	11.59	nd
Aminoadipic acid	3.43	1.31
Glycine	8.06	5.51
Alanine	57.76	8.10
Citrulline	8.51	nd
$\alpha$ -aminobutyric acid	nd	nd
Cystine	nd	48.34
Cystathionine	nd	1.78
Tyrosine	8.44	6.71
$\beta$ -alanine	7.13	6.07
$\beta$ -aminoisobutyric acid	9.09	15.01
$\gamma$ -aminobutyric acid	27.21	21.18
Aminoethanol	7.62	nd
Hydroxyproline	0.47	1.22
Ornithine	5.15	0.36
1-Methylhistidine	0.54	nd
3-Methylhistidine	nd	nd
Anserine	nd	nd
Carnosine	nd	nd
Arginine	1051.95	36.11
Totals	1495.59	305.17
Essential amino acids		
Threonine	30.55	nd
Valine	50.54	76.76
Methionine	9.01	nd
Isoleucine	12.82	21.21
Leucine	15.91	5.68
Phenylalanine	8.75	7.55
Lysine	13.58	nd
Histidine	15.98	nd
Total	157.14	111.2
Total amino acids	1652.73	416.37
Ammonia	32.88	4.55

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

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

### (3) 원료와 숙성(혹)도라지 추출물의 생리활성물질 함량

(가) 총 phenolics, 총 flavonoids 및 갈변물질 : 총 페놀릭스 함량은 5.08  $\rightarrow$  10.62 mg/g으로 숙성 시 증가하였고(Fig. 2-12A) 총 플라보노이드 함량 역시 9.42  $\rightarrow$  37.06 mg/g으로 크게

증가하였다(Fig. 2-12B). 숙성 시 갈변 현상에 따라 짙어진 숙성(흑)도라지는 2.966의 갈변도를 나타내었고 도라지 원료는 이보다 낮은 1.443의 갈변도를 나타내었다(Fig. 2-12C).

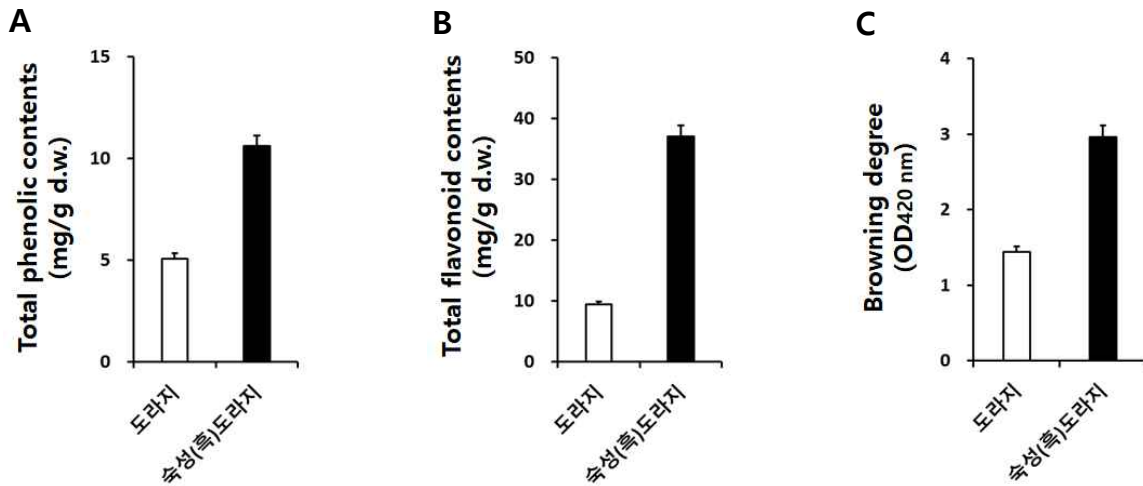


Fig. 2-12. 장백도라지 품종의 숙성(흑)도라지 총 phenolics (A), 총 flavonoids (B) 및 갈변도 (C).

(나) Triterpenoides : 사포닌 분석 결과 3종류의 유도체가 장백도라지 원료로부터 검출되었다. Platycodin D3 유도체는 0.96 → 3.23  $\mu\text{g/g}$ 으로 약간 증가하였으나 deapioplatycodin D 및 polygalcin D 유도체는 각각 0.30 → 0.14  $\mu\text{g/g}$  및 1.19 → nd로 감소 혹은 검출되지 않았다. 사포닌 총 함량은 원료(2.45  $\mu\text{g/g}$ )보다는 숙성(흑)도라지(3.37  $\mu\text{g/g}$ )가 좀 더 높은 것으로 나타났다(Table 2-13 & Fig. 2-13A).

(다) Phenolic acids : Phenolic acid 유도체들 중 p-coumaric acid는 원료와 숙성 후 모두 검출되지 않았으며 p-hydrobenzoic acid(9.15 → nd), ferulic acid(4.25 → nd), t-cinnamic acid(1.85 → 0.70  $\mu\text{g/g}$ )는 숙성 후 감소하거나 검출되지 않는 결과를 나타내었다. 한편 gallic acid(6.96 → 54.22  $\mu\text{g/g}$ ), vanillic acid(nd → 24.47  $\mu\text{g/g}$ ), vertaric acid(6.50 → 34.15  $\mu\text{g/g}$ )는 숙성 후 조금씩 증가하였다. 특히 protocatechuic acid와 chlorogenic acid는 각각 1.45 → 169.76  $\mu\text{g/g}$  및 70.95 → 226.17  $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 큰 증가폭을 나타내었다. 한편 총 함량은 103.11 → 909.38  $\mu\text{g/g}$ 으로 숙성(흑)도라지가 장백도라지 원료보다 아주 많은 양을 함유하고 있었다(Table 2-13 & Fig. 2-13B).

(라) Flavonols : Flavonols 역시 숙성 과정 중에 각각의 유도체들이 증가하는 경향을 나타내었다. 이들 중 epigallocatechin(169.55 → 218.37  $\mu\text{g/g}$ )과 quercetin(211.45 → 340.03  $\mu\text{g/g}$ )으로 가장 많이 증가하였고 총 함량 역시 원료의 경우 727.76  $\mu\text{g/g}$ 에 불과하였으나 숙성(흑)도라지는 1,870.85  $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 크게 증가하였다(Table 2-13 & Fig. 2-13C).

**Table 2-13.** 장백도라지 품종의 숙성(혹)도라지 phytochemicals 화합물 함량

Contents <sup>1)</sup>	도라지	숙성(혹)도라지
Triterpenoides (mg/g d.w.)		
Platycodin D3	0.96	3.23
Deapioplatycodin D	0.30	0.14
Polygalcin D	1.19	nd
Total	2.45	3.37
Phenolic acids ( $\mu$ g/g d.w.)		
Gallic acid	6.96	54.22
Protocatechuic acid	1.45	169.67
Chlorogenic acid	70.95	226.17
<i>p</i> -Hydrobenzoic acid	9.15	nd
Vanillic acid	nd <sup>2)</sup>	24.47
<i>p</i> -Coumaric acid	nd	nd
Ferulic acid	4.25	nd
Vertaric acid	6.50	34.15
<i>t</i> -Cinnamic acid	1.85	0.70
Total	103.11	509.38
Flavonols ( $\mu$ g/g d.w.)		
Epigallocatechin	169.55	218.37
Catechin	46.04	174.80
Epicatechin	26.15	80.12
Epigallocatechin gallate	6.75	58.83
Vanillin	tr <sup>3)</sup>	1.11
Rutin	6.86	nd <sup>2)</sup>
Catechin gallate	5.05	nd
Quercetin	211.45	340.03
Naringin	13.38	47.77
Naringenin	36.46	13.35
Formonoetin	3.07	4.47
Total	527.76	940.85

<sup>1)</sup>Value indicated the mean's of three replication ( $n=3$ ).

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

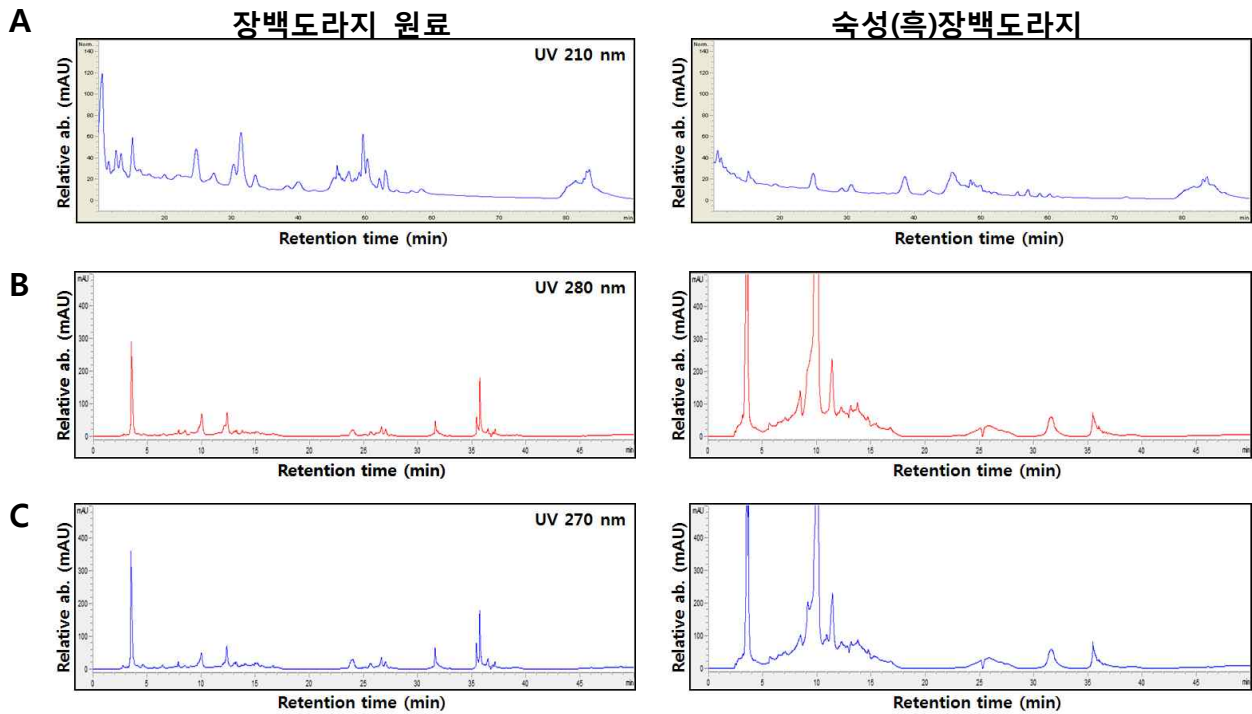


Fig. 2-13. 장백도라지 품종의 숙성(흑)도라지 추출물의 triterpenoides (A), phenolic acids (B) 및 flavonols (C) 화합물 HPLC 크로마토그램.

(4) 원료와 숙성도라지 추출물의 항산화 활성 : 항산화 활성 측정 결과 모두 공통적으로 숙성(흑)도라지가 우수한 것으로 나타났다. DPPH의 경우 32.29%에서 숙성 시 68.04%로 증가하였으며(Fig. 2-14A) ABTS 역시 62.45%에서 95.77%(Fig. 2-14B), Hydroxyl 라디칼 소거활성 또한 67.27%로 약 1.87% 증가하였다(Fig. 2-14C). 한편FRAP 환원력은 2.008에서 2.824로 아주 약간 증가하였다(Fig. 2-14D).

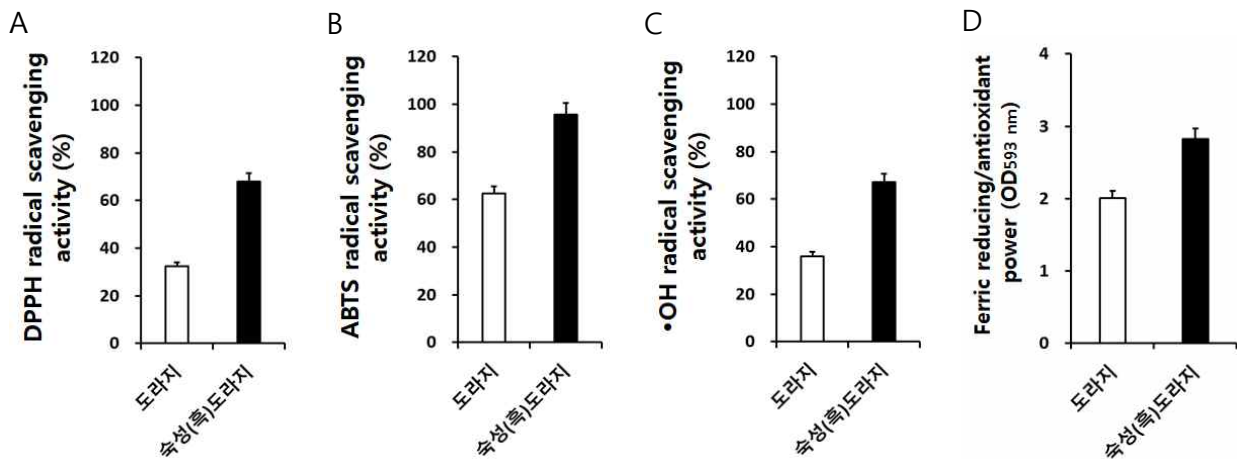


Fig. 2-14. 장백도라지 품종의 숙성(흑)도라지 추출물의 DPPH (A), ABTS (B)와 hydroxyl (C) 및 FRAP 환원력 (D).

(5) 원료와 제조 추출분말의 생리활성물질 함량

(가) 총 phenolics, 총 flavonoids 및 갈변물질 : 장백도라지 원료와 추출분말의 총 페놀릭스

함량 비교 결과 장백도라지 원료의 추출분말의 경우 0.39 mg/g이었고 숙성(흑)도라지 추출분말은 1.37 mg/g으로 좀 더 많은 양을 함유하고 있었다(Fig. 2-15A). 총 플라보노이드 함량은 원료와 추출분말에 따른 영향 없이 각각 0.10 및 0.11 mg/g으로 나타났으며(Fig. 2-15B), 갈변정도는 원료가 1.277 있었으며, 숙성(흑)도라지는 2.898 있었다(Fig. 2-15C).

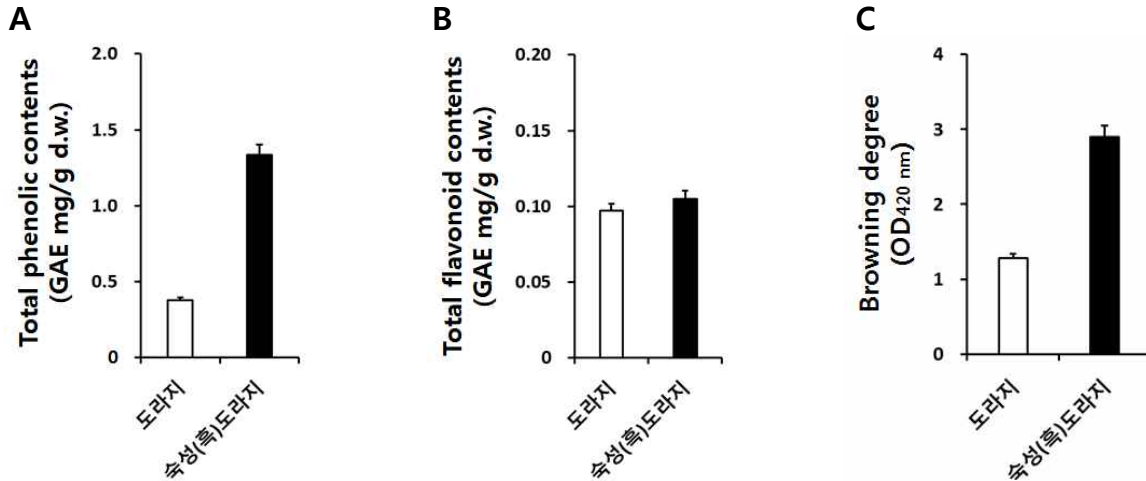


Fig. 2-15. 장백도라지 품종 추출분말의 총 phenolics (A), 총 flavonoids (B) 및 갈변 물질 (C) 함량.

(나) Triterpenoides : Saponin 분석 결과 3가지 유도체 중 polygalcin D 형태가 공통적으로 검출되지 않았으며 platycodin D3 형태는 0.29  $\mu$ g/g에서 숙성 후 0.70  $\mu$ g/g으로 약간 증가하였으나 deapioplatycodin D 형태는 0.16  $\mu$ g/g에서 숙성 후 약간 감소하여 0.07  $\mu$ g/g을 함유하고 있었다(Table 1-14 & Fig. 1-14).

(다) Phenolic acids : Phenolic acid 분석 결과 chlorogenic acid(10.05  $\rightarrow$  nd), p-hydrobenzoic acid(10.44  $\rightarrow$  nd), p-coumaric acid(1.78  $\rightarrow$  nd), ferulic acid(7.90  $\rightarrow$  nd), t-cinnamic acid(3.01  $\rightarrow$  1.03  $\mu$ g/g)는 숙성 후 검출되지 않거나 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 한편 나머지 phenolic acid 유도체들은 숙성 후 모두 증가하는 경향을 나타내었고 특히 gallic acid(6.47  $\rightarrow$  66.92  $\mu$ g/g)와 vanillic acid(10.89  $\rightarrow$  139.94  $\mu$ g/g) 유도체는 숙성(흑)도라지에서 가장 큰 폭으로 증가하였고 이들은 약 10.34 및 12.39배 만큼 증가하였다. Phenolic acid 총 함량은 원료 추출분말의 경우 72.12  $\mu$ g/g이었으나 숙성(흑)도라지 추출분말은 275.76  $\mu$ g/g이었다(Table 1-14 & Fig. 1-14).

(라) Flavonols : Flavonols 화합물 역시 rutin(15.72  $\rightarrow$  nd)과 catechin gallate(8.68  $\rightarrow$  nd)을 제외하고는 모든 화합물들이 숙성(흑)도라지 추출분말에서 증가하는 결과를 나타내었다. 특히 epigallocatechin 화합물은 481.37  $\mu$ g/g에서 1,348.07  $\mu$ g/g으로 가장 크게 증가하였고 quercetin 역시 158.43  $\mu$ g/g에서 792.11  $\mu$ g/g으로 증가하였다. Flavonols 총 함량 역시 원료 추출분말은 908.02  $\mu$ g/g이었으나 숙성(흑)도라지 추출분말은 2,909.72  $\mu$ g/g으로 큰 차이를 나타내었다(Table 1-14 & Fig. 1-14).

**Table 2-14.** 장백도라지 품종 추출분말의 phytochemicals 화합물 함량

Contents ( $\mu\text{g/g}$ ) <sup>1)</sup>	도라지	숙성(흑)도라지
Triterpenoides		
Platycodin D3	0.29	0.70
Deapioplatycodin D	0.16	0.07
Polygalcin D	nd <sup>2)</sup>	nd
Total	2.45	0.77
Phenolic acid		
Gallic acid	6.47	66.92
Protocatechuic acid	3.59	11.11
Chlorogenic acid	10.05	nd
<i>p</i> -Hydrobenzoic acid	10.44	nd
Vanillic acid	10.89	139.94
<i>p</i> -Coumaric acid	1.78	nd
Ferulic acid	7.90	nd
Vertaric acid	17.99	56.76
<i>t</i> -Cinnamic acid	3.01	1.03
Total	72.12	275.76
Flavonol		
Epigallocatechin	481.37	1348.07
Catechin	103.75	480.72
Epicatechin	68.09	110.45
Epigallocatechin gallate	12.14	42.61
Vanillin	0.31	3.06
Rutin	15.72	nd <sup>2)</sup>
Catechin gallate	8.68	nd
Quercetin	158.43	792.11
Naringin	27.93	82.57
Naringenin	24.54	42.69
Formonoetin	7.06	5.44
Total	908.02	2,909.72

<sup>1)</sup>Value indicated the mean's of three replication ( $n=3$ ).

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

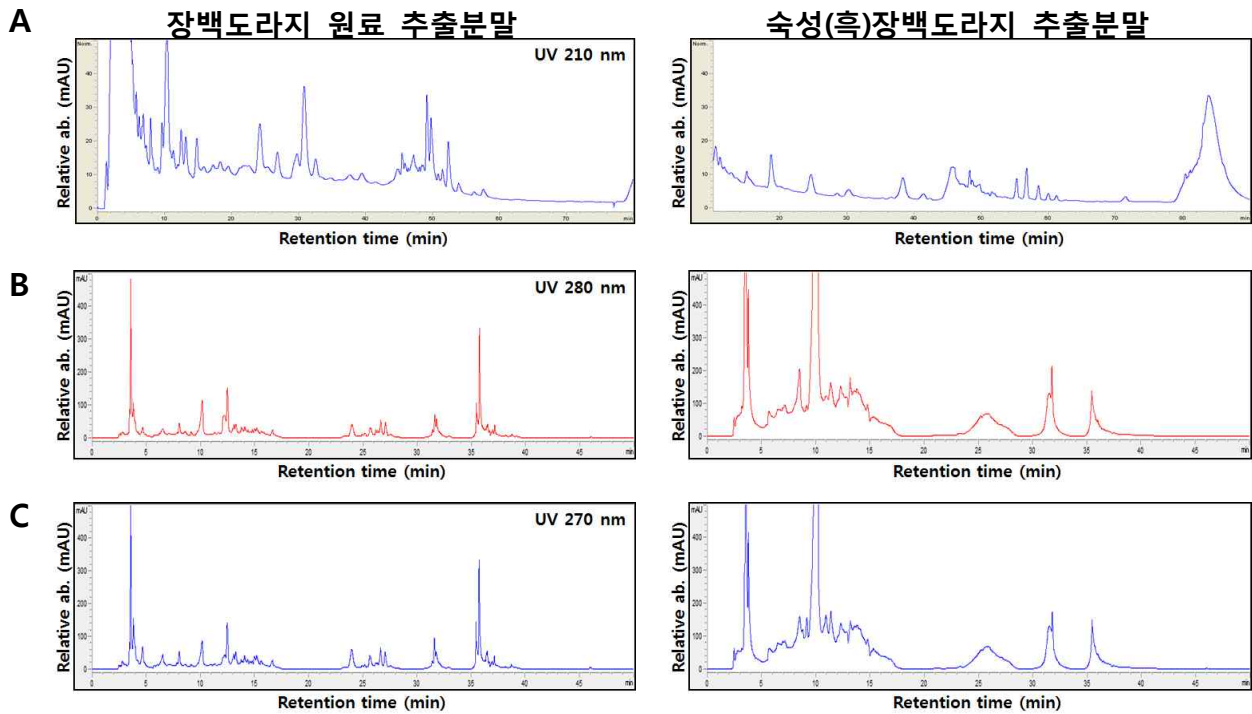


Fig. 2-16. 장백도라지 품종의 숙성(혹)도라지 추출분말의 triterpenoides (A), phenolic acids (B) 및 flavonols (C) 화합물 HPLC 크로마토그램.

(6) 원료와 제조 추출분말의 항산화 활성 : 원료와 숙성(혹)도라지 추출분말의 항산화 활성을 비교 검정한 결과 DPPH 라디칼 소거활성의 경우 도라지 원료에서는 0.25 ~ 10 mg/ml의 농도 처리 시 0.83 ~ 31.66%의 활성을 나타내었다. 숙성(혹)도라지 추출분말에서는 10 mg/ml 처리 시 84.92%로 우수한 DPPH 라디칼 소거활성을 나타내었고 5 mg/ml 농도에서는 57.03%를 나타내어 처리 농도와 비례적인 관계를 나타내었다(Fig. 2-17A). ABTS는 원료 도라지는 10 mg/ml 농도에서 98.59%의 우수한 라디칼 소거활성을 나타내었고 이는 동일 농도에서 DPPH와 비교하였을 시 약 3배 이상 증가한 것으로 나타났다. 숙성(혹)도라지 추출분말 역시 DPPH 보다 좀 더 증가한 형태를 나타내었으며 이는 ABTS의 경우 수용성과 지용성 성분 모두 측정이 가능하기 때문에 활성의 차이가 나타나는 것으로 판단하였다(Fig. 2-17B). 한편  $\cdot\text{OH}$  라디칼 소거활성은 0.25 mg/ml 농도에서 4.26%의 아주 낮은 소거활성을 나타내었으나 10 mg/ml에서는 87.72%를 나타내었고(원료 추출분말), 숙성(혹)도라지 추출분말에서는 90.34%(10 mg/ml)의 좀 더 우수한 라디칼 소거활성을 나타내었다(Fig. 2-17C). FRAP 환원력 측정 결과는 Fig. 2-17D에 나타낸바와 같았다. 원료 추출분말은 최대 0.77의 환원력을 나타내었고 숙성(혹)도라지 추출분말은 최대 2.24의 환원력을 나타내었다.



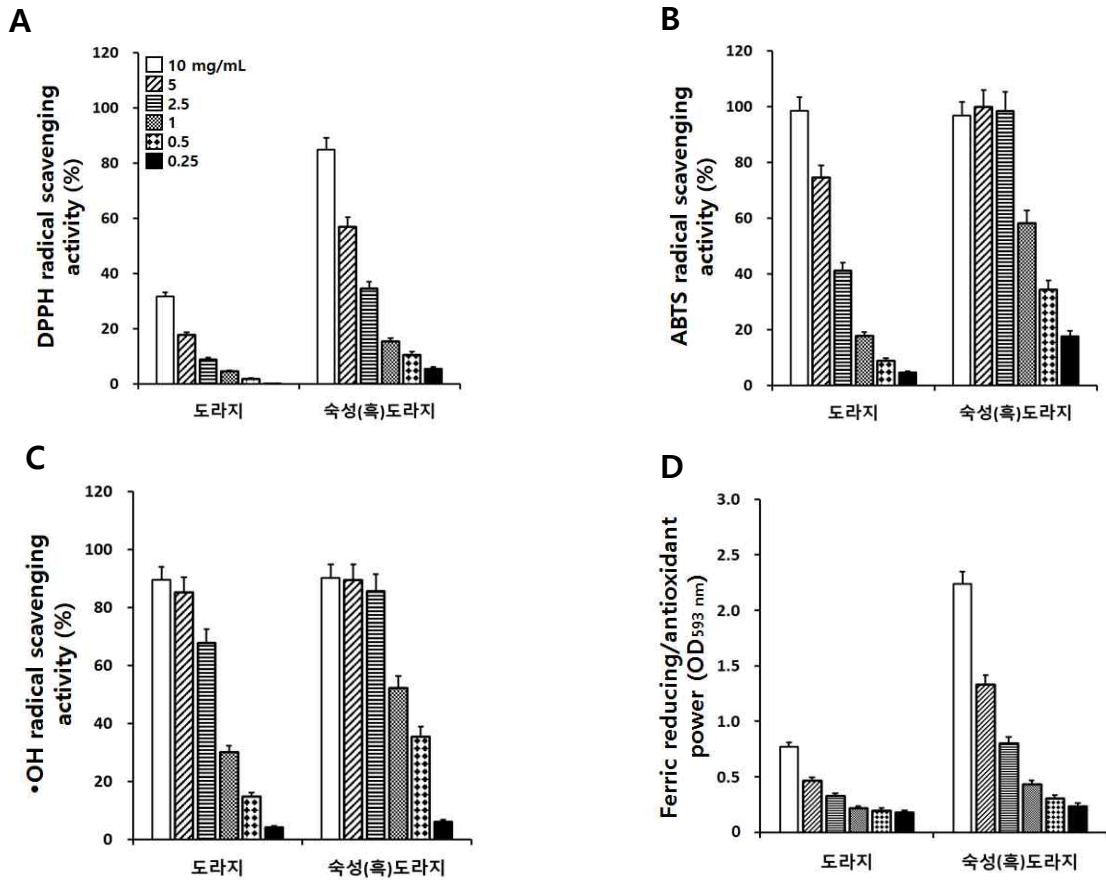


Fig. 2-17. 장백도라지 품종 추출분말의 DPPH (A), ABTS (B)와 hydroxyl (C) 및 FRAP 환원력 (D).

#### 다. 도라지 이용 경옥고환 제품화

(1) 도라지 함유 경옥고환 제조 : 1차년도 도라지 함유 고온숙성법에 의한 십전대보환 제조 기술을 적용하여 고온숙성법을 이용한 도라지 경옥고를 제조하고 이를 저온숙성 건조시켜 분말을 만든 후 대환(공진단) 형태로 제품화하여 우선 한의원 납품하여 매출액을 발생시켰고, 또한 이를 베이스 발효침향환을 제조하여 판매하고 있다.



Fig. 2-18. 도라지 이용 경옥고환 혹은 발효침향환 제품화 공정 및 제품 사진.

### 3-1. 3차년도 연구수행 방법

#### 가. 소환 제품 제조를 위한 분말원료 제조 및 특성

(1) 분말 원료 제조 : 숙성도라지, 맥문동 뿌리, 건지황, 생강, 감초, 뽕나무 뿌리껍질 및 산양삼 분말에 벌꿀과 정제수를 첨가하여 1차년도 십전대보환 제조기술인 고온숙성법을 적용하여 숙성 분말원료를 제조하였다. 아래 Fig. 3-1은 숙성 후 건조하여 분쇄 직전 원료를 나타낸 것이다.



Fig. 3-1. 소환 제품 제조를 위한 제조된 분말 원료.

(2) pH, 산도, 가용성 고형분, 환원당 및 수용성 단백질 : pH 측정은 각각의 분말 1 g에 증류수 10 ml를 첨가하여 분산시킨 후 pH meter(S20 SevenEasy™, Mettler Toledo, Co., Korea)로 측정하였다. 산도 측정은 분말 1 g에 증류수 50 ml를 첨가 및 용해하고 여기에 1% phenolphthalein 시약을 2방울 첨가한 후 선홍색으로 변할때까지 0.1 N-NaOH 용액을 소비하여 소비 ml 수를 구하여 젖산(lactic acid)양으로 총산도를 환산하였다. 가용성 고형분(brix) 함량은 각각의 시료 1 g에 증류수 10 mL를 첨가하고 혼합 후 당도계를 사용하여 측정하였다. 환원당 측정은 Miller의 DNS법(Miller, 1959)을 이용하여 분석하였다. 3,5-Dinitrosalicylic acid 0.5 g과 potassium sodium tartrate 150 g을 2N-NaOH 100 mL에 녹인 후, 증류수로 500 mL을 정용하여 A 용액을 제조하고 phenol 5 mL을 10% NaOH 용액에 녹인 후 증류수를 첨가해 50 mL을 정용 하였다. 이 용액 35 ml에 NaHSO<sub>3</sub> 3.5 g을 녹여 B 용액을 제조하여 A 용액과 B 용액을 혼합한 것을 사용하여 측정하였다. 각각의 분말 1 g에 증류수 10 ml를 첨가 및 혼합하여 일부(0.1 ml)를 시험관에 분주한 후 DNS 시약 1 ml 첨가 후 100°C에서 10분간 발색시켰다. 발색된 반응물은 냉각 후 분광광도계를 사용하여 570 nm에 측정하여 표준 검량곡선과 비교 산출하여 측정하였다. 표준 검량곡선은 glucose를 표준물질로 사용하였다. 수용성 단백질 함량은 biuret 법을 통하여 실시하였다. 즉, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O (황산구리 5수화물) 1.5 g에 KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> · 4H<sub>2</sub>O (주석산칼륨 나트륨) 6.0 g을 500 mL의 증류수에 녹이고 10% NaOH 300 mL를 가한 후 최종 부피가 1,000 mL가 되게끔 정용하여 biuret 시약을 제조하였다. 이 후 시료 1 g을 시험관에 취하고 여

기에 biuret 시약 4 mL를 첨가 및 혼합하여 37°C에서 20분간 반응시켰다. 이때 음성대조구는 증류수를 취하여 진행하였으며 20분 반응 후 3분간 원심분리 하여 상등액을 540 nm에서 흡광도를 측정하고 단백질 표준곡선(bovine serum albumin)에 의해 산출된 계산식에 따라 수용성 단백질을 정량하였다.

**(3) 9대 영양성분, 중금속, 타르색소 및 미생물 분석 :** 9대 영양성분, 중금속, 타르색소 및 미생물 분석은 식품공전법(KFDA, 2010)에 준하여 식품의약품안전처 인증기관((주)한결분석센터)에 의뢰하여 분석된 검사성적서 받아 사용하였다.

**(4) 총 phenolics, flavonoids 및 갈변물질 함량 :**

(가) 총 phenolics : 총 페놀릭스 측정은 Folin-Denis법으로 측정하였다. 장백도라지 원료 및 숙성(혹)도라지 추출물을 각각의 시험관에 0.5 ml씩 분주하고 여기에 25% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 0.5 ml 첨가 후 3분간 정치시켰다. 3분 반응 후 2 N Folin-Ciocalteu phenol 용액 0.25 ml를 첨가 및 혼합하고 30°C에서 1시간 발색시켰다. 발색된 시료는 13,500 rpm의 속도로 3분간 원심분리하여 상등액만을 750 nm에서 분광광도계(UV-1800, 240 V, Shimadzu, Japan)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 이때 총 페놀릭스 함량은 gallic acid를 이용하여 작성한 표준 검량곡선으로부터 값을 산출하였다.

(나) 총 flavonoids : 총 플라보노이드 측정은 Davis변법(Davis, 1947)으로 측정하였다. 즉 장백도라지 원료와 숙성(혹)도라지 각각의 추출물 0.5 ml를 시험관에 분주하고 diethylene glycol 시약 1 ml와 함께 1 N NaOH 0.01 mL를 첨가한 다음 37°C의 수욕상에서 1시간 동안 방치하여 반응을 일으킨 후 분광광도계를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 표준 검량곡선은 rutin을 이용하여 값을 산출하였다.

(다) 갈변물질 함량 : 갈변물질 함량 측정은 각각의 건조 분말 1 g에 10배수의 증류수를 첨가하여 4시간 상온에서 추출한 후 0.45 µm 필터로 여과한 여과액을 420 nm에서 흡광도 값을 측정하여 나타내었다.

**(5) 추출물 제조 :** 2차년도에 확립한 최적의 추출조건으로 추출하였다. 즉, 50 g에 50% 발효 주정 1 L를 가하여 30°C에서 4시간 2회 반복하여 추출물을 제조하였다.

**(6) Triterpenoides, Phenolic acids 및 flavonols 함량 : (제1세부-위탁1과제 협조)**

(가) Triterpenoides 함량 : Triterpenoid 함량 분석은 전처리의 경우 건강기능식품분석법의 인삼 진세노사이드 분석 조건을 변형하여 HPLC를 이용하여 실시하였다. 즉, 전처리의 경우 각각의 분말 1 g을 250 ml 환류용 플라스크에 칭량하고 70% 메탄올 50 ml를 가하여 80°C 수욕상에서 1시간 환류 및 냉각 후 나머지 잔사에 대해 1회 더 반복 실시하여 추출물을 제조하였다. 제조된 추출물을 환저 플라스크에 옮겨 닦고 60°C에서 감압 농축하고 농축물에 증류수 2 ml를 첨가 및 용해시켜 . 0.45 µm 멤브레인 필터로 여과한 것을 시험용액으로 사용하였다. 제조된 시험용액은 C18(TSKgel ODS 100-z) 칼럼이 장착된 High Performance Liquid Chromatography(HPLC, Agilent 1200 series, Agilent Co., Forest Hill, Vic, Australia)로 분석하였다. 이동상 용매는 HPLC water(solution A)와 acetonitrile(solution B)을 사용하였으며 이동상 조건은 A 용액 기준으로 각각 10, 15, 40, 42, 75, 80, 90, 100, 105분간 81, 81, 80, 77, 70, 65, 30, 10, 10, 10, 81%로 유지시켰으며 이동상의 유속은 30°C에서 10 µl를 주입하고 1분당 1 ml의 속도로 203 nm에서 정량하였다.

(나) Phenolic acids 및 flavonol 함량 : Cho 등(2011)의 방법을 약간 변형하여 HPLC로 분석하였다. 이동상 용매는 2.0% glacial acetic acid in water(solution A) 와 2.0% glacial acetic acid in acetonitrile(solution B)로 분석하였고, 이동상 조건은 solvent B를 기준으로 각각 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 55 및 60분간 15%, 5%, 15%, 5%, 10%, 50%, 50%, 60%, 80% 및 90%로 유지시켰다. 시료는 20  $\mu$ l를 주입하였고 이동상의 속도는 30 $^{\circ}$ C 칼럼에서 1분당 1 ml의 속도로 유지하였고 phenolic acids 함량은 diode array UV detector(Agilent 1200 series, Agilent Co.)의 흡광도 280 nm에서 정량하였고, flavonols 함량은 270 nm에서 정량 분석하였다.

#### (7) 항산화 활성 측정:

(가) DPPH radical : DPPH 시약 0.8 ml와 각각의 추출물 0.2 ml를 가해 암실에서 30분간 방치 후 분광광도계를 사용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(나) ABTS radical : 2.45 mM  $K_2S_2O_8$  5 mL과 7 mM ABTS $^{•+}$  5 mL를 혼합한 후 암실에서 16시간가량 방치시켜 ABTS $^{•+}$  양이온 라디칼을 형성시킨 후 732 nm에서 대조구의 흡광도 값이  $0.7 \pm 0.02$ 가 되도록 조절한 ABTS $^{•+}$  용액 0.9 ml와 추출물 0.1 ml를 첨가하여 3분간 정치 시켜 732 nm에서 분광광도계를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

(다) Hydroxyl( $\bullet$ OH) radical : 10 mM  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ -EDTA 0.2 mL, 10 mM 2-deoxyribose 0.2 mL, 10 mM  $H_2O_2$  0.2 mL 및 농도별 추출물 1.4 mL를 혼합하고 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 동안 반응시켰다. 이 반응액에 1% thiobarbituric acid와 2.8% trichloroacetic acid를 각각 1 ml를 가하여 100 $^{\circ}$ C에서 20분간 가열하고 발색 및 냉각시켜 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조구 실험은 시료 대신에 PBS 완충액(NaCl 8.76 g,  $NaH_2PO_4$  0.11 g,  $Na_2HPO_4$  0.596 g)을 사용하였고 전자공여능은 시료용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도의 차이를 백분율(%)로 나타내었다 (Shin 등, 2012).

(라) Ferruic Reducing Antioxidant Power(FRAP) assay : FRAP 환원력 측정은 먼저 acetate buffer(30 mM, pH 3.6), TPTZ 시약(10 mM, in 40 mM HCl), 및  $FeCl_3$  용액(20 mM in DW)을 일련의 방법에 따라 제조 후 10:1:1(v/v/v)의 비율로 혼합한 시약 0.95 ml에 시료 0.05 ml를 첨가하고 37 $^{\circ}$ C의 수욕상에서 15분간 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도 값을 측정하여 나타내었다.

#### (7) 소화효소 저해활성 :

(가)  $\alpha$ -Glucosidase : 각 농도별 추출물 50  $\mu$ l,  $\alpha$ -glucosidase(0.5 U/ml) 효소용액 50  $\mu$ l, 200 mM 인산나트륨 완충용액(pH 6.8) 50  $\mu$ l를 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 예비반응 시켰다. 이후 인산나트륨 완충용액(pH 6.8)에 녹인 *p*-NPG(5 mM) 100  $\mu$ l를 가하여 다시 37 $^{\circ}$ C에서 10분 반응시켰다. 이 반응액에  $Na_2CO_3$ (100 mM) 0.75 ml를 가해 최종 반응을 정지시킨 후 420 nm에서 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

(나) Pancreatic lipase : Kwon 등(21)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 추출물 50  $\mu$ l, lipase(1.0 U/ml) 효소용액 50  $\mu$ l, 및 200 mM 인산나트륨 완충용액(pH 6.8) 50  $\mu$ l를 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 예비 반응시켰다. 반응 후 인산나트륨 완충용액에 녹인 *p*-NPB(5 mM) 100  $\mu$ l를 가하여 동일하게 10분간 반응시킨 후 100 mM  $Na_2CO_3$  0.75 ml를 가해 반응을 종결시켜 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 효소 저해능의 음성대조구는 시료 대신에 추출용매를 취하였으며 시료용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

## 나. 스틱 액상 제품 제조를 위한 액상원료 제조 및 특성

(1) 액상원료 제조 : 숙성도라지 30%, 맥문동 뿌리 6%, 건지황 6%, 생강 3%, 감초 3%, 뽕나무 뿌리껍질 2.4%, 산양삼 추출액 0.6%를 혼합한 후 혼합된 재료 1 kg에 정제수를 10배(10 L) 가수한 후 100℃에서 8시간 추출하여 액상원료를 제조하였다(Fig. 3-2).



Fig. 3-2. 스틱 액상 제품 제조를 위한 제조된 액상원료.

(2) pH, 산도, 가용성 고형분, 환원당 및 수용성 단백질 : 상기에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

(3) 9대 영양성분, 중금속, 타르색소 및 미생물 분석 : 9대 영양성분, 중금속, 타르색소 및 미생물 분석은 식품공전법(KFDA, 2010)에 준하여 식품의약품안전처 인증기관((주)한결분석센터)에 의뢰하여 분석된 검사성적서 받아 사용하였다.

(4) 총 phenolics, flavonoids 및 갈변물질 함량 : 상기에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

(6) Triterpenoides, Phenolic acids 및 flavonols 함량 : 상기에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

(7) 항산화 활성과 소화효소 저해활성 측정: 상기에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

## 다. 스틱 액상 제품 제조 : 숙성도라지 플러스업

(1) 상품기획 : 1위탁기관과 숙성도라지 플러스업에 대한 상품기획을 진행하였다.

(2) 숙성도라지 플러스업 제조 : 숙성도라지 플러스업 제조는 숙성도라지 30%, 맥문동 뿌리 6%, 건지황 6%, 생강 3%, 감초 3%, 뽕나무 뿌리껍질 2.4%, 산양삼 추출액 0.6%, 쌀조청 40%에 정제수를 혼합하여 스틱형 액상 제품을 제조하였다. 제조공정도와 제품 사진은 아래 Fig. 3-?과 같다.

(2) pH, 산도, 가용성 고형분, 환원당 및 수용성 단백질 : 상기에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

(3) 9대 영양성분, 중금속, 타르색소 및 미생물 분석 : 9대 영양성분, 중금속, 타르색소 및 미생물 분석은 식품공전법(KFDA, 2010)에 준하여 식품의약품안전처 인증기관((주)한결분석센터)에 의뢰하여 분석된 검사성적서 받아 사용하였다.

(4) 총 phenolics, flavonoids 및 갈변물질 함량 : 상기에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

(6) Triterpenoides 함량 : 상기에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

(7) 항산화 활성과 소화효소 저해활성 측정: 상기에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

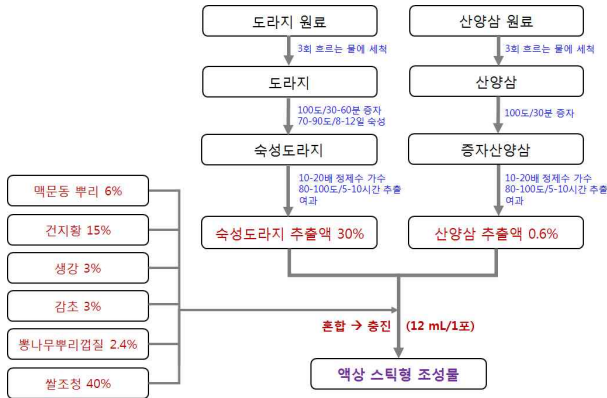


Fig. 3-3. 숙성도라지 플러스업 제조 공정.

### 라. 스틱 액상 제품의 면역 효능 평가 : 숙성도라지 플러스업

(1) Cell viability : 대식세포주인 Raw 264.7 세포를 96 well plate에  $5 \times 10^4$  cell/well seeding 후 22시간 37°C incubator에 방치하고 농도별 sample 처리 후 20시간 CO<sub>2</sub> incubator에 방치하였다. 상층액 80  $\mu$ l 냉동보관 후 남은 액체가 없도록 물기 제거하였다. EZ-CYTOX 1ml, DMEM 9 ml 섞어 각 well에 100  $\mu$ l씩 분주하고 control O.D. 값과 비교하여 30분 후 plate reader 기기로 흡광도 450 nm 측정하였다.

(2) Nitric Oxide assay : 대식세포주인 Raw 264.7 세포를 96 well plate에  $5 \times 10^4$  cell/well seeding 후 22시간 37°C에 incubator에 방치한 후 농도별 sample 처리 후 20시간 CO<sub>2</sub> incubator에 방치하였다. Cell viability 실험에서 냉동보관 한 상층액을 Griess reagent 시약과 동일한 양을 넣어주고 plate reader 기기로 흡광도 550 nm 측정하였다.

(3) 사이토카인 IL-6 : 대식세포주인 Raw 264.7 세포를 96 well plate에  $5 \times 10^4$  cell/well seeding 후 22시간 37°C에 incubator에 방치한 후 농도별 sample 처리 후 20시간 CO<sub>2</sub> incubator에 방치하였다. 상층액을 sample로 사용하였고 coating buffer에 capture antibody를 1/250 희석하여 50  $\mu$ l씩 분주하여 4°C에서 overnight 보관하고 wash buffer로 3 time wash (100  $\mu$ l 분주) 하였다. Assay diluent 100  $\mu$ l block plate 실온 1시간 방치하고 washing 3 time 후 standard, sample, control 각 50  $\mu$ l씩 분주 후 2시간 방치하였다. Washing 5 time 후 working detector (Detection Antibody + Sav-HRP reagent) 50  $\mu$ l씩 분주 후 실온 1시간 방치하고 washing 7 time 후 substrate solution 각 50ul씩 분주 후 dark room 30분 방치하였다. Stop Solution 각 25  $\mu$ l씩 분주 후 plate reader 기기로 흡광도 450 nm 측정하였다.

(4) 사이토카인 TNF- $\alpha$  : 대식세포주인 Raw 264.7 세포를 96 well plate에  $5 \times 10^4$  cell/well seeding 후 22시간 37°C에 incubator에 방치한 후 농도별 sample 처리 후 20시간 CO<sub>2</sub> incubator에 방치하였다. 상층액을 sample로 사용하였고 coating Buffer에 Capture Antibody를 1/250 희석하여 50  $\mu$ l씩 분주하여 4°C에서 overnight 보관하였다. Wash Buffer로 3 time wash (100  $\mu$ l 분주)하고 ELISA/ELISASPOT diluent 100  $\mu$ l block plate 실온 1시간 방치하였다. Washing 3 time 후 standard, sample, control 각 50  $\mu$ l씩 분주 후 2시간 방치하고 washing 5 time 후 detection

antibody 각 50 µl씩 분주한 후 실온 1시간 방치하였다. Washing 3 time 후 Avidin-HRP 각 50 µl씩 분주 후 실온 30분 방치하고 washing 5 time 후 TMB Solution 각 50 µl씩 분주 후 15분 방치하고 stop solution 각 25 µl씩 분주 후 plate reader 기기로 흡광도 450nm 측정하였다.

(5) **Real time PCR** : 대식세포주인 Raw 264.7 세포를 6well plate에  $1 \times 10^6$  cell/well seeding 후 22시간 CO<sub>2</sub> incubator에 방치하고 농도별 sample 6시간 처리 후 Tri reagent를 이용하여 세포를 처리하였다. 250 µl chloroform을 분주 한 후 최소 3회 이상 mixing하고 centrifuge 12000 rpm/15min 후 상등액을 새 tube에 옮긴 후 동량의 isopropanol을 넣은 후 10회 이상 mixing 후 10분 상온 방치하였다. Centrifuge 12000 rpm/15min 후 상등액 버리고 pellet에 70% EtOH 1 ml mixing하고 centrifuge 12000 rpm/1min 후 상등액 300 µl 버린 후 Centrifuge 12000 rpm/1min 후 상등액 최대한 버리고 실온에서 10분간 건조하고 DEPC water 50 µl씩 mixing 후 RNA 정량하였다. mRNA 합성 후 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 이용하여 cDNA 합성 후 Real time PCR 기기로 각 Primer(표 1)에 맞게 온도 설정 후 측정하였다.

### 3-2. 3차년도 연구결과

#### 가. 소환 제품 제조를 위한 분말원료의 특성

(1) **이화학적 특성** : 소환제품 제조를 위한 분말원료의 이화학적 특성은 Table 3-1과 같았다. 분말원료의 pH는 4.13으로 나타났으며 젖산으로 환산하였을 때 총 산도는 0.71%로 나타났다. Brix는 28.3%로 나타났으며 환원당은 265.75 mg/g으로 나타났다. 뷰렛법에 의한 단백질 함량은 86.26 mg/mL으로 나타났다.

Table 3-1. 분말원료의 이화학적 특성

Sample	pH	Acidity (%, as lactic acid)	Brix(%)	Reducing sugar(mg/g)	Protein (mg/mL)
분말원료	4.13	0.71	28.3	265.75	86.26

All values are means of determinations in three independent experiments.

(2) **9대 영양성분** : 소환제품 제조를 위한 분말원료의 9대 영양성분은 Table 3-2와 같았다. 원료는 379 Kcal의 열량을 보였으며 탄수화물, 지방 및 단백질의 함량은 각각 89 g, 1.2 g 및 3 g으로 나타났다. 나트륨의 경우 20 mg의 함량을 보였으며 당류는 48 g의 함량을 나타내었다. 단면 포화지방, 트랜스지방 및 콜레스테롤은 함유하지 않았다.

Table 3-2. 분말원료의 9대 영양성분

Sample	열량 (Kcal)	나트륨 (mg)	탄수화물 (g)	당류 (g)	지방 (g)	포화지방 (g)	트랜스 지방 (g)	콜레스테롤 (mg)	단백질 (g)
분말원료	379	20	89	48	1.2	0	0	0	3

All values are means of determinations in three independent experiments.

(3) **미생물, 중금속 및 타르색소** : 소환제품 제조를 위한 분말원료의 미생물, 중금속 및 타르색소 분석은 Table 3-3과 같았다. 미생물 검사 중 일반세균수는 110 cfu/g으로 나타났으며

대장균은 음성으로 나타났다. 타르색소는 검출되지 않았으며 중금속 중 카드뮴 또한 검출되지 않았다. 한편 비소와 납은 각각 0.2 mg/kg 및 0.4 mg/kg으로 나타났다.

**Table 3-3.** 분말원료의 미생물, 중금속, 타르색소

Sample	미생물 (cfu/g)		타르색소	중금속 (mg/kg)		
	일반세균수	대장균		카드뮴	비소	납
분말원료	110	음성	불검출	불검출	0.2	0.4

All values are means of determinations in three independent experiments.

**(4) 총 phenolics, flavonoids 및 갈변물질**

(가) 총 phenolics : 소환제품 제조를 위한 분말원료의 총 phenolics는 Table 3-4와 같았다. 총 phenolics 함량은 0.81 mg/mL로 나타났다.

(나) 총 flavonoids : 분말원료의 총 flavonoids는 Table 3-4와 같았다. 총 flavonoids 함량은 1.50 mg/mL로 나타났다.

(다) 갈변물질 : 분말원료의 갈변물질은 Table 3-4와 같았다. 원료의 갈변물질은 5.016 OD<sub>420nm</sub>로 측정되었다.

**Table 3-4.** 분말원료의 총 phenolics, 총 flavonoids 및 갈변물질

Sample	Total phenolics (mg/mL)	Total flavonoids (mg/mL)	Browning degree (OD <sub>420 nm</sub> )
분말원료	0.81	1.50	5.016

All values are means of determinations in three independent experiments.

**(5) Triterpenoides, Phenolic acids 및 flavonols : (제1세부-위탁1과제 협조)**

(가) Triterpenoides : 소환제품 제조를 위한 분말원료의 triterpenoides는 Table 3-5 및 Fig. 3-4A와 같았다. Triterpenoides 중 platygodin D3의 함량은 3.38 μg/g으로 나타났고 Deapioplatygodin D는 0.47 μg/g으로 나타났다. 또한 ginsenoside Ro는 1.74 μg/g으로 나타났다.

(나) Phenolic acids : 분말원료의 phenolic acids 화합물은 Table 3-5 및 Fig. 3-4B와 같았다. Phenolic acids 화합물 중 gallic acid는 27.79 μg/g으로 나타났으며 vanillic acid는 31.98 μg/g으로 나타났다. Vertaric acid는 10.71 μg/g으로 나타났으나 ferulic acid는 검출되지 않았다.

(다) Flavonols : 분말원료의 flavonols 화합물은 Table 3-5 및 Fig. 3-4C와 같았다. Catechin의 경우 324.70 μg/g으로 나타났으며 epicatechin은 234.91 μg/g으로 나타났다. Vanillin, rutin 및 catechin gallate는 검출되지 않았다.



**Table 3-5.** 분말원료의 phytochemicals 화합물 함량

Contents ( $\mu\text{g/g}$ ) <sup>1)</sup>	분말원료
<b>Triterpenoides</b>	
Platycodin D3	3.38
Deapioplatycodin D	0.47
Ginsenoside Ro	1.74
Total	5.59
<b>Phenolic acid</b>	
Gallic acid	27.79
Protocatechuic acid	94.67
Chlorogenic acid	426.34
<i>p</i> -Hydrobenzoic acid	88.49
Vanillic acid	31.98
<i>p</i> -Coumaric acid	55.34
Ferulic acid	nd <sup>2)</sup>
Vertaric acid	10.71
<i>t</i> -Cinnamic acid	0.08
Total	735.40
<b>Flavonol</b>	
Epigallocatechin	2502.81
Catechin	324.70
Epicatechin	234.91
Epigallocatechin gallate	nd
Vanillin	nd
Rutin	nd
Catechin gallate	nd
Quercetin	79.20
Naringin	8.18
Naringenin	0.27
Formonoetin	2.41
Total	3,152.48

<sup>1)</sup>Value indicated the mean's of three replication ( $n=3$ ).

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

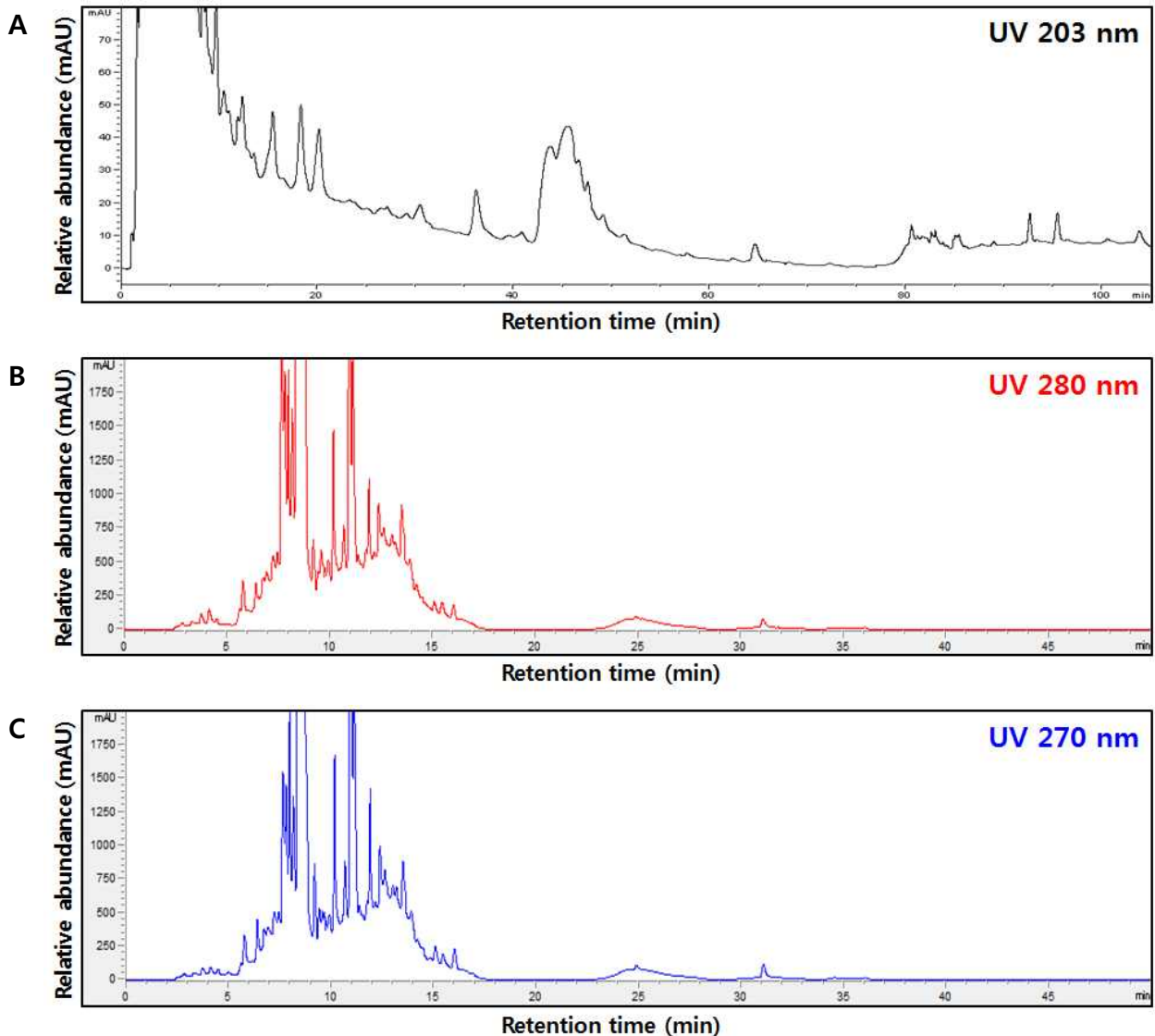


Fig. 3-4. 분말원료의 triterpenoides (A), phenolic acids (B) 및 flavonols (C) 화합물 HPLC 크로마토그램.

#### (6) 항산화 활성 측정

(가) DPPH radical : 소환제품 제조를 위한 분말원료의 항산화 활성 중 DPPH 라디칼 소거 활성은 Fig. 3-5A와 같았다. 분말의 농도가 1 mg/mL일 때 85.45%의 활성을 보였으며 0.5 mg/mL일 때 43.88% 그리고 0.25 mg/mL일 때 23.20%의 활성을 나타내었다.

(나) ABTS radical : 분말원료의 ABTS 라디칼 소거활성은 Fig. 3-5B와 같았다. 1 mg/mL의 농도에서는 100.49%의 활성을 보였으며 0.5 mg/mL일 때 90.14%로 나타났다. 또한 0.25 mg/mL의 농도일 때 76.51%의 활성을 보였다.

(다) Hydroxyl( $\bullet$ OH) radical : 분말원료의 hydroxyl 라디칼 소거활성은 Fig. 3-5C와 같았다. 농도가 1, 0.5 및 0.25 mg/mL일 때 각각 40.54, 34.58 및 9.82%의 활성을 나타냈었다.

(라) Ferric Reducing Antioxidant Power(FRAP) assay : 분말원료의 FRAP 환원력은 Fig. 3-5D와 같았다. 분말원료의 농도에 따라 각각 2.567, 1.060 및 0.620  $OD_{593nm}$ 로 나타났다.

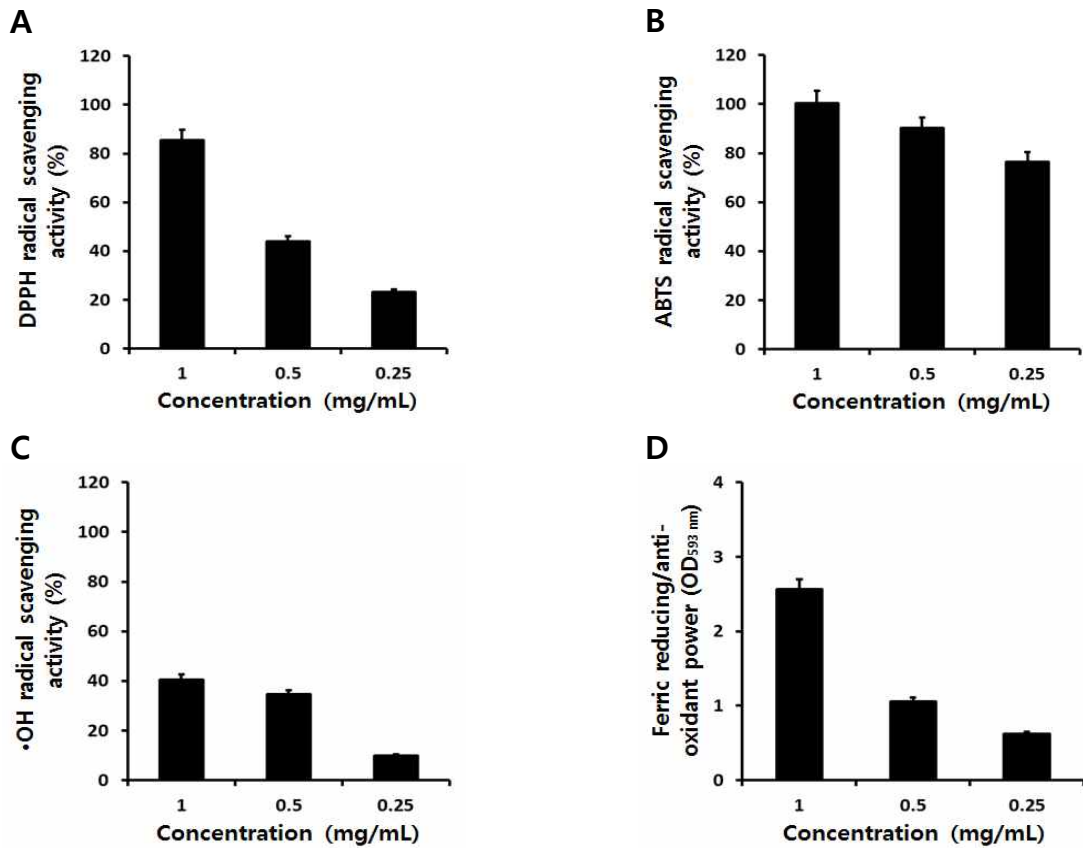


Fig. 3-5. 분말원료의 DPPH (A), ABTS (B)와 hydroxyl (C) 및 FRAP 환원력 (D).

### (7) 소화효소 저해활성

(가)  $\alpha$ -Glucosidase : 소환제품 제조를 위한 분말원료의 소화효소 저해활성 중  $\alpha$ -glucosidase는 Fig. 3-6A와 같았다. 1 mg/mL의 농도일 때 73.12%를 나타내었으며, 0.5 mg/mL 일 때 54.71%로 나타났으며 0.25 mg/mL일 때 38.03%의 저해활성을 나타내었다.

(나) Pancreatic lipase : 분말원료의 pancreatic lipase는 Fig. 3-6B와 같았다. 농도가 1, 0.5 및 0.25 mg/mL일 때 활성은 각각 38.43, 25.84 및 9.90%의 활성을 보였다.

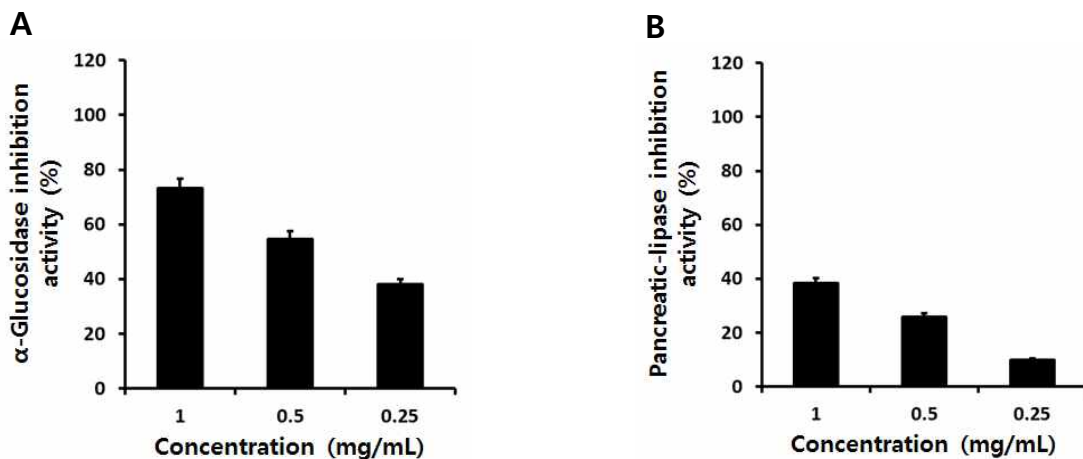


Fig. 3-6. 분말원료의  $\alpha$ -glucosidase (A) 및 췌장-lipase (B) 저해활성.

**나. 스틱 액상 제품 제조를 위한 액상원료의 특성**

(1) **이화학적 특성** : 스틱 액상 제품 제조를 위한 액상원료의 이화학적 특성은 Table 3-?와 같았다. 액상원료의 pH는 4.04로 측정되었으며 총 산도는 0.74%으로 나타났다. Brix는 6.5%로 측정되었으며 환원당은 60.48 mg/g으로 나타났다. 수용성 단백질의 함량은 43.43 mg/mL로 나타났다.

**Table 3-6. 액상원료의 이화학적 특성**

Sample	pH	Acidity (%, as lactic acid)	Brix(%)	Reducing sugar(mg/g)	Protein (mg/mL)
액상원료	4.04	0.74	6.5	60.48	43.43

All values are means of determinations in three independent experiments.

(2) **9대 영양성분** : 스틱 액상 제품 제조를 위한 액상원료의 9대 영양성분은 Table 3-?와 같았다. 액상제품의 열량은 20 Kcal로 나타났으며 나트륨은 5 mg 그리고 당류는 2 g으로 나타났다. 탄수화물은 5 g으로 나타났으나 지방과 단백질은 함유되어있지 않았다. 또한 포화지방, 트랜스지방 및 콜레스테롤의 경우에도 액상제품에 함유되어있지 않았다.

**Table 3-7. 액상원료의 9대 영양성분**

Sample	열량 (Kcal)	나트륨 (mg)	탄수화물( g)	당류 (g)	지방 (g)	포화지방 (g)	트랜스 지방 (g)	콜레스테롤 (mg)	단백질 (g)
액상제품	20	5	5	2	0	0	0	0	0

All values are means of determinations in three independent experiments.

(3) **미생물, 중금속 및 타르색소** : 스틱 액상 제품 제조를 위한 액상원료의 미생물, 중금속 및 타르색소는 Table 3-?와 같았다. 액상원료에서 일반세균과 대장균은 검출되지 않았다. 또한 타르색소와 중금속 중 카드뮴과 비소 역시 검출되지 않았다. 반면, 납은 0.1 mg/kg로 나타났다.

**Table 3-8. 액상원료의 미생물, 중금속 및 타르색소**

Sample	미생물 (cfu/mL)		타르색소	중금속 (mg/kg)		
	일반세균수	대장균		카드뮴	비소	납
액상제품	불검출	음성	불검출	불검출	불검출	0.1

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

**(4) 총 phenolics, flavonoids 및 갈변물질 함량 :**

(가) **총 phenolics** : 스틱 액상 제품 제조를 위한 액상원료의 총 phenolics 함량은 Table 3-?와 같았다. 원상원료에서는 0.47 mg/mL의 함량을 나타내었다.

(나) **총 flavonoids** : 액상원료의 총 flavonoids 함량은 Table 3-?와 같았다. 액상원료 중 0.96 mg/mL의 함량을 함유하고 있었다.

(다) **갈변물질** : 액상원료의 갈변물질은 Table 3-?와 같았다. 갈변물질은 420nm에서 3.150의 수치를 보였다.

**Table 3-9.** 액상원료의 총 phenolics, flavonoids 및 갈변물질 함량

Sample	Total phenolics (mg/mL)	Total flavonoids (mg/mL)	Browning degree (OD <sub>420 nm</sub> )
액상원료	0.47	0.96	3.15

All values are means of determinations in three independent experiments.

**(5) Triterpenoides, Phenolic acids 및 flavonols 함량 : (제1세부-위탁1과제 협조)**

(가) Triterpenoides : 스틱 액상 제품 제조를 위한 액상원료의 triterpenoides는 Table 3-?과 Fig. 3-?A와 같았다. Platycodis D3는 2.43  $\mu\text{g/g}$ , deapioplatycodin D는 0.34  $\mu\text{g/g}$ 의 함량을 나타내었다. Ginsenoside Rb1은 0.22  $\mu\text{g/g}$ , ginsenoside F2는 0.04  $\mu\text{g/g}$  그리고 ginsenoside compound K는 0.05  $\mu\text{g/g}$ 의 함량을 나타내었다.

(나) Phenolic acids : 액상원료의 phenolic acids 화합물은 Table 3-?과 Fig. 3-?B와 같았다. Protocatechuic acid의 경우 373.63  $\mu\text{g/g}$ , p-coumaric acid는 48.63  $\mu\text{g/g}$  그리고 t-cinnamic acid는 0.39  $\mu\text{g/g}$ 의 함량을 보였으나 ferulic acid의 경우에는 검출되지 않았다.

(다) Flavonols : 액상원료의 flavonol 화합물은 Table 3-?과 Fig. 3-?C와 같았다. flavonol 화합물 중 epigallocatechin은 2635.82  $\mu\text{g/g}$ 으로 나타났으며 quercetin은 91.26  $\mu\text{g/g}$  그리고 naringin은 41.11  $\mu\text{g/g}$ 의 함량을 나타내었다. 한편, vanillin, rutin 및 catechin gallate는 검출되지 않았다.

**Table 3-10. 액상원료의 phytochemicals 화합물 함량**

Contents ( $\mu\text{g/g}$ ) <sup>1)</sup>	액상원료
<b>Triterpenoides</b>	
Platycodin D3	2.43
Deapioplatycodin D	0.34
Polygalcin D	0.02
Ginsenoside Ro	1.28
Ginsenoside Rb1	0.22
Ginsenoside Rd2	0.33
Ginsenoside F2	0.04
Ginsenoside Rg3	0.04
Ginsenoside C.K	0.05
Protopanaxdiol	0.09
Total	4.84
<b>Phenolic acid</b>	
Gallic acid	136.06
Protocatechuic acid	373.63
Chlorogenic acid	1601.20
<i>p</i> -Hydrobenzoic acid	242.76
Vanillic acid	87.87
<i>p</i> -Coumaric acid	48.63
Ferulic acid	nd <sup>2)</sup>
Vertaric acid	26.76
<i>t</i> -Cinnamic acid	0.39
Total	2,519.30
<b>Flavonol</b>	
Epigallocatechin	2635.82
Catechin	1394.60
Epicatechin	441.65
Epigallocatechin gallate	232.62
Vanillin	nd
Rutin	nd
Catechin gallate	nd
Quercetin	91.26
Naringin	41.11
Naringenin	3.37
Formonoetin	3.47
Total	4,843.90

<sup>1)</sup>Value indicated the mean's of three replication ( $n=3$ ).

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

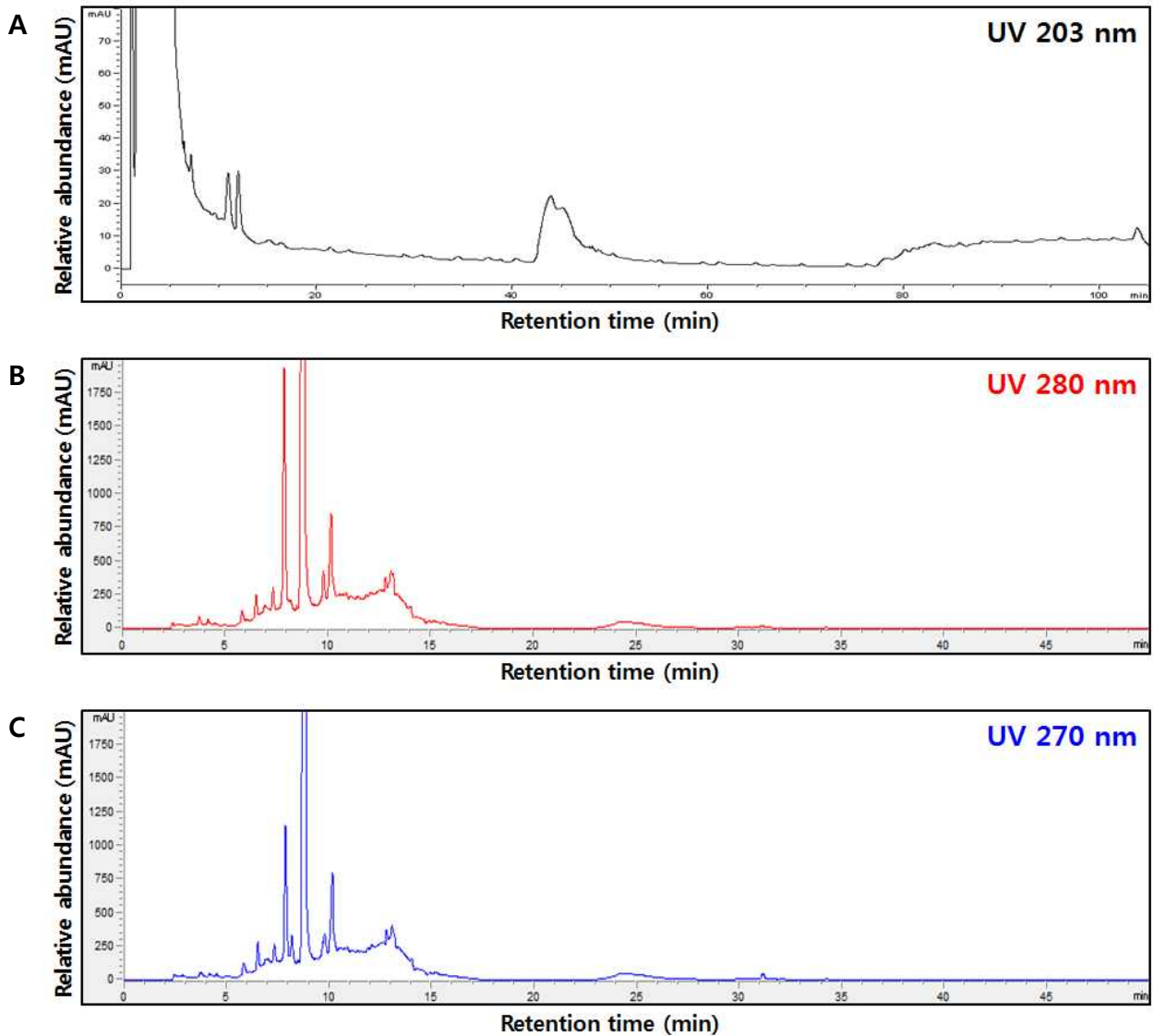


Fig. 3-7. 액상원료의 triterpenoides (A), phenolic acids (B) 및 flavonols (C) 화합물 HPLC 크로마토그램.

### (6) 항산화 활성 측정

(가) DPPH radical : 스틱 액상 제품 제조를 위한 액상제품의 항산화 활성 중 DPPH 라디칼 소거 활성은 Fig. 3-?A와 같았다. 액상제품의 농도가 0.05 mg/mL일 때 52.07%의 활성을 나타내었다. 0.02 mg/mL일 때 25.27%로 나타났으며 0.01 mg/mL일 때 16.51%의 활성을 나타내었다.

(나) ABTS radical : 액상제품의 ABTS 라디칼 소거 활성은 Fig. 3-?B와 같았다. 0.05 mg/mL의 농도일 때 99.86%의 활성을 보였으며 0.02 mg/mL 및 0.01 mg/mL의 농도일 때 각각 86.72% 및 60.84%의 활성을 보였다.

(다) Hydroxyl( $\bullet$ OH) radical : 액상제품의 hydroxyl 라디칼 소거 활성은 Fig. 3-?C와 같았다. 각 농도에 따라 0.05 mg/mL일 때 36.68%, 0.02 mg/mL - 22.27% 및 0.01 mg/mL - 9.35%의 활성을 나타내었다.

(라) Ferric Reducing Antioxidant Power(FRAP) assay : 액상제품의 FRAP 환원력은 Fig.

3-?D와 같았다. 0.05 mg/mL의 농도에서 1.392  $OD_{593nm}$ 의 수치를 보였고, 0.02 mg/mL의 농도일 때 0.68  $OD_{593nm}$  그리고 0.01 mg/mL의 농도일 때 0.417  $OD_{593nm}$ 의 수치를 보였다.

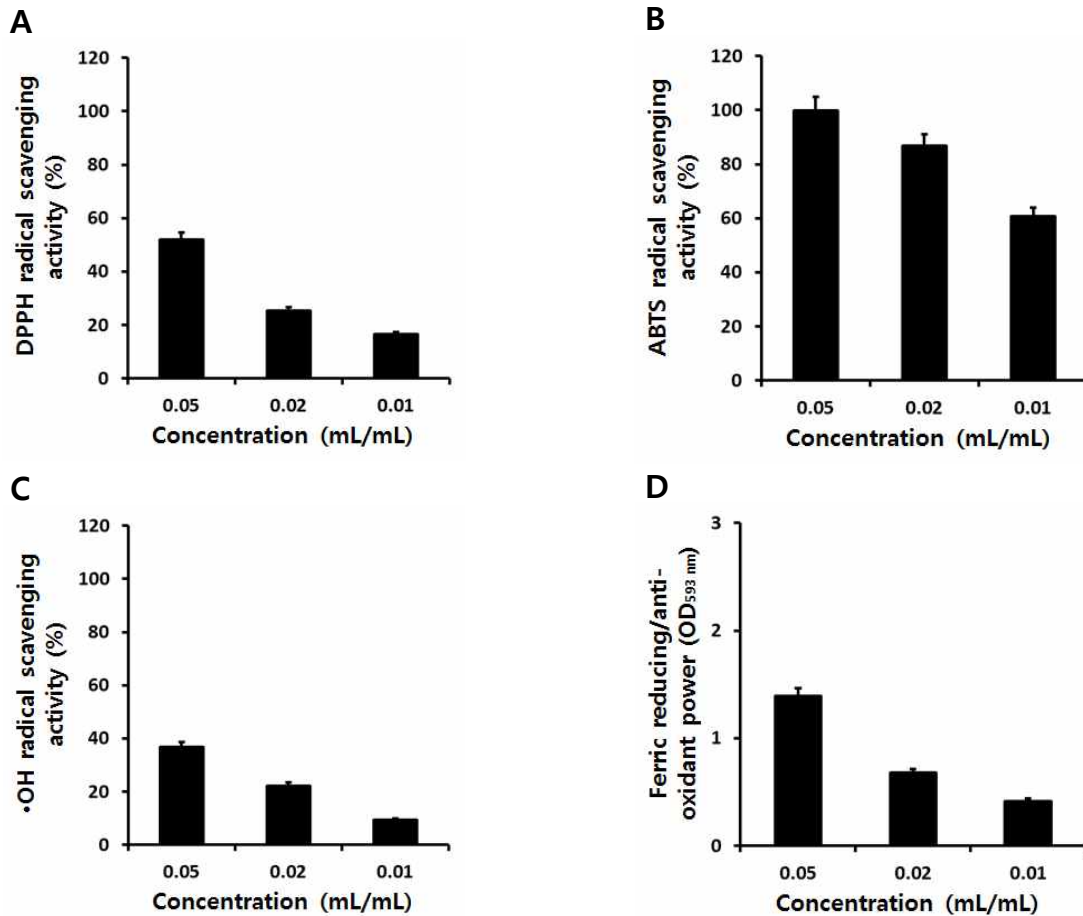


Fig. 3-10. 액상원료의 DPPH (A), ABTS (B)와 hydroxyl (C) 및 FRAP 환원력 (D).

### (7) 소화효소 저해활성

(가)  $\alpha$ -Glucosidase : 스틱 액상 제품 제조를 위한 액상원료의 소화효소 저해활성 중  $\alpha$ -glucosidase는 Fig. 3-?A와 같았다. 0.05 mg/mL의 농도를 가질 때 88.12%의 활성을 나타내었다. 0.02 mg/mL의 농도일 때 77.52% 그리고 0.01 mg/mL의 농도일 때 48.84%의 소화효소 저해활성을 나타내었다.

(나) Pancreatic lipase : 액상원료의 췌장 lipase는 Fig. 3-?B와 같았다. 원료의 농도가 0.05, 0.02 및 0.01 mg/mL일 때 각 활성은 43.28, 31.32 및 12.65%로 나타내었다.



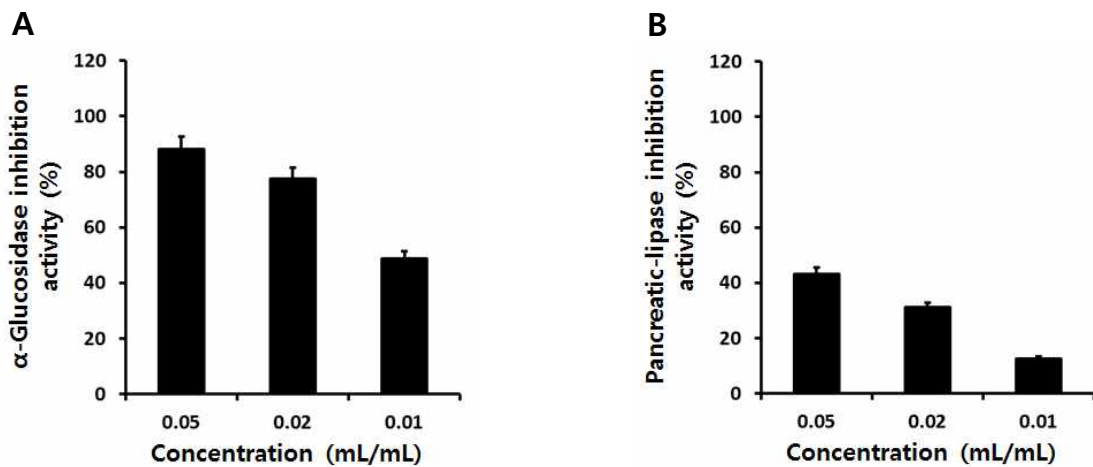


Fig. 3-11. 액상원료의  $\alpha$ -glucosidase (A) 및 췌장-lipase (B) 저해활성.

#### 다. 스틱 액상 제품의 상품기획 : 숙성도라지 플러스업 - 1위탁기관과 공동진행

##### (1) 국내·외 시장 동향 :

###### (가) 국내 건강식품 시장 동향 :

○ 생활수준 향상, 노령인구의 증가, 건강에 관한 관심이 증가하면서 건강기능식품 섭취가 지속적으로 증가하고 있으며, 의약품에만 의존하지 않고 건강기능식품과의 상호작용을 원하는 소비자들이 늘고 있음

○ 농림축산식품부 마켓분석 보고서에 따르면 2017년 건강기능식품 시장은 다양한 효능이나 질병에 따라 신제품 출시가 활발한 편이며, 이에 ‘특정 타겟을 겨냥한 신제품 출시’와 ‘식품제조업체의 시장 확대’ 등으로 요약해 볼 수 있음

○ 식품의약품안전처에 따르면 국내 건강기능식품 시장 규모는 2017년 기준 전년보다 17.2% 성장한 3조8155억 원으로 매년 성장세를 거듭하고 있음. 홍삼이 매년 판매 1위를 기록하고 있는 가운데, 당귀등혼합추출물 등 면역 기능성 원료가 주목 받고 있는 것으로 나타남(식품저널 인터넷식품신문 foodnews, 2018)



Fig. 3-12. 국내 건강기능식품 시장규모.

○ 가구 당 연평균 건강기능식품 구매액은 29만6000원으로 2015년 26만6000원보다 11% 증가한 것이며, 유통채널은 인터넷몰(26.3%), 다단계판매(14.2%), 대형할인점(12.3%) 순으로 나타나 온라인 채널이 강세를 보이고 있음

○ 원료별로는 홍삼이 매년 판매 1위를 기록하고 있는 가운데, 당귀 등 혼합추출물 등 **면역 기능성 원료**가 주목 받고 있으며, 프로바이오틱스(장 건강), 루테인(눈 건강), 밀크씨슬(간 건강), 체지방 감소 제품 등의 구매금액이 상위권으로 나타남

○ 다양한 원료를 기반으로 성장하고 있는 건강식품시장은 스스로 건강을 챙기는 ‘셀프메디케이션’ 트렌드를 타고 소비가 일반 ‘종합형’에서 부분 ‘맞춤형’으로 변화하고 있음. 또한 계절 구분없이 건기식을 구매하는 사람들이 많아지며 ‘겨울 성수기’ 공식도 사라지는 추세임(경향신문, 2018)

(나) 글로벌 건강식품 시장 동향 :

○ 2014년 세계 건강기능식품 시장의 규모는 전년 대비 6.4% 성장한 2,347억 달러 규모를 형성하였으며, 나라별 시장규모는 미국(34%), 서유럽(17%), 일본(11%), 한국(1.4%) 등이었음

○ 세계 건강기능식품의 시장 성장률은 남미(12.95%), 중국(11.7%), 중동(9.6%), 아시아(9.5%), 아프리카(9.3%) 순으로 향 후 남미와 중국시장의 잠재력이 크게 나타남

○ 전통 중국 의술의 미국 시장 진출이 증가함에 따라 한방 관련 회사와 미국 내 한방 약품 생산 등이 활발해지고, 관련 약초 및 작물들의 재배에 관심이 쏠리고 있음. 건강식품분야에서 효력 있는 자연친화적 대체식품 수요가 증가하고 미국인들의 건강에 대한 관심이 높아지며 건강보조식품 시장 진입이 기대됨

○ 나라별 건강기능식품 유형을 보면 미국은 비타민, 무기질, 식이섬유 등이 함유된 식이 보충제류 유형이고, 유럽은 캡슐, 정제, 액체앰플 형태의 식사 보충 목적 또는 생리학적 영향을 주는 식품이 주를 이룸. 일본은 특정 보건용식품, 영양기능식품, 기능성표시식품 등의 유형이며, 중국은 특정 보건 기능을 표명하거나, 비타민, 무기질 등 보충의 목적으로 하는 식품유형 등이 있음(한국농수산식품유통공사, 2017)

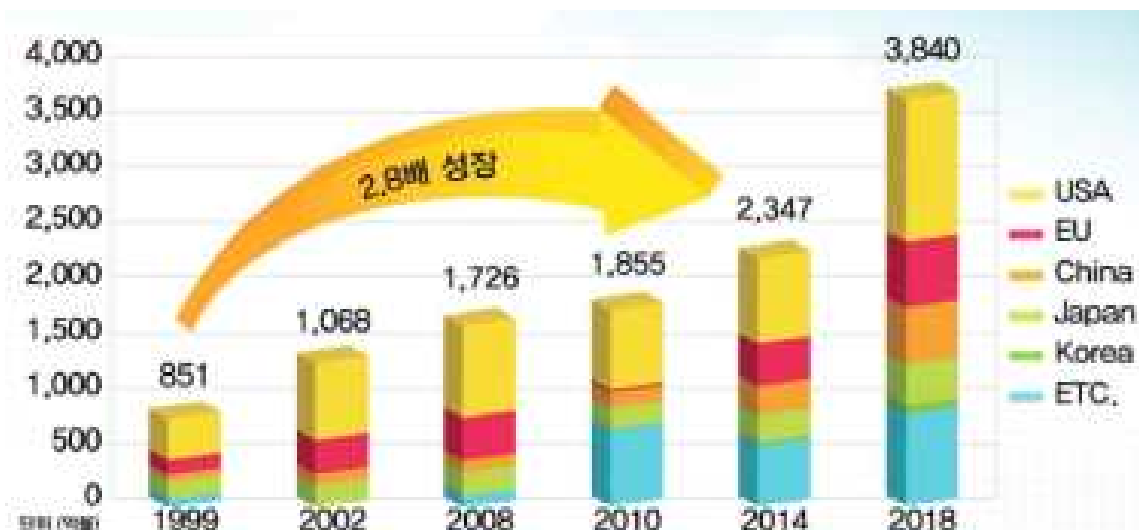


Fig. 3-13. 글로벌 건강식품 시장 동향.

(나) 한국인이 가장 많이 앓는 질병 :

○ 한국인이 가장 많이 앓는 질병 1위를 유지하고 있는 기관지염은 최근 우리나라의 미세먼지 등 심각한 대기오염 현상으로 인해 더욱 자주 걸리고 심해지는 현상이 나타나고 있음

■ 미세먼지란 우리 눈에 보이지 않을 정도로 아주 가늘고 작은 먼지 입자를 의미함. 미세먼지는 우리가 숨을 쉴 때 우리의 호흡 기관을 통해 들어가 폐속으로 침투해서 폐의 기능을 떨어뜨리고, 여러가지 병을 막아내는 힘인 면역 기능을 떨어뜨려 약하게 만듦(환경부, 2018)

■ 미국에서는 매년 6만 4천여명이나 되는 사람들이 미세먼지의 오염 때문에 일찍 죽는다는 조사 결과가 있음

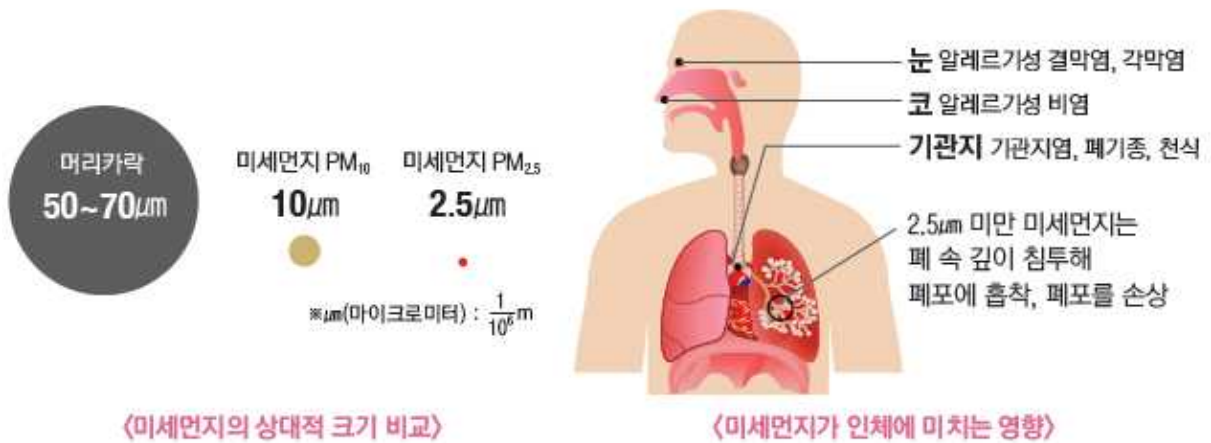


Fig. 3-14. 미세먼지가 건강에 미치는 영향 (※자료출처 : 국토환경정보센터, 2018)

○ 건강보험심사평가원의 자료에 따르면 급성 기관지염의 경우 2014년 상반기 1,111만명의 환자가 발생하였고 2017년에는 상반기에만 1,222만명의 환자수를 기록하며 국민 100명중 24명이 기관지 통증으로 병원을 찾고 있는 것으로 나타남



자료: 건강보험심사평가원

Fig. 3-15. 우리나라 사람이 가장 많이 앓는 질병.

○ 폐질환 중 천식은 세계적으로 흔한 만성 기도질환이며 환자수가 점점 증가하고 있으며, 호흡기 발육이 완전하지 않은 10대 이하 어린이와 50대 이상 고령자에서 유병률이 높아지는 추세임

○ 이에 따라 최근 국내 건강식품 시장에서는 기관지염 증상 완화 효과와 더불어 예방을 목적으로 하는 면역기능 강화를 위한 건강식품을 선호하고 있는 것으로 나타남

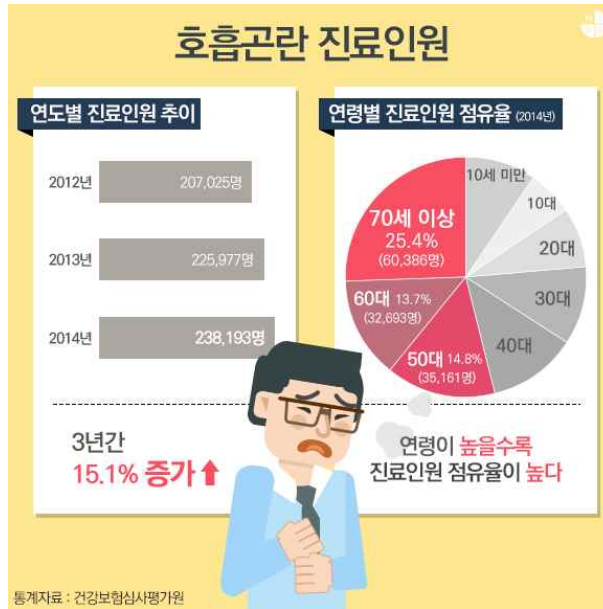


Fig. 3-16. 호흡곤란 진료 인원.

(2) 사업 개요 :

(가) 사업 목적 :

○ 본 사업은 현대인이 10대부터 고령자까지 전 연령대에서 걸쳐 가장 많이 앓고 있는 호흡기질환 증세 완화와 면역력 보안을 위한 신제품을 개발하는 것을 목적으로 함

○ 본 사업은 국내의 산양삼과 도라지, 토종꿀의 배합에 생물공정을 통해 유효성분을 극대화하여 소비자 선호도를 고려한 고급형 기능성식품을 제품화하고자 함

(나) 사업의 필요성

○ 호흡기질환 및 면역력 보안을 위한 소비자 선호도가 높는데 현재까지 시장에는 홍삼 기반 제품의 시장점유율이 높은 상황임. 하지만 언론을 통해 홍삼에 대한 잔류농약 등의 이슈가 지속되면서 국내 삼(蔘) 시장이 위축될 우려가 있음

○ 건강식품으로서의 삼(蔘)에 대한 선호도가 인삼 → 홍삼 → 산양삼(야생삼)위주로 변모하고 있으며 세계적 유통 중심지인 홍콩시장에서도 미국의 야생삼이 높은 인기를 얻으며 고가에 판매되고 있는 추세임

○ 따라서 면역력 보안을 위한 홍삼을 산양삼으로 대체하고 도라지, 조청 등을 결합하여 소비자 니즈를 충족할 신제품 개발의 필요가 절실함

(다) 사업의 추진절차 :

○ 산양삼과 도라지 및 조청을 혼합 제조하여 건강한 컨셉의 호흡기 및 면역강화식품을

개발과정 기획

- 호흡기 및 면역강화식품 시장의 소비 트렌드를 분석하고 숨은 니즈를 발굴하여 새로운 유형의 건강식품을 기획하고 그에 따른 생산 전략 및 계획설계
- 산양삼과 도라지 및 조청에 대한 선행연구 자료를 최대한 활용하여 신제품의 유효 성분과 영양성분 등을 연구 기관에 위탁하여 표준화 분석과정 진행

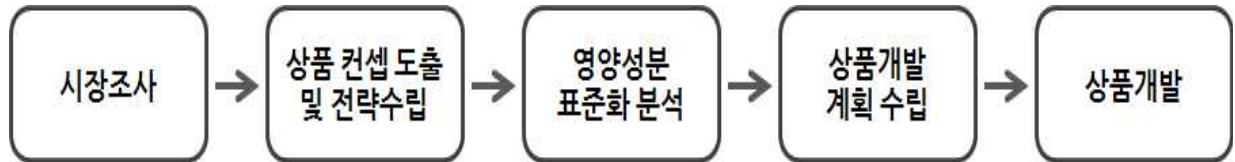


Fig. 3-17. 사업추진 절차.

(2) 상품 컨셉

(가) 기본 컨셉 도출

- 기존 인삼 및 홍삼 관련 제품의 시장이 포화되고 정체됨에 따라서 기능성이 향상되고 새로운 부가가치가 부여된 상품 출현이 필요
- 최근 소비자의 간편 섭취 욕구를 고려하여 제형을 액상 젤리 스틱형으로 개발할 필요가 있음
- 차별화된 스토리와 기능성 향상을 위해 지역 자원을 최대한 활용
  - 기침과 편도선염, 후두염에 좋은 영향을 미치는 인근 지역에서 많이 생산되는 토종꿀 활용
  - 기관지염과 호흡기 질환에 좋은 인근지역의 도라지를 (주)자연애제약만의 가공기술을 적용 및 가공하여 결합
  - 면역력이 뛰어난 함양의 산양삼과 도라지, 조청을 결합한 고부가가치 제품 개발

(나) 개발목표 상품 구성 및 제형

- 성분 : 숙성도라지 30%(국산), 맥문동 뿌리 6%(국산), 건지황 6%(국산), 생강 3%(국산), 감초 3%(수입), 뽕나무 뿌리껍질 2.4%, 산양삼 0.6%, 조청 40% 및 정제수
- 유형 : 액상차
- 포장 : 액상 젤 형태의 스틱형 포장
- 구성 : 1포 12 g으로 1세트 12 g X 15포 (225g)

(다) 개발목표 상품 마케팅 전략

- 고객 세분화 전략
  - 시장 세분화 :

추구편익	인구통계학적	심리분석적	상표애호도
기능성 사용편리성 정통성 가격	10대 중고등학생 20대 남녀 대학생 20~30대 남녀 직장인 40대~50대 중년	건강관리에 관심이 많은 학업에 지친 생활에 활력을 잃은 직장생활에 지친 공기오염에서 벗어나고픈	정관장 직접생산 농가 농협

■ 세분 시장 프로파일 분석 :

구분	세분시장 A	세분시장 B	세분시장 C
조합	사용편리성, 가격이 저렴한, 20~30대, 남녀 직장인, 직장생활에 지친, 공기오염에서 벗어나고픈, 정관장	기능성, 사용편리성 10대 중고등학생, 학업에 지친, 건강관리에 관심이 많은, 정관장	정통성, 기능성, 40~50대 중년, 건강에 관심이 많은, 생활에 활력을 잃은, 직접생산 농가, 농협
특징	20~30대 직장인은 지친 직장생활에 활력을 원하고, 휴대와 음용이 편리한 제품을 선호하며, 주로 도시에서 일하므로 나쁜 공기에서 목을 보호하고 싶어하며, 브랜드 제품을 선호한다.	학업에 시달리는 10대 중고등학생을 자녀를 둔 부모는 아이들의 건강관리에 관심이 많으며, 구매자는 부모이나 실 사용자는 학생인 경우이다. 브랜드 제품을 선호한다.	40~50대 중장년은 사용 편리성보다는 기능성과 정통적인 형태를 선호하며, 건강에 관심이 많다. 브랜드보다는 실제 원료를 재배하는 농가를 찾아서 제품을 구매한다.

○ 목표 고객 설정

■ 세분 시장별 평가 :

시장 평가기준	중요도	20~30대 직장인	10대 중고생	40~50대 중년
시장의 매력도 (시장규모/성장속도/수익률)	3	9	1	3
자사와의 적합성 (성공요건/추구방향과의 일치성)	2	3	9	1
경쟁의 정도 (경쟁사의 마케팅력/상품의 위협정도)	2	9	3	1
고객의 편익 및 가치	3	9	3	1
총 합	10점	78	36	16
순 위		1	2	3

■ 직장생활에 지치고 도시생활에서 공기오염에 노출된 20~30대 직장인을 목표시장으로 선정하여, 휴대가 편리하고 음용이 쉬운 액상 젤리 스타일의 스틱형 제품을 개발함. 기능성 원재료의 융합으로 상품의 기능성을 향상시켜 실제적인 효과를 얻을 수 있는 상품을 개발하며, 브랜드를 선호하는 성향을 인지하여 농협이라는 브랜드를 충분히 활용하고 해당 상품의 브랜드 인지도를 제고하는 마케팅 전략이 필요함

■ 구매자와 수혜자의 구분이 필요함. 구매고객은 94.4%가 주부이지만 실제 복용자는 주부, 배우자, 자녀, 기타 가족 순이므로 실 구매자인 주부고객을 Targeting한 마케팅 전략 또한 필요함



목표고객	고객의 성향 및 니즈
20~30대 직장인	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 지친 직장생활에 활력을 원함</li> <li>- 휴대와 음용이 편리한 제품을 선호</li> <li>- 주로 도시에서 일하므로 나쁜 공기에서 목을 보호하길 원함</li> <li>- 브랜드 제품을 선호</li> </ul>
10대 중고등학생의 부모	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 학업에 시달리는 아이들의 건강관리에 관심이 많음</li> <li>- 구매자는 부모이나 실 사용자는 학생임</li> <li>- 브랜드 제품을 선호</li> </ul>
40~50대 중장년	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 사용 편리성보다는 기능성과 정통적인 형태를 선호</li> <li>- 건강에 관심이 많음</li> <li>- 브랜드보다는 실제 원료를 재배하는 농가를 찾아서 직접 확인 후 제품을 구매하는 성향이 있음</li> </ul>

## 다. 스틱 액상 제품의 특성 : 숙성도라지 플러스업

### (1) 영양성분 및 이화학적 특성 비교

(가) 영양성분 : 도라지 관련 제품의 영양성분은 Table 3-12와 같다. 휴림 제품 (HDS)의 경우 탄수화물은 8.0g, 당류는 2.0g 그리고 단백질은 0.5g이 함유되어 있으며, 지방과 콜레스테롤은 함유되어있지 않았다. 진생 제품 (JGDS)은 탄수화물 1.0g 그리고 당류 1.0g이 함유되어있고, 자연애 제품 (JYDGS)은 탄수화물 7.0g과 당류 2.0g이 함유되어있다. 진생과 자연애 두 제품 모두 단백질과 지방 그리고 콜레스테롤은 함유되어있지 않았다.

**Table 3-12. 도라지 관련 제품의 영양성분**

제 품	1일 섭취량 <sup>1)</sup>				
	탄수화물 (g)	당류 (g)	단백질 (g)	지방 (g)	콜레스테롤 (mg)
휴럽 (HDS)	8.0±0.40	2.0±0.10	0.5±0.25	0.0	0.0
진생 (JGDS)	1.0±0.05	1.0±0.05	0.0	0.0	0.0
자연애 (JYDHS)	7.0±0.35	2.0±0.10	0.0	0.0	0.0

<sup>1)</sup>제품에 표기된 기준으로 작성하였음.

(나) 이화학적 특성 : 도라지 관련 제품의 이화학적 특성은 **Table 3-13**과 같다. 휴럽 제품의 pH는 4.59이었고 이에 대한 산도는 1.40%로 나타났다. 가용성 고형분은 75 Brix였으며 325.14 mg/mL의 환원당을 나타냈고, 30.37 mg/mL의 수용성 단백질의 함량을 나타냈다. 진생 제품의 pH는 4.66이였으며, 산도는 1.5%, 가용성 고형분은 62 Brix, 환원당은 298.31 mg/mL, 그리고 수용성 단백질은 39.50 mg/mL를 나타내었다. 자연애 제품은 pH 4.13, 산도 2.90%를 나타내었으며, 가용성 고형분 50 Brix, 환원당 304.56 mg/mL와 수용성 단백질 99.65 mg/mL를 나타내었다.

**Table 3-13. 도라지 관련 제품의 이화학적 특성**

제 품	분석항목 <sup>1)</sup>				
	pH	산도 (% , 젓산)	가용성 고형분 (Brix, %)	환원당 (mg/mL)	수용성 단백질 (mg/mL)
휴럽 (HDS)	4.59±0.23	1.40±0.07	75±3.75	325.14±16.26	30.37±1.52
진생 (JGDS)	4.66±0.23	1.58±0.08	62±3.10	298.31±14.92	39.50±1.98
자연애 (JYDGS)	4.13±0.21	2.90±0.15	50±2.50	304.56±15.23	99.65±4.98

<sup>1)</sup>모든 실험은 삼 반복 수행하여 평균값으로 나타내었음.

## (2) 유효성분 함량 비교

(가) 유리아미노산 함량 : 도라지 관련 제품의 유리아미노산 함량은 **Table 3-14**와 같았다. 휴럽 제품의 비필수아미노산 중의 glutamic acid의 함량은 258.03 mg/100g와  $\gamma$ -aminobutyric acid(GABA)는 234.36 mg/100g과 arginine은 1242.33 mg/100g의 함량을 나타내었다. 비필수아미노산의 총 함량은 3,499.22 mg/100g이었다. 필수아미노산 중 threonin의 함량은 114.83 mg/100g 이였으며, valine은 109.36 mg/100g이였고 총 필수아미노산의 함량은 456.01 mg/100g로 나타났다. 진생 제품의 비필수아미노산 중의 glutamic acid의 함량은 341.99 mg/100g이였으며, GABA는 209.84 mg/100g의 함량을 나타내었다. 비필수아미노산의 총 함량은 3,513.79 mg/100g이였고, 필수아미노산의 총 함량은 744.35 mg/100g이었다. 자연애 제품의 비필수아미노산 중의 glutamic acid는 142.07 mg/100g의 함량을 나타내며, GABA의 함량은 115.34 mg/100g으로 나타났다. 필수아미노산의 총 함량은 597.75 mg/100g이였으며 총 아미노산의 함량은 2,830.97 mg/100g 이였다.



Table 3-14. 도라지 관련 제품의 유리아미노산 함량

함량 <sup>D</sup> (mg/100 g)	제 품		
	휴림 (HDS)	진생 (JGDS)	자연애 (JYDGS)
<b>Non-essential amino acids</b>			
Proline	146.05±7.30	71.03±3.55	41.37±2.07
Aspartic acid	453.72±22.69	281.01±14.05	410.13±20.51
Serine	152.85±7.64	152.37±7.62	84.07±4.20
Aspartic acid - NH <sub>2</sub>	510.01±25.50	310.84±15.54	297.94±14.90
Glutamic acid	258.03±12.90	341.99±17.10	142.07±7.10
Sarcosine	31.68±1.58	76.89±3.84	nd
Aminoadipic acid	4.11±0.21	12.83±0.64	1.56±0.08
Glycine	15.19±0.76	27.84±1.39	32.76±1.64
Alanine	225.55±11.28	256.82±12.84	228.43±11.42
α-aminobutyric acid	95.54±4.80	270.83±13.54	199.03±9.95
Cystine	31.88±1.59	nd	110.61±5.53
Tyrosine	29.30±1.47	64.91±3.25	46.22±2.31
β-alanine	23.96±1.20	41.23±2.06	62.51±3.13
β-aminoisobutyric acid	2.19±0.11	63.50±3.18	69.72±3.49
γ-aminobutyric acid	234.36±11.72	209.84±10.49	115.34±5.77
Aminoethanol	9.65±0.48	44.78±2.24	29.69±1.48
Hydroxylysine	9.84±0.49	13.86±0.69	14.55±0.73
Ornithine	8.22±0.41	20.60±1.03	21.76±1.09
3-Methylhistidine	11.09±0.55	9.26±0.46	2.72±0.14
Carnosine	3.67±0.18	6.74±0.34	19.14±0.96
Arginine	1242.33±62.12	1236.62±61.83	303.60±15.18
Total	3,499.22±174.96	3,513.79±175.69	2,233.22±111.66
<b>Essential amino acids</b>			
Threonine	114.83±5.74	121.67±6.08	67.06±3.35
Valine	109.36±5.47	226.37±11.32	169.83±8.49
Methionine	52.82±2.64	45.21±2.26	48.75±2.44
Isoleucine	73.98±3.70	133.09±6.65	148.81±7.44
Leucine	33.34±1.67	69.80±3.49	55.01±2.75
Phenylalanine	32.05±1.60	87.16±4.36	85.32±4.27
Lysine	17.93±0.90	33.19±1.66	14.78±0.74
Histidine	21.70±1.09	27.86±1.39	8.19±0.41
Total	456.01±22.80	744.35±37.22	597.75±29.89
<b>Total amino acids</b>	<b>3,955.23±197.76</b>	<b>4,258.14±212.91</b>	<b>2,830.97±141.55</b>
Ammonia	70.91±3.55	104.69±5.23	103.91±5.20

<sup>1)</sup>모든 실험은 삼 반복 수행하여 평균값으로 나타내었음.

<sup>2)</sup>nd, 검출되지 않음.

(나) 수용성 페놀릭스 및 플라보노이드스 함량 : 도라지 관련 제품의 수용성 페놀릭스 및 플라보노이드스 함량은 Table 3-15와 같았다. 휴림, 진생, 자연애 각각의 수용성 페놀릭스 함량은 2.01, 4.37 그리고 2.56 mg/mL로 나타났다. 수용성 플라보노이드스 함량은 각각 0.23, 2.13, 0.67 mg/mL로 나타났다.

Table 3-15. 도라지 관련 제품의 수용성 페놀릭스 및 플라보노이드스 함량

제 품	분석항목 및 함량 (mg/mL) <sup>1)</sup>	
	수용성 페놀릭스	수용성 플라보노이드스
휴림 (HDS)	2.01±0.10	0.23±0.01
진생 (JGDS)	4.37±0.22	2.13±0.11
자연애 (JYDGS)	2.56±0.13	0.67±0.03

<sup>1)</sup>모든 실험은 삼 반복 수행하여 평균값으로 나타내었음.

(다) 도라지 사포닌 및 진세노사이드 함량 :

① 도라지 사포닌 함량 : 도라지 관련 제품의 도라지 사포닌 함량은 Table 3-16과 및 Fig. 3-18A와 같았다. 휴림 제품의 경우 platycodin D3 0.13 mg/mL, Deapioplatycodin D 0.55 mg/mL, polygalcin D 0.04 mg/mL의 함량을 나타냈고, 진생의 경우 화합물 각각 10.30, 0.65, 0.05 mg/mL의 함량을 나타내었으며, 자연애의 경우 0.12, 0.48, 0.06 mg/mL의 함량을 나타내었다. 총 사포닌은 휴림(0.72 mg/mL), 진생(11.00 mg/mL) 그리고 자연애(0.66 mg/mL) 제품의 함량을 나타내었다.

② 진세노사이드 함량 : 도라지 관련 제품의 진세노사이드 함량은 Table 3-16과 및 Fig. 3-18B와 같았다. 휴림제품에서는 하나의 화합물도 검출되지 않았으며, 진생제품에서는 ginsenoside Ro, Rd2, F2, Rg3, C.K가 측정되었으며 각각의 함량은 5.55, 0.15, 0.08, 0.06, 0.16 mg/mL로 나타났다. 마천제품에서는 ginsenoside Ro, Rd, Rd2, F2, Rg3, C.K가 측정되었으며 각각의 함량은 0.06, 0.05, 0.14, 0.05, 0.11, 0.05 mg/mL로 측정되었다. 총 진세노사이드 함량은 휴림 0 mg/mL, 진생 6.00 mg/mL, 자연애 0.46 mg/mL로 측정되었다.

Table 3-16. 도라지 관련 제품의 도라지 사포닌 함량

함량 <sup>1)</sup> (mg/mL)	제 품		
	휴림 (HDS)	진생 (JGDS)	자연애 (JYDGS)
Platycodin D3	0.13±0.01	10.30±0.52	0.12±0.01
Deapioplatycodin D	0.55±0.03	0.65±0.03	0.48±0.02
Polygalcin D	0.04±0.00	0.05±0.00	0.06±0.00
Total	0.72±0.04	11.00±0.55	0.66±0.03
Ginsenoside Ro	nd	5.55±0.28	0.06±0.00
Ginsenoside Rd	nd	nd	0.05±0.00
Ginsenoside Rd2	nd	0.15±0.01	0.14±0.01
Ginsenoside F2	nd	0.08±0.00	0.05±0.00
Ginsenoside Rg3	nd	0.06±0.00	0.11±0.01
Ginsenoside C.K	nd	0.16±0.01	0.05±0.00
Total	0	6.00±0.30	0.46±0.02

<sup>1)</sup>모든 실험은 삼 반복 수행하여 평균값으로 나타내었음.

<sup>2)</sup>nd, 검출되지 않음.

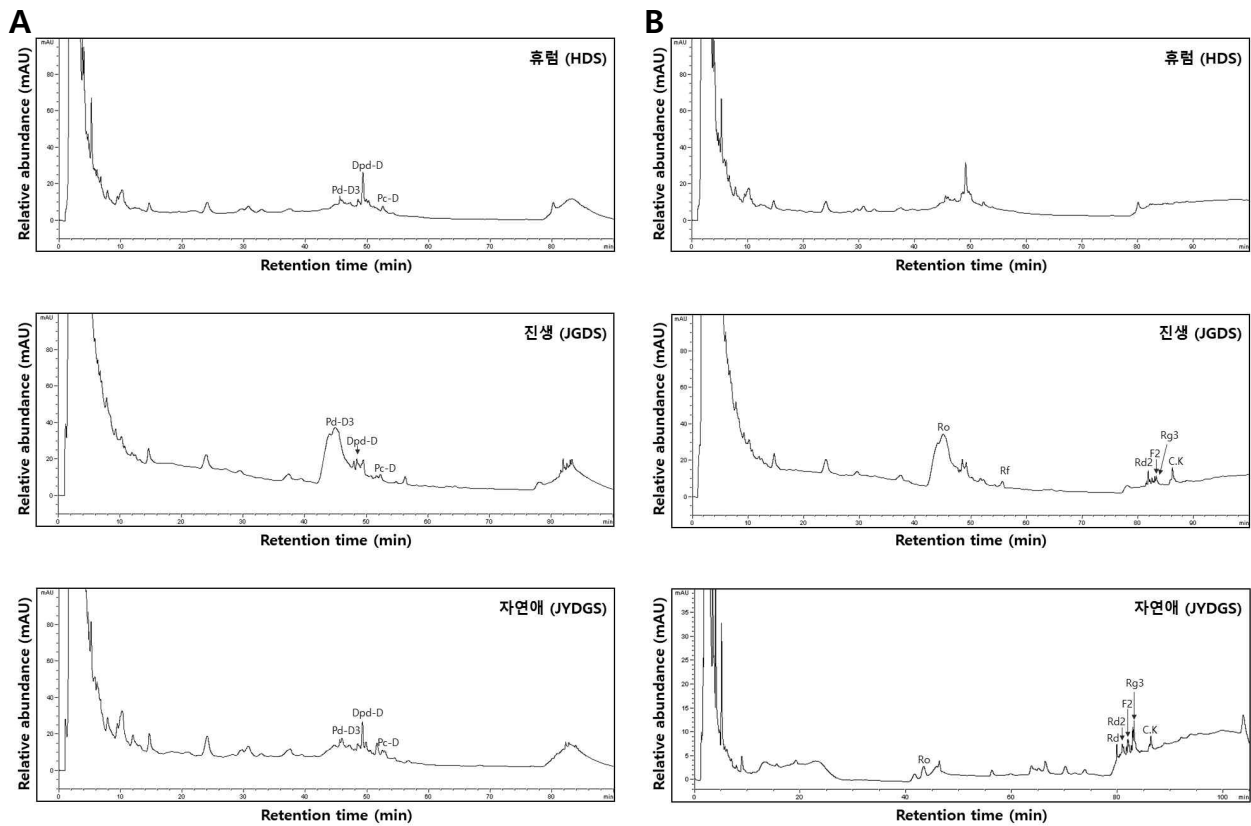


Fig. 3-18. 도라지 관련 제품의 triterpenoides HPLC 크로마토그램.

### (3) 생리활성 비교

(가) 항산화 활성 비교 : 도라지 관련 제품의 항산화 활성은 Fig. 3-19와 같았다. DPPH 라디칼 소거활성은 Fig. 3-19A와 같았다. 희석배수가 낮을수록 활성은 높았으며, 휴렴의 경우 47.09%의 활성을 나타냈고 진생의 경우 89.27% 그리고 자연애의 경우 60.23%의 활성을 나타내었다. ABTS 라디칼 소거활성은 Fig. 3-19B와 같았다. 이 또한 희석배수가 낮을수록 활성이 높게 나타났으며 휴렴은 66.65%, 진생은 89.74% 그리고 자연애는 90.78%의 활성을 나타내었다. Hydroxyl( $\cdot$ OH) 라디칼 소거활성 역시 다른 라디칼 소거활성과 마찬가지로 농도가 높을수록 높은 활성을 나타냈다. 휴렴은 69.04%, 진생은 75.44% 그리고 자연애는 73.03%의 활성을 나타내었다(Fig. 3-19C). ferric reducing antioxidant power (FRAP) 환원력 역시 농도가 높을수록 높은 활성을 나타냈다. 휴렴, 진생, 자연애 각각 0.678, 1.850 그리고 1.039( $OD_{570nm}$ )의 활성을 보였다(Fig. 3-19D).

(나) 소화효소 저해활성 비교 : 도라지 관련 제품의 소화효소 저해활성을 Fig. 3-20과 같았다.  $\alpha$ -glucosidase 저해활성은 Fig. 3-20A와 같았다. 희석배수가 낮을수록 활성이 높게 나타났으며 휴렴의 제품은 40.66%, 진생의 제품은 49.44%, 자연애의 제품은 43.82%의 활성을 나타냈다. 췌장-lipase 저해활성은 Fig. 3-20B와 같았다.  $\alpha$ -glucosidase 저해활성과 마찬가지로 희석배수가 낮을수록 활성이 높았으며 휴렴, 진생 그리고 자연애의 제품 각각 24.25%, 36.11% 그리고 28.32%의 활성을 나타냈다.

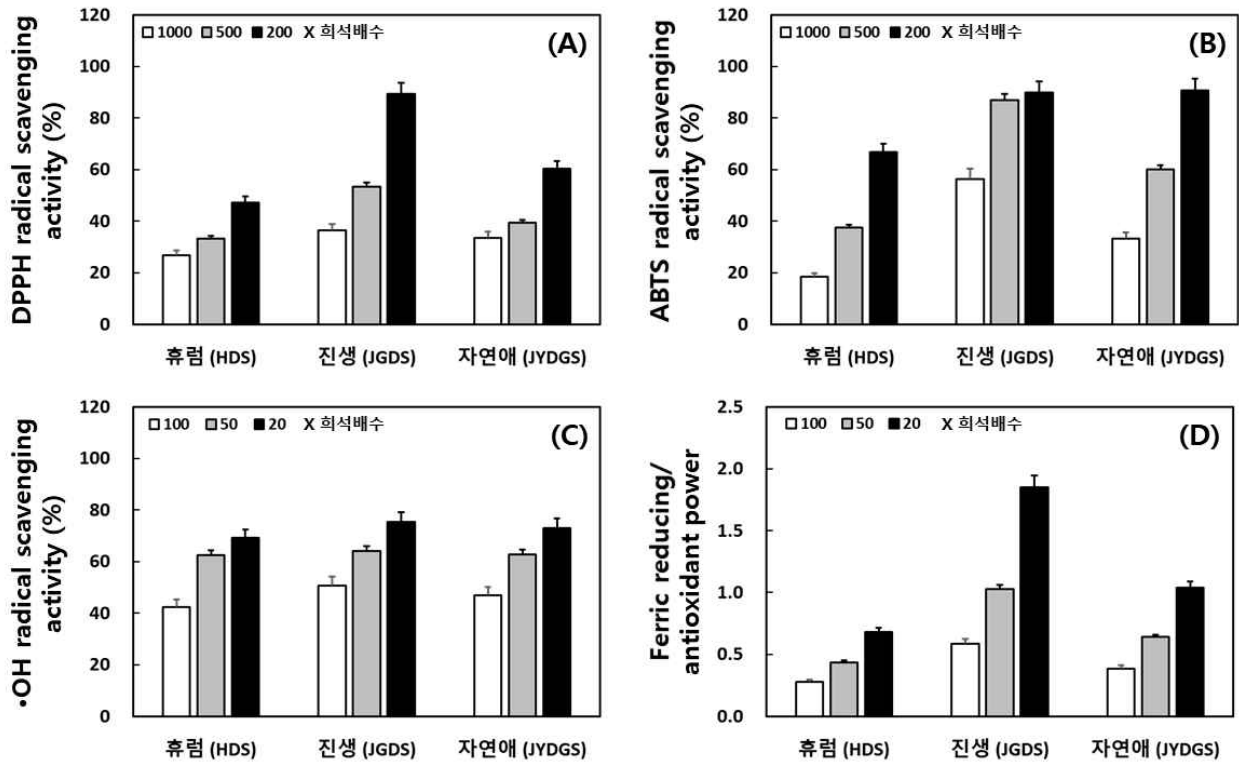


Fig. 3-19. 산양삼-도라지 혼합 제품의 항산화 활성 비교.

A; DPPH, B; ABTS, C; Hydroxyl radical scavenging activity 및 D; FRAP 환원력.

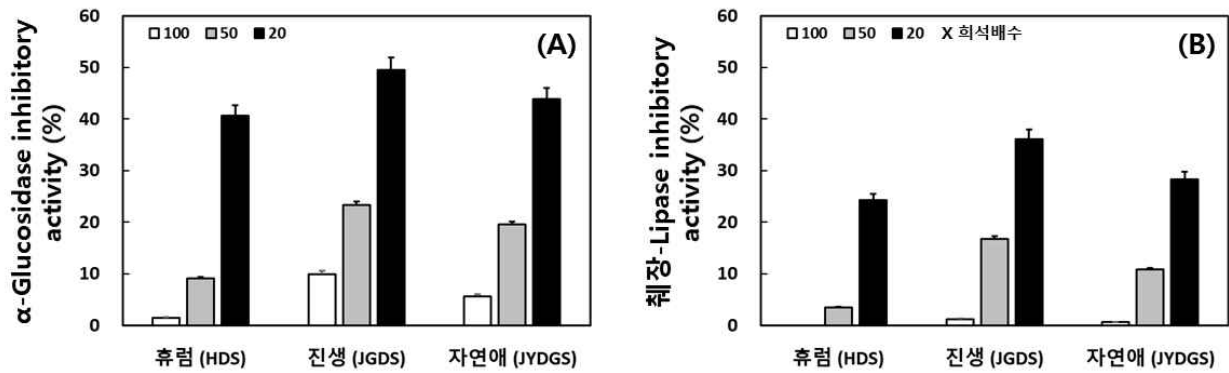


Fig. 3-20. 산양삼-도라지 혼합 제품의 소화효소 저해활성 비교.

A; α-glucosidase 및 B; pancreatic lipase.

라. 스틱 액상 제품의 면역 효능평가 : 숙성도라지 플러스업 - 1위탁기관과 협조

(1) Cell viability assay : 각 시료의 세포독성이 없는 농도까지 희석하여 실험한 결과, Control과 비교하여 세포생존율이 낮은 농도를 제외하고 실험 진행한 결과 Fig. 3-21과 같았다. 18-AD(휴림 도라지 데이스틱 제품) 시료는 0.4 Brix 이상에서는 세포독성을 보였으므로 0.4이하 농도에서 실험을 진행하였다. 18-BD(산양산삼 진생흑도라지 제품) 시료는 0.2 Brix 이상에서부터 세포독성을 보였으므로, 0.1 Brix 이하 농도부터 실험 진행하였다. 18-CD(숙성도라지 플러스업 제품) 시료는 0.5 Brix 이상에서부터 세포독성을 보였으므로, 0.4 Brix 이하 농도부터 실험 진행하였다(Fig. 3-21).

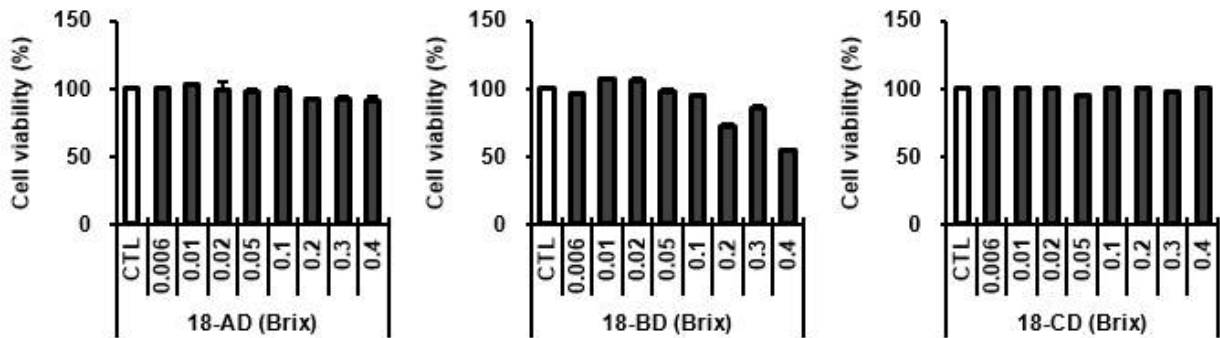


Fig. 3-21. 도라지 관련 제품의 세포 생존율.

(2) Nitric Oxide assay : NO 활성이 있는 농도에서 ELISA 실험을 진행하기 전, 세포독성이 없고, NO 활성이 높은 농도를 선정하기 위하여 실험을 진행하였다. 18-AD(휴림 도라지 데이스틱 제품) 시료는 세포독성이 있는 0.4 농도를 제외한 0.3 농도 이하부터 NO 활성을 나타내었다. 18-BD(산양산삼 진생흑도라지 제품) 시료는 세포독성이 있는 0.2 농도 이상을 제외한 0.1 농도 이하부터는 Control과 비교하여 NO 효과를 나타내었다. 18-CD(명품산양산삼 흑도라지꿀청 제품) 시료는 고농도일수록 큰 NO 효과를 나타냈다(Fig. 3-22).

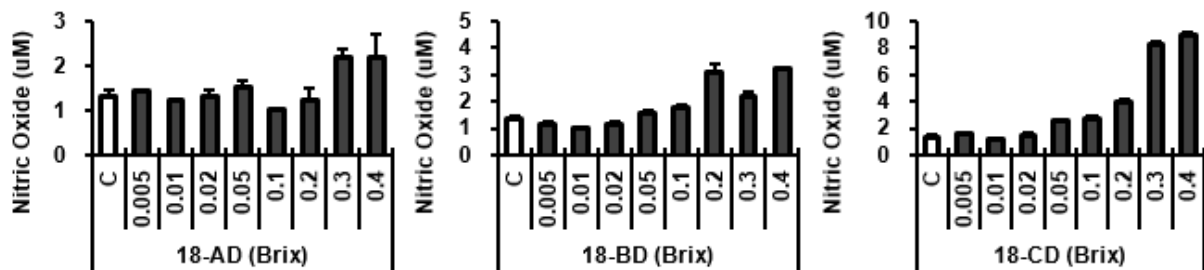


Fig. 3-22. 도라지 관련 제품의 NO 생성율.

(2) 사이토카인 IL-6 및 TNF- $\alpha$  :

(가) 사이토카인 IL-6 : 앞서 선정한 농도에서 IL-6 ELISA 실험을 진행하였다. 18-AD(휴림 도라지 데이스틱 제품) 시료는 실험한 농도 중 0.2 농도에서 333.1 pg/ml로 가장 IL-6 효과가 높았으며, 다음으로 0.1 농도에서 261.1 pg/ml로 높았다. 18-BD(산양산삼 진생흑도라지 제품)

시료는 IL-6 실험에서 0.05-0.1농도에서 309.6 pg/ml, 371.8 pg/ml으로 큰 효과를 보였다. 18-CD(명품산양산삼 흑도라지꿀청 제품) 시료는 0.05-0.1 농도에서 445 pg/ml, 360.4 pg/ml로 큰 효과가 나왔다(Fig. 3-23A).

(나) 사이토카인 TNF- $\alpha$  : 앞서 선정된 농도에서 TNF- $\alpha$  ELISA 실험을 진행하였다. 18-AD(휴림 도라지 테이스틱 제품) 시료는 TNF- $\alpha$ 에서는 0.3-0.4 농도에서 767.9 pg/ml, 614.2 pg/ml로 높았으나 IL-6에서 0.1-0.2 농도에서 효과가 나왔으므로 0.1-0.2 농도를 사용하였다. 18-BD(산양산삼 진생흑도라지 제품)와 18-CD(명품산양산삼 흑도라지꿀청 제품)은 TNF- $\alpha$ 에서 0.025 농도에서 0.025-0.05 농도에서 707.2pg/ml, 692.8pg/ml로 효과가 크게 나왔으므로 저농도에서 효과 있는 구간을 정하였다(Fig. 3-23B).

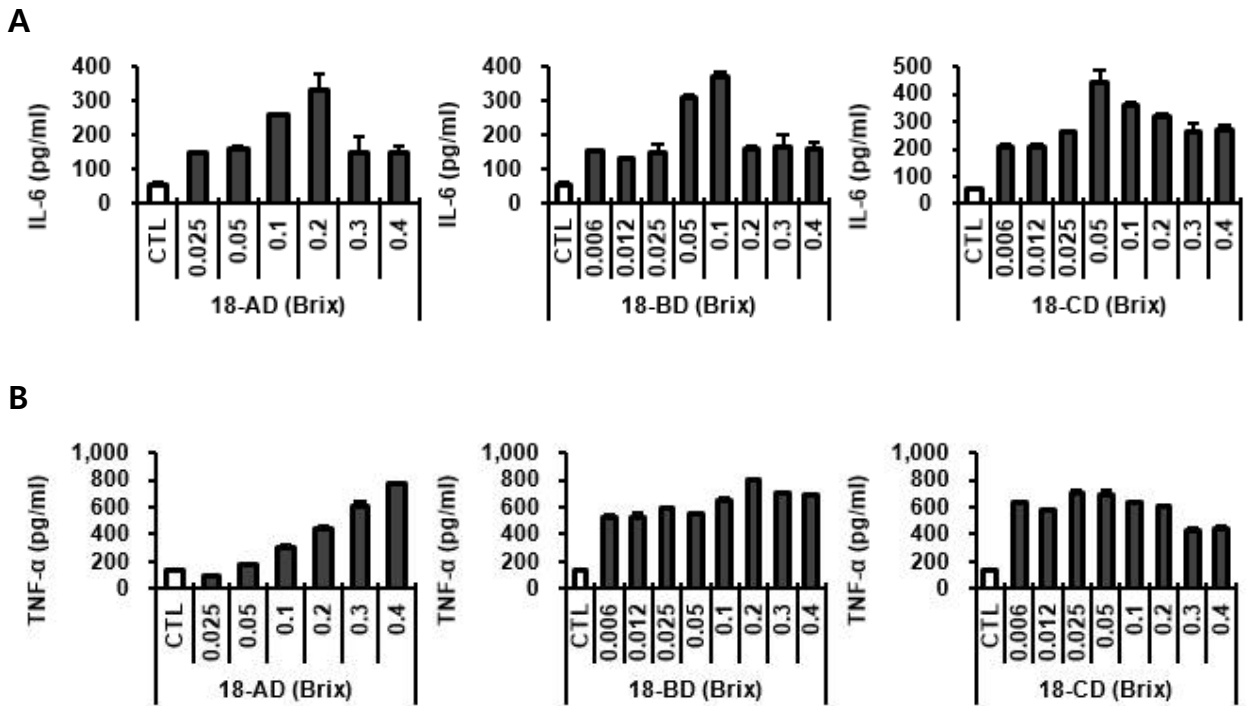


Fig. 3-23. 도라지 관련 제품의 사이토카인 IL-6 및 TNF- $\alpha$ .

(2) iNOS 및 COX2 (Real time PCR) : ELISA에서 효과 있는 농도로 선정된 구간에서 면역기능 바이오 마커인 iNOS, COX2를 Real time PCR을 진행하였다. 18-AD(휴림 도라지 테이스틱 제품) 시료에서 Control과 비교하여 0.1-0.2 농도 모두 효과를 나타내었다. 18-BD(산양산삼 진생흑도라지 제품) 시료에서 Control에 비해 iNOS에서는 효과가 없었지만 COX2에서 약간의 증가한 정도를 나타냈다. 18-CD(명품산양산삼 흑도라지꿀청 제품) 시료에서 0.025 농도에서 효과가 크게 나타났다. 전체적인 결과로 보아 면역증진에 효과가 있을 것으로 판단되었다(Fig. 3-24).

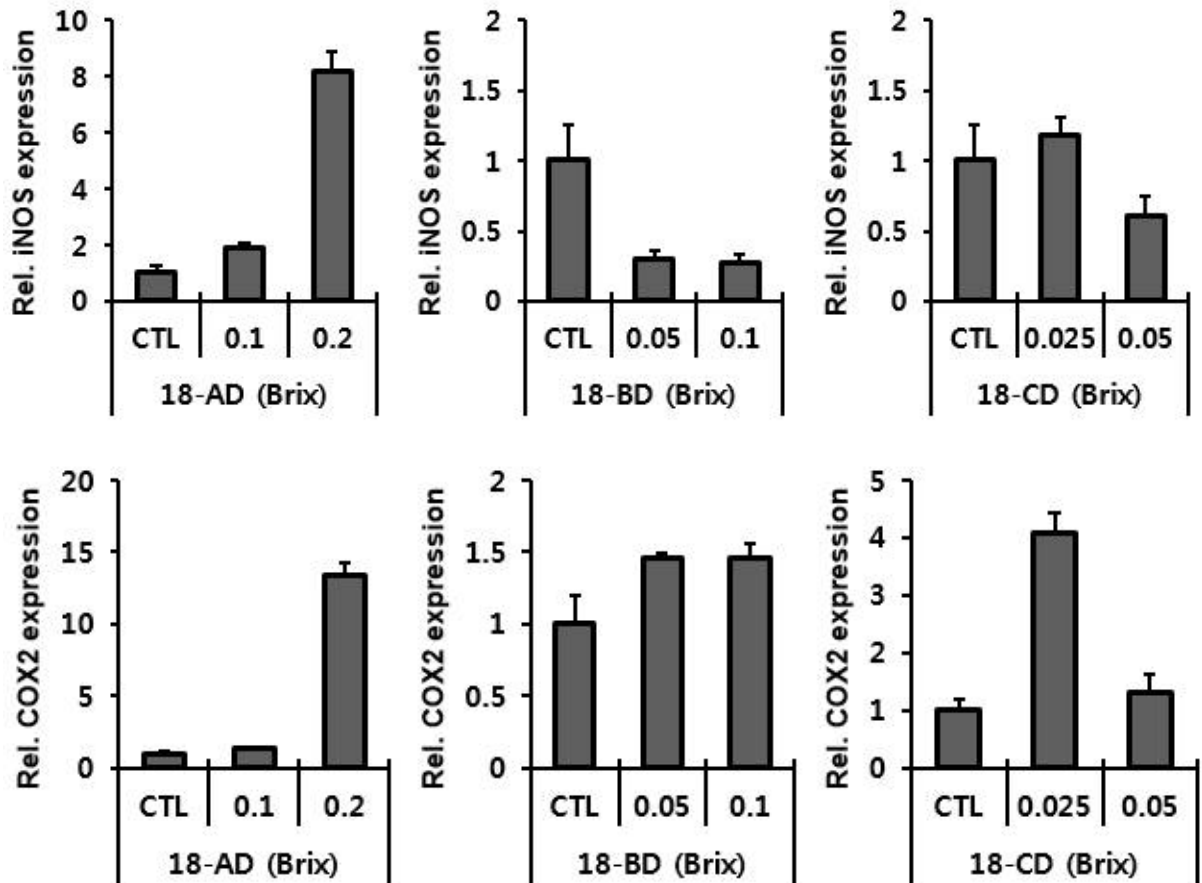


Fig. 3-24. 도라지 관련 제품의 사이토카인 iNOS 및 COX2 유전자 발현 분석.

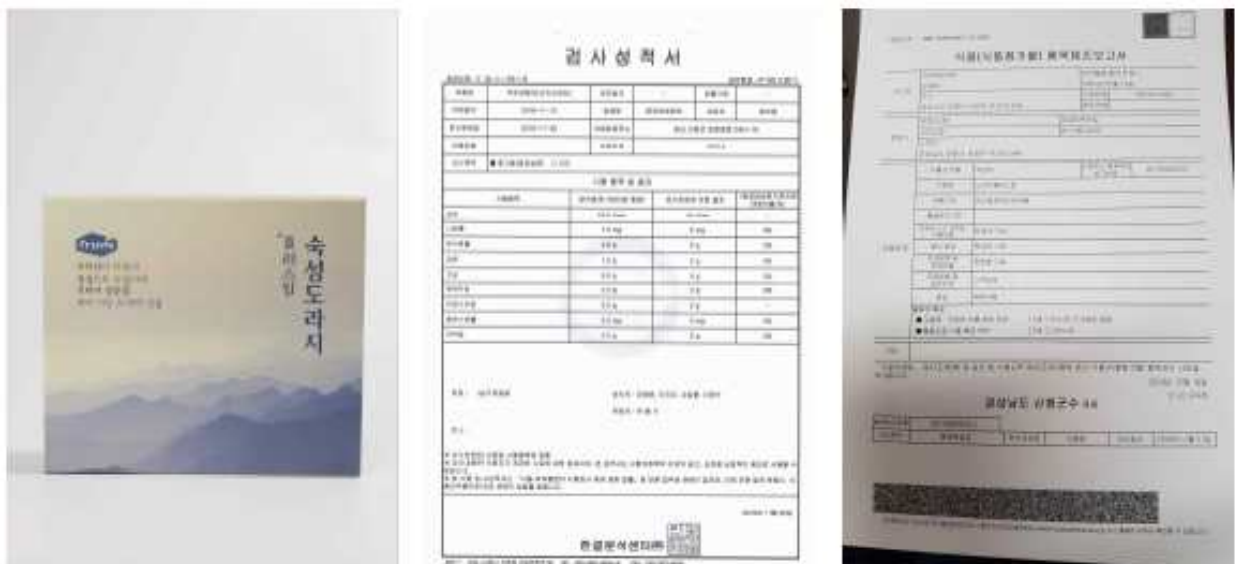


Fig. 3-25. 도라지 제품 사진, 영양성분 분석 및 품목제조보고서.

## 제3절 활성도라지의 발효공정 최적화 및 표준화

### [1위탁, 경남과학기술대학교 산학협력단]

#### 1-1. 1차년도 연구수행 방법

##### 가. 발효 미생물 선발

(1) 유산균 선발 : 유산균 선발하기 위해 기존에 김치, 식물추출발효음료 및 막걸리 등의 발효식품으로부터 분리하여 보관해둔 약 500여종의 유산균으로부터 발효 유산균을 확인하였다.

##### (2) 16S rRNA 염기서열 분석 :

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

(나) PCR 및 16S rRNA 염기서열 분석 : PCR은 상기에서 분리한 genomic DNA를 주형으로 하여 16S rDNA를 PCR로 증폭하였다. 증폭은 94°C에서 1분간 변성, 50°C에서 30초간 풀림, 72°C에서 1분 30초 신장으로 30 cycle로 수행되었다. 16S rDNA 단편을 증폭하기 위해 5'-CGGAGAGTTTGATCCTGG-3' (forward)와 5' -TACGGCTACCTTGTTACGAC-3' (reverse)사용한 PCR primer를 사용하였다. 증폭된 16S rRNA PCR 산물은 1% agarose에 전기영동한 후 1.5 kb 단편을 회수한 후 pGEM-T Easy(Promega, Madison, U.S.A.)를 사용하여 클로닝 하고 *Escherichia coli* DH5  $\alpha$ 에 형질전환 후 형질전환체를 무작위로 선정한 후 순수분리 하였다. 순수 분리된 형질전환체를 50  $\mu$ g의 ampicillin인 함유된 LB 배지 및 37° C에서 배양한 후 균체를 모집하고 Plasmid Purification Kit(Intron, Suwon, Korea)에 기술된 대로 plasmid를 분리 정제하였다. 분리된 plasmid를 서열결정 주형가닥으로 사용되었다. 핵산 염기서열은 PRISM Ready Reacion Dye terminator/primer cycle sequencing kit를 사용한 dideoxy chain termination method를 이용하여 분석하였다.

(다) 염기서열 상동성 분석 및 진화적 거리 계산 : 세균 16S rDNA 염기서열은 BLAST network service와 the nonredundant DNA sequence database를 제공하는 미국 국립생물정보센터(NCBI)에서 얻은 다른 균종의 것과 정렬하였다. 세균 16S rDNA 상동성 정도는 alignment를 통해 산출하였고 진화적 거리도 계산하였다.

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

##### (4) 기질별 GABA 생성능 확인 :

(가) MSG (Monosodium glutamic acid): MRS 액체배지에 GABA 전구물질인 MSG를 각각 0.05% 및 0.1%가 되게끔 첨가하여 미리 배양한 젖산균 배양액을 2.5% 접종하여 30°C에서 48시



간 배양하였다. 48시간 배양 후 배양액 1 ml를 시험관에 취하고 여기에 증류수 4 ml를 첨가하여 60°C에서 1시간 가수분해를 진행하였다. 그 후 lithium citrate buffer(pH 2.2)를 1 ml 첨가하여 4°C에서 2시간 방치시켜 단백질을 침전 과정을 실시하였다. 여과지로 여과한 후 얻은 여액을 60°C에서 감압 농축하여 농축물을 제조하였다. 여기에 lithium citrate buffer 2 ml에 녹여 아미노산 자동분석기(Hitachi L-8900, Tokyo, Japan)를 이용하여 분석하였다.

(나) 활성글루텐: 활성글루텐 5 g에 증류수 100 mL을 조금씩 넣어가며 용해시킨 후 살균하여 5% 활성글루텐 배양물을 준비하였고 이후 미리 배양한 젖산균 배양액을 2.5%씩 접종하여 30°C에서 48시간 배양하였다. 이후 과정은 MSG에 측정된 방법과 동일하게 진행하였다.

(다) 콩 단백질: 콩 단백질 5 g에 증류수 100 mL을 조금씩 넣어가며 용해시킨 후 살균하여 10% 대두단백 배양물을 준비하였고 이후 미리 배양한 젖산균 배양액을 2.5%씩 접종하여 30°C에서 48시간 배양하였다. 이후 과정은 MSG에 측정된 방법과 동일하게 진행하였다.

(5) 효모 선발 : 효모 선발하기 위해 기존에 각종 과일발효액으로부터 분리하여 보관해둔 약 100여종의 효모로부터 발효 효모 균주를 확인하였다.

#### (6) 26S rRNA 염기서열 분석 :

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

(나) PCR 및 16S rRNA 염기서열 분석 : 분리한 genomic DNA를 주형으로 하여 26S rDNA를 증폭하였다. 26S rDNA의 단편을 증폭하는 데 사용되는 PCR yeast-specific primer 5'-ACC CGC TGA AYT TAA GCA TAT-3'(3YF/21 mer, forward primer, *Saccharomyces cerevisiae* rRNA) 사용하였다. 5'-CTC CTT GGT CGT GTT TCA AGA CGG-3'(3YR/25 mer, reverse primer)(Cho *et al.*, 2009). 그 뒤에, rRNA는 metagenomic DNA와 Super-Therm DNA 증합 효소 (JMR, Side Cup, Kent, UK)를 사용하여 PCR을 증폭 하였다. PCR 반응은 (50  $\mu$ L) *Taq* polymerase (2.5 unit) 1  $\mu$ L, 3YF-3YR(10  $\mu$ mol) primer 3  $\mu$ L, 반응 buffer(15 mM MgCl<sub>2</sub>) 5  $\mu$ L, 2mM dNTP 5  $\mu$ L, 주형 DNA 5  $\mu$ L, 그리고 살균한 증류수 28  $\mu$ L을 포함하였다. PCR 조건은 94°C 5분, 30 cycles (94°C for 30s, 50°C for 30s, 72°C for 2min) 수행 그리고 72°C에서 10분 extension 하였다. PCR 반응이 끝난 후 전기 영동하여 26S rRNA 단편을 확인하고 효모 26S rRNA 유전자 산물은 PCR Purified Kit로 정제하였다. pGEM-T Easy에 클로닝 하여 *Escherichia coli* DH5 *a*에 형질전환하였다. LB 배지 (50  $\mu$ g ampicillin)에서 자란 균락들의 plasmid DNA를 plasmid purification kit(Intron, Suwon, Korea)를 사용 분리 정제하였다.

(다) 염기서열 상동성 분석 및 진화적 거리 계산 : 효모 26S rDNA 염기서열은 BLAST network service와 the nonredundant DNA sequence database를 제공하는 미국 국립생물정보센터(NCBI)에서 얻은 다른 균종의 것과 정렬하였다. 효모 26S rDNA 상동성 정도는 alignment를 통해 산출하였고 진화적 거리도 계산하였다.

#### (7) 내당성, 내알코올성 및 내산성 특징 조사 :

(가) 내당성 : 내당성 측정을 위해 분리된 효모 균주들을 YPD 액체배지에서 30°C에서 48시간 배양하고 sucrose 0%, 20%, 30%, 40%의 YPD액체배지에 각각 5%(v/v)로 접종한 후 30°C에서 48시간 배양 후 흡광도 (600nm)를 측정하여 균 생육정도를 결정하였다.

(나) 내알코올성 : 내알코올성 측정을 위해 분리된 효모 균주들을 YPD 액체배지에서 30℃에서 48시간 배양하고 Alcohol 0%,5%,10%,15%의 YPD액체배지에 각각 5%(v/v)로 접종한 후 30℃에서 48시간 배양 후 흡광도 (600nm)를 측정하여 균 생육정도를 결정하였다.

(다) 내산성 : 내산성 측정을 위해 분리된 효모 균주들을 YPD 액체배지에서 30℃에서 48시간 배양하고 control(pH. 6.64) pH 5, pH 4, pH 3의 YPD액체배지에 각각 5%(v/v)로 접종한 후 30℃에서 48시간 배양 후 흡광도 (600nm)를 측정하여 균 생육정도를 결정하였다.

## 나. 도라지 볶음 처리

(1) 볶음 처리 조건 선정 : 볶음처리를 위해 도라지는 주관기관으로부터 공급받아 사용하였다. 우선 세절기를 이용하여 적당한 크기와 모양으로 세절하였다. 이 후 도라지 50 g씩 선별하여 150℃에서 10분과 20분 간격으로 볶음처리 하였고 같은 방법으로 200℃에서 10분과 20분씩 볶음 처리를 한 후 실험을 진행하였다(Fig. 1-1).



Fig. 1-1. 도라지의 조건별 볶음처리 사진.

(2) 추출물 제조 : 볶음처리 조건별 분말 10 g에 70% 발효주정을 200 mL씩 가하여 40℃에서 4시간 동안 600 rpm 속도를 유지하여 추출한 후 동일한 조건으로 2회 반복 추출하여 모은 후 여과지(No. 2, Whatman, Tokyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)로 여과하여 모은 후 여과액을 감압농축기(EYELA, Tokyo, Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 60℃에서 감압 농축하여 추출물을 얻었다. 농축된 시료는 추출용매로 녹여 각각 10, 50 및 50  $\mu$ g/mL 농도로 제조하여 라디칼 소거능 및 탄수화물과 지방 분해효소 저해능을 평가하였다.

### (3) 총 phenolics, flavonoids 및 갈변물질 함량 :

(가) 총 phenolics : 총 phenolics 함량은 Folin-Denis법(16)을 약간 변형하여 측정하였다. 추출물 0.5 mL를 시험관에 분주하고 25%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  용액 0.5 mL를 첨가하여 3분간 정치시켰다. 그 후 2 N Folin-Ciocalteu phenol 용액 0.25 mL 첨가 및 혼합한 다음 30℃에서 1시간 동안 발색

시켰다. 발색된 시료는 750 nm에서 분광광도계(Spectronic 2D)를 사용하여 흡광도를 측정하였고, gallic acid를 이용하여 작성한 표준 검량곡선으로부터 값을 산출하였다.

(나) 총 flavonoids : 총 flavonoids 함량은 Davis변법(Davis, 1947)으로 측정하였다. 총 flavonoids 함량은 10배 희석한 추출물 0.5 mL를 시험관에 분주하고 diethylene glycol용액 1 mL, 1 N NaOH 0.01 mL를 첨가한 다음 37°C에서 1시간 동안 방치하여 발색시킨 후 분광광도계(Spectronic 2D)를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 flavonoid 함량은 rutin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구한다.

(다) 갈변물질 : 갈변물질의 함량은 비효소적 갈변도 측정 방법을 이용하였다. 그 여과액을 분광광도계(Spectronic 2D)를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 즉, 각 볶음처리 도라지 분말 1 g에 3차 증류수를 10 ml 가하여 300 rpm에서 1시간 추출하고 원심분리하여 상등액을 0.45  $\mu$ m 여과 필터로 여과한 후 여과액 1 ml을 분광광도계를 이용하여 측정하였다.

(4) Phenolic acids 및 flavonols 화합물 분석 : Phenolic acid와 flavonol 물질 분석은 Cho 등(2011)의 분석법을 변형하여 High Press Liquid Chromatogram(HPLC, Agilent 1200 series, Agilent Co., Forest Hill, Vic, Australia)로 분석하였다. 이동상 용매는 2.0% glacial acetic acid in water(solution A) 와 2.0% glacial acetic acid in acetonitrile(solution B)로 분석하였고, 이동상 조건은 solvent B 기준으로 각각 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 55 및 60 min 동안 15%, 5%, 15%, 5%, 10%, 50%, 50%, 60%, 80% 및 90%로 유지시켰다. 시료는 20  $\mu$ L를 주입하였고 이동상의 속도는 30°C에서 1 mL/min로 유지하였고 phenolic acids 물질은 diode array UV detector(Agilent 1200 series, Agilent Co.)의 흡광도 280 nm에서 정량하였고, flavonols 물질은 흡광도 270 nm에서 분석하였다.

#### (5) *In vitro* 상에서 생리활성 검정

(가) 라디칼 소거활성 측정 :

① DPPH 라디칼 소거능은 Hwang 등(2013)의 방법에 따라 측정하였다. 즉 DPPH 용액 0.8 mL와 농도별 추출물(0.25, 0.50, 및 1.00 mg/mL) 0.2 mL를 가해 암실에서 30분간 방치 후 분광광도계(Spectronic 2D)를 사용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다.

② ABTS 라디칼 소거능 역시 Hwang 등(2013)의 방법과 동일하게 측정하였다. 2.45 mM  $K_2S_2O_8$  5 mL과 7 mM ABTS<sup>•+</sup> 5 mL를 혼합한 후 암실에서 16시간가량 방치시켜 ABTS 라디칼을 형성시킨 후 732 nm에서 대조구의 흡광도 값이  $0.7 \pm 0.02$ 가 되도록 조절한 ABTS 용액 0.9 mL과 농도별 추출물 0.1 mL를 첨가하여 3분간 정치 시켜 732 nm에서 분광광도계를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

③ Hydroxyl ( $\bullet$ OH) 라디칼 소거능은 10 mM  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ -EDTA 0.2 mL, 10 mM 2-deoxyribose 0.2 mL, 10 mM  $H_2O_2$  0.2 mL 및 농도별 추출물 1.4 mL를 혼합하고 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 이 혼합액에 1% thiobarbituric acid와 2.8% trichloroacetic acid를 각각 1 mL를 가하여 100°C에서 20분간 가열하여 발색 및 냉각시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조구 실험은 시료 대신에 PBS 완충액(NaCl 8.76 g,  $NaH_2PO_4$  0.11 g,  $Na_2HPO_4$  0.596 g)을 사용하였고 라디칼 소거능은 시료용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도의 차이를 백분율(%)로 나타내었다(Shin 등, 2012).

(나) 탄수화물 및 지방 분해효소 저해활성 측정 :

①  $\alpha$ -Glucosidase 저해활성은 각 추출물 50  $\mu$ L,  $\alpha$ -glucosidase(0.5 U/mL) 효소용액 50  $\mu$ L, 200 mM 인산나트륨 완충용액(pH 6.8) 50  $\mu$ L를 혼합하여 37°C에서 10분간 예비반응 시켰다. 이 후 인산나트륨 완충용액(pH 6.8)에 녹인 *p*-NPG(5 mM) 100  $\mu$ L를 가하여 다시 37°C에서 10분 반응시켰다. 이 반응액에 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(100 mM) 0.75 mL를 가해 최종 반응을 정지시킨 후 420 nm에서 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다(2).

②  $\alpha$ -Amylase 저해활성은 각 추출물 50  $\mu$ L를 시험관에 분주한 후  $\alpha$ -amylase(1.0 U/mL) 효소용액 50  $\mu$ L와 200 mM 인산나트륨 완충용액(pH 6.8) 50  $\mu$ L를 첨가하여 37°C에서 10분간 예비 반응을 시켰다. 이 반응액에 200 mM 인산나트륨 완충용액(pH 6.8)에 녹인 1% 전분용액을 0.25 mL를 가하여 다시 37°C에서 10분간 반응 시켰다. 이후에는 0.5 N-NaOH 및 30% 타르타르산나트륨칼륨을 용해한 48 mM DNS 시약을 0.25 mL 첨가하여 100°C에서 20분간 끓여 발색 및 냉각시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다(20).

③ Pancreatic lipase 저해활성은 Kwon 등(21)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 추출물 50  $\mu$ L, lipase(1.0 U/mL) 효소용액 50  $\mu$ L, 및 200 mM 인산나트륨 완충용액(pH 6.8) 50  $\mu$ L를 혼합하여 37°C에서 10분간 예비 반응시켰다. 반응 후 인산나트륨 완충용액에 녹인 *p*-NPB(5 mM) 100  $\mu$ L를 가하여 동일하게 10분간 반응시킨 후 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.75 mL를 가해 반응을 종결시켜 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 효소 저해능의 음성대조구는 시료 대신에 추출용매를 취하였으며 시료용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

#### 다. 발효도라지 제조 - 1차 효모 균주별

(1) 발효도라지 제조 : 건조 도라지를 우선 세절기를 이용하여 적당한 크기와 모양으로 세절하였다. 이 후 도라지 100 g씩 선별하여 물에 30분간 수침한 후 물기를 제거하고 10분간 증자한 후 발효용기에 담고 121°C에서 30분 살균하고 30°C 전후로 냉각하고 미리 배양한 각 효모 균주를 5%(단독) 혹은 2.5%(혼합)를 접종하여 30°C에서 10일간 발효시킨 후 발효된 도라지를 건조하여 200°C에서 20분간 볶음처리 하였다(Fig. 1-2).

##### (2) pH, 산도 및 생균수 :

(가) pH : pH는 pH meter (model 3510, Jenway, Essex, UK)를 사용하여 측정하였다.

(나) 산도 : 산도는 중화적정법으로 시료 1 mL를 pH 8.2±0.1까지 중화시키는데 소비된 0.1 N NaOH의 양을 구하고 젖산(lactic acid)양으로 환산하였다.

(다) 생균수 : 시료 10 g에 90 ml 멸균생리식염수 희석한 후 단계별로 희석하여 PD 평판배지에 도달한 후 30°C에서 48시간 배양 후 나타난 집락을 계수하였다.

(3) 추출물 제조 : 효모 균주별 발효도라지 분말 10 g에 80% 발효주정 100 ml을 첨가한 후 300 rpm에서 12시간 추출하였다. 추출액을 여과하여 여과액을 얻은 후 여과액 일부는 0.45  $\mu$ m 필터로 여과하여 총 페놀릭스 함량 및 총 플라보노이드 분석을 위한 검정 시료에 사용하였다. 나머지 여과액 모두를 감압농축기를 이용하여 농축한 후 -70°C에서 하루 정도 동결한 후 동결 건조기를 이용하여 건조분말을 얻고, 추출용매인 80% 발효주정을 녹여 0.5 및 1.0 mg/ml 농도로 제조하여 그 외 기능성의 분석 시료로 사용하였다.

(4) 총 phenolics, flavonoids 및 갈변물질 함량 : 상기에 기술된 방법과 동일하게 사용하였다.

(5) Phenolic acids 및 flavonols 화합물 분석 : 상기에 기술된 방법과 동일하게 사용하였다.

(6) *In vitro* 상에서 생리활성 검정 : 상기에 기술된 방법과 동일하게 사용하였다.



Fig. 1-2. 발효도라지의 조건별 볶음처리 사진.

#### 라. 활성도라지 제조 - 지역별 도라지 원료의 고온숙성

(1) 활성도라지 제조 : 도라지는 산청군과 의령군에서 생산된 3년 생도라지를 주관기관으로부터 공급받아 사용하였다. 도라지를 흐르는 물에 3회 세척한 후 물기를 제거하고 100°C에서 30~60분에 증자한 후 70~80°C에서 10일간 숙성하여 건조하여 활성도라지를 제조하였고, 이를 분쇄기로 분쇄하여 분말로 준비하여 실험을 진행하였다(Fig. 1-3).

(2) pH 및 산도 : 상기에 기술된 방법과 동일하게 사용하였다.

(3) 추출물 제조 : 지역별 도라지로 제조한 활성도라지 분말 10 g에 80% 발효주정 100 ml을 첨가한 후 300 rpm에서 12시간 추출하였다. 추출액을 여과하여 여과액을 얻은 후 여과액 일부는 0.45 μm 필터로 여과하여 총 페놀릭스 함량 및 총 플라보노이드 분석을 위한 검정 시료에 사용하였다. 나머지 여과액 모두를 감압농축기를 이용하여 농축한 후 -70°C에서 하루 정도 동결한 후 동결건조기를 이용하여 건조 분말을 얻고, 추출 용매인 80% 발효주정을 녹여 0.5 및 1.0 mg/ml 농도로 제조하여 그 외 기능성의 분석 시료로 사용하였다.

(4) 총 phenolics, flavonoids 및 갈변물질 함량 : 상기에 기술된 방법과 동일하게 사용하였다.

(5) Phenolic acids 및 flavonols 화합물 분석 : 상기에 기술된 방법과 동일하게 사용하였다.

(6) *in vitro* 상에서 생리활성 검정 : 상기에 기술된 방법과 동일하게 사용하였다.



Fig. 1-3. 고온숙성법 이용 활성도라지의 제조 사진.

마. 활성도라지 제조 - 물리적(고온숙성)·생물학적(유산발효) 처리

(1) 활성도라지 제조 : 원료, 증자, 유산발효, 및 숙성 도라지 제조 : 5년근 도라지를 구입하여 흙과 각종 이물질을 제거하기 위해 흐르는 물에 충분히 세척하여 물기를 완전제거하였다. 증자 도라지는 1.5 kg을 100°C에서 1시간 쪄낸 후 55°C에서 2일간 열풍건조 하였다. 유산발효 도라지는 미리 배양한 젖산균배양액(*Lac. platarum* P1201과 *Lac. brevis* BMK184) 5%와 설탕 2%를 첨가하여 증자 도라지에 접종한 후 30°C에서 1주일 발효시켰다. 이후 55°C에서 2일간 열풍건조 하였다. 한편 젖산발효-숙성 도라지는 유산발효 도라지를 70°C에서 1주일 숙성시켰고, 숙성 도라지는 증자 도라지를 70°C에서 1주일 숙성시켜 55°C에서 3일간 건조하여 분쇄시켜 분말을 제조한 후 냉동실에 보관하면서 실험에 사용하였다(Fig. 1-4).



Fig 1-4. 물리적(고온숙성)·생물학적(유산발효) 처리 이용 활성도라지의 제조 사진.

(2) pH, 산도 및 생균수 : 상기에 기술된 방법과 동일하게 사용하였다.

(3) 일반성분 : 5대 영양성분, 지방산, 유리아미노산은 식품공전법 기준으로 분석하였다.

(4) 추출물 제조 : 물리적(고온숙성)·생물학적(유산발효) 처리에 의해 제조한 활성도라지 분말 10 g에 80% 발효주정 100 ml을 첨가한 후 300 rpm에서 12시간 추출하였다. 추출액을 여과하여 여과액을 얻은 후 여과액 일부는 0.45 µm 필터로 여과하여 총 페놀릭스 함량 및 총 플라보노이드 분석을 위한 검정 시료에 사용하였다. 나머지 여과액 모두를 감압농축기를 이용하여 농축한 후 -70°C에서 하루 정도 동결한 후 동결건조기를 이용하여 건조분말을 얻고, 추출용매인 80% 발효주정을 녹여 0.5 및 1.0 mg/ml 농도로 제조하여 그 외 기능성의 분석 시료로 사용하였다.

(5) 총 phenolics, flavonoids 및 갈변물질 함량 : 상기에 기술된 방법과 동일하게 사용하였다.

(6) Phenolic acids 및 flavonols 화합물 분석 : 상기에 기술된 방법과 동일하게 사용하였다.

(7) *In vitro* 상에서 생리활성 검정 : 상기에 기술된 방법과 동일하게 사용하였다.

## 1-2. 1차년도 연구결과

### 가. 발효 유산균 및 효모 확보

(1) 발효 유산균 16S rRNA 염기서열 확인 : 김치, 식물추출발효액 등으로부터 분리하여 보관해둔 유산균을 대상으로 기존의 생균제능과 가바 생성능을 확인(Fig. 1-5)하여 16S rRNA 염기서열을 결정하여 *Lactobacillus plantarum* 10종과 *Lactobacillus brevis* 10종을 확인하였다(Table 1-1). 한편 균주 LAB112(상동성 96%)를 제외하고는 99-100%의 상동성을 나타내었고, 차후 균주 LAB112 균주에 대해서는 전문적인 동정이 필요할 것으로 판단되었다.



Fig. 1-5. TLC법을 이용하여 유산균으로부터 가바 생성능 확인.

**Table 1-1. 발효 유산균의 16S rRNA 유전자 염기서열 상동성**

No	Isolates	Nearest relative <sup>1)</sup>	Accession No	Similarity (%)	Sources
1	S48	<i>Lactobacillus plantarum</i> AF1	FJ386491	99	물김치
2	S52	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	NR_075041	99	물김치
3	S56	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	NR_075041	99	물김치
4	S64	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	NR_075041	99	물김치
5	S65	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	NR_075041	99	물김치
6	P1201	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	NR_075041	99	발효음료
7	K23	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	NR_075041	99	배추김치
8	K24	<i>Lactobacillus plantarum</i> P-8	CP005942	99	배추김치
9	D56	<i>Lactobacillus plantarum</i> AF1	FJ386491	99	동치미
10	D58	<i>Lactobacillus plantarum</i> AF1	FJ386491	99	동치미
11	WCP02	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 14869	M58810	99	열무물김치
12	LAB28	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	NR_075024	99	배추김치
13	LAB40	<i>Lactobacillus brevis</i> BSO 464	JX398133	100	배추김치
14	LAB48	<i>Lactobacillus brevis</i> BSO 464	JX398133	99	배추김치
15	LAB62	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	NR_075024	99	배추김치
16	LAB112	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	NR_075024	96	배추김치
17	LAB224	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	NR_075024	100	배추김치
18	BMK41	<i>Lactobacillus brevis</i> BSO 464	JX398133	99	여주열무물김치
19	BMK184	<i>Lactobacillus brevis</i> BSO 464	JX398133	99	여주열무물김치
20	BMK484	<i>Lactobacillus brevis</i> BSO 464	JX398133	99	여주열무물김치

<sup>1)</sup>Accession number of the nearest relative. When more than one sequence had the same similarity, only the accession number of the first sequence is given.

**(2) 발효 유산균의 산과 인공위액 산 내성 확인 :**

(가) 산 내성 : 선발한 최종 20종의 유산균에 대해서 산 내성을 평가한 결과 **Table 1-2**와 같았다. 20종의 유산균 모두 pH 3.0에서 80% 이상의 생존율을 나타내었고, 특히 *Lac. plantarum* S48, S56과 P1201는 2시간째 100% 이상의 생존율을 보였고, 4시간째에는 97% 이상을 나타내었고, *Lac. brevis*의 경우 100% 생존율을 보이는 균주는 없었으나, 대체적으로 90% 전후의 생존율을 나타냈다. 한편 pH 2.0에서는 생존율이 급격히 감소하였으며, 2시간째 40% 이상의 생존율을 보이는 균주는 *Lac. plantarum* S48과 P1201 및 *Lac. brevis* WCP02, LAB48과 BMK484 있었으며, 4시간째 30% 이상의 생존율을 보이는 균주는 *Lac. plantarum* S48과 P1201 및 *Lac. brevis* WCP02뿐 있었다.

(나) 인공위액 산 내성 : 선발한 최종 20종의 유산균에 대해서 인공위액 산 내성을 평가한 결과 **Table 1-3**과 같았다. 20종의 유산균 모두 pH 3.0에서 80% 이상의 생존율을 나타내었고, 특히 *Lac. plantarum* S56, S65, P1201, K24, D56과 D58는 2시간째 100% 이상의 생존율을 보였고, 4시간째에는 90% 이상을 나타내었고, *Lac. brevis*의 경우 100% 생존율을 보이는 균주는 BMK41, BMK184와 BMK484 있었으며, 균주 WCP02 역시 98%로 100%에 가까운 생존율을 보였고, 4시간째에는 역시 90% 이상의 생존율을 보였다. 한편 pH 2.0에서는 생존율이 급격히 감소하였으며, 2시간째 30% 이상의 생존율을 보이는 균주는 *Lac. plantarum*는 없었으며, *Lac. brevis* WCP02, LAB28, LAB40과 BMK184 있었으며, 4시간째 20% 이상의 생존율을 보였다.



**Table 1-2. 발효 유산균의 산에 대한 생존율 비교**

Isolates	Survival rate (%) / pH / Incubation time			
	pH 2.0		pH 3.0	
	2 hr	4 hr	2 hr	4 hr
S48	48.69±2.43	33.11±1.66	110.49±6.63	108.62±6.52
S52	22.32±1.12	13.87±0.69	99.62±5.98	98.21±5.89
S56	24.85±1.24	12.33±0.62	101.30±6.08	97.14±5.83
S64	20.12±1.01	13.85±0.69	84.60±5.08	78.80±4.73
S65	22.47±1.12	11.52±0.58	86.46±5.19	82.63±4.96
P1201	46.84±2.34	34.60±1.73	100.39±6.02	99.34±5.96
K23	22.28±1.11	11.44±0.57	98.72±5.92	98.46±5.91
K24	23.65±1.18	10.52±0.53	97.06±5.82	91.44±5.49
D56	18.44±0.92	6.52±0.33	84.94±5.10	80.75±4.85
D58	24.18±1.21	12.85±0.64	97.39±5.84	92.44±5.55
WCP02	67.85±4.11	32.36±1.81	88.19±4.77	88.48±4.52
LAB28	30.49±1.77	14.22±0.55	88.12±5.06	92.58±5.08
LAB40	20.11±1.08	7.62±0.11	89.33±5.01	87.58±5.00
LAB48	43.87±2.01	17.15±0.48	96.38±5.23	94.05±5.67
LAB62	16.98±0.88	5.13±0.08	93.67±5.44	92.81±4.87
LAB112	39.77±2.16	11.33±0.10	96.13±5.71	95.69±4.91
LAB224	17.51±0.57	5.44±0.05	97.66±5.77	85.69±4.88
BMK41	16.67±0.61	7.02±0.06	84.45±5.10	84.02±4.74
BMK184	51.12±4.32	8.97±0.10	87.83±4.88	85.17±4.75
BMK484	43.77±2.47	12.44±0.16	80.21±4.55	83.52±4.44

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

**Table 1-3. 발효 유산균의 인공 위액 산에 대한 생존율 비교**

Isolates	Survival rate (%) / pH / Incubation time			
	pH 2.0		pH 3.0	
	2 hr	4 hr	2 hr	4 hr
S48	28.11±1.41	18.69±0.93	98.82±5.93	90.31±5.42
S52	17.64±0.88	10.45±0.52	97.60±5.86	87.78±5.27
S56	19.55±0.98	9.99±0.50	101.39±6.08	94.93±5.70
S64	18.33±0.92	10.42±0.52	84.33±5.06	78.31±4.70
S65	25.52±1.28	14.21±0.71	101.89±6.11	100.13±6.01
P1201	26.85±1.34	15.32±0.77	112.55±6.75	102.79±6.17
K23	19.42±0.97	9.21±0.46	82.74±4.96	79.41±4.76
K24	23.76±1.19	13.87±0.69	106.87±6.41	95.99±5.76
D56	25.66±1.28	13.54±0.68	105.35±6.32	98.13±5.89
D58	24.89±1.24	14.77±0.74	106.41±6.38	99.03±5.94
WCP02	44.43±2.44	29.64±2.08	98.86±5.67	92.24±5.77
LAB28	42.52±2.55	28.27±2.17	94.74±5.55	86.65±4.98
LAB40	36.59±2.21	22.54±1.89	95.65±5.82	92.77±5.01
LAB48	22.43±2.02	5.78±0.05	91.64±5.31	88.62±5.43
LAB62	18.30±1.77	11.42±0.10	94.14±5.56	90.56±4.87
LAB112	12.48±1.54	5.24±0.04	96.91±5.77	91.46±4.99
LAB224	13.77±1.48	4.98±0.05	97.52±6.43	95.32±4.76
BMK41	11.77±1.32	4.32±0.03	105.65±6.18	94.29±4.55
BMK184	36.12±2.99	5.55±0.06	101.32±6.09	92.42±4.50
BMK484	24.30±1.77	3.21±0.00	108.07±6.11	93.91±5.19

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

**(3) 발효 유산균의 가바 전환율 확인 :**

(가) 글루탐산 기질 : 20종의 유산균에 대해서 가바 생성능을 확인한 결과, *Lac. plantarum* 10종의 균주는 가바 생성능이 없었으며, *Lac. brevis* 10종만 가바 생성능 있어 이후 실험을 진행하였다. MRS broth에 발효 기질로서 MSG를 0.05%와 0.1%를 첨가하여 가바 전환율을 살펴본 결과, 생균제제능이 가장 우수한 WCP02 균주는 전환율이 93.51%와 95.08%로 가장 우수하였고, LAB28 균주를 제외하고 80% 이상의 전환율을 보였다(Fig. 1-6).

(나) 활성글루텐 기질: 5% 활성글루텐 기질로 하여 가바 전환율을 확인한 결과는 Fig. 1-7과 같았다. 선발한 유산균을 접종한 결과 전환율은 대부분 70% 이상을 나타내었다. 한편 생균제제능이 가장 우수한 WCP02 균주는 glutamic acid 함량은 4.08 mg/100 ml 있었고, GABA 함량은 23.58 mg/100 ml으로 전환율은 85.25%로 11종의 유산균 가장 높은 전환율이 나타내었다. 이외 물김치에서 분리한 BMK41, BMK184 및 BMK484 균주들 역시 전환율이 80% 이상으로 높은 전환율을 나타내었다.

(다) 콩 단백질 기질 : 5% 콩 단백질 기질로 하여 가바 전환율을 확인한 결과는 Fig. 1-8과 같았다. 선발한 유산균을 접종한 결과 전환율은 대부분 약 60% 이상을 나타내었다. 한편 생균제제능이 가장 우수한 WCP02 균주는 glutamic acid 함량은 108.89 mg/100 ml 있었고, GABA 함량은 197.19 mg/100 ml으로 전환율은 64.42%로 11종의 유산균 중 두 번째로 높은 전환율을 나타내었다. 이외 물김치에서 분리한 BMK41, BMK184 및 BMK484 균주들 역시 전환율이 60% 이상으로 그중 BMK41 균주는 66.33%로 유산균 중 가장 높은 전환율을 나타내었다.

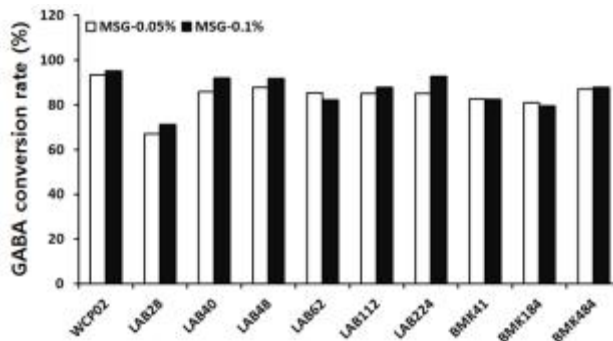


Fig. 1-6. 발효 유산균의 MSG 기질에서 가바 전환율 확인. GABA conversion rate were determined using the following equation: % GABA = GABA/(GA+GABA) × 100: GA, glutamic acid, GABA,  $\gamma$ -aminobutyric acid.

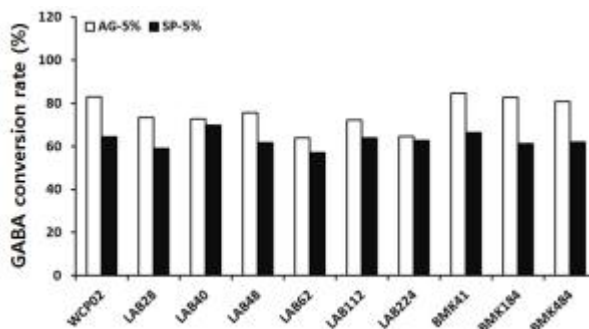


Fig. 1-7. 발효 유산균의 활성글루텐과 콩단백질 기질에서 가바 전환율 확인.

(4) 발효 효모 26S rRNA 염기서열 확인 : 과일발효액으로부터 분리하여 보관해둔 효모를 대상으로 우선 26S rRNA 염기서열을 결정하여 *Saccharomyces cerevisiae*로 동정된 식용 가능한 5종의 효모를 선발하였다(Table 1-4).

Table 1-4. 발효 효모의 26S rRNA 유전자 염기서열 상동성

No	Isolates	Nearest relative	Accession No	Similarity (%)	Source
1	Y4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D3C	JF715188	99%	Golden Kiwi
2	Y10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D3C	JF715188	99%	Loquat
3	Y28	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D3C	JF715188	99%	Wild berry
4	Y78	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D3C	JF715188	99%	Grape
5	Y81	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D3C	JF715188	99%	Grape

<sup>1)</sup>Accession number of the nearest relative. When more than one sequence had the same similarity, only the accession number of the first sequence is given.

(4) 발효 효모의 당, 알코올과 산 내성 확인 :

(가) 당 내성 : 분리한 5종의 효모 균주에 대해 당 내성을 살펴본 결과, 당 농도 20% 이상에서 공시균주인 KCCM 12615보다 생육 정도가 우수하여 본 분리 균주들은 당 내성이 우수한 것으로 판단되었다(Fig. 1-8A).

(나) 알코올 내성 : 분리한 5종의 효모 균주에 대해 당 내성을 살펴본 결과, 알코올 농도 15%에서 공시균주인 KCCM 12615보다 생육 정도가 높은 균주는 Y4, Y10 및 Y28로 이들 균주는 알코올 내성에 우수한 것으로 판단되었다(Fig. 1-8B).

(다) 산 내성 : 분리한 5종의 효모 균주에 대해 당 내성을 살펴본 결과, pH 3.0에서 공시균주인 KCCM 12615보다 생육정도가 우수하여 본 분리 균주들은 산 내성이 우수한 것으로 판단되었다(Fig. 1-8C).

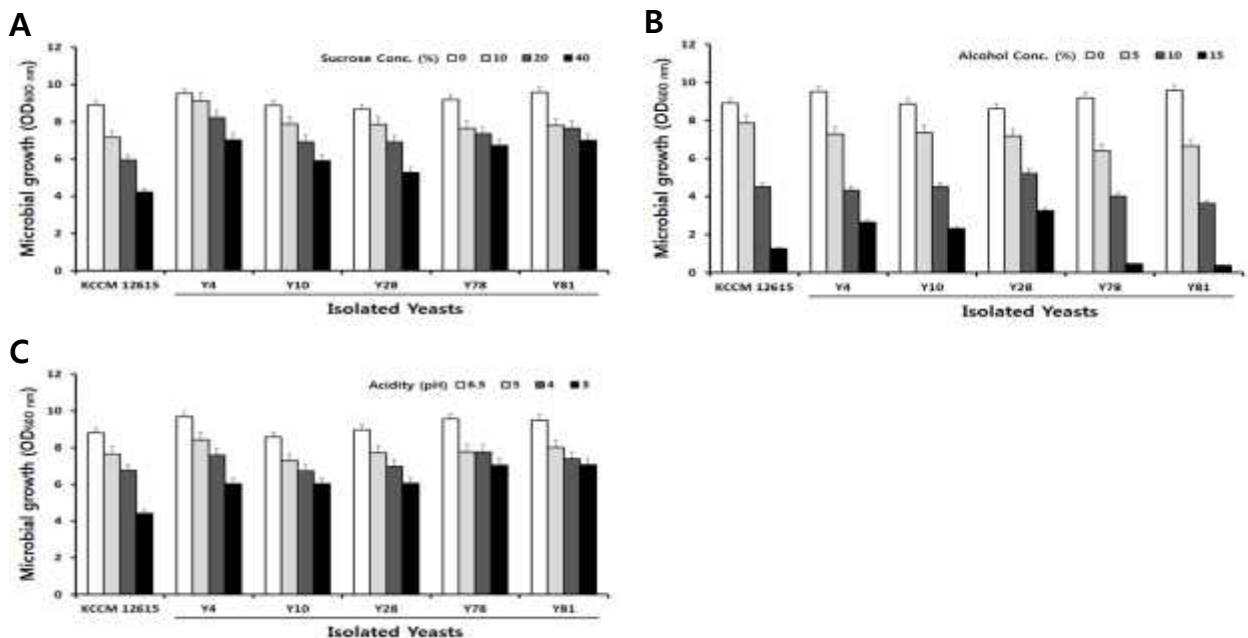


Fig. 1-8. 발효 효모의 당, 알코올 및 산 내성. A, 당 내성; B, 알코올 내성 및 C, 산 내성.

## 나. 도라지 볶음처리 조건 확립

### (1) 총 phenolics, 총 flavonoids 및 갈변물질 함량 :

(가) 총 phenolics : 당귀를 볶음처리 하여 측정된 결과와 동일한 양상을 나타내었는데, 즉 볶음 온도와 시간에 따른 유의적인 차이는 크게 나타나지 않았다. 하지만 볶음처리 하지 않은 도라지(12.71 mg/g)에 비해서는 온도와 시간 증가에 따른 약간의 증가가 있었고 200°C 에서 20 분 볶음처리한 경우 14.01 mg/g으로 가장 높게 측정되었다(Fig. 1-9A).

(나) 총 flavonoids : 총 phenolics 함량과 마찬가지로 볶음 온도와 시간이 증가할수록 그 함량 차이가 확실히 있는 것으로 측정되었다. 즉, 원료인 도라지에서는 0.46 mg/g, 150°C-10분 처리 시 0.56 mg/g, 150°C-20분 처리 시 0.65 mg/g, 200°C-10분 처리 시 0.97 mg/g이었으며, 200°C-20분 처리 시에는 1.17 mg/g으로 열처리에 의한 총 flavonoids 함량 증가가 명확히 나타났다(Fig. 1-9B).

(다) 갈변물질 : 갈변 변화를 측정된 결과 원료 도라지에 비해 온도와 시간이 증가할수록 갈변 역시 비례하게 일어났는데 이는 마이알 반응에 의한 것으로 판단하였다(Fig. 1-9C).

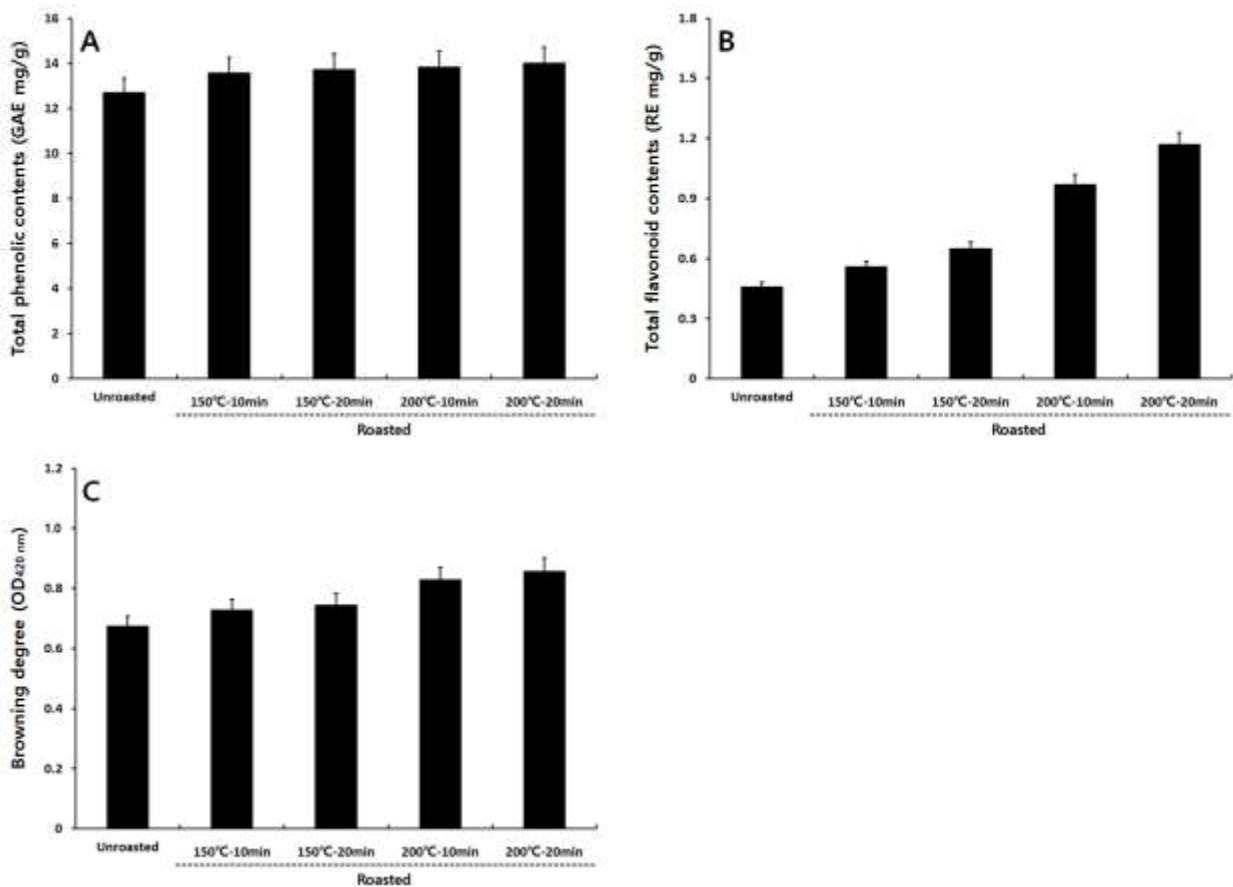


Fig. 1-9. 볶음처리에 따른 도라지의 총 phenolics, 총 flavonoids 및 갈변물질 함량. A, 총 phenolics 함량; B, 총 flavonoids 함량 및 C, 갈변물질 함량.

### (2) 라디칼 소거능 및 환원력 측정 :

(가) DPPH : DPPH 라디칼 소거능의 경우에 최고 농도인 1 mg/g 처리 시에 평균 78.01%의 우수한 소거능을 나타내었다(그림 2-6A). 한편 볶음 온도와 시간에 따른 변화는 조금씩 있었으

나 큰 차이는 없었다.

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

(다) Hydroxyl :  $\cdot\text{OH}$  라디칼 소거능의 경우에는 DPPH 및 ABTS와 전체적인 경향은 비슷하게 측정되었으나 다소 낮은 소거능을 보였고 저농도 즉 2.5 및 5.0 mg/g 농도 처리 시에는 대부분 29% 내외의 낮은 소거능을 보인 반면 오직 1.0 mg/g 농도 처리 시에서만 52% 내외의 라디칼 소거능이 있음으로 결과가 나타났(그림 2-6C). 한편 이러한 결과는 polyphenol성 화합물과 여러 라디칼 소거 기작에 상관관계가 있다는 연구 보고들을 통해 본 연구에서도 여러 조건의 도라지 추출물들은 이런 근거들과 밀접한 관계가 있을 것이라 사료되었다.

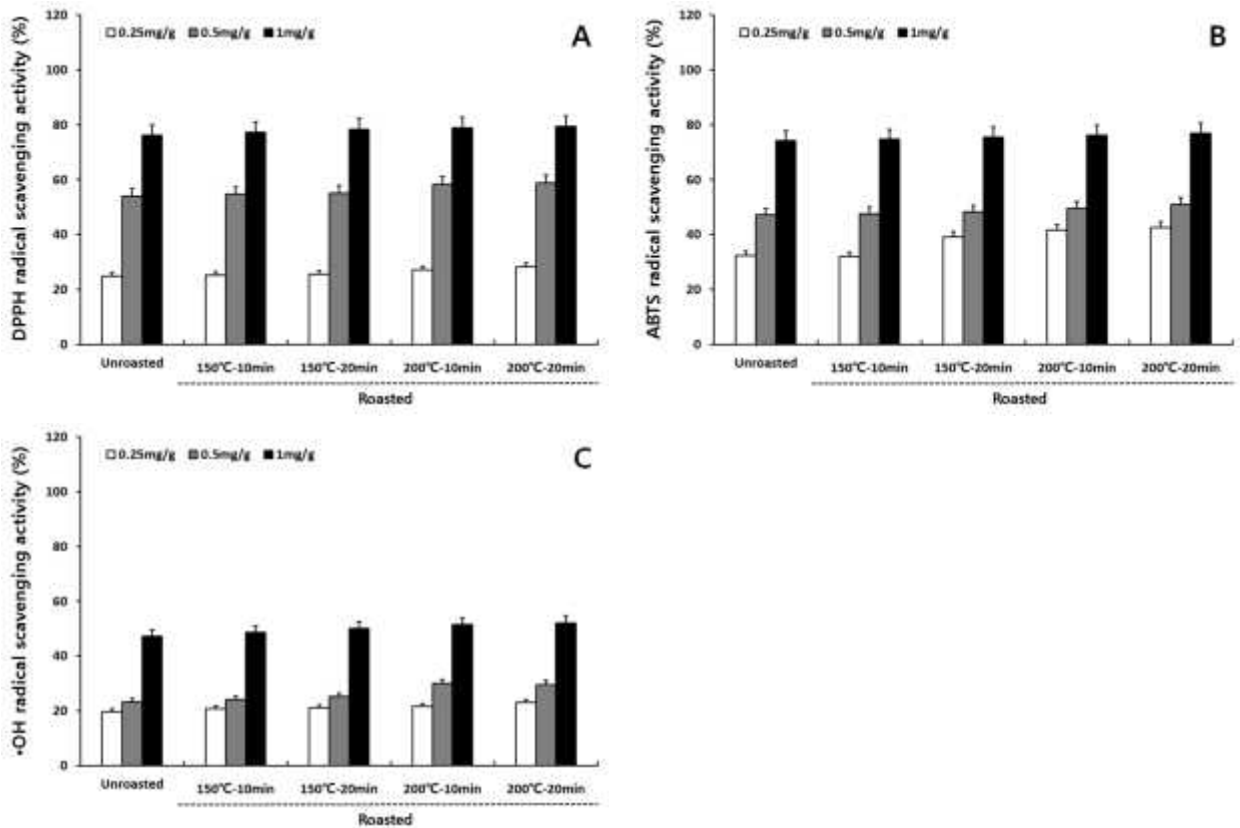


Fig. 1-10. 볶음처리에 따른 도라지의 라디칼 소거활성. A, DPPH 라디칼 소거활성; B, ABTS 라디칼 소거활성; 및 C, Hydroxyl 라디칼 소거활성.

(2) 탄수화물 및 지방분해 효소 저해능 측정 :

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

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

(다) 췌장- lipase 저해능 : 지방 분해효소 저해능 측정에서는 2.5 및 5.0 mg/g의 농도에서는 저해능이 매우 미약한 수준이었고 1.0 mg/g 농도에서는 200°C-20분 처리 시 최종 18.82%를 나타내었다(그림 2-7C). 한편 모든 분해효소 저해능은 농도에 비례하여 조금씩 저해능이 상승

하였고 모든 결과와 동일하게 도라지의 볶음 온도와 시간에 따른 증가 역시 조금씩 증가하는 것으로 나타났다.

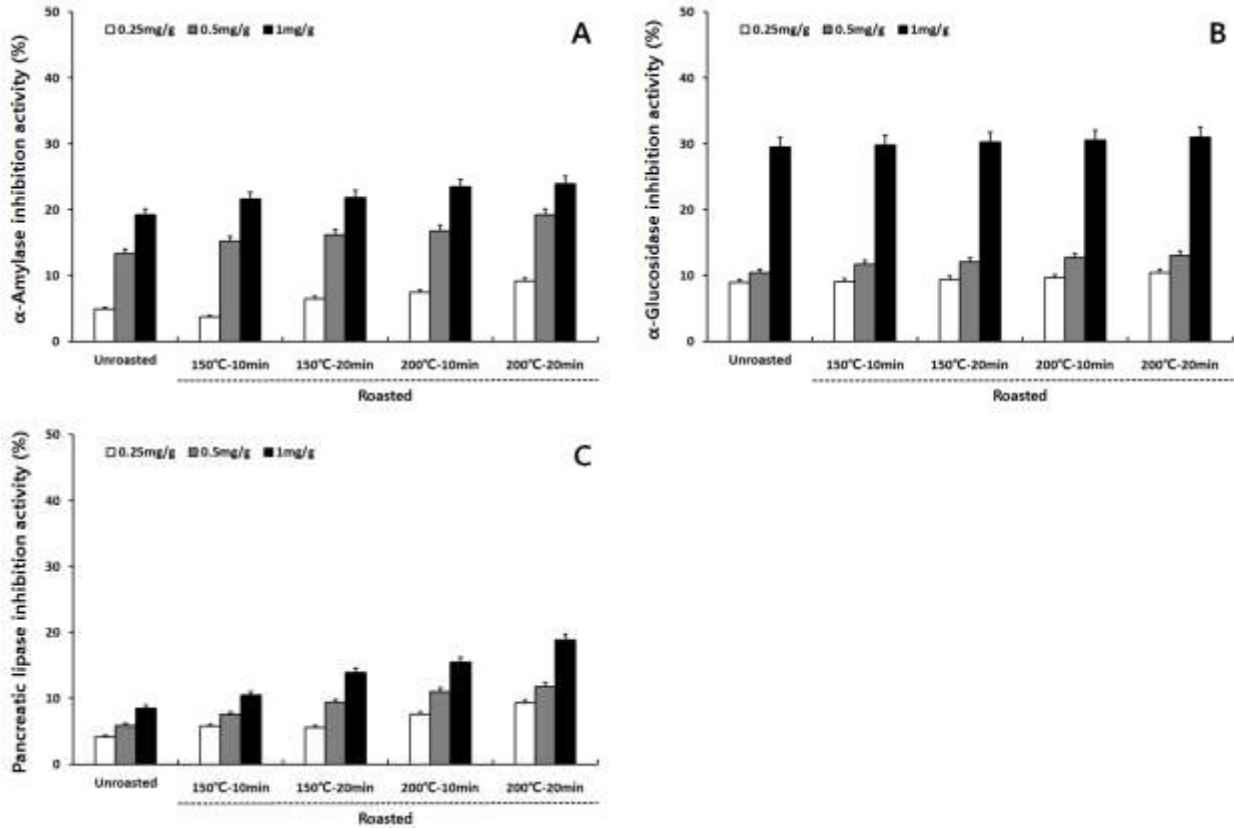


Fig. 1-11. 볶음처리에 따른 도라지의 소화효소 저해활성. A,  $\alpha$ -glucosidase 저해활성; B,  $\alpha$ -amylase 저해활성; 및 C, 췌장-lipase 저해활성.

#### 다. 발효 도라지 제조 조건 확립 - 효모 균주별 (1차)

##### (1) 발효 도라지의 이화학적 특성 비교 :

(가) pH : 발효 도라지의 pH를 측정한 결과 Table 1-5와 같았으며, 발효 후 pH는 감소하는 경향을 보였다. 비발효 도라지의 pH는 5.34 있었으며, CCS27과 Y10 혼합균주 발효 도라지의 pH는 4.6으로 가장 낮았다. 이는 효모 발효에 의해 생성된 다양한 유기산에 의한 것으로 추정되었다.

(나) 산도 : 발효 도라지의 산도를 측정한 결과, 대체적으로 pH가 낮아짐에 따라 산도는 증가하는 경향을 보였다. 비발효 도라지의 산도는 0.13% 있었으며, CCS27과 Y10 혼합균주 발효 도라지의 pH는 0.18%으로 가장 높았다. 이는 효모 발효에 의해 생성된 다양한 유기산으로 산도가 증가된 것으로 사료된다(Table 1-5).

(다) 생균수 : 발효 도라지의 효모 생균수를 측정한 결과 Table 1-5와 같았으며, 비발효 도라지의 효모가 검출되지 않았으며, CCS27과 Y10 혼합균주 발효 도라지의 6.84 log cfu/ml로 가장 낮았다.

**Table 1-5. 효모 균주별 발효 도라지의 pH, 산도 및 생균수 비교**

Starters	Indexes <sup>1)</sup>		
	pH	Acidity (%, as lactic acid)	Viable cell numbers (log cfu/g)
NIM	5.34	0.13	-
CCSY27	4.85	0.16	7.08
Y10	4.65	0.17	7.99
Y28	4.92	0.15	7.48
Y78	5.24	0.14	7.48
Y81	5.25	0.14	7.00
CCSY27+Y10	4.60	0.18	7.31
CCSY27+Y28	4.90	0.16	6.84
CCSY27+Y78	5.24	0.14	7.72
CCSY27+Y81	5.31	0.14	7.28

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

**(2) 발효 도라지의 총 phenolics, 총 flavonoids 및 갈변물질 비교 :**

(가) 총 phenolics : 발효 도라지의 총 phenolics 함량은 발효가 진행된 도라지에서 함량이 증가하였다. 한편, 효모를 접종하지 않은 비발효 도라지가 5.53 mg/g으로 함량이 가장 적었으며, CCS27과 Y10 혼합균주의 발효 도라지가 6.8 mg/g으로 가장 높았으나, 발효 중 증가는 하였으나 이들 간의 큰 차이는 없는 것으로 나타났다(Fig. 1-12A).

(나) 총 flavonoids : 발효 도라지의 총 flavonoids 함량을 측정한 결과, 비발효 도라지의 경우에는 0.38 mg/g으로 가장 낮았으며, CCS27과 Y10 혼합균주의 발효 도라지가 0.52 mg/g으로 가장 높았으나, 발효 중 증가는 하였으나 이들 간의 큰 차이는 없는 것으로 나타났다(Fig. 1-12B).

(다) 갈변물질 : 발효 도라지의 갈변도는 발효가 진행된 도라지에서 증가하였다. 한편, 효모를 접종하지 않은 비발효 도라지가 1.63으로 함량이 가장 적었으며, CCS27과 Y10 혼합균주의 발효 도라지가 2.8으로 가장 높았으나, 발효 중 증가는 하였으나 이들 간의 큰 차이는 없는 것으로 나타났다(Fig. 1-12C).

**(3) 발효 도라지의 라디칼 소거활성 비교 :**

(가) DPPH 라디칼 소거활성 : 발효 도라지의 DPPH 라디칼 소거활성을 측정한 결과는 Fig. 1-13A와 같았고, 발효 도라지가 비발효 도라지보다 약간 높은 활성을 나타내었다. 비발효 도라지는 85.26% 있었으며, CCS27과 Y10 혼합균주의 발효 도라지가 96.26%으로 가장 높았으나, 발효 중 증가는 하였으나 이들 간의 큰 차이는 없는 것으로 나타났다.

(나) ABTS 라디칼 소거활성 : 발효 도라지의 ABTS 라디칼 소거활성 역시 DPPH 라디칼 소거활성과 일치하였다. 비발효 도라지는 73.26% 있었으며, CCS27과 Y10 혼합균주의 발효 도라지가 84.08%으로 가장 높았으나, 발효 중 증가는 하였으나 이들 간의 큰 차이는 없는 것으로 나타났다(Fig. 1-13B).

(다) •OH 라디칼 소거활성 : 발효 도라지의 •OH 라디칼 소거활성 역시 DPPH 라디칼 소거활성과 일치하였다. 비발효 도라지는 58.116% 있었으며, CCS27과 Y10 혼합균주의 발효 도라지

가 75.22%으로 가장 높았으나, 발효 중 증가는 하였으나 이들 간의 큰 차이는 없는 것으로 나타났다(Fig. 1-13A).

**(4) 발효 도라지의 소화효소 저해활성 비교 :**

(가)  $\alpha$ -Glucosidase 저해활성 : 발효 도라지의  $\alpha$ -glucosidase 저해활성은 발효 후에 약간 증가하는 경향을 보였으나, 발효 미생물 사이에 큰 차이를 보이지는 않았다. 효모를 접종하지 않은 비발효 도라지의 경우 29.7%의 활성을 나타내었고, CCS27과 Y10 혼합균주의 발효 도라지가 39.07%로 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 1-14A).

(나)  $\alpha$ -Amylase 저해활성 : 발효 도라지의  $\alpha$ -amylase 저해활성 역시  $\alpha$ -glucosidase 저해활성과 동일한 경향을 보여 발효 후에 약간 증가하는 경향을 보였으나, 발효 미생물 사이에 큰 차이를 보이지는 않았다. 효모를 접종하지 않은 비발효 도라지의 경우 14.24%의 활성을 나타내었고, CCS27과 Y10 혼합균주의 발효 도라지가 19.45%로 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 1-14B).

(다) Pancreatic lipase 저해활성 : 발효 도라지의 pancreatic lipase 저해활성은 발효 후에 약간 증가하는 경향을 보였으나, 발효 미생물 사이에 큰 차이를 보이지는 않았다. 효모를 접종하지 않은 비발효 도라지의 경우 20.11%의 활성을 나타내었고, CCS27과 Y10 혼합균주의 발효 도라지가 26.79%로 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 1-14C).

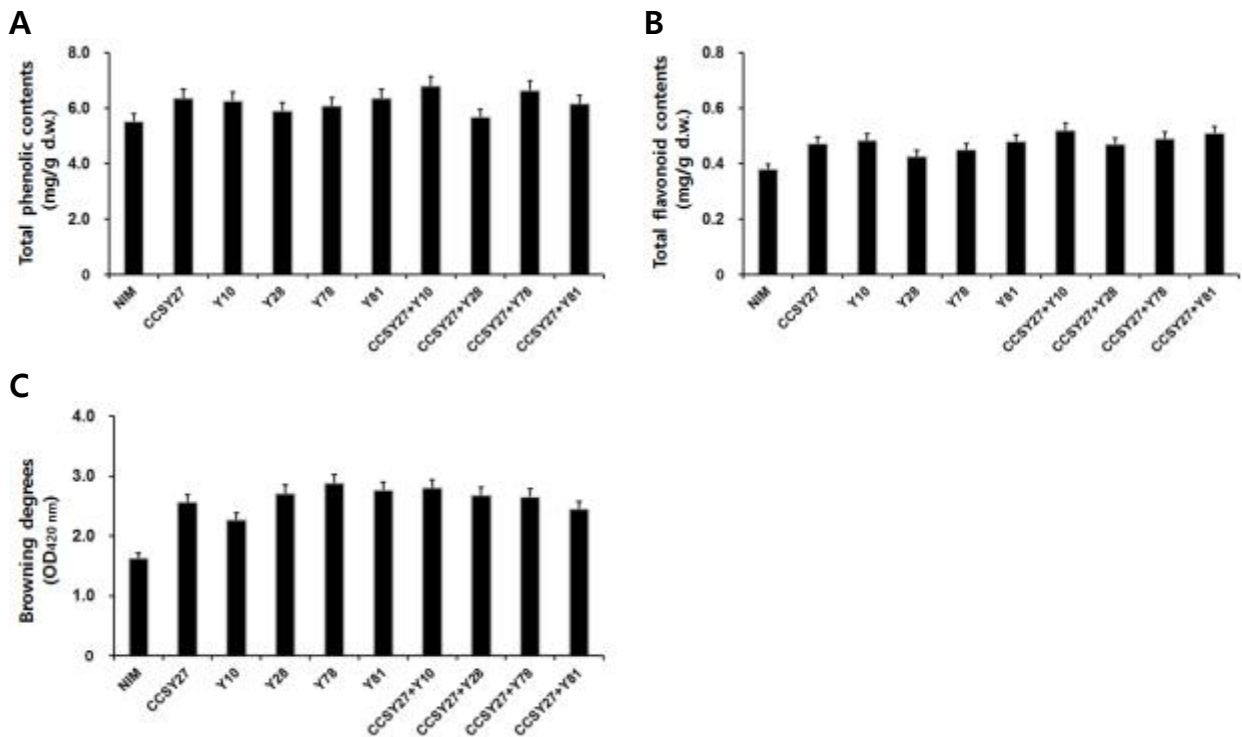


Fig. 1-12. 효모 균주별 발효 도라지의 총 phenolics, 총 flavonoids 및 갈변물질 함량. A, 총 phenolics 함량; B, 총 flavonoids 함량 및 C, 갈변물질 함량.



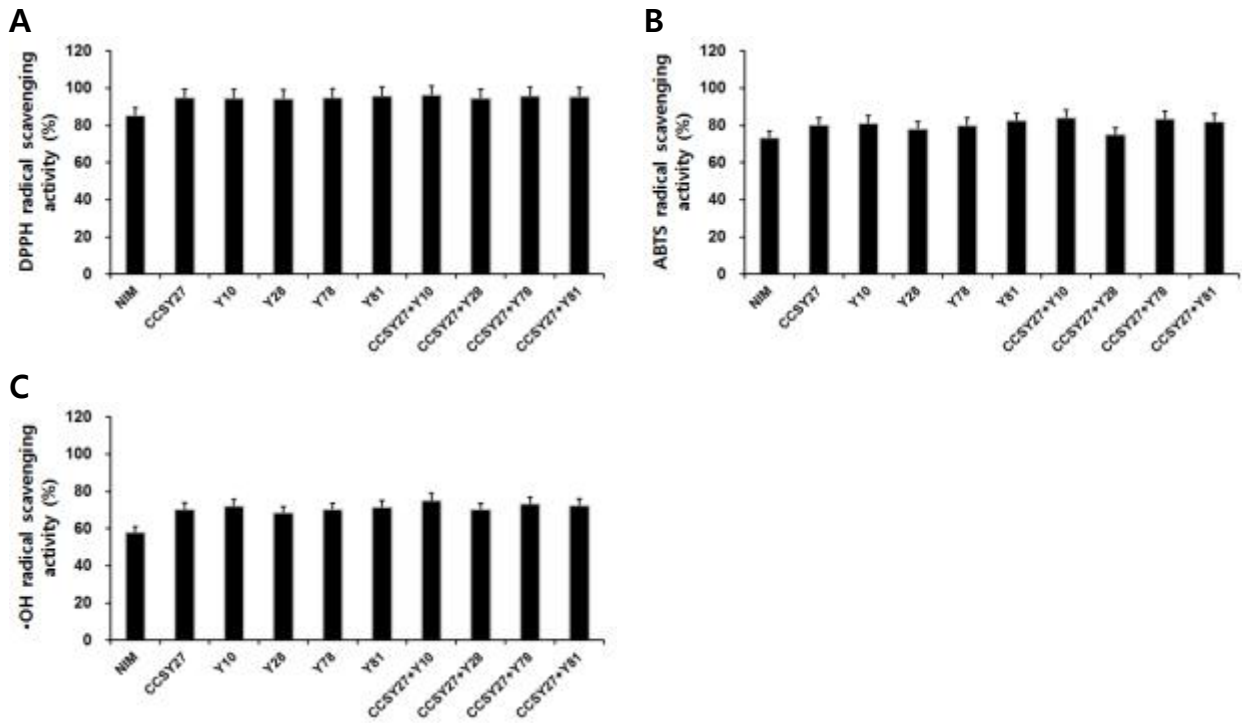


Fig. 1-13. 효모 균주별 발효 도라지의 라디칼 소거활성. A, DPPH 라디칼 소거활성; B, ABTS 라디칼 소거활성; 및 C, Hydroxyl 라디칼 소거활성.

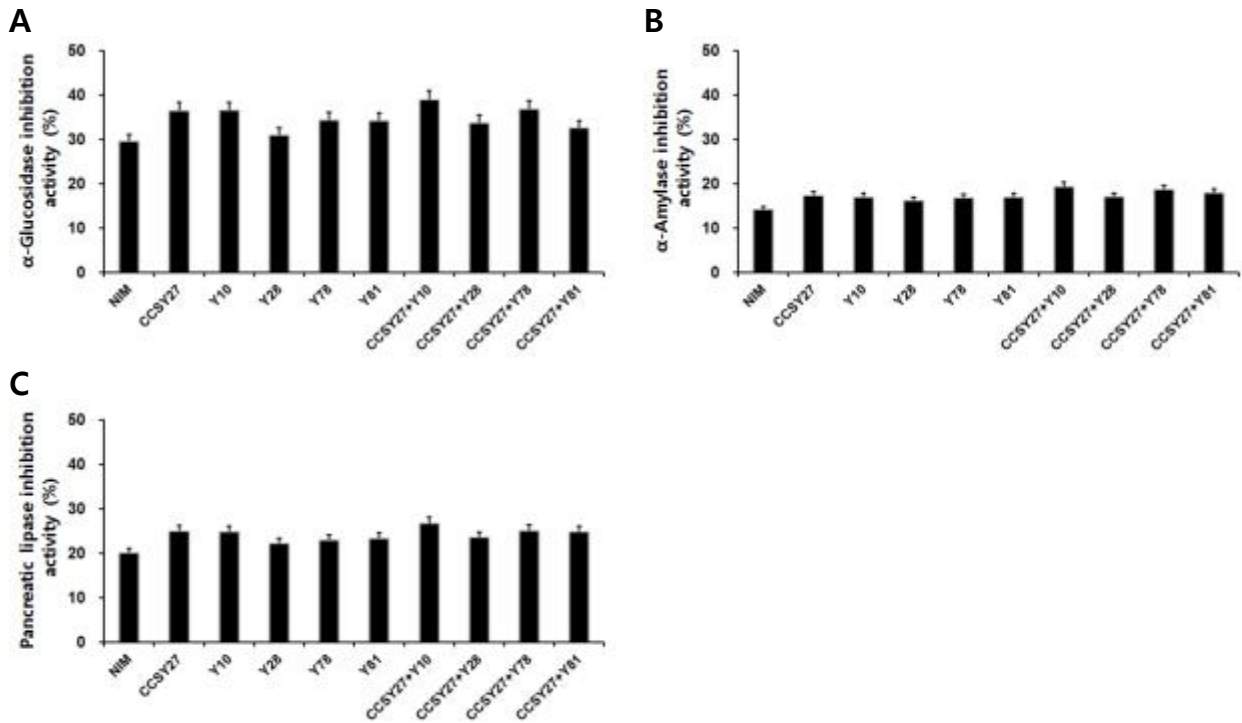


Fig. 1-14. 효모 균주별 발효 도라지의 소화효소 소거활성. A, α-glucosidase 저해활성; B, α-amylase 저해활성; 및 C, 췌장-lipase 저해활성.

**라. 1차 활성도라지 제조 조건 확립 - 지역별 도라지 원료**

**(1) 활성도라지의 이화학적 특성 비교 :**

(가) pH : 지역별 원료를 이용하여 고온 숙성시켜 제조한 활성도라지의 pH를 측정한 결과 Fig. 1-15A와 같았다. 원료 도라지의 pH는 5.63 (산청)과 5.48 (의령)이었으며, 고온숙성 도라지는 이보다 낮은 3.97 (산청)과 3.83 (의령)으로 측정되어졌다.

(나) 산도 : 활성도라지의 산도를 측정한 결과, pH와 반비례적인 경향을 나타내었고, 원료 도라지의 0.31% (산청)과 0.19% (의령)이었으며, 고온숙성 도라지는 이보다 낮은 0.37% (산청)과 0.34% (의령)으로 측정되어졌다(Fig. 1-15B).

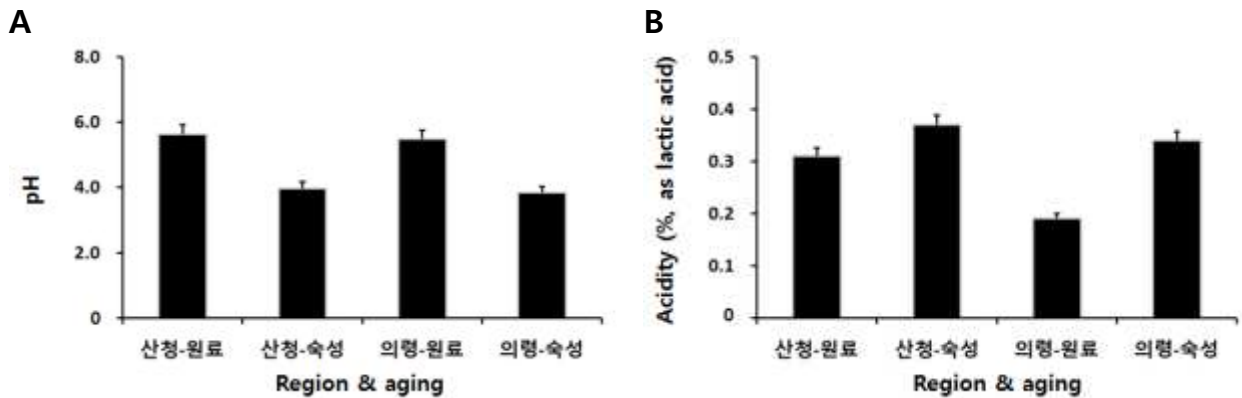


Fig. 1-15. 지역별 도라지로 제조한 활성도라지의 pH와 산도. A, pH and B, acidity.

**(2) 활성도라지의 총 phenolics, 총 flavonoids 및 갈변물질 비교 :**

(가) 총 phenolics : 지역별 원료를 이용하여 고온 숙성시켜 제조한 활성도라지의 총 phenolics 함량은 원료 도라지가 0.62 mg/g (산청)과 0.48 mg/g (의령)으로 함량이 적었으며, 고온숙성 도라지가 1.06 mg/g (산청)과 0.94 mg/g으로 높았다(Fig. 1-16A).

(나) 총 flavonoids : 활성도라지의 총 flavonoids 함량을 측정한 결과, 원료 도라지가 0.18 mg/g (산청)과 0.12 mg/g (의령)으로 함량이 적었으며, 고온숙성 도라지가 1.11 mg/g (산청)과 0.107 mg/g으로 높았다(Fig. 1-16B).

(다) 갈변물질 : 활성도라지의 갈변도를 측정한 결과, 원료 도라지가 0.632 mg/g (산청)과 0.458 mg/g (의령)으로 함량이 적었으며, 고온숙성 도라지가 3.071 mg/g (산청)과 3.055 mg/g으로 높았다(Fig. 1-16C).

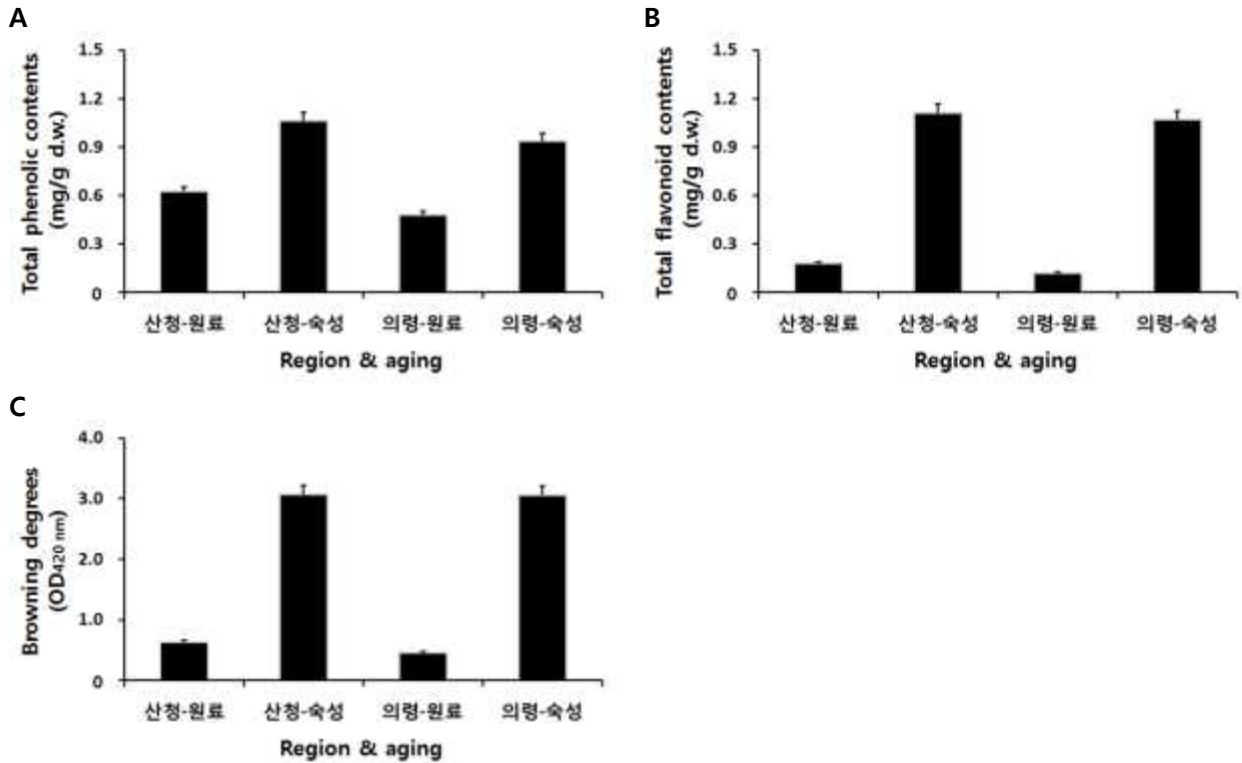


Fig. 1-16. 지역별 도라지로 제조한 활성도라지의 총 phenolics, 총 flavonoids 및 갈변물질 함량. A, 총 phenolics 함량; B, 총 flavonoids 함량 및 C, 갈변물질 함량.

### (3) 활성도라지의 phenolic acids 및 flavonols 화합물 함량 :

(가) Phenolic acids : 지역별 원료를 이용하여 고온 숙성시켜 제조한 활성도라지의 phenolic acids 화합물 함량은 Table 1-6과 같았고, 원료는 6종의 화합물이 검출되었고, 고온숙성 도라지는 5종의 화합물이 검출되었다. 산청의 원료 도라지는 protocatechuic acid 및 chlorogenic acid가 주요 화합물로 각각 91.13  $\mu\text{g/g}$  및 82.05  $\mu\text{g/g}$  있었고, 의령의 원료 도라지 역시 protocatechuic acid 및 chlorogenic acid가 주요 화합물로 각각 81.71  $\mu\text{g/g}$  및 73.46  $\mu\text{g/g}$  있었다. 한편, 고온숙성 도라지의 경우 protocatechuic acid, chlorogenic acid 및 *p*-hydrobenzoic acid가 주요 화합물로 각각 126.69  $\mu\text{g/g}$ , 148.31  $\mu\text{g/g}$ 과 102.78  $\mu\text{g/g}$  (산청-숙성 도라지) 및 131.89  $\mu\text{g/g}$ , 135.87  $\mu\text{g/g}$ 과 104.84  $\mu\text{g/g}$  (의령-숙성 도라지) 있었다. 지역별 도라지로 제조한 활성도라지의 HPLC 크로마토그램은 Fig. 1-17A&B과 같았다.

(나) Flavonols : 활성도라지의 flavonols 화합물 함량은 Table 1-6과 같았고, 산청의 원료와 고온 숙성 도라지는 3종의 화합물이 검출되었고, 의령의 원료와 고온숙성 도라지는 4종의 화합물이 검출되었다. 산청의 원료와 숙성 도라지는 epigallocatechin, catechin 및 naringenin이 검출되었고, 각각 48.62  $\mu\text{g/g}$ , 35.15  $\mu\text{g/g}$ 과 75.53  $\mu\text{g/g}$  (산청-원료) 및 138.23  $\mu\text{g/g}$ , 52.95  $\mu\text{g/g}$ 과 111.51  $\mu\text{g/g}$  (산청-숙성 도라지) 있었고, 의령의 원료와 숙성 도라지는 epigallocatechin, catechin, naringenin 및 formonoetin이 검출되었고, 각각 32.34  $\mu\text{g/g}$ , 29.32  $\mu\text{g/g}$ , 52.08  $\mu\text{g/g}$ 과 17.95  $\mu\text{g/g}$  (의령-원료) 및 119.69  $\mu\text{g/g}$ , 54.11  $\mu\text{g/g}$ , 91.43  $\mu\text{g/g}$ 과 111.51  $\mu\text{g/g}$  (의령-숙성 도라지) 있었다(표 2-6). 지역별 도라지로 제조한 활성도라지의 HPLC 크로마토그램은 Fig. 1-17C&D과 같았다.

Table 1-6. 지역별 도라지로 제조한 활성도라지의 지방산 조성 비교

Contents <sup>1)</sup> ( $\mu\text{g/g}$ )	재배 기간별 도라지			
	산청-원료	산청-숙성	의령-원료	의령-숙성
<b>Phenolic acids</b>				
Gallic acid	21.0	65.57	16.37	57.49
Protocatechuic acid	91.13	126.69	81.71	131.89
Chlorogenic acid	82.06	148.31	73.46	135.87
<i>p</i> -Hydrobenzoic acid	55.23	102.78	58.96	104.84
Vanilic acid	14.76	nd	nd	nd
<i>p</i> -Coumaric acid	nd	nd	19.05	nd
<i>t</i> -Cinnamic acid	40.59	46.21	41.75	44.64
Total	304.77	489.56	291.3	474.73
<b>Flavonols</b>				
Epigallocatechin	48.62	138.23	32.34	119.69
Catechin	35.15	52.95	29.32	54.11
Naringin	nd	nd	nd	nd
Naringenin	75.53	111.51	52.08	91.43
Formonoetin	nd	nd	17.95	15.43
Total	159.3	302.69	131.69	280.66

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

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

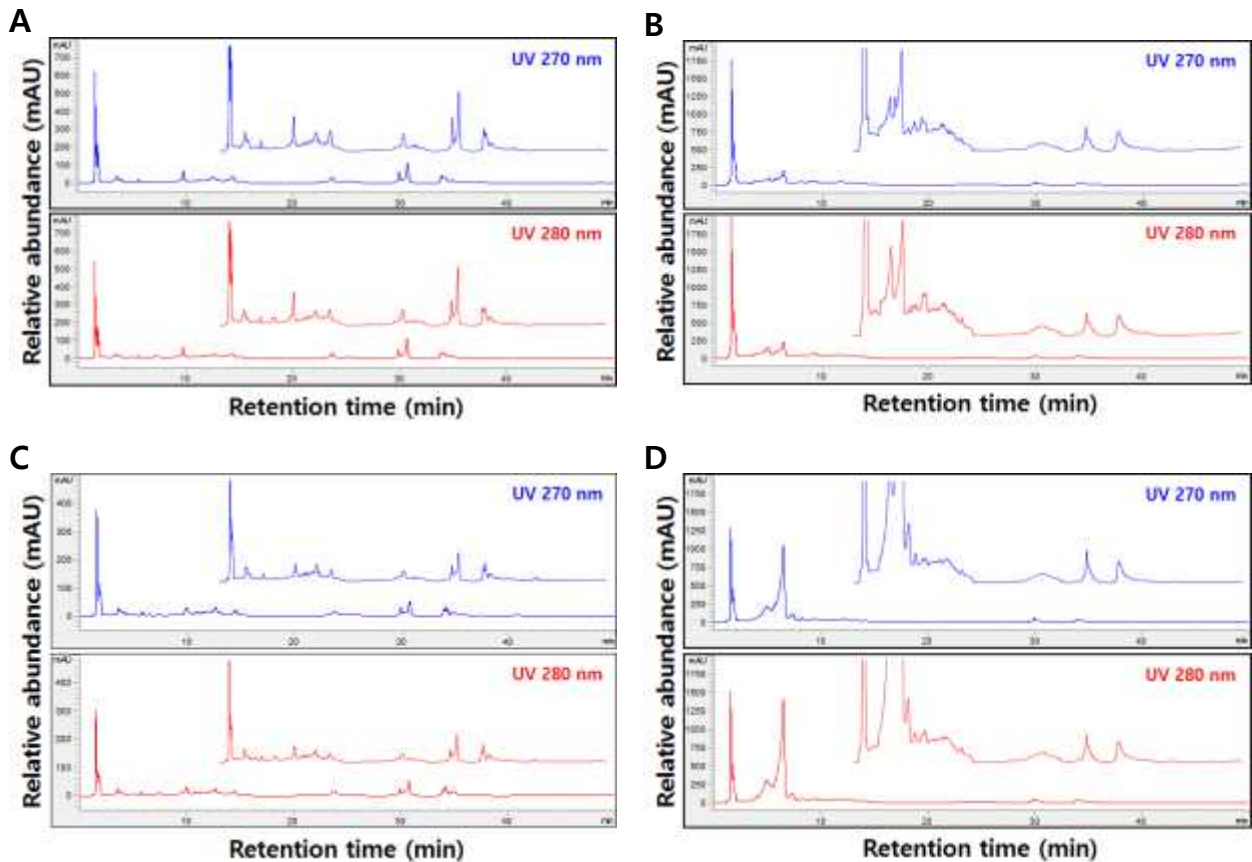


Fig. 1-17. Phenolic acids (280 nm) 및 flavonols (270 nm) 화합물의 HPLC 크로마토그램. A, 산청 원료 도라지; B, 산청 고온숙성 도라지; C, 의령 원료 도라지 및 D, 의령 고온숙성 도라지.

**(4) 활성도라지의 라디칼 소거활성 비교 :**

(가) DPPH 라디칼 소거활성 : 지역별 원료를 이용하여 고운 숙성시켜 제조한 활성도라지의 DPPH 라디칼 소거활성을 측정한 결과는 Fig. 1-18A와 같았다. 산청 원료 도라지는 82.59%, 산청 숙성 도라지는 95.28%로 가장 높았다. 한편, 의령 원료 도라지는 80.75%로 가장 낮았으며, 의령 숙성 도라지는 90.17% 있었다.

(나) ABTS 라디칼 소거활성 : 활성도라지의 ABTS 라디칼 소거활성 역시 DPPH 라디칼 소거활성과 경향이 일치하였다. 산청 원료 도라지는 60.32%, 산청 숙성 도라지는 88.77%로 가장 높았다. 한편, 의령 원료 도라지는 51.08%로 가장 낮았으며, 의령 숙성 도라지는 84.74% 있었다(Fig. 1-18B).

(다) •OH 라디칼 소거활성 : 활성도라지의 •OH 라디칼 소거활성 역시 DPPH와 ABTS 라디칼 소거활성과 동일하였다. 산청 원료 도라지는 72.38%, 산청 숙성 도라지는 81.35%로 가장 높았다. 한편, 의령 원료 도라지는 63.54%로 가장 낮았으며, 의령 숙성 도라지는 79.68% 있었다(Fig. 1-18C).

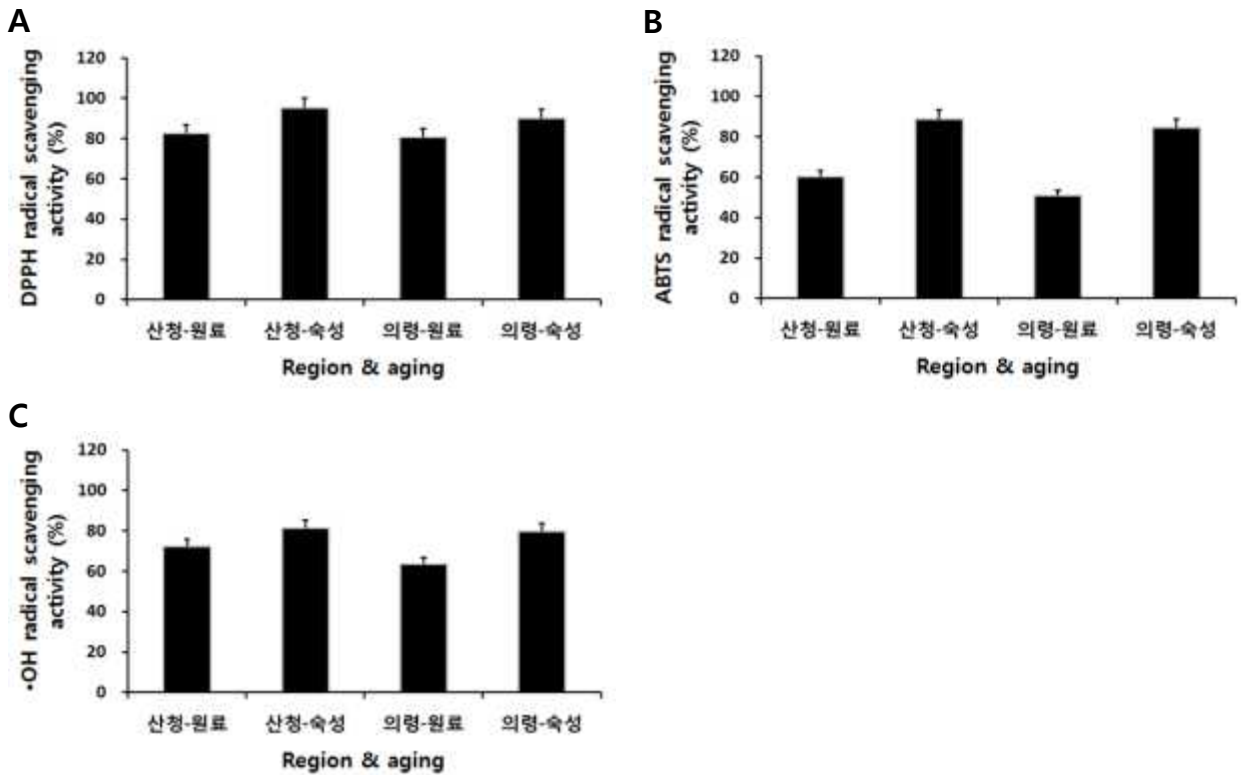


Fig. 1-18. 지역별 도라지로 제조한 활성도라지의 라디칼 소거활성. A, DPPH 라디칼 소거활성; B, ABTS 라디칼 소거활성; 및 C, Hydroxyl 라디칼 소거활성.

**(5) 활성도라지의 소화효소 저해활성 비교 :**

(가) α-Glucosidase 저해활성 : 지역별 원료를 이용하여 고운 숙성시켜 제조한 활성도라지의 α-glucosidase 저해활성은 Fig. 1-19A와 같았다. 산청 원료 도라지는 27.97%, 산청 숙성 도라지는 55.31%로 가장 높았다. 한편, 의령 원료 도라지는 21.66%로 가장 낮았으며, 의령 숙성 도라지는 50.84% 있었다.

(나)  $\alpha$ -Amylase 저해활성 : 활성도라지의  $\alpha$ -amylase 저해활성은  $\alpha$ -glucosidase 저해활성과 동일한 경향을 나타냈다. 산청 원료 도라지는 13.22%, 산청 숙성 도라지는 36.74%로 가장 높았다. 한편, 의령 원료 도라지는 11.24%로 가장 낮았으며, 의령 숙성 도라지는 34.99% 있었다(Fig. 1-19B).

(다) Pancreatic lipase 저해활성 : 활성도라지의 pancreatic lipase 저해활성은 Fig. 1-19C와 같았다. 산청 원료 도라지는 16.57%, 산청 숙성 도라지는 40.21%로 가장 높았다. 한편, 의령 원료 도라지는 13.22%로 가장 낮았으며, 의령 숙성 도라지는 39.88% 있었다.

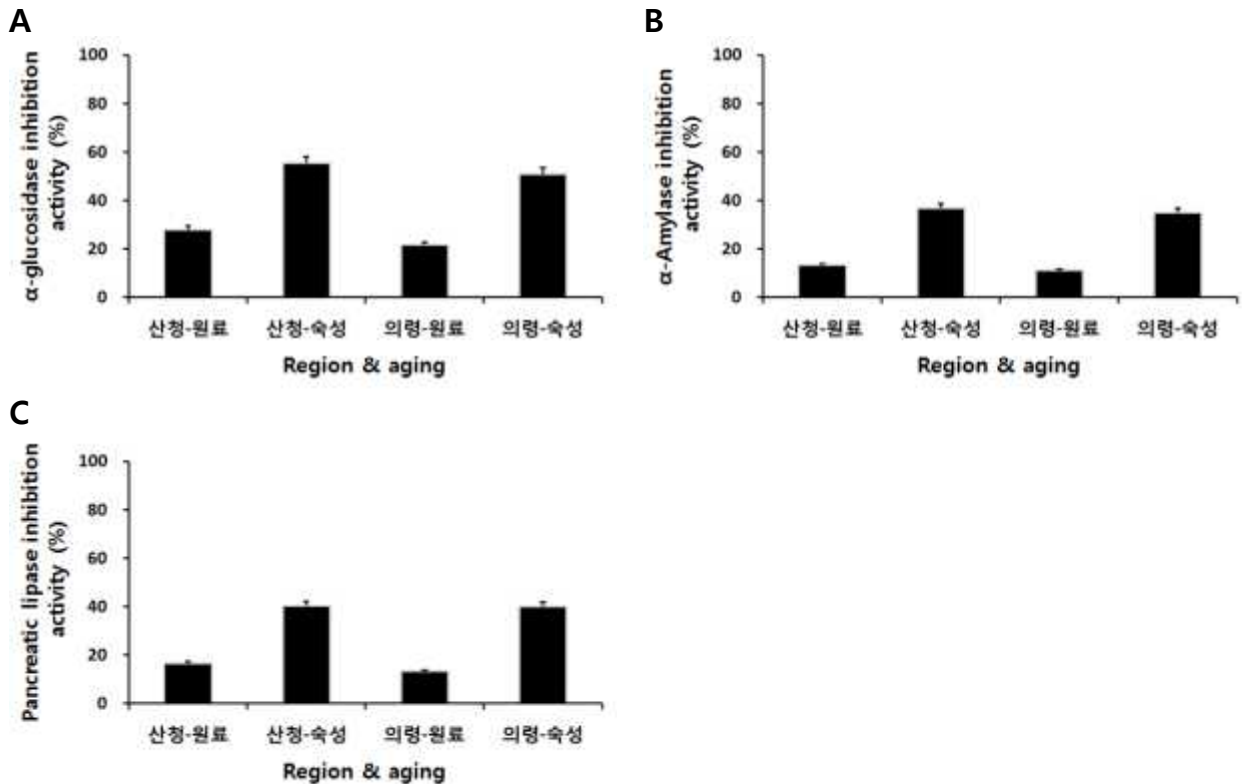


Fig. 1-19. 지역별 도라지로 제조한 활성도라지의 소화효소 소거활성. A,  $\alpha$ -glucosidase 저해활성; B,  $\alpha$ -amylase 저해활성; 및 C, 췌장-lipase 저해활성.

#### 마. 2차 활성도라지 제조 조건 확립 : 물리적·생물학적 처리 조건

##### (1) 활성도라지의 이화학적 특성 및 일반성분 비교 :

(가) pH : 도라지의 pH를 측정한 결과 Fig. 1-20A와 같았다. 원료 도라지의 pH는 6.07이었으며 증자 도라지는 이보다 좀 낮은 5.26으로 측정되어졌다. 발효 도라지는 4.02로 나타났으며 이는 젖산생성에 기인한 것으로 추정하였다. 젖산발효-숙성 도라지는 3.71로 가장 낮게 나타났고 숙성 도라지는 4.21이었다.

(나) 산도 : 산도는 0.14%(생도라지), 0.17%(증자도라지), 0.39%(유산발효도라지), 0.64%(유산발효-숙성도라지), 0.34%(숙성도라지)로 pH 수치에 비례하여 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 1-20B).

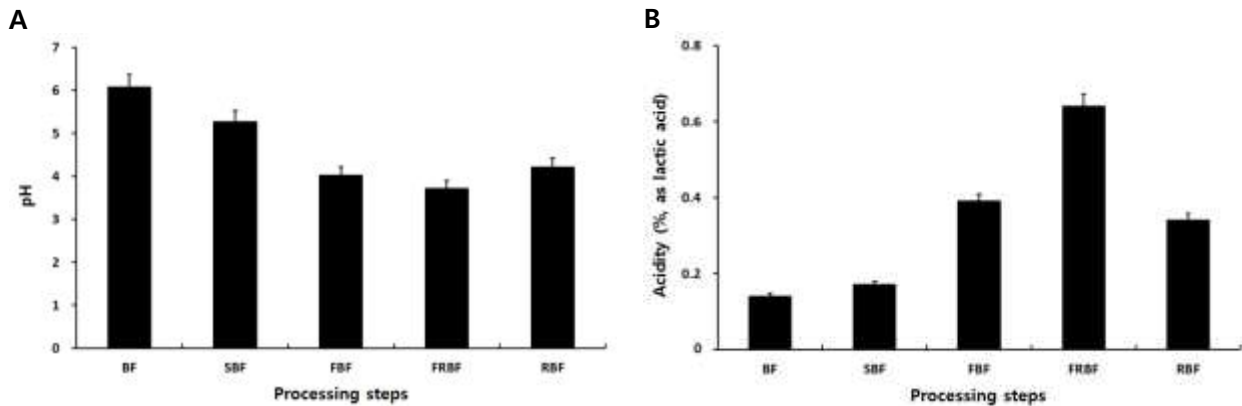


Fig. 1-20. 물리적 · 생물학적 처리에 따른 활성도라지의 pH와 산도.

A, pH and B, acidity.

(다) 5대 영양성분 : 물리적 · 생물학적 처리에 제조된 활성도라지의 5대 영양성분 분석 결과, 처리전 원료 도라지는 수분이 2.5 g/100 g, 조회분 4.5 g/100 g, 조지방 0.7 g/100 g, 조단백질 4.6 g/100 g 및 탄수화물 87.7 g/100 g 있었으며, 증자 도라지는 수분이 5.7 g/100 g, 조회분 3.7 g/100 g, 조지방 0.9 g/100 g, 조단백질 4.4 g/100 g 및 탄수화물 85.3 g/100 g 있었으며, 유산발효 도라지는 수분이 5.6 g/100 g, 조회분 4.4 g/100 g, 조지방 1.5 g/100 g, 조단백질 6.5 g/100 g 및 탄수화물 82 g/100 g 있었으며, 유산발효-숙성 도라지는 수분이 10.5 g/100 g, 조회분 4.8 g/100 g, 조지방 2.1 g/100 g, 조단백질 2.0 g/100 g 및 탄수화물 80.6 g/100 g 있었으며, 숙성 도라지는 수분이 10.0 g/100 g, 조회분 3.7 g/100 g, 조지방 1.9 g/100 g, 조단백질 4.4 g/100 g 및 탄수화물 80 g/100 g 있었다(Table 1-7).

Table 1-7. 물리적 · 생물학적 처리에 제조된 활성도라지의 5대 영양성분 비교

Contents <sup>1)</sup> (g/100 g)	물리적 · 생물학적 처리에 제조된 도라지				
	생(원료)	증자	유산발효	유산발효-숙성	숙성
Moisture	2.5	5.7	5.6	10.5	10.0
Crude ash	4.5	3.7	4.4	4.8	3.7
Crude fat	0.7	0.9	1.5	2.1	1.9
Crude protein	4.6	4.4	6.5	2.0	4.4
Carbohydrate	87.7	85.3	82	80.6	80

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

(라) 지방산 : 물리적 · 생물학적 처리에 제조된 활성도라지의 지방산 조성 분석 결과, 원료 도라지는 3종이 검출되었고, 처리된 도라지는 7종과 6종이 검출되었다. 즉, 처리전 원료 도라지는 palmitic acid 6.5 mg/100 g, oleic acid 19.3 g/100 g 및 linoleic acid 24.2 mg/100 g으로 검출되었으며, 증자 도라지는 palmitic acid 12 mg/100 g, stearic acid 2.1 mg/100 g, behenic acid 2.1 mg/100 g, oleic acid 6.0 g/100 g, linoleic acid 32.6 mg/100 g,  $\alpha$ -linolenic acid 3.1 mg/100 g 및 DHA 7.4 mg/100 g 있었고, 유산발효 도라지는 palmitic acid 38.5 mg/100 g, stearic acid

8.2 mg/100 g, behenic acid 5.4 mg/100 g, oleic acid 36.5 g/100 g, linoleic acid 132.3 mg/100 g,  $\alpha$ -linolenic acid 11.7 mg/100 g 및 DHA 27.3 mg/100 g 있었고, 유산발효-숙성 도라지는 palmitic acid 55.9 mg/100 g, stearic acid 9.2 mg/100 g, oleic acid 63.4 g/100 g, linoleic acid 136.8 mg/100 g,  $\alpha$ -linolenic acid 10.8 mg/100 g 및 DHA 11.8 mg/100 g 있었고, 숙성 도라지는 palmitic acid 32.2 mg/100 g, stearic acid 6.2 mg/100 g, behenic acid 5.5 mg/100 g, oleic acid 22.3 g/100 g, linoleic acid 100.83 mg/100 g,  $\alpha$ -linolenic acid 6.5 mg/100 g 및 DHA 21.8 mg/100 g 있었다(Table 1-8).

**Table 1-8.** 물리적·생물학적 처리에 제조된 도라지의 지방산 조성 비교

Contents <sup>1)</sup> (mg/100 g)	물리적·생물학적 처리에 제조된 도라지				
	생(원료)	증자	유산발효	유산발효-숙성	숙성
<b>Unsaturated fatty acids</b>					
C16:0 Palmitic acid	6.5	12.0	38.5	55.9	32.2
C18:0 Stearic acid	nd	2.1	8.2	9.2	6.2
C22:0 Behenic acid	nd	2.1	5.4	nd	5.5
<b>Saturated fatty acids</b>					
C18:1n9c Oleic acid	19.3	6.0	36.5	63.4	22.3
C18:2n6c Linoleic acid	24.4	32.6	132.3	136.8	100.8
C18:3n3 $\alpha$ -Linolenic acid	nd	3.1	11.7	10.8	6.5
C22:6n3 Docosaheptaenoic acid	nd	7.4	27.3	11.8	21.8
<b>Total fatty acids</b>	<b>50.2</b>	<b>65.3</b>	<b>259.9</b>	<b>287.9</b>	<b>195.3</b>

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

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

(마) 유리아미노산 : 물리적·생물학적 처리에 제조된 활성도라지 5종의 유리아미노산 함량 분석 결과는 Table 1-9에 나타낸 바와 같았다. 5종류의 활성도라지는 모두 공통적으로 phosphoserine, 1-Methylhistidine, 3-Methylhistidine, 그리고 carnosine이 불검출 되었다. Glutamic acid (GA) 함량은 원료 도라지가 238.05 mg/100 g으로 가장 많은 함유량을 나타내었고 증자처리를 한 도라지는 62.65 mg/100 g으로 크게 감소하였다. 유산발효 도라지는 56.61 mg/100 g으로 약간 더 감소하였으며 유산발효 후 숙성 과정을 거친 도라지는 30.16 mg/100 g으로 크게 감소하였다. 한편 숙성 도라지는 22.60 mg/100 g으로 이들 중 가장 낮은 함량을 나타내었다. 필수 아미노산 함량은 발효와 숙성 과정에 따른 차이는 보이지 않았고 대부분 유사한 함량을 나타내었으며 유리아미노산 총 함량은 원료 도라지가 965.45 mg/100 g으로 가장 많았고 이 결과 발효와 숙성 처리를 할수록 유리아미노산 총 함량은 조금씩 감소하는 경향을 나타내었다.



**Table 1-9. 물리적·생물학적 처리에 제조된 활성도라지의 유리아미노산 조성 비교**

Contents <sup>1)</sup> (mg/100 g)	물리적·생물학적 처리에 제조된 활성도라지				
	생(원료)	증자	유산발효	유산발효- 숙성	숙성
<b>Essential amino acids</b>					
Taurine	nd <sup>2)</sup>	4.16	2.31	26.56	14.51
Phosphoetanolamine	30.86	nd	6.15	nd	nd
Urea	nd	nd	59.21	nd	nd
Proline	nd	nd	nd	42.63	nd
Aspartic acid	51.83	30.68	9.41	12.45	18.25
Serine	29.60	18.49	3.22	5.01	7.38
Glutamic acid	238.05	62.65	56.61	30.16	22.60
Sarcosine	30.80	1.36	nd	nd	nd
Aminoadipic acid	5.33	nd	nd	nd	nd
Glycine	6.42	3.26	3.51	3.32	2.54
Alanine	52.30	18.52	6.12	7.96	15.76
Citrulline	nd	0.61	0.50	0.94	nd
$\alpha$ -aminobutyric acid	1.71	nd	0.23	nd	nd
Cystine	10.96	13.31	3.01	6.75	27.95
Cystathionine	1.99	nd	0.39	1.94	nd
Tyrosine	6.13	1.73	nd	0.88	1.39
$\beta$ -alanine	6.98	6.69	2.11	3.58	3.46
$\beta$ -aminoisobutyric acid	8.61	4.55	1.52	3.13	4.87
$\gamma$ -aminobutyric acid	22.02	33.08	8.87	24.08	34.87
Aminoethanol	8.25	0.47	nd	1.94	1.76
Hydroxyproline	0.27	0.50	nd	nd	0.13
Ornithine	0.69	0.80	0.38	0.62	0.10
Anserine	3.36	nd	nd	nd	nd
Arginine	347.72	230.08	52.33	26.13	51.87
Total	863.88	430.94	215.87	198.06	207.45
<b>Essential amino acids</b>					
Threonine	31.64	17.76	2.62	20.21	12.10
Valine	22.41	16.22	1.94	25.75	9.90
Methionine	3.90	2.61	0.35	nd	nd
Isoleucine	9.46	6.55	0.30	8.16	3.77
Leucine	7.78	4.15	0.30	1.45	5.97
Phenylalanine	7.63	3.03	0.87	0.89	1.58
Lysine	4.65	1.56	0.56	0.20	nd
Histidine	14.10	5.28	1.82	0.71	0.32
Total	101.57	57.16	8.76	57.37	33.65
<b>Total amino acids</b>	<b>965.45</b>	<b>488.10</b>	<b>224.63</b>	<b>255.43</b>	<b>241.10</b>

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

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

**(2) 활성도라지의 총 phenolics, 총 flavonoids 및 갈변물질 비교 :**

(가) 총 phenolics : 물리적·생물학적 처리에 제조된 활성도라지의 총 phenolics 함량은 원료 도라지가 0.53 mg/g으로 함량이 가장 적었으며 숙성 도라지가 0.62 mg/g으로 가장 높았으며, 가공 중 증가는 하였으나 이들 간의 큰 차이는 없는 것으로 나타났다(Fig. 1-20A).

(나) 총 flavonoids : 물리적·생물학적 처리에 제조된 활성도라지의 총 flavonoids 함량을 측정한 결과, 원료와 증자 도라지의 경우에는 각각 0.11 및 0.16 mg/g의 아주 적은 양이 측정

되어졌으나 발효와 숙성 처리를 함에 따라 조금씩 증가하여 젖산발효 도라지는 0.37 mg/g을 나타내었고 젖산발효-숙성 도라지는 0.59 mg/g을 나타내었다. 한편 숙성 도라지는 0.89 mg으로 가장 높은 것으로 나타났다(Fig. 1-20B).

(다) 갈변물질 : 물리적·생물학적 처리에 제조된 활성도라지의 갈변물질 함량을 측정한 결과, 원료 도라지는 0.178에서 물리적·생물학적 처리가 진행됨에 따라 갈변도는 증가하여 증자 도라지는 0.365, 유산발효 도라지는 0.812, 유산발효-숙성 도라지는 2.730 및 숙성 도라지는 3.049으로 가장 높은 것으로 나타났다(Fig. 1-20C).

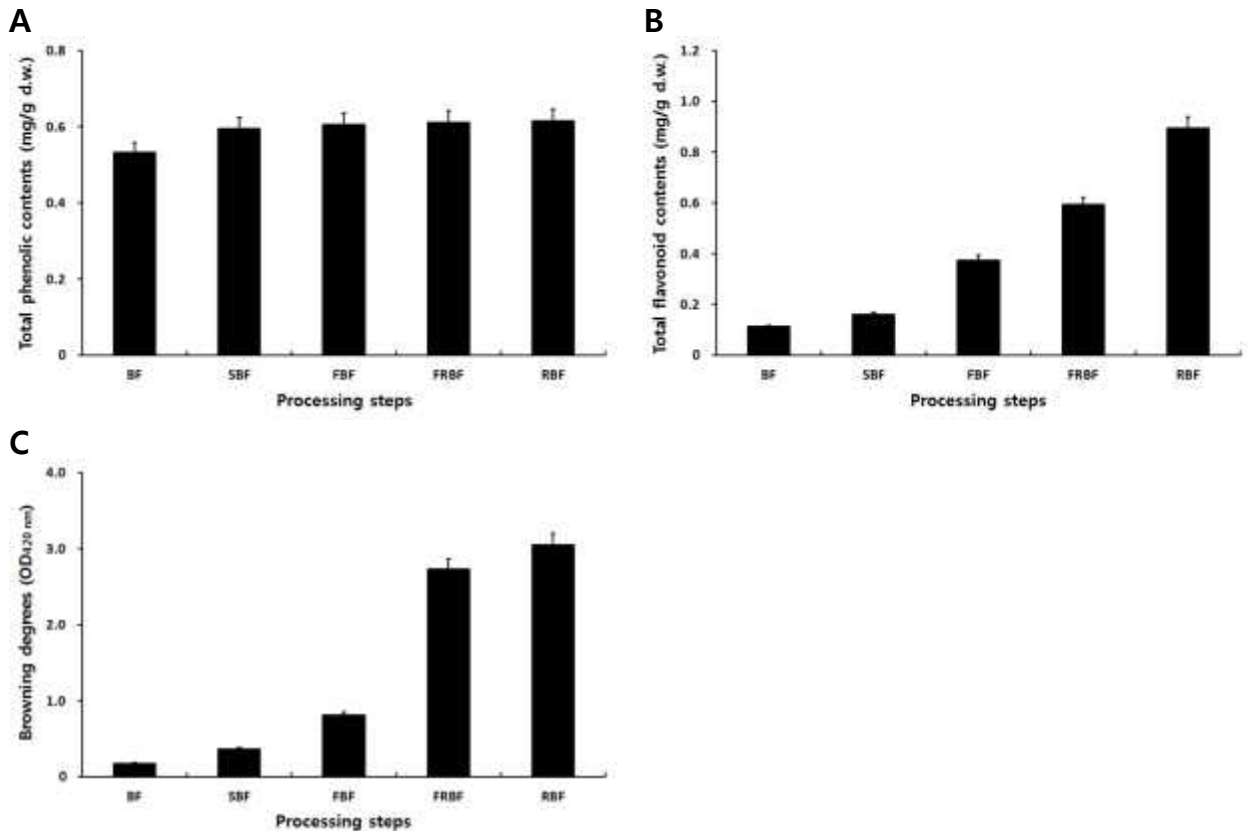


Fig. 1-21. 물리적·생물학적 처리에 따른 활성도라지의 총 phenolics, 총 flavonoids 및 갈변물질 함량 비교. A, 총 phenolics 함량; B, 총 flavonoids 함량 및 C, 갈변물질 함량.

### (3) 활성도라지의 phenolic acids 및 flavonols 화합물 함량 비교 :

(가) Phenolic acids : 물리적·생물학적 처리에 제조된 활성도라지의 phenolic acids 화합물 함량은 표 2-10과 같았고, 원료를 포함하여 모든 처리구에서 8종의 화합물이 검출되었다. 한편, 처리전 원료, 증자 및 유산발효 도라지의 주요 화합물은 chlorogenic acid *p*-Hydrobenzoic acid 및 ferulic acid로 각각 59.59  $\mu$ g/g, 67.05  $\mu$ g/g, 49.87  $\mu$ g/g (원료), 68.99  $\mu$ g/g, 75.77  $\mu$ g/g, 58.35  $\mu$ g/g (증자) 및 74.74  $\mu$ g/g, 68.71  $\mu$ g/g, 56.22  $\mu$ g/g (유산발효) 있었고, 유산발효-숙성 및 숙성 도라지의 주요 화합물은 gallic acid, chlorogenic acid, *p*-Hydrobenzoic acid로 각각 79.48  $\mu$ g/g, 87.95  $\mu$ g/g, 77.51  $\mu$ g/g (증자) 및 111.6  $\mu$ g/g, 103.6  $\mu$ g/g, 72.39  $\mu$ g/g (유산발효) 있었다. 특히, 유산발효-숙성과 숙성 도라지의 경우 gallic acid, protocatechuic acid, chlorogenic acid가 급격히 증가하였다(표 2-10). 물리적·생물학적 처리에 제조된 활성도라지의

HPLC 크로마토그램은 그림 2-17과 같았다.

(나) Flavonols : 물리적·생물학적 처리에 제조된 활성도라지의 flavonols 화합물 함량은 Table 1-10과 같았고, 원료를 포함하여 모든 처리구에서 10종의 화합물이 검출되었다. 한편, 처리전 원료를 포함하여 모든 시료에서 주요 화합물은 quercetin으로 각각 100.4  $\mu\text{g/g}$ , 101.07  $\mu\text{g/g}$ , 124.25  $\mu\text{g/g}$ , 136.56  $\mu\text{g/g}$ , 139.01  $\mu\text{g/g}$  있었다. 물리적·생물학적 처리가 됨에 따라 원료보다 epigallocatechin, catechin, epicatechin 및 naringenin 화합물이 증가하였다. 즉, 원료의 경우 epigallocatechin, catechin 및 naringenin 함량은 각각 33.06  $\mu\text{g/g}$ , 31.4  $\mu\text{g/g}$ , 51.48  $\mu\text{g/g}$  있었고, 증자 도라지는 각각 36.9  $\mu\text{g/g}$ , 34.19  $\mu\text{g/g}$ , 54.92  $\mu\text{g/g}$  있었고, 유산발효 도라지는 각각 57.46  $\mu\text{g/g}$ , 42.81  $\mu\text{g/g}$ , 58.55  $\mu\text{g/g}$  있었고, 유산발효-숙성도라지는 각각 60.41  $\mu\text{g/g}$ , 57.88  $\mu\text{g/g}$ , 66.53  $\mu\text{g/g}$  있었고, 숙성 도라지는 각각 66.34  $\mu\text{g/g}$ , 62.55  $\mu\text{g/g}$ , 69.23  $\mu\text{g/g}$  있었다. 물리적·생물학적 처리에 제조된 활성도라지의 HPLC 크로마토그램은 그림 2-17과 같았다.

Table 1-10. 물리적·생물학적 처리에 제조된 활성도라지의 phenolic acids와 flavonols 비교

Contents <sup>1)</sup> ( $\mu\text{g/g}$ )	물리적·생물학적 처리에 따른 도라지				
	생(원료)	증자	유산발효	유산발효-숙성	숙성
<b>Phenolic acids</b>					
Gallic acid	37.14	34.0	44.32	79.48	111.6
Protocatechuic acid	19.08	27.11	30.77	59.81	34.94
Chlorogenic acid	59.59	68.9	74.74	87.95	103.6
<i>p</i> -Hydrobenzoic acid	67.05	75.77	68.71	77.51	72.39
Vanilic acid	nd	nd	nd	nd	nd
<i>p</i> -Coumaric acid	13.48	18.02	21.38	18.43	28.25
Ferulic acid	49.87	58.35	56.22	50.23	49.88
Vertaric acid	14.27	12.07	18.98	11.04	9.24
<i>t</i> -Cinnamic acid	9.86	11.22	35.49	51.00	48.41
Total	270.34	305.44	350.61	435.45	458.31
<b>Flavonols</b>					
Epigallocatechin	33.06	36.9	57.46	60.41	66.34
Catechin	31.4	34.19	42.81	57.88	62.55
Epicatechin	59.53	59.47	60.43	67.59	65.22
Epigallocatechin gallate	12.57	17.62	15.24	14.27	12.65
Vanilin	nd	nd	nd	nd	nd
Rutin	14.38	15.3	10.24	8.61	5.77
Catechin gallate	23.41	25.87	19.25	15.02	16.13
Quercetin	100.4	101.07	124.25	136.56	139.01
Naringin	66.08	59.64	45.35	37.39	34.39
Naringenin	51.48	54.92	58.55	66.53	69.23
Formonoetin	41.46	36.15	18.98	24.50	35.57
Total	433.77	441.13	452.56	488.76	506.86

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

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

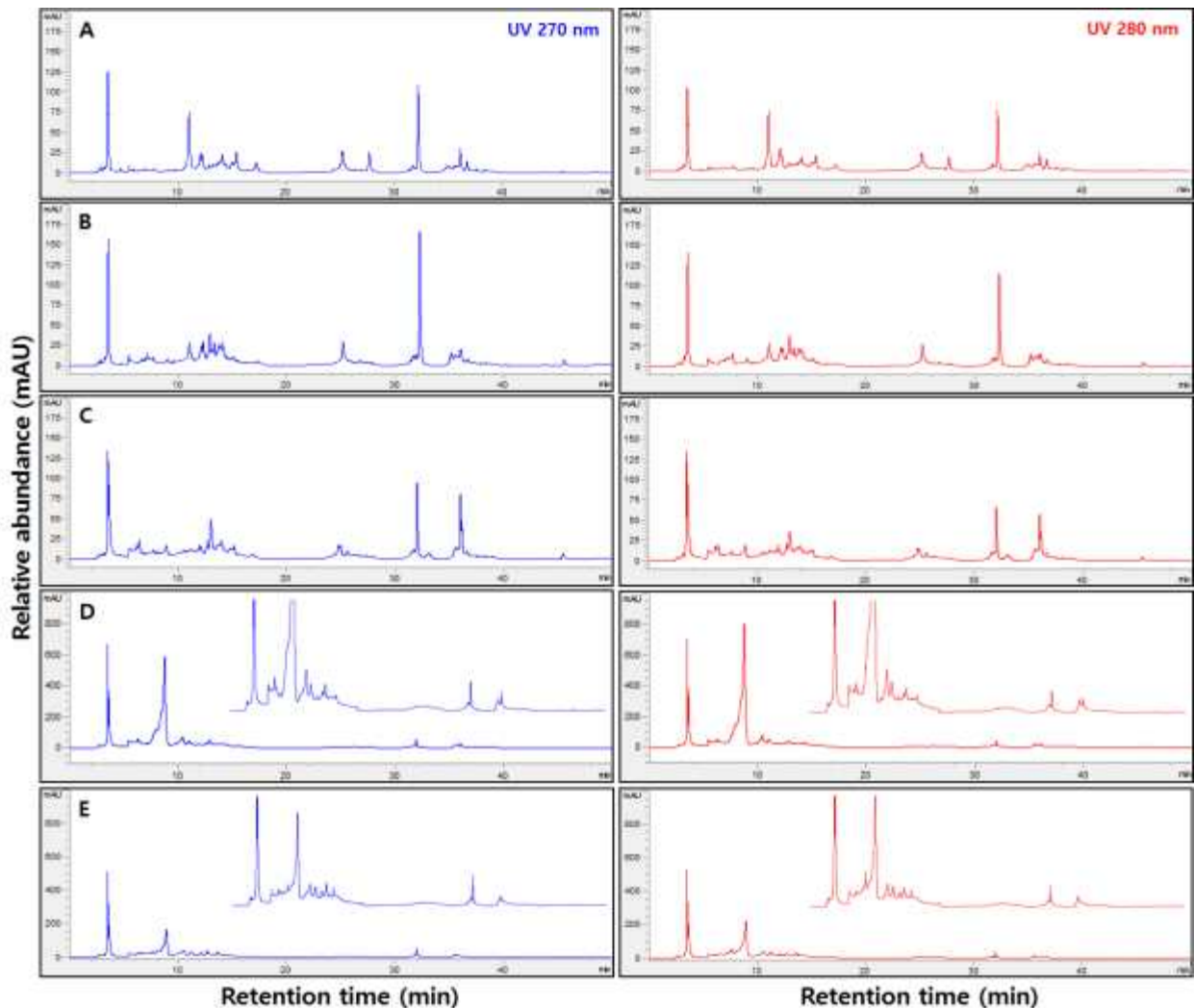


Fig. 1-22. Phenolic acids (280 nm) 및 flavonols (270 nm) 화합물의 HPLC 크로마토그램. A, 원료 도라지; B, 증자 도라지; C, 유산발효 도라지; D, 유산발효-숙성 도라지; 및 E, 숙성 도라지.

#### (4) 활성도라지의 라디칼 소거활성 비교 :

(가) DPPH 라디칼 소거활성 : 물리적·생물학적 처리에 제조된 활성도라지 추출물을 0.25, 0.5, 1.0 mg/ml 농도 처리하여 DPPH 라디칼 소거활성을 측정한 결과는 Fig. 1-23A와 같았다. 라디칼 소거활성은 총 flavonoids 함량과 결과가 일치하였다. 원료 도라지의 경우 1.0 mg/ml 농도 처리 시 21.94%를 나타내었고 증자 도라지는 35.91%를, 젓산발효 도라지는 73.97%, 젓산발효-숙성 도라지는 84.72%를 나타내었고 숙성 도라지는 86.51%로 가장 우수한 활성을 나타내었다.

(나) ABTS 라디칼 소거활성 : 물리적·생물학적 처리에 제조된 활성도라지의 ABTS 라디칼 소거활성 역시 DPPH 라디칼과 경향이 일치하였다. 0.25 mg/ml 농도 처리 시에는 3.22%(원료; BF), 6.58%(SBF; 증자 도라지), 12.98%(FBF; 젓산발효 도라지), 46.34%(FRBF; 젓산발효-숙성 도라지), 52.46%(RBF; 숙성 도라지)를 나타내었다. 한편 추출물의 농도가 높아짐에 따라 농도의 존적으로 라디칼 소거활성이 증가하였다(Fig. 1-23B).

(다)  $\bullet$ OH 라디칼 소거활성 : 물리적·생물학적 처리에 제조된 활성도라지의  $\bullet$ OH 라디칼

소거활성 또한 농도 의존형으로 증가하였고, 숙성 도라지가 1 mg/ml 처리 시에 47.59%로 가장 높았다(Fig. 1-23C).

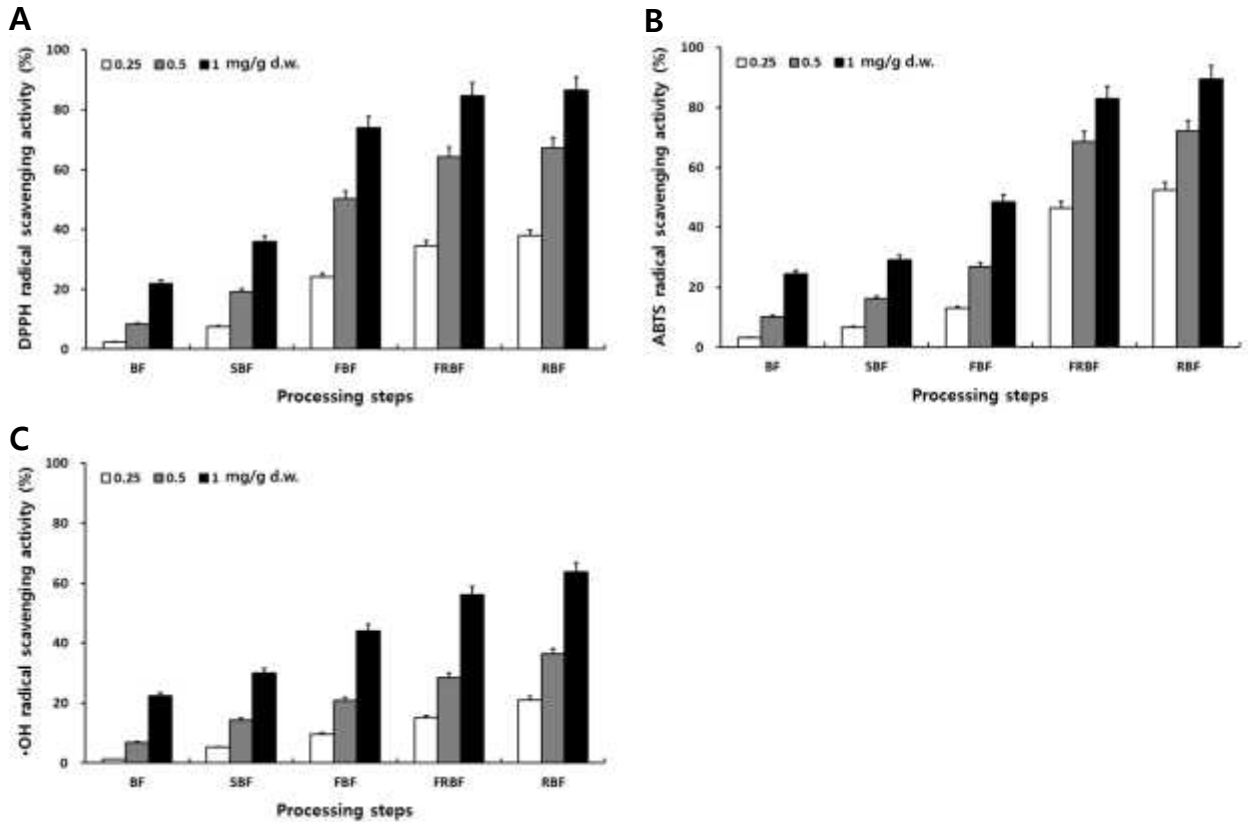


Fig. 1-23. 물리적 · 생물학적 처리에 따른 도라지의 라디칼 소거활성.

A, DPPH 라디칼 소거활성; B, ABTS 라디칼 소거활성; 및 C, Hydroxyl 라디칼 소거활성.

(5) 활성도라지의 소화효소 저해활성 비교 :

(가)  $\alpha$ -Glucosidase 저해활성 : 물리적 · 생물학적 처리에 제조된 활성도라지의  $\alpha$ -Glucosidase 저해활성은 0.25 mg/ml과 0.5 mg/ml 처리 시 원료 도라지에서는 저해활성이 나타나지 않았고, 증자 도라지는 0.5 mg/ml 농도에서 5.23%를 나타내었다. 한편 1.0 mg/ml 농도 처리 시에는 각각 5.04%(원료; BF), 16.01%(SBF; 증자 도라지), 33.75%(FBF; 젖산발효 도라지), 46.46%(FRBF; 젖산발효-숙성 도라지), 47.59%(RBF; 숙성 도라지)를 나타내었다(Fig. 1-24A).

(나)  $\alpha$ -Amylase 저해활성 : 물리적 · 생물학적 처리에 제조된 활성도라지의  $\alpha$ -Glucosidase 저해활성은 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml 및 1 mg/ml 처리 시 원료와 증자 도라지에서는 저해활성이 나타나지 않았다. 한편, 1.0 mg/g 농도 처리 시에는 각각 12.54%(FBF; 젖산발효 도라지), 31.22%(FRBF; 젖산발효-숙성 도라지), 35.98%(RBF; 숙성 도라지)를 나타내었다(Fig. 1-24B).

(라) Pancreatic lipase 저해활성 : 원료와 증자 도라지의 경우 모든 농도에서 저해활성이 없는 것으로 나타났다. 젖산발효 도라지는 0.25 mg/ml 농도 처리 시 1.22%의 아주 낮은 저해활성을 보였고 젖산발효-숙성 도라지는 7.84%, 숙성 도라지는 이보다 좀 더 높은 9.86%를 나타내었다. 한편 농도가 높아질수록 저해활성 역시 증가하였고 숙성 도라지 추출물이 1.0 mg/ml 처리 시 32.51%로 지방분해 효소 저해활성이 가장 우수하였다(Fig. 1-24C).

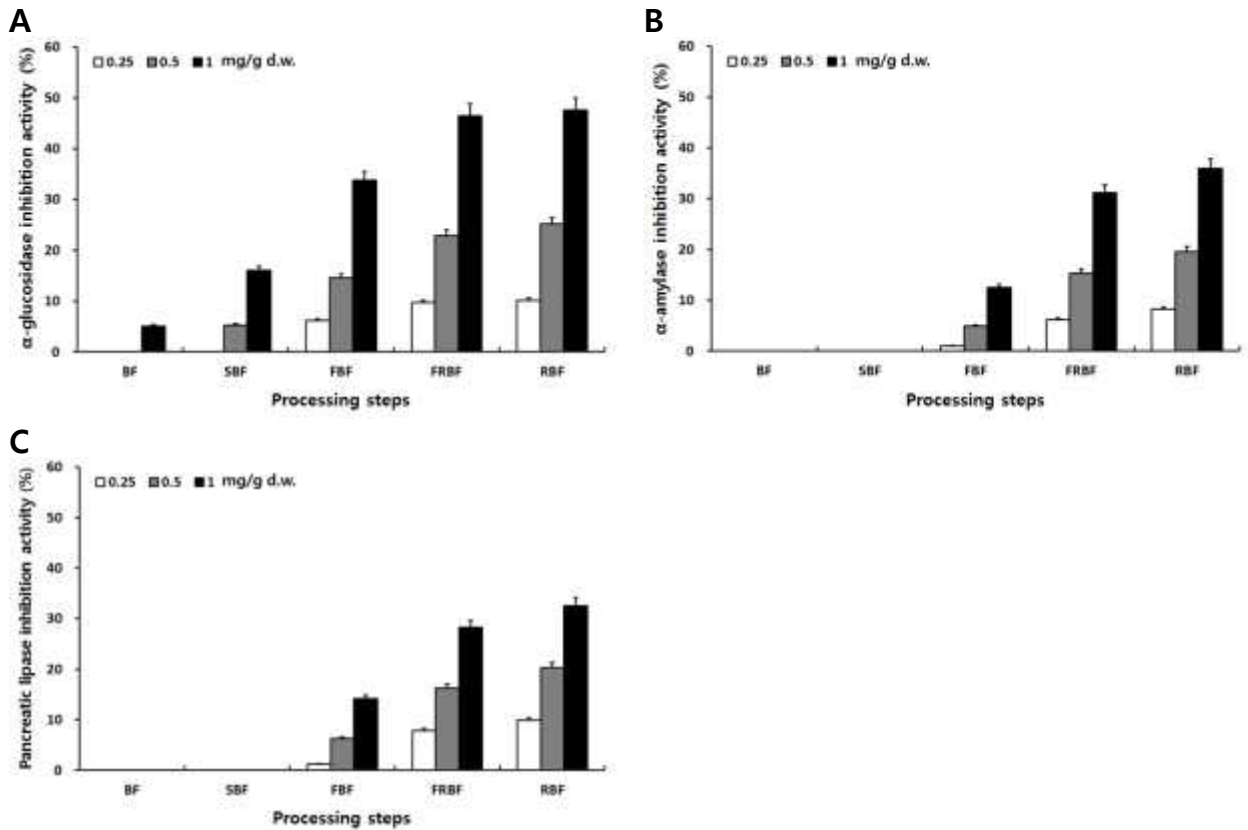


Fig. 1-24. 물리적 · 생물학적 처리에 따른 도라지의 소화효소 소거활성. A,  $\alpha$ -glucosidase 저해활성; B,  $\alpha$ -amylase 저해활성; 및 C, 췌장-lipase 저해활성.

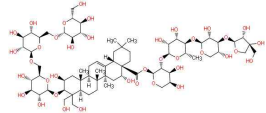
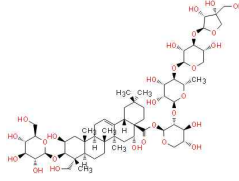
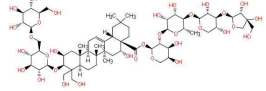
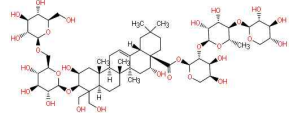
## 2-1. 2차년도 연구수행 방법

### 가. 도라지 triterpenoid 화합물의 표준화

(1) **표준물질** : 도라지 triterpenoid 4종의 표준물질은 천연물 물질은행으로부터 분양 받아 사용하였다. 4종의 도라지 triterpenoid 표준물질 정보는 아래와 같다(Table 2-1).

(2) **HPLC 분석 조건** : 도라지 triterpenoid 분석은 기능성식품분석법의 홍삼 사포닌 분석법에 기술된 방법을 약간 변형하여 고압액체크로마토그래피(HPLC, high press liquid chromatograph)로 분석하였다. 분석 컬럼은 TSKgel ODS-100Z을 사용하여 시료주입량  $10 \mu\text{L}$ , 온도는  $30^\circ\text{C}$  측정파장은  $203 \text{ nm}$ , 유속은  $1.0 \text{ mL/min}$ 으로 하였고 이동상으로는 A용액은 HPLC water, B용액은 아세토니트릴을 사용하였다. HPLC 분석 조건은 이동상 용액은 0분때 A용액 81%:B용액 19%로 흘려주고 15분때에는 A용액 80%:B용액 20%로 흘려주고 40분때 A용액 77%:B용액 23%, 42분때 A용액 70%:B용액 30%, 75분때에 A용액 65%:B용액 35%, 80분때에 A용액 30%:B용액 70%, 90분때에 A용액 10%:B용액 90%로 이동상을 흘려주었다(Table 2-2).

**Table 2-1.** 도라지 triterpenoid 4종 표준물질의 화합물 이름, 분자량, 화학식 및 구조

화합물 이름	약자	분자량 (M.W.)	화학식	화학구조	순도(%)
Platycoside E	Pcd-E	1549.62	C <sub>69</sub> H <sub>112</sub> O <sub>38</sub>		99
Polygalacin D	Pc-D	1209.4	C <sub>57</sub> H <sub>92</sub> O <sub>27</sub>		99
Platycodin D3	Pd-D3	1387.48	C <sub>63</sub> H <sub>102</sub> O <sub>33</sub>		98
Deapioplatycodin D	Dpd-D	1255.35	C <sub>58</sub> H <sub>94</sub> O <sub>29</sub>		99

**Table 2-2.** 도라지 triterpenoid 4종 표준물질의 분석을 위한 HPLC 이동상 용매 조건

시간 (min)	A 용액 (%)	B 용액 (%)
0	81	19
10	81	19
15	80	20
40	77	23
42	70	30
75	65	35
80	30	70
90	10	90
100	10	90
105	81	19

**(3) 1차년도 시료의 triterpenoid 분석**

(가) 1차년도 시료 : 도라지 볶음 조건별 시료(5 시료), 도라지 지역별 시료(4 시료) 및 도라지 가공 공정별 시료 (5 시료)를 100 메쉬 이하로 분쇄하여 분말로 제조하여 준비하였다.

(나) 전처리 : 도라지 triterpenoid 화합물 분석은 분말 1 g씩 250 ml 삼각플라스크에 정확히 취하고 70% 메탄올 20 ml를 가하여 80℃ 항온수조에서 1시간 정치한 후 냉각하였다. 이를 원심분리 하여 그 상등액만 취하고 이를 2회 반복하였다. 이 상등액을 60℃에서 감압 농축하여 그 잔유물을 3차 증류수 2 ml에 용해하여 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과한 후 사용하였다.

**나. 효모발효 도라지 차 제조 및 특성 확인**

(1) 발효도라지 제조 : 건조 도라지를 우선 세절기를 이용하여 적당한 크기와 모양으로 세

절하였다. 이 후 도라지 100 g씩 선별하여 물에 30분간 수침한 후 물기를 제거하고 10분간 증자한 후 발효용기에 담고 121℃에서 30분 살균하고 30℃ 전후로 냉각하고 미리 배양한 각 효모 균주를 5%(단독) 혹은 2.5%(혼합)를 접종하여 30℃에서 10일간 발효시킨 후 발효된 도라지를 건조하여 200℃에서 20분간 볶음처리 하였다(Fig. 2-1).



Fig. 2-1. 효모발효 도라지 차의 제조 과정.

(2) pH, 산도 및 생균수 :

(가) pH : pH는 pH meter (model 3510, Jenway, Essex, UK)를 사용하여 측정하였다.

(나) 산도 : 산도는 중화적정법으로 시료 1 mL를 pH 8.2±0.1까지 중화시키는데 소비된 0.1 N NaOH의 양을 구하고 젖산(lactic acid)양으로 환산하였다.

(다) 생균수 : 시료 10 g에 90 ml 멸균생리식염수 희석한 후 단계별로 희석하여 PD 평판배지에 도말한 후 30℃에서 48시간 배양 후 나타난 집락을 계수하였다.

(3) 유리아미노산 : 효모발효 도라지 차의 유리아미노산 분석은 식품공전법 기준으로 분석하였다.

(4) 추출물 제조 : 효모 균주별 발효도라지 차 분말 10 g에 50% 발효주정 100 ml을 첨가한 후 300 rpm에서 12시간 추출하였다. 추출액을 여과하여 여과액을 얻은 후 여과액 일부는 0.45 μm 필터로 여과하여 총 페놀릭스 함량 및 총 플라보노이드 분석을 위한 검정 시료에 사용하였다. 나머지 여과액 모두를 감압농축기를 이용하여 농축한 후 -70℃에서 하루 정도 동결한 후 동결건조기를 이용하여 건조분말을 얻고, 추출용매인 50% 발효주정을 녹여 0.5 및 1.0 mg/ml 농도로 제조하여 그 외 기능성의 분석 시료로 사용하였다.



### (5) 총 phenolics, 총 flavonoids 및 갈변물질 함량

(가) 총 phenolics : 총 phenolics 함량은 Folin-Denis법(16)을 약간 변형하여 측정하였다. 추출물 0.5 mL를 시험관에 분주하고 25% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 0.5 mL를 첨가하여 3분간 정치시켰다. 그 후 2 N Folin-Ciocalteu phenol 용액 0.25 mL 첨가 및 혼합한 다음 30°C에서 1시간 동안 발색시켰다. 발색된 시료는 750 nm에서 분광광도계(Spectronic 2D)를 사용하여 흡광도를 측정하였고, gallic acid를 이용하여 작성한 표준 검량곡선으로부터 값을 산출하였다.

(나) 총 flavonoids : 총 flavonoids 함량은 Davis변법(Davis, 1947)으로 측정하였다. 총 flavonoids 함량은 10배 희석한 추출물 0.5 mL를 시험관에 분주하고 diethylene glycol용액 1 mL, 1 N NaOH 0.01 mL를 첨가한 다음 37°C에서 1시간 동안 방치하여 발색시킨 후 분광광도계(Spectronic 2D)를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 flavonoid 함량은 rutin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구한다.

(다) 갈변물질 : 갈변물질의 함량은 비효소적 갈변도 측정 방법을 이용하였다. 그 여과액을 분광광도계(Spectronic 2D)를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 즉, 각 볶음처리 도라지 분말 1 g에 3차 증류수를 10 ml 가하여 300 rpm에서 1시간 추출하고 원심분리하여 상등액을 0.45 μm 여과 필터로 여과한 후 여과액 1 ml을 분광광도계를 이용하여 측정하였다.

### (6) Triterpenoides, Phenolic acids 및 flavonols 함량

(가) Triterpenoides 화합물 분석 : 상기 방법에서 확립 방법대로 분석을 진행하였다.

(나) Phenolic acids 및 flavonols 화합물 분석 : Phenolic acid와 flavonol 물질 분석은 Cho 등(2011)의 분석법을 변형하여 High Press Liquid Chromatogram(HPLC, Agilent 1200 series, Agilent Co., Forest Hill, Vic, Australia)로 분석하였다. 이동상 용매는 2.0% glacial acetic acid in water(solution A) 와 2.0% glacial acetic acid in acetonitrile(solution B)로 분석하였고, 이동상 조건은 solvent B 기준으로 각각 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 55 및 60 min 동안 15%, 5%, 15%, 5%, 10%, 50%, 50%, 60%, 80% 및 90%로 유지시켰다. 시료는 20 μL를 주입하였고 이동상의 속도는 30°C에서 1 mL/min로 유지하였고 phenolic acids 물질은 diode array UV detector(Agilent 1200 series, Agilent Co.)의 흡광도 280 nm에서 정량하였고, flavonols 물질은 흡광도 270nm에서 분석하였다.

### (7) 항산화 활성

(가) DPPH radical : DPPH 시약 0.8 ml와 각각의 도라지 추출물 0.2 ml를 가해 암실에서 30분간 방치 후 분광광도계를 사용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(나) ABTS radical : 2.45 mM K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 5 mL과 7 mM ABTS<sup>•+</sup> 5 mL를 혼합한 후 암실에서 16시간가량 방치시켜 ABTS<sup>•+</sup> 양이온 라디칼을 형성시킨 후 732 nm에서 대조구의 흡광도 값이 0.7±0.02가 되도록 조절한 ABTS<sup>•+</sup> 용액 0.9 ml와 추출물 0.1 ml를 첨가하여 3분간 정치 시켜 732 nm에서 분광광도계를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

(다) Ferruic Reducing/Antioxidant Power (FRAP) assay : FRAP 환원력 측정은 먼저 acetate buffer(30 mM, pH 3.6), TPTZ 시약(10 mM, in 40 mM HCl), 및 FeCl<sub>3</sub> 용액(20 mM in DW)을 일련의 방법에 따라 제조 후 10:1:1(v/v/v)의 비율로 혼합한 시약 0.95 ml에 시료 0.05 ml를 첨가하고 37°C의 수욕상에서 15분간 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도 값을 측정하여 나타내었다.

### (8) 소화효소 저해활성

(가)  $\alpha$ -Glucosidase : 각 농도별 추출물 50  $\mu$ l,  $\alpha$ -glucosidase(0.5 U/ml) 효소용액 50  $\mu$ l, 200 mM 인산나트륨 완충용액(pH 6.8) 50  $\mu$ l를 혼합하여 37°C에서 10분간 예비반응 시켰다. 이후 인산나트륨 완충용액(pH 6.8)에 녹인 *p*-NPG(5 mM) 100  $\mu$ l를 가하여 다시 37°C에서 10분 반응시켰다. 이 반응액에 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(100 mM) 0.75 ml를 가해 최종 반응을 정지시킨 후 420 nm에서 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

(나) Pancreatic lipase : Kwon 등(21)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 추출물 50  $\mu$ l, lipase(1.0 U/ml) 효소용액 50  $\mu$ l, 및 200 mM 인산나트륨 완충용액(pH 6.8) 50  $\mu$ l를 혼합하여 37°C에서 10분간 예비 반응시켰다. 반응 후 인산나트륨 완충용액에 녹인 *p*-NPB(5 mM) 100  $\mu$ l를 가하여 동일하게 10분간 반응시킨 후 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.75 ml를 가해 반응을 종결시켜 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 효소 저해능의 음성대조구는 시료 대신에 추출 용매를 취하였으며 시료용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

#### 다. 숙성·발효 도라지 제조 및 특성 확인

(1) **활성도라지 제조 (홍도라지, 흑도라지, 발효홍도라지 및 발효흑도라지)** : 도라지는 산청군에서 생산된 2년 이상의 생도라지를 구입하여 사용하였다. 도라지를 흐르는 물에 3회 세척한 후 물기를 제거하고 100°C에서 30~60분에 증자하였다. 홍도라지는 개방형 고온숙성방식으로 70~80°C에서 3일간 숙성하고 다시 증자한 후 숙성 과정을 3회 진행하여 제조하였고, 흑도라지는 밀폐형 고온숙성방식으로 70~80°C에서 9일간 숙성하여 제조하였다. 한편 발효홍도라지와 발효흑도라지 제조는 발효홍도라지와 발효흑도라지를 발효용기에 넣고 정제수로 수분이 40~50% 되게 조정된 후 설탕 2%를 첨가한 후 121°C에서 30분간 살균처리하고 미리 배양한 젖산균배양액(*Lac. platarum* P1201과 *Lac. brevis* BMK184) 5% 접종한 후 30°C에서 5일간 발효시켰다. 모든 시료는 55°C에서 3일간 건조하여 분쇄시켜 분말을 제조한 후 냉동실에 보관하면서 실험에 사용하였다(Fig. 2-2).

(2) **pH, 산도 및 생균수** : 상기 방법 2-2에 기술된 대로 수행하였다.

(3) **추출물 제조** : 각 시료 분말 10 g에 50% 발효주정 100 ml를 첨가한 후 300 rpm에서 12시간 추출하였다. 추출액을 여과하여 여과액을 얻은 후 여과액 일부는 0.45  $\mu$ m 필터로 여과하여 총 페놀릭스 함량 및 총 플라보노이드 분석을 위한 검정 시료에 사용하였다. 나머지 여과액 모두를 감압농축기를 이용하여 농축한 후 -70°C에서 하루 정도 동결한 후 동결건조기를 이용하여 건조분말을 얻고, 추출용매인 50% 발효주정을 녹여 0.5 및 1.0 mg/ml 농도로 제조하여 그 외 기능성의 분석 시료로 사용하였다.

(4) **총 phenolics, 총 flavonoids 및 갈변물질 함량** : 상기 방법에 기술된 대로 수행하였다.

(5) **Triterpenoides, Phenolic acids 및 flavonols 함량** : 상기 방법에 기술된 대로 수행하였다.

(6) **항산화 활성** : DPPH와 ABTS 라디칼 소거활성 및 FRAP 환원력은 상기 방법 2-2에 기술된 대로 수행하였고, Hydroxyl ( $\bullet$ OH) 라디칼 소거활성은 10 mM FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O-EDTA 0.2 mL, 10 mM 2-deoxyribose 0.2 mL, 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.2 mL 및 농도별 추출물 1.4 mL를 혼합하고 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 이 반응액에 1% thiobarbituric acid와 2.8% trichloroacetic acid를 각각 1 ml를 가하여 100°C에서 20분간 가열하고 발색 및 냉각시켜 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조구 실험은 시료 대신에 PBS 완충액(NaCl 8.76 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.11 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.596 g)을 사용하였고 전자공여능은 시료용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도의 차이를

백분율(%)로 나타내었다.

(7) 소화효소 저해활성 : 상기 방법에 기술된 대로 수행하였다.



Fig. 2-2. 고온숙성법 이용 활성도라지 (홍도라지, 흑도라지, 발효홍도라지 및 발효흑도라지)의 제조 과정.

라. 지역별 도라지와 숙성도라지의 영양성분

(1) 숙성(활성)도라지 제조 : 도라지는 산청군과 의령군에서 생산된 3년 생도라지를 주관기관으로부터 공급받아 사용하였다. 도라지를 흐르는 물에 3회 세척한 후 물기를 제거하고 100°C에서 30~60분에 증자한 후 70~80°C에서 10일간 숙성하여 건조하여 활성도라지를 제조하였고, 이를 분쇄기로 분쇄하여 분말로 준비하여 실험을 진행하였다(Fig. 2-3).

(2) 5대 영양성분 : 5대 영양성분 분석은 식품공전법(KFDA, 2010)에 따라 시행하였다. 수분과 회분 함량은 각각 상압가열건조법과 건열회화법으로 측정하였고 조지방과 조단백 함량은 속실탕과 마이크로켈달법으로 측정하였다. 탄수화물 함량은 100에서 상기 각 성분 함의 뺀 값을 %로 표시하였다.



Fig. 2-3. 고온숙성법 이용 숙성(활성)도라지의 제조 사진. - 1차년도 제조 완료

(3) 지방산 : 지방산 전처리는 각각의 시료 1 g에 0.5 N 메탄올성 NaOH 3 ml를 가하고 100°C에서 10분간 가열하였다. 가열 후 삼불화붕소(BF<sub>3</sub>) 2 ml를 첨가 및 혼합하고 30분간 다시 100°C에서 가열시켜 지방산 메틸레이션 과정을 수행하였다. 반응이 끝난 후에는 이소옥탄 1 ml를 첨가하고 격렬히 흔든 후 방치시켜 분리된 상등액을 무수아황산과 함께 탈수시키고 0.45 μm 필터로 여과한 여액을 gaschromatography(GC, Agilent 5890 series, Agilent Co., Forest Hill, Vic, Australia)로 분석하였다.

(4) 유리아미노산 : 숙성(혹)도라지 건조 분말 100 mg에 HPLC water 5 ml를 가하여 60°C에서 1시간 가수분해 과정을 실시하였다. 이 후 10% 5-sulfosalicylic acid 1 ml를 첨가하고 4°C에서 2시간 방치시켜 단백질을 침전시켰다. 이 후 3,000 rpm 속도에서 5분간 원심분리 하여 얻은 상등액을 0.45 μm 필터로 여과하고 이 여과액을 60°C에서 감압 농축을 실시하였다. 감압 농축 후 lithium buffer(pH 2.2) 2 ml를 첨가 및 용해하고 다시 한번 0.45 μm 필터로 여과시킨 것을 자동아미노산 분석기(L-8900, Hitachi, Japan)로 정량 분석하였다.

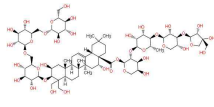
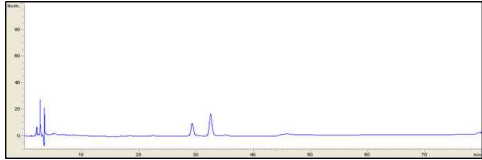
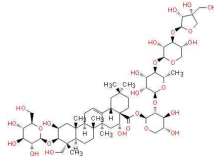
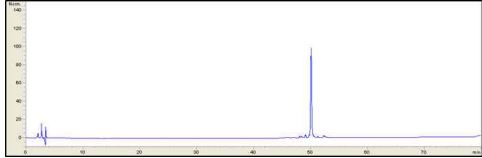
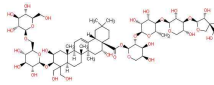
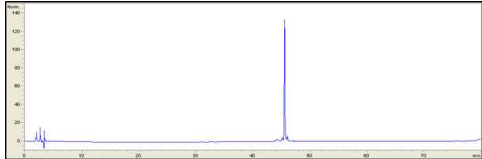
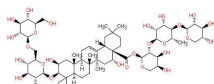
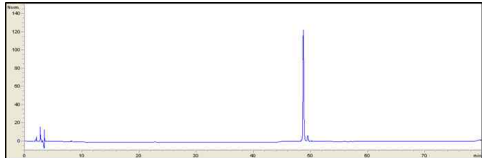
## 2-2. 2차년도 연구결과

### 가. 도라지 triterpenoid 계열 화합물 표준화

#### (1) 표준물질의 검량곡선 작성

(가) HPLC 크로마토그램 패턴 : 도라지 triterpenoid 4종의 표준물질에 대해서 HPLC를 분석한 결과 Table 2-3 및 Fig. 2-4와 같았다. Platycoside E의 경우 HPLC 크로마토그램 상 2 종류의 pick(retention time : 29.34와 32.53)가 확인되어 지표물질로 사용을 제외하여 나머지 polygalacin D(retention time : 50.37), platycodin D3(retention time : 45.68) 및 deapioplatycodin D(retention time : 48.75)로 확인되었으며, 추가적으로 현재 platycodin D에 대해서 분석을 진행 중에 있다.

Table 2-4. 도라지 triterpenoid 4종의 표준물질 HPLC 분석 결과

화합물 이름	약자	R.T. (min)	화학구조	HPLC 크로마토그램
Platycoside E	Pcd-E	29.34 / 32.53		
Polygalacin D	Pc-D	50.37		
Platycodin D3	Pd-D3	45.68		
Deapioplatycodin D	Dpd-D	48.75		

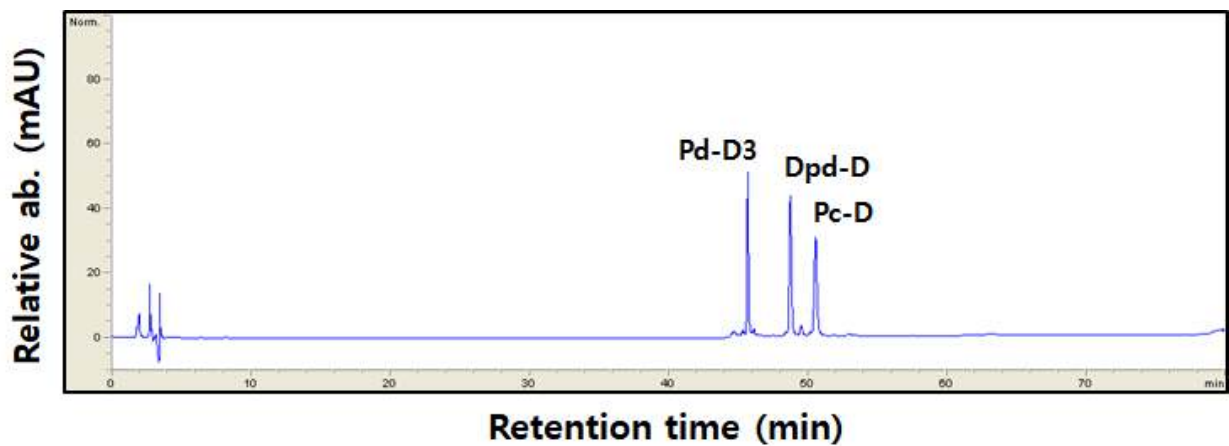


Fig. 2-4. 3종의 도라지 triterpenoid 화합물의 HPLC 크로마토그램.

(나) 검량곡선 작성 : 도라지 triterpenoid 3종의 표준물질에서 대해서 검량곡선을 작성하였다. Polygalacin D는  $y = 1291.5x + 45.609$ ,  $R^2 = 0.99$ , platycodin D3는  $y = 1104x - 7.6583$ ,  $R^2 = 0.99$  및 Deapioplatycodin D는  $y = 1415.7x - 15.185$ ,  $R^2 = 0.99$  있었다(Fig. 2-5).

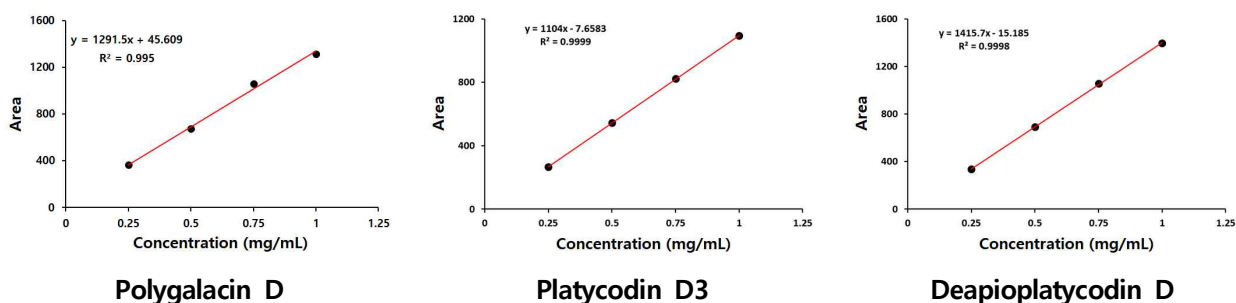


Fig. 2-5. 3종의 도라지 triterpenoid 화합물의 검량곡선.

## (2) 1차년도 시료의 triterpenoid 함량

(가) 도라지 볶음처리 조건별 : 여러 볶음처리 조건에 따라 제조된 도라지의 triterpenoid 함량 분석 결과 Table 2-5 & Fig. 2-6과 같았다. Triterpenoid 유도체 중 platycodin D3, deapioplatycodin D, polygalcin D 화합물들은 볶음처리를 하지 않은 도라지와 150℃에서 10분간 볶음처리를 한 경우에는 함량의 변화가 크게 뚜렷하지는 않았다. 그러나 150℃에서 20분간 볶음처리를 한 결과 platycodin D3(1.25 mg/g), deapioplatycodin D(0.49 mg/g), polygalcin D(0.18 mg/g) 함량은 조금 증가하였다. 200℃에서 10분간 볶음처리 한 경우 역시 platycodin D3 화합물이 1.32 mg/g으로 증가하였으나 deapioplatycodin D와 polygalcin D 화합물의 함량 변화는 없는 것으로 나타났다. 그러나 200℃에서 20분간 볶음 처리를 한 경우에는 platycodin D3와 deapioplatycodin D 함량이 각각 1.81 및 0.61 mg/g으로 볶음 온도와 처리시간이 증가할수록 함량 역시 증가하는 것으로 나타났다.

(나) 도라지 지역별 : 재배 지역별 도라지의 triterpenoid 함량 분석 결과 platycodin D3 화합물 함량은 산청군에서 재배된 원료 도라지가 2.08 mg/g으로 가장 높았고 이를 숙성 한 경우 platycodin D3 및 polygalcin D 화합물은 각각 1.56 및 0.22 mg/g으로 감소하였으나 deapioplatycodin D 화합물은 1.61 mg/g으로 증가하는 것으로 나타났다. 의령군에서 재배된 도라지 역시 platycodin D3 화합물은 원료에서 1.70 mg/g의 함량을 나타내었으나 숙성 후 1.22 mg/g으로 약간 감소하였고 deapioplatycodin D(1.06 → 0.39 mg/g) 및 polygalcin D(3.04 → 1.72 mg/g) 함량 역시 숙성 후에 감소하는 결과를 나타내었다. Triterpenoid 총 함량은 산청군 도라지가 숙성 후 7.39 mg/g으로 가장 크게 증가하였다(Table 2-6 & Fig. 2-7).

(다) 도라지 가공 공정별 : 도라지 가공 공정별 triterpenoid 함량 분석 결과는 Table 2-7 & Fig 2-8과 같았다. 총 triterpenoid 함량은 유산발효가 가장 높았으며, 그 다음으로 원료 > 발효-숙성 > 증자 > 숙성 있었다. 원료의 platycodin D3 함량은 0.89 mg/g 이었으나 증자, 유산발효, 발효-숙성 및 숙성의 가공 공정별 platycodin D3 함량은 각각 0.61, 12.5, 1.31, 0.72 mg/g 있었고, 원료의 deapioplatycodin D는 0.62 mg/g 이었으나, 증자, 유산발효, 발효-숙성 및 숙성의 가공 공정별 platycodin D3 함량은 각각 0.2, 0.44, 0.45, 0.08 mg/g로 원료보다는 함량이 낮았다. 마지막으로 polygalcin D는 원료, 증자, 유산발효, 발효-숙성 및 숙성의 가공 공정별 함량은 0.51, 0.71, 0.96, 0.15, 0.1 mg/g 이었다.

Table 2-5. 도라지 볶음처리 조건별 triterpenoid 함량

Contents <sup>d)</sup> (mg/g d.w.)	Un-roasted	Roasted			
		150°C -10min	150°C -20min	200°C -10min	200°C -20min
Platycodin D3	1.01	1.01	1.25	1.32	1.81
Deapioplatycodin D	0.45	0.44	0.49	0.48	0.61
Polygalcin D	0.12	0.14	0.18	0.19	0.20
Total	1.58	1.59	1.92	1.99	2.62

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

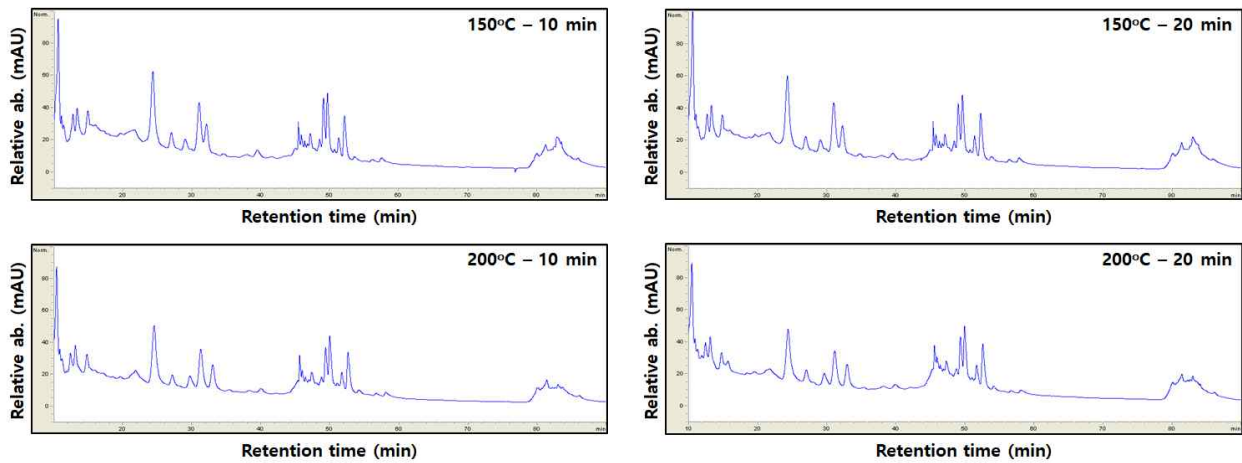


Fig. 2-6. 도라지 볶음처리 조건별 화합물의 HPLC 크로마토그램.

Table 2-6. 원료와 숙성(후)도라지 지역별 triterpenoid 함량

Contents <sup>d)</sup> (mg/g d.w.)	산청군		의령군	
	원료	숙성	원료	숙성
Platycodin D3	2.08	1.56	1.70	1.22
Deapioplatycodin D	0.47	1.61	1.06	0.39
Polygalcin D	2.70	0.22	0.28	0.11
Total	5.25	7.39	3.04	1.72

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

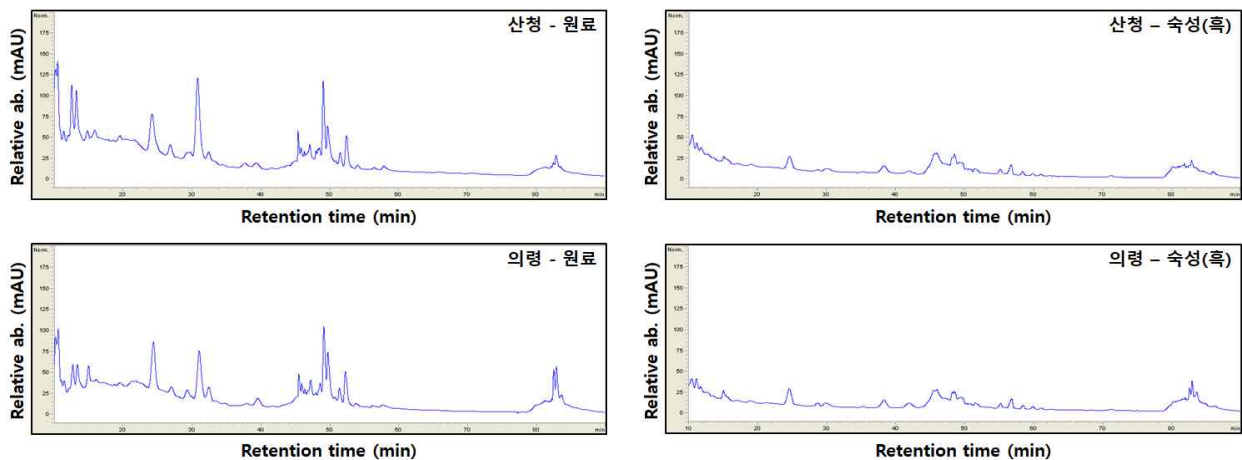


Fig. 2-7. 원료와 숙성(후)도라지 지역별 triterpenoid 화합물의 HPLC 크로마토그램.

Table 2-7. 도라지 가공 공정별 triterpenoid 함량

Contents <sup>1)</sup> d.w.)	(mg/g 물리적·생물학적 처리에 제조된 도라지				
	원료	증자	유산발효	발효-숙성	숙성
Platycodin D3	0.89	0.61	1.25	1.31	0.72
Deapioplatycodin D	0.62	0.20	0.44	0.45	0.08
Polygalcin D	0.51	0.71	0.96	0.15	0.10
Total	2.02	1.52	2.65	1.91	0.9

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

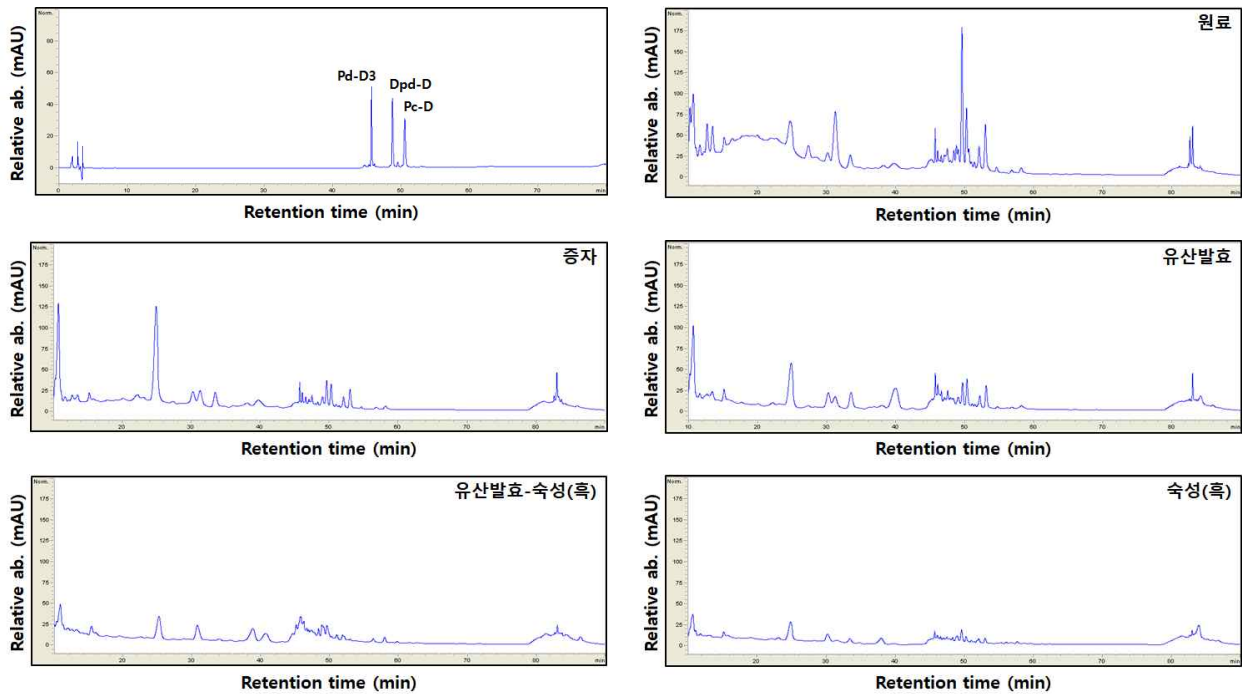


Fig. 2-8. 도라지 가공 공정별 triterpenoid 화합물의 HPLC 크로마토그램.

## 나. 효모발효 도라지차 제조 및 특성 확인

### (1) 이화학적 특성

(가) pH : SCY78(6.12), SCY81(6.45), SCY81+KEY27(5.84) 효모균들의 단독 혹은 혼합 발효되어진 도라지 차를 제외 하고는 모든 발효 도라지 차의 pH는 4.49 ~ 4.92 수준으로 나타났다. 한편 효모를 접종 및 발효하지 않은 도라지 차의 경우 pH는 5.89 수준으로 측정되어졌다(Table 2-8).

(나) 산도 : 산도는 pH 수치에 비례하게 증가하였고 SCY4 효모균으로 발효시킨 도라지 차가 2.08%로 가장 높았고 SCY4+KEY27 효모균으로 발효 시킨 도라지 차 역시 2.05%로 높았다(Table 2-8).

(다) 생균수 : 생균수는 특별히 큰 차이를 보이지 않았고 6.56(SCY78+KEY27) ~ 7.99(SCY10) log cfu/g 수준으로 검출되었다(Table 2-8).



**Table 2-8. 효모발효 도라지 차의 이화학적 특성**

Strains	Contents <sup>1)</sup>		
	pH	Acidity (%, as lactic acid)	Viable cell numbers (log cfu/g)
NIM	5.89	1.21	0
SCY4	4.58	2.08	7.72
SCY10	4.65	1.92	7.99
SCY28	4.92	1.70	7.57
SCY78	6.12	0.72	7.60
SCY81	6.45	0.68	7.00
KEY27	4.85	1.74	7.01
SCY4+KEY27	4.49	2.05	7.51
SCY10+KEY27	4.60	1.98	7.29
SCY28+KEY27	4.85	1.74	7.12
SCY78+KEY27	4.90	1.73	6.56
SCY81+KEY27	5.84	1.34	7.82

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

(라) 유리아미노산 : 효모 발효 도라지 차의 유리아미노산 분석 결과는 **Table 2-9**와 같았다. 효모 발효를 하지 않은 경우 일반 아미노산 총 함량은 1,764.31 mg/100 g이었고 필수 아미노산 총 함량은 198.47 mg/100 g이었으며 유리아미노산 총 함량은 1,960.78 mg/100 g으로 가장 많은 수치를 나타내었다. Glutamic acid 함량은 Y4+Y27 혼합 발효 도라지 차에서 112.15 mg/100 g으로 가장 많이 함유하고 있었고 GABA는 Y81+Y27 혼합 발효 도라지 차에서 67.26 mg/100 g으로 가장 많은 양이 검출되었다. 또한 Y81+Y27 혼합 발효 도라지 차는 agrinine이 476.35 mg/100 g으로 가장 많았다. 한편 Y28로 발효시킨 도라지 차의 경우에는 다른 발효 도라지 차에 비해 필수 아미노산 함량이 월등히 높은 것으로 나타났다. 특히 leucine은 211.80 mg/100 g으로 이는 Y81 효모군으로 발효시킨 도라지 차와 비교하였을 시 59배나 많은 양을 나타내었다. Y28 효모군으로 발효시킨 도라지 차는 이외에도 valine(104.01 mg/100 g), isoleucine(32.36 mg/100 g), phenylalanine(158.74 mg/100 g), lysine(143.52 mg/100 g), histidine(56.32 mg/100 g)이 다른 발효 도라지 차에 비해 많은 양을 함유하고 있었다(**Table 2-9**).

**Table 2-9. 효모발효 도라지 차의 유리아미노산 함량**

Contents <sup>1)</sup> (mg/100 g d.w.)	Strains					
	NIM	Y4	Y10	Y28	Y78	Y81
Non-essential amino acids						
Phosphoserine	nd <sup>2)</sup>	nd	nd	nd	nd	nd
Taurine	nd	11.16	8.56	9.03	nd	nd
Phosphoethanolamine	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Urea	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Proline	16.60	5.73	0.06	2.68	5.07	2.35
Aspartic acid	73.98	44.77	12.45	20.11	25.38	12.56
Serine	68.74	18.67	6.75	14.41	22.75	11.34
Glutamic acid	184.96	77.93	91.94	81.11	82.13	56.67
Sarcosine	14.08	nd	2.27	nd	7.02	nd
Aminoadipic acid	3.05	1.12	1.39	0.97	1.84	1.22
Glycine	6.50	5.04	3.07	3.36	6.39	4.49
Alanine	108.88	41.66	15.17	25.81	39.55	20.97
Citrulline	10.30	2.27	0.67	nd	3.20	1.75
$\alpha$ -aminobutyric acid	0.55	0.18	nd	nd	0.66	0.10
Cystine	15.60	20.77	10.54	18.88	20.73	17.11
Cystathionine	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Tyrosine	8.61	2.52	1.88	6.52	6.61	2.22
$\beta$ -alanine	7.80	8.29	6.98	9.08	11.37	4.93
$\beta$ -aminoisobutyric acid	6.81	6.43	12.17	14.73	13.08	6.56
$\gamma$ -aminobutyric acid	16.77	40.22	31.07	49.33	12.81	4.34
Aminoethanol	6.94	2.68	nd	1.01	2.92	1.77
Hydroxyproline	0.34	2.29	0.51	1.47	2.81	1.77
Ornithine	1.98	1.64	0.34	0.64	6.65	3.51
1-Methylhistidine	nd	1.24	0.49	0.74	2.12	1.17
3-Methylhistidine	nd	1.71	0.74	1.03	3.38	0.96
Anserine	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Carnosine	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Arginine	1209.82	328.81	109.45	176.36	383.88	202.73
Totals	1,764.31	625.13	316.5	437.27	662.35	358.52
Essential amino acids						
Threonine	61.97	17.08	9.31	9.28	23.00	11.45
Valine	47.83	20.88	10.51	104.01	22.74	14.48
Methionine	8.44	nd	nd	32.36	nd	nd
Isoleucine	18.06	12.13	12.30	55.42	12.64	9.49
Leucine	13.18	5.47	nd	211.80	7.73	3.56
Phenylalanine	10.63	3.99	11.03	158.74	9.54	4.04
Lysine	11.18	1.97	nd	143.52	4.54	2.26
Histidine	27.18	5.05	1.56	56.32	6.73	2.68
Total	198.47	66.57	44.71	771.45	86.92	47.96
Total amino acids	1960.78	691.7	361.21	1208.72	747.27	406.48
Ammonia	34.82	11.81	6.63	9.28	17.23	9.26

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

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

Contents <sup>1)</sup> (mg/100 g d.w.)	Strains					
	Y27	Y4+Y27	Y10+Y27	Y28+Y27	Y78+Y27	Y81+Y27
Non-essential amino acids						
Phosphoserine	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Taurine	11.53	11.00	8.22	7.32	8.16	9.61
Phosphoetanolamine	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Urea	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Proline	nd	7.40	3.53	nd	2.63	7.64
Aspartic acid	nd	nd	20.31	nd	19.49	37.30
Serine	7.42	26.87	14.91	9.51	13.36	33.00
Glutamic acid	84.73	112.15	71.97	65.32	85.87	78.54
Sarcosine	4.16	7.98	1.04	nd	0.85	10.87
Amino adipic acid	1.92	2.09	0.92	0.92	1.19	1.64
Glycine	2.77	5.83	3.48	2.85	3.35	6.30
Alanine	14.39	53.00	30.02	18.06	25.15	59.57
Citrulline	nd	2.61	2.01	0.83	nd	3.17
$\alpha$ -aminobutyric acid	nd	0.45	nd	nd	nd	0.21
Cystine	20.31	15.99	23.71	10.47	19.13	20.42
Cystathionine	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Tyrosine	7.14	3.64	7.79	2.48	6.23	5.76
$\beta$ -alanine	9.24	2.95	10.09	7.25	8.87	12.88
$\beta$ -aminoisobutyric acid	14.90	3.35	14.64	11.62	14.33	11.51
$\gamma$ -aminobutyric acid	53.25	42.76	55.70	37.74	40.51	67.26
Aminoethanol	nd	2.81	1.19	nd	1.19	3.08
Hydroxyproline	0.72	3.08	3.39	0.52	0.54	3.27
Ornithine	0.35	1.63	0.67	0.36	0.62	2.39
1-Methylhistidine	0.49	1.94	1.01	0.67	0.83	1.33
3-Methylhistidine	0.82	1.29	0.98	0.20	1.15	1.65
Anserine	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Carnosine	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Arginine	92.60	416.49	212.84	117.37	169.97	476.35
Totals	326.74	725.31	488.42	293.49	423.42	853.75
Essential amino acids						
Threonine	11.62	26.40	16.38	12.84	15.07	34.25
Valine	13.11	27.02	19.40	12.55	17.26	33.08
Methionine	nd	2.33	nd	nd	nd	nd
Isoleucine	24.13	16.50	27.18	13.67	22.38	17.69
Leucine	nd	7.62	nd	nd	nd	9.62
Phenylalanine	14.68	3.36	15.00	6.41	10.67	7.54
Lysine	nd	3.00	1.03	0.54	1.02	4.15
Histidine	1.76	7.26	3.57	2.09	3.06	9.01
Total	65.3	93.49	82.56	48.1	69.46	115.34
Total amino acids	392.04	818.8	570.98	341.59	492.88	969.09
Ammonia	5.69	16.53	8.14	7.59	8.17	18.09

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

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

## (2) 생리활성물질

(가) Triterpenoid : 효모 발효도라지 차의 triterpenoid 함량 분석 결과는 Table 2-10 & Fig. 2-9과 같았다. 효모 발효를 하지 않은 도라지 차의 platycodin D3 함량은 1.81 mg/g이었으나 Y10, Y28, Y4+Y27, Y28+Y27, Y78+Y27 효모로 단독 또는 혼합 발효한 경우 platycodin D3 함량은 각각 4.25, 4.62, 4.37, 3.95, 3.25 mg/g으로 발효됨에 따라 증가하였고 3가지 유도체들 중 가장 많은 함량을 나타내었다. Deapioplatycodin D 유도체는 발효하지 않은 도라지 차에서 0.75 mg/g이었고 Y10(1.28 mg/g), Y28(1.02 mg/g), Y81(0.79mg/g), Y27(1.11 mg/g), Y10+Y27(1.16 mg/g), Y78+Y27(1.09 mg/g) 단독 또는 혼합 발효하였을 경우 조금씩 증가하였다. 한편 polygalacin D 유도체는 발효에 관계없이 크게 증가하는 경향은 나타나지 않았으며 saponin 총 함량은 6.72 mg/g을 함유한 Y28+Y27 효모군으로 발효시킨 도라지 차가 가장 많았다.

(나) Phenolic acids : Phenolic acids 화합물 분석 결과 여러 유도체들 중 gallic acid는 발효 후 모두 공통적으로 검출되지 않았다. Protocatechuic acid 함량은 발효하지 않았을 경우 18.99  $\mu\text{g/g}$ 이었으나 발효 후에는 28.77  $\mu\text{g/g}$ (Y4)에서 최대 93.32  $\mu\text{g/g}$ (Y28+Y27)으로 크게 증가하였다. 특히 chlorogenic acid는 37.42  $\mu\text{g/g}$ (NIM)에서 Y27 발효 도라지 차에서 276.14  $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 크게 증가하였으며 효모군으로 발효시킨 도라지 차 모두 크게 증가하는 결과를 나타내었다. 한편 p-hydrobenzoic acid는 발효 후 모두 검출되지 않았고 phenolic acid 총 함량은 Y28+Y27 혼합 발효 도라지 차에서 424.35  $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 많은 양이 검출되었다(Table 2-11 & Fig. 2-10).

- Flavonols : Flavonols 함량 분석 결과로는 총 11종류의 유도체가 검출되었다. Epigallocatechin는 28.05  $\mu\text{g/g}$ (NIM)에서 발효 후 도라지 차에서는 모두 증가하였고 Y28+Y27 발효 도라지 차에서 125.32  $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 높게 검출되었다. Vanilin은 Y28 발효 도라지 차(0.73  $\mu\text{g/g}$ )를 제외하고 모두 검출되지 않았고 quercetin은 발효하지 않은 도라지 차(81.90  $\mu\text{g/g}$ )를 제외하고 모두 검출되지 않았다. 한편 catechin, epicatechin, epigallocatechin gallate, naringin, naringein, rutin은 발효 도라지 차 모두 증가하였고 총 함량은 Y27 효모군으로 발효시킨 도라지 차에서 377.59  $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 높은 양을 나타내었다(Table 2-12 & Fig. 2-11).

Table 2-10. 효모발효 도라지 차의 triterpenoides 함량

Contents <sup>1)</sup> (mg/g d.w.)	Strains											
	NIM	Y4	Y10	Y28	Y78	Y81	Y27	Y4+Y27	Y10+Y27	Y28+Y27	Y78+Y27	Y81+Y27
Platycodin D3	1.81	1.51	4.25	4.62	1.13	2.37	3.21	4.37	1.85	3.95	3.25	0.88
Deapioplatycodin D	0.75	0.60	1.28	1.02	0.31	0.79	1.11	0.71	1.10	1.16	1.09	0.30
Polygalacin D	0.12	0.26	0.55	0.31	0.89	0.53	1.53	0.34	0.51	1.61	1.36	1.14
Total	2.68	2.37	6.08	5.95	2.33	3.69	5.85	5.42	3.46	6.72	5.70	2.32

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

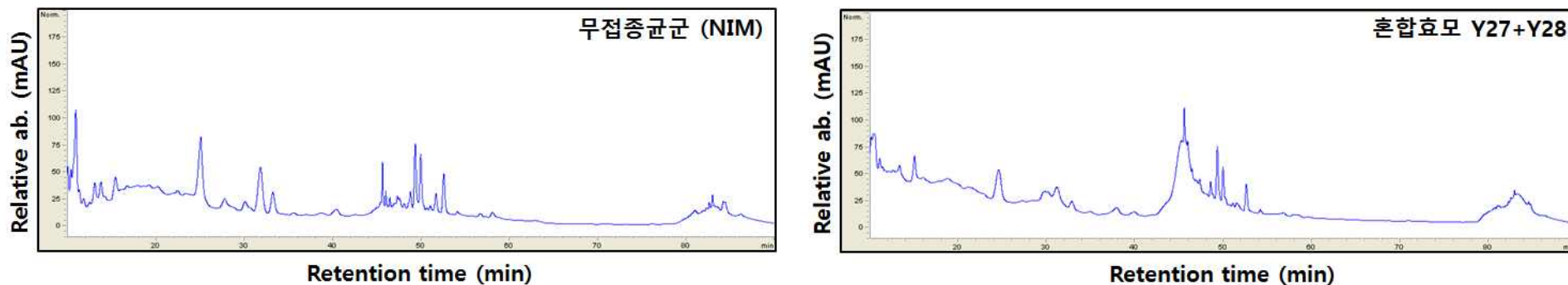


Fig. 2-9. 효모발효 도라지 차의 triterpenoid 화합물의 HPLC 크로마토그램.

Table 2-11. 효모발효 도라지 차의 phenolic acids 함량

Contents ( $\mu\text{g/g d.w.}$ ) <sup>1)</sup>	Strains											
	NIM	Y4	Y10	Y28	Y78	Y81	Y27	Y4+Y27	Y10+Y27	Y28+Y27	Y78+Y27	Y81+Y27
Gallic acid	5.78	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Protocatechuic acid	18.99	28.77	40.11	71.30	30.73	68.61	86.94	57.37	70.62	93.32	85.61	30.60
Chlorogenic acid	37.42	186.47	274.32	251.85	186.26	224.92	276.14	245.38	259.36	267.81	255.06	164.16
p-Hydrobenzoic acid	6.09	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Vanilic acid	4.14	7.87	14.05	9.42	7.16	8.54	21.34	14.96	14.62	30.93	27.31	13.28
p-Coumaric acid	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ferulic acid	8.63	29.24	33.65	nd	9.47	8.37	8.69	7.16	8.08	6.77	5.98	nd
Vertaric acid	3.21	15.85	18.79	20.07	16.22	18.16	19.37	15.44	16.34	22.07	19.55	9.84
trans-Cinnamic acid	0.73	1.00	1.58	2.34	1.98	1.30	1.64	0.94	1.36	3.45	1.54	0.80
Total	84.99	269.2	382.5	354.98	251.82	329.9	414.12	341.25	370.38	424.35	395.05	218.68

<sup>1)</sup> Value indicated the mean's of three replication ( $n=3$ ).

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

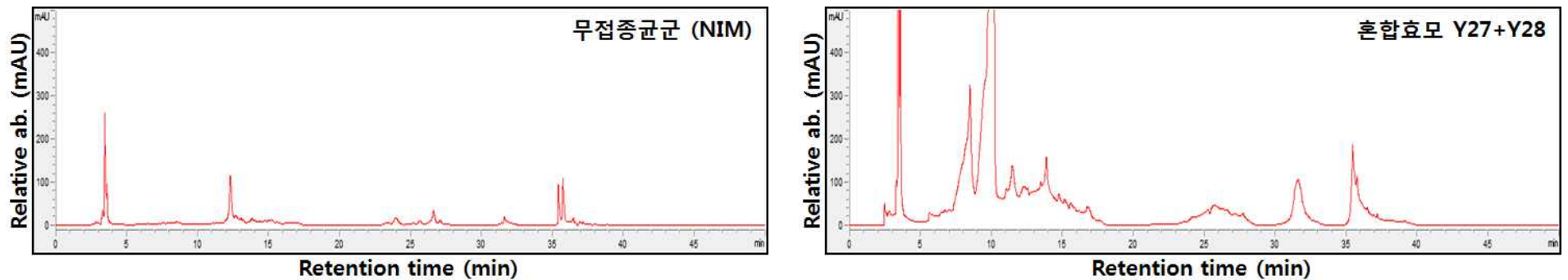


Fig. 2-10. 효모발효 도라지 차의 phenolic acid 화합물의 HPLC 크로마토그램.

Table 2-12. 효모발효 도라지 차의 flavonols 함량

Contents ( $\mu\text{g/g d.w.}$ ) <sup>1)</sup>	Strains											
	NIM	Y4	Y10	Y27	Y28	Y78	Y81	Y4+Y27	Y10+Y27	Y28+Y27	Y78+Y27	Y81+Y27
Epigallocatechin	28.05	106.15	107.68	110.72	93.15	77.66	83.48	84.34	96.74	125.32	101.32	59.45
Catechin	18.07	47.99	64.79	89.26	80.77	83.28	74.85	86.84	83.79	117.27	111.16	84.44
Epicatechin	8.89	24.04	46.53	28.77	30.43	20.33	37.16	32.65	37.24	40.87	29.56	22.53
Epigallocatechin gallate	9.01	25.52	32.08	50.28	36.45	25.64	21.53	20.71	34.59	50.52	31.32	16.03
Vanilin	nd	nd	nd	nd	0.73	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Rutin	5.32	19.60	47.21	46.62	36.16	16.92	12.02	13.42	18.71	13.55	45.44	11.38
Catechin gallate	41.07	14.74	12.44	11.25	11.05	9.89	20.94	23.35	35.14	10.98	12.36	28.47
Quercetin	81.90	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Naringin	nd	21.97	25.89	26.76	18.33	16.98	23.09	20.67	22.53	31.13	27.52	13.06
Naringenin	2.65	6.83	10.53	7.77	15.65	6.55	4.55	7.26	7.97	6.34	5.79	4.18
Formonoetin	3.93	4.03	6.54	6.16	6.54	2.74	2.92	4.34	nd	nd	nd	4.50
Total	198.89	270.87	353.69	377.59	329.26	259.99	280.54	293.58	336.71	395.98	364.47	244.04

<sup>1)</sup> Value indicated the mean's of three replication ( $n=3$ ).

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

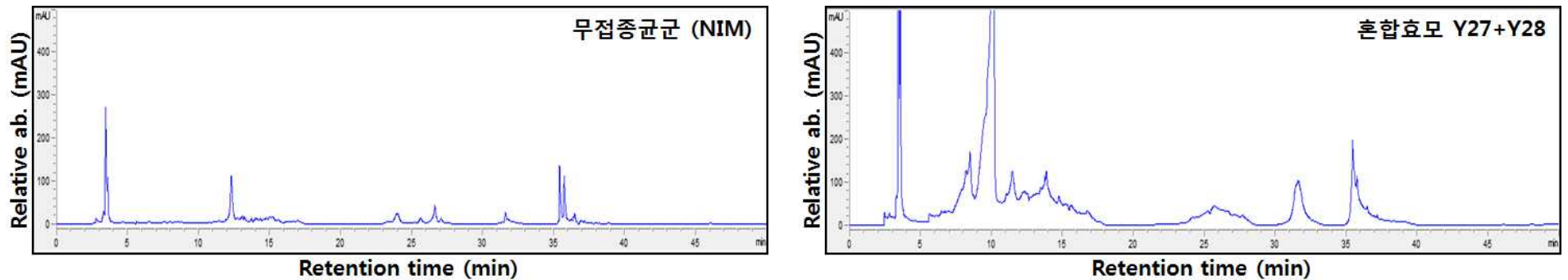


Fig. 2-11. 효모발효 도라지 차의 flavonol 화합물의 HPLC 크로마토그램.

**(3) 생리활성 물질 함량 :**

(가) 총 phenolics : 총 페놀릭스 함량 측정 결과 Fig. 2-12A와 같았다. 결과적으로 발효 도라지 차에서 총 페놀릭스 함량이 크게 증가하였다. 특히 Y28+Y27 혼합 발효 도라지 차는 3.91 mg/g으로 가장 높은 양을 나타내었고 Y27 단독 발효 도라지 차는 3.85 mg/g으로 두 번째로 높은 함량을 나타내었다. 이외 모든 발효 도라지 차들 역시 발효하지 않은 도라지 차(NIM, 1.11 mg/g)보다는 증가하였다.

(나) 총 flavonoid : 총 플라보노이드 함량 역시 총 페놀릭스 함량과 동일한 양상을 나타내었다. Y28+Y27 혼합 발효 도라지 차는 54.59 mg/g으로 가장 높았고 Y27 단독 발효 도라지 차 역시 53.68 mg/g으로 높은 함량을 나타내었다(Fig 2-12B).

(다) 갈변물질 : 갈변물질 함량은 발효 하지 않은 경우 1.605의 흡광도 값을 나타냈으나 발효 도라지 차들은 갈색화 반응에 의해 유사한 갈변도 함량을 나타내었다(2.824 ~ 3.093)(Fig. 2-12C).

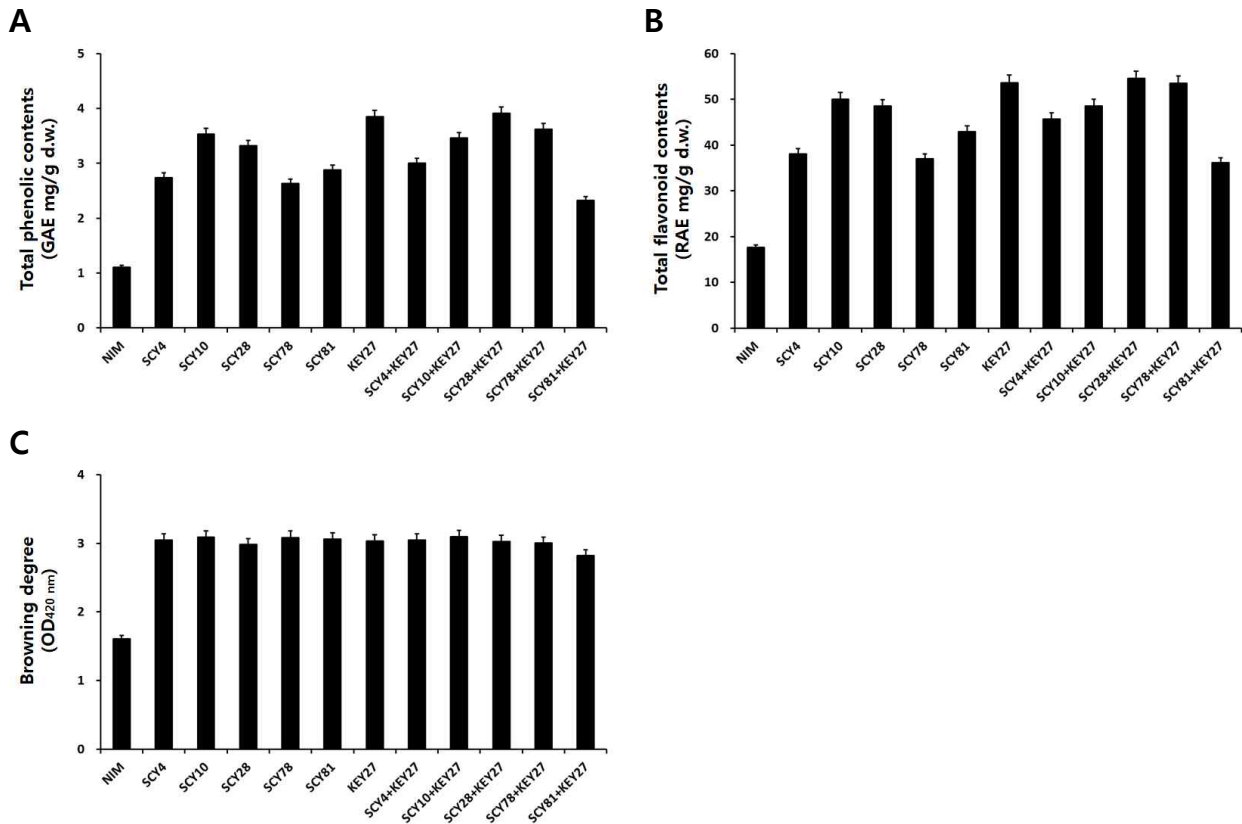


Fig. 2-12. 효모발효 도라지 차의 총 phenolics (A), 총 flavonoids (B) 및 갈변물질 (C) 함량.

**(4) 항산화 활성 :**

(가) DPPH 라디칼 소거활성 : DPPH 라디칼 소거활성은 발효 하지 않은 도라지 차(40.16%)와 Y81+Y27 혼합 발효 도라지 차(62.00%)를 제외하고는 모두 우수한 소거활성을 나타내었다. 특히 Y28+Y27 혼합 발효 도라지 차는 84.06%로 가장 우수한 활성을 나타내었다(Fig. 2-13A).

(나) ABTS 라디칼 소거활성 : ABTS 라디칼 소거활성은 DPPH 라디칼 소거활성과는 약간 다른 결과를 나타내었다. 발효를 하지 않은 도라지 차의 경우 18.66%의 아주 낮은 라디칼 소거



활성을 나타내었고 Y28+Y27 혼합 발효 도라지 차는 92.41%로 다른 도라지 차에 비해 가장 우수한 라디칼 소거활성을 나타내었다. 이 외 Y28 단독 발효 도라지 차는 89.90%의 우수한 활성을 나타내었고 대부분의 발효 도라지 차 역시 61.55 ~ 84.57%의 우수한 소거활성을 나타내었다(Fig. 2-13B).

(다) FRAP 환원력 : FRAP 환원력은 NIM(0.762), Y81+Y27(1.863) 도라지 차를 제외하고는 모평균 2.15의 우수한 FRAP 환원력을 나타내었다(Fig. 2-13C).

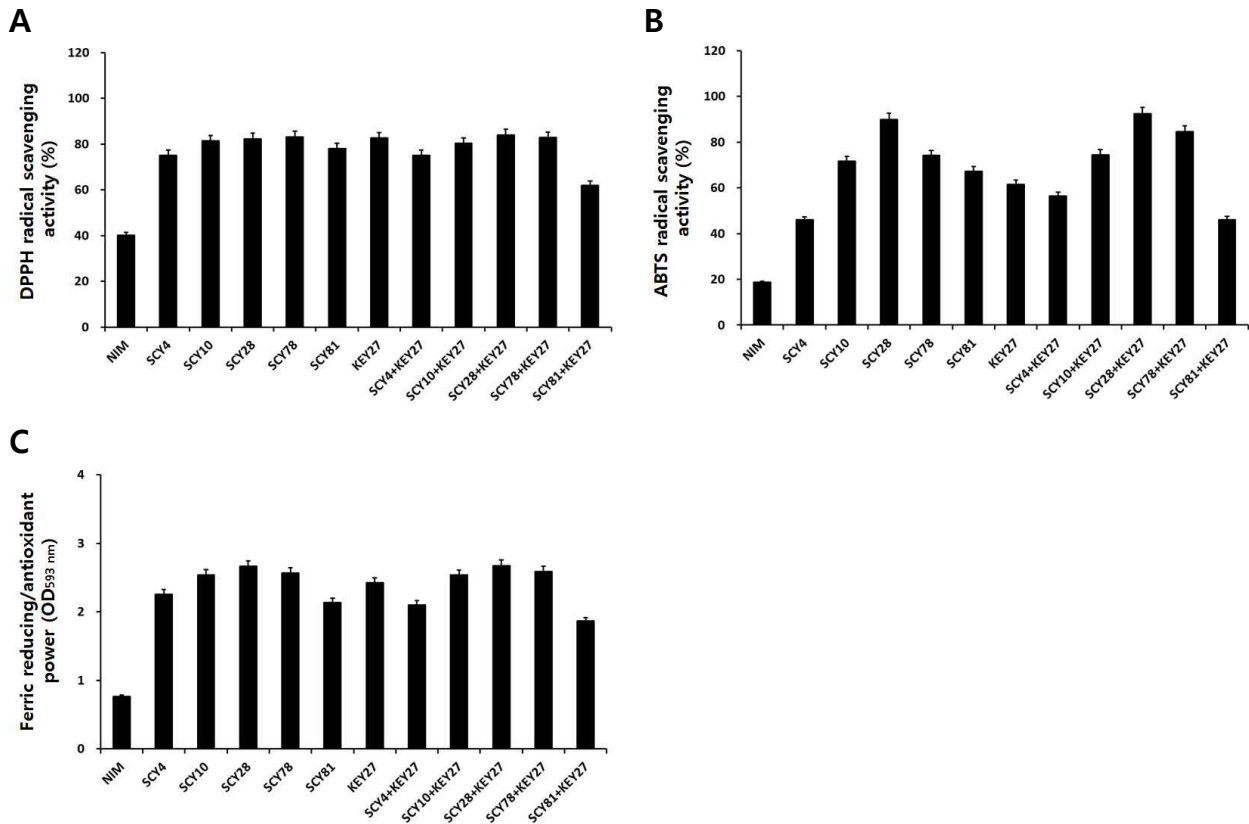


Fig. 2-13. 효모발효 도라지 차의 DPPH 라디칼 소거활성 (A), ABTS 라디칼 소거활성 (B) 및 FRAP 환원력 (C)의 비교.

(5) 소화효소 저해활성 :

(가)  $\alpha$ -Glucosidase 저해활성 :  $\alpha$ -Glucosidase 저해활성은 항산화 활성보다는 낮은 활성을 나타내었으나 경향은 일치하는 것으로 나타났다. 즉, Y28+Y27 혼합 발효 도라지 차가 24.26%로 가장 우수하였고 Y28 단독 발효 도라지 차 역시 23.61%로 우수한 저해활성을 나타내었다(Fig. 2-14A).

(나) 췌장-lipase 저해활성 : 췌장 lipase 저해활성은  $\alpha$ -glucosidase 보다 조금 우수한 것으로 나타났다. 발효를 하지 않은 도라지는 5.88%의 아주 낮은 저해활성을 보인 반면, 모든 발효 도라지 차들은 19.80%(Y81+Y27) ~ 32.63%(Y28+Y27)의 다양한 lipase 저해활성을 나타내었다(Fig. 2-14B).

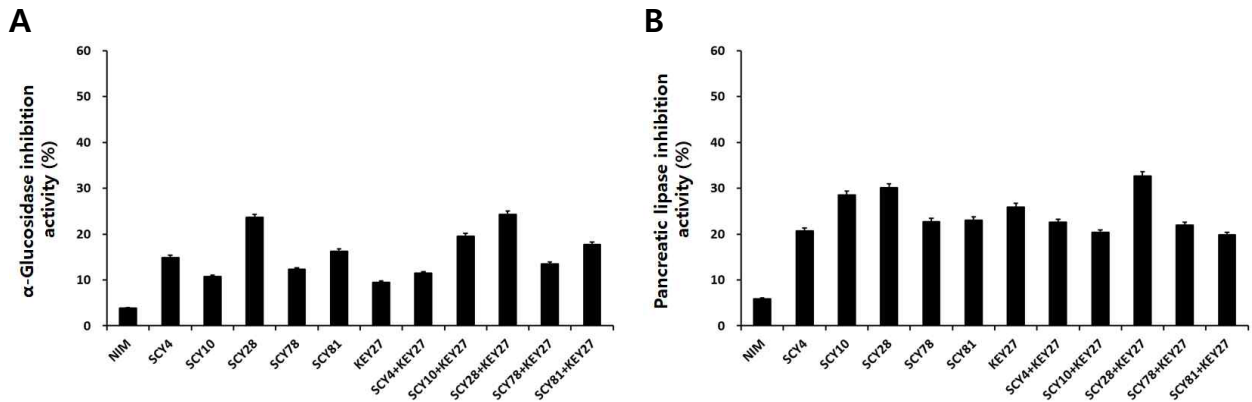


Fig. 2-14. 효모발효 도라지 차의  $\alpha$ -glucosidase 저해활성 (A) 및 췌장-lipase 저해활성 (B)의 비교.

#### 다. 숙성·발효도라지 제조 및 특성 확인

(1) **이화학적 특성** : 건도라지, 홍도라지, 흑도라지, 발효홍도라지, 발효흑도라지의 이화학적 특성을 측정한 결과 흑도라지의 pH가 3.71로 가장 낮은 수치를 나타내었다. 건도라지의 pH는 5.66이었고 홍도라지는 이보다 약간 감소하여 4.65를 나타내었다. 발효홍도라지는 3.77이었고 발효흑도라지는 4.15의 pH 수치를 나타내었다. 산도는 9.90%로 발효홍도라지가 가장 높은 산미를 나타내었고 건도라지가 2.83%로 가장 낮은 산미를 나타내었다. 환원당은 홍도라지(3.77 mg/g), 흑도라지(3.78 mg/g), 발효홍도라지(3.80 mg/g)는 유사한 함량이었고 건도라지는 2.88 mg/g, 발효흑도라지는 2.65 mg/g으로 가장 낮은 환원당 함량을 나타내었다. 생균수는 발효흑도라지가 4.57 log cfu/g으로 측정되어졌고 발효홍도라지는 8.23 log cfu/g으로 발효흑도라지보다 높은 생균수가 검출되었다(Table 2-13).

Table 2-13. 숙성·발효도라지의 이화학적 특성

Sample	Contents <sup>1)</sup>			
	pH	Acidity (%, as lactic acid)	Reducing sugar (mg/g)	Viable cell numbers (log cfu/g)
건도라지	5.66	2.83	2.88	nm <sup>2)</sup>
홍도라지	4.65	4.18	3.77	nm
흑도라지	3.71	9.00	3.78	nm
발효홍도라지	3.77	9.90	3.80	8.23
발효흑도라지	4.15	7.16	2.65	4.57

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

<sup>2)</sup>nm, not measured.

(2) **숙성·발효도라지의 생리활성물질 함량** : 숙성과 발효도라지의 총 페놀릭스 함량 측정 결과 Fig. 2-15A와 같았다. 건도라지는 3.99 mg/g으로 아주 낮은 페놀릭스 함량을 보유하고 있었으나 홍도라지의 경우 14.91 mg/g으로 건도라지에 비해 크게 증가하였으며 흑도라지는 이보다 좀 더 증가하여 20.06 mg/g을 함유하고 있었다. 발효홍도라지의 경우에는 17.16 mg/g으로

약간 낮은 함량을 나타내었으나 발효흑도라지는 21.42 mg/g으로 이들 중 가장 많은 페놀릭스 함량을 나타내었다. 총 플라보노이드 함량 역시 총 페놀릭스 함량 결과와 일치하였다. 즉, 건도라지에서는 81.44 mg/g이었으나 홍도라지는 111.84 mg/g으로 증가하였고 흑도라지 역시 134.81 mg/g으로 크게 증가하였다. 발효홍도라지는 125.93 mg/g으로 흑도라지에 비해 약간 낮은 함량을 나타내었고 발효흑도라지는 141.01 mg/g으로 가장 높았고 건도라지를 제외한 숙성·발효도라지들의 총 플라보노이드 함량은 대부분 많은 것으로 나타났다(Fig. 2-15B). 갈변물질 함량은 건도라지의 경우 1.88의 낮은 흡광도 값을 나타내었으나 홍도라지는 3.37의 흡광도 값을 나타내었다. 한편 흑도라지, 발효홍도라지, 발효흑도라지들의 갈변물질 함량은 서로 유사하였고 흡광도 값은 3.65 ~ 3.80을 나타내었다(Fig. 2-15C).

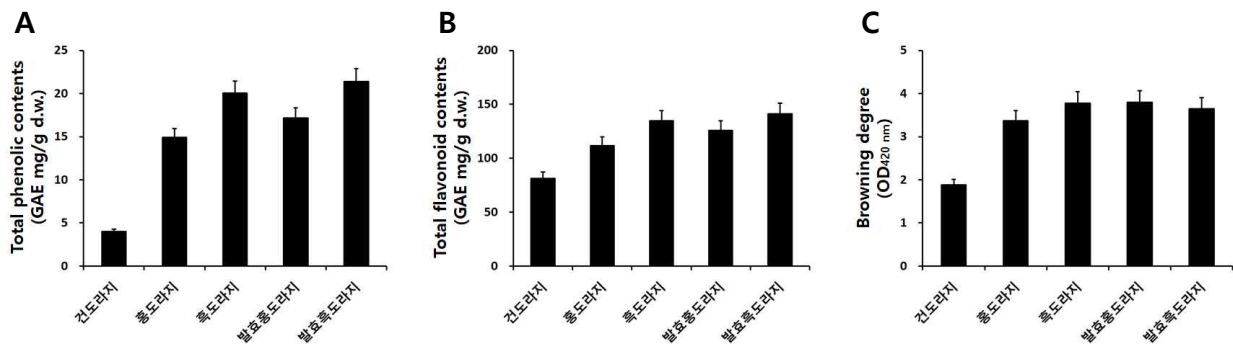


Fig. 2-15. 숙성·발효도라지의 총 phenolics (A), 총 flavonoids (B) 및 갈변물질 (C) 함량.

### (3) 숙성·발효도라지의 phytochemicals 화합물 함량 :

(가) Triterpenoides : Triterpenoides계 화합물 분석 결과 platycodin D3, deapioplatycodin D, polygalcin D 형태가 검출되었다. Platycodin D3 화합물은 건도라지, 흑도라지, 발효흑도라지에선 검출되지 않았고 홍도라지는 1.67 mg/g이 검출되었고 발효홍도라지는 0.87 mg/g을 함유하고 있었다. Deapioplatycodin D 화합물은 홍도라지가 0.77 mg/g으로 가장 많은 양이 검출되었고 발효홍도라지 역시 0.50 mg/g으로 비교적 많은 함량이 검출되었다. Polygalcin D 화합물은 건도라지, 흑도라지, 발효흑도라지에서는 검출되지 않았고 홍도라지와 발효홍도라지에서 각각 0.27 mg/g과 0.19 mg/g이 검출되었다. Triterpenoides계 화합물의 총 함량은 홍도라지(2.44 mg/g)가 가장 많은 함량을 나타내었다(Table 2-14 & Fig. 2-16).

(나) Phenolic acids : Phenolic acids 화합물 분석 결과 gallic acid는 건도라지에서만 6.10 mg/g 수준으로 검출되었고 나머지 도라지에서는 검출되지 않았다. Protocatechuic acid는 건도라지는 11.57 mg/g, 홍도라지 66.54 mg/g이었으며 흑도라지는 133.57 mg/g으로 크게 증가하였다. 발효홍도라지는 69.82 mg/g으로 흑도라지에 비해 낮은 함량을 나타내었으나 발효흑도라지는 126.71 mg/g으로 많은 양이 검출되었다. 한편 chlorogenic acid 역시 대부분 많은 양이 검출되었고 특히 발효흑도라지가 244.51 mg/g으로 가장 많은 함량을 나타내었다. 또한 발효흑도라지에는 chlorogenic acid와 protocatechuic acid 함량이 높은 관계로 phenolic acids 총 함량 역시 459.34 mg/g으로 가장 높았고 발효홍도라지(380.15 mg/g)와 홍도라지(329.06 mg/g) 역시 높은 함량을 나타내었다(Table 2-14 & Fig. 2-17).

(다) Flavonols : Flavonols 화합물 분석 결과 11종류의 화합물이 검출되었다. 각각의 도라지들의 주요 flavonols 화합물은 epigallocatechin이었고 건도라지에서는 160.67 mg/g이 검출되

있고 홍도라지는 215.89 mg/g으로 건도라지에 비해 좀 더 많은 함량을 나타내었다. 흑도라지는 323.83 mg/g으로 더욱 증가하였고 발효홍도라지는 278.59 mg/g이 검출되었으며 발효흑도라지는 397.05 mg/g으로 이들 중 가장 많은 함량을 나타내었다. Epicatechin 화합물 역시 비교적 높은 함량이 검출되었고 홍도라지가 115.36 mg/g으로 가장 높은 함량을 나타내었고 flavonols 총 함량은 발효흑도라지가 971.22 mg/g으로 가장 높았고 흑도라지는 935.09 mg/g, 발효홍도라지는 879.04 mg/g, 홍도라지는 750.57 mg/g이었고 건도라지(363.33 mg/g)보다는 숙성과 발효 처리 시 모두 증가하는 경향을 나타내었다 Table 2-14 & Fig. 2-18).

**Table 2-14.** 숙성·발효도라지의 phytochemicals 화합물 함량 특성

Contents <sup>1)</sup> (mg/g d.w.)	숙성·발효도라지 종류				
	건도라지	홍도라지	흑도라지	발효홍도라지	발효흑도라지
Triterpenoides					
Platycodin D3	nd	1.67	nd	0.87	nd
Deapioplatycodin D	0.18	0.77	0.44	0.50	0.31
Polygalcin D	nd	0.27	nd	0.19	nd
Total	0.18	2.44	0.44	1.37	0.31
Phenolic acids					
Gallic acid	6.10	nd	nd	nd	nd
Protocatechuic acid	11.57	66.54	133.57	69.82	126.71
Chlorogenic acid	38.26	186.49	235.66	220.53	244.51
p-Hydrobenzoic acid	14.80	63.81	61.25	71.25	57.72
Vanillic acid	nd	nd	11.10	nd	12.44
p-Coumaric acid	1.09	nd	nd	nd	nd
Ferulic acid	5.88	11.47	nd	nd	nd
Vertaric acid	9.26	nd	nd	17.80	17.10
t-Cinnamic acid	0.73	0.75	0.79	0.75	0.86
Total	87.69	329.06	442.37	380.15	459.34
Flavonols					
Epigallocatechin	160.67	215.89	323.83	278.59	397.05
Catechin	15.22	115.36	57.84	69.97	43.23
Epicatechin	20.90	53.84	130.39	140.98	146.25
Epigallocatechin gallate	5.39	32.25	58.24	42.99	nd
Vanillin	nd	nd	1.23	nd	nd
Rutin	9.86	21.47	nd	nd	nd
Catechin gallate	8.23	12.84	nd	42.19	nd
Quercetin	130.32	287.90	320.11	289.65	345.23
Naringin	nd	nd	25.14	nd	29.24
Naringenin	8.92	6.81	14.86	10.69	6.61
Formonoetin	3.82	4.21	3.45	3.98	3.61
Total	363.33	750.57	935.09	879.04	971.22

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

<sup>2)</sup>nm, not measured.

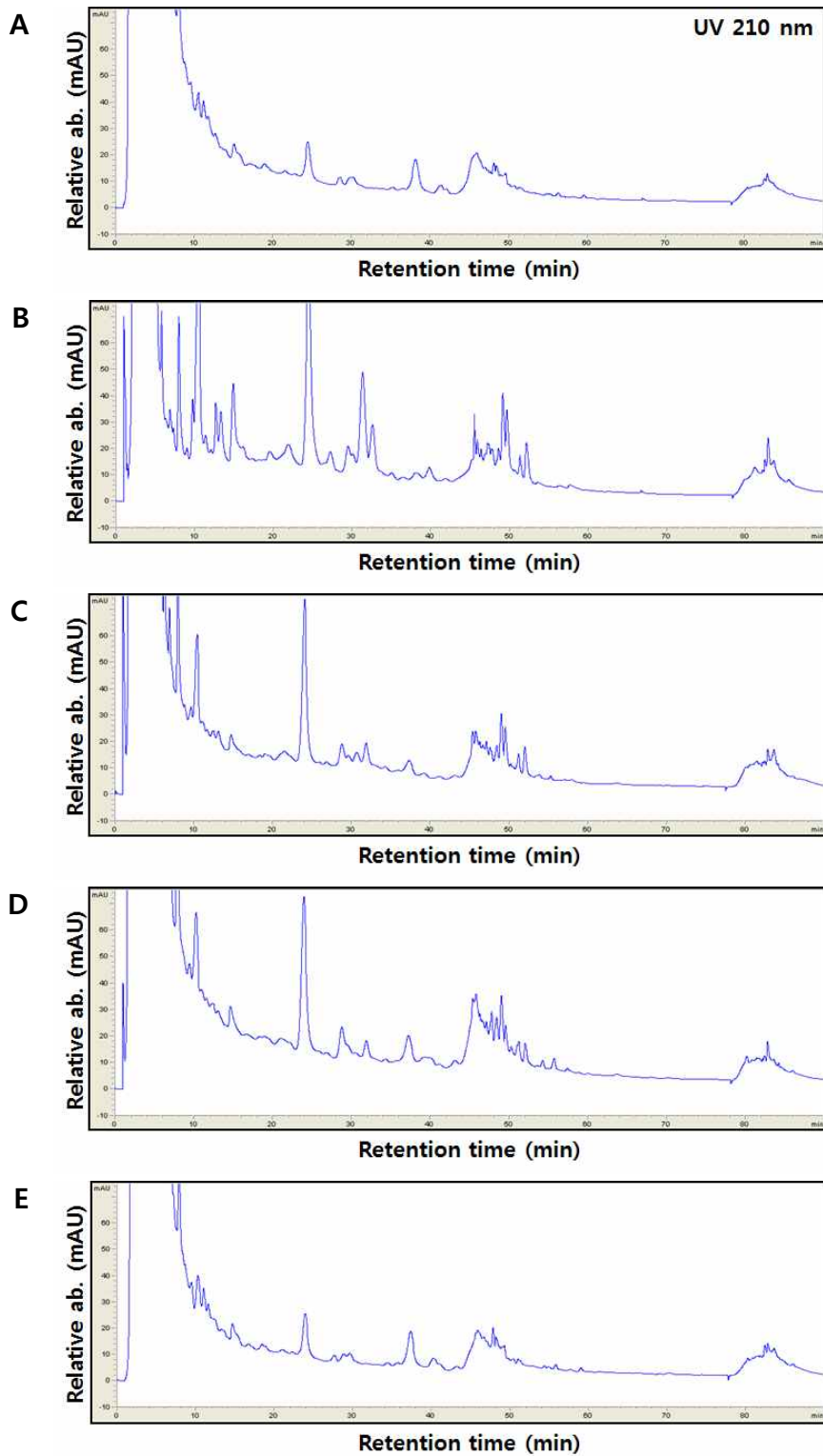


Fig. 2-16. 숙성·발효도라지 추출물의 triterpenoid 화합물의 HPLC 크로마토그램. (A) 건도라지, (B) 흥도라지, (C) 흑도라지, (D) 발효흥도라지 및 (E) 발효 흑도라지.

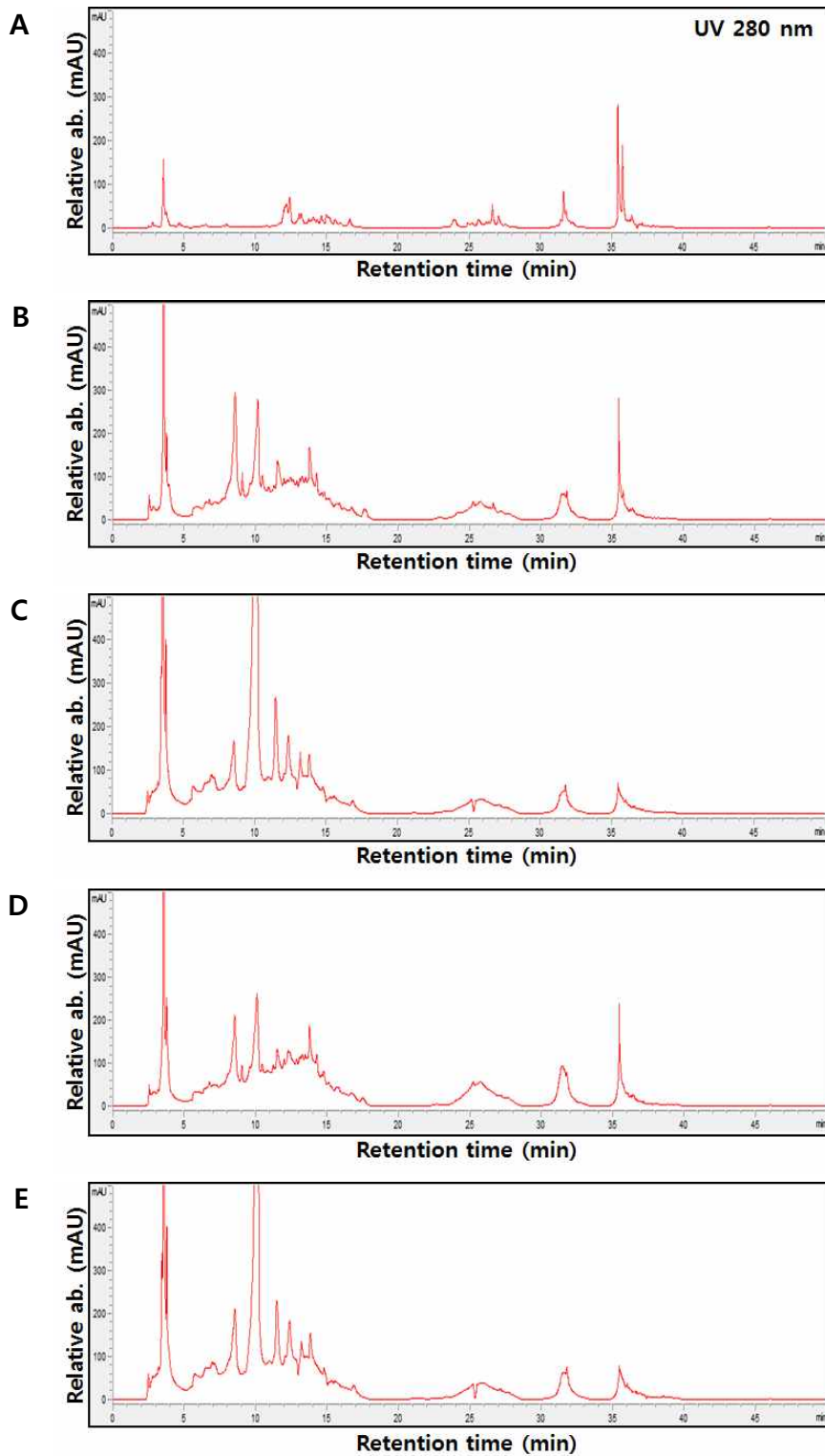


Fig. 2-17. 숙성·발효도라지 추출물의 phenolic acid 화합물의 HPLC 크로마토그램.  
 (A) 건도라지, (B) 홍도라지, (C) 흑도라지, (D) 발효홍도라지 및 (E) 발효 흑도라지.

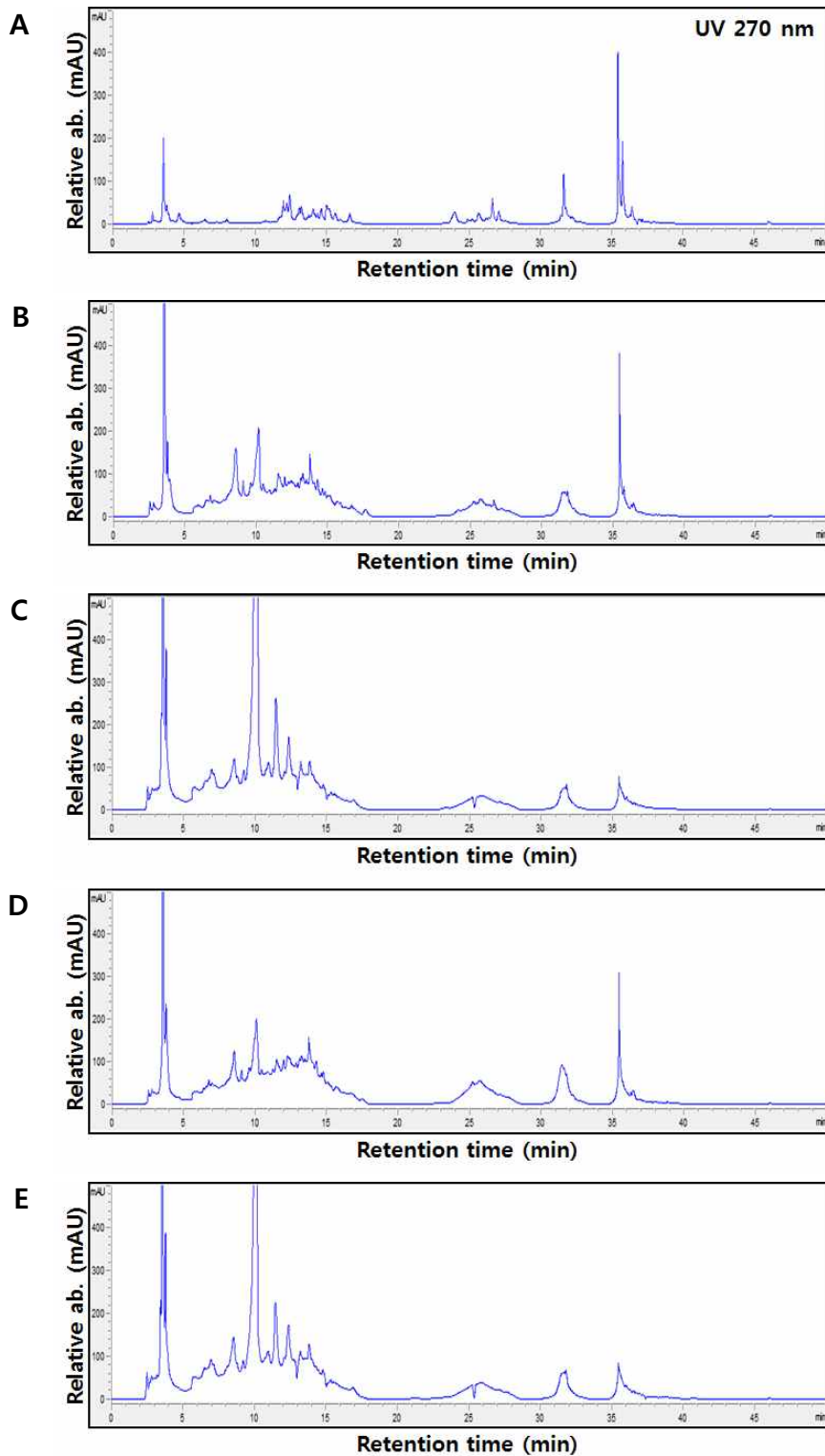


Fig. 2-18. 숙성·발효도라지 추출물의 flavonol 화합물의 HPLC 크로마토그램.  
 (A) 건도라지, (B) 흥도라지, (C) 흑도라지, (D) 발효흥도라지 및 (E) 발효 흑도라지.

(3) 숙성·발효도라지의 항산화 활성 : DPPH 라디칼 소거활성은 발효흑도라지가 91.90%로 가장 높은 활성을 보였고 흑도라지는 87.34%를 나타내었다. 한편 건도라지는 54%로 이들 중

가장 낮은 활성을 나타내었고 홍도라지는 68%를 나타내었으며 발효홍도라지는 79%를 나타내었다(Fig. 2-19A). ABTS 라디칼 소거활성은 DPPH 라디칼 소거활성보다 전체적으로 높은 활성을 나타내었다. 건도라지는 68%를 나타내었고 홍도라지는 79%로 건도라지보다 좀 더 증가하였다. 흑도라지는 89%를 나타내었으며 발효흑도라지는 85%를 나타내었고 발효흑도라지는 93%로 이들 중 가장 우수한 ABTS 라디칼 소거활성을 나타내었다(Fig. 2-19B).  $\cdot\text{OH}$  라디칼 소거활성 역시 DPPH 및 ABTS와 동일 결과를 나타내었고 발효흑도라지가 81%로 가장 우수한 활성을 나타내었다(Fig. 2-19C). FRAP 환원력은 건도라지(0.69)와 홍도라지(0.89)는 유사한 활성을 나타내었고 흑도라지는 1.37의 환원력을 보였으며 발효홍도라지는 1.21로 약간 낮은 환원력을 나타내었다. 한편 발효흑도라지는 1.43으로 가장 우수한 FRAP 환원력을 나타내었다(Fig. 2-19D).

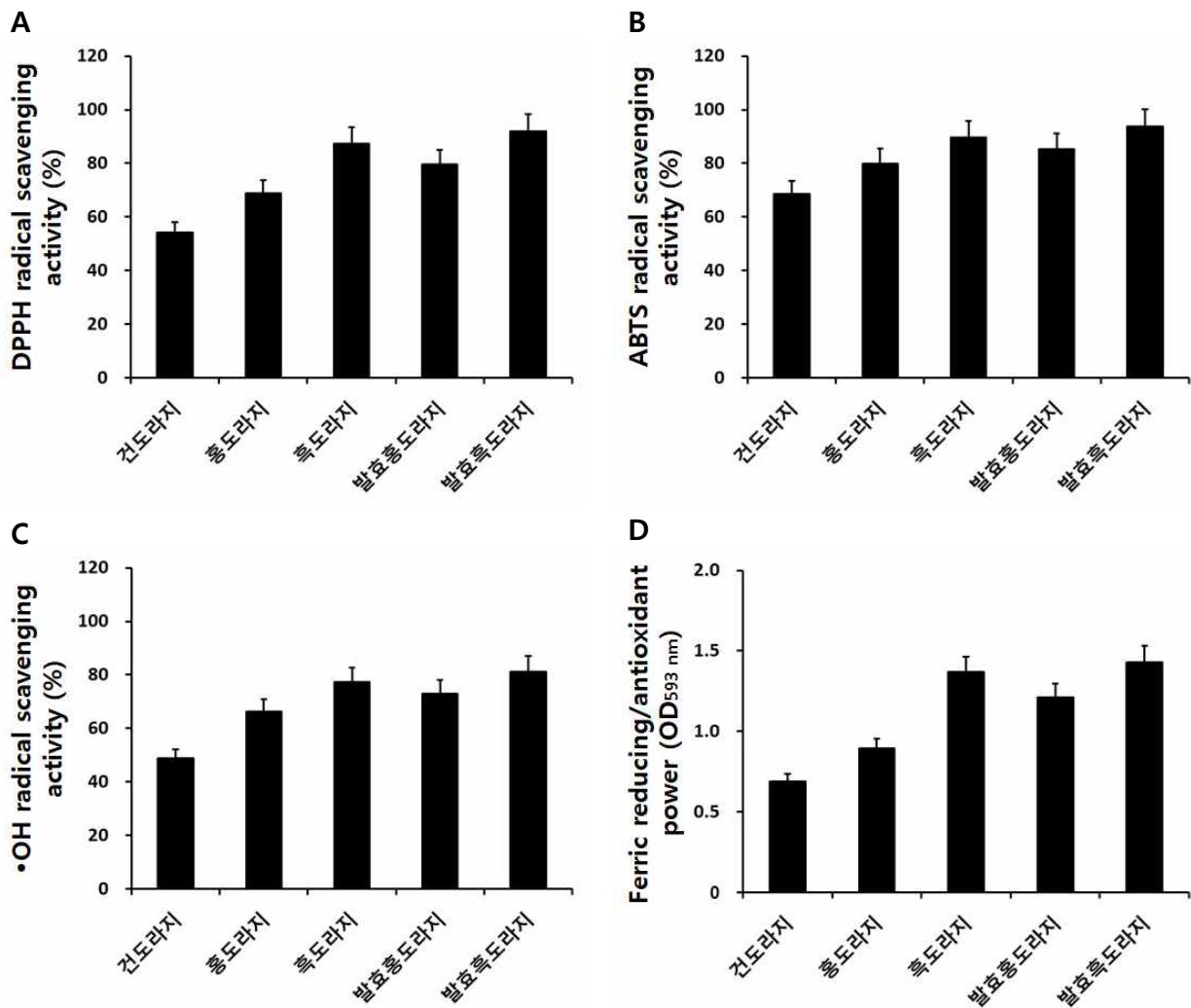


Fig. 2-15. 숙성·발효도라지 추출물의 DPPH (A)와 ABTS (B), hydroxyl (C) 라디칼 소거활성 및 FRAP 환원력 (D).

(4) 숙성·발효도라지의 소화효소 저해활성 :  $\alpha$ -Glucosidase 저해활성 측정 결과는 Fig. 2-20A와 같았다. 건도라지의 저해활성은 49%로 비교적 우수하였고 홍도라지는 57%로 좀 더 우수한 것으로 나타났다. 흑도라지는 이들보다 좀 더 증가하여 79%의 저해활성을 나타내었으나 발효홍도라지는 69%로 약간 감소하였고 발효흑도라지는 82%로 가장 우수한  $\alpha$ -glucosidase



저해활성을 나타내었다. Pancreatic lipase 저해활성은  $\alpha$ -glucosidase 저해활성과는 반대로 비교적 낮은 활성을 나타내었다. 건도라지는 9%의 아주 저조한 저해활성을 나타내었고 홍도라지는 22%를, 흑도라지는 37%로 약간 증가하였다. 발효홍도라지는 34%를 나타내었으며 발효흑도라지는 42.27%의 pancreatic lipase 저해활성을 나타내었다(Fig. 2-20B).

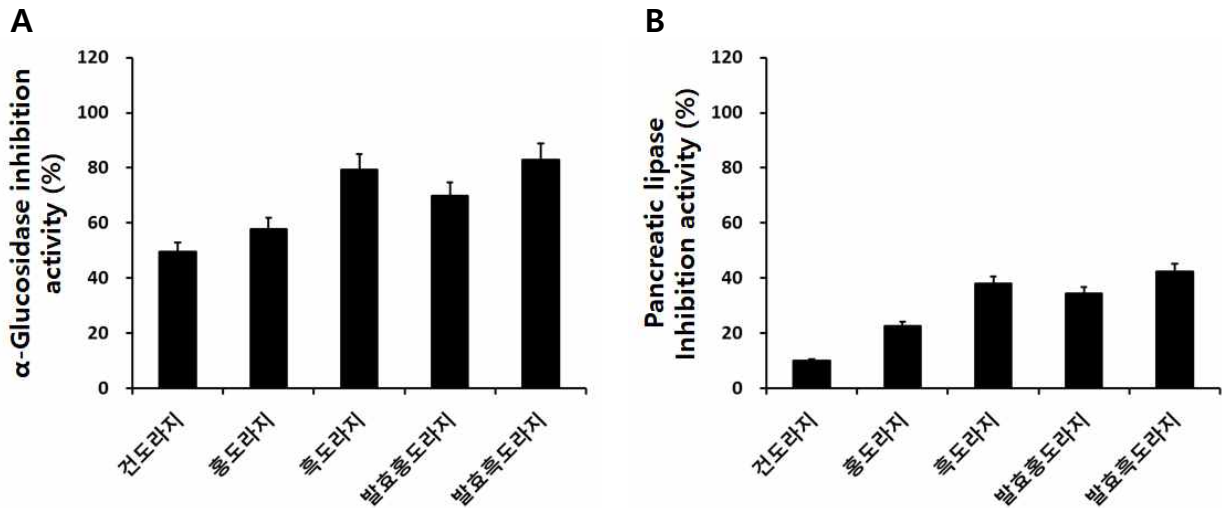


Fig. 2-20. 숙성·발효도라지 추출물의  $\alpha$ -glucosidase (A) 및 췌장-lipase (B) 저해활성.

#### 라. 지역별 도라지와 숙성도라지의 영양성분

(1) 5대 영양성분 조성 : 산청군과 의령군에서 재배된 각각의 도라지 원료와 숙성 도라지의 5대 영양성분 비교 분석 결과는 Table 2-15와 같았다. 산청군에서 재배된 도라지 원료는 수분 4.9 g/100 g, 회분 6.2 g/100 g, 단백질 15.6 g/100 g, 지방 0.8 g/100 g, 그리고 탄수화물은 72.5 g/100 g을 함유하고 있었다. 산청군에서 재배된 도라지를 이용한 숙성 도라지의 경우 수분은 3.1 g/100 g으로 숙성 후 약간 감소하였고 회분 함유량은 7.8 g/100 g으로 조금 증가하였다. 단백질 함량은 15.2 g/100 g으로 원료와 비교하였을 시 큰 차이는 없었고 지방은 1.0 g/100 g, 탄수화물은 72.9 g/100 g으로 숙성 후 수분과 회분 함량만이 약간의 차이를 나타내었다. 의령군에서 재배된 도라지 원료의 경우 수분은 10.0 g/100 g으로 이들 중 가장 많았고 회분은 4.5 g/100 g, 단백질은 5.6 g/100 g으로 산청 도라지에 비해 낮은 함유량을 나타내었다. 지방은 0.9 g/100 g이었고 탄수화물은 79.0 g/100 g을 함유하고 있었다. 의령군 숙성 도라지는 원료에 비해 수분이 4.1 g/100 g으로 크게 감소하였고 회분은 4.7 g/100 g으로 큰 차이를 보이지 않았다. 단백질은 6.0 g/100 g으로 큰 변화는 없었으며 지방과 탄수화물은 각각 1.3 g/100 g과 83.9 g/100 g으로 이들 중 가장 많은 양이 검출되었다.

(2) 지방산 조성 : 산청군과 의령군에서 재배된 각각의 도라지 원료와 숙성 도라지의 지방산 분석 결과 원료와 숙성 도라지 모두 공통적으로 포화지방산 중에서는 arachidic acid(C20:0), behenic acid(C22:0), lignoceric acid(C24:0)가 검출되지 않았다. 불포화지방산은 myristoleic acid(C14:1), eicosadienoic acid(C20:2), eicosatrienoic acid(C20:3n6), docosadienoic acid(C22:2)가 검출되지 않았다. 포화지방산인 palmitic acid(C16:0)는 의령군 숙성 도라지가 8.9 mg/100 g으로 가장 높은 함량을 나타내었고 산청군 숙성 도라지는 4.8 mg/100 g으로 두 번째로 높은 것으로

나타났다. 산청군 도라지 원료에서는 palmitic acid(C16:0)가 2.2 mg/100 g이었고 의령군 도라지 원료는 4.1 mg/100 g이 검출되었다. Stearic acid(C18:0) 역시 의령군 숙성 도라지에서 1.3 mg/100 g으로 가장 높은 양이 검출되었다. 불포화지방산 중 주요 지방산은 linoleic acid(C18:2n6c)로서 의령군 숙성 도라지가 22.7 mg/100 g으로 가장 많은 양을 나타내었으며 공통적으로 도라지 원료보다는 숙성 후에 증가하였다. 산청군 도라지 원료의 linoleic acid(C18:2n6c) 함량은 4.5 mg/100 g에서 숙성 후 15.6 mg/100 g으로 증가하였다. 한편 oleic acid(C18:1n9c) 역시 0.7 mg/100 g(산청군 원료)에서 1.3 mg/100 g(산청군 숙성)으로 약간 증가하였고 의령군 도라지 역시 1.2 mg/100 g(의령군 원료)에서 2.5 mg/100 g(의령군 숙성)으로 증가하였다. 포화지방산 총 함량은 의령군 숙성 도라지가 10.2 mg/100 g의 함량을 나타내었고 포화지방산 총 함량 역시 30.1 mg/100 g으로 의령군 숙성 도라지가 가장 높은 함량을 나타내었다. 포화 및 불포화지방산 총 함량은 의령군 숙성 도라지에서 40.3 mg/100 g으로 이들 중 가장 높았다(Table 2-16).

**(3) 유리아미노산 조성** : 산청군과 의령군에서 재배된 도라지 원료와 이들의 숙성도라지가 함유한 유리아미노산 분석 결과는 Table ?와 같았다. 비필수 아미노산에서는 phosphoserine, phosphoetanolamine, proline, 1-methylhistidine, anserine, 및 carnosine이 공통적으로 검출되지 않았다. 필수 아미노산은 산청군 숙성도라지와 의령군 숙성도라지를 제외한 각각의 원료에서는 8종류 모두 검출되었다. 비필수 아미노산 중에서는 arginine이 2,000.94 mg/100 g으로 산청군 도라지 원료에서 가장 많은 양이 검출되었고 숙성 후에는 292.15 mg/100 g 크게 감소하였다. 이는 의령군 도라지 원료에서도 마찬가지로 435.28 mg/100 g에서 14.62 mg/100 g으로 감소하였다. 한편 glutamic acid가 비필수 아미노산 중 대부분을 차지하는 것으로 나타났고 산청군 원료에서는 337.43 mg/100 g이 검출되었고 산청군 숙성도라지는 253.36 mg/100 g으로 약간 감소하였다. 의령군 원료 역시 117.72 mg/100 g에서 71.08 mg/100 g으로 숙성 후 조금씩 감소하였다. 이 외에도 aspartic acid(산청군 원료-162.22 mg/100 g)와 alanine(산청군 원료-123.97 mg/100 g)의 함량이 비교적 많았으며 비필수 아미노산 총 함량은 산청군 원료가 3,079.97 mg/100 g으로 가장 많았다. 필수 아미노산 중 theronine이 산청군 원료(76.53 mg/100 g)와 숙성도라지(68.73 mg/100 g)에서 많은 양이 검출되었고 valine은 산청군 숙성도라지에서 320.88 mg/100 g으로 가장 많은 함량을 나타내었다. Isoleucine은 산청군 원료(22.44 mg/100 g)보다는 숙성 시 63.67 mg/100 g으로 크게 증가하였다. 의령군 도라지의 경우에는 숙성 후 isoleucine 함량이 14.16 mg/100 g에서 0.85 mg/100 g으로 크게 감소하는 것으로 나타났다. 이외 leucine, phenylalanine, lysine, histidine이 숙성 후 모두 감소하는 것으로 나타났다. 한편 유리아미노산 총 함량은 산청군 원료(3,375.15 mg/100 g) > 산청군 숙성도라지(1,661.11 mg/100 g) > 의령군 원료(922.86 mg/100 g) > 의령군 숙성도라지(448.31 mg/100 g) 순으로 높은 함량을 나타내었다 (Table 2-17).

**Table 2-15. 지역별 도라지와 숙성도라지의 5대 영양성분 조성**

Contents (g/100 g d.w.) <sup>1)</sup>	산청		의령	
	원료	숙성	원료	숙성
Moisture	4.9	3.1	10.0	4.1
Ash	6.2	7.8	4.5	4.7
Protein	15.6	15.2	5.6	6.0
Fat	0.8	1.0	0.9	1.3
Carbohydrate	72.5	72.9	79.0	83.9

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

**Table 2-16. 지역별 도라지와 숙성도라지의 지방산 조성**

Contents (g/100 g d.w.) <sup>1)</sup>	산청		의령	
	원료	숙성	원료	숙성
Saturated fatty acids				
Palmitic acid (C16:0)	2.2	4.8	4.1	8.9
Stearic acid (C18:0)	0.3	0.6	0.6	1.3
Arachidic acid (C20:0)	nd	nd	nd	nd
Behenic acid (C22:0)	nd	nd	nd	nd
Lignoceric acid (C24:0)	nd	nd	nd	nd
Total	2.5	5.4	4.7	10.2
Unsaturated fatty acids				
Myristoleic acid(C14:1)	nd	nd	nd	nd
Palmitoleic acid (C16:1)	0.1	0.1	nd	0.2
Oleic acid (C18:1n9c)	0.7	1.3	1.2	2.5
Linoleic acid (C18:2n6c)	4.5	15.6	12.9	22.7
$\gamma$ -Linolenic acid (C18:3n6)	0.3	1.6	0.9	1.8
$\alpha$ -Linolenic acid (C18:3n3)	nd	0.1	0.3	0.2
Eicosenic acid (C20:1)	0.1	0.4	0.3	0.9
Eicosadienoic acid (C20:2)	nd	nd	nd	nd
Eicosatrienoic acid (C20:3n3)	0.1	0.6	0.5	1.3
Eicosatrienoic acid(C20:3n6)	nd	nd	nd	nd
Arachidonic acid(C20:4n6)	nd	nd	nd	0.1
Erucic acid(C22:1n9)	nd	0.1	0.1	0.2
Docosadienoic acid (C22:2)	nd	nd	nd	nd
Nervonic acid (C24:1)	nd	0.1	nd	0.2
Total	5.8	19.9	16.2	30.1
Total fatty acids	8.3	25.3	20.9	40.3

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

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

**Table 2-17. 지역별 도라지와 숙성도라지의 유리아미노산 조성**

Contents (mg/100 g d.w.) <sup>1)</sup>	산청		의령	
	원료	숙성	원료	숙성
Non-essential amino acids				
Phosphoserine	nd <sup>2)</sup>	nd	nd	nd
Taurine	11.40	48.17	nd	14.51
Phosphoethanolamine	nd	nd	nd	nd
Urea	nd	nd	nd	235.81
Proline	nd	nd	nd	nd
Aspartic acid	162.22	96.03	40.28	12.39
Serine	88.52	26.17	26.80	2.38
Glutamic acid	337.43	253.36	117.72	71.08
Sarcosine	38.21	nd	16.53	nd
Aminoadipic acid	7.24	nd	2.64	nd
Glycine	14.75	13.77	8.35	3.80
Alanine	123.97	61.50	44.82	9.16
Citrulline	57.68	nd	2.99	nd
$\alpha$ -aminobutyric acid	1.69	nd	1.22	nd
Cystine	14.56	205.24	nd	19.06
Cystathionine	nd	7.03	2.21	nd
Tyrosine	29.44	29.76	11.07	1.11
$\beta$ -alanine	10.43	14.53	7.55	2.88
$\beta$ -aminoisobutyric acid	11.64	41.59	10.06	7.90
$\gamma$ -aminobutyric acid	83.19	64.69	43.03	5.33
Aminoethanol	12.41	2.48	7.42	1.26
Hydroxylysine	6.85	12.72	1.39	nd
Ornithine	65.40	4.93	4.42	0.19
1-Methylhistidine	nd	nd	nd	nd
3-Methylhistidine	nd	0.46	nd	nd
Anserine	nd	nd	nd	nd
Carnosine	nd	nd	nd	nd
Arginine	2,000.94	292.15	435.28	14.62
Totals	3,079.97	1,174.58	783.78	401.48
Essential amino acids				
Threonine	76.53	68.73	25.82	9.10
Valine	60.57	320.88	34.67	33.74
Methionine	18.95	nd	5.99	nd
Isoleucine	22.44	63.67	14.16	0.85
Leucine	23.67	12.52	17.99	0.95
Phenylalanine	22.94	17.92	14.83	2.19
Lysine	29.30	1.81	12.70	nd
Histidine	40.78	1.00	12.92	nd
Total	295.18	486.53	139.08	46.83
Total amino acids	3,375.15	1,661.11	922.86	448.31
Ammonia	52.20	10.88	12.23	3.35

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

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

### 3-1. 3차년도 연구수행 방법

#### 가. 효모발효 도라지 차의 지방산 조성 분석 : 2차년도 계속 진행

(1) 지방산 : 지방산 전처리는 각각의 시료 1 g에 0.5 N 메탄올성 NaOH 3 ml를 가하고 10 0°C 에서 10분간 가열하였다. 가열 후 삼불화붕소(BF<sub>3</sub>) 2 ml를 첨가 및 혼합하고 30분간 다시 1 00°C 에서 가열시켜 지방산 메틸레이션 과정을 수행하였다. 반응이 끝난 후에는 이소옥탄 1 ml 를 첨가하고 격렬히 흔든 후 방치시켜 분리된 상등액을 무수아황산과 함께 탈수시키고 0.45 μm 필터로 여과한 여액을 gaschromatogrphy(GC, Agilent 5890 series, Agilent Co., Forest Hill, Vic, Australia)로 분석하였다.

#### 나. 숙성·발효도라지의 영양성분 : 2차년도 계속 진행

(1) 5대 영양성분 : 5대 영양성분 분석은 식품공전법(KFDA, 2010)에 따라 시행하였다. 수분 과 회분 함량은 각각 상압가열건조법과 건열회화법으로 측정하였고 조지방과 조단백 함량은 속실탓과 마이크로켈달법으로 측정하였다. 탄수화물 함량은 100에서 상기 각 성분 합 의 뺀 값 을 %로 표시하였다.

(2) 지방산 : 상기와 동일한 방법으로 수행하였다.

(3) 유리아미노산 : 유리아미노산 분석은 Lee 등(2019)이 기술한 방법을 약간 변경하여 측정 하였다. 각각의 하수오 분말 1 g에 증류수 4 mL를 가하고 60°C 에서 1시간 가수분해 하였다. 가수분해 후 10% 5-sulfosalicylic acid 1 mL를 첨가하여 4°C 에서 2시간 방치시켜 단백질을 침전시킨 후 3분간 원심분리하여 얻은 상등액을 0.45 μm membrane filter로 1차 여과시켜 60°C 에서 감압 농축하였다. 농축 후에는 농축물에 대하여 pH 2.2 lithium buffer 2 mL씩 첨 가하여 용해시키고 0.45 μm membrane filter로 여과시킨 것을 아미노산 자동분석기로 분 석하였다.

#### 다. 활성(숙성발효)도라지 함유 에너지 음료 시제품 개발

##### (1) 활성(숙성발효)도라지 함유 에너지 음료 시제품 제조 :

(가) 활성도라지 추출물 : 활성(숙성·발효)도라지 분말 1 g (1%), 2.5 g (2.5%) 5 g (5%) 및 10 g (10%)에 정제수 100 mL을 첨가하고 100°C 에서 5 시간 동안 추출한 후 여과하여 활성도라 지 추출물을 제조하였다.

(나) 활성산양삼 추출물 : 활성산양삼 5 g에 정제수 100 mL을 첨가하고 100°C 에서 5 시간 동안 추출한 후 여과하여 활성산양삼 추출물을 제조하였다.

(다) 시제품 제조 : 산양삼과 여주 추출물을 이용하여 아래 Table 3-1과 같은 레시피 조건 대로 산양삼-여주 함유 에너지 음료를 제조하였다(Fig. 3-1).

(2) 이화학적 특성 : pH 측정은 각각의 1 ml에 증류수 50 ml를 첨가하여 분산시킨 후 pH meter(S20 SevenEasy™, Mettler Toledo, Co., Korea)로 측정하였다. 산도 측정은 시 1 ml에 증 류수 50 ml를 첨가 및 용해하고 여기에 1% phenolphthalein 시약을 2방울 첨가한 후 선홍색으 로 변할때까지 0.1 N-NaOH 용액을 소비하여 소비 ml 수를 구하여 젯산(lactic acid)양으로 총산 도를 환산하였다. 가용성 고형분(brix) 함량은 각각의 시료 1 g에 증류수 10 mL를 첨가하고 혼 합 후 당도계를 사용하여 측정하였다. 환원당 측정은 Miller의 DNS법(Miller, 1959)을 이용하여 분석하였다. 3,5-Dinitrosalicylic acid 0.5 g과 potassium sodium tartrate 150 g을 2N-NaOH 100

mL에 녹인 후, 증류수로 500 mL을 정용하여 A 용액을 제조하고 phenol 5 mL을 10% NaOH 용액에 녹인 후 증류수를 첨가해 50 mL을 정용 하였다. 이 용액 35 ml에 NaHSO<sub>3</sub> 3.5 g을 녹여 B 용액을 제조하여 A 용액과 B 용액을 혼합한 것을 사용하여 측정하였다. 각각의 분말 1 g에 증류수 10 ml를 첨가 및 혼합하여 일부(0.1 ml)를 시험관에 분주한 후 DNS 시약 1 ml 첨가 후 100℃에서 10분간 발색시켰다. 발색된 반응물은 냉각 후 분광광도계를 사용하여 570 nm에 측정하여 표준 검량곡선과 비교 산출하여 측정하였다. 표준 검량곡선은 glucose를 표준물질로 사용하였다.

**Table 3-1.** 활성도라지와 활성산양삼 추출물 혼합 에너지 음료 제조 레시피

재료	대조구	시제품 A	시제품 B	시제품 C	시제품 D
활성산양삼 추출물 (brix 3.9%)	-	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL
활성도라지 추출물 (brix 1.2%)	250 mL	250 mL	250 mL	250 mL	250 mL
오미자 엑기스 (brix 73.1%)	-	25 mL	50 mL	25 mL	50 mL
과라나추출분말 (카페인 31.4 mg/g)	-	4 g	7 g	7 g	4 g
타우린 (1000 mg/g)	-	1 g	1 g	1 g	1 g
스테비아	-	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g
비타민 복합체	-	0.25 g	0.25 g	0.25 g	0.25 g
녹차추출물 (brix 2.3%)	-	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL
정제수	250 mL	215 mL	215 mL	215 mL	215 mL



**Fig. 3-1.** 활성도라지와 활성산양삼 추출물 혼합 에너지 음료 시제품.

(3) **유리아미노산** : 유리아미노산 분석은 상기와 동일한 방법으로 수행하였다.

(4) **총 phenolics 및 총 flavonoids 함량** :

(가) **총 phenolics** : 총 phenolics 함량은 Folin-Denis법(16)을 약간 변형하여 측정하였다. 추출물 0.5 mL를 시험관에 분주하고 25% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 0.5 mL를 첨가하여 3분간 정치시켰다. 그 후 2 N Folin-Ciocalteu phenol 용액 0.25 mL 첨가 및 혼합한 다음 30℃에서 1시간 동안 발색시켰다. 발색된 시료는 750 nm에서 분광광도계(Spectronic 2D)를 사용하여 흡광도를 측정하였고, gallic acid를 이용하여 작성한 표준 검량곡선으로부터 값을 산출하였다.

(나) 총 flavonoids : 총 flavonoids 함량은 Davis변법(Davis, 1947)으로 측정하였다. 총 flavonoids 함량은 10배 희석한 추출물 0.5 mL를 시험관에 분주하고 diethylene glycol용액 1 mL, 1 N NaOH 0.01 mL를 첨가한 다음 37°C에서 1시간 동안 방치하여 발색시킨 후 분광광도계(Spectronic 2D)를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 flavonoid 함량은 rutin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구한다.

(다) 갈변물질 : 갈변물질의 함량은 비효소적 갈변도 측정 방법을 이용하였다. 그 여과액을 분광광도계(Spectronic 2D)를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 즉, 각 볶음처리 도라지 분말 1 g에 3차 증류수를 10 ml 가하여 300 rpm에서 1시간 추출하고 원심분리하여 상등액을 0.45 μm 여과 필터로 여과한 후 여과액 1 ml을 분광광도계를 이용하여 측정하였다.

**(5) Triterpenoides, Phenolic acids/flavonols 및 caffeine 함량 :**

(가) Triterpenoides 화합물 분석 : 상기 방법에서 확립 방법대로 분석을 진행하였다.

(나) Phenolic acids 및 flavonols 화합물 분석 : Phenolic acid와 flavonol 물질 분석은 Cho 등(2011)의 분석법을 변형하여 High Press Liquid Chromatogram(HPLC, Agilent 1200 series, Agilent Co., Forest Hill, Vic, Australia)로 분석하였다. 이동상 용매는 2.0% glacial acetic acid in water(solution A) 와 2.0% glacial acetic acid in acetonitrile(solution B)로 분석하였고, 이동상 조건은 solvent B 기준으로 각각 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 55 및 60 min 동안 15%, 5%, 15%, 5%, 10%, 50%, 50%, 60%, 80% 및 90%로 유지시켰다. 시료는 20 μL를 주입하였고 이동상의 속도는 30°C에서 1 mL/min로 유지하였고 phenolic acids 물질은 diode array UV detector(Agilent 1200 series, Agilent Co.)의 흡광도 280 nm에서 정량하였고, flavonols 물질은 흡광도 270nm에서 분석하였다.

(다) Caffeine 분석 : 본 연구에서 사용된 각각의 여주 추출물과 이 추출물을 이용하여 제조한 각각의 산양삼-활성도라지 추출물 혼합 에너지 음료의 카페인 함량 분석은 HPLC를 사용하여 분석하였다. 각 제품을 HPLC용 water로 2배 희석한 후 0.45 μm 여과필터로 여과하여 분석시료를 준비하였다. 사용한 컬럼은 TSKgel ODS-100z C18 (4.6×250 mm, 5 μm, Merck, Germany) 컬럼을 사용하였고 이동상 용매는 2.0% glacial acetic acid in water (solution A)와 acetonitrile (solution B)로 분석하였다. 이동상 조건은 아래 표 3과 같으며, 시료는 10 μL를 주입하였고 이동상 속도는 30°C에서 1 mL/min으로 설정하였다. 검출기는 diode array detector (DAD)를 사용하여 270 nm 에서 검출하였다. 각 실험은 3회 반복하여 평균값으로 나타내었다. 카페인 표준물질에 검량곡선을 결과  $y = 62311x - 40.927$ ,  $R^2 = 0.9999$  있었고, caffeine 표준물질의 화학구조식과 HPLC 크로마토그램 패턴은 Fig. 3-2와 같았다.

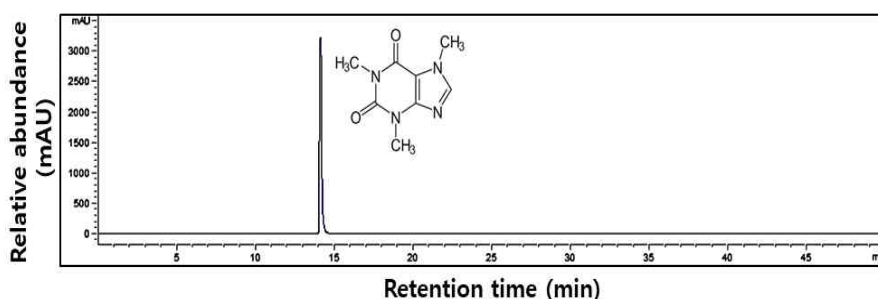


Fig. 3-2. Caffeine 표준 화합물의 HPLC 크로마토그램 패턴.

## (6) 항산화 활성

(가) DPPH radical : DPPH 시약 0.8 ml와 각각의 도라지 추출물 0.2 ml를 가해 암실에서 30분간 방치 후 분광광도계를 사용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(나) ABTS radical : 2.45 mM  $K_2S_2O_8$  5 mL과 7 mM  $ABTS^{•+}$  5 mL를 혼합한 후 암실에서 16시간가량 방치시켜  $ABTS^{•+}$  양이온 라디칼을 형성시킨 후 732 nm에서 대조구의 흡광도 값이  $0.7 \pm 0.02$ 가 되도록 조절한  $ABTS^{•+}$  용액 0.9 ml와 추출물 0.1 ml를 첨가하여 3분간 정치 시켜 732 nm에서 분광광도계를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

(다) Hydroxyl( $\bullet OH$ ) : 10 mM  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ -EDTA 0.2 mL, 10 mM 2-deoxyribose 0.2 mL, 10 mM  $H_2O_2$  0.2 mL 및 농도별 추출물 1.4 mL를 혼합하고 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 이 혼합액에 1% thiobarbituric acid와 2.8% trichloroacetic acid를 각각 1 mL를 가하여 100°C에서 20분간 가열하여 발색 및 냉각시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조구 실험은 시료 대신에 PBS 완충액(NaCl 8.76 g,  $NaH_2PO_4$  0.11 g,  $Na_2HPO_4$  0.596 g)을 사용하였고 라디칼 소거능은 시료용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도의 차이를 백분율(%)로 나타내었다(Shin 등, 2012).

(라) Ferruic Reducing/Antioxidant Power (FRAP) assay : FRAP 환원력 측정은 먼저 acetate buffer(30 mM, pH 3.6), TPTZ 시약(10 mM, in 40 mM HCl), 및  $FeCl_3$  용액(20 mM in DW)을 일련의 방법에 따라 제조 후 10:1:1(v/v/v)의 비율로 혼합한 시약 0.95 ml에 시료 0.05 ml를 첨가하고 37°C의 수욕상에서 15분간 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도 값을 측정하여 나타내었다.

## (8) 소화효소 저해활성

(가)  $\alpha$ -Glucosidase : 각 농도별 추출물 50  $\mu$ l,  $\alpha$ -glucosidase(0.5 U/ml) 효소용액 50  $\mu$ l, 200 mM 인산나트륨 완충용액(pH 6.8) 50  $\mu$ l를 혼합하여 37°C에서 10분간 예비반응 시켰다. 이후 인산나트륨 완충용액(pH 6.8)에 녹인 *p*-NPG(5 mM) 100  $\mu$ l를 가하여 다시 37°C에서 10분 반응시켰다. 이 반응액에  $Na_2CO_3$ (100 mM) 0.75 ml를 가해 최종 반응을 정지시킨 후 420 nm에서 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

(나) Pancreatic lipase : Kwon 등(21)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 추출물 50  $\mu$ l, lipase(1.0 U/ml) 효소용액 50  $\mu$ l, 및 200 mM 인산나트륨 완충용액(pH 6.8) 50  $\mu$ l를 혼합하여 37°C에서 10분간 예비 반응시켰다. 반응 후 인산나트륨 완충용액에 녹인 *p*-NPB(5 mM) 100  $\mu$ l를 가하여 동일하게 10분간 반응시킨 후 100 mM  $Na_2CO_3$  0.75 ml를 가해 반응을 종결시켜 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 효소 저해능의 음성대조구는 시료 대신에 추출 용매를 취하였으며 시료용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

## 라. 경남 한방항노화 전략약초 적하수오에 활성도라지 제조기술 적용

### (1) 재료, 미생물 배지, 시약 및 기기 :

(가) 재료 : 하수오는 산청군에서 재배된 3년 근 이상 재배된 것을 수확한 후 흐르는 물에 3회 세척하고 채반에 옮겨 담은 후 1 시간 정도 물기를 완전히 제거하였다. 물기가 제거된 하수오를 1 cm 정도 크기의 정사면체로 절단하여 이 후 실험에 사용하였다.

(나) 미생물 배지 및 시약 : 본 연구에서 사용된 미생물은 생균제제 활성이 우수한 유산균 *Lactobacillus plantarum* P1201 및 *Lactobacillus brevis* BMK184를 하수오 발효에 사용하였다. 유산균 배양은 MRS 액체 또는 고체 배지(Difco, Becton Dickson Co., Sparks, MD, USA)를 사용하



였다. 하수오 지표물질인 2,3,4,5'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\alpha$ -glucoside, rhein, emodin, chrysophenol 그리고 catechin 또한 Sigma-Aldrich에서 구입하여 사용하였다.

(2) 숙성 및 발효 하수오의 제조 : 식품 가공 공정에 따른 숙성과 발효 하수오 제조는 우선 절단 상태의 하수오를 증자기에 적당량 담은 후 100°C에서 1시간가량 쪄서 증숙 하수오를 제조하였다. 제조된 증숙 하수오는 55°C로 설정되어진 열풍 건조기로 약 2일간 건조하여 건조 하수오(*Polygoni multiflora Radix*; PMR)를 제조하였다. 숙성 홍하수오(red *Polygoni multiflora Radix*; RPMR)는 증숙 상태의 하수오를 스테인레스 통에 옮겨 담고 65°C에서 3일간 개방 숙성시키고 이를 55°C에서 2일간 건조하는 과정을 3회 반복하여 숙성 하수오를 제조하였다. 흑하수오(black *Polygoni multiflora Radix*; BPMR)는 상기 기술된바와 동일하게 증숙 하수오를 적당량 스테인레스 통에 담은 후 65°C에서 9일간 밀폐 숙성시키고 55°C에서 건조하여 제조하였다. 한편 발효 하수오는 우선 연구실에서 보관 중이던 *L. plantarum* P1201과 *L. brevis* BMK184 균주를 적당량의 MRS 액체배지에 접종시켜 35°C에서 2일간 배양하여 발효를 위한 종균으로 준비하였다. 가공 공정에 따라 제조된 각각의 하수오에 미리 배양해둔 균주 P1201과 BMK184 유산균 배양액을 각각 2.5%(w/v) 접종하고 35°C에서 5일간 반고체 발효시켜 최종적으로 발효 하수오(fermented *Polygoni multiflora Radix*; FPMR), 발효 홍하수오(fermented red *Polygoni multiflora Radix*; FRPMR) 및 발효 흑하수오(fermented black *Polygoni multiflora Radix*; FBPMR)를 제조하였다. 한편 하수오의 식품 가공 공정에 따른 제조는 Fig. 3-3에 나타내었으며 각각의 하수오는 55°C에서 2에서 3일간 건조시킨 후 분쇄기로 분쇄시켜 분말로 제조하여 -80°C에서 보관하며 필요에 따라 꺼내어 사용하였다.

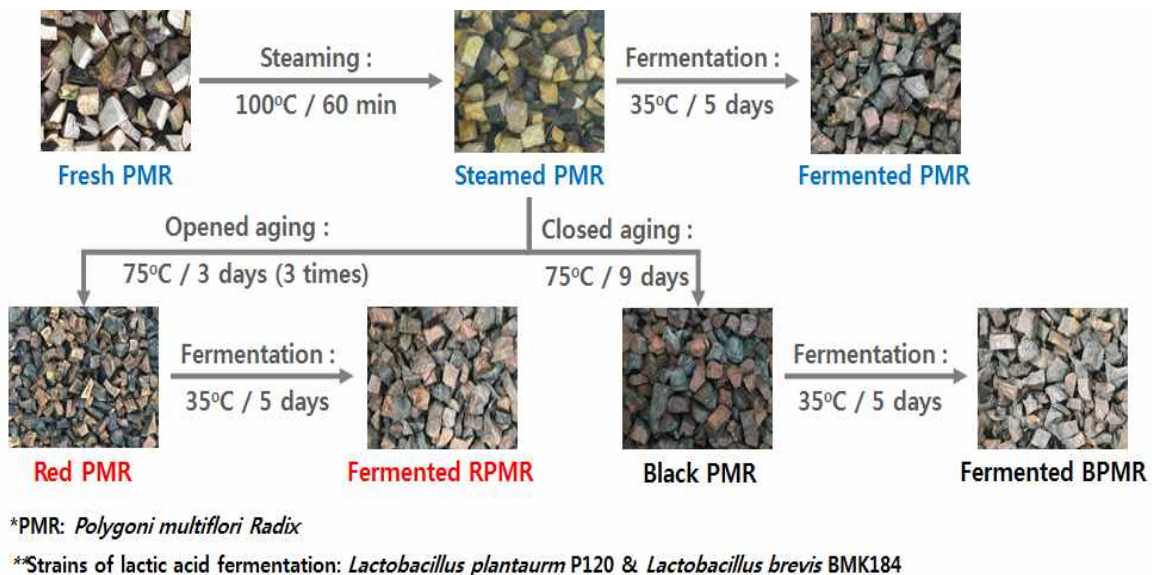


Fig. 3-3. 숙성 및 발효 하수오의 제조.

(2) 이화학적 특성 : pH, 산도 및 환원당은 상기에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

(3) 지방산, 유리아미노산 및 무기질 :

(가) 지방산과 유리아미노산 : 상기에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

(나) 무기질 : 무기질 분석은 식품공전법과 Joo 등(2018)의 방법에 준하여 측정하였다. 시험

관에 각각의 하수오 분말 0.5 g을 정확히 첨가하고 여기에 70% 질산 용액 10 mL를 첨가하여 microwave로 분해하였다. 분해 후 증류수를 첨가하여 최종 부피가 50 mL가 되게끔 정용하여 inductively coupled plasma (ICP)로 분석하고 mg/kg으로 표시하였다.

(4) **추출물 제조** : 각각의 하수오 분말 5 g에 80% 발효주정 50 mL를 첨가하여 상온에서 12 시간 추출하고 0.45  $\mu$ m membrane filter로 여과하여 상등액을 회수하여 추출물을 제조하였으며 이를 바탕으로 총 페놀릭스 및 총 플라보노이드스 함량을 측정하였다. 한편 제조한 각각의 하수오 추출물들은 60°C에서 감압농축하고 동결건조하여 건조물을 얻은 후 추출용매(80% 발효주정)에 용해시켜 0.25, 0.5, 0.75 및 1.0 mg/mL 농도로 제조하여 항산화 활성을 측정하였다.

(5) **총 phenolics, flavonoids 및 갈변물질 함량** : 상기에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

(6) **생리활성물질 분석 함량** : 생리활성물질인 2,3,4,5'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\alpha$ -glucoside, rhein, emodin, chrysophenol 및 catechin 분석은 Kim 등(2015)의 방법에 따라 HPLC로 분석하였다. 이동상 용매는 0.5% glacial acetic acid in water (A) 와 0.5% glacial acetic acid in acetonitrile (B)로 분석하였고, 이동상 조건은 B 용매 기준으로 0분-0%, 3분-3%, 5분-5%, 8분-10%, 10분-15%, 13분-15%, 14분-3%, 15분-5%, 17분-8%, 19분-10%, 20분-15%, 22분-20%, 24분-20%, 25분-5%, 26분-15%, 27분-20%, 28분-30%, 30분-10%, 32분-40%, 35분-50%, 36분-60%, 37분-30%, 38분 40%, 40분-50%, 45분-60%, 55분-80%, 60분-90%, 60분-90% 및 65분-100%로 유지하였다. 이때 분석 컬럼은 XTerra™ RP C18(4.6×250 mm, 5  $\mu$ m, Waters Crop., Milford, MA, USA)을 사용하여 시료를 20  $\mu$ L 주입하였고 이동상의 속도는 30°C에서 분당 1 mL를 유지하여 DAD 검출기의 280 nm에서 정량하였다. 한편 하수오의 표준물질의 화학구조와 크로마토그램은 Fig. 3-4와 같았다.

(7) **항산화 활성 측정**: 상기에 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

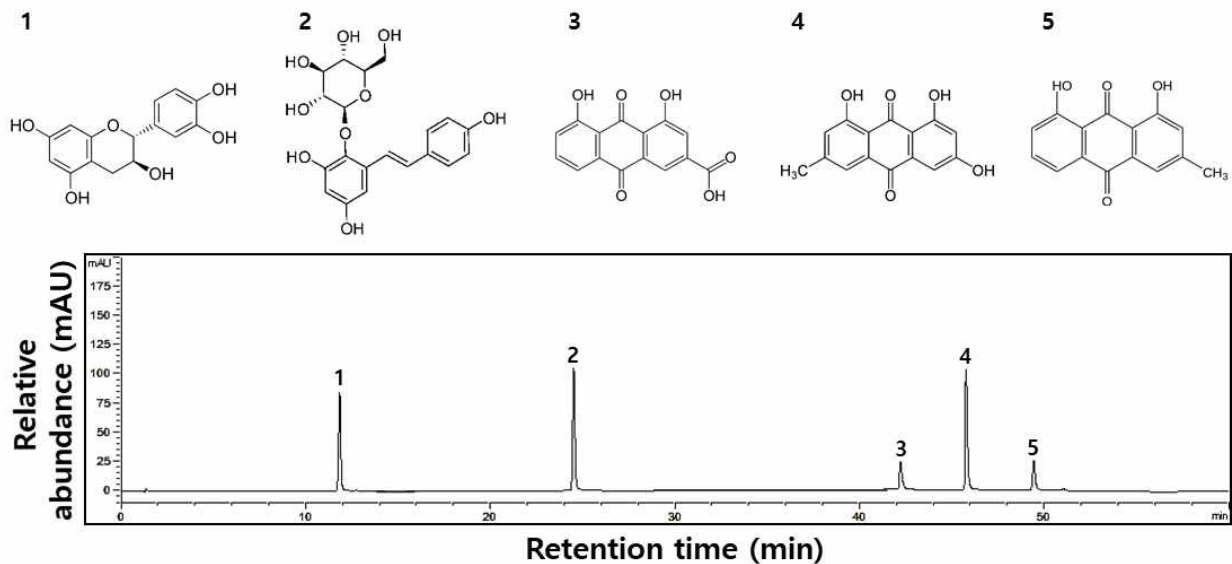


Fig. 3-4. 생리활성물질 화학구조와 HPLC 크로마토그램. Catechin (1) 2,3,4,5'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\alpha$ -glucoside (2), Rhein (3), Emodin (4) 및 Chrysophenol (5).

### 3-2. 3차년도 연구결과

(1) 지방산 조성 : 효모발효를 이용한 도라지 차의 지방산 함량 비교는 Table 3-2와 같았다. 도라지 원료의 포화 지방산 중 palmitic acid는 166.5 mg/100 g, stearic acid는 47.7 mg/100 g 및 behenic acid는 8.3 mg/100 g의 함량을 나타내었다. 불포화 지방산 중 oleic acid는 122.0 mg/100 g, linoleic acid는 280.2 mg/100 g 및 eicosenic acid는 5.3 mg/100 g의 함량을 나타내었다. Y4의 균주로 발효 한 도라지의 포화 지방산 중 stearic acid는 70.3 mg/100 g으로 다른 균주로 발효 한 도라지 중 가장 높게 나타났으며 또한, 총 포화 지방산 함량 역시 342.1 mg/100 g으로 가장 높은 함량을 나타내었다. 불포화 지방산의 linoleic acid는 400.4 mg/100 g으로 발효 한 도라지 중 가장 높게 나타났으며 총 불포화 지방산 역시 596.6 mg/100 g으로 가장 높은 함량을 나타내었다. Y10의 균주로 발효 한 도라지의 포화 지방산의 arachidic acid는 5.9 mg/100 g의 함량을 보였으며 lignoceric acid는 9.3 mg/100 g의 함량을 보였다. 불포화 지방산의 palmitoleic acid는 20.5 mg/100 g으로 가장 높은 함량을 보였으며 eicosenic acid는 검출되지 않았다. Y27의 총 포화 지방산의 함량은 290.3 mg/100 g으로 나타났으며 총 불포화 지방산은 433.1 mg/100 g의 함량을 나타내었다. Y28의 포화 지방산 중 behenic acid는 11.3 mg/100 g의 함량을 나타냈으며 불포화 지방산 중 palmitoleic acid와 erucic acid는 검출되지 않았다. Y78의 경우 palmitic acid는 170.5 mg/100 g 및 총 포화 지방산은 247.5 mg/100 g의 함량을 보였으며 총 불포화 지방산은 337.9 mg/100 g의 함량을 보였다. 반면 불포화 지방산 중 lauric acid, myristic acid, eicosenic acid 및 crucic acids는 검출되어지지 않았다. Y81은 포화 지방산 중 stearic acid는 56.2 mg/100 g 및 lignoceric acid는 7.6 mg/100 g의 함량을 보였다. 불포화 지방산 중 oleic acid는 47.3 mg/100 g 및  $\alpha$ -linolenic acid는 29.1 mg/100 g의 함량을 보였다. Y4+Y27로 혼합 발효한 도라지의 palmitic acid, arachidic acid 및 behenic acid는 각각 178.7, 4.9 및 9.4 mg/100 g의 함량을 나타내었으며 lauric acid, palmitoleic acid 및 eicosadienoic acid는 각각 5.6, 5.1 및 3.3 mg/100 g의 함량을 나타내었다. Y10+Y27의 경우 stearic acid는 66.2 mg/100 g, 총 포화 지방산은 278.8 mg/100 g으로 나타났다. Nervonic acid는 2.9 mg/100 g로 발효 도라지 중 유일하게 검출되었다. Y28+Y27의 경우 lignoceric acid는 8.8 mg/100 g로 나타났으며 총 포화 지방산은 249.5 mg/100 g으로 나타났다. 불포화 지방산 중 linoleic acid는 314.8 mg/100 g의 함량을 나타냈으며 총 불포화 지방산의 함량은 391.2 mg/100 g으로 나타났다. Y78+Y27의 포화 지방산 중 palmitic acid는 160.6 mg/100 g의 함량을 보였으며 불포화 지방산 중 eicosenic acid 및 nervonic acid는 검출되지 않았다. Y81+Y27의 경우 포화 지방산의 stearic acid는 48.3 mg/100 g으로 나타났으며 불포화 지방산의 oleic acid는 32.1 mg/100 g의 함량을 나타내었다.

**Table 3-2. 효모발효 도라지 차의 지방산 함량**

Contents (mg/100 g d.w.) <sup>1)</sup>	Strains											
	NIM	Y4	Y10	Y27	Y28	Y78	Y81	Y4+Y27	Y10+Y27	Y28+Y27	Y78+Y27	Y81+Y27
<b>Saturated fatty acids</b>												
Palmitic acid (C16:0)	166.5	244.0	180.9	200.3	184.7	170.5	187.8	178.7	189.6	174.4	160.6	158.5
Stearic acid (C18:0)	47.7	70.3	47.3	59.7	60.7	54.1	56.2	61.0	63.2	48.4	45.0	48.3
Arachidic acid (C20:0)	9.1	6.1	5.9	6.2	5.5	5.1	5.2	4.9	5.9	5.8	5.0	4.9
Behenic acid (C22:0)	8.3	12.4	12.9	14.4	11.3	10.4	10.5	9.4	11.9	12.1	10.5	9.9
Lignoceric acid (C24:0)	6.0	9.3	9.3	9.7	8.2	7.4	7.6	6.5	8.2	8.8	6.9	6.8
Total	237.6	342.1	256.3	290.3	270.4	247.5	267.3	260.5	278.8	249.5	228.0	228.4
<b>Unsaturated fatty acids</b>												
Lauric acid (C12:0)	nd <sup>2)</sup>	4.1	5.7	6.1	nd	nd	nd	5.6	6.9	6.8	3.7	3.4
Myristic acid (C14:0)	6.7	7.1	7.7	7.7	4.6	nd	6.1	9.8	7.0	7.4	5.7	4.6
Palmitoleic acid (C16:1)	nd	9.4	20.5	4.7	nd	5.3	6.7	5.1	10.4	nd	4.8	4.1
Oleic acid (C18:1n9c)	122.0	136.7	72.4	41.0	28.1	41.7	47.3	59.2	40.5	31.0	44.7	32.1
Linoleic acid (C18:2n6c)	280.2	400.4	310.1	339.9	295.2	266.8	290.9	245.3	296.7	314.8	284.2	258.0
$\alpha$ -Linolenic acid (C18:3n3)	64.7	28.8	21.6	24.0	21.3	24.1	29.1	18.8	23.6	22.4	22.3	22.6
Eicosenic acid (C20:1)	5.3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Eicosadienoic acid (C20:2)	nd	4.8	4.2	4.5	nd	nd	nd	3.3	4.1	4.4	3.8	3.6
Erucic acid (C22:1n9)	7.0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Docosahexaenoic acid (C22:6n3)	nd	5.3	4.6	5.2	nd	nd	nd	nd	3.7	4.4	nd	nd
Nervonic acid (C24:1)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2.9	nd	nd	nd
Total	485.9	596.6	446.8	433.1	349.2	337.9	380.1	347.1	395.8	391.2	369.2	328.4
<b>Total fatty acids</b>	<b>723.5</b>	<b>938.7</b>	<b>703.1</b>	<b>723.4</b>	<b>619.6</b>	<b>585.4</b>	<b>647.4</b>	<b>607.6</b>	<b>674.6</b>	<b>640.7</b>	<b>597.2</b>	<b>556.8</b>

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

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

### 나. 숙성·발효도라지의 영양성분

(1) 5대 영양성분 : 숙성·발효도라지의 5대 영양성분은 Table 3-3과 같았다. 건도라지의 수분의 함량은 1.9 g/100 g으로 나타났으며 탄수화물, 지방 및 단백질은 각각 78.3, 3.9 및 11.1 g/100 g으로 나타났다. 홍도라지와 흑도라지의 수분은 각각 1.4 g/100 g 및 4.7 g/100 g으로 나타났으며 회분의 경우 각각 4.4 g/100 g 및 4.5 g/100 g으로 나타났다. 발효홍도라지 및 발효흑도라지의 탄수화물 함량은 76.5 g/100 g 및 78.3 g/100 g을 보였으며 지방의 경우 각각 4.5 g/100 g 및 1.3 g/100 g의 함량을 보였다. 단백질의 함량은 11.4 g/100 g 및 11.2 g/100 g으로 큰 차이를 보이지 않았다.

Table 3-3. 숙성·발효도라지의 5대 영양성분

Samples	Contents (g/100 g) <sup>1)</sup>				
	Moisture	Ash	Protein	Fat	Carbohydrate
건도라지	1.9	4.8	11.1	3.9	78.3
홍도라지	1.4	4.4	11.0	5.7	77.5
흑도라지	4.7	4.5	9.4	1.8	79.6
발효홍도라지	2.8	4.8	11.4	4.5	76.5
발효흑도라지	4.3	4.9	11.2	1.3	78.3

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

(2) 지방산 조성 : 숙성·발효도라지의 지방산 조성 비교는 Table 3-4와 같았다. 건도라지의 포화 지방산 중 palmitic acid 및 stearic acid는 각각 25.48 mg/100 g 및 3.56 mg/100 g의 함량을 보였으며 불포화 지방산 중 oleic acid 및 linoleic acid는 각각 4.41 mg/100 g 및 42.37 mg/100 g의 함량을 보였다. 홍도라지의 포화 지방산 중 palmitic acid는 14.42 mg/100 g 그리고 stearic acid는 1.81 mg/100 g으로 나타났으며 불포화 지방산 중 eicosenic acid는 0.72 mg/100 g 그리고 erucic acid는 1.90 mg/100 g으로 나타났다. 흑도라지의 palmitic acid는 17.77 mg/100 g으로 나타났으며 linoleic acid는 26.62 mg/100 g으로 나타났다. 발효홍도라지의 포화 지방산 중 stearic acid는 1.64 mg/100 g의 함량을 나타냈으며 총 포화 지방산 함량은 10.04 mg/100 g으로 나타났다. 불포화 지방산 중  $\gamma$ -linolenic acid는 1.91 mg/100 g으로 나타났으며 총 불포화 지방산의 함량은 25.19 mg/100 g으로 나타났다. 발효흑도라지의 stearic acid는 2.07 mg/100 g으로 나타났으며  $\gamma$ -linolenic acid는 21.27 mg/100 g으로 나타났다. 건도라지, 홍도라지, 흑도라지, 발효홍도라지 및 발효흑도라지의 포화 지방산 중 arachidic acid, behenic acid 및 lignoceric acid 모두 검출되지 않았다.

**Table 3-4.** 숙성·발효도라지의 지방산 조성

Contents <sup>1)</sup> (mg/100 g)	Sample				
	건도라지	홍도라지	흑도라지	발효홍도라지	발효흑도라지
<b>Saturated fatty acids</b>					
Palmitic acid (C16:0)	25.48	14.42	17.77	8.40	14.10
Stearic acid (C18:0)	3.56	1.81	4.40	1.64	2.07
Arachidic acid (C20:0)	nd <sup>2)</sup>	nd	nd	nd	nd
Behenic acid (C22:0)	nd	nd	nd	nd	nd
Lignoceric acid (C24:0)	nd	nd	nd	nd	nd
Total	29.04	16.23	22.17	10.04	16.17
<b>Unsaturated fatty acids</b>					
Myristic acid (C14:0)	0.58	nd	0.50	nd	nd
Oleic acid (C18:1n9c)	4.41	2.56	9.58	2.95	2.41
Linoleic acid (C18:2n6c)	42.37	31.39	26.62	17.41	21.27
$\gamma$ -Linolenic acid (C18:3n3)	3.39	3.42	2.22	1.91	1.73
Eicosenic acid (C20:1)	nd	0.72	1.04	nd	nd
Eicosatrienoic acid (C20:3n3)	1.28	0.90	1.28	0.44	1.03
Erucic acid (C22:1n9)	2.78	1.90	2.39	1.01	1.68
Nervonic acid (C24:1)	nd	0.25	9.22	1.47	2.98
Total	54.81	41.14	52.85	25.19	31.1
<b>Total fatty acids</b>	<b>83.85</b>	<b>57.37</b>	<b>75.02</b>	<b>35.23</b>	<b>47.27</b>

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

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

**(3) 유리아미노산 조성** : 숙성·발효도라지의 유리아미노산 조성 비교는 **Table 3-5**와 같았다. 건도라지의 비 필수아미노산 중 aspartic acid는 104.16 mg/100 g을 함유하고 있었으며 alanine은 75.66 mg/100 g을 함유하고 있었다. Taurine과 3-methylhistidine은 검출되지 않았다. 필수아미노산은 valine의 경우 27.55 mg/100 g 및 phenylalanine은 9.37 mg/100 g을 함유하고 있었다. 홍도라지의 비 필수아미노산의 경우 taurine은 23.99 mg/100 g, proline은 2.89 mg/100 g 그리고 glutamic acid는 101.66 mg/100 g으로 나타났다. 필수아미노산의 경우 isoleucine은 11.71 mg/100 g, lysine은 1.67 mg/100 g 그리고 histidine은 3.57 mg/100 g으로 나타났다. 흑도라지의 aspartic acid는 32.28 mg/100 g, glutamic acid는 86.02 mg/100 g 그리고 alanine은 18.63 mg/100 g으로 나타났으며 citrulline은 검출되지 않았다. leucine은 11.01 mg/100 g, lysine은 0.27 mg/100 g으로 나타났으며 threonine과 methionine은 검출되지 않았다. 발효홍도라지의 비 필수아미노산 중 taurine은 30.25 mg/100 g을 함유하고 있었으며  $\gamma$ -amiobutyric acid의 경우 44.50 mg/100 g을 함유하고 있었다. 또한 필수아미노산 중 valine은 21.15 mg/100 g을 함유하고 있었으며 lysine은 1.55 mg/100 g 그리고 histidine은 1.47 mg/100 g을 함유하고 있었다. 반면, phosphoserine, hydroxyproline 및 methionine은 함유하고 있지 않았다. 발효흑도라지의 비 필수아미노산 중 proline은 3.11 mg/100 g, aspartic acid는 39.15 mg/100 g 및 glutamic acid는 92.23 mg/100 g의 함

량을 나타내었다. 필수아미노산 중 valine은 65.51 및 phenylalanine은 13.36 mg/100 g의 함량을 나타내었다.

**Table 3-5.** 숙성·발효도라지의 유리아미노산 조성

Contents <sup>1)</sup> (mg/100 g)	Sample				
	건도라지	홍도라지	흑도라지	발효홍도라지	발효흑도라지
<b>Non-essential amino acids</b>					
Phosphoserine	45.33	nd	nd	nd	nd
Taurine	nd	23.99	40.31	30.25	nd
Proline	43.90	2.89	2.55	2.91	3.11
Hydroxyproline	13.02	nd	nd	nd	nd
Aspartic acid	104.16	nd	32.28	20.88	39.15
Serine	45.54	9.12	10.03	4.54	12.98
Aspartic acid - NH <sub>2</sub>	77.51	12.31	nd	2.39	nd
Glutamic acid	347.45	101.66	86.02	85.22	92.23
Sarcosine	11.53	14.33	18.40	12.20	18.78
Aminoadipic acid	1.54	0.55	nd	0.48	nd
Glycine	8.10	2.04	6.68	3.20	7.17
Alanine	75.66	14.52	18.63	13.85	18.72
Citrulline	3.92	nd	nd	1.08	nd
$\alpha$ -aminobutyric acid	3.78	32.11	116.09	37.80	129.26
Cystine	7.62	7.13	nd	7.40	nd
Tyrosine	9.57	2.21	nd	1.72	9.34
$\beta$ -alanine	8.94	7.89	2.67	11.24	9.68
$\beta$ -aminoisobutyric acid	7.73	9.63	5.44	20.46	25.83
$\gamma$ -aminobutyric acid	58.02	61.85	28.49	44.50	30.40
Aminoethanol	13.55	3.38	0.93	1.44	1.34
Hydroxylysine	1.31	1.24	1.15	1.18	1.16
Ornithine	2.46	2.15	1.05	0.67	0.88
3-Methylhistidine	nd	1.15	nd	0.98	nd
Arginine	1134.66	306.14	81.19	143.91	66.08
Total	2,025.3	616.29	451.91	448.3	466.11
<b>Essential amino acids</b>					
Threonine	42.59	8.56	nd	6.72	nd
Valine	27.55	14.29	54.96	21.15	65.51
Methionine	7.18	nd	nd	nd	nd
Isoleucine	8.79	11.71	25.16	10.82	37.34
Leucine	12.36	nd	11.01	3.52	5.83
Phenylalanine	9.37	4.21	3.46	5.75	13.36
Lysine	14.51	1.67	0.27	1.55	1.42
Histidine	24.63	3.57	0.46	1.47	0.74
Total	146.98	44.01	95.32	50.98	124.2
<b>Total amino acids</b>	<b>2172.28</b>	<b>660.30</b>	<b>547.23</b>	<b>499.28</b>	<b>590.31</b>
Ammonia	46.37	6.30	10.86	6.43	8.89

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

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

## 다. 활성(숙성발효)도라지 함유 에너지 음료 시제품 개발

### (1) 활성도라지 열수추출 조건 확립 :

(가) 이화학적 특성 : 활성도라지 추출 조건 확립을 위해 활성도라지 첨가량은 1%, 2.5%, 5%, 최대 10%로 첨가량을 설정하여 이들 추출물에 대한 이화학적 특성을 측정된 결과는 Table 3-6과 같았다. pH 수치는 활성도라지 첨가량이 증가할수록 점차 낮아지는 경향을 나타내었고 산도는 pH 수치 변화에 비례적으로 점차 증가하여 활성도라지를 10% 첨가한 추출물에서 0.4%로 가장 높았다. 가용성 고형분은 활성도라지 첨가량이 증가할수록 함량 또한 증가하는 경향이었고 활성도라지 10% 첨가 시 4.8 Brix로 가장 높았다.

Table 3-6. 활성도라지 추출물의 이화학적 특성

활성도라지 첨가량 (% w/v)	분석항목 <sup>1)</sup>		
	pH	산도 (% , 젖산)	가용성 고형분 (Brix, %)
1	5.01±0.25	0.12±0.01	0.90±0.05
2.5	4.93±0.25	0.14±0.01	1.60±0.08
5	4.84±0.24	0.24±0.01	2.80±0.14
10	4.73±0.24	0.40±0.02	4.80±0.24

<sup>1)</sup>모든 실험은 삼 반복 수행하여 평균값으로 나타내었음.

(나) 갈변도, 수용성 phenolics 및 수용성 flavonoids 함량 : 활성도라지 첨가별 추출물의 갈변도는 1% 첨가 시 0.30, 2.5% 첨가 시 0.73, 5% 첨가 시 1.25, 10% 첨가 시 2.50으로 첨가량에 따라 갈변도는 증가하였다. 수용성 페놀릭스 함량은 활성도라지 첨가량에 따른 변화는 크게 없었다. 수용성 페놀릭스 함량은 활성도라지 첨가량에 비례적으로 점차적으로 증가하여 10% 첨가 시 4.88 mg/mL의 함유량을 나타내었다(Fig. 3-5).

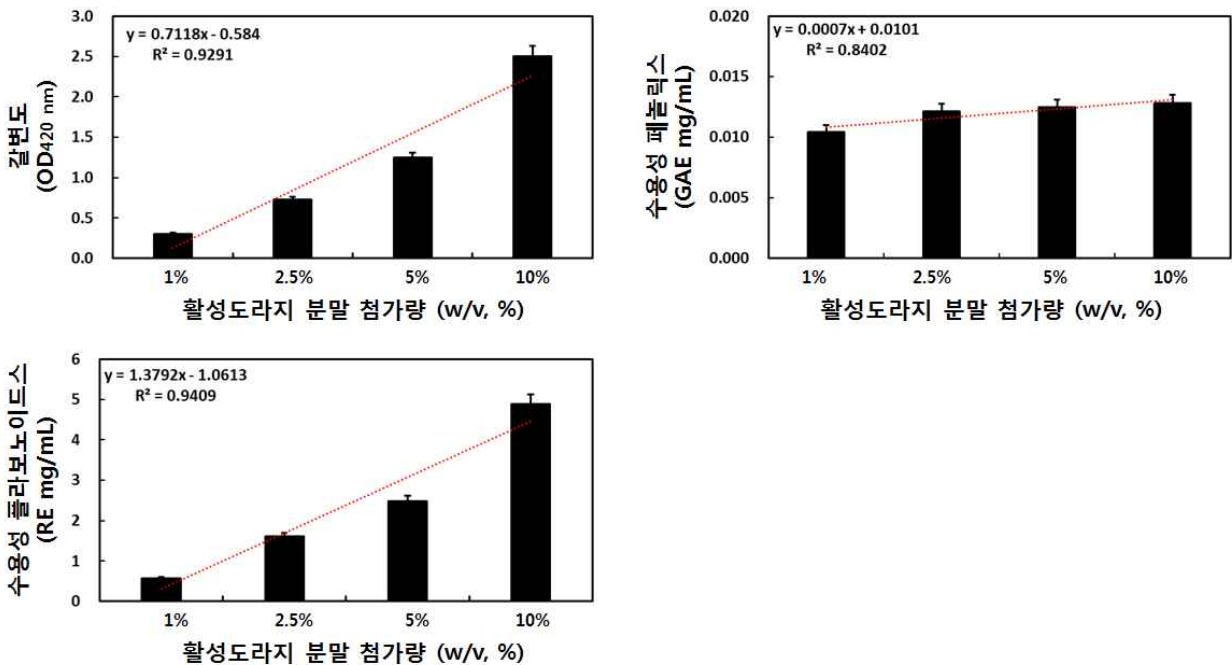


Fig. 3-5. 활성도라지 추출물의 갈변도, 수용 페놀릭스 및 수용성 플라보노이드스 함량.



(다) 항산화 활성 : 활성도라지 첨가량에 따른 항산화 활성 중 DPPH 라디칼 소거활성을 측정한 결과 여주 첨가량이 1%일 때 11%로 아주 낮은 활성을 나타내었으나 첨가량이 증가할수록 점차 증가하였으며 활성도라지를 10% 첨가하였을 시 80%로 우수한 DPPH 라디칼 소거활성을 나타내었다. ABTS 라디칼 소거활성 역시 DPPH와 마찬가지로 여주 첨가량에 비례하여 점차 증가하였고 1% 첨가 시 35%였으나 10% 첨가 시 99%의 아주 우수한 ABTS 라디칼 소거활성을 나타내었다. Hydroxyl 라디칼 소거활성과 FRAP 환원력 역시 여주 첨가량이 증가할수록 점차 그 활성 또한 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 3-6).

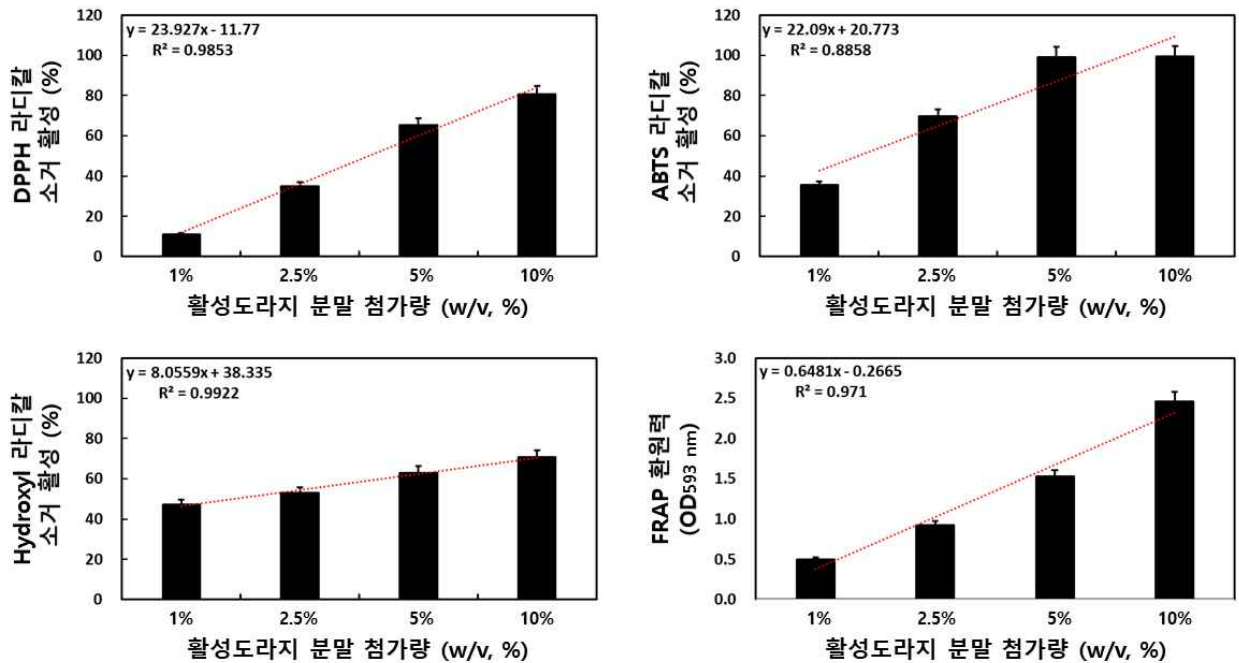


Fig. 3-6. 활성도라지 추출물의 항산화 활성 비교.

A; DPPH, B; ABTS, C; Hydroxyl radical scavenging activity 및 D; FRAP 환원력.

(라) 소화효소 저해활성 : 탄수화물 분해효소인 알파-글루코시다아제와 지방 분해효소인 췌장-리파아제 저해활성을 측정한 결과 여주 첨가량이 1%와 2.5%일 때에는 큰 효과가 없었으나 5% 이상 첨가 시에는 효소 저해활성이 있는 것으로 나타났다(Fig. 3-7).

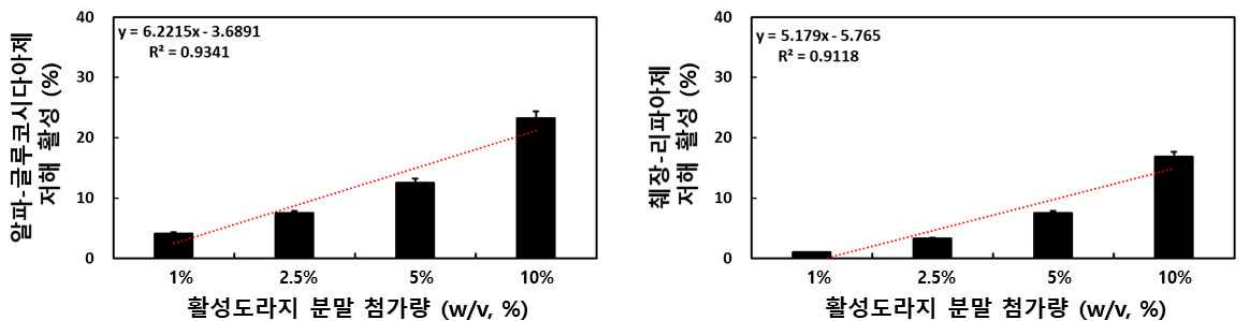


Fig. 3-7. 활성도라지 추출물의 소화효소 저해활성 비교.

A; α-glucosidase 및 B; pancreatic lipase.

**(2) 활성산양삼-활성도라지 추출물 혼합 에너지 드링크의 특성**

(가) 이화학적 특성 : 활성산양삼과 활성도라지 추출물을 사용하여 제조된 활성산양삼-활성도라지 추출물 혼합 에너지 드링크의 이화학적 특성은 Table 3-7에 나타내었다. 본 연구에 사용된 대조구의 pH는 5.12이었고 시제품 A부터 D의 pH는 3.70에서 3.81 수준으로 대조구보다는 산성 영역에 가까웠다. 산도는 시제품 D가 0.62%로 가장 높은 산미를 나타내었다. 가용성 고형분 함량은 시제품 B가 8.7 Brix로 가장 많았고 환원당 함량 역시 시제품 B가 56.23 mg/mL로 가장 많았다.

**Table 3-7. 활성도라지 추출물 혼합 에너지 음료의 이화학적 특성**

시 제 품	분석항목 <sup>1)</sup>			
	pH	산도 (% , 젖산)	가용성 (Brix, %)	고형분 환원당 (mg/mL)
대조구	5.12±0.26	0.10±0.01	0.30±0.02	0.32±0.02
시제품 A	3.72±0.19	0.34±0.02	5.0±0.25	26.69±1.33
시제품 B	3.73±0.19	0.54±0.03	8.70±0.44	56.23±2.81
시제품 C	3.81±0.19	0.36±0.02	5.70±0.29	34.38±1.72
시제품 D	3.70±0.19	0.62±0.03	8.30±0.42	54.33±2.72

<sup>1)</sup>모든 실험은 삼 반복 수행하여 평균값으로 나타내었음.

(나) 유효성분 함양 비교 :

① 유리아미노산 함량 : 각 시제품들의 유리아미노산 함량을 분석한 결과는 Table 3-8과 같았다. 공통적으로 phosphoserine, taurine, phosphoetanolamine, urea, proline, hydroxylproline, aminoadipic acid 1-methylhistidine, 3-methylhistidine, anserine, carnosine이 검출되지 않았으며 필수아미노산 중에서는 histidine이 검출되지 않았다. 유리아미노산 총 함량은 시제품 B가 52.19 mg/100 mL로 가장 많았고 대조구로 사용된 제품에서는 18.16 mg/100 mL로 가장 낮았으며 시제품 C는 43.76 mg/100 mL로 이들 중 두 번째로 유리아미노산 함량이 높았다. 한편 taurine은 대조구에서는 검출되지 않고 시제품은 약 100 mg/100 g 정도의 함량을 나타내었다.

Table 3-8. 활성도라지 추출물 혼합 에너지 음료의 유리아미노산 함량

함량 <sup>1)</sup> (mg/100 mL)	시 제 품				
	대조구	시제품A	시제품 B	시제품 C	시제품 D
<b>Non-essential amino acids</b>					
Phosphoserine	nd <sup>2)</sup>	nd	nd	nd	nd
Taurine	nd	110.33	100.98	99.99	102.54
Phosphoetanolamine	nd	nd	nd	nd	nd
Urea	nd	nd	nd	nd	nd
Proline	nd	nd	nd	nd	nd
Hydroxyproline	nd	nd	nd	nd	nd
Aspartic acid	nd	0.89±0.04	3.29±0.16	nd	0.58±0.03
Serine	1.02±0.05	0.74±0.04	1.60±0.08	1.43±0.07	0.60±0.03
Aspartic acid - NH <sub>2</sub>	nd	nd	nd	nd	nd
Glutamic acid	2.53±0.13	3.86±0.19	7.83±0.39	7.04±0.35	2.25±0.11
Sarcosine	nd	0.78±0.04	1.92±0.10	2.23±0.11	nd
Aminoadipic acid	nd	nd	nd	nd	nd
Glycine	1.33±0.07	1.15±0.06	2.99±0.15	1.54±0.08	0.83±0.04
Alanine	1.48±0.07	1.08±0.06	nd	2.91±0.15	0.48±0.02
Citrulline	0.53±0.03	nd	0.59±0.03	nd	nd
$\alpha$ -aminobutyric acid	nd	0.33±0.05	1.68±0.09	0.50±0.03	0.44±0.03
Cystine	nd	1.32±0.07	nd	1.28±0.06	nd
Cystathionine	nd	nd	1.11±0.06	nd	nd
Tyrosine	nd	nd	1.92±0.10	1.00±0.05	nd
$\beta$ -alanine	1.66±0.08	0.30±0.02	0.48±0.02	0.34±0.02	0.41±0.02
$\beta$ -aminoisobutyric acid	nd	nd	nd	nd	nd
$\gamma$ -aminobutyric acid	0.51±0.03	2.72±0.14	8.22±0.41	6.37±0.32	1.03±0.05
Aminoethanol	0.37±0.02	0.92±0.05	1.25±0.06	0.96±0.05	1.35±0.07
Hydroxylysine	1.07±0.05	1.28±0.06	1.46±0.07	1.51±0.08	1.13±0.06
Ornithine	0.70±0.04	0.55±0.03	0.79±0.04	0.74±0.04	0.34±0.02
1-Methylhistidine	nd	nd	nd	nd	nd
3-Methylhistidine	nd	nd	nd	nd	nd
Anserine	nd	nd	nd	nd	nd
Carnosine	nd	nd	nd	nd	nd
Arginine	3.40±0.17	0.80±0.04	9.50±0.48	9.57±0.48	nd
Total	14.6	16.72	44.63	37.42	9.44
<b>Essential amino acids</b>					
Threonine	0.61±0.03	0.41±0.02	0.93±0.05	0.97±0.05	0.21±0.01
Valine	1.29±0.06	0.82±0.04	1.69±0.08	1.39±0.07	1.40±0.07
Methionine	nd	nd	1.35±0.07	0.06±0.00	0.07±0.00
Isoleucine	nd	nd	0.45±0.02	0.45±0.02	nd
Leucine	nd	nd	0.65±0.03	0.76±0.04	nd
Phenylalanine	1.66±0.08	nd	1.92±0.10	1.99±0.10	nd
Lysine	nd	nd	0.57±0.03	0.72±0.04	nd
Histidine	nd	nd	nd	nd	nd
Total	3.56	1.23	7.56	6.34	1.68
Total amino acids	18.16	17.95	52.19	43.76	11.12
Ammonia	5.98±0.30	4.88±0.24	9.34±0.47	8.36±0.42	5.56±0.28

<sup>1)</sup> 모든 실험은 삼 반복 수행하여 평균값으로 나타내었음.

<sup>2)</sup> nd, 검출되지 않음.

② 수용성 페놀릭스 및 플라보노이드스 함량 : 각 시제품들의 수용성 페놀릭스 함량은 대조구(여주)의 경우 0.05 mg/mL로 극 미량이었으나 본 연구에서 제조한 시제품 A에서 D 제품은 0.24 mg/mL에서 0.26 mg/mL 수준으로 크게 증가하였다. 수용성 플라보노이드스 함량 역시 대조구(0.27 mg/mL)보다는 시제품에서 좀 더 많은 양이 검출되었으며 시제품 B는 0.84 mg/mL로 이들 중 가장 많은 양이 검출되었고 시제품 중에서는 시제품 C가 0.62 mg/mL로 약간 낮은 함량을 나타내었다(Fig. 3-8).

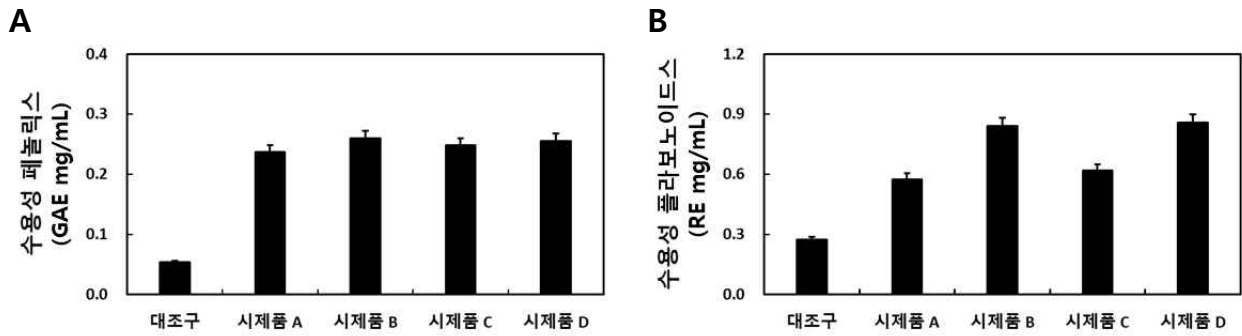


Fig. 3-8. 활성도라지 추출물 혼합 에너지 음료의 수용 페놀릭스 (A) 및 수용성 플라보노이드스 (B) 함량.

③ 카페인 함량 : 여주 추출물 혼합 에너지 드링크의 카페인 함량은 시제품 A와 D는 0.2  $\mu$ g/mL, 시제품 B와 C는 0.29  $\mu$ g/mL가 검출되었다(Table 3-9 및 Fig. 3-9).

Table 3-9. 활성도라지 추출물 혼합 에너지 음료의 카페인 함량

Contents ( $\mu$ g/mL) <sup>1)</sup>	시 제품				
	대조구	시제품A	시제품 B	시제품 C	시제품 D
Caffeine	nd <sup>2)</sup>	0.20 $\pm$ 0.01	0.29 $\pm$ 0.01	0.29 $\pm$ 0.01	0.20 $\pm$ 0.01

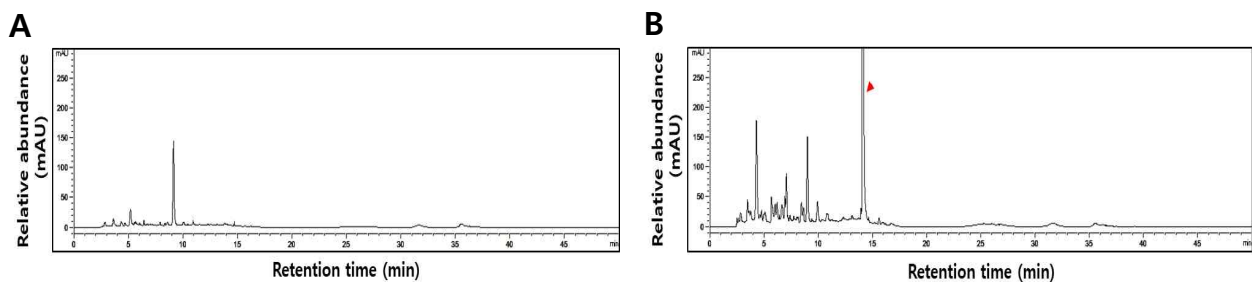


Fig. 3-9. 활성도라지 추출물 혼합 에너지 음료의 카페인 크로마토그램.

A, 대조구 및 B, 시제품 B

④ Triterpenoides, Phenolic acids/flavonols 함량 : 활성도라지 추출물 혼합 에너지 음료의 triterpenoides 화합물은 검출되지 않았고, phenolic acids와 flavonols는 오미자, 산양삼, 녹차 추출물이 혼합된 음료가 활성도라지 추출물만으로 구성된 대조구보다는 함량이 높았다(Table 3-10 및 Fig. 3-10과 11).

Table 3-8. 활성도라지 추출물 혼합 에너지 드링크의 카페인 함량

Contents ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>1)</sup>	시 제 품				
	대조구	시제품A	시제품 B	시제품 C	시제품 D
Phenolic acids					
Gallic acid	4.00	9.72	11.56	11.79	10.03
Protocatechuic acid	tr <sup>2)</sup>	2.38	1.00	1.10	1.02
Chlorogenic acid	22.06	43.86	40.16	41.21	40.73
p-Hydrobenzoic acid	5.26	9.13	13.37	13.21	13.68
Vanilic acid	tr	2.03	4.01	3.72	3.37
p-Coumaric acid	nd <sup>3)</sup>	nd	nd	nd	nd
Ferulic acid	1.15	nd	nd	nd	nd
Ventaric acid	1.57	4.74	5.01	4.76	3.51
Benzoic acid	nd	nd	nd	nd	nd
t-Cinnamic acid	0.16	0.15	0.18	0.11	0.20
Total	34.20	72.01	75.29	75.90	72.54
Flavonols					
Epigallocatechin	35.87	84.95	74.78	79.18	68.38
Catechin	25.19	33.74	50.53	49.23	61.35
Epicatechin	4.24	16.85	25.47	24.73	18.51
Epigallocatechin gallate	2.52	8.95	12.52	11.72	11.93
Vanilin	nd <sup>2)</sup>	nd	nd	nd	nd
Rutin	2.78	8.01	12.18	10.99	10.84
Catechin gallate	2.89	6.21	7.98	7.45	7.23
Quercetin	132.25	163.28	192.47	181.18	190.69
Naringin	1.01	3.97	7.38	4.93	4.02
Naringenin	1.14	1.22	1.21	0.18	0.26
Formonoetin	2.22	2.20	2.18	2.15	2.22
Total	210.11	329.38	386.70	371.74	375.43

<sup>1)</sup>Value indicated the mean's of three replication ( $n=3$ ).

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

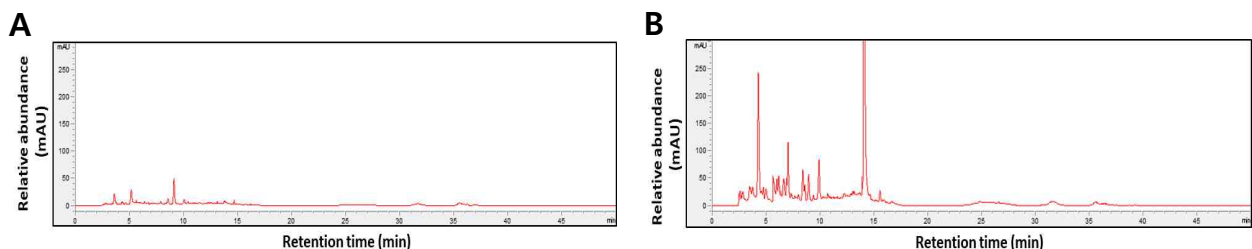


Fig. 3-10. 활성도라지 추출물 혼합 에너지 음료의 phenolic acid 크로마토그램.

A, 대조구 및 B, 시제품 B

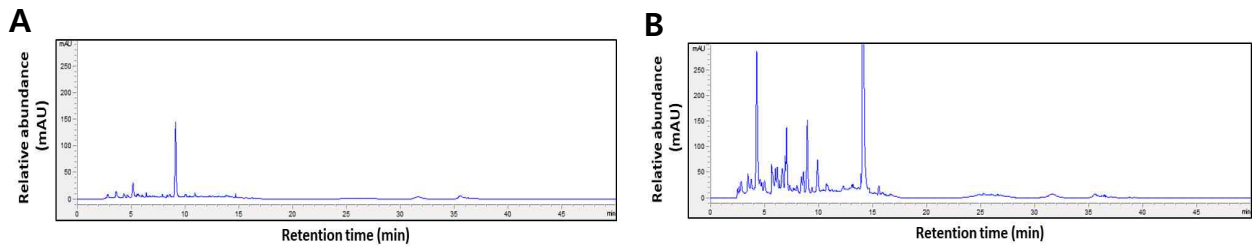


Fig. 3-11. 활성도라지 추출물 혼합 에너지 음료의 flavonol 크로마토그램.

A, 대조구 및 B, 시제품 B

(다) 생리활성 비교 :

① 항산화 활성 비교 : DPPH 라디칼 소거활성은 대조구의 경우 4%로 아주 낮은 활성을 보인 반면에 시제품 B와 C가 각각 42.73%와 40.98%로 우수하였다. ABTS 라디칼 소거활성 역시 시제품 B가 60.29%로 이들 중 가장 우수한 활성을 나타내었으며 hydroxyl 라디칼 소거활성 역시 시제품 B가 53.55%로 우수하였다. 이 외 나머지 시제품들 역시 대조구보다는 우수한 라디칼 소거활성을 보였다. 한편 FRAP 환원력은 시제품 B가 1.89의 우수한 환원력을 나타내었다 (Fig. 3-12).

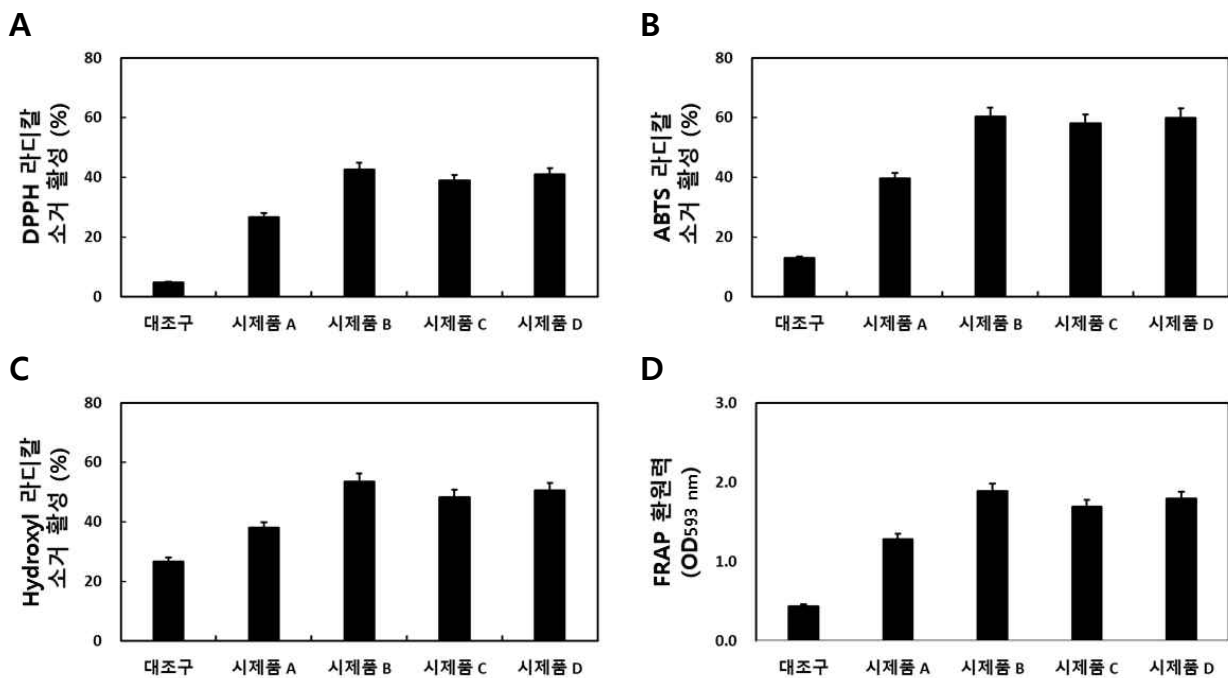


Fig. 3-12. 활성도라지 추출물 혼합 에너지 음료의 항산화 활성 비교.

A, DPPH; B, ABTS; C; hydroxyl 및 D, FRAP

② 소화효소 저해활성 비교 : 여주 추출물 혼합 에너지 드링크의 소화효소 저해활성은 Fig. 3-13과 같았다. 탄수화물 분해효소인 알파-글루코시다아제 저해활성과 췌장-리파아제 저해활성은 항산화 활성과 유사한 경향을 보였다. 알파-글루코시다아제 저해활성은 시제품 B에서 13.44%로 이들 중 가장 우수하였고 대조구에서는 3%로 나타났다. 췌장-리파아제 저해활성은 대조구에서는 저해활성을 나타내지 않았으나 각각의 시제품들은 최대 8.32%의 저해활성을

나타내었다.

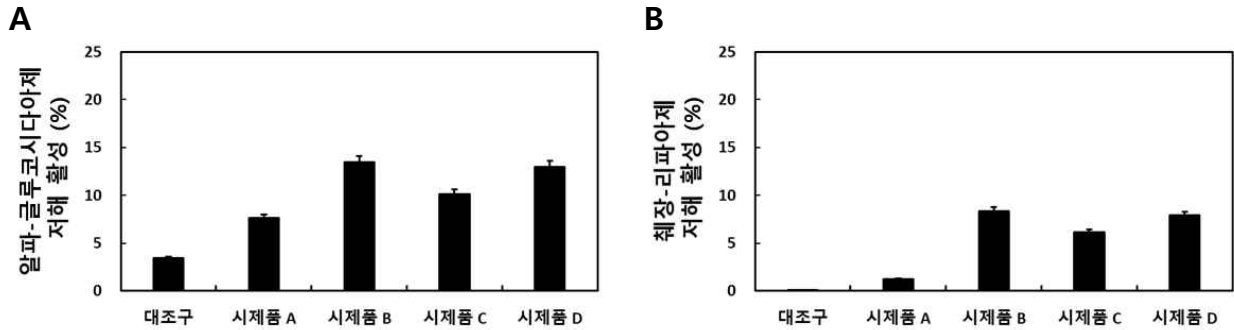


Fig. 3-13. 활성도라지 추출물 혼합 에너지 드링크의 소화효소 저해활성 비교.

A, 알파-글루코시다아제 및 B, 췌장-리파아제 저해활성

라. 경남 한방항노화 전략약초 적하수오에 활성도라지 제조기술 적용

(1) 숙성 및 발효 하수오 : 숙성과 발효 가공공정에 따라 제조된 각각의 PMR (A), RPMR (B), BPMR (C) 및 *Lactobacillus plantarum* P1201과 *Lactobacillus brevis* BMK184 균주로 발효시킨 FPMR (D), FRPMR (E), FBPMR (F)는 Fig. 3-14와 같았다.



Fig. 3-14. 하수오 (A), 홍하수오 (B), 흑하수오 (C), 발효하수오 (D), 발효홍하수오 (E), 발효흑하수오(F)의 사진.

(2) 이화학적 특성 변화 : 숙성 및 발효 가공 공정에 따라 제조한 하수오의 이화학적 특성 변화는 Figs. 3-15과 같았다. PMR의 pH는 5.70으로 측정되어졌고 FPMR은 5.23으로 약간 낮은 pH 수치를 나타내었다. RPMR의 pH는 5.37이었고 FRPMR의 pH는 5.05였고 BPMR의 pH는 4.90이었고 FBPMR의 pH는 4.78로 나타나 숙성 및 발효 가공에 따라 pH는 조금씩 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 3-15A). 총산도는 PMR에서 0.23%, FPMR은 0.27%, BPMR은 0.25%, FRPMR

은 0.27%, BPMR은 0.27%, FBPMR은 0.29%를 나타내었고 이는 pH 수치에 비례적인 것으로 나타났다(Fig. 3-15B). 환원당 함량은 PMR이 1.19 mg/g을 함유하고 있었고 FPMR에서는 1.40 mg/g이 검출되었다. RPMR은 1.30 mg/g의 환원당을 함유하고 있었고 FRPMR은 1.53 mg/g으로 좀 더 증가하였다. 한편 BPMR은 FRPMR에 비해 좀 더 증가하여 1.99 mg/g이 검출되었고 FBPMR에서는 2.33 mg/g으로 발효 공정에 따라 증가하였다(Fig. 3-15C).

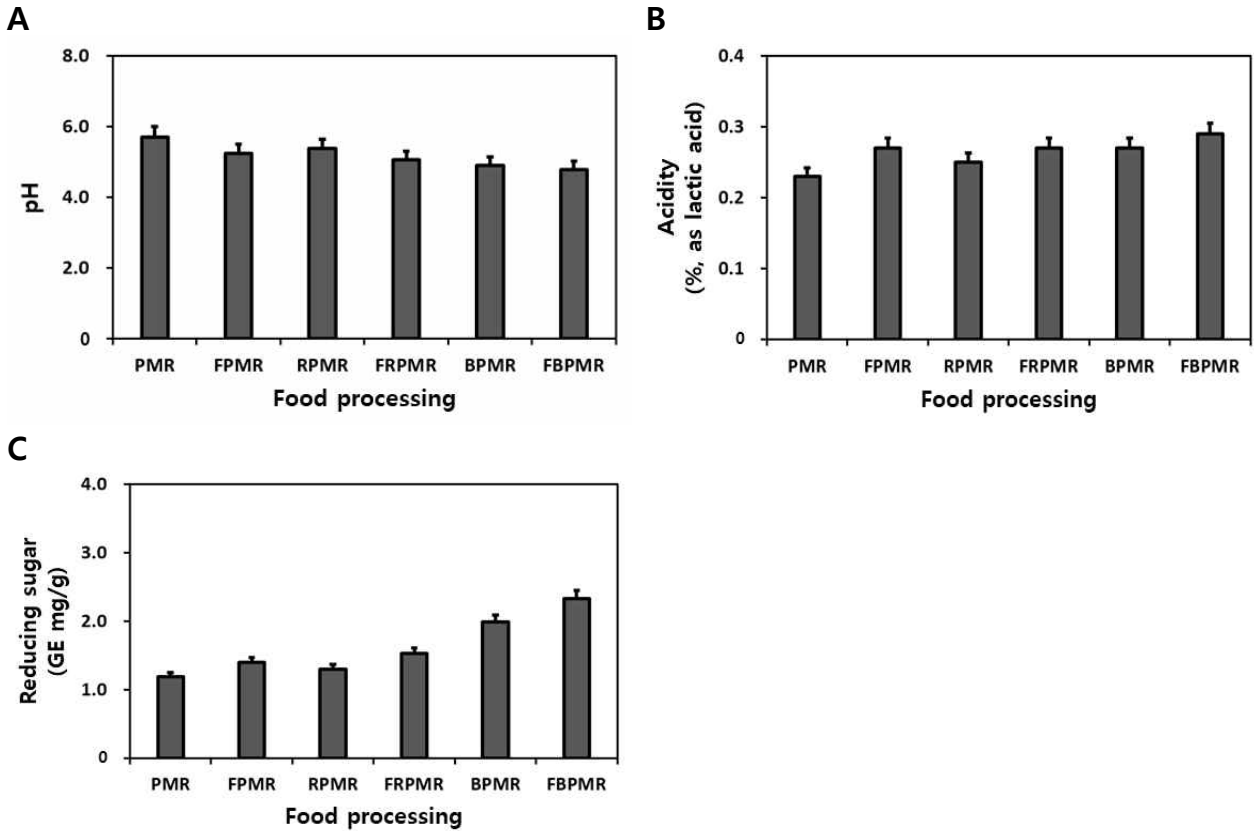


Fig. 3-15. 하수오의 가공 중 이화학적 특성 변화. A, pH; B, acidity 및 C, 환원당 변화

(3) 1차 대사체 함량 변화 :

(가) 지방산 함량 변화 : 숙성 및 발효 가공 공정에 따른 하수오의 지방산 함량을 분석한 결과는 Table 3-9과 같았다. 포화 지방산 중 lauric acid (C12:0)는 PMR에서 검출되지 않았고 arachidic acid (C20:0)는 BPMR에서만 검출되지 않았다. 이외 포화지방산 중 myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0), behenic acid (C22:0), lignoceric acid (C24:0)는 모두 검출되었다. 특히 palmitic acid (C16:0)가 RPMR에서 126.9 mg/100 g으로 가장 많은 양이 검출되어 주요 포화 지방산으로 나타났다. PMR에서 발효시킨 FPMR에서는 palmitic acid (C16:0) 함량이 101.6 → 112.5 mg/100 g으로 증가하였고 RPMR에서 발효시킨 FRPMR에서는 126.9 → 84.1 mg/100 g으로 감소하였다. BPMR과 FBPMR에서는 91.1 → 93.3 mg/100 g으로 약간 증가하는 것으로 나타났다. 또한 lauric acid (C12:0) 함량은 숙성과 발효 공정에 따른 차이는 크게 없어 함량은 유사한 수준으로 나타났다. 한편 arachidic acid (C20:0), behenic acid (C22:0), lignoceric acid (C24:0)는 숙성과 발효 가공공정에 따라 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. 불포화 지방산 중에서는 palmitoleic acid(C16:1)가 PMR에서만 1.7 mg/100 g으로 검출되었



다. Elaidic acid (C18:1t)는 PMR에서 17.6 mg/100 g이 검출되었으나 FPMR에서는 검출되지 않았다. RPMR 역시 7.1 mg/100 g으로 검출되었으나 FRPMR에서는 검출되지 않았고 BPMR과 FBPMR에서는 모두 검출되지 않았다. 한편 주요 불포화 지방산은 oleic acid (C18:1c)로써 PMR에서 144.5 mg/100 g으로 가장 많은 양이 검출되었다. 이 외 linoleic acid (C18:2c),  $\alpha$ -linoleic acid (C18:3n3), eicosenic acid (C20:1) 함량은 모두 숙성과 발효 가공에 따라 조금씩 감소하는 경향을 나타내었다.

(나) 유리아미노산 함량 변화 : 숙성 및 발효 가공 공정에 따른 하수오의 유리아미노산 함량을 분석한 결과는 **Table 3-10**와 같았다. 건조 하수오에서는 citrulline과 phosphoserine이 검출되지 않았으나 PMR을 발효 가공 시에는 citrulline 함량이 22.84 mg/100 g으로 증가하였다. 또한  $\alpha$ -aminobutyric acid 및  $\beta$ -aminobutyric acid 함량이 PMR에서는 각각 7.86 및 2.49 mg/100 g이었으나 FPMR에서는 각각 15.21 및 2.94 mg/100 g으로 약간 증가하였다. 그러나 이들 아미노산을 제외한 대부분의 비필수 아미노산들은 발효 가공에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. 한편 숙성 가공공정을 거친 RPMR과 발효 가공공정을 거친 FRPMR은 대부분의 아미노산이 증가하는 경향을 나타내었다. 특히 proline이 주요 아미노산으로 검출되었고 349.09 → 426.77 mg/100 g으로 가장 크게 증가하였다. 이 외 비필수 아미노산인 aspartic acid (5.76 → 7.45 mg/100 g), serine (5.67 → 8.66 mg/100 g), glutamic acid (15.30 → 16.69 mg/100 g), glycine (1.37 → 3.03 mg/100 g), alanine (4.64 → 10.59 mg/100 g), cystine (9.61 → 12.64 mg/100 g) 등이 크게 증가하였다. BPMR 및 FBPMR 역시 phosphoetanolamine (49.90 → 63.69 mg/100 g), aspartic acid (8.14 → 8.53 mg/100 g), cystine (11.35 → 11.45 mg/100 g),  $\beta$ -alanine (1.35 → 2.94 mg/100 g),  $\beta$ -aminobutyric acid (0.23 → 2.41 mg/100 g)가 크게 증가하였다. 필수아미노산 역시 숙성보다는 발효 공정 후에 크게 증가하는 경향을 나타내었다.

(다) 무기질 함량 변화 : 숙성 및 발효 가공 공정에 따른 하수오의 무기질 함량을 비교 분석한 결과는 **Table 3-11**과 같았다. 숙성하수와 발효 하수오 모두 공통적으로 12종류의 무기질이 검출되었다. PMR과 FPMR의 무기질 함량은 모두 유사하여 발효공정에 따른 함량 차이는 없는 것으로 나타났다. 한편 RPMR과 FRPMR에서는 발효 공정에 따른 무기질 함량 변화가 조금 있는 것으로 나타났다. RPMR의 인(P) 함량은 24.66 mg/kg이었고 FRPMR에서는 27.97 mg/kg으로 약간 증가하였다. RPMR에서 황(S)은 17.16 mg/kg에서 19.54 mg/kg으로 약간 증가하였고 주요 무기질은 칼륨(K)이었고 PMR에서는 134.66 mg/kg이었고 FPMR에서는 136.32 mg/kg으로 약간 증가하였다. RPMR 역시 130.6 mg/kg에서 139.31 mg/kg으로 증가하였고 BPMR에서는 123.37 mg/kg에서 142.55 mg/kg으로 가장 큰 증가폭을 나타내었다. 이외에도 칼슘(Ca), 마그네슘(Mg), 철(Fe) 등이 발효 가공공정에 따라 조금씩 증가하는 결과를 나타내었다. 한편 무기질 총 함량은 FRPMR (227.6 mg/kg)과 FBPMR (229.43 mg/kg)에서 비교적 높은 양이 검출되었다.

Table 3-9. 하수오의 가공 중 지방산 조성 변화

Contents <sup>1)</sup> (mg/100 g)	Food processing steps <sup>2)</sup>					
	PMR	FPMR	RPMR	FRPMR	BPMR	FBPMR
<b>Saturated fatty acids</b>						
Lauric acid (C12:0)	nd <sup>3)</sup>	2.7±0.14	2.7±0.14	2.0±0.10	2.3±0.12	2.4±0.12
Myristic acid (C14:0)	3.6±0.18	3.0±0.15	3.2±0.16	2.4±0.12	2.7±0.14	2.7±0.14
Palmitic acid (C16:0)	101.6±5.08	112.5±5.63	126.9±6.35	84.1±4.21	91.1±4.56	93.3±4.67
Stearic acid (C18:0)	42.7±2.14	60.8±3.04	66.8±3.34	42.6±2.13	46.8±2.34	47.7±2.39
Arachidic acid (C20:0)	4.3±0.22	2.1±0.11	3.1±0.16	1.4±0.07	nd	1.6±0.08
Behenic acid (C22:0)	4.0±0.20	2.9±0.15	3.3±0.17	2.3±0.12	2.4±0.12	2.4±0.12
Lignoceric acid (C24:0)	2.3±0.12	nd	nd	nd	nd	nd
Total	158.5±7.93	194.1±9.71	206.0±10.30	134.8±6.74	145.3±7.27	150.1±7.51
<b>Unsaturated fatty acids</b>						
Palmitoleic acid (C16:1)	1.7±0.09	nd	nd	nd	nd	nd
Elaidic acid (C18:1 <i>l</i> )	17.6±0.88	nd	7.1±0.36	nd	nd	nd
Oleic acid (C18:1 <i>c</i> )	144.5±7.23	41.4±2.07	80.1±4.01	28.7±1.44	34.0±1.70	32.1±1.61
Linoleic acid (C18:2 <i>c</i> )	88.0±4.40	75.7±3.79	85.1±4.26	70.1±3.51	71.9±3.60	74.3±3.72
$\alpha$ -Linolenic acid (C18:3 <i>n</i> 3)	10.1±0.51	9.0±0.45	9.8±0.49	8.6±0.43	8.4±0.42	8.4±0.42
Eicosenic acid (C20:1)	2.6±0.13	nd	nd	nd	nd	nd
Total	267.2±13.36	128.8±6.44	182.1±9.11	109.5±5.48	114.3±5.72	117.0±5.85
<b>Total fatty acids</b>	<b>425.7±21.29</b>	<b>322.9±16.15</b>	<b>388.1±19.41</b>	<b>244.3±12.22</b>	<b>259.6±12.98</b>	<b>267.1±13.36</b>

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

<sup>2)</sup>Food processing steps: PMR, *Polygoni multiflori Radix*; FPMR, fermented *Polygoni multiflori Radix*; RPMR, red *Polygoni multiflori Radix*; FRPMR, fermented red *Polygoni multiflori Radix*; BPMR, black *Polygoni multiflori Radix*; and FBPMR, fermented black *Polygoni multiflori Radix*.

<sup>3)</sup>nd: not detected.

Table 3-10. 하수오의 가공 중 유리아미노산 조성 변화

Contents <sup>1)</sup> (mg/100 g)	Food processing steps <sup>2)</sup>					
	PMR	FPMR	RPMR	FRPMR	BPMR	FBPMR
<b>Non-essential amino acids</b>						
Phosphoserine	nd	22.84±1.14	nd	nd	nd	nd
Phosphoetanolamine	65.98±3.30	50.48±2.52	58.73±2.94	56.48±2.82	49.90±2.50	63.69±3.18
Proline	790.24±39.51	515.28±25.76	349.09±17.45	426.77±21.84	464.34±23.22	347.69±17.38
Aspartic acid	8.25±0.41	7.9±0.40	5.76±0.29	7.45±0.37	8.14±0.41	8.53±0.43
Serine	11.50±0.58	8.86±0.44	5.67±0.28	8.66±0.43	6.96±0.35	nd
Aspartic acid - NH <sub>2</sub>	2.80±0.14	nd	nd	nd	nd	nd
Glutamic acid	26.24±1.31	12.24±0.61	15.30±0.77	16.69±0.83	27.33±1.37	12.14±0.61
Glycine	5.37±0.27	3.28±0.16	1.37±0.07	3.03±0.15	2.38±0.12	2.14±0.11
Alanine	22.05±1.10	16.51±0.83	4.64±0.23	10.59±0.53	10.63±0.53	8.29±0.41
Citrulline	nd	nd	nd	7.19±0.36	nd	nd
$\alpha$ -aminobutyric acid	7.86±0.39	15.21±0.76	7.12±0.36	10.81±0.54	21.00±1.05	19.72±0.99
Cystine	13.64±0.68	13.44±0.67	9.61±0.48	12.64±0.63	11.35±0.57	11.45±0.57
Cystathionine	1.76±0.09	nd	nd	nd	nd	nd
Tyrosine	15.21±0.76	7.93±0.40	8.56±0.43	9.37±0.47	4.66±0.23	4.53±0.23
$\beta$ -alanine	7.55±0.38	5.62±0.28	2.16±0.11	4.59±0.23	1.35±0.07	2.94±0.15
$\beta$ -aminoisobutyric acid	2.49±0.12	2.94±0.15	nd	3.68±0.18	0.23±0.01	2.41±0.12
$\gamma$ -aminobutyric acid	48.18±2.41	30.11±1.51	19.43±0.97	22.87±1.14	29.17±1.46	20.10±1.01
Aminoethanol	4.83±0.24	1.55±0.08	0.55±0.03	0.75±0.04	0.72±0.04	0.36±0.02
Hydroxylysine	1.19±0.06	1.05±0.05	0.92±0.05	1.10±0.06	nd	1.07±0.05
Ornithine	nd	0.49±0.02	nd	1.22±0.06	nd	0.19±0.01
Arginine	107.16±5.36	45.43±2.27	55.34±2.77	47.15±2.36	36.57±1.83	16.02±0.80
Total	1142.3±57.12	761.16±38.06	544.25±27.21	651.04±32.55	674.73±33.74	521.27±26.06
<b>Essential amino acids</b>						
Threonine	51.38±2.57	19.65±0.98	16.51±0.83	18.28±0.91	13.09±0.65	8.03 ±0.40
Valine	8.11±0.41	9.77±0.49	5.9±0.30	9.11±0.46	9.69±0.48	7.90±0.40
Methionine	1.66±0.08	1.05±0.05	1.35±0.07	1.33±0.07	nd	nd
Isoleucine	4.89±0.24	10.13±0.51	7.18±0.36	11.94±0.60	12.67±0.63	17.09±0.85
Leucine	2.91±0.15	8.18±0.41	1.38±0.07	3.73±0.19	nd	1.99±0.10
Phenylalanine	2.59±0.13	2.34±0.12	3.21±0.16	3.89±0.19	0.44±0.02	3.22±0.16
Lysine	2.86±0.14	1.12±0.06	nd	0.95±0.05	0.33±0.02	0.34±0.02
Histidine	5.82±0.29	1.64±0.08	nd	1.59±0.08	nd	nd
Total	80.22±4.01	53.88±2.69	35.53±1.78	50.82±2.54	36.22±1.81	38.57±1.93
Total amino acids	1222.52±61.13	815.04±40.75	579.78±28.99	701.86±35.09	512.65±25.63	559.84±27.99
Ammonia	5.49±0.27	5.34±0.27	3.63±0.18	6.44±0.32	12.35±0.62	8.14±0.41

<sup>1)</sup>All values are presented as the mean±SD of triplicate determination. <sup>3)</sup>nd: not detected.

Table 3-11. 하수오의 가공 중 무기질 조성 변화

Content (mg/kg)	Food processing steps <sup>2)</sup>					
	PMR	FPMR	RPMR	FRPMR	BPMR	FBPMR
P	28.82±1.44	28.48±1.42	24.66±1.23	27.97±1.40	23.31±1.17	26.7±1.34
S	17.21±0.86	17.51±0.88	17.16±0.86	19.54±0.98	17.26±0.86	18.73±0.94
K	134.66±6.73	136.32±6.82	130.6±6.53	139.31±6.97	123.37±6.17	142.55±7.13
Ca	24.46±1.22	22.35±1.12	23.54±1.18	26.76±1.34	26.76±1.34	28.4±1.42
Mg	12.17±0.61	12.85±0.64	10.99±0.55	12.31±0.62	10.2±0.51	11.15±0.56
Fe	0.63±0.03	0.69±0.03	0.62±0.03	0.63±0.03	0.75±0.04	0.71±0.04
Cu	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	nd	nd
Zn	0.11±0.01	0.13±0.01	0.11±0.01	0.12±0.01	0.1±0.01	0.11±0.01
Ni	0.01±0.00	0.01±0.00	nd	nd	nd	nd
Mn	0.06±0.00	0.08±0.00	0.06±0.00	0.07±0.00	0.06±0.00	0.07±0.00
Ti	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00
Al	0.92±0.05	1.06±0.05	0.83±0.04	0.86±0.04	1.02±0.05	0.99±0.05
Total	219.08±10.95	219.51±10.98	208.6±10.43	227.6±11.38	202.86±10.14	229.43±11.47

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

<sup>2)</sup>Food processing steps: PMR, *Polygoni multiflori Radix*; FPMR, fermented *Polygoni multiflori Radix*; RPMR, red *Polygoni multiflori Radix*; FRPMR, fermented red *Polygoni multiflori Radix*; BPMR, black *Polygoni multiflori Radix*; and FBPMR, fermented black *Polygoni multiflori Radix*.

<sup>3)</sup>nd: not detected.

**(4) 2차 대사체 함량 변화**

(가) 총 phenolics 함량 : PMR은 6.05 mg/g으로 숙성과 발효 가공 공정에 비해 가장 많은 함량이 검출되었다. PMR을 발효한 FPMR은 4.10 mg/g으로 발효 공정 후 약간 감소하였고 RPMR에서는 4.94 mg/g이 검출되었고 FRPMR에서 역시 3.26 mg/g으로 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 한편 BPMR은 4.03 mg/g이 검출되었고 FBPMR에서는 4.51 mg/g으로 약간 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 3-16A).

(나) 총 flavonoids 함량 : PMR은 1.34 mg/g을 함유하고 있었고 FPMR에서는 2.48 mg/g으로 약간 증가하였다. RPMR에서는 2.20 mg/g이 검출되었고 FRPMR에서는 2.53 mg/g으로 좀 더 증가하였다. BPMR에서는 2.69 mg/g이 검출되었고 FBPMR에서는 2.76 mg/g으로 증가하였다. 이로써 FPMR보다는 RPMR과 BPMR에서 총 플라보노이드스 함량은 증가하였고 PMR, RPMR, BPMR보다는 FPMR, FRPMR, FBPMR에서 총 플라보노이드스 함량이 좀 더 향상되는 것으로 나타났다(Fig. 3-16B).

(다) 갈변물질 함량 : PMR을 발효시킨 후에는 2.48의 수치가 측정되었다. RPMR에서는 2.20이었고 FRPMR에서는 이보다 좀 더 증가하여 2.53의 흡광도 수치를 나타내었다. BPMR 역시 2.69의 흡광도 수치를 나타내었고 FBPMR에서는 2.76으로 갈변물질을 가장 많이 함유하고 있는 것으로 나타났다. 이 결과로 볼 때, PMR 보다는 RPMR이 좀 더 많은 갈변물질을 함유하고 있었고 RPMR보다는 BPMR에서 갈변물질 함량이 높았고 발효 후 역시 갈변물질 함량이 조금씩 증가하였다(Fig. 3-16C).

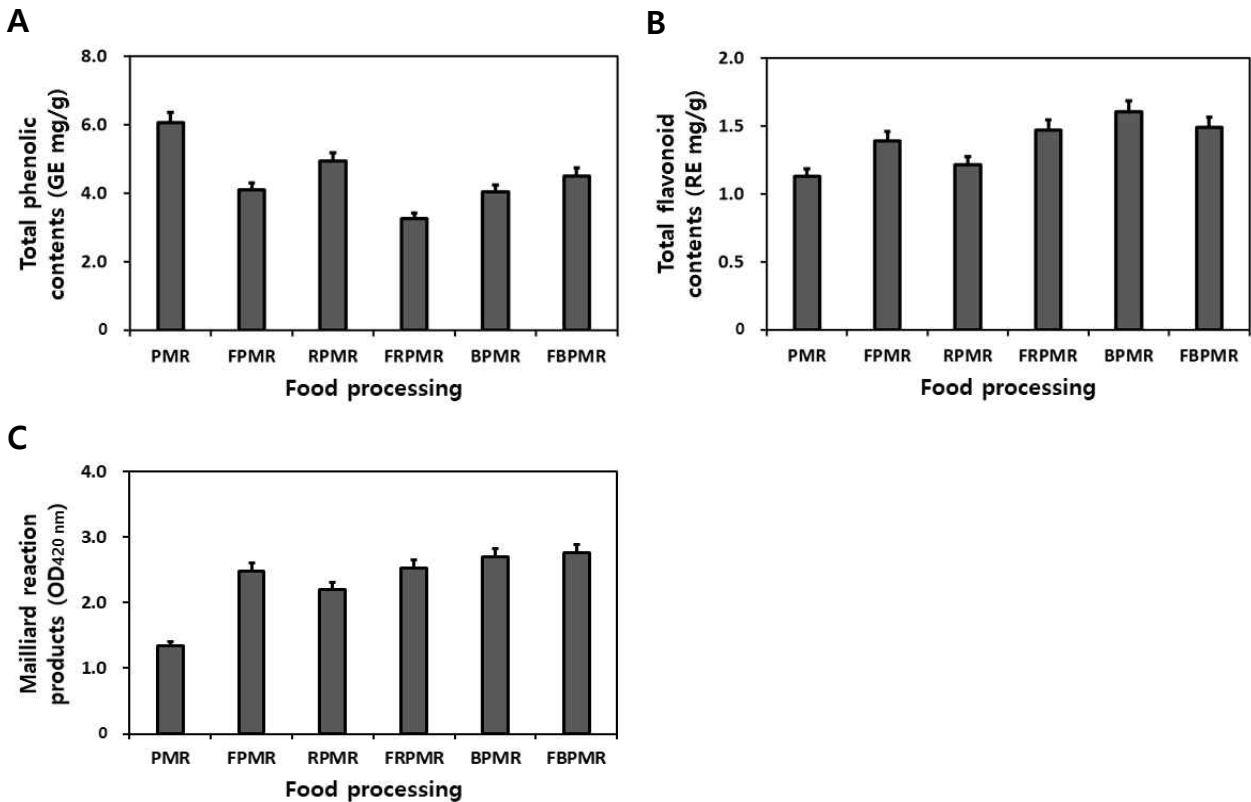


Fig. 3-16. 하수오의 가공 중 지방산 조성 변화. A, 총 phenolics; B, 총 flavonoids 및 C, 갈변물질

(라) 생리활성물질 함량 : 숙성 및 발효 가공 공정에 따라 제조된 각각의 하수오 추출물의 생리활성물질 함량을 분석한 결과는 Fig. 17 및 Table 3-12와 같았다. HPLC 분석 결과 catechin, 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\alpha$ -glucoside, rhein, emodin, chrysophenol 화합물이 검출되었고 (Fig. 11) 특히 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\alpha$ -glucoside가 주요 화합물로 확인되었다. Catechin 함량 변화는 PMR 및 FPMR에서는 2.25  $\rightarrow$  1.93 mg/g으로 약간 감소하였다. RPMR과 FRPMR에서는 2.22  $\rightarrow$  1.67 mg/g, BPMR 및 FBPMR에서는 1.51  $\rightarrow$  1.48 mg/g의 감소 변화를 보였다. 한편 본 연구에서는 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\alpha$ -glucoside 화합물이 숙성과 발효 가공 시 감소함에 따라 PMR에서는 검출되지 않았던 화합물이 FPMR, RPMR, FRPMR, BPMR, FBPMR에서는 숙성과 발효 가공 시 새로운 화합물이 검출되었다.

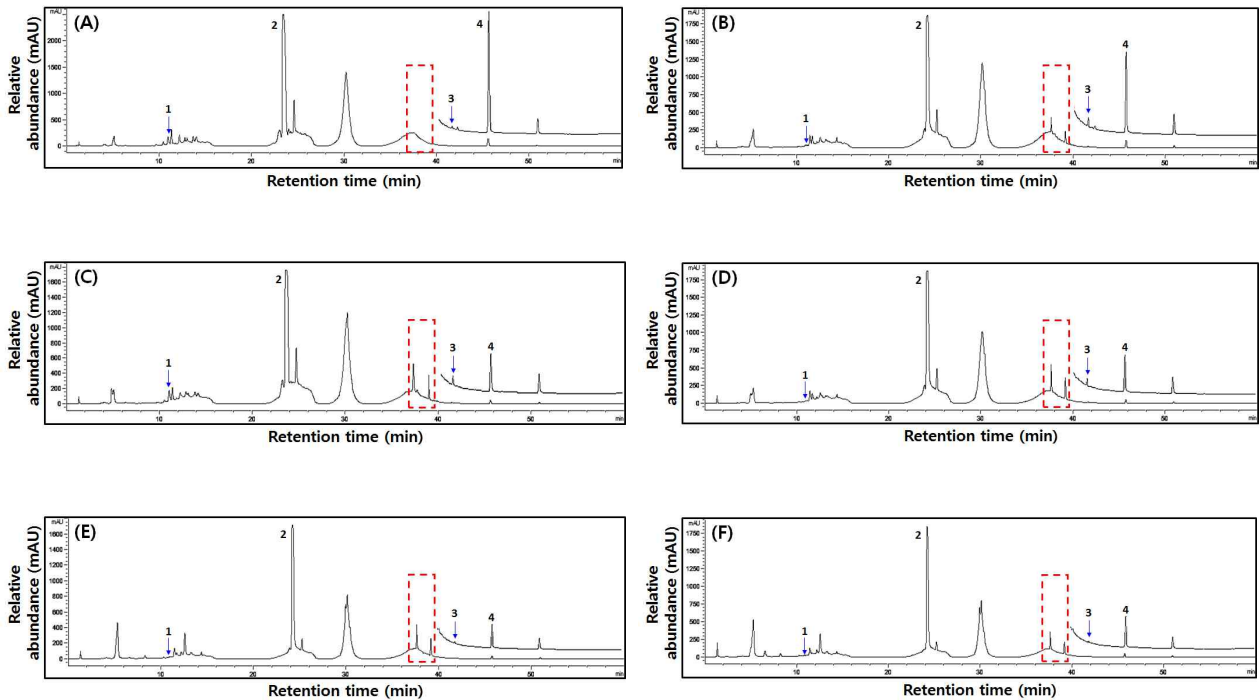


Fig. 3-16. 하수오의 가공 중 생리활성 물질 HPLC 크로마토그램. A, 하수오; B, 발효하수오; C, 흥하수오; D, 발효흥하수오; E, 흑하수오 및 F, 발효흑하수오

Table 3-11. 하수오의 가공 중 생리활성물질 조성 변화

Content (mg/g)	Food processing steps <sup>2)</sup>					
	PMR	FPMR	RPMR	FRPMR	BPMR	FBPMR
Catechin	2.25±0.11	1.93±0.10	2.22±0.11	1.67±0.08	1.51±0.07	1.48±0.07
2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\alpha$ -glucoside	64.9±3.25	46.47±2.32	33.94±1.70	48.76±2.44	36.68±1.83	34.35±1.72
Rhein	0.3±0.02	0.52±0.03	0.36±0.02	0.73±0.04	0.3±0.02	0.44±0.02
Emodin	0.27±0.01	0.16±0.01	0.06±0.00	0.1±0.01	0.05±0.00	0.07±0.00
Chrysophenol	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Total	67.79±3.39	49.08±2.45	36.58±1.83	51.26±2.56	38.54±1.93	36.34±1.82

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

<sup>2)</sup>Food processing steps: PMR, *Polygoni multiflori Radix*; FPMR, fermented *Polygoni multiflori Radix*; RPMR, red *Polygoni multiflori Radix*; FRPMR, fermented red *Polygoni multiflori Radix*; BPMR, black *Polygoni multiflori Radix*; and FBPMR, fermented black *Polygoni multiflori Radix*.

<sup>3)</sup>nd: not detected.

**(4) 항산화 활성 변화 :**

(가) DPPH 라디칼 소거활성 : DPPH 라디칼 소거활성은 0.1 mg/mL 농도에서는 PMR-39.06%, FPMR-38.66%, RPMR-32.10%, FRPMR-24.36%, BPMR-28.02%, FBPMR-28.05%를 나타내었다. 특히 PMR은 39%에서 발효 공정 적용 후 38%로 떨어졌으며 이는 숙성과 발효 가공 공정 적용 후 모두 동일하게 DPPH 라디칼 소거활성이 조금씩 감소하는 경향을 나타내었다. 추출물의 농도가 0.075 mg/mL에서 역시 PMR (34%), FPMR (30%), RPMR (23%), FRPMR (19%)에서는 숙성과 발효가 될수록 감소하였다. 그러나 BPMR (21%) 및 FBPMR (24%)에서는 약간 증가하였다. 0.05 mg/mL와 0.025 mg/mL 농도에서는 PMR, FPMR, RPMR, FRPMR, BPMR, FBPMR 모두 조금씩 감소하는 경향을 보였다(Fig. 3-18A).

(나) ABTS 라디칼 소거활성 : ABTS 라디칼 소거활성 측정 결과는 DPPH 라디칼 소거활성과 패턴이 일치하는 것으로 나타났으며 Fig. 3-18B에 나타내었다. PMR, FPMR, RPMR, FRPMR, BPMR, FBPMR 추출물의 농도를 0.1 mg/mL로 처리하였을 시 각각 98%, 96%, 98%, 96%, 90%, 96%로 유사하였다. 0.075, 0.05, 0.025 mg/mL 처리 시에도 PMR → FPMR, RPMR → FRPMR로 발효 가공 공정 적용 시 ABTS 라디칼 소거활성이 조금씩 감소하였다. 그러나 BPMR에서 FBPMR로 발효 가공 공정 적용 시에는 증가하는 경향을 나타내었고 0.075 mg/mL, 0.05 mg/mL, 0.025 mg/mL 농도로 처리하였을 시 각각 77 → 87%, 51 → 61%, 32 → 36%로 조금씩 증가하였다.

(다) FRAP 환원력 : 각각의 하수오 추출물들의 FRAP 환원력을 비교 측정한 결과는 Fig. 3-18C에 나타내었다. 0.1 mg/mL 농도에서 각 추출물들의 FRAP 환원력은 PMR에서 2.61의 흡광도 값이 측정되어졌고 FPMR에서는 2.55로 약간 감소하였다. RPMR 역시 2.59에서 FRPMR에서는 2.22로 감소하였다. 그러나 DPPH와 ABTS 라디칼 소거활성과 마찬가지로 BPMR (2.03)에서 FBPMR (2.25)로 발효 가공 공정 적용 시 증가하는 경향을 보였다. 이러한 환원력의 패턴은 농도 의존적으로 나타났고 낮은 농도에서도 비교적 우수한 FRAP 환원력을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

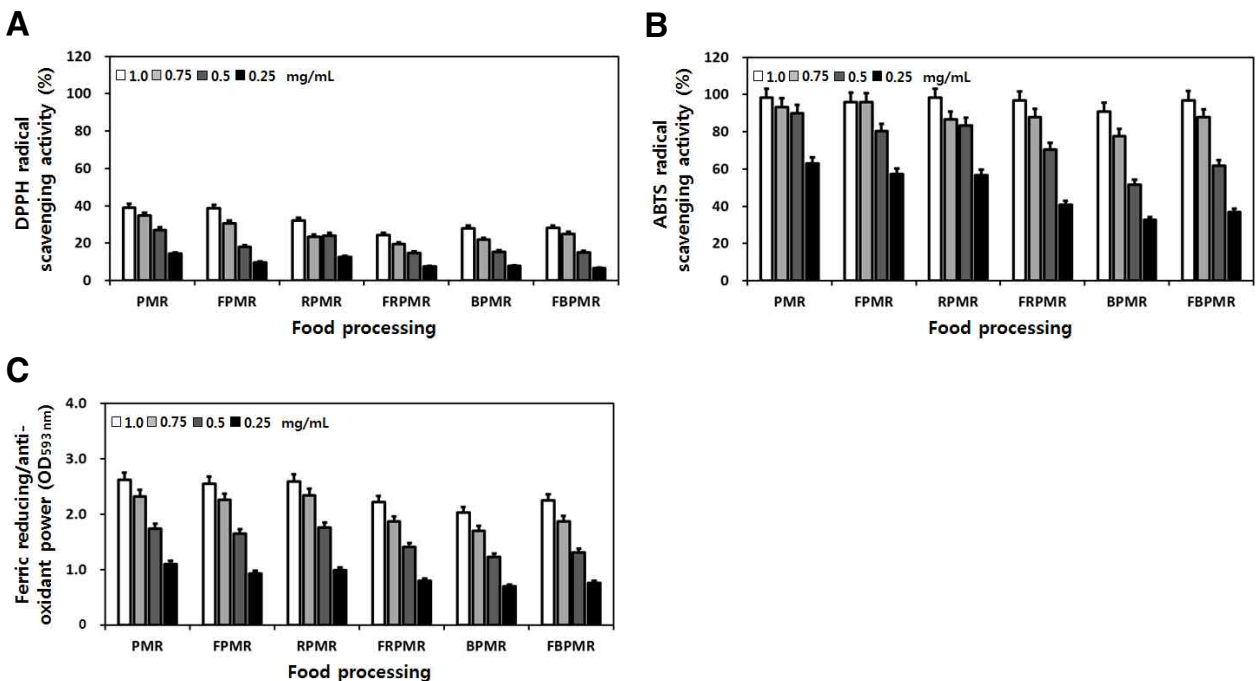


Fig. 3-18. 하수오의 가공 중 항산화 활성 변화. A, DPPH; B, ABTS 및 C, FRAP



## 제4절 활성화도라지 산업화를 위한 사업화 연계 방안 구축 [2위탁, 주식회사 아이피온]

### 1-1. 1차년도 연구수행 방법

#### (가) 간 기능 관련 건강기능식품 등의 시장조사

(1) 시장조사 : 분석 대상기술 예상 적용 분야에 대한 성장성과 가능성을 탐색하여 궁극적으로 시장 환경에 적합한 성과 확산 전략 도출을 위한 기반을 마련하는 단계로서 주요 구성 내용은 아래와 같음

#### (2) 문헌 자료 분석을 통해 관련 기술 또는 제품의 시장동향 분석

- (가) 국내외 시장조사 전문기관의 시장보고서(Datamonitor) 분석
- (나) 관련 협회 및 단체의 시장 통계 분석
- (다) 국내외 정부부서의 통계자료 이용
- (라) 각국의 무역 통계 조사

#### (3) 관련업체 동향 분석을 통한 시장 및 제품 환경 분석

- (가) 관련업체별 시장점유현황 조사
- (나) 시장의 관련 제품 포트폴리오 분석
- (다) 산업 및 시장 특성, 경쟁 특성 분석
- (라) 제품 개발에 있어서의 주요기업간의 특허 Pool 및 Alliance분석
- (마) 주요경쟁기업분석을 통한 유사/경쟁; 대체 기술 유무 및 상호경쟁력 분석

(4) 적용제품 및 시장 특성분석 : 해당 기술이 적용될 수 있는 제품(또는 공정)을 구체적으로 제시하고, 시장의 규모 및 수요처의 특징, 내수 또는 수출위주, 시장에 영향을 미치는 요인, 수요 및 공급의 특성 등 시장특성을 분석

#### (5) 향후전망 예측

- (가) 수요 및 시장 변화 예측
- (나) 관련 업체별 시장점유율 현황 파악을 통한 향후 5년간 가능 판매량 예측
- (다) 업체별 현황 분석을 통한 향후 시장 변화 예측

(6) 시장동향 분석 개발하고자 하는 기술 혹은 개발완료 상태인 기술에 대한 시장성 분석과 경쟁력 분석 포함

(가) 시장성 분석은 대상 기술이 목표하는 시장의 특성이나 잠재적인 전망을 고려하였을 때 분석대상 기술에 대한 지속적인 개발을 통하여 성과 확산을 도모할 수 있는지와 그 가치가 충분히 매력적인지에 관한 평가를 하기 위해서 응용분야의 시장규모와 성장성 분석

(나) 경쟁력 분석은 목표하는 시장 및 산업 환경의 경쟁을 형성하는 요소들을 이해함으로써 대상 기술의 강점과 약점이 무엇인지 도출하며 궁극적으로 시장진입 시 경쟁력을 확보할 수 있는지 여부를 예측하기 위한 과정

## 1-2. 1차년도 연구결과

### 가. 도라지 재배 현황

(1) 농림축산식품부의 보고에 따르면 2015년 도라지 재배 및 생산현황은 표 3-1과 같다. 즉, 2015년 기준 전국적으로 도라지 재배면적은 총 1,481ha로 생산량은 7,577톤을 기록하였다.

Table 1-1. 도라지 재배 및 생산현황

구분	농가수(호)	재배면적(ha)	수확면적(ha)	단수(kg/10a)	생산량(M/T)
길경 도라지 (경작지/임야)	9,791	1,481	1,187	17,760	7,577

출처 : 특용작물생산현황, 농림축산식품부 2016

(2) 농림축산부의 통계자료에 의하면 1991년도부터 2011년도까지 국내의 도라지 생산량을 조사한 바에 의하면 1991년도에는 5,255톤이었으나 점차 감소하여 2002년도에는 2,697톤으로 약 절반까지 감소하였으나, 2006년도부터 다시 증가하기 시작하여 2011년도에는 6,759톤으로 다시 2.5배까지 증가하였으며 이러한 추세는 향후 수년간 지속될 것으로 전망된다.

(3) 경상남도는 최근 도라지의 재배농가가 크게 증가하여 생산량 역시 증가하여 2019년 912톤, 2010년 1,100톤, 2011년 719톤 생산하여 이는 전국에서 강원도에 이어 두 번째로 많은 것으로 조사되었음(Fig. 1-1)

(4) 경상남도의 시·군별 도라지 생산 현황을 보면 거창군에서 가장 많은 생산량을 보여 2009년도에는 447톤, 2010년도에는 743톤이었으나 2011년도에는 다소 감소하여 299톤을 생산, 두 번째로는 산청군으로서 2009년도에 185톤, 2010년도에 155톤, 2011년도에 143톤을 생산 및 그 외의 시군은 20톤에서 50톤을 생산. 특히, 한방특화 웰니스산업 중심 네 개 군에서 약 90% 이상을 생산하고 있음

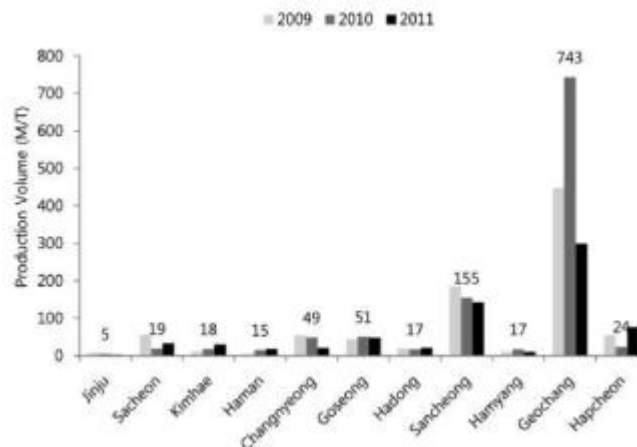


Fig. 1-1. 경상남도 도라지 생산량. 출처: 한국국제농업개발학회지, 2014년

(5) 한편 도라지는 전통적으로 기관지 질환에 사용되어 왔는데, 기관지, 천식의 효능이 알려져 있으며, 주요 약리 성분으로는 triterpenoid계 saponin으로 platycodin A, C, D와 polygalacin D 등의 성분이 알려져 있고 이 중에서 platycodin D는 동물실험에서 진해 거담작용, 중추신경 억제작용, 혈당강화작용 및 콜레스테롤 대사개선작용, 항암활성 효과, 항염증 효과, 항비만 효

과가 밝혀져 있지 않다.

(6) 그러나, 도라지 가공품으로는 경남 진주 소재 (주)장생도라지를 필두로 도라지환, 도라지 사탕, 도라지 칩출주, 도라지청, 도라지 절편 등의 단순 1차 가공품이 주를 이루고 있어 한방 항노화 소재로써 가치를 창조하고 한방특화 웰니스 관광산업과의 연계를 위해 고부가가치 건강기능식품 개발이 필요한 실정이다.

(7) 도라지의 단가(가격/kg)는 평균단가가 13,700원/kg으로 거래되고 있는 것으로 조사되었다 (농수산물도매시장).

### 나. 간 건강 관련 건강기능성식품 시장

(1) 식품의약품안전처는 2015년 건강기능식품 생산실적은 1조 8,230억원으로 2014년(1조 6,310억원)에 비해 11.8% 증가하였으며, 건강기능식품 생산은 2011년 이후 연평균 성장률 7.4%를 기록하며 지속적으로 성장하고 있다고 발표하였다(Fig. 1-2).

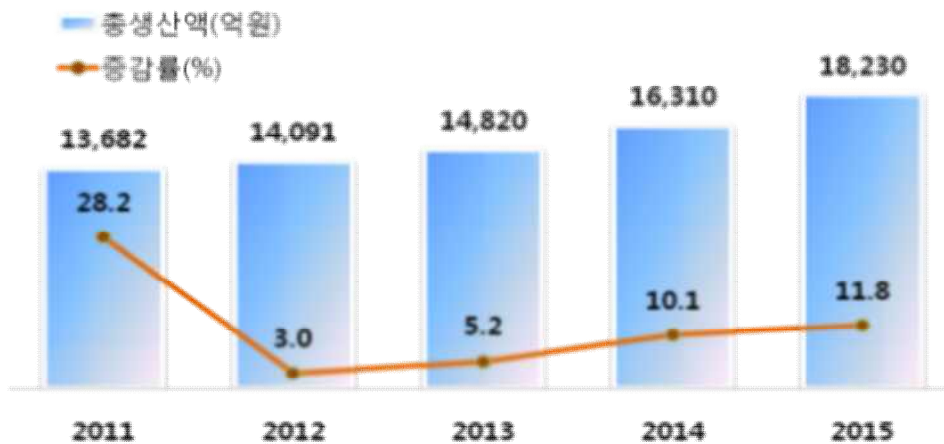


Fig. 1-2. 연도별 건강기능식품 생산실적 (2011~2015). 출처: 식품의약품안전처, 2016년 (2015.12.31.기준, 출처: 식약처)

(2) 2015년 국내 건강기능식품 시장규모는 2조 3,291억원으로 2014년(2조 52억원)에 비해 16.2%가 증가하였으며, 2011년 이후 지속적으로 성장하고 있다(표 3-2).

Table 1-2. 건강기능식품 국내 시장규모 (단위: 억원)

구분	2011	2012	2013	2014	2015
생산액	13,682	14,091	14,820	16,310	18,230
수입액	3,729	3,532	3,854	4,412	5,965
수출액	556	584	754	670	904
국내 시장규모	16,855	17,039	17,920	20,052	23,291

\* 시장규모 = 생산+수입-수출

\*\* 1\$=1,108원('11), 1,126원('12), 1,095원('13), 1,053원('14), 1,131원('15)

출처: 식품의약품안전처, 2016

(3) 품목별로는 홍삼제품의 생산실적이 6,943억원으로 전체 생산실적(1조 8,230억원)의 38.1%를 차지하여 가장 높은 점유율을 보였으나, 2011년 이래 점유율이 점차 감소하고 있다.

(4) 홍삼제품 다음으로는 개별인정형 17.5%(3,195억원), 비타민·무기질 11.4%(2,079억원), 프로바이오틱스 8.7%(1,579억원), **밀크씨슬추출물 3.9%(705억원)** 제품 순으로 나타났다. (\*밀크씨슬 추출물: 실리마린 성분이 활성산소로부터 간세포를 보호하는 항산화작용 등으로 간 건강에 도움을 주는 건강기능식품) (Table 1-3)

(5) 밀크씨슬추출물 제품은 2015년에 개별인정형 원료의 독점적 사용권(3년)이 소멸되어 생산이 급증한 것으로 분석되었고, 프로바이오틱스 제품은 유산균과 장내면역, 장내미생물의 중요성에 대한 소비자의 인식이 높아진 데 따른 것으로 풀이된다.

Table 1-3. 2015년 품목별 생산실적 및 추이 (2011~2015)

순위	구분	2015		2014	2013	2012	2011
		생산실적 (억원)	점유율 (%)				
	계	18,230	100	16,310	14,820	14,091	13,682
1	홍삼	6,943	38.1	6,330	5,869	6,484	7,191
2	개별인정형*	3,195	17.5	3,177	2,324	1,807	1,433
3	비타민 및 무기질	2,079	11.4	1,415	1,747	1,646	1,561
4	프로바이오틱스	1,579	8.7	1,388	804	518	405
5	<b>밀크씨슬 추출물</b>	<b>705</b>	<b>3.9</b>	<b>676</b>	<b>308</b>	<b>135</b>	<b>138</b>
	누계 (5품목)	14,501	79.5	12,987	11,052	10,590	10,728
6	알로에	560	3.1	575	628	687	692
7	EPA 및 DHA 함유 유지	485	2.7	396	490	497	509
8	인삼	307	1.7	426	466	450	381
9	가르시니아카보지아추출물	277	1.5	221	541	440	207
10	루테인	204	1.1	111	95	118	52
	누계 (10품목)	16,333	89.6	14,716	13,272	12,782	12,569
11	기타품목	1,897	10.4	1,594	1,548	1,314	1,113

출처: 식품의약품안전처, 2016년

(6) 2015년 기준 국내 건강기능식품의 기능성별 생산실적으로 살펴보면 항산화 관련 제품의 점유율이 17.9%로 가장 높았고, 면역기능(17.4%), 기억력 개선(15.5%), 혈행 개선(15.4%) 제품 순으로 나타났다(그림 3-3).

(7) 간 건강 관련 분야는 전체에서 약 2% 시장점유율을 보이며, 총 매출액은 2014년 692.1억원에서 2015년 990.5억원으로 증가추세를 보인다(그림 3-3).

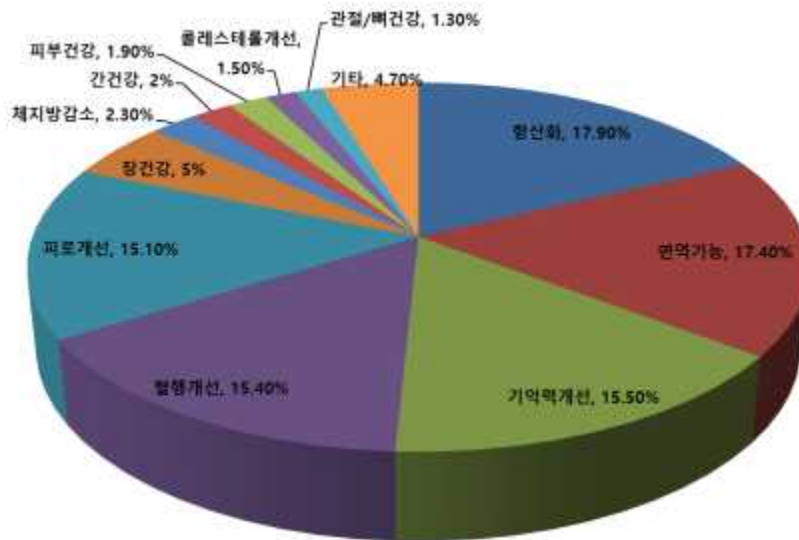


Fig. 1-3. 연기능성별 건강기능식품 생산실적 (점유율).

출처 : 2015년 건강기능식품 국내시장규모 동향분석, 한국식품안전관리인증원

(6) 지난 해 생산 실적 중 개별인정형 건강기능식품은 당귀혼합추출물(면역기능)이 714억원으로 1위(22.3%)를 차지하였으며, 백수오등복합추출물(갱년기 여성건강)이 380억(11.9%), 황기추출물등복합물(키 성장)이 266억원(8.3%), 헛개나무과병추출분말(간 건강)이 255억원(8.0%), 미역등 복합추출물(체지방 감소)이 183억(5.7%) 등의 순으로, 간 건강 관련 헛개나무과병추출분말의 생산실적은 2015년 기준으로 4위를 차지하였다.

(7) 이는 알콜성 손상으로부터 간을 보호하는데 도움을 주는 헛개나무과병추출분말을 함유한 숙취해소제, 건강기능식품의 소비자 수요가 높음을 알 수 있다.

(8) 현재 식품의약품안전처에 간 건강 관련 기능성원료로 등재되어 있는 품목으로는 아래와 같았다(Table 1-4).

Table 1-4. 간 건강 기능성원료 현황

구 분	내 용
인정된 기능성 원료	밀크씨슬추출물, 브로콜리스프라우트분말, 표고버섯균사체, 표고버섯균사체추출물, 복분자추출분말, 헛개나무과병추출물, 유산균발효다시마추출물

출처: 식품의약품 안전처, 2016년

(9) 다음은 2015년 기준 간 건강 기능성 원료 중 대표적인 밀크씨슬 추출물과 헛개나무과병추출분말의 상위 5개 업체 매출액에 관한 표로, 밀크씨슬추출물과 헛개나무과병추출분말 원료 모두 (주)한국야쿠르트의 매출이 각 503.7억, 168억원으로 압도적으로 상위 1위를 차지하면서 간 건강 기능성 원료의 국내 시장을 선도하고 있는 것으로 파악된다(Table 1-5 & Fig. 1-4).

Table 1-5. 간 건강 기능성원료별 상위 5개 업체 매출액

품목	순위	업체명	총 매출액
밀크씨슬 추출물	1	(주)한국야쿠르트	503.7
	2	(주)네이처텍	25.9
	3	코스맥스바이오(주)	25.8
	4	콜마비엔에이치(주)	20.2
	5	(주)에스트라	19.1
헛개나무과병추출분말	1	(주)한국야쿠르트	168.0
	2	(주)뉴메드	33.7
	3	코스맥스바이오(주)	29.6
	4	농업회사법인 주식회사 생명의나무	18.1
	5	(주)아리바이오	2.7

출처 : 2015년 건강기능식품 국내시장규모 동향분석, 한국식품안전관리인증원, 2016년

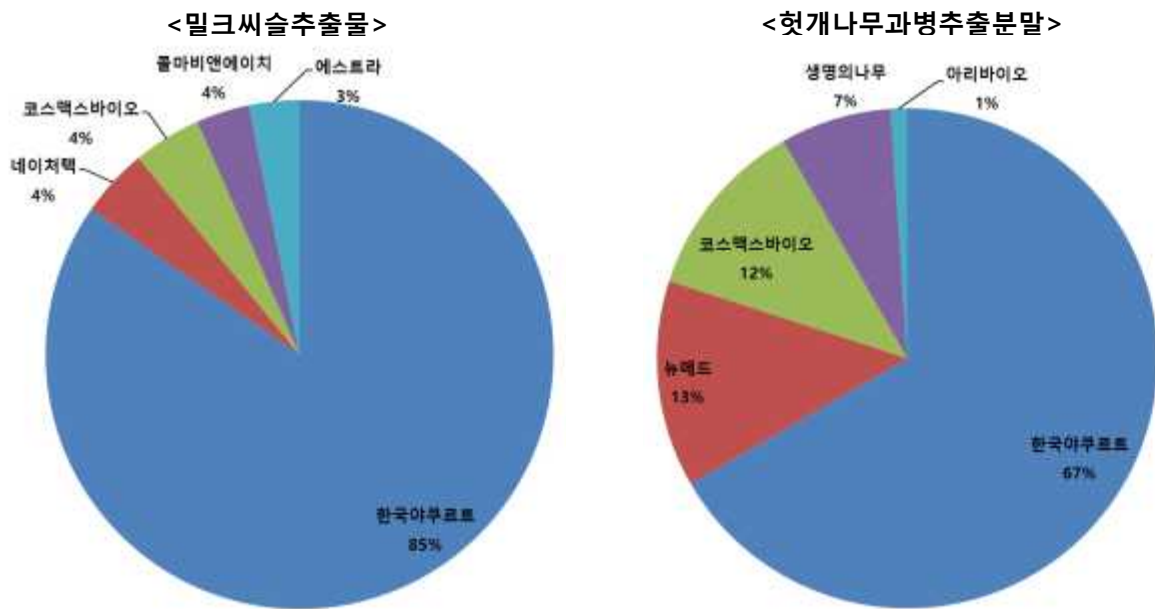


Fig. 1-4. 간 건강 기능성 원료 상위 5개 업체 점유율.

출처 : 2015년 건강기능식품 국내시장규모 동향분석, 한국식품안전관리인증원, 2016년






(10) 식품의약품안전처에 인증된 원료로 만들어진 상용화된 건강기능식품은 쿠퍼스(한국야쿠르트), 헬프칸(CJ뉴트라), 헤파칸(일진제약), 헤파글루칸(대웅제약), 헤파밸런스(보령제약), 헤파셀리아(한국마그나스) 등이 있다(Table 1-6).

(11) ‘쿠퍼스 프리미엄’은 연 매출 1,000억원 이상으로 간 건강기능식품으로써 가장 대중적인 제품으로 자리잡았으며, 일본의 ‘우콘의 치카라(울금의 힘)’는 시장 점유율이 40%에 이를 정도로 인기를 끌고 있는 상품이다(Table 1-7).

**Table 1-6. 국외 간 건강 관련 주요 건강기능식품**

기업	제품명	원료
하우스식품(JP)	울금의 힘	울금
Sabinsa Japan (JP)	쿠르쿠민 C3 복합체	울금
마르하니치로(JP)	SFD	꿀
ILS(JP)	간-Hi	돼지 간 효소 분해
일유(日油)(JP)	쌀 코사놀	폴리코사놀 함유 쌀겨
Natures way(US)	Thisilyn	밀크시슬
Nutraceutical corporation(US)	SOLARAY	밀크시슬

**표 1-7. 국내 간 건강 관련 주요 건강기능식품**

기업	제품명	원료	제품
한국야쿠르트	쿠퍼스 프리미엄	헛개나무과병추출분말 밀크씨슬추출물 프로바이오틱스	
CJ	헬프칸	헛개나무과병추출분말	
일진제약	해파칸	헛개나무과병추출분말	
대웅제약	해파글루칸	표고버섯 균사체, 헛개나무과병추출분말, 밀크씨슬추출물	
보령제약	해파멜런스	표고버섯 균사체, 헛개나무과병추출분말, 밀크씨슬추출물	

**다. 숙취해소음료 시장**

(1) 숙취해소음료 시장은 기능성 음료 시장에서 가장 높은 판매액을 보이고 있으며, 이들은 보통 간 건강을 표방하는 경우가 많은 것으로 사료된다(표 Table 1-8).

(2) 숙취해소식품 시장은 크게 성장하고 있으며, 숙취해소식품 매출이 빠르게 증가하면서 제약, 식품 업계에서는 기존 음료형 외에 젤리형, 아이스크림 등 다양한 제품을 출시하고 있다.

**Table 1-8. 연도별 숙취해소음료 시장규모**

연도	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
시장규모 (억원)	600	700	860	1,140	1,345	1,645	2,058	1,901	1,865	1,966

출처 : 닐슨코리아, 특허청 보도자료 2015년

(3) 2005년 600억원 규모였던 숙취해소음료 시장은 2014년 1,966억원으로 크게 성장하였으며, 관련 제품에 대한 연구도 활발한 상황이다.

(4) 특허청에 따르면, 2005년부터 2014년까지 10년간의 숙취해소음료 관련 특허출원 건수는 총 359건으로(Table 1-9), 2010년까지 매년 30건 내외로 출원되던 것이 2010년부터는 연평균 9.2%로 꾸준히 증가하여 2014년에는 총 44건에 달한 것으로 나타났다(Fig. 1-5).

Table 1-9. 연도별 숙취해소음료 특허출원 현황

연도	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
특허출원 (건)	30	32	31	30	41	31	37	40	43	44

출처 : 특허청 보도자료 2015년



Fig. 1-5. 연도별 숙취해소음료 특허출원 건수. 출처 : 특허청 보도자료 2015년

(5) 특히 숙취해소 기능성 음료 시장은 CJ헬스케어의 CJ헛개컨디션(점유율 43.6%)과 그래미의 여명808(31.7%), 동아제약의 모닝케어(13.9%)의 3강 구도를 이루고 있다(Fig. 1-6).

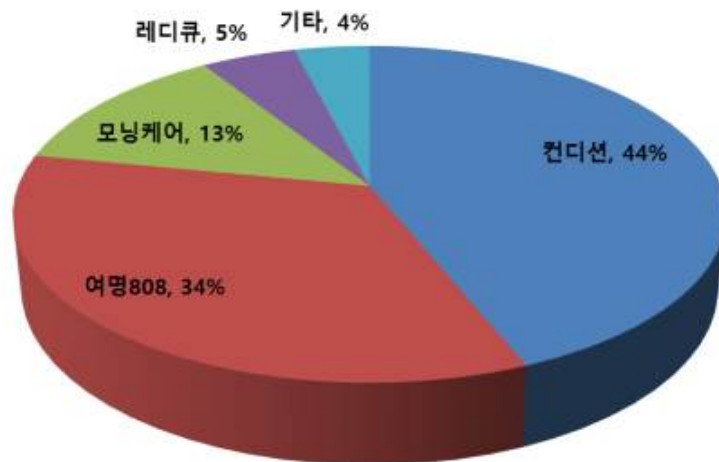


Fig. 1-6. 숙취해소제 시장 점유율 (2015년). 출처 : 링크아즈텍



(6) CJ헬스케어의 ‘컨디션’ 제품은 지속적인 연구개발을 통해 지금까지 총 6번의 업그레이드를 진행하였으며, 2012년엔 기존 제품보다 100% 국산 헛개나무열매추출물을 30% 강화한 ‘헛개컨디션’으로 리뉴얼하여 출시하였다(Table 1-10).

**Table 1-10. 국내 주요 숙취해소음료 비교**

제품명	헛개컨디션	여명808	모닝케어
기업명	CJ제일제당	그래미	동아제약
주성분	헛개나무 열매농축액 미배아추출물(글루메이트) 효모추출물혼합분말, 자리, 황기-로터스 추출물 등	여명농축액(오리나무, 대추, 생강) 혼합농축액(마가목, 감초, 갈화, 갈근, 사인, 박, 꿀)	유산균발효다시마추출물, RSE(미배아대두 추출액), 밀크씨슬추출물, 과라나추출물 벌꿀, 갈근추출분말 등
유형	혼합음료	액상차	건강기능식품

**Table 1-10. 국내 주요 숙취해소음료 비교**

제품명	기업명	주성분	유형
헛개컨디션	CJ제일제당	헛개나무 열매농축액 미배아추출물(글루메이트) 효모추출물혼합분말, 자리, 황기-로터스 추출물 등	혼합음료
여명808	그래미	여명농축액(오리나무, 대추, 생강) 혼합농축액(마가목, 감초, 갈화, 갈근, 사인, 박, 꿀)	액상차
모닝케어	동아제약	유산균발효다시마추출물, RSE(미배아대두 추출액), 밀크씨슬추출물, 과라나추출물 벌꿀, 갈근추출분말 등	건강기능식품

(7) 숙취해소 음료 시장은 기존에 헛개음료를 위주로 시장이 형성되어 있었는데, 최근에는 강황(울금)을 주제로 한 숙취해소 음료가 맞붙고 있는 형세를 보인다.

(8) 대표적으로 동아제약에서는 항암 및 항산화 효과로 잘 알려진 강황 성분을 10배 이상 증량시킨 ‘모닝케어 강황’ 까지 제품 포트폴리오를 확대하였다.

(9) 컨디션과 모닝케어 등의 장수 브랜드들 외에도 최근에는 신규 브랜드들의 출시가 활발한데, KGC인삼공사 정관장은 인삼공사의 특성을 살려 6년근 홍삼과 숙취해소에 좋은 10여가지

다양한 소재를 결합해 만든 ‘정관장 369’ 를 출시하였다.

Table 1-11. 국내 숙취해소음료 주요 제품

기업	제품명	원료	제품
CJ헬스케어	컨디션	헛개나무 열매 미배아대두발효추출물	
동아제약	모닝케어	유산균 발효다시마추출물 미배아대두발효추출물 (*모닝케어 강화 : 강화, 마름 추출물)	
한독약품	레디큐	헛개나무과병추출분말 커큐민(울금 추출물)	
이마트	울금 500	커큐민	
KGC인삼공사	정관장 369	홍삼	
CJ헬스케어	헛개수	헛개나무열매추출농축액	
광동제약	힘찬하루 헛개차	헛개나무열매추출농축액	

**라. 주요기업 보유 특허**

(1) 식품의약품안전처에 인증된 원료로 만들어진 상용화된 건강기능식품은 쿠퍼스(한국야쿠르트), 헬프칸(CJ뉴트라), 헤파칸(일진제약), 헤파글루칸(대웅제약), 헤파밸런스(보령제약), 헤파셀리아(한국마그나스) 등이 있다.

(2) 그 중 간 건강 관련 기능성 식품 시장에서 점유율 1위를 차지하고 있는 한국야쿠르트의

간 건강 관련 특허를 조사한 결과 아래와 같은 특허가 다수 조사되었으며, 대부분 간기능 개선, 혈중 알코올 감소 및 체내 항산화에 유효한 조성물에 관한 기술로서 그 조성물은 밀크씨슬 추출물과 락토바실러스 등 유산균, 미강 발효 추출물 등을 포함하고 있다(Table 1-12).

(3) 특히 출원번호 제10-2004-0072213호의 ‘간장 보호 및 혈중 알코올 분해에 유효한 조성물’은 가시오가피 추출물, 갈근 추출물, 구기자 추출물, 오리목 추출물, 꿀풀 추출물 또는 밀크씨슬 추출물 중에서 3가지 성분을 주원료로 하고 순무 농축액, 생두-미강 발효 추출물을 부원료로 하는 5가지 유효성분을 함유한 기능성 조성물로서, 한국야쿠르트의 상용화 제품인 쿠퍼스와 관련된 특허로 파악되었다(Table 1-12).

**Table 1-12. 한국 야쿠르트의 간 기능 개선 관련 주요특허**

No	발명의 명칭	출원번호	출원일
1	사과박 주정 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물	10-2015-0132869	2015-09-21
2	고인슐린혈증, 고혈당증 및 고중성지방혈증을 개선하는 효능을 갖는 락토바실러스 커베터스 에이취와이7601과 락토바실러스 플란타룸 케이와이1032를 유효성분으로 함유하는 제품	10-2011-0134689	2011-12-14
3	간기능 개선과 고인슐린혈증, 고혈당증 및 고중성지방혈증을 개선하는 효능을 갖는 락토바실러스 커베터스 에이취와이7601과 락토바실러스 플란타룸 케이와이1032를 유효성분으로 함유하는 제품	10-2011-0134689	2011-12-14
4	간 기능 개선, 혈중 알코올 감소 및 항산화에 유효한 조성물	10-2005-0032417	2005-04-19
5	<b>간장 보호 및 혈중 알코올 분해에 유효한 조성물</b>	<b>10-2004-0072213</b>	<b>2004-09-09</b>
6	알코올과 아세트알데하이드를 분해하는 젓산균	10-2004-0098717	2004-11-29
7	간장 보호 및 혈중 알코올 분해에 유효한 조성물	10-2004-0072213	2004-09-09
8	유산균을 함유한 과일젤리의 제조방법	10-1994-0027414	1994-10-26

출처 : 특허청

(4) 헛개나무를 유효성분으로 하는 간 건강 관련 국내 특허 조사결과 다음과 같은 주요특허가 조사되었다.

(5) 헛개나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 간 건강 관련 특허를 출원한 출원인으로는 (주)에니캠, 주식회사 블루텍, 농업회사법인 생명의나무, (주)리즈바이오텍, (주)네추럴에프엔피 등의 기업과 대부분 개인 출원인이 많이 조사되었다(Table 1-13).

(6) (주)에니캠은 헛개나무 추출액, 헛개나무 추출물, 헛개나무 정제물 등을 함유하는 알코올 음료 관련 특허를 2015년에 출원하였으며, 네추럴에프엔피에서는 손바닥 선인장 (*Opuntia ficus*

*indica*), 오리나무 (*Alnus japonica* STEUD.), 갈근 (*Pueraria lobata* (WILLD.), OHWI) 및 헛개나무 (*Hovenia dulcis* THUNB.)로 구성된 복합생약추출물을 함유하는 숙취해소 및 간장 보호를 위한 기능성 식품 조성물에 대해 특허를 출원하였다(Table 1-13).

(7) (주)한독에서는 유효성분으로 생체 이용률 및 생체 흡수율이 개선된 미분화된 커큐민 및 헛개나무 추출물을 함께 함유하는 숙취 해소 또는 예방용 조성물에 대한 특허를 출원하였으며, 이와 관련하여 레디큐로 제품을 상용화시킨 것으로 사료된다(Table 1-13).

(8) 식품의약품안전처에 인증된 원료인 헛개나무과병추출물은 일일섭취량이 2,460mg/일로 고시되어 있으며, 헛개열매는 최소 kg 당 30,000원에 판매되고 있는 것으로 파악된다.

(9) 도라지의 경우 kg당 단가가 13,700원이며 헛개열매와 비교하여 약 3분의 1 정도로, 도라지 추출물을 함유하는 제품의 상용화 시에는 일일 섭취량이 약 7.3g/일까지 경제적으로 유사한 이익을 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

**Table 1-13. 헛개나무 포함 간 건강 관련 주요특허**

No	발명의 명칭	출원번호	출원인
1	헛개나무 추출물을 포함하는 알코올 음료 맛 개선용 조성물, 이를 포함하는 알코올 음료 조성물 및 알코올 음료 조성물의 제조방법	10-2015-0159991	(주)애니캠
2	헛개나무 씨 추출물 또는 그로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 하는 간독성 질환 치료, 예방 또는 개선용 조성물	10-2013-0127241	농업회사법인 주식회사 생명의 나무
3	헛개나무 추출물로부터 유래된 화합물, 이를 포함하는 헛개나무 추출물, 및 헛개나무 추출물을 함유하는 알코올 음료의 맛 개선용 조성물	10-2013-0053918	(주)애니캠
4	손바닥 선인장, 오리나무, 갈근 및 헛개나무의 복합생약추출물을 함유하는 숙취해소용 조성물	10-2004-0070265	(주)네추럴에프앤피
5	헛개나무 어린 가지로부터 분리된 간독성, 숙취 및 피로해소 활성을 갖는 저급알콜 불용성 추출분획 및 다당체 물질 및 이를 함유한 조성물	10-2002-0002770	농업회사법인 주식회사 생명의 나무/대한민국
6	커큐민을 함유하는 숙취해소용 제제	10-2015-0115448	(주)한독

출처 : 특허청

## 2-1. 2차년도 연구수행 방법

### 가. 간 기능과 면역기능 관련 건강기능식품 등의 시장조사

(1) 시장조사 : 분석 대상기술 예상 적용 분야에 대한 성장성과 가능성을 탐색하여 궁극적

으로 시장 환경에 적합한 성과 확산 전략 도출을 위한 기반을 마련하는 단계로서 주요 구성 내용은 아래와 같음

**(2) 문헌 자료 분석을 통해 관련 기술 또는 제품의 시장동향 분석**

- (가) 국내외 시장조사 전문기관의 시장보고서(Datamonitor) 분석
- (나) 관련 협회 및 단체의 시장 통계 분석
- (다) 국내외 정부부서의 통계자료 이용
- (라) 각국의 무역 통계 조사

**(3) 관련업체 동향 분석을 통한 시장 및 제품 환경 분석**

- (가) 관련업체별 시장점유현황 조사
- (나) 시장의 관련 제품 포트폴리오 분석
- (다) 산업 및 시장 특성, 경쟁 특성 분석
- (라) 제품 개발에 있어서의 주요기업간의 특허 Pool 및 Alliance 분석
- (마) 주요경쟁기업분석을 통한 유사/경쟁; 대체 기술 유무 및 상호경쟁력 분석

**(4) 적용제품 및 시장 특성분석** : 해당 기술이 적용될 수 있는 제품(또는 공정)을 구체적으로 제시하고, 시장의 규모 및 수요처의 특징, 내수 또는 수출위주, 시장에 영향을 미치는 요인, 수요 및 공급의 특성 등 시장특성을 분석

**(5) 향후전망 예측**

- (가) 수요 및 시장 변화 예측
- (나) 관련 업체별 시장점유율 현황 파악을 통한 향후 5년간 가능 판매량 예측
- (다) 업체별 현황 분석을 통한 향후 시장 변화 예측

**(6) 시장동향 분석 개발하고자 하는 기술 혹은 개발완료 상태인 기술에 대한 시장성 분석과 경쟁력 분석 포함**

(가) 시장성 분석은 대상 기술이 목표하는 시장의 특성이나 잠재적인 전망을 고려하였을 때 분석대상 기술에 대한 지속적인 개발을 통하여 성과 확산을 도모할 수 있는지와 그 가치가 충분히 매력적인지에 관한 평가를 하기 위해서 응용분야의 시장규모와 성장성 분석

(나) 경쟁력 분석은 목표하는 시장 및 산업 환경의 경쟁을 형성하는 요소들을 이해함으로써 대상 기술의 강점과 약점이 무엇인지 도출하며 궁극적으로 시장진입 시 경쟁력을 확보할 수 있는지 여부를 예측하기 위한 과정

**나. 간 기능과 면역기능 관련 특허 동향 조사**

**(1) 특허 동향 분석**

(가) 특허정보는 산업과 매우 밀접한 관계로 발전하고 있는 과학기술 활동을 이해하는데 있어서 매우 유용한 정보이며, 과학기술 성과지표로서 많은 장점과 잠재력을 갖고 있음

(나) 특허 출원, 등록에 관한 다양한 정량적 통계자료를 이용하여 특정기술 분야의 기술변화속도와 방향을 분석하고 기술수준을 비교분석하여 개별 기업의 기술전략 수립에 있어서의 사결정정보로 활용이 가능함

(다) 특허정보는 기술획득전략, 신사업 및 신제품 기획, 특허라이선싱 전략, 특허포트폴리오 전략, 특허침해 대응, 특허성 조사 등 다양한 분야에 활용되고 있으며, R&D 기획에 있어서 연구과제의 사전타당성을 확보할 수 있는 데이터를 제공함

(라) R&D 기획에서 특허분석을 통해 연구과제가 특정 분야에서 어떤 위치에 속하는 지 파악할 수 있으며, 원천특허가 될 수 있는 기술개발 영역에 대한 정보를 얻을 수 있음. 또한 유사 기술을 확보하고 있는 출원인 현황을 파악하여 공동협력을 추진하거나 특허침해를 사전에 방지할 수 있음

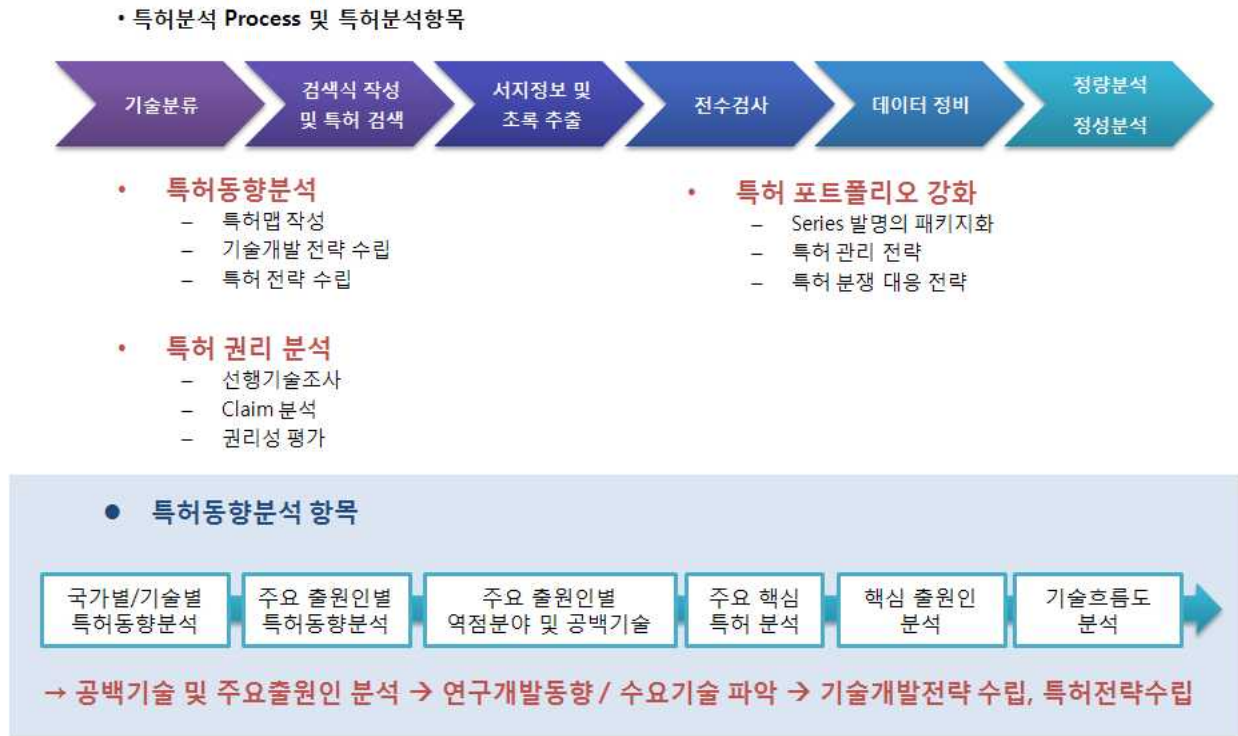


Fig. 2-1. 특허 분석 process 및 특허 분석 항목.

## 2-2. 2차년도 연구결과

### 가. 간 기능 관련 건강기능식품 시장 동향

#### (1) 전체 건강기능식품 시장 :

(가) 세계 건강기능식품(Global Nutrition Industry) 시장규모는 2012년 약 3,464억 달러로 전년 대비 7.1% 성장하였으며, 그 중 우리나라 건강기능식품과 유사한 것으로 분류되는 Supplements 시장규모는 961억 달러인 것으로 나타남

(나) Supplements 시장규모는 최근 4년간 연평균 성장률이 6.2%로 2012년에는 약 1,677억 달러에 이를 것으로 전망됨

(다) 2015년 국내 건강기능식품 시장규모는 2조 3,291억원으로 2014년(2조 52억원)에 비해 16.2%가 증가하였으며, 2011년 이후 연평균 성장률 13.2%로 지속적으로 성장하고 있음

(라) 건강기능식품 총 생산액 또한 2015년 1조 8,230억원으로 2014년(1조 6,310억원)에 비해 11.8% 증가하였으며, 건강기능식품 생산은 2011년 이후 연평균 성장률 7.4%를 기록하며 지속적으로 성장하고 있음

(마) 최근 건강에 대한 관심이 높아지면서 새로운 기능성을 찾는 다양한 계층의 소비자 욕구가 반영되어 성장세가 지속되는 것으로 분석되며, 고령화와 소득수준 향상으로 건강기능식품의 꾸준한 성장세가 이어질 것으로 예상됨

(바) 식약처는 ‘건강기능식품 공전’에 등재된 기능성 원료와 개별인정 원료를 바탕으로 다양한 기능의 건강기능 식품을 구분하였으며, 간 건강, 갱년기 남성/여성 건강, 과민피부상태 개선, 관절/뼈 건강 등 총 32개 생리활성 기능에 대해 고시해 보다 구체적인 기능성으로 건강기능식품 시장이 확대되도록 하고 있음

**Table 2-1. 품목별 세계 건강기능식품 시장규모** (단위 : 억 달러, %)

구분		2009	2010	2011	2012	2013(e)	2014(e)	2015(e)	2020(e)
Supplements	매출액	803	846	902	961	1,034	1,100	1,179	1,677
	성장률	4.8	5.4	6.5	7.0	7.6	6.4	7.1	7.3
Natural/ Organic Food	매출액	782	838	915	1,010	1,116	1,231	1,357	2,255
	성장률	3.8	7.02	9.2	10.3	10.5	10.4	10.2	9.8
N & OPC & Household Product	매출액	285	310	339	374	411	452	496	767
	성장률	5.2	8.7	9.4	10.3	9.9	9.8	9.7	8.7
Functional Food	매출액	964	1,009	1,061	1,119	1,180	1,247	1,315	1,696
	성장률	2.3	4.7	5.1	5.5	5.5	5.7	5.5	5.2
Total	매출액	2,834	3,004	3,217	3,464	3,741	4,029	4,347	6,394
	성장률	3.7	6.0	7.1	7.7	8.0	7.7	7.9	7.8

출처 : 2014 건강기능식품 시장현황 및 소비자 실태조사, 한국건강기능식품협회

**Table 2-2. 국내 건강기능식품 시장규모**

구분	2011	2012	2013	2014	2015	CAGR(%)
시장규모(억원)	16,855	17,039	17,920	20,052	23,291	13.2
전년대비 성장률(%)	31.6	1.1	5.2	11.9	16.2	

출처 : 식품의약품안전처 보도자료, 2016



**Fig. 2-2. 연도별 건강기능식품 생산실적('11~'15).** 출처 : 식품의약품안전처 보도자료, 2016

Table 2-3. 건강기능식품 기능성별 분류

번호	기능성	번호	기능성	번호	기능성
1	간 건강	12	어린이 키 성장에 도움	23	치아 건강
2	갱년기 남성 건강	13	여성 질 건강 (유산균 증식을 통한)	24	칼슘 흡수 촉진
3	갱년기 여성 건강	14	월경전 변화에 의한 불편한 상태 개선	25	피로 개선
4	과민피부상태 개선	15	위 건강 / 소화건강	26	피부 건강
5	관절 / 뼈 건강	16	요로 건강	27	항산화
6	기억력 개선	17	운동수행 능력 향상	28	혈당 조절
7	긴장 완화	18	인지능력 향상	29	혈압 조절
8	눈 건강	19	장 건강	30	혈중 중성지방 개선
9	면역 기능 개선	20	전립선 건강	31	혈중 콜레스테롤 개선
10	배뇨기능 개선	21	정자 운동성 개선	32	혈행 개선
11	수면의 질 개선	22	체지방 감소		

출처: 건강기능식품 기능성 원료 인정 현황, 식품의약품안전처, 2016

(사) 건강기능식품 기능성별 생산실적을 살펴보면 면역기능 개선 관련 제품의 점유율이 25%로 가장 높았고, 혈행개선(22%), 항산화(21%), 영양소 보충(7%), 장 건강 (5%) 제품 순이며, 간 기능 관련 분야는 전체에서 약 3% 수준인 것으로 나타남

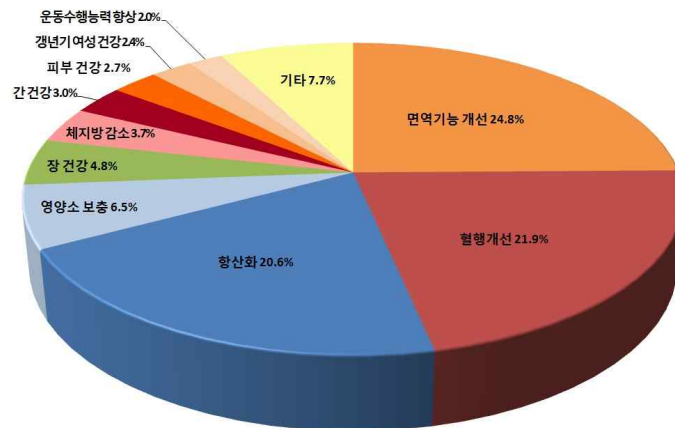


Fig 2-3. 기능성별 건강기능식품 생산실적(점유율). 출처: 식품의약품안전처, 2015

(아) 또한 최근 13년 동안 면역기능 관련 기능성 원료 인정 건수는 17건, 간 건강 관련 기능성원료 인정 건수는 약 10건인 것으로 나타나며 면역기능 및 간 건강 관련 기능성 원료는 2006년 이후로 꾸준히 인정받고 있어, 면역기능 및 간 건강 기능성에 대한 시장이 성장한 것으로 판단됨



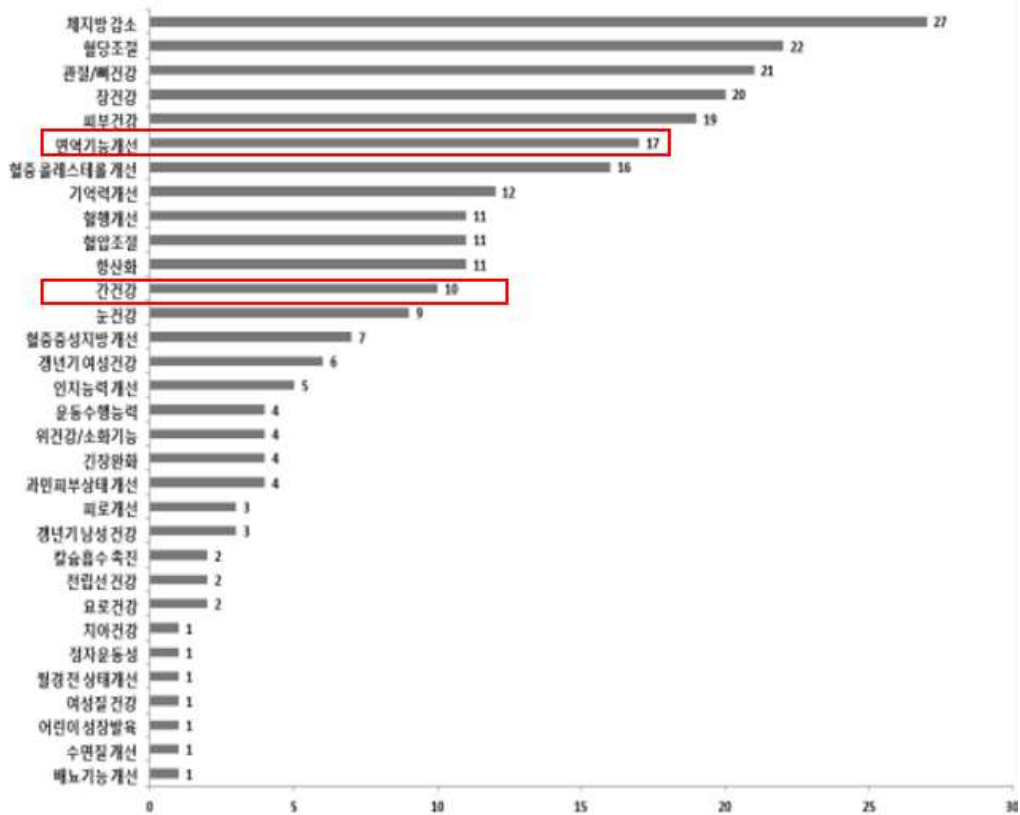


Fig 2-4. 13년간(2004-2016) 기능성별 원료 인정 현황.

출처 : 건강기능식품 기능성 원료 인정 현황, 식품의약품안전처, 2016

(자) 2015년 기준 품목별 생산실적을 보면 면역 기능과 관련된 면역기능 개선 기능성의 **홍삼**제품의 생산실적이 6,943억원으로 전체 생산실적(1조 8,230억원)의 38.1%를 차지하고 있고 개별인정형을 제외하고 고시형 원료 중에서 간 건강과 관련된 **밀크씨슬추출물 3.9%(705억원)** 순으로 나타남

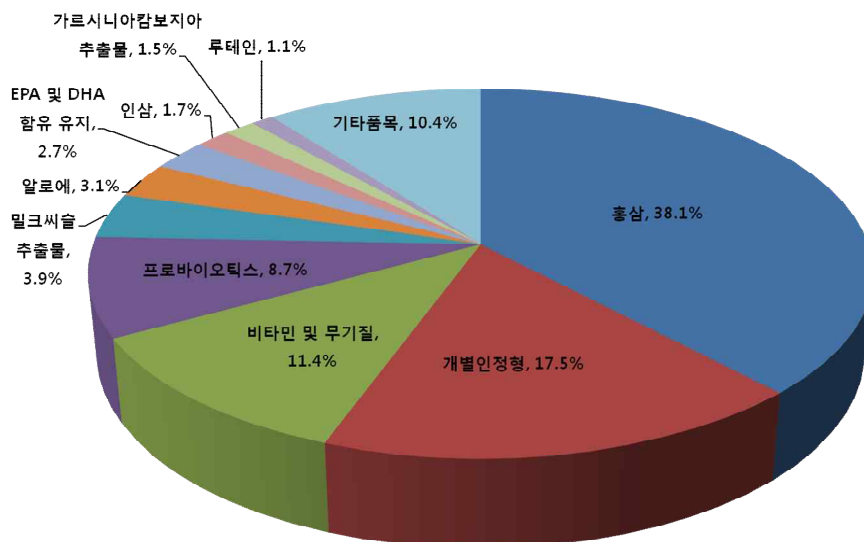


Fig. 2-5. '15년 품목별 점유율. 출처 : 식품의약품안전처 보도자료, 2016

(카) 품목별 중에서도 2015년 개별인정형 제품의 생산은 3,195억 원으로 '14년(3,177억 원)에 비해 0.6% 증가하였으며, 이 중 면역력 증진 원료인 **당귀혼합추출물**이 714억 원으로 1위(22.3%), 알콜성 손상으로부터 간 보호에 도움을 주는 **헛개나무과병추출분말**이 255억 원으로 4위(8.0%)를 차지하는 등 면역력 증진과 간 건강 기능성식품의 시장성이 큰 것으로 파악됨

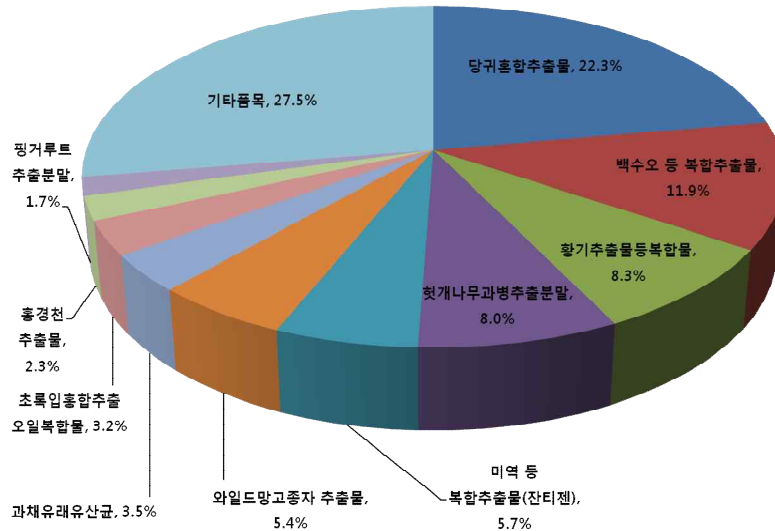


Fig. 2-6. 개별인정형 품목별 점유율('15). 출처 : 식품의약품안전처 보도자료, 2016

(2) 간 기능 관련 건강기능식품 시장 :

(가) 2016년 기준 식품의약품안전처에 간 건강 관련 기능성 원료로 등재되어 있는 품목은 총 10건으로, 도라지추출물, 밀크씨슬 추출물, 발효율금, 표고버섯 균사체, 헛개나무과병추출물 등이 있음

Table 2-4. 간 건강 관련 기능성 원료 (2016년 기준)

기능성	기능성 원료
간 건강에 도움	도라지추출물, 밀크씨슬 추출물, 발효율금, 복분자추출물(분말), 브로콜리스프라우트분말, 표고버섯 균사체추출물(분말), 표고버섯균사체, 유산균발효마늘추출물
알콜성 손상으로부터 간 보호에 도움	유산균 발효 다시마추출물, 헛개나무과병추출물

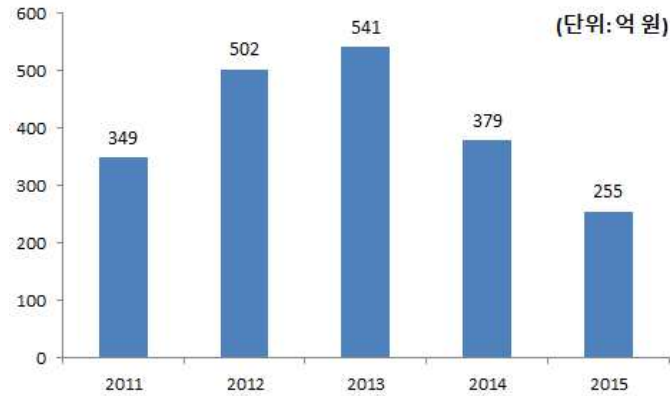
출처: 건강기능식품 기능성 원료 인정 현황, 식품의약품안전처, 2016

(나) 간 건강 기능성 원료 생산실적을 살펴보면, 헛개나무과병추출분말은 2014년 379억 원에서 2015년 255억 원으로 생산 실적이 32.7% 감소하였으며 전체 개별인정형 품목 중 8%를 점유하고 있음

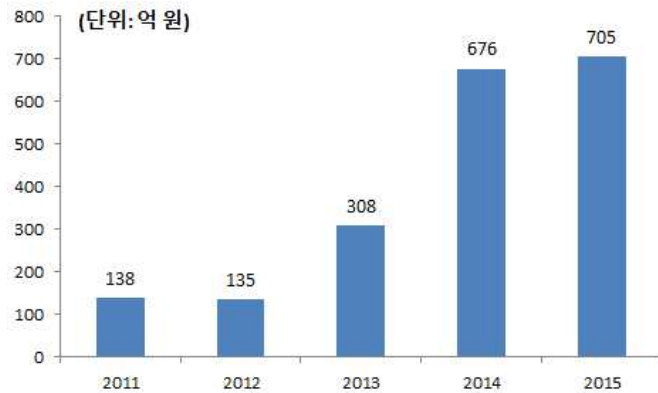
(다) 2013년 이후 생산실적이 감소하고 있음에도 불구하고 전체 개별인정형 품목 중 8%를 점유하고 있다는 점에서 간 건강, 특히 알코올로부터 간의 손상을 보호하고자 하는 니즈가 여전히 많은 것으로 사료 됨

(라) 또한 간 건강 기능성 원료인 밀크씨슬 추출물 생산실적은 2013년 308억 원에서 2014년 676억 원으로 급격히 증가하였으며, 2014년 676억 원에서 2015년 705억 원으로 4.3% 증가하였음

(마) 개별인정형 원료의 독점적 사용권(3년)이 소멸되면서 밀크씨슬 추출물 제품 생산이 급증한 것으로 분석되며, 간 건강 기능성에 대한 수요가 증가하고 있다고 판단됨



**Fig. 2-7. 헛개나무과병추출분말 연도별 생산실적.** 출처 : 식품의약품안전처 보도자료, 2016  
유산균발효다시마추출물, RSE(미배아대두 추출액), 밀크씨슬추출물, 과라나추출물 벌꿀, 갈근추출분말 등



**Fig 2-8. 밀크씨슬 추출물 연도별 생산실적.** 출처 : 식품의약품안전처 보도자료, 2016

(사) 간 건강 기능성 원료별 업체 매출액을 살펴보면, 간 건강 기능성 원료 중 밀크씨슬추출물과 헛개나무과병추출분말 원료 모두 (주)한국야쿠르트의 매출이 각 815.3억, 155.1억원으로 압도적으로 상위 1위를 차지하면서 간 건강 기능성 원료의 국내 시장을 선도하고 있는 것으로 파악됨

Table 2-5. 간 건강 기능성원료별 상위 5개 업체 매출액

품목	순위	업체명	총 매출액
밀크씨슬 추출물	1	(주)한국야쿠르트	815.3
	2	코스맥스바이오(주)	32.2
	3	콜마비엔에이치(주)	26.3
	4	(주)네이처텍	24.1
	5	(주)에스트라	22.6
헛개나무과병 추출분말	1	(주)한국야쿠르트	155.1
	2	농업회사법인 주식회사 생명의나무	38.1
	3	코스맥스바이오(주)	22.7
	4	(주)뉴메드	21.4
	5	주식회사 노바렉스	5.3

출처 : 2016 건강기능식품 국내시장규모 동향분석, 한국식품안전관리인증원, 2017

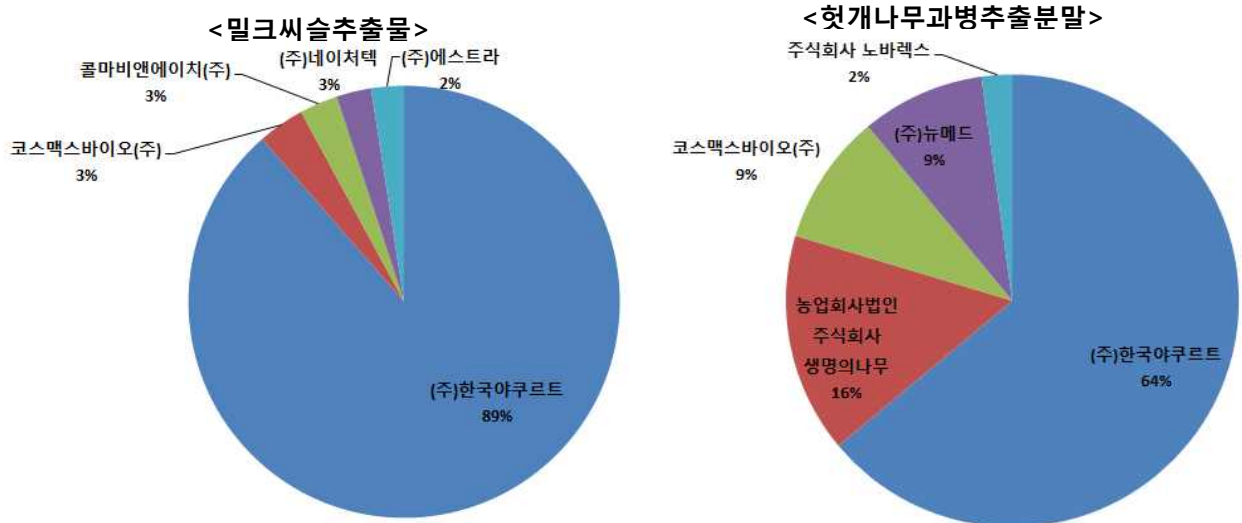


Fig. 2-9. 간 건강 기능성 원료 상위 5개 업체 점유율.

출처 : 2016 건강기능식품 국내시장규모 동향분석, 한국식품안전관리인증원, 2017

(아) 국내 간 기능 관련 건강기능식품은 주로 알콜성 손상으로부터 간 보호에 도움을 주는 헛개나무과병추출물, 간 건강에 도움을 주는 밀크씨슬 추출물을 주원료로 하는 제품들이 많이 출시되고 있으며, 기타 표고버섯균사체추출물, 발효울금 등이 함유된 간 건강 개선을 위한 제품도 시판되고 있음

(자) 식품의약품안전처에 간 기능 관련 기능성 인증된 원료로 만들어진 상용화된 건강기능식품은 쿠파스(한국야쿠르트), 헬프칸(CJ뉴트라), 헤파칸(일진제약), 헤파글루칸(대웅제약), 헤파밸런스(보령제약), 헤파셀리아(한국마그나스) 등이 있음

(카) 특히 ‘쿠파스’는 연 매출 800억원 이상으로 회사 전체 발효유의 매출 10%대에 이르는 상품으로 자리 잡았으며 일본의 ‘우콘의 치카라(울금의 힘)’는 시장 점유율이 40%에 이를 정도로 인기를 끌고 있는 상품임

(타) 미국, 일본 등 국외에서도 밀크씨슬, 울금, 꿀, 효소, 쌀겨 등 다양한 원료를 포함한 간 기능 개선 건강기능식품이 판매되고 있는 것으로 나타남

Table 2-6. 국내 간 건강 관련 주요 건강기능식품

기업	제품명	원료	제품
한국야쿠르트	쿠퍼스	헛개나무	
CJ	헬프칸	헛개나무	
일진제약	헤파칸	헛개나무	
대웅제약	헤파글루칸	표고버섯 균사체, 헛개나무, 밀크씨슬	
보령제약	헤파밸런스	표고버섯 균사체, 헛개나무, 밀크씨슬	

Table 2-7. 국외 간 건강 관련 주요 건강기능식품

기업	제품명	원료
하우스식품(JP)	울금의 힘	울금
Sabinsa Japan (JP)	쿠르쿠민 C3 복합체	울금
마르하니치로(JP)	SFD	굴
ILS(JP)	간-Hi	돼지 간 분해 효소
일유(日油)(JP)	쌀 코사놀	폴리코사놀 함유 쌀겨
Natures way(US)	Thisilyn	밀크씨슬
Nutraceutical corporation(US)	SOLARAY	밀크씨슬

나. 면역 기능 관련 건강기능식품 시장 동향

(1) 면역기능 관련 건강기능식품 시장 :

(가) 면역기능 개선 건강기능식품 기능성 원료 인정 현황을 살펴보면, 면역기능 개선 관련 원료는 총 18종으로 L-글루타민, 게르마늄효모, 금사상황버섯 등이 인정을 받았음

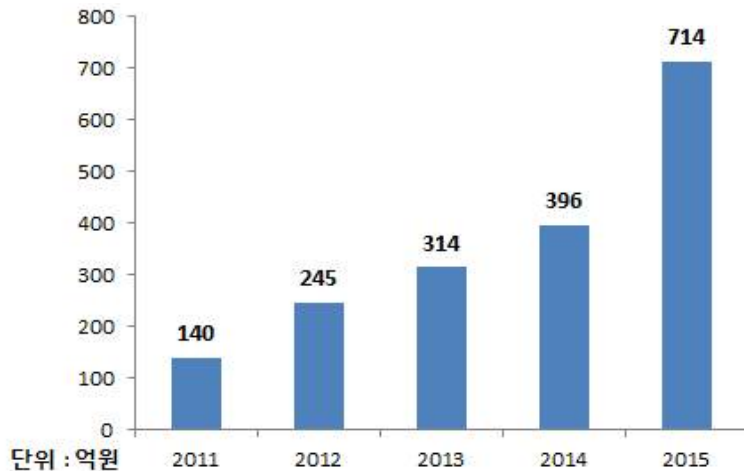
**Table 2-8. 면역기능 개선 기능성 원료 또는 성분 (2016년 기준)**

기능성	기능성 원료
면역기능 개선	L-글루타민, 게르마늄효모, 금사상황버섯, Enterococcus faecalis 가열처리건조분말, 당귀혼합추출물, 동충하초 주정추출물, 스피루리나, 클로렐라, 청국장균배양정제물(폴리감마글루탐산칼륨), 표고버섯균사체, 효모베타글루칸, 인삼다당체추출
	Enterococcus faecalis 가열처리건조분말, 구아바인추출물등복합물, 다래추출물, 소엽추출물, 피카오프레토 분말 등 복합물, 합성 PLAG

출처: 건강기능식품 기능성 원료 인정 현황, 식품의약품안전처, 2016

(나) 면역기능 기능성 원료 생산실적을 살펴보면, 당귀혼합추출물은 2014년 396억 원에서 2015년 714억 원으로 증가율 80%로 생산 실적이 급성장하였으며 전체 개별인정형 품목 중 22.3%를 차지하고 있는 것으로 나타남

(다) 이는 메르스 사태, 일상 속 건강관리에 대한 관심 증가로 면역기능성에 대한 수요가 높아지면서 당귀혼합추출물 생산액도 급증한 것으로 분석됨



**Fig. 2-10. 당귀혼합추출물 연도별 생산실적.** 출처 : 식품의약품안전처 보도자료, 2016

(라) 면역기능 관련 기능성 원료별 업계 매출액을 살펴보면, 당귀혼합추출물 매출액은 콜마비앤에이치(주)가 532.8억으로 면역기능 관련 기능성 원료의 국내 시장을 독점하고 있는 것으로 파악됨. 그 외에도 면역기능 개선 효능이 있는 홍삼의 경우 (주)한국인삼공사가 7,534억 (91%)으로 독보적으로 1위를 차지하고 있음

Table 2-9. 면역기능 관련 기능성원료별 상위 5개 업체 매출액

품목	순위	업체명	총 매출액
당귀혼합추출물	1	콜마비엔에이치(주)	815.3
	1	(주)한국인삼공사 부여공장	4,820.3
	2	(주)한국인삼공사 원주공장	2,714.9
	3	(주)에스트라	310.7
	4	(주)농협홍삼	242.0
홍삼	5	대동고려삼(주)	140.2

출처 : 2016 건강기능식품 국내시장규모 동향분석, 한국식품안전관리인증원, 2017

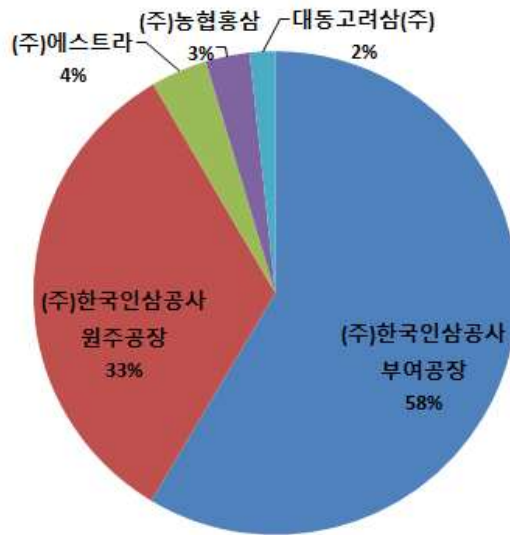


Fig. 2-11. 면역기능 원료(홍삼) 제조 상위 5개 업체 점유율.

출처 : 2016 건강기능식품 국내시장규모 동향분석, 한국식품안전관리인증원, 2017

- 면역기능을 개선시키는 건강기능식품 제품군으로는 홍삼농축액을 함유한 제품이 가장 많이 출시되고 있으며, 그 외에도 프로바이오틱스 유제품, 비타민첨가 드링크, 녹차추출물 드링크, 프로바이오틱스와 항산화제와 비타민을 통합시킨 제품들도 출시되고 있음

Table 2-10. 면역기능 개선 건강기능식품

기업명	제품명	주요 성분
KGC 인삼공사	홍삼톤마일드	홍삼농축액 등
야쿠르트	한진생	홍삼농축액 등
콜마BNH	헤모힘	당귀혼합추출물 등
CJ제일제당	우리아이 피부면역을 위한 피부 유산균 CJLP-133	과채유래 유산균 CJLP133 등
대상웰라이프	피부생생 락토프로바이오틱스	<i>Lactobacillus sakei probio65</i> , 프로바이오틱스 동결분말 등
스פע쉬	인트리트	다래추출물, 결정셀룰로오스, 민들레추출물 등
(주)뉴트리바이오텍	이뮤넌스	다래추출물 등
안국건강(주)	코박사	구아바잎 추출물 등 복합물 등
대상(주)	대상 타민	L-글루타민 등

(마) 2015년 가짜 백수오 사건에도 불구하고 일상 속 건강관리에 대한 관심증가로 면역기능 개선 제품에 대한 수요가 증가하면서 생산실적과 관련된 건강기능식품이 꾸준히 출시되고 있는 것으로 판단됨

(바) 건강기능식품 제조업체 및 제약업체를 중심으로 다양한 개별인정형 제품들이 생산·판매되고 있음. 이는 소비자들의 관심이 다양한 제품(기능성)으로 분산되고 있음에 따라 다양한 기능성의 신규한 건강기능식품 소재에 대한 연구개발이 활발히 이루어지고 있는 것으로 판단됨

**(2) 선행특허 분석 :**

(가) 분석 대상 설정 :

① 본 연구과제에서는 도라지 및 활성도라지의 간 기능 및 면역기능 개선의 기능성 입증 을 목표로 연구개발이 진행 중임.

② 따라서 도라지 및 활성도라지를 함유하는 간 기능 또는 면역기능 개선 관련 식품 및 건강기능식품에 대하여 선행특허의 존재여부를 검토하였음

③ 조사일 현재까지의 한국의 공개·등록 특허, 미국의 공개·등록 특허, 일본의 공개·등록 특허 및 유럽의 공개·등록 특허, PCT 공개·출원 특허를 검색 대상으로 하였음

**Table 2-11. 국가별 DB 및 검색범위**

국가	사용 DB	검색 범위	검색 년도
한국	Wipson	공개·등록 특허	~ 2017. 10.
미국	Wipson	공개·등록 특허	
일본	Wipson	공개·등록 특허	
유럽	Wipson	공개·등록 특허	
PCT	Wipson	공개·출원 특허	

④ 본 선행특허 분석에서 사용된 검색식은 조사 결과의 누락건수를 최소화하기 위하여 포괄적으로 작성되었음

**Table 2-12. 선행특허 검색식**

국가	검색식
한국	1. (간기능* (간* adj (보호* 손상* 기능*)) ((liver*) adj (function* protect* damage*))) and (식품* 건강기능식품* 건강보조식품* 보조제* 음료* 주스* (식이* adj (보조제* 제품*)) (health* adj functional* adj food*) supplement* juice* (건강* adj (보조* 기능*) adj 식품*))
미국	2. (면역기능* (면역* adj (개선* 증진* 증강* 강화* 기능*)) (immun* adj (improve* function* enhance*))) and (식품* 건강기능식품* 건강보조식품* 보조제* 음료* 주스* (식이* adj (보조제* 제품*)) (health* adj functional* adj food*) supplement* juice* (건강* adj (보조* 기능*) adj 식품*))
일본	3. (도라지* 도라* 길경* 백약* 경초* 고경* 도래* 도레* 돌가지* (Platycodon* adj grandiflorum*)) and (면역* immun*) and (식품* 건강기능식품* 건강보조식품* 보조제* 음료* 주스* (식이* adj (보조제* 제품*)) (health* adj functional* adj food*) supplement* juice* (건강* adj (보조* 기능*) adj 식품*)) and (간기능* (간* adj (보호* 손상* 기능*)) (liver* adj (function* protect* damage*)))
유럽	
PCT	



(나) 선행기술 조사결과

NO	문헌번호 (출원일)	발명의 명칭	관련도
1	한국등록특허 10-0643877 (2006.11.01)	장생도라지 추출물을 유효성분으로 함유하는 알코올성간질환의 억제, 치료용 약학적 조성물 및 알코올대사촉진용 조성물	A
2	한국등록특허 10-1769531 (2017.08.11)	항암면역증진 활성이 강화된 장생도라지 복합조성물 및 제조방법	A
3	한국공개특허 10-2004-0058626 (2004.07.05)	항종양활성, 간염억제활성 및 면역증강활성을 갖는 미삼정 생약제제 추출물	A
4	한국등록특허 10-1750191 (2017.06.16)	양파, 도라지, 연잎의 유효성분이 함유된 돼지사육용 음용수 제조방법	A
5	한국등록특허 10-1771209 (2017.08.18)	미강생물전환물을 함유하는 면역증강용, 당뇨개선용, 고지혈증 개선용 또는 간 보호용 조성물	A
6	한국등록특허 10-1741165 (2017.05.23)	미생물(담자균류균사) 발효하거나, 추가로 효소처리를 통해 생물전환된 도라지 발효물을 포함하는 항알레르기능이 있는 치료용 약학조성물 또는 식품조성물	A

▶ 관련도 표시기호

X: 이 문헌에 의해 청구항에 기재된 발명(고안)의 신규성이 없는 것으로 인정

Y: 이 문헌과 2이상의 다른 문헌과 결합하여 청구항에 기재된 발명을 당해 분야의 기술자가 극히 용이하게  
발명할 수 있는 것으로 인정

A: 일반적인 선행기술내용을 포함하는 자료

① 선행기술 1은 장생도라지 추출물을 유효성분으로 함유하는 알코올성간질환의 억제, 치료용 약학적 조성물 및 알코올대사촉진용 조성물에 관한 것으로, 목적적인 측면에서 도라지 추출물을 함유하여 간 기능 개선을 목적으로 한다는 점에서 본 연구과제와 유사하지만, 선행기술의 경우 알코올성간질환 억제 및 치료용 약학 조성물과 숙취해소 건강보조식품으로서 권리범위를 한정하고 있음

② 선행기술 2는 항암면역증진 활성이 강화된 장생도라지 복합조성물 및 제조방법에 관한 것으로, 항암면역증진 활성이 있는 도라지 복합조성물에 대해 개시하고 있음

③ 선행기술 3은 항종양활성, 간염억제활성 및 면역증강활성을 갖는 미삼정 생약제제 추출물에 관한 것으로서, 간 기능 개선 및 면역증강 활성용 조성물을 개시하고 있다는 점에서 목적 측면에서는 본 연구과제와 유사하지만, 도라지가 간 기능 개선 및 면역증강활성을 띄는 점이 직접적으로 명시되어 있지 않음

④ 선행기술 4는 양파, 도라지, 연잎의 유효성분이 함유된 돼지사육용 음용수 제조방법에 관한 것으로서, 돼지사육용 음용수 제조를 목적으로 한다는 점에서 본 연구과제와 차이가 있음

⑤ 선행기술 5는 미강생물전환물을 함유하는 면역증강용, 당뇨개선용, 고지혈증 개선용 또

는 간 보호용 조성물에 관한 것으로서, 면역증강 및 간 보호를 목적으로 하는 점에서는 본 연구과제와 유사하지만 유효성분에서 차이가 있음

⑥ 선행기술 6은 미생물(담자균류균사) 발효하거나, 효소처리를 통해 생물전환된 도라지 발효물을 포함하는 항알레르기능이 있는 치료용 약학조성물 또는 식품조성물에 관한 것으로서, 기능성을 나타내는 유효성분이 도라지 발효물이라는 점에서는 본 연구과제와 유사하지만, 발효 방법과 유효성분의 기능적인 측면에서 차이가 있음

⑦ 선행기술 분석 결과, 본 연구과제에서 현재 연구 중인 도라지 및 활성도라지의 간 기능 및 면역기능 개선 기술은 신규성 및 진보성이 있는 기술로서 특허 출원 시 도라지 추출물을 유효성분으로 함유하여 간 기능 개선 및 면역기능 개선 효능이 있는 식품용 조성물 또는 건강 기능식품 조성물로서 권리를 확보할 수 있을 것으로 사료됨

(다) 선행기술 조사자료 :

<b>발명의 명칭</b>	장생도라지 추출물을 유효성분으로 함유하는 알코올성간질환의 억제, 치료용 약학적 조성물 및 알코올대사촉진용 조성물		
<b>등록(공개)번호</b>	10-0643877	<b>등록(공개)일</b>	2006.11.01
<b>출원번호</b>	10-2004-0055909	<b>출원일</b>	2004.07.19
<b>출원인</b>	주식회사 장생도라지, 정혜광		
<b>발명의 요지</b>			
<p>본 발명은 장생도라지 추출물(CKT)의 용도에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 장생도라지 추출물을 유효성분으로 함유하는 알코올성 간질환의 억제, 치료용 약학적 조성물 및 알코올 대사촉진용 조성물에 관한 것이다.</p> <p>장생도라지 추출물은 알코올성 간손상 및 간염증의 지표인자들의 수치를 감소시키고 혈중 알코올 농도를 감소시키므로 이를 유효성분으로 함유시키면 알코올의 과다 섭취로 유발된 간손상·간염증 등 알코올성 간질환의 억제 및 치료용 약학적 조성물과 알코올 대사촉진용 조성물 및 이를 유효성분으로 함유하여 숙취해소 조성물로 활용할 수 있게 된다. 특히, 20년 근 이상의 장생도라지 추출물을 유효성분으로 포함시킴으로써 2~4년근의 일반도라지에 비하여 우수한 약리작용과 생리활성 효능을 기대할 수 있게 된다. 또한, 본 발명은 장생도라지 추출물이라는 천연물 유래 생약성분을 포함하기 때문에 생체 내에서 독성이 거의 없고 부작용 발현이 거의 나타나지 않게 된다.</p>			
<b>대표 청구항</b>			
<p>청구항 1. 장생도라지 추출물을 유효성분으로 함유하는 알코올성 간질환의 억제 및 치료용 약학적 조성물.</p>			
<b>검토의견</b>			
<p>도라지 추출물을 함유하여 간 기능 개선을 목적으로 한다는 점에서 본 연구과제와 유사하지만, 알코올성간질환 억제 및 치료용 약학 조성물과 숙취해소 건강보조식품으로서 권리범위를 한정하고 있음</p>			

<b>발명의 명칭</b>	항암면역증진 활성이 강화된 장생도라지 복합조성물 및 제조방법		
<b>등록(공개)번호</b>	10-1769531	<b>등록(공개)일</b>	2017.08.11
<b>출원번호</b>	10-2015-0166436	<b>출원일</b>	2015.11.26
<b>출원인</b>	주식회사 장생도라지		
<b>발명의 요지</b>			
<p>본 발명은 항암면역증진 활성이 우수한 장생도라지와 여러 생약들을 혼합하여 항암면역증진 활성을 강화시킨 장생도라지 복합조성물과 이러한 장생도라지 복합조성물을 건강기능소재로 간편하게 활용하기 위한 장생도라지 복합조성물의 제조방법에 관한 것이다.</p> <p>본 발명에 따른 항암면역증진 활성이 강화된 장생도라지 복합조성물은, 장생도라지 26.85~40.27중량%, 와송 6.44~9.66중량%, 유근피 6.44~9.66중량%, 원육 4.30~6.44중량%, 황정 4.30~6.44중량%, 녹각 3.22~4.84중량%, 숙지황 2.02~3.02중량%, 산약 2.02~3.02중량%, 인삼 2.02~3.02중량%, 당귀 2.02~3.02중량%, 황기 2.02~3.02중량%, 황백 2.02~3.02중량%, 진피 2.02~3.02중량%, 백복령 2.02~3.02중량%, 두충 1.61~2.41중량%, 감초 1.61~2.41중량%, 백출 1.61~2.41중량%, 택사 1.61~2.41중량%, 산수유 1.61~2.41중량%, 파고지 1.61~2.41중량%, 오미자 1.61~2.41중량%, 솔잎 1.07~1.61중량%를 포함하여 조성되는 것을 특징으로 한다. 또한 본 발명에 따른 항암면역증진 활성이 강화된 장생도라지 복합조성물 제조방법은 장생도라지 복합조성물 원료를 열수추출한 후 10±0.3 Brix 농도로 만드는 제1단계; 여과한 후 살균하는 제2단계;를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하며, 나아가 제2단계 후에 동결건조한 후 분쇄하여 포장용기에 포장하는 제3단계;를 더 포함하여 이루어질 수 있다.</p>			
<b>대표 청구항</b>			
<p>청구항 1.</p> <p>장생도라지 26.85~40.27중량%, 와송 6.44~9.66중량%, 유근피 6.44~9.66중량%, 원육 4.30~6.44중량%, 황정 4.30~6.44중량%, 녹각 3.22~4.84중량%, 숙지황 2.02~3.02중량%, 산약 2.02~3.02중량%, 인삼 2.02~3.02중량%, 당귀 2.02~3.02중량%, 황기 2.02~3.02중량%, 황백 2.02~3.02중량%, 진피 2.02~3.02중량%, 백복령 2.02~3.02중량%, 두충 1.61~2.41중량%, 감초 1.61~2.41중량%, 백출 1.61~2.41중량%, 택사 1.61~2.41중량%, 산수유 1.61~2.41중량%, 파고지 1.61~2.41중량%, 오미자 1.61~2.41중량%, 솔잎 1.07~1.61중량%를 포함하여 조성되는 것을 특징으로 하는 항암면역증진 활성이 강화된 장생도라지 복합조성물.</p>			
<b>검토의견</b>			
<p>항암면역증진 활성이 있는 도라지 복합조성물에 대해 개시하고 있다는 점에서 본 연구과제와 유사하지만, 항암면역증진 효과 외에 간 기능 개선 효과는 없는 것으로 파악됨</p>			

<b>발명의 명칭</b>	항종양활성, 간염억제활성 및 면역증강활성을 갖는 미삼정 생약제제 추출물		
<b>등록(공개)번호</b>	10-2004-0058626	<b>등록(공개)일</b>	2004.07.05
<b>출원번호</b>	10-2002-0084979	<b>출원일</b>	2002.12.27
<b>출원인</b>	김성호, 김철호		
<b>발명의 요지</b>			
<p>본 발명은 생약제제로 구성된 미삼정 추출물에 관한 것으로 각각 동량의 육계, 자완, 시호, 단삼, 천오, 오수유, 인삼, 길경, 건강, 석창포, 후박, 복령, 황련, 조협, 쑥 및 감초로 구성된 미삼정을 열수추출하여 항종양활성, 간질환억제활성 및 면역증강활성을 가지는 미삼정 추출물에 관한 것이다.</p>			
<b>대표 청구항</b>			
<p>청구항 1. 육계, 자완, 시호, 단삼, 천오, 오수유, 인삼, 길경, 건강, 석창포, 후박, 복령, 황련, 조협, 쑥 및 감초로 구성되는 미삼정 생약제제로부터 추출되는 것을 특징으로 하는, 항종양활성, 간질환억제활성 및 면역증강활성을 갖는 미삼정 추출물.</p>			
<b>검토의견</b>			
<p>간 기능 개선 및 면역증강 활성용 조성물을 개시하고 있다는 점에서 본 연구과제와 유사하지만, 도라지 외 다양한 한약재가 복합된 제제로부터 추출한다는 점에서 도라지가 간 기능 개선 및 면역증강 활성을 띠는 주요 물질이 아닌 것으로 판단됨</p>			

<b>발명의 명칭</b>	양파, 도라지, 연잎의 유효성분이 함유된 돼지사육용 음용수 제조방법		
<b>등록(공개)번호</b>	10-1750191	<b>등록(공개)일</b>	2017.06.16
<b>출원번호</b>	10-2016-0011091	<b>출원일</b>	2016.01.29
<b>출원인</b>	주식회사 대원푸드		
<b>발명의 요지</b>			
<p>본 발명은 양파를 끓여 추출한 양파농축액에 도라지 및 연잎을 끓여 추출한 도라지농축액 및 연잎농축액을 혼합한 혼합농축액을 발효시켜 제조한 양파, 도라지, 연잎의 유효성분이 함유된 양조식초를 물에 첨가하여 돼지에 급여하는 돼지사육용 음용수 제조방법 및 이 방법에 의해 제조된 돼지사육용 음용수에 관한 것으로 양파, 도라지, 연잎의 유효성분을 통하여 돼지의 면역력증진 및 육질향상 등을 기하기 위한 발명이다.</p>			
<b>대표 청구항</b>			
<p>청구항 1. 양파를 끓여 추출한 양파농축액 80~90중량%와, 도라지를 끓여 추출한 도라지농축액 5~10중량%, 연잎을 끓여 추출한 연잎농축액 5~10중량%를 혼합한 혼합농축액을 발효시켜 양파와 도라지 및 연잎의 유효성분이 함유된 양조식초를 제조하고, 상기 양조식초 10중량%를 물 90중량%에 첨가 혼합하여 제조하는 것을 특징으로 하는 돼지사육용 음용수 제조방법.</p>			
<b>검토의견</b>			
<p>도라지 농축액을 포함하는 혼합농축액을 발효시킨다는 점에서 본 연구과제와 유사하지만, 돼지사육용 음용수 제조를 목적으로 한다는 점에서 본 연구과제와 차이가 있음</p>			

<b>발명의 명칭</b>	미강생물전환물을 함유하는 면역증강용, 당뇨개선용, 고지혈증 개선용 또는 간 보호용 조성물		
<b>등록(공개)번호</b>	10-1771209	<b>등록(공개)일</b>	2017.08.18
<b>출원번호</b>	10-2016-0160737	<b>출원일</b>	2016.11.29
<b>출원인</b>	(주)에스티알바이오텍		
<b>발명의 요지</b>			
<p>본 발명은 미강생물전환물을 함유하는 면역증강용, 당뇨개선용, 고지혈증 개선용 또는 간 보호용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 미강생물전환물을 함유하는 조성물은 대식세포의 활성화를 통해 미생물 감염에 대한 면역력을 증가시키고, 당뇨를 개선할 수 있으며, 간 손상 또는 췌장의 랑게르한스섬 손상을 개선하고, 중성지방의 생성을 억제하는 효과를 발휘한다. 또한, 알코올로 인해 발현되는 알코올성 지방간 또는 알코올성 지방간염을 억제하는 효과를 보인다.</p>			
<b>대표 청구항</b>			
<p>청구항 1.  미강에 아밀라아제(amylase) 또는 셀룰라아제(cellulase) 중 선택되는 하나 이상을 첨가하여, 반응시킨 후, 멸균처리하여 액상배지를 제조하는 단계 (a);  상기 단계 (a) 후, 상기 액상배지에 표고버섯 균사를 접종하고, 배양하여 배양물을 제조하는 단계 (b);  상기 단계 (b)후, 상기 배양물에 섬유소분해효소를 첨가하여 반응시키는 단계 (c); 를 포함하는 과정으로부터 제조되는 미강생물전환물을 함유하며,  상기 미강생물전환물은 다당체(polysaccharide)인 것을 특징으로 하는 면역증강용 식품 조성물.</p>			
<b>검토의견</b>			
면역증강 및 간 보호를 목적으로 하는 점이 본 연구과제와 유사하지만, 본 연구과제의 도라지 또는 활성도라지를 유효성분으로 포함하고 있지 않음			

<b>발명의 명칭</b>	미생물(담자균류균사) 발효하거나, 추가로 효소처리를 통해 생물전환된 도라지 발효물을 포함하는 항알레르기능이 있는 치료용 약학조성물 또는 식품조성물		
<b>등록(공개)번호</b>	10-1741165	<b>등록(공개)일</b>	2017.05.23
<b>출원번호</b>	10-2015-0165208	<b>출원일</b>	2015.11.25
<b>출원인</b>	(주)에스티알바이오텍		
<b>발명의 요지</b>			
<p>본 발명은 미생물(담자균류균사) 발효 및 효소처리를 통해 생물전환된 도라지 발효물을 포함하는 항알레르기능이 있는 치료용 약학조성물 또는 식품조성물에 관한 것으로, 담자균류균사 발효 및 효소처리를 통해 생물전환된 도라지 발효물은 발효되지 않은 도라지에 비하여 항알레르기 물질을 많이 함유하고 있으므로, 이를 이용하여 식품 등으로 개발시 알레르기 발생을 저감시킬 수 있는 효과를 발휘한다.</p>			
<b>대표 청구항</b>			
<p>청구항 1.  (a) 도라지를 액상으로 배양배지화 하는 단계;  (b) 상기 (a)단계의 배양배지화 한 액상도라지배지에 담자균류균사를 접종하여 배양발효하는 생물전환 발효공정을 수행하는 단계; 및  (c) 상기 (b)단계의 생물전환 발효공정에 의해 생산된 발효물로부터 섬유소분해효소 처리 공정을 통해 항알레르기 효능을 향상시킨 발효 및 효소처리의 생물전환산물을 생산하는 단계를 포함하는, 항 알레르기 효능이 증가된 발효물의 제조방법.</p>			
<b>검토의견</b>			
도라지 발효물을 포함한다는 점에서 본 연구과제와 유사하지만, 항알레르기 활성이 있는 조성물을 제공한다는 점에서 본 연구과제와 차이가 있음			

다. 간 기능 관련 식품 및 건강기능식품 특허 동향 분석

(1) 간 기능 특허 동향 :

(가) 간 기능 관련 식품 및 건강기능식품 특허동향을 살펴보면, 1999년 이후 국내 간 기능 관련 식품 및 건강기능식품 전체 특허출원건수는 459건이며, 2000년대에 들어서 출원이 증가하고 있는 것으로 판단됨

① 일시적으로 특허출원이 감소하는 지점이 있지만 최근 5년간 70~90건 정도의 특허가 꾸준히 출원되고 있는 것으로 파악됨

② 2016년, 2017년은 특허 미공개건이 존재하므로 정확한 특허 출원 건수 산정이 불가능함

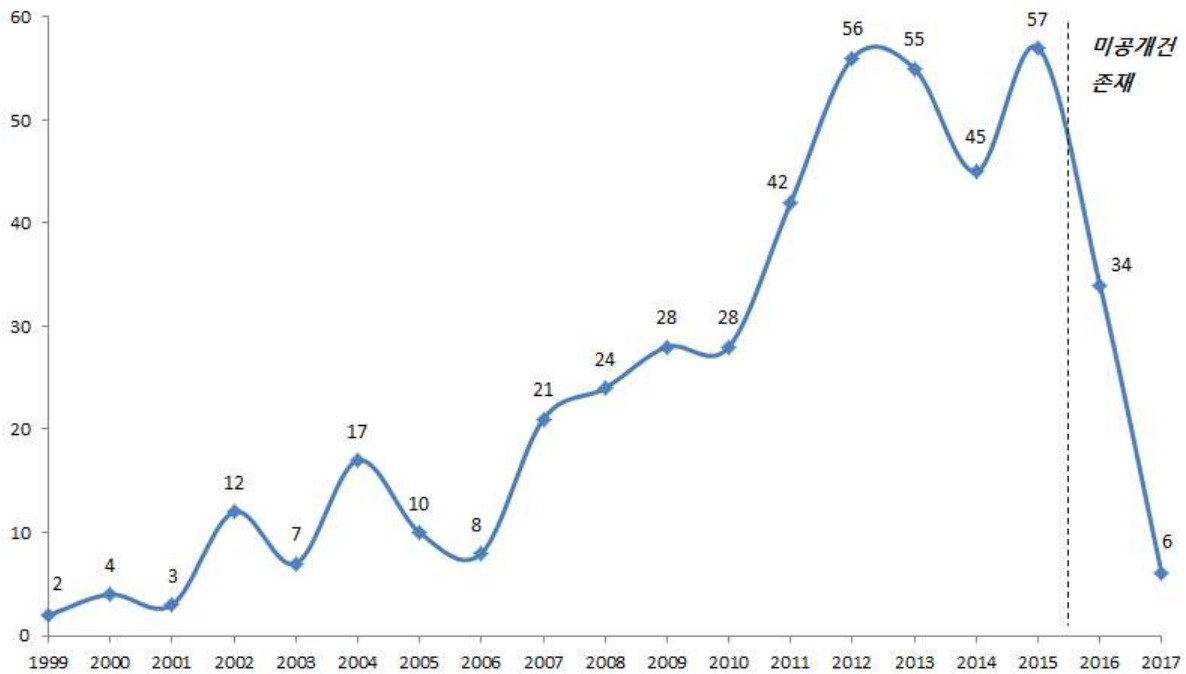


Fig. 2-12. 간 기능 관련 식품 및 건강기능식품 연도별 특허 출원 동향.

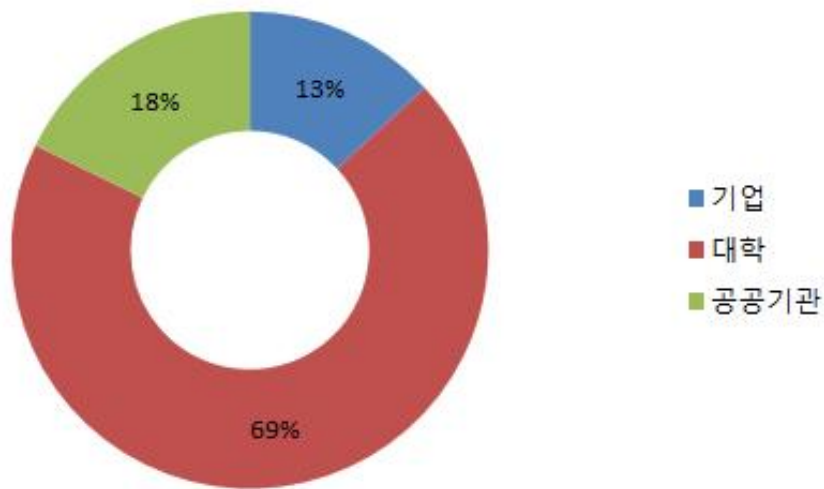


Fig. 2-13. 출원인 형태별 특허 출원 점유율.

(나) 간 기능 관련 식품 및 건강기능식품 출원 특허 총 726건 중 대부분의 특허가 대학에서 출원되고 있는 것으로 나타남

① 1999년 이후 간 기능 관련 식품 및 건강기능식품 국내특허 총 726건 중 대학 69%, 공공기관이 18%, 기업 13%의 순으로 관련 특허활동이 활발한 것으로 나타남

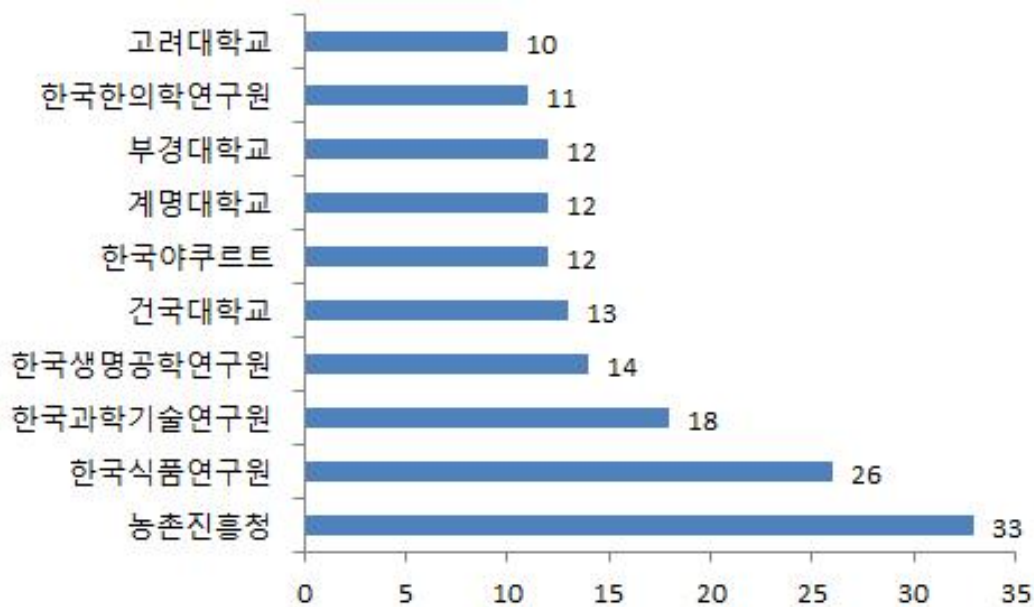


Fig. 2-14. 주요 출원인별 특허출원 건수.

(다) 간 기능 관련 식품 및 건강기능식품 분야 국내 특허의 주요 출원인을 살펴보면 전체 출원인(91) 중 상위 10대 출원인이 차지한 특허가 161건으로 총 출원건수의 약 22%를 차지하고 있는 것으로 파악됨

① 농촌진흥청이 33건으로 가장 많은 특허를 출원하였으며, 한국식품연구원이 26건, 한국과학기술연구원이 18건으로 그 뒤로 가장 많은 특허를 출원한 것으로 나타남

② 일부 해외출원인도 있으나 대부분이 국내출원인인 것으로 파악되어, 국내 특허출원 비율이 매우 높아 기술 자립도가 높은 것으로 분석됨

(라) 주요 특허 리스트를 살펴보면, 상위 3대 출원기관에서는 간 기능 개선과 관련하여 천연물 유래 소재를 많이 활용하고 있는 것으로 파악됨

① 농촌진흥청에서는 참죽나무, 흰민들레, 어수리 등의 식물 추출물을 이용한 숙취해소 및 간 기능 개선 관련 연구가 활발한 것으로 사료됨

② 한국식품연구원에서는 울금, 미강, 감귤과피 등의 식품 유래의 천연 발효물, 한국과학기술연구원에서는 식물 추출물 및 화합물을 이용한 간 기능 개선 관련 연구를 활발하게 진행하고 있는 것으로 판단됨

Table 2-13. 주요 특허 리스트

순번	출원번호 (출원일)	등록번호 (등록일)	발명의 명칭	출원인
1	10-2015-0146624 (2015.10.21.)	10-1747245 (2017.06.08.)	귀뚜라미 분획물을 유효 성분으로 포함하는 트롬빈 활성 저해 항응고 조성물 및 식품조성물	농촌진흥청
2	10-2015-0157776 (2015.11.10.)	10-1740502 (2017.05.22.)	참죽나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 숙취해소용 약학적 조성물	농촌진흥청
3	10-2015-0158435 (2015.11.11.)	-	흰민들레 뿌리 추출물을 유효성분으로 포함하는 간 기능 저하 증상 완화 또는 치료용 약학적 조성물	농촌진흥청
4	10-2015-0157777 (2015.11.10.)	10-1708250 (2017.02.14.)	어수리 추출물을 유효성분으로 함유하는 숙취해소 및 간 보호용 약학적 조성물	농촌진흥청
5	10-2012-0066803 (2012.06.21.)	10-1428521 (2014.08.04.)	울금 발효물을 유효성분으로 함유하는 비알코올성 지방간 예방 및 치료용 조성물	한국식품연구 원
6	10-2012-0066800 (2012.06.21.)	10-1393607 (2014.05.02.)	미강 발효물을 유효성분으로 함유하는 비알코올성 지방간 예방 및 치료용 조성물	한국식품연구 원
7	10-2011-0099877 (2011.09.30.)	10-1301971 (2013.08.26.)	감귤과피 추출물 또는 나리루틴을 유효성분으로 포함하는 간기능 저해 억제용 조성물 및 감귤과피로부터 나리루틴을 추출하는 방법	한국식품연구 원
8	10-2012-0079425 (2012.07.20.)	10-1401416 (2014.05.23.)	간 보호용 조성물	한국과학기술 연구원
9	10-2011-0036866 (2011.04.20.)	10-1321879 (2013.10.18.)	층꽃풀 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 함유하는 간독성 질환 예방 및 치료용 조성물	한국과학기술 연구원
10	10-2010-0011969 (2010.02.09.)	10-1236233 (2013.02.18.)	이고들빼기 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 간 기능 개선용 약학적 조성물 및 간 기능 개선용 건강기능 식품조성물	한국과학기술 연구원



라. 면역기능 관련 식품 및 건강기능식품 특허 동향 분석

(1) 면역기능 특허 동향 :

(가) 면역기능 관련 식품 및 건강기능식품 특허동향을 살펴보면, 1998년 이후 국내 면역기능 관련 식품 및 건강기능식품 전체 특허출원건수는 718건이며, 1998년 이후 특허출원이 증가하는 추세임

① 특히 2012년 64건에서 2013년 96건으로 특허 출원이 급격히 증가하였으며, 2015년에는 122건으로 특허가 최다 출원되었음

② 2016년, 2017년은 특허 미공개건이 존재하므로 정확한 특허 출원 건수 산정이 불가능함

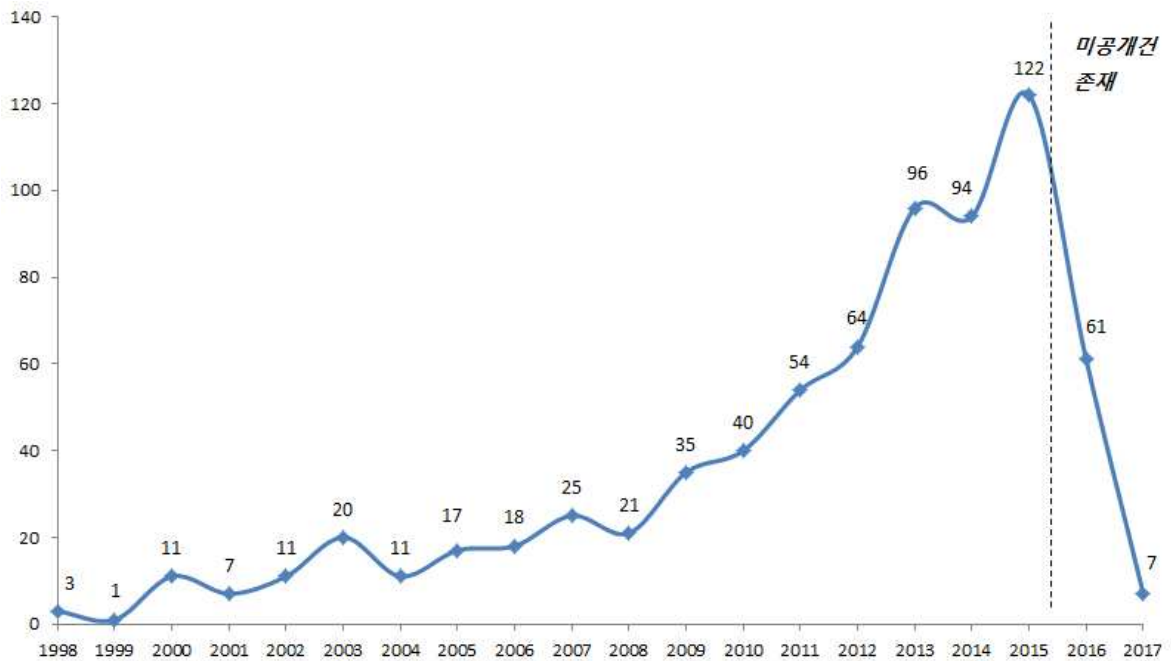


Fig. 2-15. 면역기능 관련 식품 및 건강기능식품 연도별 특허출원 동향.

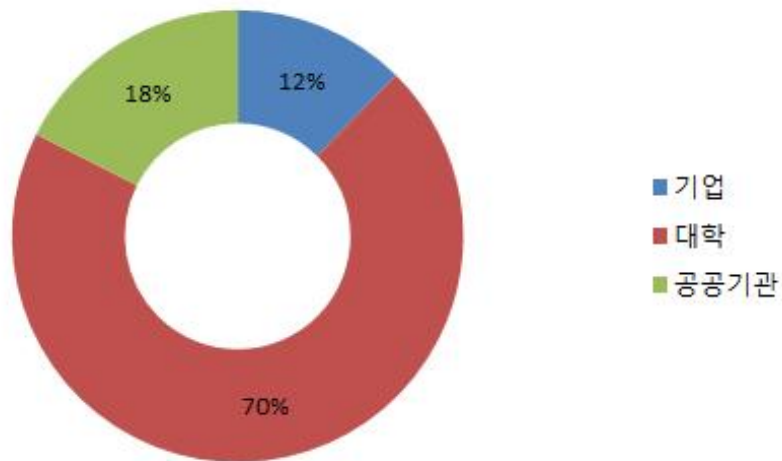


Fig. 2-16. 출원인 형태별 특허출원 점유율.

(나) 면역기능 관련 식품 및 건강기능식품 출원 특허 총 718건 중 대부분의 특허가 대학에서 출원되고 있는 것으로 나타남

① 1998년 이후 면역기능 관련 식품 및 건강기능식품 국내특허 총 718건 중 대학 70%, 공공기관이 18%, 기업 12%의 순으로 관련 특허활동이 활발한 것으로 나타남

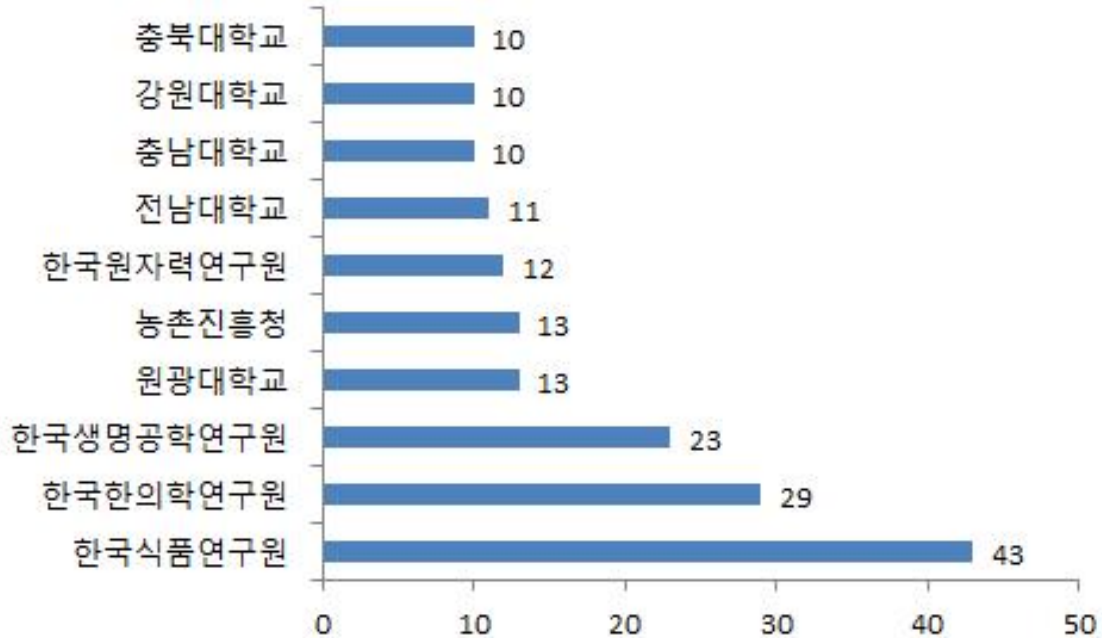


Fig. 2-17. 주요 출원인별 특허출원 건수.

(다) 면역기능 관련 식품 및 건강기능식품 분야 국내 특허의 주요 출원인을 살펴보면 전체 출원인(94) 중 상위 10대 출원인이 차지한 특허가 174건으로 총 출원건수의 약 24%를 차지하고 있는 것으로 파악됨

① 한국식품연구원이 43건으로 가장 많은 특허를 출원하였으며, 한국한의학연구원이 29건, 한국생명공학연구원이 23건으로 그 뒤로 가장 많은 특허를 출원한 것으로 나타남

② 일부 해외출원인도 있으나 대부분이 국내출원인인 것으로 파악되어, 국내 특허출원 비율이 매우 높아 기술 자립도가 높은 것으로 분석됨

(라) 주요 특허 리스트를 살펴보면, 상위 3대 출원기관에서 천연물 유래 물질 또는 균주 등을 이용한 다양한 면역기능 관련 연구를 진행하고 있는 것으로 파악됨

① 한국식품연구원에서는 인삼, 보리 등의 식품 유래 소재 및 균주를 이용한 면역기능 개선 관련 연구가 활발한 것으로 사료됨

② 한국한의학연구원에서는 지구자, 송화분 등의 한방약재, 한국생명공학연구원에서는 균주를 이용한 면역 기능 개선 관련 연구를 활발하게 진행하고 있는 것으로 판단됨

Table 2-14. 주요 특허 리스트

순번	출원번호 (출원일)	등록번호 (등록일)	발명의 명칭	출원인
1	10-2014-0096693 (2014.07.29.)	10-1774564 (2017.08.29.)	효소처리 인삼 유래 면역기능 증강용 다당분획물 및 이의 제조방법	한국식품연구원
2	10-2016-0147027 (2016.11.04.)	10-1774566 (2017.08.29.)	면역기능 증진 활성이 우수한 효소처리 보리잎 유래 다당 분획물 및 이의 용도	한국식품연구원
3	10-2015-0088702 (2015.06.22.)	10-1761379 (2017.07.19.)	다기능 신규 균주 락토바실러스 사케이 K040706 및 이의 배양 방법	한국식품연구원
4	10-2016-0026193 (2016.03.04.)	10-1761506 (2017.07.19.)	락토바실러스 펜토서스를 유효성분으로 포함하는 Th1-매개 면역 질환, Th17-매개 면역 질환, 또는 Th2-매개 면역 질환의 예방, 개선, 또는 치료용 조성물	한국식품연구원
5	10-2016-0160179 (2016.11.29.)	-	효소처리 영실 추출물을 유효성분으로 포함하는 Th2-매개 면역질환의 예방 또는 치료용 조성물	한국식품연구원
6	10-2017-0030131 (2017.03.09.)	10-1782847 (2017.09.22.)	지구자 추출물을 유효성분으로 함유하는 선천면역 증진 및 항바이러스용 조성물	한국한의학연구원
7	10-2015-0039193 (2015.03.20.)	10-1780975 (2017.09.18.)	송화분 추출물을 유효성분으로 함유하는 선천면역 증진 및 항바이러스용 조성물	한국한의학연구원
8	10-2015-0047324 (2015.04.03.)	10-1770572 (2017.08.17.)	상지 또는 상백피 추출물을 유효성분으로 함유하는 선천면역 증진 및 항바이러스용 조성물	한국한의학연구원
9	10-2016-0007388 (2016.01.21.)	10-1750948 (2017.06.20.)	트라우스토키트리드계 변이균주 유래의 면역활성 증진 효과가 있는 세포외 다당류 및 이의 용도	한국생명공학연구원
10	10-2015-0042407 (2015.03.26.)	10-1773059 (2017.08.24.)	면역 증진 및 항바이러스 활성을 가지는 클로스트리디움 부티리쿰 균주 및 이의 용도	한국생명공학연구원

### 3-1. 3차년도 연구수행 방법

#### 가. 상용화 전략 수립

(1) 시장 및 특허동향 분석 결과를 바탕으로 신규 비즈니스 모델 구축 :

- (가) 기술공급에 따른 기업환경변화요인 분석 및 예측
- (나) 목표시장, 가치사슬, 비용, 이익, 경쟁성, 시장성 위치

(2) 바이오 기술사업화 (기술거래 유형) :

- (가) 공동 및 위탁연구를 통한 기술창출
- (나) 매매(양도 및 양수 등) / License In/Out / 현물출자
- (다) Incubator, JV, 기술보유기업 M&A와 같은 기술투자 / 기술담보에 의한 융자
- (라) 유동화 증권 (Technology Backed Securities)
- (마) Cross License 등 전략적 제휴의 수단
- (바) 기술자문, 기술지도 등 기타 기술거래

(3) 신규 비즈니스 모델 도입에 따른 가치창출 예측 제시 :

(4) 신규비즈니스모델 제시 방안 :

(가) 상용화 후보기업을 대상으로 개발 과제에 대한 새로운 비즈니스 모델 제시

(나) 기술의 가치, 시장분석, 목표시장, 목표고객 조사 및 분석을 통해 도출된 사업화 모델 들은 유사하면서도 상이한 특성을 지남에 따라, 개별 특허 및 기술의 경쟁전략을 실현시키는데 가능성을 제고하는 목적으로 Business Model을 제안

(다) 비즈니스 모델 개발을 위한 시장성 분석은 시장의 성장성, 경쟁도, 시장진입 장벽, 수요 가능성, 시장지위 확보 가능성 등의 요소 반영

(라) 시장성 분석결과를 바탕으로 기술사업화에 필요한 생산성, 수익성, 마케팅, 소요자금 등의 요소를 고려하여 새로운 비즈니스 모델(BM) 제시

(마) 궁극적으로 사업화 기업에는 이윤극대화를 실현하는 모델이며, 나아가 투자자본의 조 기회수 방안이 포함된 Business Model 필요

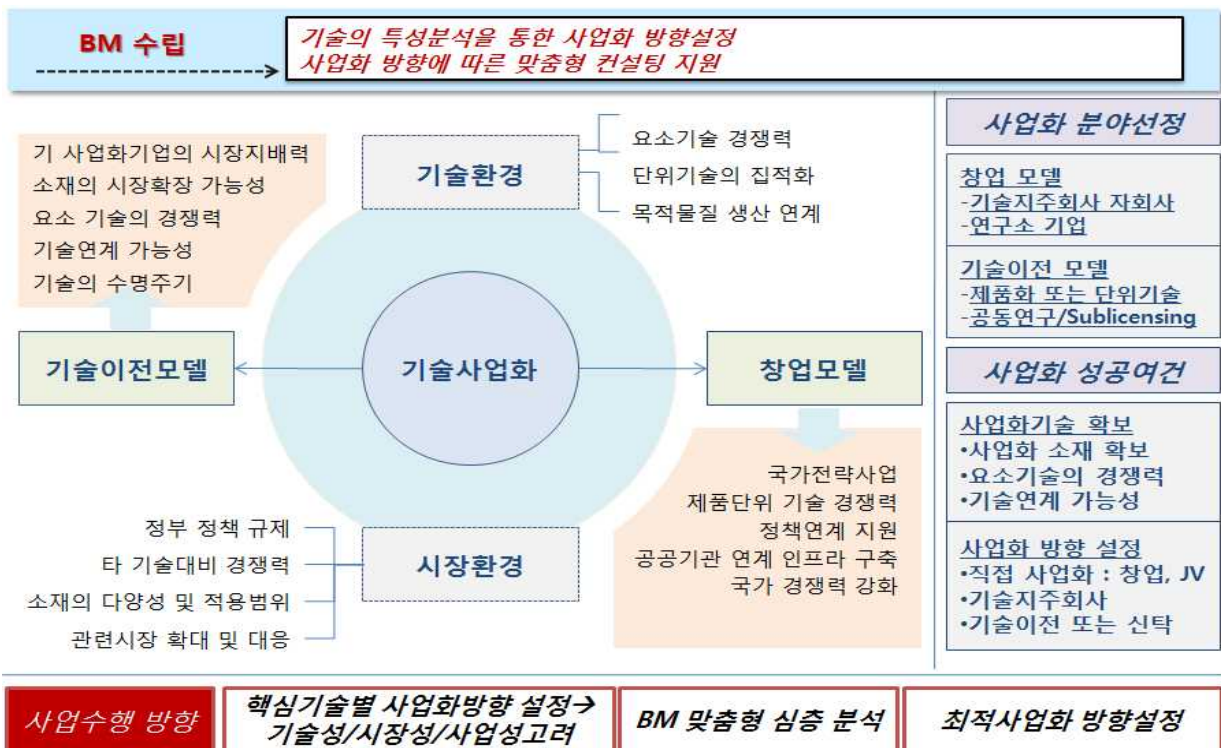


Fig. 3-1. 신규 비즈니스모델 개발 및 상용화 후보기업으로의 공급 프로세스.

### 3-2. 3차년도 연구결과

#### 가. 사업화 가능 시장에 대한 조사 및 분석

##### (1) 시장 동향

(가) 2015년 기준으로 국내 건강기능식품 시장규모는 2조 3,291억 원으로 조사되며 2009년 이후 지속적인 성장세를 유지하고 있는 수준임

Table 3-1. 국내 건강기능식품 시장규모

구분	2011	2012	2013	2014	2015	CAGR(%)
시장규모(억원)	16,855	17,039	17,920	20,052	23,291	
전년대비 성장률(%)	31.6	1.1	5.2	11.9	16.2	13.2

출처 : 식품의약품안전처 보도자료, 2016

(나) 기능성별로는 면역기능 개선 관련 제품의 점유율이 25%로 가장 높았고, 혈행개선(22%), 항산화(21%), 영양소 보충(7%), 장 건강 (5%) 제품 순이며, 본 기술과 관련된 간질환 관련 분야는 전체에서 약 3%수준임

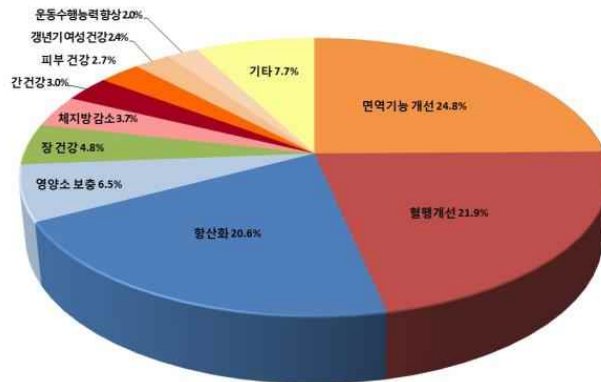


Fig. 3-2. 기능성별 건강기능식품 생산실적 (점유율). 출처: 식약처, 2015

(다) 특히 최근 10년 동안 간 건강 관련 개별인정형 건수는 약 38건으로 상위 3번째로 높은 기능성 인정현황을 확인할 수 있음

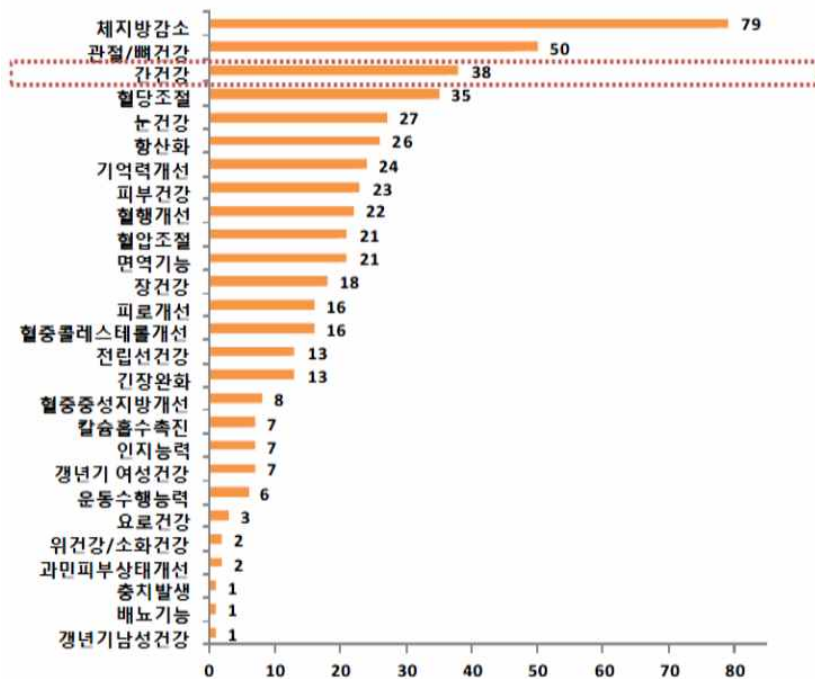


Fig. 3-3. 2004 ~ 2013 기능성 인정현황). 출처: 식약처, 2014

(라) 현재 2015년 3월 기준으로 식품의약품안전처에 간 건강 관련 기능성원료로 등재되어 있는 품목으로는 아래와 같음

**Table 3-2. 간 기능 기능성 원료 현황**

구분	내용
인정된 기능성 원료	도라지추출물, 밀크씨슬추출물, 브로콜리스프라우트분말, 표고버섯균사체, 표고버섯균사체추출물, 복분자추출분말, 헛개나무 과병 추출물, 유산균발효다시마추출물

출처: 식품의약품안전처, 2016

(마) 식품의약품안전처에 인증된 원료로 만들어진 상용화된 건강기능식품은 쿠파스(한국야쿠르트), 헬프칸(CJ뉴트라), 헤파칸(일진제약), 헤파글루칸(대웅제약), 헤파밸런스(보령제약), 헤파셀리아(한국마그나스) 등이 있음

(바) ‘쿠파스’는 연 매출 800억원 이상으로 회사 전체 발효유의 매출 10%대에 이르는 상품으로 자리잡았으며 일본의 ‘우콘의 치카라(울금의 힘)’는 시장 점유율이 40%에 이를 정도로 인기를 끌고 있는 상품임

**Table 3-3. 국내 간 건강 관련 주요 건강기능식품**

기업	제품명	원료	제품
한국야쿠르트	쿠파스	헛개나무	
CJ	헬프칸	헛개나무	
일진제약	헤파칸	헛개나무	
대웅제약	헤파글루칸	표고버섯 균사체, 헛개나무, 밀크씨슬	
보령제약	헤파밸런스	표고버섯 균사체, 헛개나무, 밀크씨슬	

**Table 3-4. 국외 간 건강 관련 주요 건강기능식품**

기업	제품명	원료
하우스식품(JP)	울금의 힘	울금
Sabinsa Japan (JP)	쿠르쿠민 C3 복합체	울금
마르하니치로(JP)	SFD	굴
ILS(JP)	간-Hi	돼지 간 효소 분해
일유(日油)(JP)	쌀 코사놀	폴리코사놀 함유 쌀겨
Natures way(US)	Thisilyn	밀크시슬
Nutraceutical corporation(US)	SOLARAY	밀크시슬

(사) 시장 특성 및 니즈 :

① 국내 간질환 관련 환자 수는 꾸준히 발생하고 있으며, 2016년에는 다소 증가한 것으로 파악되며, 간 건강 기능성식품 분야의 매출액의 경우 2015년 약 990억원에서 2016년 1,367억원으로 증가함에 따라 간 건강, 특히 알코올로부터 간의 손상을 보호하고자 하는 니즈가 많은 것으로 사료 됨

② 현재 국내 간 기능 관련 기능성 인증 원료는 헛개나무, 표고버섯, 밀크시슬 등 약 6개 원료에 그치며 상용화제품도 헛개나무 추출물이 주를 이루고 있음. 따라서 간 기능 관련 기능성 식품 시장에서는 헛개나무 쿠퍼스 제품 이외에도 다양한 소재화, 제형화(캡슐, 정제, 음료, 과립, 분말, 캔디 등)에 대한 니즈가 증대되고 있음

**(2) 기업 동향 :**

(가) 건강기능식품 산업 구조 :

① 건강기능식품의 공정은 크게 원료 인정, 생산, 유통판매, 소비의 과정으로 나누어 살펴볼 수 있음. 건강기능식품은 식품의약품안전처에서 고시된 원료나 연구개발한 원료를 인정받을 경우에만 제품의 원료 사용할 수 있는 특징임

② 식품의약품안전처에서 고시된 원료를 사용할 경우에는 별도의 인정 절차 없이 바로 연구개발하여 제품을 생산할 수 있는 특징이 있지만, 개별인정형 원료를 사용할 경우, 영업자가 연구개발한 자료를 식약처에 제출하여 검토 및 심사를 받은 후에 기능성 원료로 인정을 받아야 하는 절차가 필요함. 이 후 고시된 원료를 사용하는 것과 마찬가지로 생산과정을 진행해야함

③ 생산단계에서는 품목제조신고(또는 수입신고)가 되어있어야 하며 제품을 생산한 뒤에는 표시광고 심의, 기준규격 검사 등을 진행하게 된다. 유통판매는 판매업 신고가 이루어진 곳에서 가능하며, 유통판매업체를 통해 구입한 소비자들이 최종적으로 섭취를 하게 됨

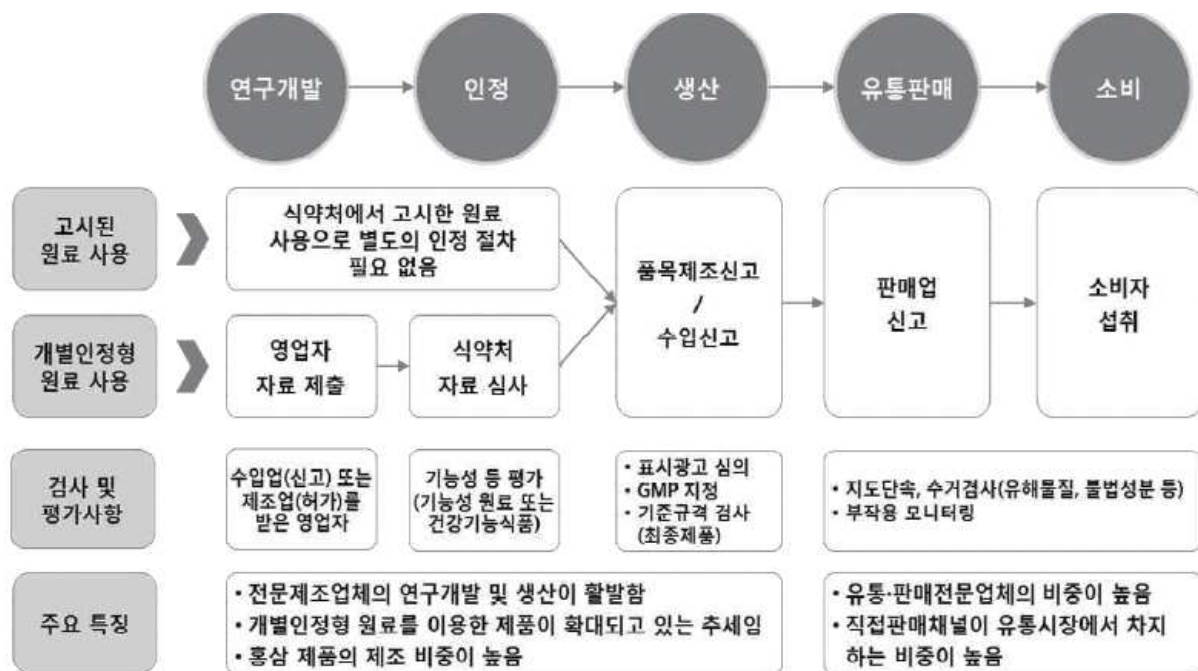


Fig. 3-4. 2004 ~ 2013 기능성 인정현황). 출처: 식약처, 2014

(나) 기업 현황

① 식품의약품안전처에 인증된 원료로 만들어진 상용화된 건강기능식품을 생산하고 있는 주요 기업으로는 한국야쿠르트, CJ, 일진제약, 대웅제약, 보령제약, 한국마그나스 등이 있으며 한국야쿠르트의 ‘쿠퍼스’는 연 매출 800억원 이상으로 회사 전체 발효유의 매출 10%대에 이르는 상품으로 대표적인 기업으로 사료됨

② 또한 일본 하우스식품의 ‘우콘의 치카라(울금의 힘)’는 시장 점유율이 40%에 이를 정도로 인기를 끌고 있는 상품으로 대표적인 기업으로 사료됨

③ 국외 간 기능 개선 관련 건강기능식품 제조 기업으로는 하우스식품(JP), Sabinsa Japan (JP), 마르하니치로(JP), ILS(JP), Natures way(US), Nutraceutical corporation(US) 등이 있으며, 국내 주요 간질환 관련 건강기능식품 제조 기업으로는 한국야쿠르트, CJ, 일진제약, 대웅제약, 보령제약 등이 있음

Table 3-4. 간 기능 개선 관련 기업 리스트

구분		기업
간 기능 개선 관련 건강기능식품 제조 기업	국외	하우스식품(JP), Sabinsa Japan (JP), 마르하니치로(JP) ILS(JP), Natures way(US), Nutraceutical corporation(US) 등
	국내	한국야쿠르트, CJ, 일진제약, 대웅제약, 보령제약 등



## 3-2. 사업화 가능 시장에 대한 국내 선행특허 조사 및 분석

### 가. 간 기능 개선 건강기능식품 소재

#### (1) 기술 동향 :

(가) 간 질환을 유발하는 주요 독성물질로는 알코올이 대표적이며 섭취한 에탄올의 80~90%가 간에서 대사되며 이때 생성되는 아세트알데히드 등의 물질이 에탄올성 간 손상의 주 원인임. 에탄올 또는 이것의 대사산물은 간세포에서 자동산화를 일으키며 pro-oxidative 인자로써의 작용 또는 항산화 수준을 감소시켜 간염을 유발함으로 이와 같은 공격적인 물질들로부터 간을 보호할 수 있는 항산화 기능이 중요함

(나) 따라서 바이러스에 의한 간질환이 아닌 독성물질을 원인으로 하는 간질환의 경우, 간 손상반응을 초기에 저해할 수 있는 간 보호활성물질이나 간염 치료제의 개발이 요구되고 있음

(다) 현재 임상적으로 사용되고 있는 대표적인 간 치료제인 실리마린(silymarin)의 경우 국화과 식물인 마리아영경귀의 열매에서 분리되었으며, 최근 개발된 디메틸 디메톡시 비페닐레이트는 오미자의 성분인 쉬잔드린(schizandrin)과 유사한 합성물질로 간독성 치료 효과가 보고된 바 있음. 그러나 이들 질환의 심각성과 빈도수를 고려해 효과적으로 작용하기 위한 천연물에서의 간 질환 예방 또는 치료제의 개발이 절실히 필요한 실정임

(라) 간 기능 개선 소재로서 울금, 가막조개, 굴 엑기스, 핵산, 간 펩티드, 폴리코사놀 등 다양한 소재 개발이 이루어지고 있음

(마) 울금 : 울금은 현재 간 기능 개선 소재로서 압도적으로 많이 개발되고 있는 소재로서, 카레의 향신료로 알려져 있지만 하우스식품의 ‘울금의 힘’이라는 제품으로 간기능 개선 측면에서 주목받는 소재로 부상하고 있음. 시장에 유통되고 있는 울금 소재는 울금에서 추출하여 쿠르쿠민 함량을 정량화한 엑기스와 울금 자체 분말이 있으나, 간 기능 개선 소재로서 주로 사용되는 소재는 주로 울금 추출물(쿠르쿠민)이며 이는 알코올 섭취로 생기는 산화 피해에 영향을 주는 NF- $\kappa$ B를 저해하고 염증이나 장해로부터 간을 효과적으로 보호함

(바) 굴 엑기스 : 굴은 옛날부터 세계적으로 먹어 왔던 음식 재료로서 타우린, 글리코젠, 아연, 아미노산 등을 풍부하게 함유하고 있음. 마르하니치로 식품회사는 굴 엑기스를 독자 기술로 정제하여 분말화한 굴 엑기스 분말을 판매하고 있으며 모델 동물의 알코올성 간 질환 개선효과에 대해 유효성이 확인됨

(사) 핵산 - 마르하니치로 식품회사는 연어 시라코 유래의 DNA-Na에 알코올 대사 촉진효과가 있는 것을 인체 실험에서 확인한 결과, 알코올 섭취 1시간 후와 2시간 후의 혈중 아세트알데히드 및 초산 농도가 프라세포와 비교하여 유의하게 낮은 값을 보임. 또한 쥐의 간을 이용한 in vitro 실험에서 디옥시아데노신이나 디옥시구아노신 등의 디옥시뉴클레오시드가 간 세포에 작용하고 있는 것이 확인됨

(아) 간 펩티드 : ILS사의 간-Hi는 돼지 간을 효소 분해한 것으로, 분자량 3,000 이하의 수용성 펩티드를 주성분으로 하고 있음. 간 펩티드를 사용한 간 기능 개선 시험에서 AST, ALT, ALP의 개선과 중성지방, 혈당치, 혈압, 체중 등의 저하를 보임

(사) 폴리코사놀 : 일유사에서는 폴리코사놀 함유 쌀겨 추출물 ‘쌀 코사놀’을 판매하고 있으며, 체력 증진, 근육기능 개선, 기초대사율 향상, 콜레스테롤 대사 개선, 간기능 개선 등의

효과를 확인하고, 새로운 폴리코사놀의 섭취로 음주 후의 불쾌감을 경감시키는 것을 확인함

(아) 스쿠알렌 : 스쿠알렌은 깊은 바다에 생식하는 간장에서 얻은 기름을 원료로 한 소재로 항산화력이 강하고 세포 산소 공급 보조, 운동기능 향상, 신장 및 간장 기능 향상 등 많은 기능성에 대해 연구되고 있음

(자) 국내에서 간기능 개선 건강기능식품 원료로는 브로콜리 스프라우트 분말, 표고버섯균사체 추출물, 밀크씨슬 추출물, 복분자추출분말, 발효울금, 도라지 추출물 등이 인정을 받음

**Table 3-5. 간 기능 개선 기능성 원료 인정현황**

NO	원료명	인정등급	기능(지표)성분
1	브로콜리 스프라우트 분말	생리활성기능 3등급	sulforaphane
2	표고버섯균사체 추출물	생리활성기능 2등급	$\beta$ -glucan
3	밀크씨슬 추출물 (고시된 원료로 전환: 밀크씨슬 (카르두스마리아누스) 추출물)	생리활성기능 2~3등급	Silymarin
4	표고버섯균사체	생리활성기능 2등급	$\beta$ -glucan
5	복분자추출분말	생리활성기능 2등급	Ellagic acid
6	발효울금	생리활성기능 3등급	Curcumin
7	도라지추출물	생리활성기능 2등급	Platycodin D
8	유산균 발효 마늘 추출물	생리활성기능 2등급	cycloalliin

출처: 건강기능식품 기능성 원료 인정 현황, 식품의약품안전처, 2016

(차) 식품의약품안전처에 고시된 원료 외에도 새로운 간 기능 개선 소재 발굴 및 이에 따른 건강기능식품 개발이 진행되고 있음

(카) 휴럼(2013)에서는 오가피를 기질로 한 미생물 발효물로부터 간 기능 개선 효능을 갖는 소재를 개발하였으며, 오가피 발효물의 경우 간 기능 개선 외에도 숙취해소 효능 등 다양한 기능성을 가지고 있어 기존의 간 기능 개선 원료보다 경쟁력을 가지고 있음

(타) 강원대학교(2013)에서는 번데기동충하초로부터 간기능 개선을 위한 기능성 소재 개발 연구에서 번데기동충하초 추출물 CMWE가 TAA에 의한 간손상을 억제하는 것을 확인하여 간 세포 손상에 아주 유효한 생리활성 물질임을 도출함

(파) 그 외에도 전주생물소재연구소, 농촌진흥청 등에서 미역쇠, 새싹보리와 같은 천연소재로부터 간 기능 개선 소재를 발굴하여 건강기능식품으로 개발하고자하는 연구가 진행되고 있으며, 다양한 기능 성분들을 복합적으로 사용하여 기능성을 강화하는 방안에 대한 연구도 진행되고 있는 것으로 나타남

Table 3-5. 국내 간기능 개선 건강기능식품 소재 개발 현황

No.	연구기관	개발내용	연도
1	휴림	간 기능 개선 효능을 갖는 오가피 발효물 소재 개발 및 산업화	2013
2	강원대학교	번데기동충하초로부터 간기능 개선을 위한 기능성 소재개발연구	2013
3	전주생물소재연구소	미역씨의 간 기능 개선 효능에 관한 연구	2013
4	농촌진흥청	새싹보리를 이용한 숙취해소 및 알코올성 지방간 개선	2015
5	바이오랜드	마늘유산균발효액을 이용한 간기능 개선성 건강기능식품 개발	2016
6	파낙스코리아	자소엽 등 복합추출물 원료를 이용한 간기능 개선 효능을 갖는 건강기능소재 및 제품개발	2015~2018

출처 : NDSL 등

(2) 선행기술 조사 및 분석 :

(가) 선행기술 분석 범위

① 간 기능 개선 건강기능식품 소재 분야를 특허분석대상으로 설정하였으며, 본 분야의 특허 동향을 파악하기 위해 국내의 특허 동향 및 주요 핵심특허 분석을 통해, 선행기술의 존재 여부를 검토하였음

② 분석 대상기술과 관련되는 최근 기술이 포함되도록 조사일 현재까지의 국내의 출원·공개·등록 특허를 검색 대상으로 설정하였음

Table 3-6. 검색 범위 설정

국가	사용 DB	자료 구분
한국	WIPSON	출원·공개·등록특허 (출원일 기준)

③ 검색식은 기능성 간 기능 개선 건강기능식품 분야의 핵심키워드를 바탕으로 작성하였으며, 조사 결과의 누락 건수를 최소화하기 위하여 포괄적으로 작성되었음

Table 3-7. 검색식

국가	검색식
한국	(간건강* (간 adj 건강*)) (간 adj 기능*) 간개선* (간 adj 개선*) and (기능성* (건강 adj 기능성) (건강기능성) (function*) dietary* nutrition*) and (식품* food*)

(나) 선행기술 조사 결과 :

① 선행기술조사를 수행한 결과, 간 기능 개선 건강기능식품 소재 관련하여 다수의 선행기술이 조사되었으며, 주요 기술은 다음과 같음

Table 3-8. 간 기능 특허 현황

NO	발명의 명칭	출원번호 (출원일)	등록번호 (등록일)
1	숙취해소 및 간 기능 개선용 건강 기능성 식품 조성물 및 이의 제조 방법	10-2017-0152940 (2017.11.16.)	10-1935861 (2018.12.31.)
2	옻나무 추출물과 두충나무 추출물을 포함하는 간 기능 개선, 예방 또는 치료용 조성물	10-2018-0064412 (2018.06.04.)	10-1923695 (2018.11.23.)
3	소나무껍질 추출물을 함유하는 간 기능 개선 및 숙취해소용 식품 조성물	10-2016-0157868 (2016.11.25.)	10-1919325 (2018.11.12.)
4	효소 처리 콩나물 추출물을 함유하는 간질환 치료 및 예방용 약학 조성물, 및 간보호용 건강기능식품	10-2012-0048885 (2012.11.18.)	10-1906984 (2018.10.04.)
5	고욤 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획물을 유효성분으로 함유하는 간 기능 개선용 조성물	10-2016-0065384 (2016.05.27.)	10-1837156 (2018.03.05.)
6	회귀 진세노사이드를 고함유하는, 산삼 또는 인삼을 포함하는 인삼류 추출물, 인삼류 형성층 유래 식물줄기세포 또는 이의 추출물 제조방법	10-2015-0118938 (2015.08.24.)	10-1821702 (2018.01.18.)
7	도토리 발효물을 함유하는 알코올 분해 및 간 기능 보호용 건강 기능성 조성물	10-2015-0158589 (2015.11.12.)	10-1772933 (2017.08.24.)

② 제 1 선행기술(한국등록특허 10-1935861호)는 숙취해소 및 간 기능 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것으로, 무, 산양삼, 생강, 마늘, 배, 도라지, 백개자, 산조인, 공사인 및 대추의 복합 추출물을 함유하는 것을 특징으로 함. 본 기술에 따르면, 음주로 인한 숙취를 해소하는 효과 및 알코올성 간 손상으로부터 간을 보호하는 효과가 우수함. 이에, 간 기능 개선 효과가 향상된 숙취해소 및 간 기능 개선용 건강기능식품으로 활용 가능함

③ 제 2 선행기술(한국등록특허 10-1923695호)는 천연물 추출물을 포함하는 간 기능 보호에 효과적인 조성물에 관한 것으로, 본 기술의 옻나무 추출물과 두충나무 추출물은 간 세포에서 독성 스트레스인 CCl<sub>4</sub>에 대한 유의한 보호 효과를 나타냄

④ 제 3 선행기술(한국등록특허 10-1919325호)는 천연물 추출물을 함유하는 간 기능 개선 및 숙취해소용 식품 조성물에 관한 것으로, 소나무껍질 추출물, 헛개나무열매 추출물, 엉겅퀴 추출물, 도라지 추출물 및 칩뿌리 추출물을 유효성분으로 함유함. 본 기술에 따르면, 식물 추출물을 원료로 하여 부작용이 없이 안전하게 섭취할 수 있으며, 섭취 시 간의 알코올 분해효소 및 아세트알데하이드 분해효소 활성의 증가, 카탈라아제 활성의 증가, 그리고 혈중 GOP 및 GPT 농도의 감소로 인하여 숙취해소 뿐만 아니라 음주로 인한 간의 손상을 효과적으로 방지할 수 있고, 간 기능을 효과적으로 개선할 수 있다. 특히 본 발명의 조성물은 각 추출물들의 시너지 효과로 인해 보다 우수한 간 기능 개선 효과 및 숙취해소 효과를 제공함

⑤ 제 4 선행기술(한국등록특허 10-1906984호)는 효소 처리 콩나물 추출물을 함유하는 간 보호용 건강기능식품 및 간질환 치료 조성물에 관한 것으로, 본 기술에 따른 추출물은 콩나물을

효소 처리와 동시에 실온에서 추출함으로써 통상의 콩나물 추출물이나 콩나물즙에 비하여 아스파라긴이 현저히 많이 추출되고, 동시에 HepG2 세포에서 과산화수소에 의한 간 손상 억제 활성이 뛰어난

⑥ 제 5 선행기술(한국등록특허 10-1837156호)는 고음 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획물을 유효성분으로 함유하는 간 기능 개선용 조성물에 관한 것으로, 본 기술에 따른 분획물은 간 기능 개선에 효과적이며, 천연물로부터 얻어진 물질을 이용하기 때문에 부작용을 유발하지 않으며, 안전성을 확보할 수 있어, 간 기능 개선을 위한 기능성 식품으로 활용 가능함

⑦ 제 6 선행기술(한국등록특허 10-1821702호)는 당뇨병 예방 또는 치료와 혈행 개선용 조성물 또는 간 기능 개선용 조성물에 관한 것으로, 특정 진세노사이드 예를 들어, Rh2와 같은 희귀 진세노사이드의 함량이 증대될 수 있도록 하는 인삼류 추출물, 인삼류의 형성층 유래 줄기세포, 또는 이의 추출물 제조방법, 상기 제조방법에 의해 제조된 인삼류 추출물, 인삼 형성층 유래 줄기세포, 또는 이의 추출물 및 이를 유효성분으로 포함함

⑧ 제 7 선행기술(한국등록특허 10-1772933호)는 도토리 발효물을 함유하는 알코올 분해 및 간 기능 보호용 건강 기능성 조성물에 관한 것으로, 도토리를 원료로 하여 70% 에탄올로 추출시킨 추출물을 고초균으로 발효시켜 수득된 발효물을 주원료로 함유하며, 간기능 개선, 신속한 에탄올 분해 및 숙취해소 효능이 우수함

## 나. 숙취해소 식품 소재

### (1) 기술 동향:

(가) 숙취해소제는 한국을 비롯한 일본, 중국, 대만 등의 동북아시아 국가를 중심으로 시장이 활성화되어 있으며, 이들 국가에서 다양한 제품개발이 활발히 진행되고 있음. 대체로 숙취해소를 위해 처방되는 한방재료나 북어국, 콩나물국 등 숙취해소를 위해 섭취하는 음식에 알코올의 해독에 좋은 아스파라긴산, 당 등이 다량 함유되어 있는 것으로 밝혀짐으로써, 이를 이용한 숙취해소제의 개발이 활발히 이루어지고 있음

(나) 숙취해소제에 사용되는 주요 한약재료로는 헛개나무(지구자나무), 무, 사철, 쑥, 칩, 감잎, 삼백초, 오가피, 노근, 상심, 금은화, 상엽, 구기자, 천문동, 용안육, 치자, 토사자, 해성차, 녹차, 감초 등이 있음

(다) 이에 재단법인 경남한방약초연구소(2017)에서는 한방을 소재로 한 간편한 숙취해소 음료를 개발하고 특허 출원하였으며, 헛개나무와 칩, 한약재 등 숙취해소에 효과가 있는 소재를 일정 비율로 배합하여 숙취해소 음료를 제조함

(라) 순천대학교(2010)에서는 오이를 주원료로 하여 숙취해소 음료를 개발하는 연구과제를 수행하였으며, 오이 발효원액 및 SKM(SK Mixture)를 이용해 시제품 제작 후 숙취해소 및 알코올성 간장해 개선에 대한 in vivo 효능을 검증함

(마) 그 외에도 오앤씨, 마린바이오프로세스, 한풍제약 등의 연구기관에서 숙취해소를 위한 새로운 천연소재 발굴 및 활용, 기능성 강화 등에 대한 기술을 개발하고 있는 것으로 나타남

Table 3-9. 숙취해소 소재 개발 현황

No.	연구기관	개발내용	연도
1	오앤씨	제주 자생생물 유래 다당류를 이용한 알코올성 간질환 완화 및 숙취해소 음료 개발	2008
2	마린바이오프로세스	GABA 및 해조다당류의 알콜분해활성 및 아세트알데하이드 분해활성을 이용한 숙취해소용 기능성음료의 개발	2009
3	순천대학교	오이를 주원료로 한 숙취해소 음료의 개발 및 상품화	2010
4	한풍제약	취당굴을 이용한 기능성 원료 소재 개발 및 상품화	2013
5	재단법인 경남한방약초연구소	숙취해소 효능이 있는 한약재를 소재로 하는 숙취해소 음료 제조	2017

출처 : NDSL 등

(2) 선행기술 조사 및 분석 :

(가) 선행기술 분석범위 :

① 숙취해소 식품 소재 분야를 특허분석대상으로 설정하였으며, 본 분야의 특허 동향을 파악하기 위해 국내의 특허 동향 및 주요 핵심특허 분석을 통해, 선행기술의 존재여부를 검토하였음

② 분석 대상기술과 관련되는 최근 기술이 포함되도록 조사일 현재까지의 국내의 출원·공개·등록 특허를 검색 대상으로 설정하였음

Table 3-10. 검색 범위 설정

국가	사용 DB	자료 구분
한국	WIPSON	출원·공개·등록특허 (출원일 기준)

③ 검색식은 기능성 천연 화장품 분야의 핵심키워드를 바탕으로 작성하였으며, 조사 결과의 누락 건수를 최소화하기 위하여 포괄적으로 작성되었음

Table 3-11. 검색식

국가	검색식
한국	(간건강* (간 adj 건강*) (간 adj 기능* 간개선* (간 adj 개선*)) and (기능성* (건강 adj 기능성) (건강기능성) (function*) dietary* nutrition*) and (숙취* 숙취제거* 숙취해소* (숙취 adj 제거) (숙취 adj 해소) 식품* food*)

(나) 선행기술 조사 결과

① 선행기술조사를 수행한 결과, 숙취해소 식품 소재 관련하여 다수의 선행기술이 조사되었으며, 주요 기술은 다음과 같음

Table 3-12. 숙취해소 특허 현황

NO	발명의 명칭	출원번호 (출원일)	등록번호 (등록일)
1	숙취해소 및 간 기능 개선용 건강 기능성 식품 조성물 및 이의 제조 방법	10-2017-0152940 (2017.11.16.)	10-1935861 (2018.12.31.)
2	소나무껍질 추출물을 함유하는 간 기능 개선 및 숙취해소용 식품 조성물	10-2016-0157868 (2016.11.25.)	10-1919325 (2018.11.12.)
3	간 기능 개선용 조성물 및 이의 제조방법	10-2017-0063146 (2017.05.22.)	10-1902701 (2018.09.19.)
4	마치현 주정 추출물을 유효성분으로 함유하는 알콜성 간손상 예방, 개선 및 치료용 조성물	10-2016-0179363 (2016.12.26.)	-
5	한약재 기반 숙취해소제용 조성물, 이를 이용한 환약 숙취해소제의 제조 방법 및 이에 의해 제조된 환약 숙취해소제	10-2016-0147231 (2016.11.07.)	-

② 제 1 선행기술(한국등록특허 10-1935861호)는 숙취해소 및 간 기능 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것으로, 무, 산양삼, 생강, 마늘, 배, 도라지, 백개자, 산조인, 공사인 및 대추의 복합 추출물을 함유하는 것을 특징으로 함. 본 기술에 따르면, 음주로 인한 숙취를 해소하는 효과 및 알코올성 간 손상으로부터 간을 보호하는 효과가 우수함. 이에, 간 기능 개선 효과가 향상된 숙취해소 및 간 기능 개선용 건강기능식품으로 활용 가능함

③ 제 2 선행기술(한국등록특허 10-1919325호)는 천연물 추출물을 함유하는 간 기능 개선 및 숙취해소용 식품 조성물에 관한 것으로, 소나무껍질 추출물, 헛개나무열매 추출물, 엉겅퀴 추출물, 도라지 추출물 및 칩뿌리 추출물을 유효성분으로 함유함. 본 기술에 따르면, 식물 추출물을 원료로 하여 부작용이 없이 안전하게 섭취할 수 있으며, 섭취 시 간의 알코올 분해효소 및 아세트알데하이드 분해효소 활성의 증가, 카탈라아제 활성의 증가, 그리고 혈중 GOP 및 GPT 농도의 감소로 인하여 숙취해소 뿐만 아니라 음주로 인한 간의 손상을 효과적으로 방지할 수 있고, 간 기능을 효과적으로 개선할 수 있다. 특히 본 발명의 조성물은 각 추출물들의 시너지 효과로 인해 보다 우수한 간 기능 개선 효과 및 숙취해소 효과를 제공함

④ 제 3 선행기술(한국등록특허 10-1902701호)는 간 기능 개선용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 본 기술의 유효성분인 참녹 추출물은 항산화 효과 및 카테킨 함량이 우수할 뿐만 아니라 알코올 분해효소 활성능 및 알데하이드 분해효소 활성능이 우수하여, 간 기능 개선을 통한 숙취 개선용 제품으로 활용 가능함

⑤ 제 4 선행기술(한국공개특허 10-2018-0075763호)는 마치현 주정 추출물을 유효성분으로 함유하는 알콜성 간 손상 예방, 개선 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 기술의 추출물은 알콜에 의해 유도되는 간손상을 억제하고 숙취해소 효과가 있으므로 간 기능 개선 및 숙취해소 제품으로 활용 가능함

⑥ 제 5 선행기술(한국공개특허 10-2018-0050783호)는 본 발명은 한약재 기반 숙취해소제용 조성물에 관한 것으로, 위장 기능 개선에 주된 관점을 둔 한약재를 기반으로 하여 재료 이용의 다양화를 도모하고, 유효 성분을 최적화할 수 있는 공정을 통해 재료의 수율을 극대화할 수

있는 효과가 있음. 또한, 기본적인 위장 기능의 개선과 아울러 보조적으로 간 기능 개선을 통해 탁월한 숙취해소 효과가 있음

### 다. 사업화 연계 방안 및 BM 수립

#### (1) 사업화 추진 방향 및 BM

(가) 본 기술은 활성도라지 추출물의 간 기능 개선에 관한 것임으로 화장품 분야 사업화를 위한 관련 연구가 미흡한 상태이며, 의약품 분야 사업화를 위해서는 전임상 및 임상시험 등 인허가를 위한 많은 시간과 비용의 투자가 필요함.

(나) 따라서 본 연구결과 및 기술의 활용성, 사업화 타당성, 선행기술을 살펴본 결과 본 기술은 간기능 개선 분야 건강기능식품 분야로 사업화를 추진하는 것이 타당해 보이며,

(다) 또한 국내 식약처의 간기능 개선 건강기능식품 개별인정형 원료로 도라지추출물이 등록되어 있어 본 연구결과를 바탕으로 인허가 절차를 진행할 수 있을 것으로 보임.

Table 3-13. 간 기능 개선 기능성 원료 인정현황

NO	원료명	인정등급	기능(지표)성분
1	브로콜리 스프라우트 분말	생리활성기능 3등급	sulforaphane
2	표고버섯균사체 추출물	생리활성기능 2등급	$\beta$ -glucan
3	밀크씨슬 추출물 (고시된 원료로 전환: 밀크씨슬 (카르두스마리아누스) 추출물)	생리활성기능 2~3등급	Silymarin
4	표고버섯균사체	생리활성기능 2등급	$\beta$ -glucan
5	복분자추출분말	생리활성기능 2등급	Ellagic acid
6	발효울금	생리활성기능 3등급	Curcumin
7	<b>도라지추출물</b>	<b>생리활성기능 2등급</b>	<b>Platycodin D</b>
8	유산균 발효 마늘 추출물	생리활성기능 2등급	cycloalliin

출처: 건강기능식품 기능성 원료 인정 현황, 식품의약품안전처, 2016

(라) 개별인정형 원료를 사용할 경우, 영업자가 연구 개발한 자료를 식약처에 제출하여 검토 및 심사를 받은 후에 기능성 원료로 인정을 받아야 하는 절차가 필요함

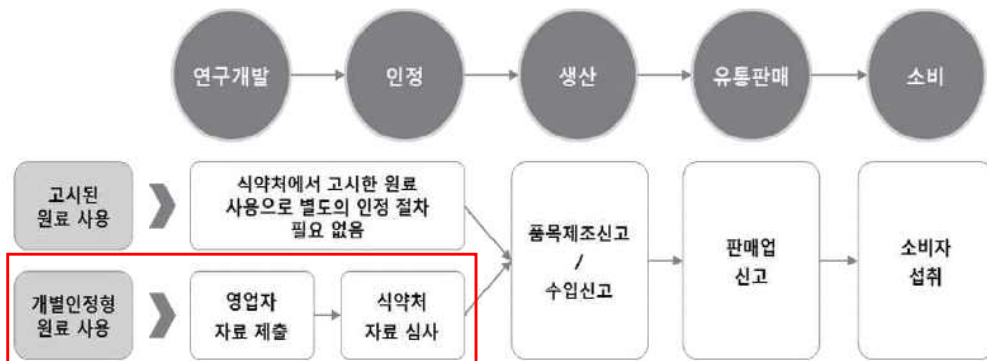


Fig. 3-5. 고시형 및 개별인정형 원료의 인허가 절차.

출처: 건강기능식품 산업동향 보고서, 농업기술실용화재단, 2013



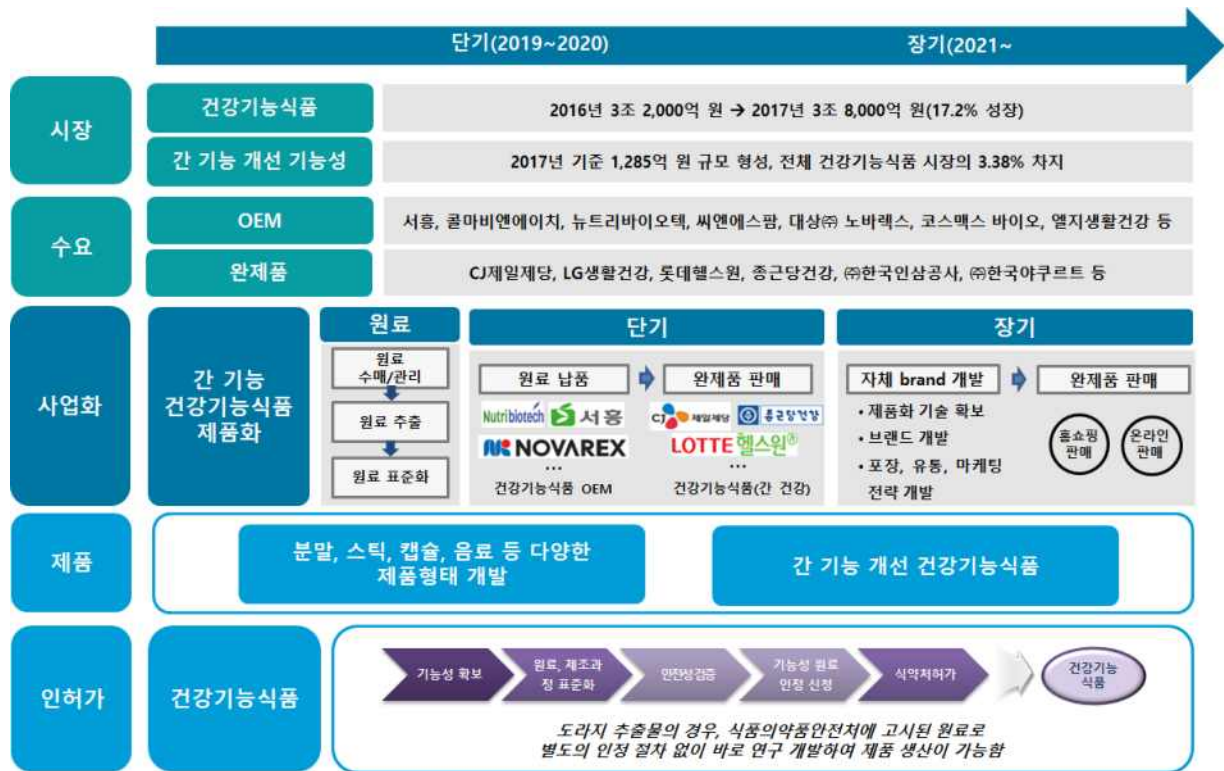


Fig. 3-6. 도라지 이용 BM 모델과 자연제약 기업 상용화 공급 프로세스.

## 제5절 활성도라지 소재의 안전성 및 효능 평가

### [협동, 경상대학교 산학협력단]

#### 1-1. 1차년도 연구수행 방법

##### 가. 활성도라지의 세포주 이용 세포독성 및 효능 평가

(1) 활성도라지 제조 및 처리 : 1) 생도라지를 100°C에서 1시간 증자 처리하여 2) 증자도라지 제조. 증자한 도라지에 유산균을 접종하여 35°C에서 7일간 발효시켜 제조한 3) 유산발효도라지. 증자도라지를 70°C에서 7일간 고온 숙성하여 제조한 4) 흑도라지. 유산균 발효가 완료된 유산발효도라지를 다시 7일간 고온 숙성하여 제조한 5) 유산발효흑도라지를 이용하여 실험을 진행함. 제작된 활성도라지를 건조시킨 후 분쇄시켜 건조 분말을 제조하고, 각 도라지 분말을 200 mg/ml의 농도로 녹인 후 0.45  $\mu$ m로 여과하여 사용하였다.

(2) 세포주 및 세포배양 : HepG2 (human hepatocellular carcinoma), FL83B (normal mouse hepatocyte) 간세포주 및 RAW264.7 (murine Macrophage) 대식세포주를 ATCC에서 분양받음. HepG2, FL82B 및 RAW264.7 세포주를 5 mM D-glucose, 10% FBS 및 1% penicillin/streptomycin 이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 및 F-12K 배지를 이용하여 CO<sub>2</sub> incubator(5% CO<sub>2</sub>, 95% air, 37°C)에서 배양하였으며 3일 간격으로 계대 배양하였다.

(3) MTT assay를 통한 제한용량 설정 : HepG2 및 FL83B 간세포주 및 raw264.7 대식세포주 (50,000 cells/mL)를 DMEM 및 F-12K 배지를 이용하여 24 well plate에 24 시간 배양시킨 후, starvation media에 16 시간 배양함. 여과된 각 활성도라지를 0.1, 0.5, 1 and 5 mg/ml 농도로 1 시간 처리한 후, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich) 용액을 0.1 mg/ml의 농도로 처리하여 37°C CO<sub>2</sub> incubator에 3시간 배양함. 배지를 제거한 각 well에 200  $\mu$ l dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 orbital shaker에 15분간 보관하여 생성된 formazan을 추출함. 추출된 formazan을 100  $\mu$ l 획득하여 96 well plate에 옮긴 후, ELISA reader (Molecular Devices, USA)로 570 nm 파장에서 optical density (OD) 값을 측정하였다.

(4) Oil-Red O 염색 : FL83B 간세포주에서 활성도라지에 의한 지방축적량의 변화를 분석하기 위해 Oil-Red O 염색을 시행함. FL83B 세포주를 24 well plate에 seeding 후 24시간 배양한 다음 FBS free media에 16 시간 배양함. 각 활성도라지를 0.1 및 0.5 mg/ml 농도로 1시간 전 처치 한 후, 배지를 제거하고 10% formaldehyde에서 1시간동안 고정시킨 다음 60% isopropanol 로 세척함. 60% Oil-Red O (Sigma-Aldrich) 10분간 염색한 후 증류수로 5회 세척함. 축적된 지질을 정량하기 위해 염색된 세포에 100% isopropanol을 5분간 처치한 후 ELISA reader로 500 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

(5) 세포내 중성지방 함량 측정 : HepG2 및 FL83B 간세포주에서 활성도라지에 의한 세포내 중성지방 (triglyceride) 함량의 변화를 triglyceride colorimetric assay kit(Cayman, USA)을 이용하여 분석함. HepG2 및 FL83B 세포주 (18 x 10<sup>6</sup> cells)를 6 well plate에 seeding 후 24시간 배양한 다음 FBS free media에 16 시간 배양함. 각 활성도라지를 0.1 및 0.5 mg/ml 농도로 1시간 전 처치 한 후, 세포 내 지질축적을 유도하기 위해 0.5 mM의 free fatty acid (FFA, 0.33

mM oleic acid+0.17 mM palmitic acid)를 24시간 처리함. 배지를 제거하고 kit내의 Standard Diluent buffer를 이용하여 lysis하여 5초간 sonication 함. 10,000 x g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 수집함. 상층액 10  $\mu$ l에 150 ml의 Enzyme Buffer solution을 첨가한 후 실온에서 15 분간 반응시키고 ELISA reader로 545 nm 파장에서 흡광도를 측정함. 측정된 중성지방 standard를 이용하여 세포내 중성지방 함량 (mg/dl)을 계산하였다.

(6) **Western blotting** : RAW264.7 대식세포주를 seeding 후 24시간 배양한 다음 FBS free media에 16 시간 배양함. 각 활성도라지를 0.1 및 0.5 mg/ml 농도로 1시간 전 처리 한 후, 배지를 제거한 다음 차가운 PBS로 2번 세척함. 100  $\mu$ l RIPA buffer에서 세포를 lysis시킨 후 13,000 g, 4°C에서 15 분간 원심분리하여 상층액을 획득함. Bicinchoninic acid assay (BCA)로 정량된 단백질 시료는 laemmli buffer를 첨가하여 100°C에서 5 분간 denaturation 함. SDS-PAGE에 전기영동하여 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane에 transfer한 후 5% skim-milk로 blocking을 수행함. 1차 항체 iNos, COX-2 및 TNF  $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnologies)와 2차 항체를 반응 후 ECL system (BioRad, USA)하에서 분석을 수행하였다.

## 1-2. 1차년도 연구결과

### 가. 활성도라지 농도별 처치에 따른 세포생존율 분석

(1) HepG2 세포주에서 활성도라지 농도별 처치에 따른 세포생존율 분석 : 간세포주인 HepG2 세포주에서 각 활성도라지를 농도별 (1-10 mg/ml)로 24시간 처리하여 세포생존율을 MTT assay로 측정함 (그림 1). 1)원료도라지 2)증자도라지 및 3)유산발효도라지는 1mg/ml 이하의 농도 4)흑도라지 5 mg/ml 이하의 농도에서 세포생존율의 변화가 없었으며, 5)유산발효흑도라지는 10 mg/ml 농도에서도 세포생존율의 차이가 나타나지 않음을 확인하였다(Fig. 1-1).

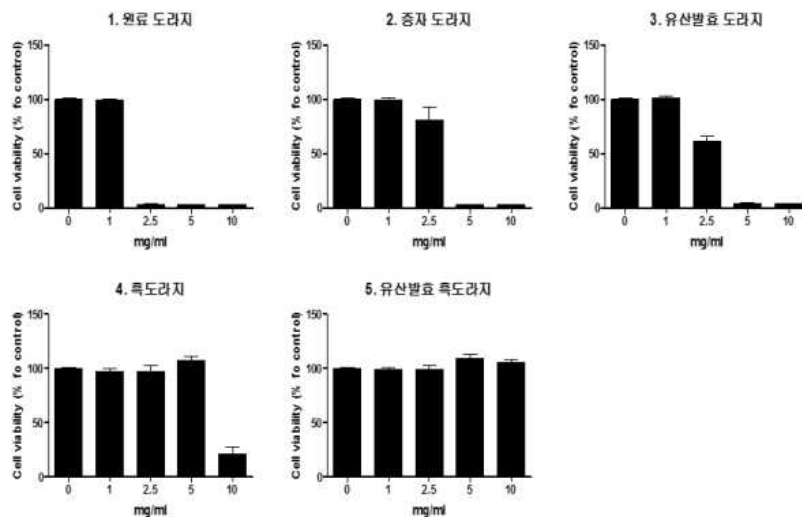


Fig. 1-1. 배양 간세포주인 HepG2에서 활성도라지의 세포 독성.

(2) HepG2 및 FL83B 세포주에서 활성도라지와 FFA 동시 처치에 따른 세포생존율 분석 : 간세포주인 HepG2 및 FL83B 세포에서 각 활성도라지를 농도별 (0.001-5 mg/ml)로 1시간 처리

한 후, 0.5 mM의 free fatty acid (FFA, 0.33 mM oleic acid+0.17 mM palmitic acid)를 24시간 처리하여 세포생존율을 MTT assay로 측정함 (Fig. 1-2 및 1-3). HepG2 세포주는 1)원료도라지, 2)증자도라지, 3)유산발효도라지 및 4)흑도라지 1 mg/ml 이하 농도에서 세포생존율에 별다른 차이가 없었으나 5 mg/ml 농도에서 세포생존율이 감소함. 5)유산발효흑도라지는 5 mg/ml 농도에서도 세포생존율의 차이가 나타나지 않음을 조사하였다(Fig. 1-2).

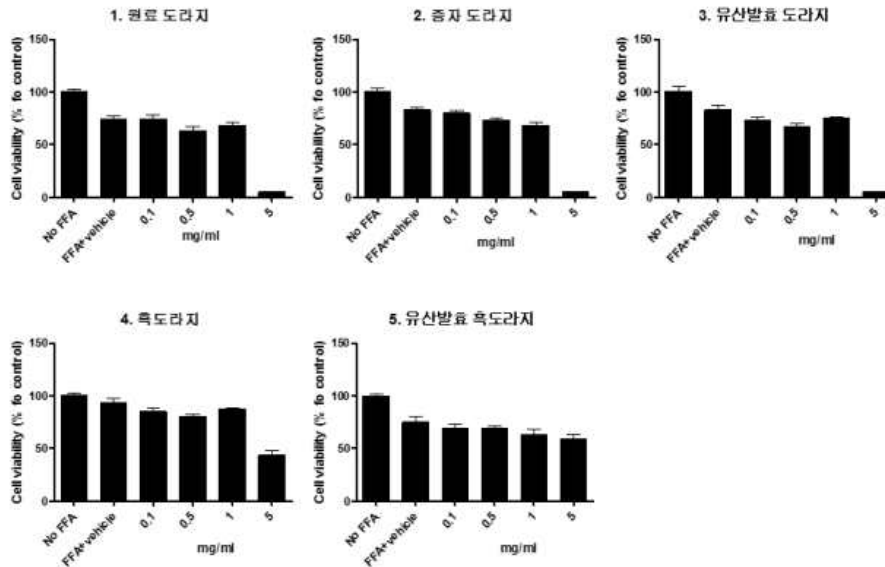


그림 4-2. 배양 간세포주인 HepG2에서 활성도라지의 세포독성.

• FL83B 세포주에 1)원료도라지, 2)증자도라지, 3)유산발효도라지, 4) 흑도라지 및 5) 유산발효흑도라지를 1시간 전 처리후 0.5 mM의 free fatty acid (FFA, 0.33 mM oleic acid+0.17 mM palmitic acid)를 24시간 처리하여 세포생존율을 MTT assay로 측정함. 각 활성도라지를 0.5 mg/ml의 농도로 처리하여도 세포생존율의 유의한 차이가 나타나지 않음을 확인함(Fig. 1-3).

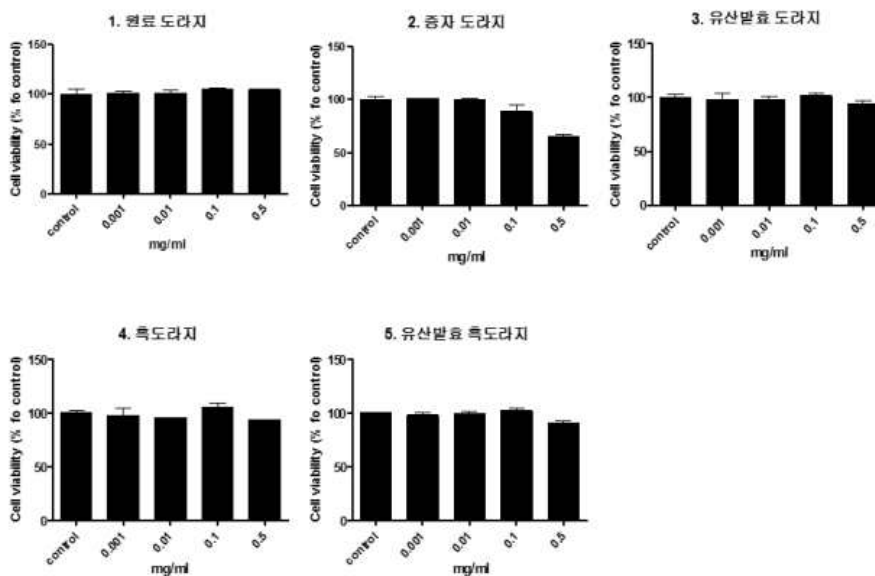


그림 4-3. 배양 간세포주인 FL83B에서 활성도라지의 세포 독성.

## 2-1. 2차년도 연구수행 방법

### 가. 지방간 축적 억제 효능 분석

(1) 세포주 및 세포배양 : HepG2 (human hepatocellular carcinoma), FL83B (normal mouse hepatocyte) 간세포주 및 RAW264.7 (murine Macrophage) 대식세포주를 ATCC에서 분양받음. HepG2, FL82B 및 RAW264.7 세포주를 5 mM D-glucose, 10% FBS 및 1% penicillin/streptomycin 이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 및 F-12K 배지를 이용하여 CO<sub>2</sub> incubator(5% CO<sub>2</sub>, 95% air, 37°C)에서 배양하였으며 3일 간격으로 계대 배양함.

(2) MTT assay를 통한 제한용량 설정 : HepG2 및 FL83B 세포주 (50,000 cells/mL)를 DMEM 및 F-12K 배지를 이용하여 24 well plate에 24 시간 배양시킨 후, starvation media에 16 시간 배양함. 여과된 각 활성도라지를 0.1, 0.5, 1 and 5 mg/ml 농도로 1시간 처리한 후, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl -tetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich) 용액을 0.1 mg/ml의 농도로 처리하여 37°C CO<sub>2</sub> incubator에 3시간 배양함. 배지를 제거한 각 well에 200  $\mu$ l dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 orbital shaker에 15분간 보관하여 생성된 formazan을 추출함. 추출된 formazan을 100  $\mu$ l 획득하여 96 well plate에 옮긴 후, ELISA reader (Molecular Devices, USA)로 570 nm 파장에서 optical density (OD) 값을 측정함.

(3) Oil-Red O 염색 : FL83B 세포주에서 활성도라지에 의한 지방축적량의 변화를 분석하기 위해 Oil-Red O 염색을 시행함. FL83B 세포주를 24 well plate에 seeding 후 24시간 배양한 다음 FBS free media에 16 시간 배양함. 각 활성도라지를 0.1 및 0.5 mg/ml 농도로 1시간 전 처리 한 후, 배지를 제거하고 10% formaldehyde에서 1시간동안 고정시킨 다음 60% isopropanol로 세척함. 60% Oil-Red O (Sigma-Aldrich) 10분간 염색 후 증류수로 5회 세척함. 축적된 지질을 정량하기 위해 염색된 세포에 100% isopropanol을 5분간 처리한 후 ELISA reader로 500 nm 파장에서 흡광도를 측정함.

(4) 세포내 중성지방 함량 측정 : HepG2 및 FL83B 세포주에서 활성도라지에 의한 세포 내 중성지방 (triglyceride) 함량의 변화를 triglyceride colorimetric assay kit(Cayman, USA)을 이용하여 분석함. HepG2 및 FL83B 세포주 (18 x 10<sup>6</sup> cells)를 6 well plate에 seeding 후 24시간 배양한 다음 FBS free media에 16 시간 배양함. 각 활성도라지를 0.1 및 0.5 mg/ml 농도로 1시간 전 처리 한 후, 세포 내 지질축적을 유도하기 위해 0.5 mM의 free fatty acid (FFA, 0.33 mM oleic acid+0.17 mM palmitic acid)를 24시간 처리함. 배지를 제거하고 kit내의 Standard Diluent buffer를 이용하여 lysis하여 5초간 sonication 함. 10,000 x g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 수집함. 상층액 10  $\mu$ l에 150 ml의 Enzyme Buffer solution을 첨가한 후 실온에서 15분간 반응시키고 ELISA reader로 545 nm 파장에서 흡광도를 측정함. 측정된 중성지방 standard를 이용하여 세포내 중성지방 함량 (mg/dl)을 계산함.

(5) Western blotting : RAW264.7 세포주를 seeding 후 24시간 배양한 다음 FBS free media에 16 시간 배양함. 각 활성도라지를 0.1 및 0.5 mg/ml 농도로 1시간 전 처리 한 후, 배지를 제거한 다음 차가운 PBS로 2번 세척함. 100  $\mu$ l RIPA buffer에서 세포를 lysis시킨 후 13,000 g, 4°C에서 15분간 원심분리하여 상층액을 획득함. Bicinchoninic acid assay (BCA)로 정량된 단백질 시료는 laemmli buffer를 첨가하여 100°C에서 5 분간 denaturation 함. SDS-PAGE에 전기영동하여

polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane 에 transfer한 후 5% skim-milk로 blocking을 수행함. 1차 항체 iNos, COX-2 및 TNF $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnologies)와 2차 항체를 반응 후 ECL system (BioRad, USA)하에서 분석을 수행함.

## 나. 염증성 간 손상 억제 효능 분석

(1) 실험동물 : 실험동물은 (주) 하나상사(경기 오산)로부터 구입한 생후 8주된 C57BL/6 계통의 웅성 마우스(23-24g)를 이용하였다. 동물은 일정한 온도(25°C)와 규칙적인 조명(12시간 명/암)이 자동적으로 조절되는 동물실에서 사육되었고 사료와 음수가 자유롭게 공급되었으며, 일주일간 적응기간을 거친 후 본 실험에 사용하였다.

(2) 실험군 분류 및 처치 : 급성간독성 실험에서 웅성 C57BL/6 마우스를 (1)무처치군, (2)lipopolysaccharide 및 galactosamine(LPS/GalN)을 단독으로 투여한 실험군, (3)100 mg/kg 원료도라지 추출물+LPS/GalN 투여군, (4)500 mg/kg 원료도라지 추출물+LPS/GalN 투여군, (5)100 mg/kg 유산발효도라지 추출물+LPS/GalN 투여군, (6)500 mg/kg 유산발효도라지 추출물+LPS/GalN 투여군으로 나누었다. LPS/GalN 투여 1시간 전에 추출물을 경구 투여하였다. 모든 군에 LPS 10  $\mu$ g/kg+GalN 700 mg/kg 1회 복강 투여하였다. LPS/GalN 투여 4시간 후 실험동물을 희생시켜 채혈하고 간 조직을 적출하였다.

(3) 활성 도라지 투여에 의한 급성 간손상에서 생존율 분석 : C57BL/6 마우스에 정상 대조군과 실험군으로 각각 10마리씩 구성하였다. 정상 대조군에는 saline을 복강 투여하였고, 간독성 유도 실험군에는 LPS 10  $\mu$ g/kg+GalN 700 mg/kg을 복강 투여 하였다. 복강 투여 후 30분간 관찰을 통해서 생존율(%)을 측정하여 survival rate로 명시하였다.

(4) 혈청 생화학적 지표성분 분석 : 간세포 손상을 측정하기 위해 혈청 분석용 kit(IVD-LAB, Korea)를 사용하여 aspartate aminotrans-ferase(AST) 및 alanine aminotransferase(ALT)을 측정하였다. Kit내의 R1, R2 시약을 4:1의 비율로 혼합하여 마우스에서 분리한 용혈되지 않은 혈장에 섞어 실험을 수행하였다. AST와 ALT는 340 nm에서 spectrophotometer를 사용하여 흡광도를 측정하였고 혈청 liter당 unit(U/L)으로 나타내었다.

(5) 세포배양 : 인체 간암세포인 HepG2 세포를 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100units/ml penicillin, 그리고 100  $\mu$ g/ml streptomycin이 함유된 DMEM 배지를 이용하여 37°C humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 마우스 정상간세포주 FL83B cell은 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100units/ml penicillin, 그리고 100  $\mu$ g/ml streptomycin이 함유된 F12K 배지를 이용하여 37°C humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

(6) 세포독성실험 : MTT assay는 탈수소 효소작용에 의해 노란색의 수용성기질인 MTT tetrazolium을 청자색의 비수용성 MTT formazan (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법으로 간 세포주에서 세포독성을 측정하였다. 24 well plate에 5 $\times$ 10<sup>3</sup>/well의 개수로 배양하고, 24 h이 경과한 후 well당 도라지 추출물과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 600  $\mu$ M의 농도로 처리하여 24 h 동안 배양하였다. 24시간 후 용 PBS에 용해시킨 1 mg/mL MTT 시약을 첨가하여 37°C에서 3시간 배양한 후 상층액을 제거하고 DMSO를 200  $\mu$ L 첨가하여 ELISA reader기를 통해 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하는 방법을 사용하였으며 Cell viability 측정은 3회 반복 수행하여 평균값을 도출하였다.

## 다. 면역기능 개선 효능 분석

(1) NO 생성능 측정 : 세포 분주 후 24시간 후에 도라지 약물과 LPS를 24시간 자극시켰다. 세포배양 상층액을 얻어 96well plate에 griess 시약과 함께 넣어 반응시킨 후 흡광도 540nm에서 측정하였다.

(2) Western blot 분석 : RAW264.7 cell을 분주하여 24시간 배양시킨 후 serum free media로 16시간 starvation하였다. Positive control인 LPS와 도라지 약물을 iNOS, COX-2는 8시간 TNF- $\alpha$ 는 4시간 자극시킨 후 RIPA buffer에서 균질화 하고 BCA로 정량 하였다. SDS-PAGE로 정기영동한 후 PVDF membrane에 transfer하였다. 그 후 Skim milk로 blocking하고 iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ ,  $\beta$ -actin antibody를 binding시킨 후 ECL로 detection하였다.

(3) Real-time PCR : RAW264.7 cell을 분주하여 24시간 배양시킨 후 serum free media로 16시간 starvation하였다. Positive control인 LPS와 도라지 약물을 1간 자극시킨 후 얻은 세포에 TRIZOL을 넣고 균질화한 후 chloroform 을 가하여 원심분리하여 상층액을 수집하였다. Isopropanol을 넣어 원심분리하여 RNA를 추출한 다음 정량하여 cDNA를 합성하였다. TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, GAPDH primer와 SYBR green, cDNA를 넣은 후 real-time PCR을 수행하였다.

(4) 마우스에서 분리한 비장세포에서 cytokine 측정 : 마우스에서 분리한 비장세포를 96well plate에 1X10<sup>5</sup> cell/well이 되도록 분주하고 양성대조군으로 concanavalin A(1  $\mu$ g/ml) LPS(1  $\mu$ g/ml)를 처리하여 72시간 배양하고 상층액을 취해 원심분리한 후 상층액으로 TNF- $\alpha$ , IL-6 ELISA assay를 수행하였다.

## 라. 항염증 효능 분석

(1) 세포생존율 분석(MTT assay) : 대식세포인 RAW264.7와 비만세포주인 RBL-2H3을 본 연구에서 사용하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 10% FBS, penicillin이 포함된 DMEM에서 배양하였다. RAW264.7cell을 24 well plate에 분주하여 24시간동안 배양한 후 도라지를 24시간 동안 반응시키고 MTT solution을 더해 4시간동안 반응시켰다. 반응 후 ELISA를 사용하여 570nm에서 측정하였다.

(2) Western blot 분석 : 대식세포인 RAW264.7과 비만세포주인 RBL-2H3을 분주하여 24시간 배양시킨 후 serum free media로 16시간 starvation하였다. 도라지 1시간 전처리 후에 LPS(1  $\mu$ g/ml)로 iNOS, COX-2는 8시간 TNF- $\alpha$ 는 4시간 자극시킨 후 RIPA buffer에서 균질화 하고 BCA로 정량 하였다. SDS-PAGE로 정기영동한 후 PVDF membrane에 transfer하였다. 그 후 Skim milk로 blocking하고 iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ ,  $\beta$ -actin antibody를 binding시킨 후 ECL detection하였다.

(3) NO 생성능 측정 : 세포 분주 후 24시간 후에 도라지 약물을 1시간 전처리하고 LPS를 24시간 자극시켰다. 세포배양 상층액을 얻어 96well plate에 griess 시약과 함께 넣어 반응시킨 후 흡광도 540nm에서 측정하였다.

(4) Cytokine 분비 측정 : 세포를 분주하여 24시간 배양한 후 약물과 LPS로 24시간 자극시킨 다음 상층액을 얻어 원심분리하였다. TNF- $\alpha$ , IL-6 ELISA kit를 사용하여 측정하였다.

## 2-2. 2차년도 연구결과

### 가. 간 세포주에서 지질축적 억제 효능

(1) Free fatty acid를 처리한 FL83B 세포주에서 활성도라지 처치에 따른 농도별 세포 내 지질축적 억제 효능 분석 : FL83B 세포에 0.5 mM FFA를 처리한 후 24시간에 Oil-Red O 염색을 통해 활성도라지의 지질축적 억제 효능을 분석함(Fig. 2-1). 각 활성도라지를 0.1 및 0.5 mg/ml의 농도로 1 시간 처리하여 지질축적의 변화를 실험한 결과, 각 활성도라지의 농도별 지질 축적의 유의적 변화가 나타나지 않았음.

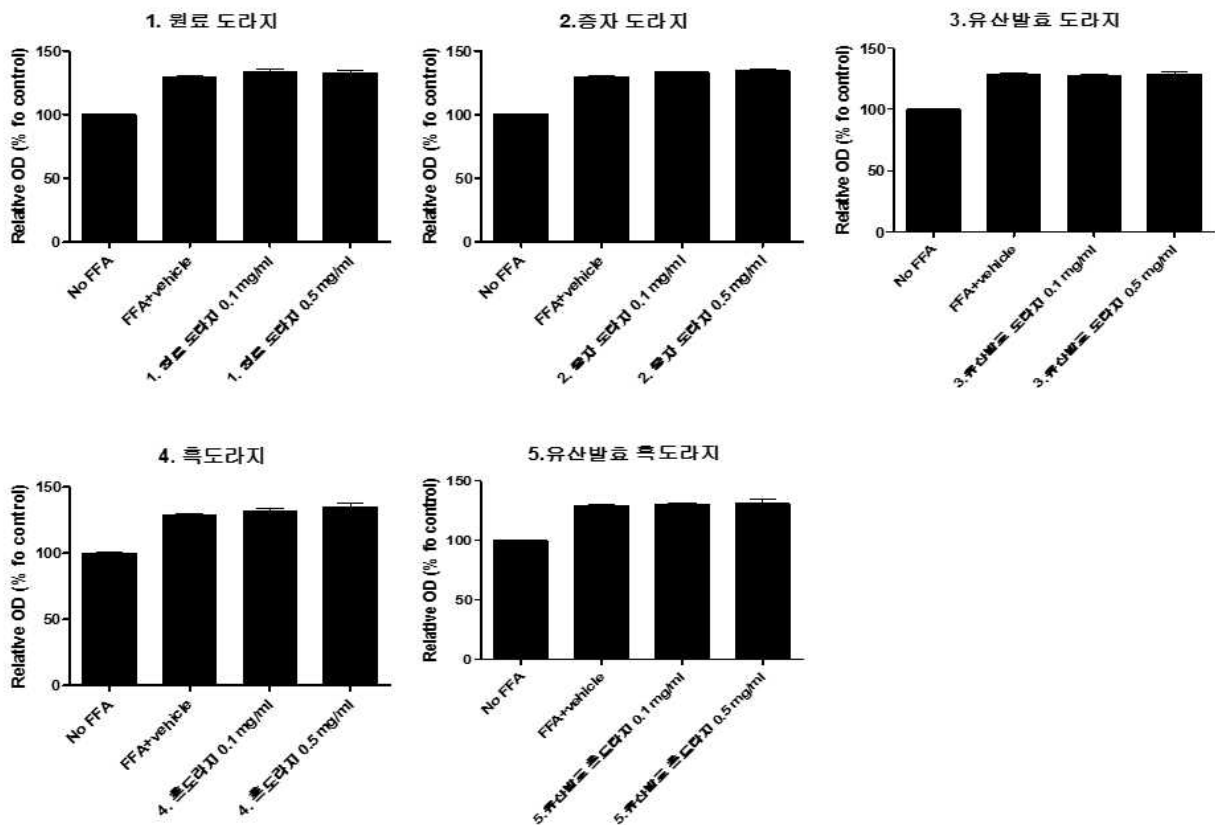


Fig. 2-1. FFA를 처리한 FL83B 세포에서 MTM의 지질축적 억제 효능.

(2) Free fatty acid를 처리한 FL83B 및 HepG2 세포에서 활성도라지 처치에 따른 농도별 세포 내 중성지방 축적 억제 효능 분석 :

(가) HepG2 및 FL83B 세포에 농도별로 각 활성도라지를 1시간 처리한 후, 0.5 mM FFA를 처리하여 24시간에 세포 내 중성지방 축적에 대한 활성도라지의 억제 효능을 분석함(그림 4-2 및 4-3). HepG2 세포주에서 각 활성도라지를 0.5 및 1 mg/ml의 농도로 1 시간 처리하여 세포 내 중성지방의 변화를 실험한 결과 흑도라지 1 mg/ml에서 중성지방 축적이 감소하는 결과를 나타내었으나, 각 소재의 농도별 처치는 세포내 중성지방의 변화가 나타나지 않음을 확인함(Fig. 2-2).



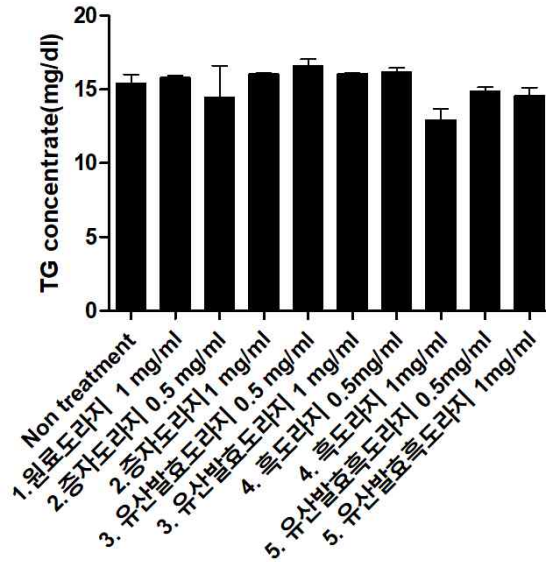


Fig. 2-2. FFA를 처치한 HepG2 세포에서 활성도라지의 중성지방 축적 억제 효능.

(나) FL83B 세포주에서 각 활성도라지를 0.1 및 0.5 mg/ml의 농도로 1 시간 처리하여 세포 내 중성지방의 변화를 실험한 결과 각 활성도라지의 농도별 세포내 중성지방의 변화가 나타나지 않음을 확인함 (Fig. 2-3).

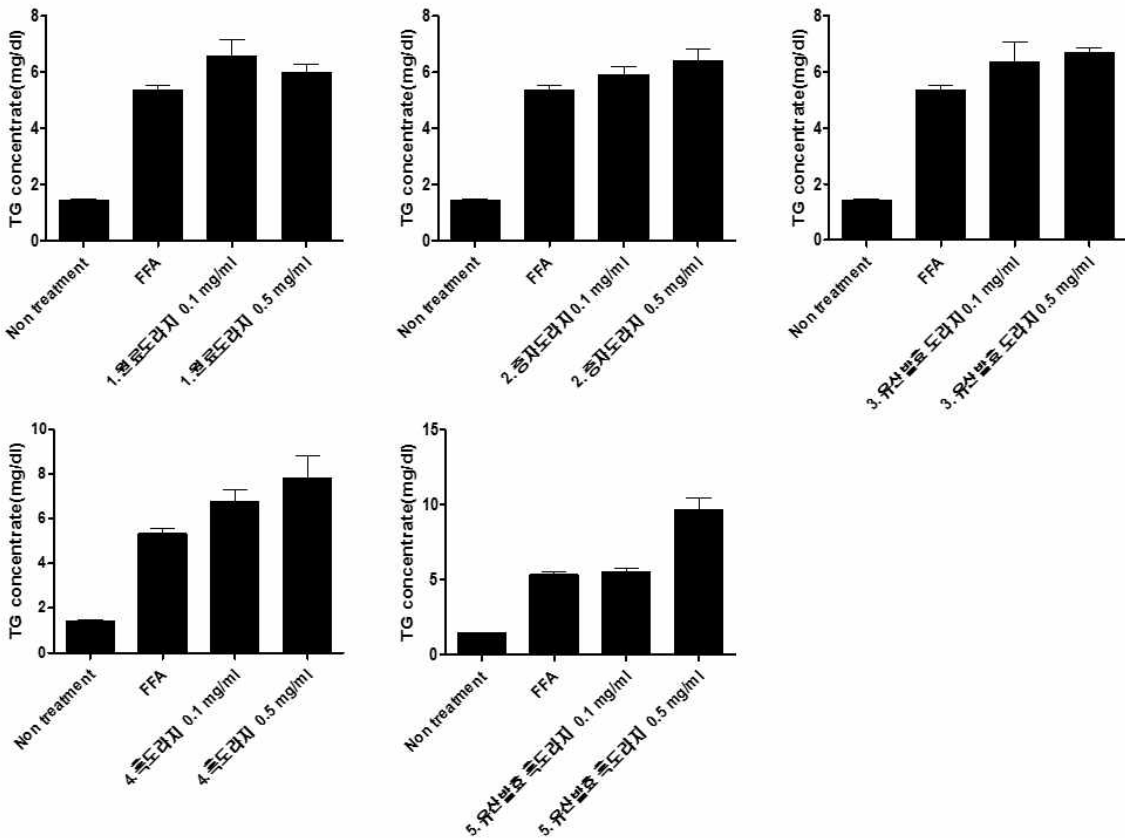


Fig. 2-3. FFA를 처치한 FL83B 세포에서 활성도라지의 중성지방 축적 억제 효능.

## 나. 비알코올성 급성 간 손상에서 간 기능 개선

(1) 동물모델에서 활성도라지에 의한 LPS/GalN에 유도된 간독성 효능 분석 : 물 투여 후 LPS/GalN을 복강주사한 대조군의 경우, LPS/GalN 투여 후 6.5시간째 17%의 생존율을 보였고 이후 7시간째 0%의 생존율을 나타내었음. 원료도라지 100mg/kg 용량 투여군의 경우, LPS/GalN 투여 후 5시간째 83%, 6시간째 67%, 7시간째 33%의 생존율을 보였고 이후 7.5시간째 0%의 생존율을 나타내었음. 원료도라지 500mg/kg 용량 투여군의 경우, LPS/GalN 투여 후 6시간째 83%, 6.5시간째 50%, 7시간째 17%의 생존율을 보였고 이후 9시간째까지 17%의 생존율을 나타내었음. 유산발효흑도라지 100mg/kg 용량 투여군의 경우, LPS/GalN 투여 후 7시간째 33%, 8시간째 17%의 생존율을 보였고 이후 9시간째까지 17%의 생존율을 나타내었음. 유산발효흑도라지 500mg/kg 용량 투여군의 경우, LPS/GalN 투여 후 7시간째 67%, 7.5시간째 33%의 생존율을 보였고 이후 9시간째까지 17%의 생존율을 나타내었음. 따라서, 유산발효흑도라지는 대조군이나 원료도라지에 비해 LPS/GalN에 의한 급성 간 손상에서 생존율을 증가시키는 경향을 나타내었음(Fig. 2-4).

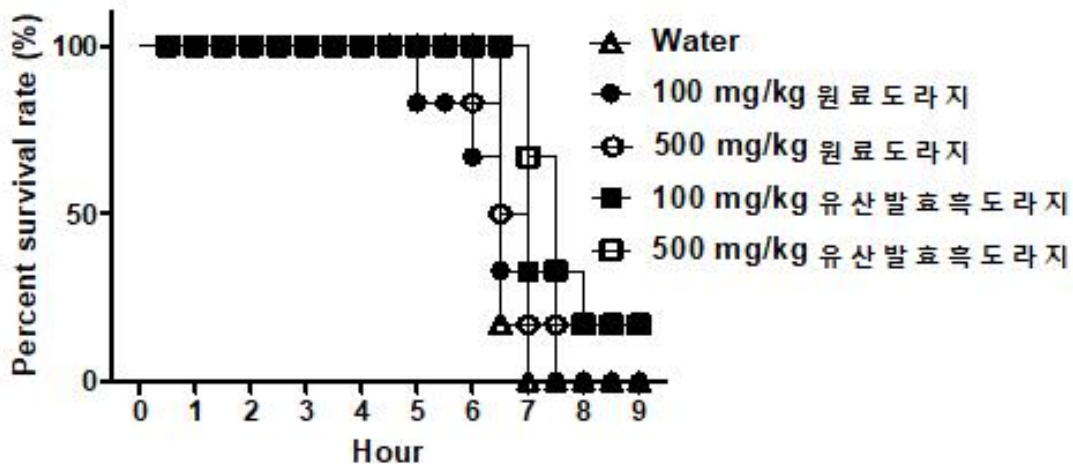


Fig. 2-4. C57BL/6 마우스에서 LPS/GalN에 유도된 간독성 효능 (생존율).

## (2) LPS/GalN에 유도된 간독성 동물모델에서 활성도라지 간 보호 효능 분석 :

(가) 간의 실질세포가 손상되면 세포질에 존재하는 알라닌아미노전이효소(ALT)와 아스파르테이트 아미노전이효소(AST)는 혈중으로 유리되어 그 농도가 증가하므로, 이 두 효소의 활성을 측정하는 것은 간 손상의 정도를 알 수 있는 중요한 지표가 된다. LPS/GalN에 의한 급성 간 손상 모델에서 ALT와 AST의 농도 변화를 측정하여 활성도라지의 간 보호 효과를 확인하였음.

(나) Fig. 2-5에서 보는 바와 같이 정상군에 비해 LPS/GalN 처리군은 ALT 농도가 정상대조군에 비해 약 3배 증가하였으며, 원료도라지 100 mg 및 500 mg/kg 투여군은 LPS/GalN 처리군에 비해 약 15.5% 및 5.5% 혈중 ALT양이 감소하였으며, 유산발효도라지 100 mg 및 500 mg/kg 투여군은 LPS/GalN 처리군에 비해 약 17.2% 및 5.7%의 혈중 ALT양의 감소를 확인하였음.

(다) AST 농도 역시 정상군보다 LPS/GalN 처리군에서 정상대조군에 비해 약 3.4배 증가하였음. 원료도라지 100 mg 및 500 mg/kg 투여군은 LPS/GalN 처리군에 비해 혈중 AST양은 감소

하지 않았으며, 유산발효도라지 100 mg 및 500 mg/kg 투여군은 LPS/GalN 처리군에 비해 약 23.1% 및 11.3%의 혈중 AST양의 감소를 확인하였음.

(마) 따라서, 유산발효도라지는 LPS/GalN 투여에 의한 혈중 간 손상 지표의 상승을 억제하는 것을 알 수 있음.

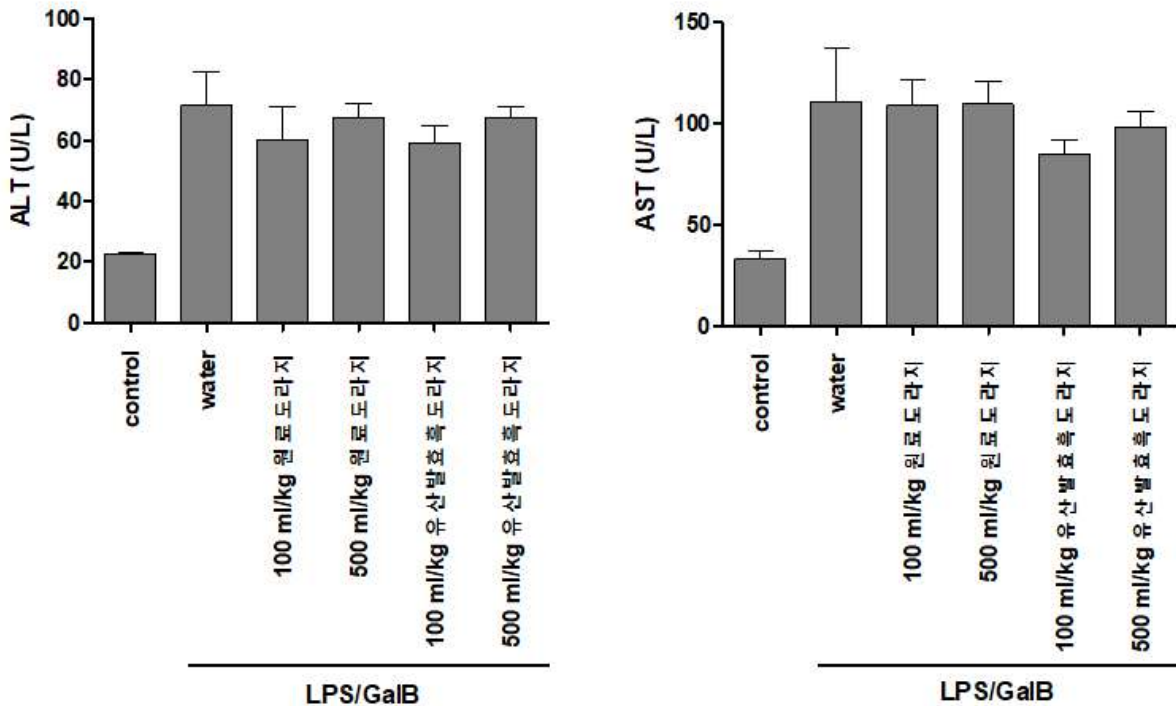


Fig. 2-5. C57BL/6 마우스에서 LPS/GalN에 유도된 간 보호 효능 (ALT와 AST).

### (3) 활성도라지 간 세포 독성 분석

(가) 활성도라지의 간세포 독성 유무를 확인하기 위하여 인체 간암세포주인 HepG2 세포주에 활성도라지를 처리한 후 세포 독성을 조사하였음. 활성도라지의 세포 독성을 확인하기 위해 각 도라지 별로 1, 2.5, 5 및 10 mg/ml의 농도로 HepG2 세포주에 처리하고 MTT를 통해 세포 생존율을 확인하였음.

(나) 원료도라지는 1 mg/ml의 농도에서 세포독성을 나타내지 않았으며, 2.5 mg/ml 농도에서 96% 생존율 감소로 높은 세포 독성을 나타내었음. 증자도라지는 1 mg/ml의 농도에서 세포독성을 나타내지 않았으며, 2.5 mg/ml 농도에서 19% 생존율 감소, 5 mg/ml 농도에서 97% 생존율 감소를 나타내었음. 유산발효도라지는 2.5 mg/ml 농도에서 38.5% 생존율 감소, 5 mg/ml 농도에서 95.8% 생존율 감소를 나타내었음. 흑도라지는 5 mg/ml 농도까지 생존율의 감소는 나타나지 않았지만, 10 mg/ml 농도에서 79% 생존율 감소를 나타내었음. 유산발효흑도라지는 실험에 사용한 농도(1-10 mg/ml)에 세포 독성을 나타내지 않았음(Fig. 2-6).

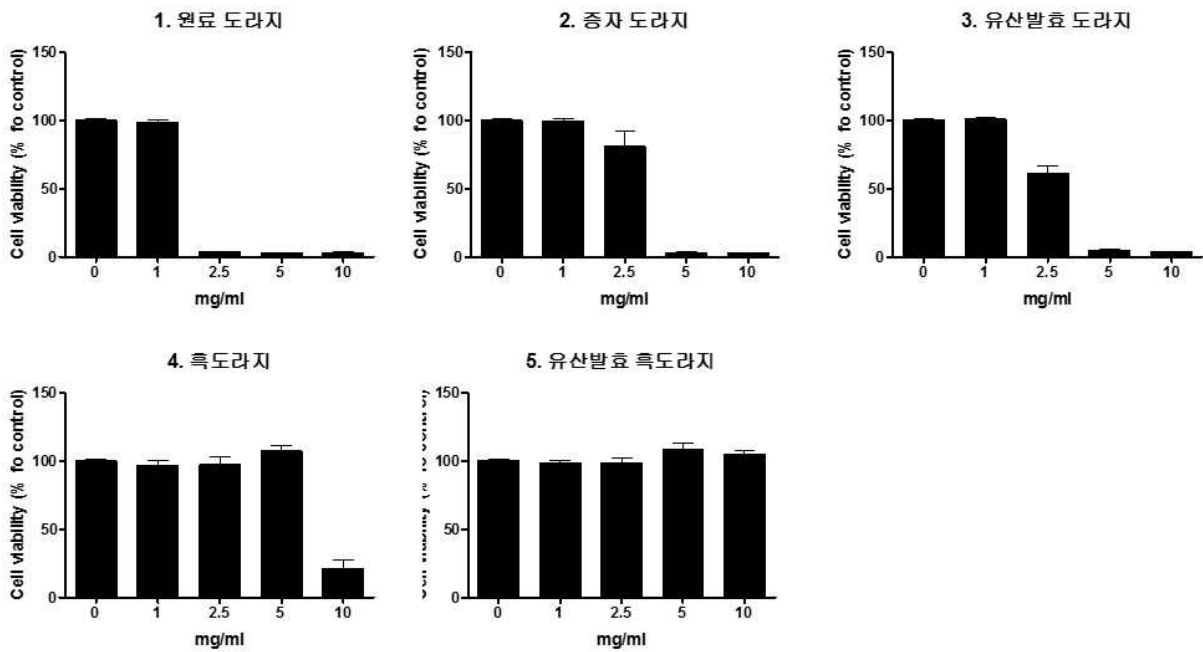


Fig. 1-6. HepG2 세포주에서 간 세포 독성 확인.

#### (4) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 유도된 간세포 손상에서 활성도라지의 세포 손상 보호 효과

(가) 과산화물 음이온(superoxide anion), 과산화수소수(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 수산화 라디칼(hydroxyl radical, OH) 등과 같은 반응성 산소종은 산화성 스트레스를 유발하여 세포내 DNA 변형 및 세포의 사멸을 유도함. 따라서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도된 FL83B 마우스 세포주 독성에 대한 활성도라지 추출물의 보호효과는 독성을 나타내지 않은 농도범위(0.01 및 0.1 mg/ml)의 시료를 처리하여 측정하였음. 각 농도별로 1시간 전 처리한 세포에서 600 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 함유한 배양액을 투여하여 24시간 동안 반응시킨 다음 MTT assay로 생존을 측정하여 생존율의 차이를 평가하였음.

(나) FL83B 세포주에서 원료도라지의 0.01 및 0.1 mg/ml의 농도에서 세포 독성을 나타내지 않았으며, 대조군의 세포 생존율을 100%로 보았을 때 전 처리하지 않은 실험군은 81% 세포 생존율을 나타낸 반면, 원료도라지 0.01 및 0.1 mg/ml 전처리에서는 각각 82.8 및 96%의 생존율이 나타나 농도 의존적으로 보호효과가 증대되었음.

(다) 또한 유산발효흑도라지의 0.01 및 0.1 mg/ml의 농도에서 세포 독성을 나타내지 않았으며, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 실험군에서 80.8%의 세포 생존율이 나타났으며, 유산발효흑도라지의 0.01 및 0.1 mg/ml 전처리에서는 각각 87 및 77.3%의 생존율을 나타내어 저농도에서 산화적 스트레스에 의한 세포생존율 감소를 억제하는 것을 확인하였음(그림 4-7).

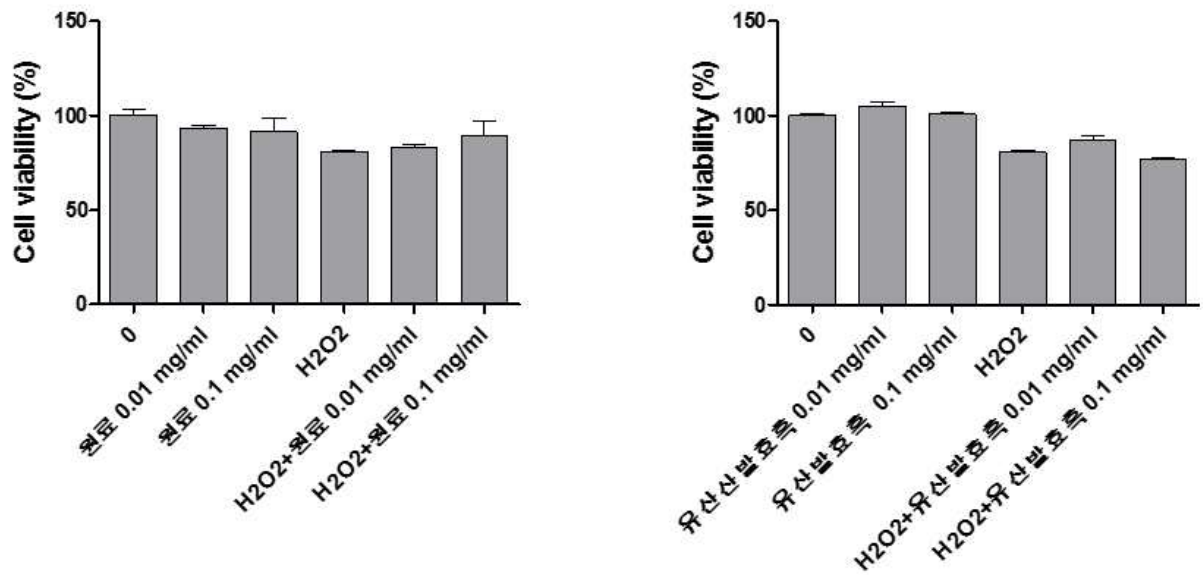


Fig. 2-7. FL83B 세포주에서 세포 손상 보호 효과 확인.

#### 다. 면역세포에서 면역기능 개선 효능

(1) 대식세포인 RAW264.7 세포주에서 심전대보환의 NO 생성능 : RAW264.7 세포에서 심전대보환에 의한 산화질소 생성정도를 관찰하기 위하여 심전대보환을 처리한 후 얻어지는 세포 배양 상층액에서 산화질소 생성을 측정하였다. 무처리군에서는 산화질소가 생성되지 않았으나 LPS를 처리한 대조군에서는 70  $\mu$ M 정도의 산화질소가 생성되었고 심전대보환(도라지 B)에서 유의적으로 산화질소의 양이 증가하였다(Fig. 2-8).

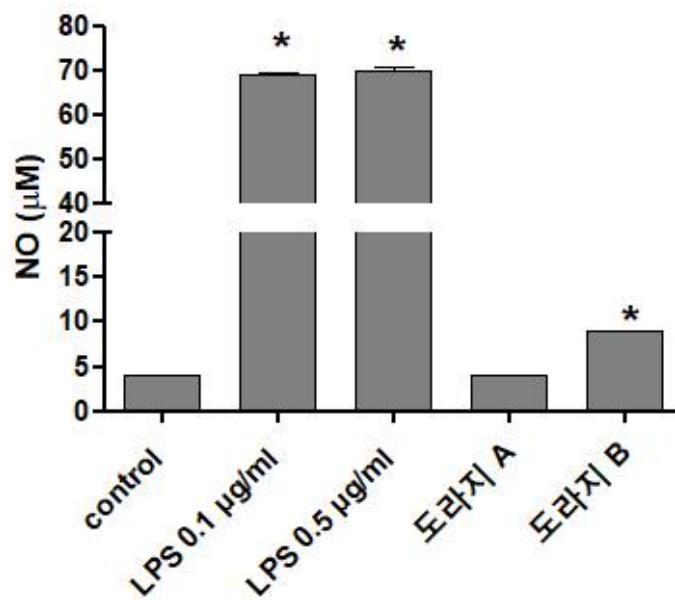


Fig. 2-8. RAW264.7 세포주에서 심전대보환 A 또는 B를 처리한 후 배양액에서 NO 생성량을 분석.

(2) 대식세포인 RAW264.7 세포주에서 십전대보환의 iNOS, COX-2, TNF-a 발현 유도 : RAW264.7 세포에서 십전대보환에 의한 iNOS, COX-2, TNF-a 단백질 발현 유발 정도를 관찰하기 위하여 십전대보환을 농도별로 처리한 후 각각 4시간에서 iNOS 및 COX-2 발현과 8시간에서 TNF-a 발현을 측정된 결과 대조군에 비해 십전대보환(A 및 B)는 모두 iNOS, COX-2, TNF-a 단백질 발현을 유발하는 결과를 나타내었으며, 특히 십전대보환 B 5 mg/ml 농도에서 현저한 단백질 발현 증가가 관찰되었다. 이러한 증가는 LPS에 의한 과도한 수준의 염증인자 증가를 나타내지는 않았다. 따라서, 십전대보환은 대식세포의 사이토카인 발현을 유도하여 면역기능을 조절하는 효능이 있는 것으로 판단된다(Fig. 2-9).

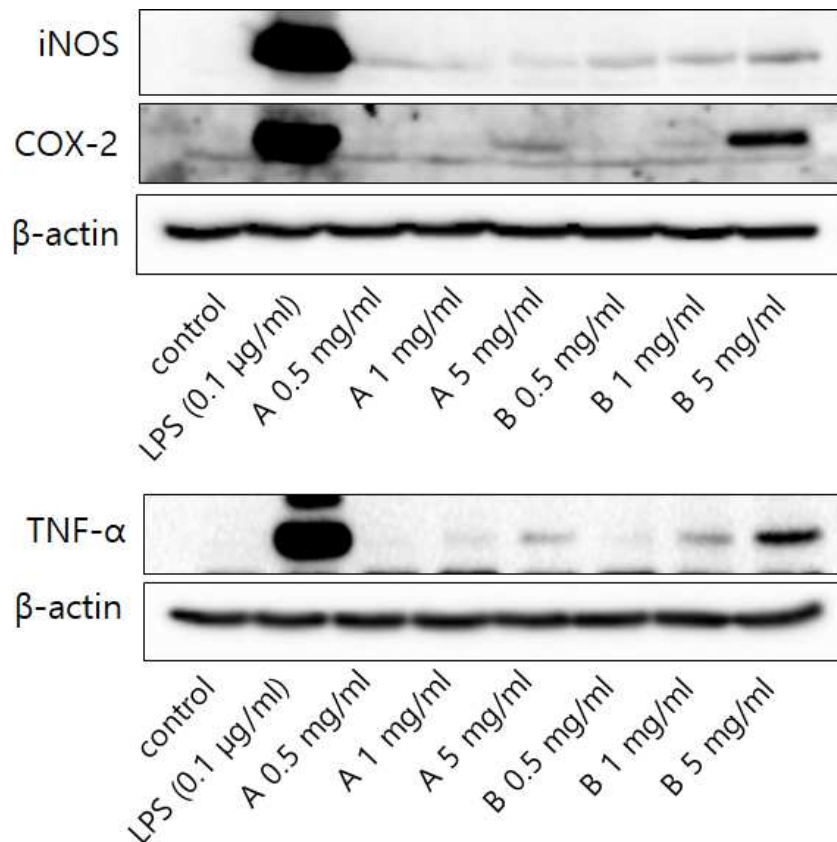


Fig. 2-9. RAW264.7 세포주에서 십전대보환 A 및 B를 농도별로 처리한 후 iNOS, COX-2, TNF-a 단백질 발현 정도를 western blot을 통해 분석.

(3) 대식세포인 RAW264.7 세포주에서 십전대보환의 면역조절인자 유전자 발현 유도 : RAW264.7 세포에서 십전대보환에 의한 TNF-a, IL-1b, IL-6, IL-10의 유전자 발현 유발 정도를 관찰하기 위하여 십전대보환을 농도별로 처리한 후 1시간에서 유전자 발현을 측정된 결과 대조군에 비해 십전대보환(A 및 B)는 모두 TNF-a, IL-1b, IL-6, IL-10의 유전자 발현을 유발하는 결과를 나타내었으며, 특히 십전대보환 A 5 mg/ml 농도에서 항염증 유전자인 IL-10의 발현이 현저히 증가하였다. 이러한 증가는 LPS에 의한 과도한 수준의 염증인자 증가를 나타내지는 않았다. 따라서, 십전대보환은 대식세포의 사이토카인 발현을 유도하여 면역기능을 조절하는 효능이 있는 것으로 판단된다(Fig. 2-10).

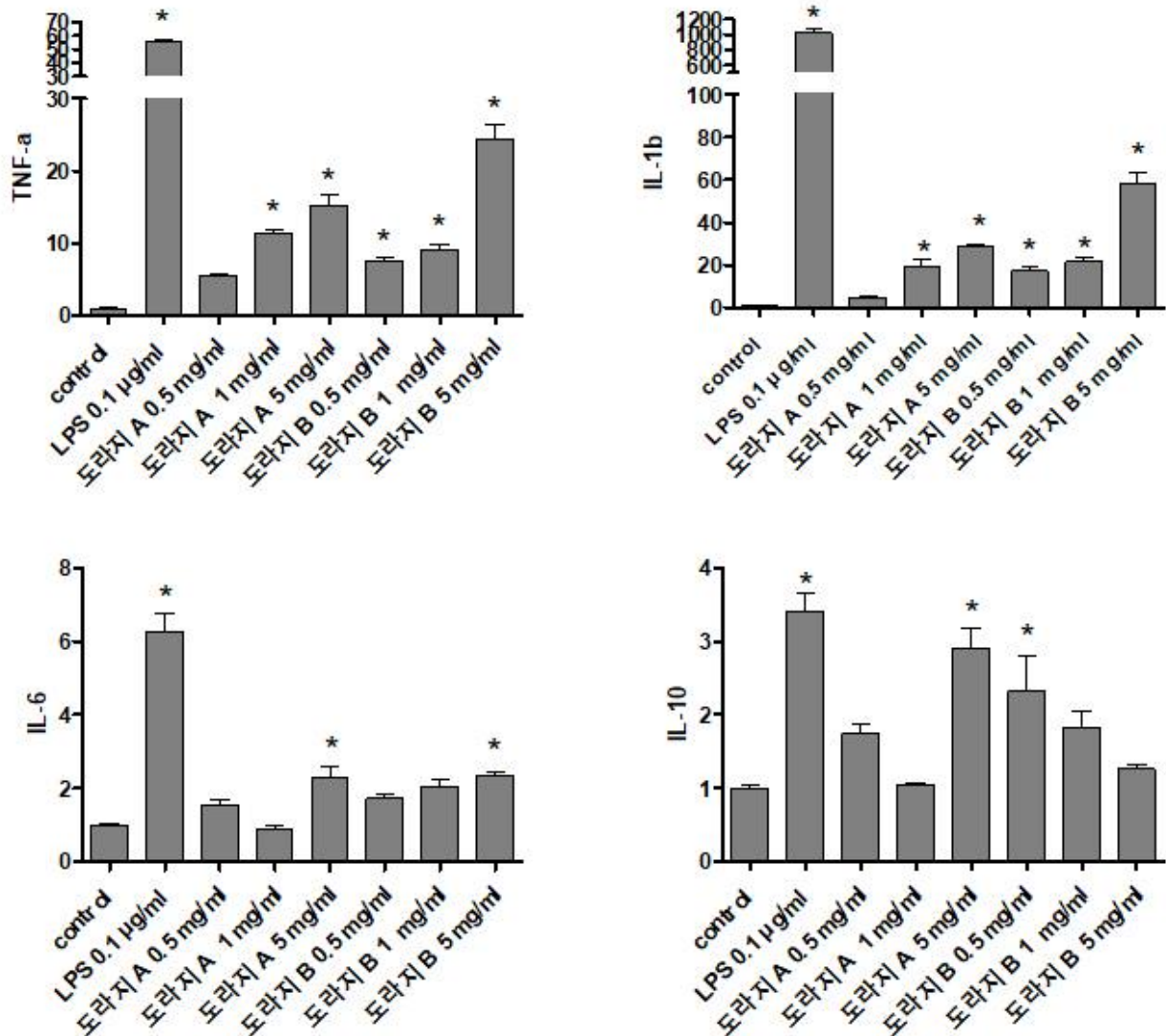


Fig. 2-10. RAW264.7 세포주에서 십전대보환 A 및 B를 농도별로 처리한 후 TNF-a, IL-1b, IL-6, IL-10의 유전자 발현을 real-time PCR을 통해 분석.

(4) 마우스에서 분리한 splenocyte에서 십전대보환의 면역조절인자 유전자 발현 유도 : 다음으로는 마우스에서 분리한 splenocyte에서 십전대보환에 의한 TNF-a, IL-6의 유전자 발현 유발 정도를 관찰하기 위하여 십전대보환을 농도별로 처리한 후 72시간에서 유전자 발현을 측정 한 결과 대조군에 비해 십전대보환 B는 TNF-a, IL-6의 유전자 발현을 유발하는 결과를 나타내었 으며, 특히 십전대보환 B 1 mg/ml 농도에서 가장 높은 유전자 발현 유발을 나타내었다. 따 라서, 십전대보환은 splenocyte의 사이토카인 발현을 유도하여 면역기능을 조절하는 효능이 있는 것으로 판단된다(Fig. 2-11).

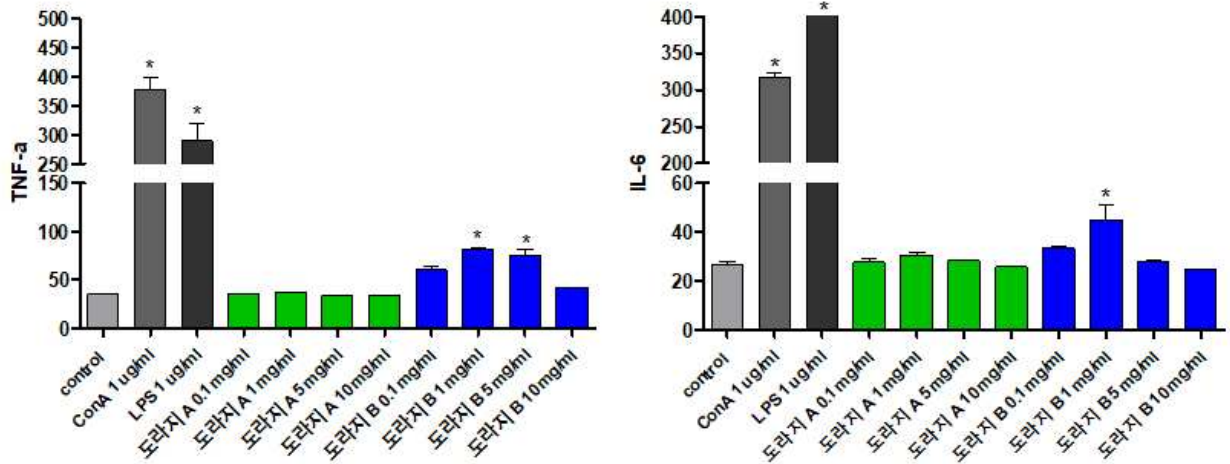


Fig. 2-11. 마우스에서 분리한 splenocyte에서 심전대보환 A 및 B를 농도별로 처리한 후 TNF-a, IL-6의 유전자 발현을 real-time PCR을 통해 분석.

(5) 대식세포인 RAW264.7 세포주에서 활성도라지의 NO 생성능 : RAW264.7 세포에서 활성도라지에 의한 산화질소 생성정도를 관찰하기 위하여 활성도라지를 처리한 후 얻어지는 세포 배양 상층액에서 산화질소 생성을 측정하였다. 무처리군에서는 산화질소가 생성되지 않았으나 LPS를 처리한 대조군에서는 70  $\mu$ M 정도의 산화질소가 생성되었고 활성도라지에서는 유의적인 산화질소 양 증가가 나타나지 않았다(Fig 2-12).

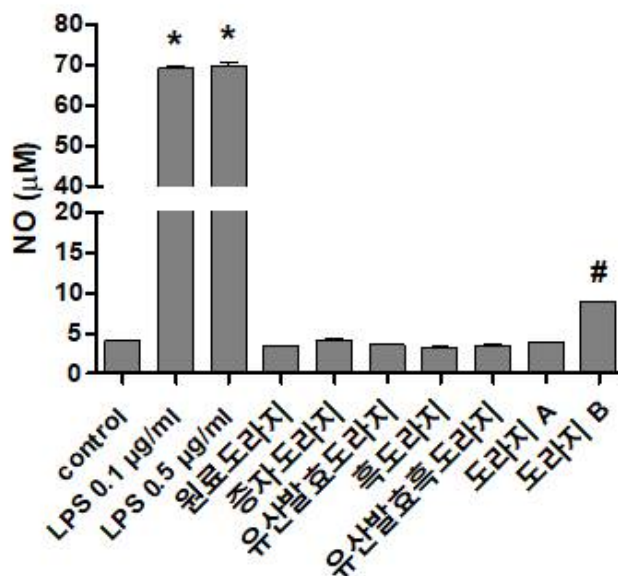
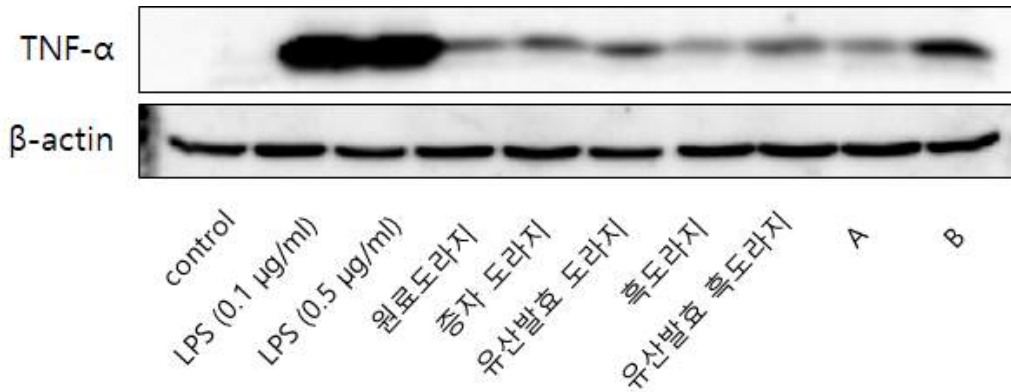


Fig. 2-12. RAW264.7 세포주에서 활성도라지를 처리한 후 배양액에서 NO 생성량을 분석.

(6) 대식세포인 RAW264.7 세포주에서 활성도라지의 iNOS, COX-2, TNF-a 발현 유도 : RAW264.7 세포에서 활성도라지에 의한 iNOS, COX-2, TNF-a 단백질 발현 유발 정도를 관찰하기 위하여 활성도라지를 처리한 후 각각 4시간에서 iNOS 및 COX-2 발현과 8시간에서 TNF-a 발현을 측정된 결과 대조군에 비해 활성도라지는 모두 TNF-a 단백질 발현을 유발하는 결과를



나타내었으며, 이러한 증가는 LPS에 의한 과도한 수준의 염증인자 증가를 나타내지는 않았다. 따라서, 십전대보환은 대식세포의 TNF-a 발현을 유도하여 면역기능을 조절하는 효능이 있는 것으로 판단된다(그림 4-13).



**Fig 6-13.** RAW264.7 세포주에서 활성도라지를 처치한 후 8시간에 TNF-a 단백질 발현 정도를 western blot을 통해 분석.

(7) 대식세포인 RAW264.7 세포주에서 활성도라지의 면역조절인자 유전자 발현 유도 : RAW264.7 세포에서 활성도라지에 의한 TNF-a, IL-1b, IL-6, IL-10의 유전자 발현 유발 정도를 관찰하기 위하여 활성도라지를 처치한 후 1시간에서 유전자 발현을 측정된 결과 대조군에 비해 유산발효후도라지는 TNF-a, IL-10의 유전자 발현을 유발하는 결과를 나타내었으며, 후도라지는 IL-6의 발현을 유의적으로 증가시켰다. 이러한 증가는 LPS에 의한 과도한 수준의 염증인자 증가를 나타내지는 않았다. 따라서, 십전대보환은 대식세포의 사이토카인 발현을 유도하여 면역기능을 조절하는 효능이 있는 것으로 판단된다(Fig. 2-14).

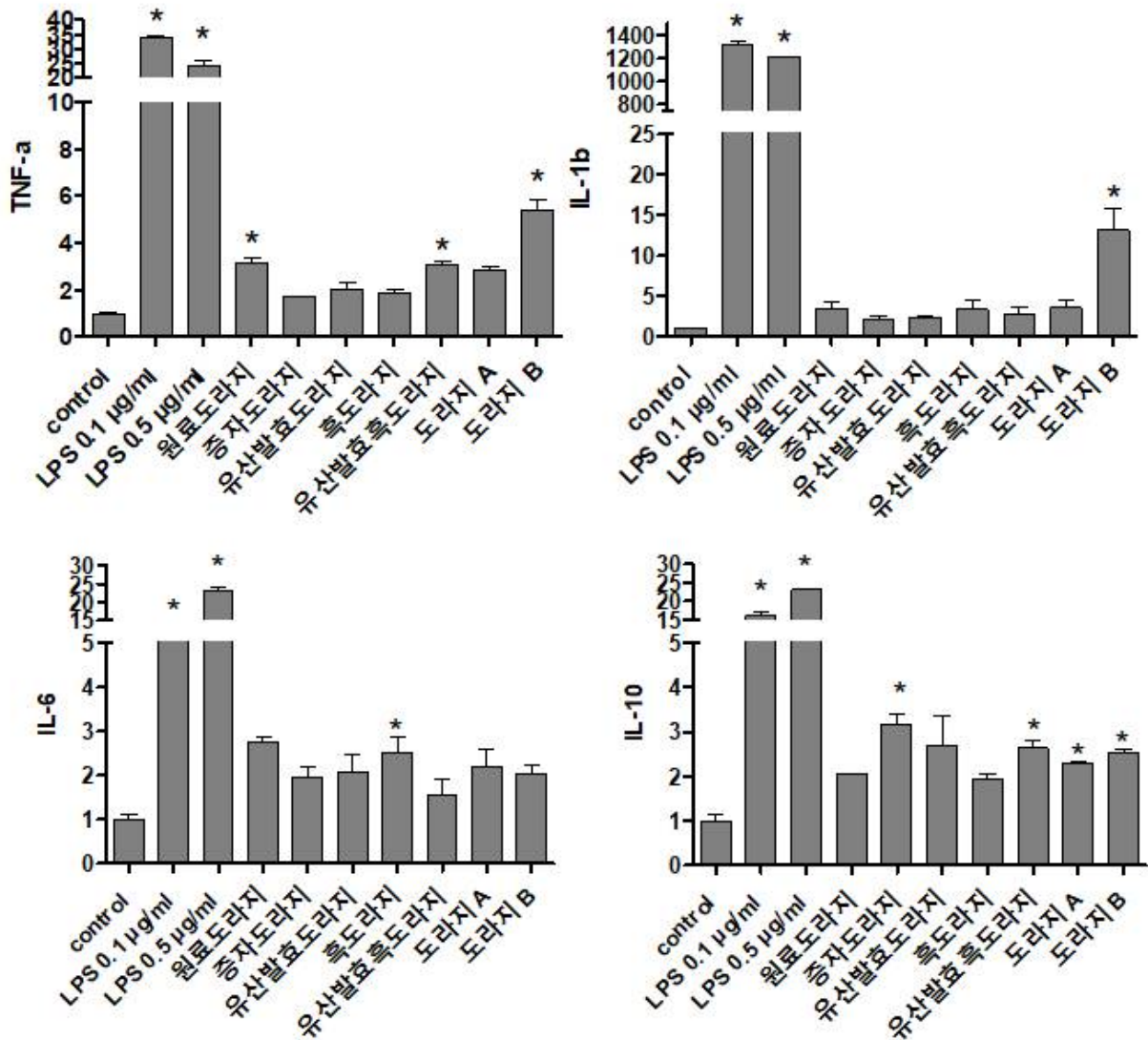


Fig. 2-14. RAW264.7 세포주에서 십전대보환 A 및 B를 농도별로 처리한 후 TNF-a, IL-1b, IL-6, IL-10의 유전자 발현을 real-time PCR을 통해 분석.

(8) 마우스에서 분리한 splenocyte에서 활성도라지의 면역조절인자 유전자 발현 유도 : 다음으로는 마우스에서 분리한 splenocyte에서 활성도라지에 의한 TNF-a, IL-6의 유전자 발현 유발 정도를 관찰하기 위하여 활성도라지를 농도별로 처리한 후 72시간에서 유전자 발현을 측정 한 결과 대조군에 비해 유산발효후도라지는 TNF-a, IL-6의 유전자 발현을 유의적으로 증가시키는 결과를 나타내었으며, 이러한 증가는 LPS에 의한 과도한 수준의 염증인자 증가를 나타내지는 않았다. 따라서, 십전대보환은 splenocyte의 사이토카인 발현을 유도하여 면역기능을 조절하는 효능이 있는 것으로 판단된다(Fig. 2-15).

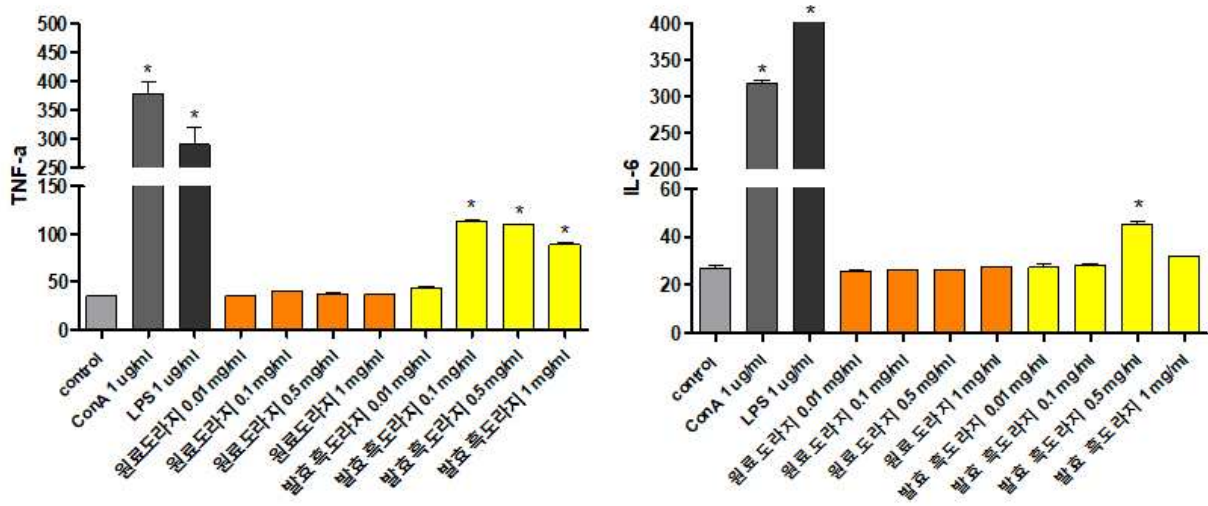


Fig. 2-15. 마우스에서 분리한 splenocyte에서 활성도라지를 농도별로 처치한 후 TNF-a, IL-6의 유전자 발현을 real-time PCR을 통해 분석.

#### 라. 면역세포에서 항염증 작용 효능

##### (1) 대식세포주에서 활성도라지 및 십전대보환 독성 분석 :

(가) 대식세포로부터 염증매개 물질의 억제 효과는 세포독성으로 RAW264.7 세포가 사멸되는 것에 의해서도 나타날 수 있으므로 이러한 가능성을 배제하고자 RAW264.7 세포주에 미치는 활성도라지 및 십전대보환의 세포 독성을 알아보기 위해 MTT assay를 수행하였음. 각 도라지 별로 0.01, 0.1, 0.5 및 1 mg/ml의 농도로 RAW264.7 세포주에 처리하여 배양한 결과, 세포의 생존율에서 원료도라지와 증자도라지는 모든 처리 농도에서 유의적인 차이를 보이지 않음을 관찰함. 유산발효도라지, 흑도라지 또는 유산발효흑도라지는 0.5 mg/ml의 농도에서는 세포독성을 나타내지 않았으며, 1 mg/ml의 농도에서 각각 42.3, 93 및 83%의 생존율 감소를 나타내었음 (Fig. 4-16).

(나) 십전대보환(A 및 B)을 0.01, 0.1, 0.5 및 1 mg/ml의 농도로 RAW264.7 세포주에 처리하여 배양하여 세포 생존율을 분석한 결과, 십전대보환(A 및 B)은 실험한 든 농도에서 세포 독성을 나타나지 않음을 확인함(Fig. 4-17).

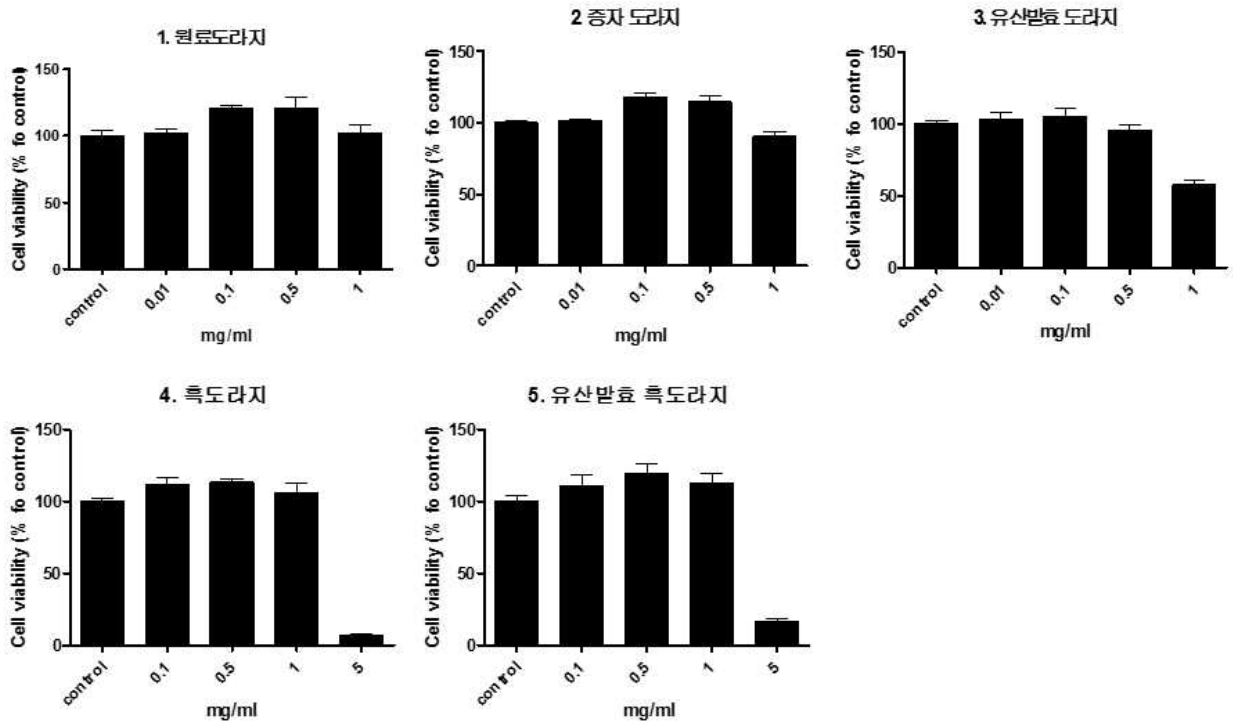


Fig. 2-16. RAW264.7 세포주에서 각 도라지별 세포독성 확인.

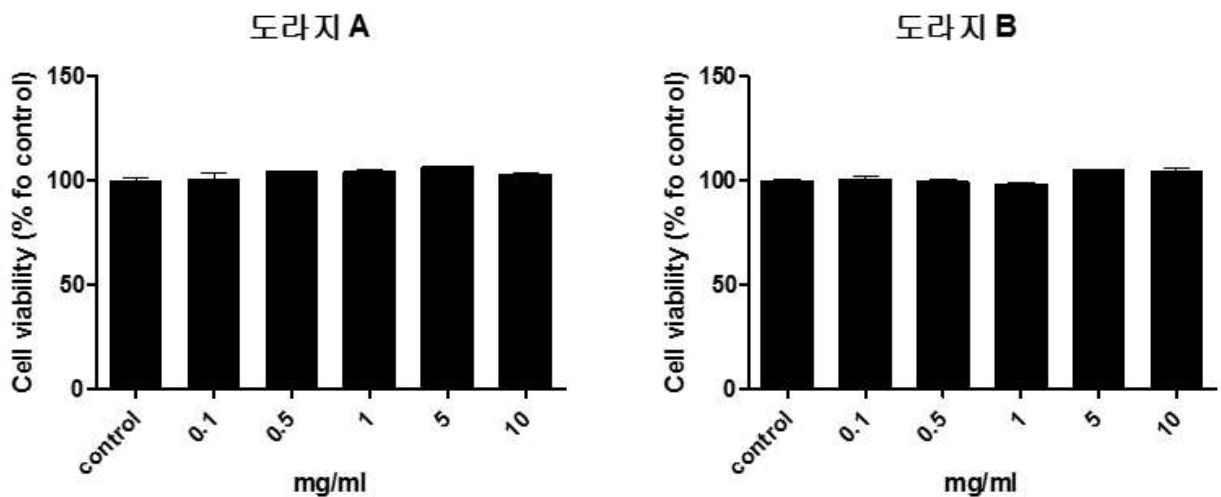


Fig. 2-17. RAW264.7 세포주에서 십전대보환(A 및 B)을 농도별 세포독성 확인.

(2) 활성도라지 및 십전대보환에 의한 Nitric oxide 생성 억제 효과 : 병리적인 조건 하에서 NO 발현량의 과도한 증가는 염증을 유발하게 되고 조직의 손상을 가져오는 것으로 알려져 있음. 따라서 활성도라지 및 십전대보환(A 및 B)처리에 의한 NO 생성 정도를 측정하기 위하여 RAW264.7 세포주에 LPS를 처리하여, 활성도라지 및 십전대보환(A 및 B)를 0.5 및 5 mg/ml의 농도로 배양 후 생성된 NO를 측정함. LPS만 처리한 대조군의 NO 생성량은  $64.2 \mu\text{m}$  이었으며, 원료, 증자, 유산발효, 흑, 및 유산발효흑도라지의 처리군에서 NO의 생성량은 각 29.5, 28.5, 24.1, 17.7 및 18.8  $\mu\text{m}$ 로 대조군에 비하여 유의한 감소효과를 나타냄. 십전대보환(A 및

B)을 처리한 군에서는 NO 생성이 6.4 및 9.0  $\mu\text{M}$ 으로 현저하게 감소하는 것으로 나타남(Fig. 2-18). 따라서 활성도라지 및 십전대보환(A 및 B)은 NO 생성을 억제함으로써 항염증 물질로 이용될 수 있을 것이라 사료됨.

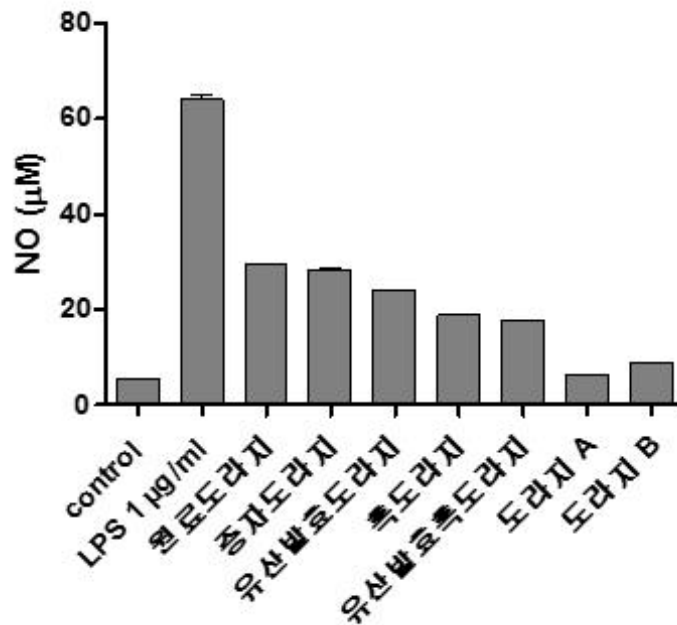


Fig. 2-18. RAW264.7 세포주에 십전대보환(A 및 B)을 처리 후, 배양액에서 NO 생성량을 분석.

(3) LPS로 유도되는 iNOS 및 COX-2의 발현에 대한 활성도라지 및 십전대보환 억제 효과 :

(가) 산화질소를 생성하는 NOS들은 L-arginine을 L-citrullin으로 전환시키면서 NO를 생성하며, 이들 NOS는 iNOS에 의해 발현성이 증가하며, 이는 염증 유발 등 병리적으로 중요한 작용을 한다고 알려져 있음. 또한 COX-2는 염증 매개 물질인 PGE<sub>2</sub>의 형성에 관여하기 때문에 염증 반응에서 활성도라지 및 십전대보환의 처리에 따른 iNOS 및 COX-2 생성 억제를 확인하여 항염증 효과를 확인함. RAW264.7 세포주에 각 활성도라지 및 십전대보환(A 및 B)을 0.5 및 5 mg/ml의 농도로 처리하고 iNOS 발현량을 측정된 결과, LPS 단독 처리군의 iNOS 발현량을 100%로 보았을 때 원료, 종자, 유산발효, 흑, 및 유산발효흑도라지의 처리군에서 34.3, 34.3, 25, 51, 54.9%로 유의적으로 iNOS 발현이 감소하였음. 십전대보환(A 및 B)을 처리한 군에서는 iNOS 발현이 68.6 및 67.1%로 유의적으로 감소하였음(Fig. 2-19).

(나) PGE<sub>2</sub>의 형성에 관여하는 COX-2의 발현에 대한 활성도라지 및 십전대보환(A 및 B)의 효과를 알아보기 위해 각 활성도라지 및 십전대보환(A 및 B)을 0.5 및 5 mg/ml의 농도로 처리한 후 western blot을 통해 COX-2의 발현을 분석하였음. LPS 단독 처리군의 iNOS 발현량을 100%로 보았을 때 원료, 종자, 유산발효, 흑, 및 유산발효흑도라지의 처리군에서 77.8, 68.9, 73.3, 28, 49.2.9%로 유의적으로 COX-2 발현이 감소하였음. 십전대보환(A 및 B)을 처리한 군에서는 COX-2 발현이 십전대보환(A)에 의해 31.6% 감소하였으나 십전대보환(B) 군에서는 유의적인 변화가 보이지 않았음(그림 4-20). 따라서 활성도라지 및 십전대보환(A 및 B)은 COX-2 및

iNOS 발현을 억제함으로써 항염증 효과를 나타낸다고 사료됨.

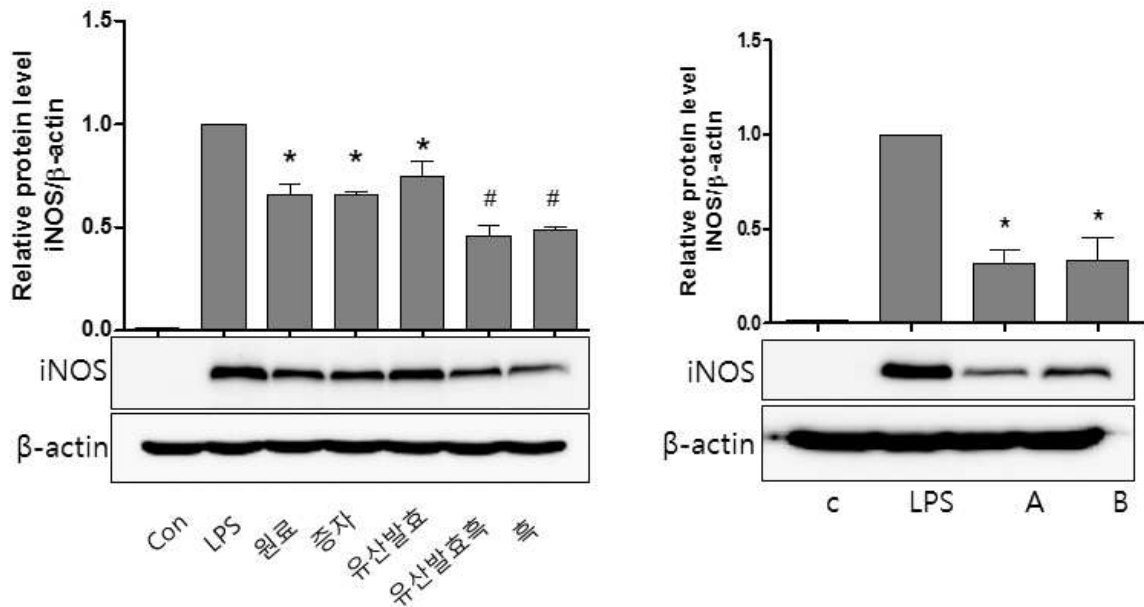


Fig. 2-19. RAW264.7 세포주에 활성도라지 및 십전대보환(A 및 B)을 처리 후, iNOS 단백질 발현 정도를 western blot을 통해 분석.

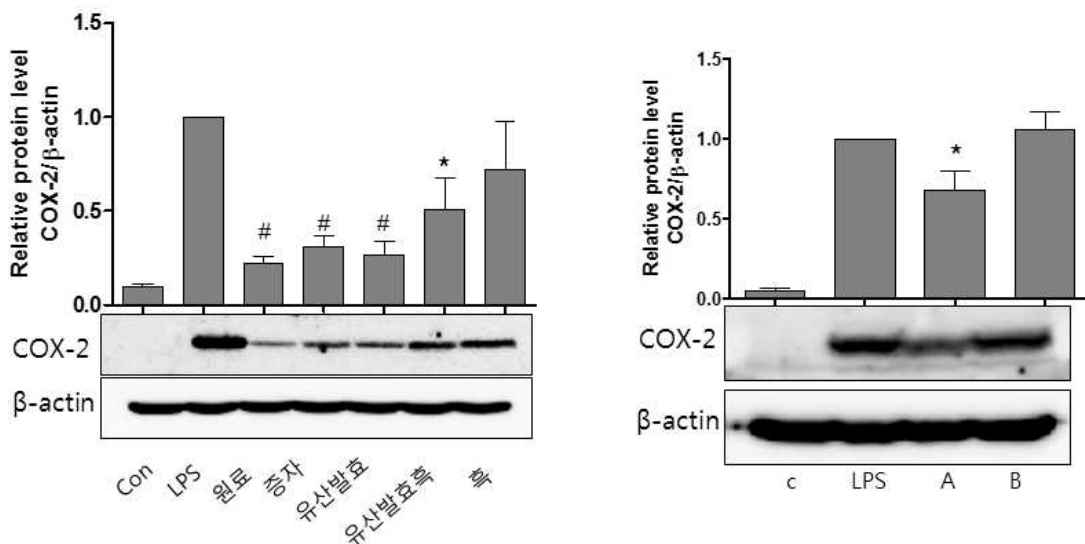


Fig. 2-20. RAW264.7 세포주에 활성도라지 및 십전대보환(A 및 B)을 처리 후, COX-2 단백질 발현 정도를 western blot을 통해 분석.

(4) LPS로 유도되는 염증성 사이토카인의 생성에 대한 활성도라지 및 십전대보환 억제 효과 : 인체에서 염증반응이 진행되기 위해서는 NO와 PGE<sub>2</sub>와 같은 염증 매개물 이외에 면역 반응에서 필연적으로 염증성 사이토카인이 동반되는데, 대표적인 cytokine으로는 IL-6, TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 임. 종양괴사 인자인 TNF- $\alpha$ 는 체내에서 대식세포나 림프구 등 백혈구에 의해 생성되는 cytokine으로 정상상태에서는 만들어지지 않으며 LPS 등에 의한 대식세포의 자극으로 합성되

어 분비됨. 따라서 활성도라지 및 십전대보환(A 및 B)이 염증성 사이토카인의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RAW264.7 세포주에 LPS처리 후 활성도라지 및 십전대보환(A 및 B)을 처리하여 western blot을 통해 분석하였음. 그 결과 활성도라지 및 십전대보환(A 및 B) 처리에 따라 TNF- $\alpha$ 의 발현이 감소되는 경향을 확인함(그림 4-21). 이러한 결과를 통해 활성도라지 및 십전대보환(A 및 B) RAW264.7 세포주에서 염증 매개성 사이토카인을 효과적으로 억제하여 항염증 기능에 관여하는 것을 확인함.

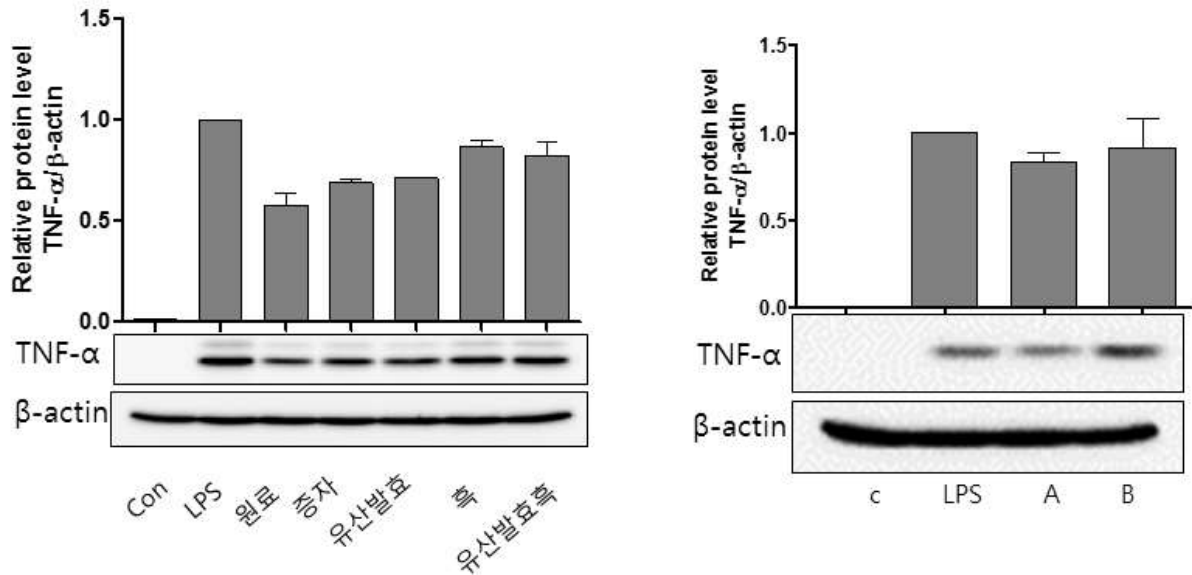


Fig. 2-21. RAW264.7 세포주에 활성도라지 및 십전대보환(A 및 B)을 처리 후, TNF- $\alpha$  단백질 발현 정도를 western blot을 통해 분석.

(5) 비만세포주에서 활성도라지 및 십전대보환 독성 분석 :

(가) RBL-2H3 세포주에서 활성도라지 및 십전대보환 처리에 따른 세포의 생존 및 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT assay를 수행함. 각 도라지 별로 0.01, 0.1, 1 및 5 mg/ml의 농도로 RBL-2H3 세포주에 처리하여 배양한 결과, 세포의 생존율에서 원료도라지, 증자도라지 및 흑도라지는 0.1 mg/ml의 농도에서부터 세포 독성을 나타내었으며, 유산발효도라지 및 유산발효흑도라지는 0.01 mg/ml의 농도에서 생존율 감소가 나타남을 확인함(Fig. 2-22).

(나) 십전대보환(A 및 B)을 0.01, 0.1, 1, 5 및 10 mg/ml의 농도로 RBL-2H3 세포주에 처리하여 배양한 후 세포 생존율을 분석한 결과, 십전대보환(A 및 B)은 0.1 mg/ml의 농도에서 생존율 감소가 나타남을 확인함(Fig. 2-23).

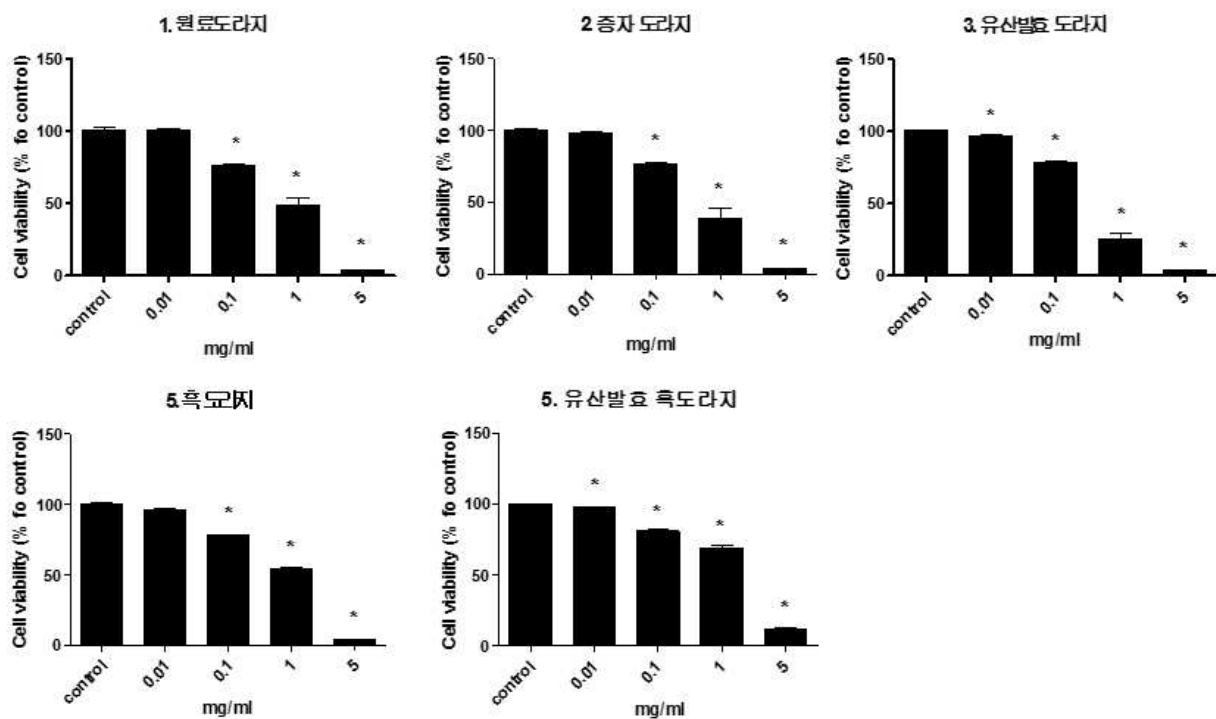


Fig. 2-22. RBL-2H3 세포주에서 원각 도라지 별 세포 독성 확인.

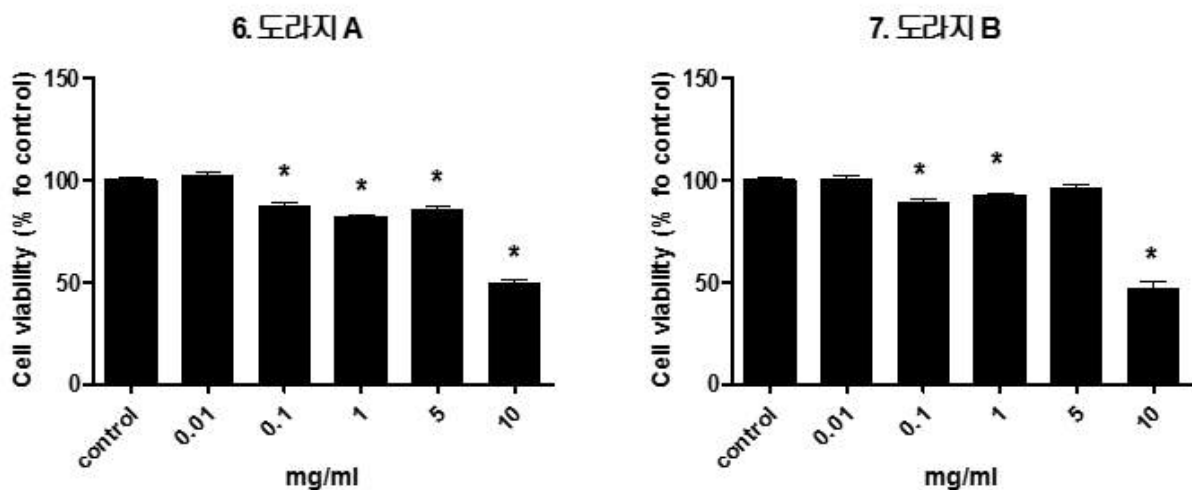


Fig. 2-23. RBL-2H3 세포주에서 십전대보환(A 및 B)을 농도별(0.01-10 mg/ml) 세포 독성을 측정 확인.

### 3-1. 3차년도 연구수행 방법

#### 가. 염증성 간 손상 억제 효능 분석

(1) 실험동물 : 실험동물은 (주) 하나상사(경기 오산)로부터 구입한 생후 8주된 C57BL/6 계통의 웅성 마우스(23 - 24 g)를 이용하였다. 동물은 일정한 온도(25°C)와 규칙적인 조명(12시간 명



/암)이 자동적으로 조절되는 동물실에서 사육되었고 사료와 음수가 자유롭게 공급되었으며, 일주일간 적응기간을 거친 후 본 실험에 사용하였다.

(2) 실험군 분류 및 처치 : 염증성 간독성 실험에서 ICR 마우스를 (1)무처치군, (2)10  $\mu$ g/kg lipopolysaccharide + 700 mg/kg galactosamine(LPS/GalN)을 단독으로 투여한 실험군, (3)10 mg/kg 발효흑도라지+LPS/GalN 투여군, (4)100 mg/kg 발효흑도라지+LPS/GalN 투여군으로 나누었다. LPS/GalN 투여 1시간 전에 발효흑도라지를 경구 투여하였다. 모든 군에 LPS 10  $\mu$ g/kg+GalN 700 mg/kg 1회 복강 투여하였다. LPS/GalN 투여 5시간 후 실험동물을 희생시켜 채혈하고 간 조직을 적출하였다.

(3) 혈청 생화학적 지표성분 분석 : 간세포 손상을 측정하기 위해 혈청 분석용 kit(IVD-LAB, Korea)를 사용하여 aspartate aminotransferase(AST) 및 alanine aminotransferase(ALT)을 측정하였다. Kit내의 R1, R2 시약을 4:1의 비율로 혼합하여 마우스에서 분리한 용혈 되지 않은 혈장에 섞어 실험을 수행하였다. AST와 ALT는 340 nm에서 spectrophotometer를 사용하여 흡광도를 측정하였고 혈청 liter당 unit(U/L)으로 나타내었다.

(4) Cytokine 분비 측정 : 마우스에서 분리한 용혈 되지 않은 혈장에서 TNF- $\alpha$  및 IL-6 ELISA kit를 사용하여 측정하였다.

(5) 간 조직의 형태학적 변화 분석 : 위의 동물실험으로 적출된 간조직을 10% 포르말린 용액(10% formalin solution)으로 고정시키고 파라핀(paraffin-embedded) 과정을 거친 후 5  $\mu$ m 두께의 절편으로 잘랐다. 상기 잘라진 간조직을 유리 슬라이드에 고정시키고 헤마톡실린-에오신 염색(hematoxylin and eosin staining)을 실시한 다음 100 및 200 배율에서 관찰하였다.

(6) 간 조직 내 세포사멸(apoptosis)의 억제 효과 : GalN/LPS에 의한 염증성 간손상 동물모델에서 발효흑도라지의 간세포 사멸을 보호하는 효과가 있는지 분석하기 위해, GalN 및 LPS 투여 5시간 후의 마우스에서 간 조직을 적출하였고, TUNEL 분석법(terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling assay)을 실시하였다. 구체적으로, 적출된 간조직을 10% 포르말린 용액으로 고정시키고 파라핀 과정을 거친 후 5  $\mu$ m 두께의 절편으로 잘랐으며, 상기 잘라진 간조직은 *in situ* cell death detection kit(Roche)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 실험을 수행하였다. 사멸된 세포는 초록색 형광(green fluorescence)을 나타내었다. 현미경을 이용해 형광을 확인하였다.

(7) Real-time PCR : 동물실험을 통해 적출한 간조직에 TRIZOL을 넣고 균질화한 후 chloroform을 가하여 원심분리하여 상층액을 수집하였다. Isopropanol을 넣어 원심분리하여 RNA를 추출한 다음 정량하여 cDNA를 합성하였다. 각각 TNF- $\alpha$ , MIP-2, MCP-1, IL-6, GAPDH primer, SYBR green 및 cDNA를 넣은 후 real-time PCR을 수행하였다.

(8) Western blot : 동물실험을 통해 적출한 간조직에 RIPA buffer를 첨가하여 조직을 lysis시킨 후 13,000 g, 4°C에서 15 분간 원심분리하여 상층액을 획득하였다. Bicinchoninic acid assay (BCA)로 정량된 단백질 시료는 laemmli buffer를 첨가하여 100°C에서 5 분간 denaturation하였다. SDS-PAGE에 전기영동하여 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane에 transfer한 후 5% skim-milk로 blocking을 수행하였다. 1차 항체 PARP-1, pro-caspase3, Cl-caspase3, pro-caspase8, Cl-caspase8, TLR4, p-I $\kappa$ B, I $\kappa$ B, 4-HNE, CHOP 및  $\beta$ -actin로 overnight 반응 후, 2차 항체로 1시간 반응하여 ECL system (BioRad, USA)하에서 분석을 수행하였다.

## 나. 항염증 효능 및 기전 분석

(1) 세포 및 세포배양 : 대식세포인 RAW264.7 세포주를 ATCC에서 분양 받았으며, 10% fetal bovine serum, 5 mM D-glutamine, 100 units/ml penicillin, 그리고 100 µg/ml streptomycin이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 배지를 이용하여 CO<sub>2</sub> incubator(5% CO<sub>2</sub>, 95% air, 37°C)에서 배양하였다.

(2) 세포독성실험 : MTT assay는 탈수소 효소작용에 의해 노란색의 수용성기질인 MTT tetrazolium을 청자색의 비수용성 MTT formazan(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법으로 대식세포주에서 세포독성을 측정하였다. 24 well plate에 5×10<sup>3</sup>/well의 개수로 배양하고, 24시간이 경과한 후 각 well당 도라지별로 0.1, 0.5, 1, 5 및 10 mg/ml의 농도로 처리하여 24시간동안 배양하였다. 24시간 후 PBS에 용해시킨 1 mg/ml MTT 시약을 첨가하여 37°C에서 빛을 차광하여 3시간 배양한 후 상층액을 제거하고 DMSO를 200 µl 첨가하여 ELISA reader기를 통해 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하는 방법을 사용하였으며 Cell viability 측정은 3회 반복 수행하여 평균값을 도출하였다.

(3) NO 생성능 측정 : 대식세포를 분주하여 24시간 후 도라지들을 1시간 전처리하고 LPS를 처리 후 18시간동안 반응시켰다. 세포배양 상층액을 얻어 96well plate에 griess 시약과 함께 넣어 반응시킨 후 ELISA reader기를 이용하여 540nm 파장에서 측정하였다.

(4) Western blot 분석 : 대식세포인 RAW264.7를 분주하여 24시간 배양시킨 후 serum free media로 16시간 starvation하였다. 도라지별로 1시간 전처리 후에 LPS(1 µg/ml)로 8시간동안 반응시켰다. 이 후, 상층액을 제거하고 세포들을 수집하여 RIPA buffer에서 균질화하고 BCA로 정량하였다. 동일 양의 단백질을 SDS-PAGE로 전기영동한 후 PVDF membrane에 transfer하였다. 그 후 skim- milk로 blocking하고 1차 항체 iNOS, COX-2, p-p38, p38, p-ERK, ERK, p-AKT, AKT, p-JNK, JNK 및 β-actin로 overnight 반응 시킨 후 2차 항체로 1시간 반응 시킨 후 ECL을 이용하여 단백질을 검출하였다.

(5) Real-time PCR : RAW264.7 cell을 분주하여 24시간 배양시킨 후 serum free media로 16시간 starvation하였다. 먼저 도라지별로 1시간 전처리 후 LPS를 처리한 후 1시간 자극시킨 후 얻은 세포에 TRIZOL을 넣고 균질화한 후 chloroform을 첨가하여 원심분리하여 상층액을 수집하였다. Isopropanol을 넣어 원심분리하여 RNA를 추출한 다음 정량하여 cDNA를 합성하였다. 각각 TNF-α, IL-6, MCP-1, IL-10, GAPDH primer, SYBR green 및 cDNA를 넣은 후 real-time PCR을 수행하였다.

## 3-2. 3차년도 - 실험결과

### 가. LPS/GalN 투여에 의한 염증성 간 손상 개선

(1) 혈중 ALT 및 AST : ICR 마우스를 12시간 절식시킨 후 발효흑도라지 10 mg/kg, 100 mg/kg 또는 물(대조군)을 투여하였다. 1시간 후 LPS 10 µg/kg+GalN 700 mg/kg(LPS+GalN)를 1회 복강투여한 후 5시간에 혈액을 수집하여 혈장을 분리하여 혈중 ALT 및 AST를 분석하였다. 그

결과, 혈중 ALT와 AST의 상승은 간 손상으로 인한 간세포의 파괴가 진행되면서 아미노기 전이효소가 혈중으로 나와 높게 나타나는 것이므로 간세포의 파괴 및 변성의 지표가 될 수 있다. 발효흑도라지 100 mg/kg 투여군은 LPS+GalN 투여에 의해 증가한 혈중 ALT 및 AST 수치를 유의적으로 감소하였다(Fig. 3-1).

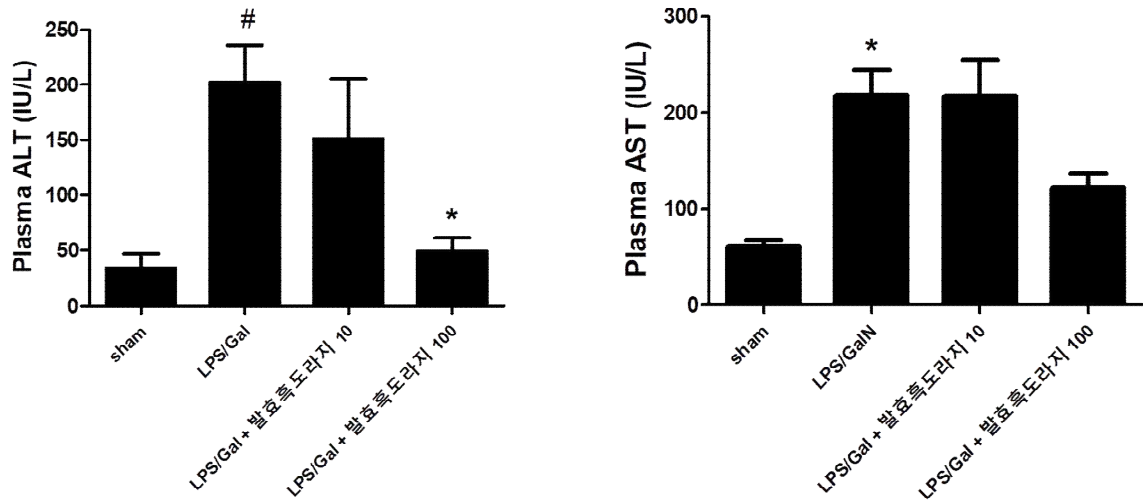


Fig. 3-1. 발효흑도라지의 혈중 ALT와 AST 분석.

(2) 간 조직의 조직학적 분석 : 위의 같은 방법으로 동물실험을 한 뒤, 간 조직을 적출하였다. 10% 포르말린 용액에 고정하고 파라핀 블록을 제조하여 5  $\mu$ m 크기로 조직 슬라이드 샘플을 제조하였다. 준비된 간 조직 샘플을 hematoxylin 및 eosin으로 염색하였다. LPS+GalN 투여에 의한 중증의 간 손상(조직형태 변화 및 간세포괴사)이 조직학적 분석으로 관찰되었으며, 발효흑도라지 투여군에서 이러한 간 손상이 현저히 억제되었다(Fig. 3-2).

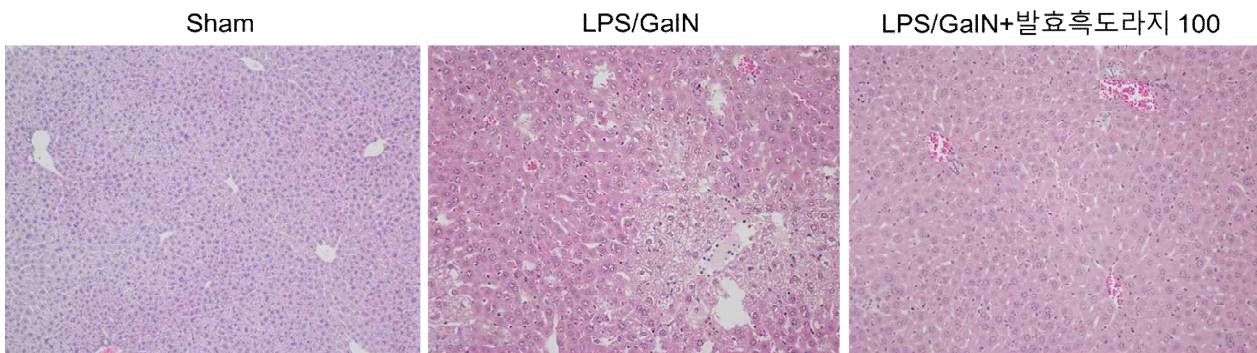


Fig. 3-2. 발효흑도라지의 간 조직학적 분석.

(3) 간세포 사멸 (apoptosis) :

(가) 위의 같은 방법으로 동물 실험을 한 뒤, 간 조직을 적출하여 간 조직 샘플을 제조하였다. 간 조직 내 세포사멸을 분석하기 위해 terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling(TUNEL) assay법을 이용하였다. 즉, 간 조직 슬라이드에 in situ cell death detection kit(Roche)를 이용하여 염색하였으며 apoptosis에 의해 사멸된 세포는 green

fluorescence를 나타낸다. LPS/GalN 투여는 정상군에 비해 세포사멸이 현저히 증가하였으며 발효흑도라지를 전처치한 투여군은 이러한 세포사멸의 증가가 현저히 억제하였다(Fig. 3-3).

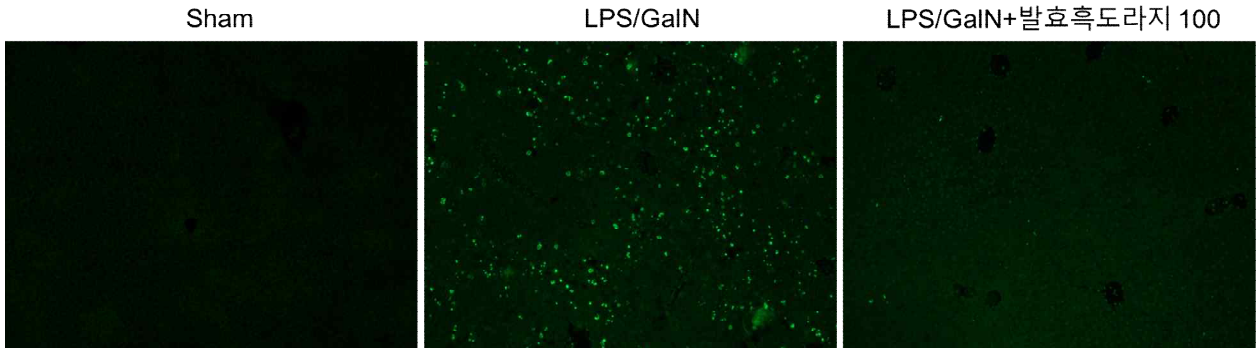


Fig. 3-3. 발효흑도라지의 간 세포 사멸 (apoptosis) 분석.

(나) 간 조직 내에서 세포사멸 관련 단백질들의 발현 변화를 확인해보기 위해, western blot을 수행하였다. 그 결과, LPS/GalN 투여군에서 세포사멸 관련 단백질(PARP-1, cleavage-caspase3 및 cleavage-caspase8)들의 발현이 증가하였으며, 발효흑도라지를 전처치한 투여군은 세포사멸 관련 단백질들의 발현을 감소하였다(Fig. 3-4).

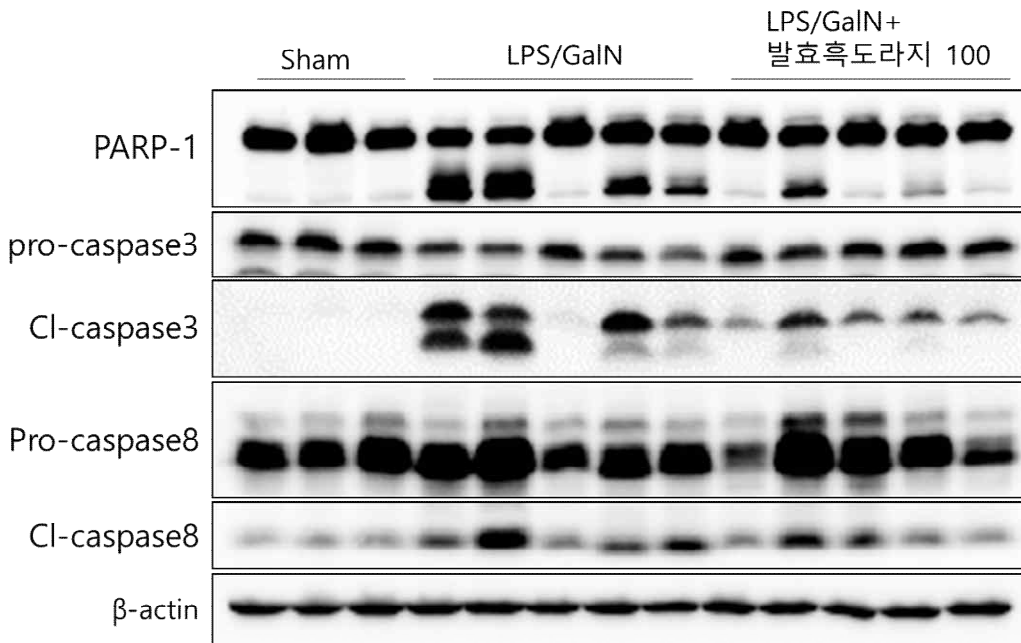


Fig. 3-4. 발효흑도라지의 간 세포 사멸 (apoptosis) 분석.

(4) **혈중 염증지표** : 위와 같은 방법으로 동물 실험을 한 뒤, 혈액을 수집하여 혈장을 분리하여 혈중 TNF- $\alpha$  및 IL-6(염증지표)를 분석하였다. 그 결과, LPS+GalN 투여군에서 혈중 TNF- $\alpha$  및 IL-6 수치가 유의적으로 증가하였고 발효흑도라지를 전처치한 투여군에서 염증지표들을 유의적으로 억제하였다(Fig. 3-5).

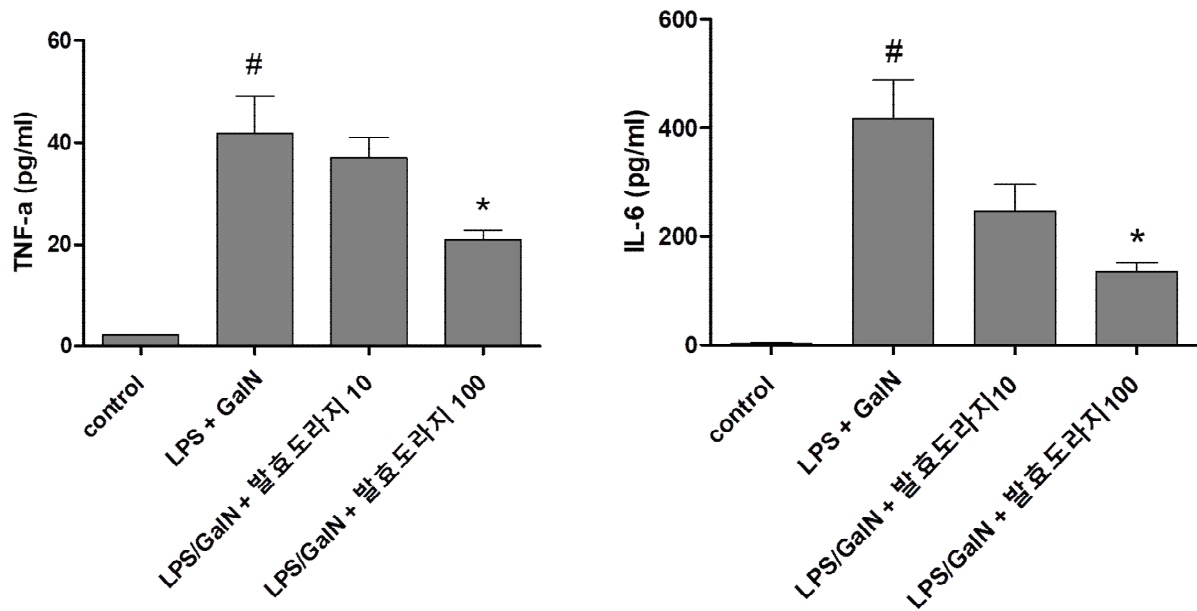


Fig. 3-6. 발효흑도라지의 혈중 내 염증 인자 분석.

(5) 간 조직 내 염증지표 발현 :

(가) 위의 같은 방법으로 동물 실험을 한 뒤, 간 조직에서 RNA를 추출하여 염증유전자들의 발현을 확인하였다. 그 결과, LPS+GalN 투여군에서 간 조직 내 TNF- $\alpha$ , MIP-2, MCP-1 및 IL-6 유전자의 발현이 증가하였고 발효흑도라지를 전처리한 투여군에서 유의적으로 억제되었다(Fig. 3-7).

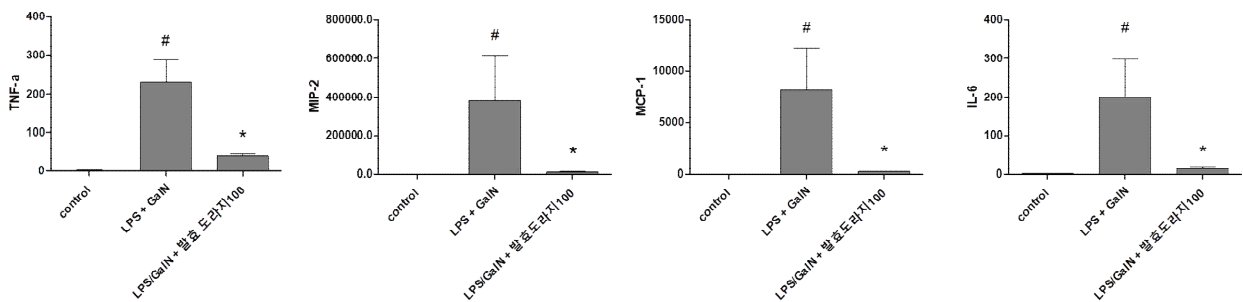


Fig. 3-7. 발효흑도라지의 간 조직 내 염증 인자 분석.

(나) 간 조직에서 단백질을 추출하여 염증인자 단백질의 발현을 확인하였다. 그 결과, LPS+GalN 투여군에서 I $\kappa$ B 인산화 발현이 증가되었으며 발효흑도라지 투여군에서 I $\kappa$ B 인산화 발현이 감소되었다(Fig. 3-8).

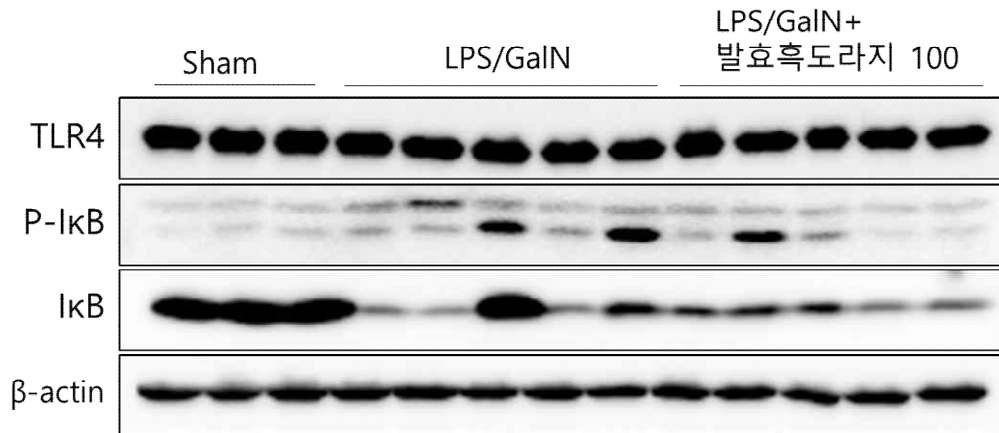


Fig. 3-7. 발효흑도라지의 간 조직 내 염증 인자 발현 정도.

(6) 간 조직 내 산화 : 위의 같은 방법으로 동물 실험을 한 뒤, 간 조직의 산화정도를 판단하기 위해 4-HNE(4-hydroxynonenal)의 발현을 확인하였다. 그 결과, LPS+GalN 투여군에서 간 조직 내 4-HNE의 발현이 증가하였고 발효흑도라지를 전처치한 투여군에서 현저히 억제되었다 (Fig. 3-8).

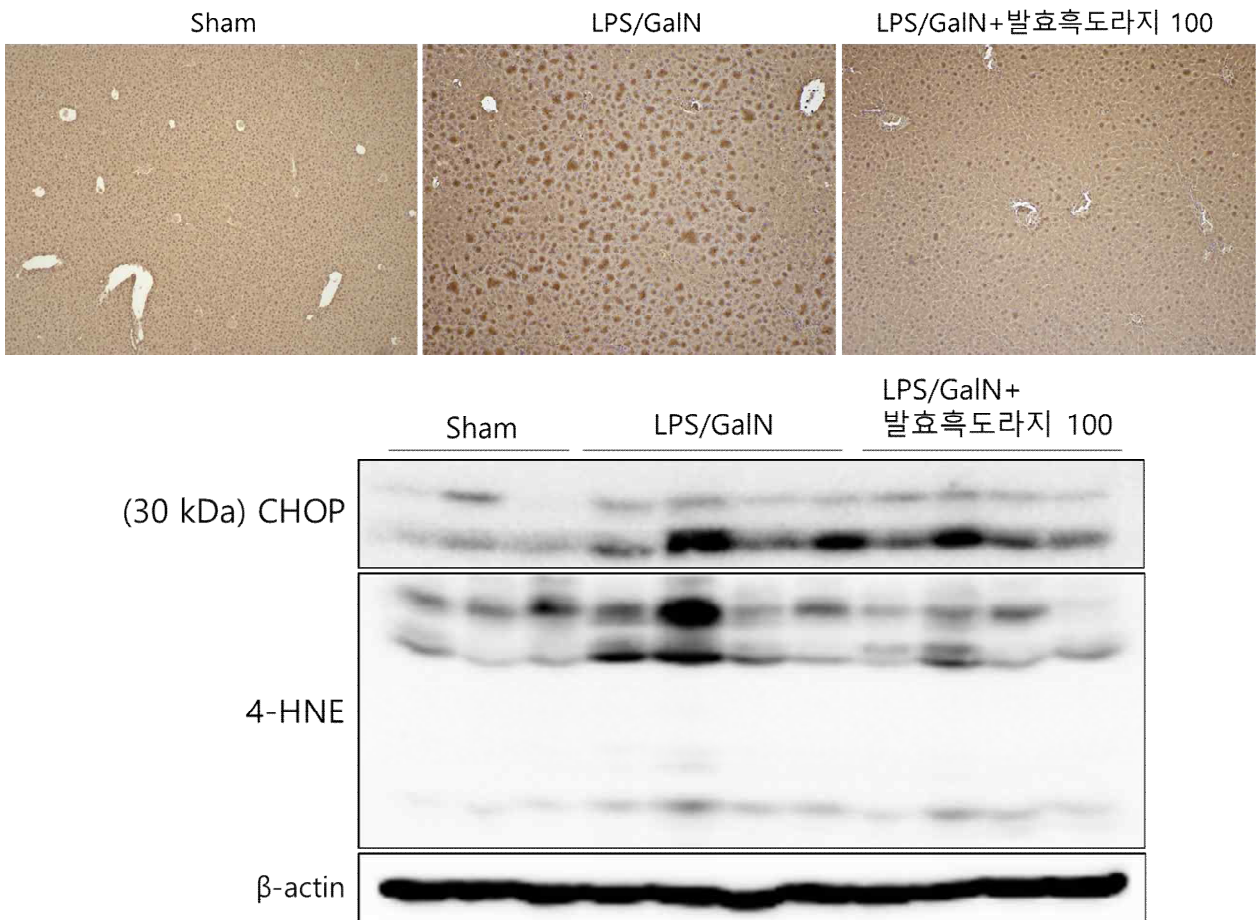


Fig. 3-8. 발효흑도라지의 간 조직 내 산화 정도.

## 나. 염증 효능 및 기전 분석

(1) **대식세포독성** : 대식세포주인 RAW264.7 세포로부터 염증 매개 물질의 억제 효과는 세포독성으로 세포가 사멸되는 것에 의해서도 나타날 수 있으므로 이러한 가능성을 배제하고자 세포주에 미치는 건도라지, 홍도라지, 발효홍도라지, 흑도라지 및 발효흑도라지의 독성 유무를 확인하기 위하여 도라지별로 0.1, 0.5, 1, 5, 10 mg/ml 농도를 처리한 후 MTT를 통해 세포독성을 확인하였다. 건도라지는 0.1 mg/ml 농도까지는 세포독성을 나타내지 않았으며 0.5 및 1 mg/ml 농도에서 각각 13.2%, 32.9% 세포독성을 나타냈으며 5 및 10 mg/ml 농도에서 95% 이상으로 높은 세포독성을 나타냈다. 홍도라지 및 발효홍도라지는 1 mg/ml 농도까지 세포독성을 나타내지 않았고 5 및 10 mg/ml 농도에서 95% 이상으로 높은 세포독성을 나타냈다. 흑도라지 및 발효흑도라지는 5 mg/ml 농도까지 세포 독성을 나타내지 않았으며 10 mg/ml 농도에서 각각 45.5% 및 68.2%의 세포독성을 나타냈다(Fig. 3-9).

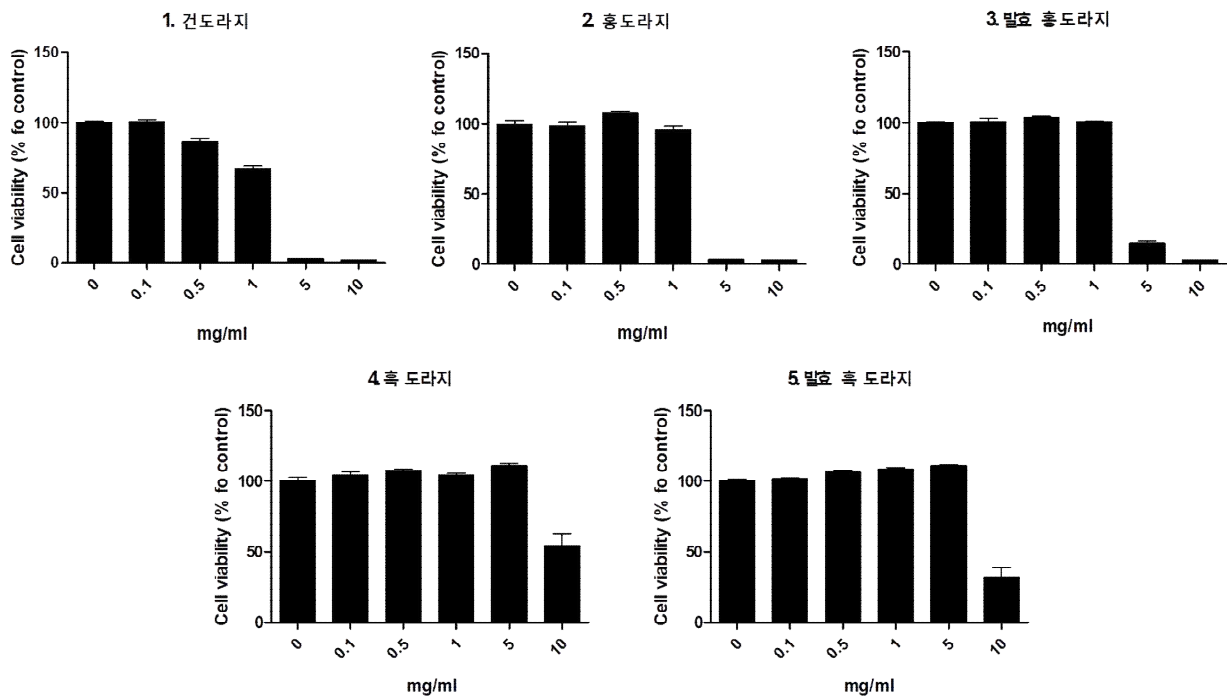


Fig. 3-9. RAW264.7 세포주에서 세포독성 확인.

(2) **NO 억제능** : 대식세포 RAW264.7 세포에서 도라지들의 NO 생성 억제를 관찰하기 위하여 도라지별로 전처리한 후 LPS를 처리하여 18시간동안 배양하였다. 그 결과, LPS 처리군에서 50.2  $\mu$ M로 NO 생성이 증가되었고 흑도라지 및 발효흑도라지 전처리군에서 NO 생성이 각각 33.5  $\mu$ M 및 15.6  $\mu$ M으로 LPS 처리군 대비 NO의 생성이 현저히 억제되었다(Fig. 3-10).

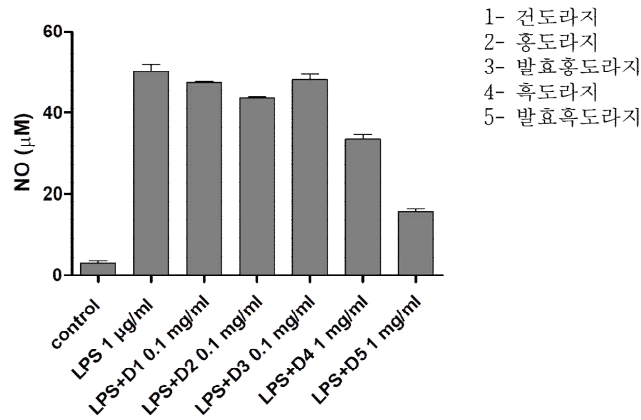


Fig. 3-10. RAW264.7 세포주에서 NO 생성량 확인.

(3) 염증인자 단백질 및 염증 유전자 발현 :

(가) 대식세포 RAW264.7 세포에서 도라지별 iNOS 및 COX-2 단백질 발현 억제를 관찰하기 위하여 도라지 1시간 전처리 후 LPS를 처리하고 8시간 배양하였다. 그 결과, LPS 처리군에서 증가된 iNOS 단백질의 발현이 흑도라지 및 발효흑도라지 처리군에서 억제되었다.

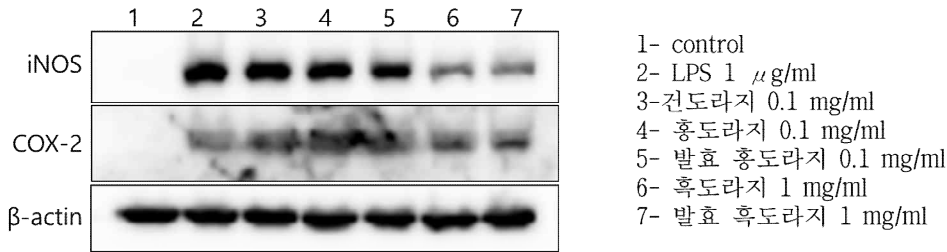


Fig. 3-11. RAW264.7 세포주에서 염증인자의 유전자 발효 정도 확인.

(나) 대식세포 RAW264.7 세포에서 도라지별 TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1 및 IL-10 유전자 발현을 관찰하기 위해 real-time PCR을 수행하였다. 그 결과, LPS 처리군에서 증가되었던 pro-inflammatory 유전자 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 MCP-1 유전자 발현이 도라지별 전처리군에서 억제되었다. 하지만, 도라지들이 anti-inflammatory 유전자인 IL-10에는 영향을 미치지 않았고, pro-inflammatory 유전자를 억제하였기 때문에 anti-inflammatory 유전자를 증가시키지 않아도 염증 억제 효능을 나타낸다(Fig. 1-12).

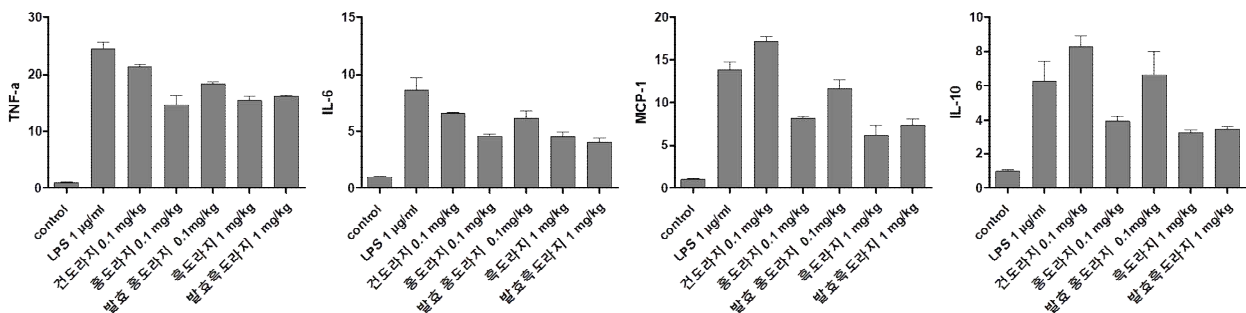
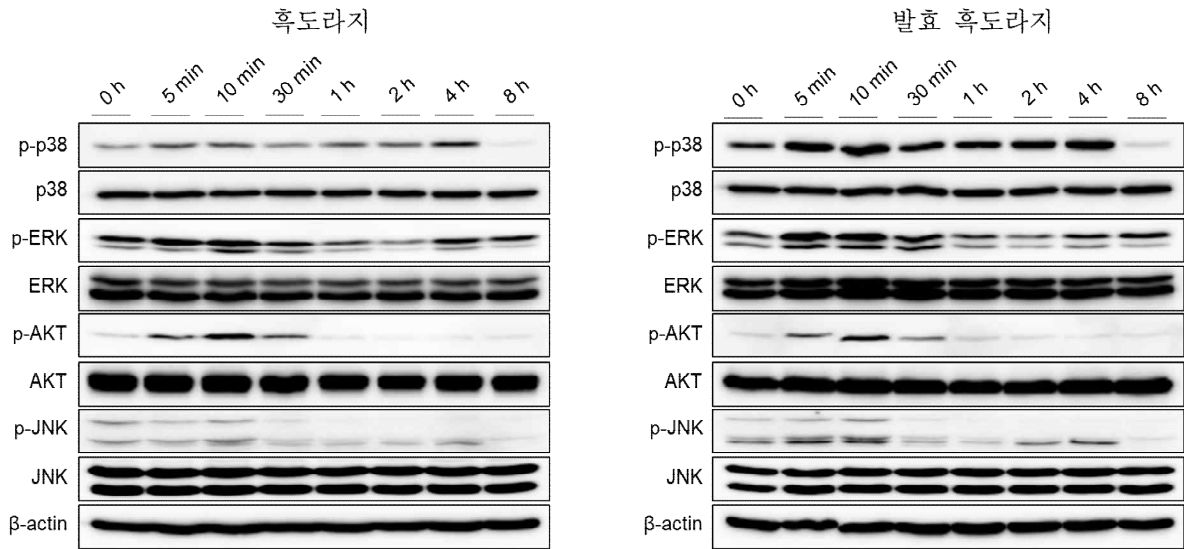


Fig. 3-12. RAW264.7 세포주에서 염증인자의 유전자 발효 정도 확인.



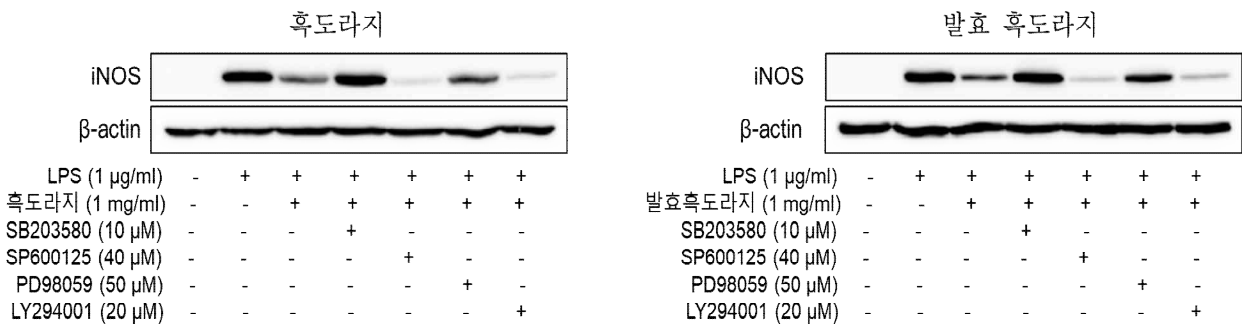
**(4) 염증 억제 기전 :**

(가) 대식세포 RAW264.7 세포에서 흑도라지 및 발효흑도라지가 MAPK 신호경로를 활성화 시키는지 확인해보기 위해 p38, ERK, JNK 및 AKT의 인산화 발현정도를 조사하였다. 그 결과, 흑도라지 및 발효흑도라지는 초기 시간대부터 꾸준히 p38 인산화 발현이 증가되었으며, 초기 시간에 ERK 및 AKT 인산화 발현이 증가되었다. 또한 JNK 인산화에는 영향을 미치지 않았다 (Fig. 3-13).



**Fig. 3-13.** RAW264.7 세포주에서 염증 억제 기작 확인.

(나) 대식세포 RAW264.7 세포에서 흑도라지 및 발효흑도라지의 iNOS 및 COX-2 단백질 발현 억제가 MAPK 신호경로를 통하는지 확인하기 위해 SB203580(p38 inhibitor), SP600125(JNK inhibitor), PD98059(ERK inhibitor) 및 LY294001(PI3K inhibitor)를 이용하였다. 그 결과, LPS 처리군에서 증가되었던 iNOS 단백질 발현이 흑도라지 및 발효흑도라지를 전처리하였을 때 현저히 억제되었으며 두 처리군 모두 SB203580을 처리하였을 때 iNOS 단백질 발현이 증가되는 것으로 보아 흑도라지 및 발효흑도라지가 p38 및 ERK 신호를 통해 염증을 억제하였다(Fig. 3-14).



**Fig. 3-14.** RAW264.7 세포주에서 염증인자 확인.

## 제6절 연구개발 성과

### 1. 연구성과 총괄표

(단위 : 건수)

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인 증	학술성과		교 육 지 도	인 력 양 성	정책 활용·홍 보		기 타 (타 연 구 활 용 등)	
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문				학 술 발 표	정 책 활 용		홍 보 전 시
												SCI	비 SCI						
1차 년 도	목표	1											1	1					
	실적	1		1			1						1	1			2		
2차 년 도	목표	2			1	10	1	36			1		1	2	2	2		1	
	실적	2				94.12	2	94.12			1		0	3		2		2	1
3차 년 도	목표	2	4		1	50	2	82.8			1		2	1	2			1	1
	실적	2	2			100.12	1	100.12			0		0	2	2			1	1
합 계	목표	5	4	0	2	60	3	118.8			2		3	1	5	4	4	2	1
	실적	5	2	1	2	194.12	4	194.12			1		0	2	6	4	4	5	2

### 2. 연구성과

#### 가. 국내·외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	Antioxidative and digestion enzyme inhibitory activity of <i>Ganoderma lucidum</i> depends on the extraction solvent	한국식품저장유통학회	주옥수	25 (1)	대한민국	한국식품저장유통학회지	비SCI	2018.02.28	
2	Changes in yeast diversity and volatile flavor compounds during fermentation of mugwort sugar extracts	한국식품저장유통학회	홍수영	25 (7)	대한민국	한국식품저장유통학회지	비SCI	2018.12.31	

나. 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	제37차 한국식품저장유통학회 정기총회 및 학술대회	황정은, 강민철, 조계만	2016.10.21.	부경대학교 부민관	대한민국
2	2017 International Symposium and Annual Meeting of the KSABC	황정은, 강민철, 박상원, 김현준, 조계만	2017.06.16	부산 해운대그랜드호텔	대한민국
3	제38차 한국식품저장유통학회 정기총회 및 학술대회	김수철, 황정은, 지기현, 조계만	2017.10.20	경북대학교 글로벌프라자 1층 경하홀	대한민국
4	2017년 한국식품영양과학회 국제심포지엄 및 정기학술대회	김수철, 황정은, 지기현, 조계만	2017.11.08.	경주 화백컨벤션센터	대한민국
5	2018 International Symposium and Annual Meeting of the KSABC	김수철, 지기현, 황정은, 최아라, 조두용, 조계만	2018.06.19	제주 국제컨벤션센터	대한민국
6	2018 International Symposium and Annual Meeting of the KSABC	지기현, 김수철, 황정은, 최아라, 조두용, 조계만	2018.06.19	제주 국제컨벤션센터	대한민국

다. 생명자원(생물자원)/화합물

No	생명자원(생물자원)/화합물명	등록/기탁번호	등록/기탁기관	발생년도
1	<i>Lactobacillus brevis</i> BMK184	KACC 92156P	국립농업과학원 한국농업유전자은행 (KACC)	2016-2017

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

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	증진된 기호성, 장기저장 안전성 및 기능성을 갖는 도라지 함유 십전대보환 및 그 제조방법	대한민국	(주)자연애제약	16.11.24	10-2016-0157126				50%
2	증진된 기호성과 향산화 활성을 갖는 식물성 브라운 소스 및 그 제조방법	대한민국	경남과기대 산학협력단	2017.08.31	10-2017-0111355				50%
3	프로도카테킨산, 에피카테킨 및 올레산이 강화되고 증진된 알파-글루코시다제 및 췌장 리파제 저해활성을 갖는 도라지 및 그 제조방법	대한민국	(주)자연애제약, 경남과기대 산학협력단	2017.09.15	10-2017-0118380				50%

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
4	증진된 기호성, 장기저장 안전성 및 기능성을 갖는 도라지 함유 십전대보환 및 그 제조방법	대한민국				(주)자연애 제약	2018. 04.10	10-1849132	50%
5	증진된 기호성과 항산화 활성을 갖는 식물성 브라운 소스 및 그 제조방법	대한민국				경남과기대 산학협력단	2018. 11.05	10-1917534	50%
6	발효도라지 *플러스업 (상표: 30류)	대한민국	(주)자연 애제약	2018. 12.26	40-2018- 0181517				100%
7	발효도라지 *플러스업 (디자인: 19류)	대한민국	(주)자연 애제약	2018. 12.26	30-2018- 0061476				100%

마. 저작권(소프트웨어, 서적 등) : 해당사항 없음

바. 전문연구 인력양성

No	분류	기준 년도	현황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1	졸업자*	2017	1	1		1	1				2			
2	졸업자**	2018		1		2					2			

\*박사: 황정은 (경남과기대 산단 연구원임용, 現 환경독성본부 박사후 과정 중), 학사: 장경진 (식품기업 취업, 신우코퍼레이션)  
\*\*학사 : 김수철 (석사진학), 지기현 ( (식품기업 취업, 신우코퍼레이션, 2019년 2월 졸업예정)

사. 산업기술 인력양성 : 해당사항 없음

아. 기술거래(이전) 등

No	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)		누적 징수현황 (매출액)
					정액	경상	
1	직접 실시 (2017)	증진된 기호성, 장기저장성 및 기능성을 갖는 도라지 함유 십전대보환 및 그 제조방법	(주)자연애 제약	2017년 11월 24일	-	-	94,120,300원
2	직접 실시 (2018)	증진된 기호성, 장기저장성 및 기능성을 갖는 도라지 함유 십전대보환 및 그 제조방법	(주)자연애 제약	2018년 12월 28일	-	-	100,119,516원

자. 사업화 투자실적 : 해당사항 없음

차. 사업화 현황

(단위 : 명, 년)

No	사업화 방식	사업화 형태	지역	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생년도	기술 수명
							국내	국외		
1	자가 실시	신제품 개발	국내	도라지 십전대보환, 도라지 경옥고환, 발효침향환	고온숙성법을 이용한 도라지 함유 십전대보환, 경옥고환, 발효침향환 제품화 (한의원 납품용)	(주)자연애제약	94,120,300원		2016.07 ~ 2017.10	정체기
2	자가 실시	신제품 개발	국내	도라지 십전대보환, 도라지 경옥고환, 발효침향환	고온숙성법을 이용한 도라지 함유 십전대보환, 경옥고환, 발효침향환 제품화	(주)자연애제약	100,119,516원		2018.01 ~ 2018.12	정체기

카. 표준화 : 해당사항 없음

타. 기술요약정보 : 해당사항 없음

파. 보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록번호
2016	기획보고서 (2016 미래건강, 경남항노화산업 콘퍼런스 기획보고서)	2016.10.11	경상남도/경남테크노파크
2017	‘자연애제약 함양군 이전 6차산업 사업계획’ 보고서 (참여기업 자연애제약의 함양군 이전 계획에 따른 6차산업 베이스 사업계획서)	2017.08.	(주)자연애제약

하. 기타

(1) 심포지엄

번호	교육명	교재명	주요내용	활용년도
1	지리산권역 약용작물의 6차산업 고부가가치 전략	2016년 지리산권역 약용작물의 6차산업 고부가가치 전략 심포지엄 자료집	지리산권역인 산청군 한방 항노화 전략약초의 6차산업화 육성을 전략으로 공무원, 기업인, 농업인 및 학생을 대상으로 도라지 등의 재배기술, 가공품 개발, 건강기능식품 이해 및 한방항노화 웰니스 관광에 대해서 발표 및 토론	2016

(2) 교육

번호	교육명	교재명	주요내용	활용년도
1	중소기업 기술개발서포터즈 기술애로 해결	기술애로 상담일지와 진단 결과보고서	도라지를 함유한 십전대보환 개발, 차별화된 도라지 원료 가공 기술 개발, 발효도라지 차 가공 기술 개발	2017
2	경상대학교 농식품유통과정	경상대학교 농식품유통과정	경남 향노화산업 연계 지리산권 농식품 6차산업 육성과 농산물을 이용한 향노화 식품 개발과정에 대해서 강의	2017
3	2017년 산청한방향노화포럼 기업애로사항	2017년 산청한방향노화포럼 결과보고서	주관기업인 (주)자연애제약의 환 제조시 애로점을 다양한 분야 전문가의 자문을 통한 해결방안 도출	2017
4	2018년 경상대학교 최고농업경영자과정 강의	2018년 경상대학교 최고농업경영자과정	경남 향노화산업 연계 지리산권 농식품 6차산업 육성과 경남 향노화소재 이용 기능성 콩 발효식품 개발에 대해서 강의	2018

(3) 홍보·박람회/전시회 등

번호	유형	박람회/전신회명	내용	참가일자
1	인터넷 신문	한국농어민 신문 외 다수	“활성도라지, 향노화 스타상품 만든다” 및 “산청 한방향노화 기업 '자연애제약', 활성도라지 제품화 '시동'” 제목으로 산청군 한방향노화실 과제 선정 홍보	2016.07
2	방송	MBC경남뉴스 테스크	지리산 도라지 상품 개발	2016.07
3	박람회 기획 및 전시	제14회 함양 산삼축제	제14회 함양군 산삼축제에 기업 판매장에 참가하여 도라지 함유 십전대보환, 경옥고환 및 산삼관련 대환 제품 전시 및 관측 행사	2017.09.08. ~2017.09.17 (10일간)
4	수출 상담회 및 박람회	베트남 수출 박람회	경상남도 테크노파크 동남아(베트남) 수출지원사업에 선정되어 베트남 수출 박람회에 참가하여 도라지 제품에 대한 긍정적인 반응을 보임, <b>액상 추출-농축액 형태로 제품화하여 수출하기로 협의</b>	2017.08.07. ~2017.08.12
5	국내·외 식품박람회 및 수출상담회 (총 9회)	그리스, 베트남, 홍콩, 한국 (경남/서울/창원), 중국, 호주	(주)자연애제약은 국내·외 식품박람회 및 수출상담회를 통해 본 사업을 통하여 개발된 도라지 제품(십전대보환 등)의 수출을 위해 지속적으로 진행 중이며, 또한 베트남 현지 법인을 설립을 계획하고 있음	2018.3.9~3.12 2018.6.7~6.8 2018.6.18~6.19 2018.6.20~6.21 2018.6.21 2018.7.19~7.21 2018.9.8~9.14 2018.9.11 2018.11.15~11.18

(4) 타 과제 연구 활용

번호	연구사업명	과제명	책임자	과제발주처 (부처)	활용년도
1	풀뿌리기업육성 사업	함양 산양삼 기반 향노화 블록버스터급 상품 고도화 사업	조계만, (총괄사업 책임자) 강민철 (참여기업 책임자)	산업통상 자원부	2017~2019
2	향노화산업 육성 지원사업	고온숙성 특허공법을 이용한 복합한방약초 숙취예방, 해소용 제품 개발	강민철 (주관책임자)	경상남도	2018~2019

(5) 신규 고용창출

번호	고용자명	고용형태	고용기관	고용일자	역할	활용년도
1	윤영식	정규직	(주)자연애제약	2017.06.01	도라지 등의 관련 제품 개발과 판촉 등	2017년~

## 제7절 사업화성과 및 매출실적

### 1. 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	2억원	
			향후 3년간 매출	5억원	
		관련제품	개발후 현재까지	0억원	
			향후 3년간 매출	0억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0.1% 국외 : 0%	
			향후 3년간 매출	국내 : 0.5% 국외 : 0%	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 0% 국외 : 0%	
			향후 3년간 매출	국내 : 0% 국외 : 0%	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			10위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			20위

### 2. 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		-		
	소요예산(백만원)		-		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년 후	5년 후
			2	5	8
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내	0	0.5	0.8
국외		0	0	0	
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		추후 산양삼 등을 활용한 한의용 및 건강기능식품으로 개발 예정			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)		현재	3년 후	5년 후
	수입대체(내수)		0	10	20
	수 출		0	5	10



# 제4장 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호

D-06

## 제1절 목표달성도

### 1. 정성적 목표달성도

가. 1차년도 : 2018.07.07. ~ 2018.12.31.

세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
<b>주관과제:</b> 활성도라지 이용 제품화 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 십전대보환 제품화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 도라지와 기타 10가지 약재의 활성 검정 (<i>in vitro</i>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 특수성분(HPLC 기반) 분석</li> <li>- 도라지와 10가지 약재의 라디칼 소거활성과 소화효소 저해활성 검정 완료</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 십전대보환 제조 및 제품화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 고온숙성법 제조 공정 확립</li> <li>- 일반(5대 영양성분, 지방산 등)과 특수성분(HPLC 기반) 분석</li> <li>- 라디칼 소거활성과 소화효소 저해활성 검정 완료</li> <li>- 특허출원 1건 완료</li> <li>- 제품화 1건 완료 (한의원 납품용 - 매출액: 50,212천원)</li> <li>- 학술대회발표 1건 완료</li> </ul>
<b>1위탁과제:</b> 활성도라지의 발효공정 최적화 및 표준화 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 우수미생물 확보</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 발효 유산균 및 효모 확보</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 발효식품 유래 유산균을 대상으로 생균제능과 가바 생성능을 확인하여 최종 유산균 3종 확보</li> <li>- 과일발효액 유래 효모를 대상으로 식용 가능한 효모 균주 5종 확보 및 특성 확인</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 볶음처리 조건 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 도라지 볶음처리 조건 및 효모 균주별 발효도라지 제조 조건</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 건조 도라지를 대상으로 볶음 시간과 온도를 고려하여 볶음 처리 조건 확립</li> <li>- 선발 효모균주의 단독 혹은 혼합종균 이용 발효도라지 제조</li> <li>- 라디칼 소거활성과 소화효소 저해활성 검정 완료</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 활성도라지 제조 공정 확립 (2차년 연계)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 활성도라지 제조 조건 확인</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 도라지(산청과 의령)를 고온숙성하여 활성도라지 제조</li> <li>- 도라지(5년)를 증자, 유산발효, 유산발효-고온숙성, 고온숙성의 물리적·생물학적 처리를 통하여 활성도라지 제조</li> <li>- 일반(5대 영양성분, 지방산 등)과 특수성분(HPLC 기반) 분석</li> <li>- 라디칼 소거활성과 소화효소 저해활성 검정 완료</li> </ul>

<b>2위탁과제:</b> 활성도라지 산업화를 위한 사업화 연계 방안 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 간 기능 시장조사</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 간 기능 중심의 시장 동향 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 도라지 재배 현황 조사 완료</li> <li>- 간 건강 관련 건강기능성식품 시장 조사 완료</li> <li>- 간 건강 관련 숙취해소음료 시장조사 완료</li> <li>- 간 건강 관련 주요 기업 보유 특허 조사 완료</li> <li>- 헛개나무열매추출물과 밀크씨슬추출물 보다 경제적으로 비교우위에 있는 것으로 판단</li> </ul>
<b>1협동과제:</b> 활성도라지 소재의 안전성 및 효능평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 간세포 및 면역세포에서 세포독성 확인</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 간세포주(HepG2 및 FL83B)와 대식세포주(Raw264.7)에서 용량에 따른 세포독성 확인</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 활성도라지는 원료도라지에 비해 세포독성이 낮음</li> </ul>

나. 2차년도 : 2017.01.01. ~ 2017.12.31.

세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
<b>주관과제:</b> 활성도라지 이용 제품화 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 숙성도라지로부터 최적 추출조건 확립 및 제품화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 숙성도라지로부터 최적 추출조건 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 고온숙성 기반 숙성(후)도라지 제조 (소규모 파일럿트)</li> <li>- 영양성분/특수성분 분석</li> <li>- 주정농도별 및 온도별 추출조건 확립</li> <li>- 추출조건별 HPLC 기반특수성분 (도라지 triterpenoid, phenolic acid, flavonol 화합물) 분석</li> <li>- <i>In vitro</i> 항산화 활성 확인</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 장백도라지 품종의 숙성(후)도라지 제조 및 특성</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 경남지역 도라지 특화 품종 장백도라지 이용 숙성(후)도라지 제조 (소규모 파일럿트)</li> <li>- 영양성분/특수성분 분석</li> <li>- 50% 주정추출물 제조 및 HPLC 기반특수성분 (도라지 triterpenoid, phenolic acid, flavonol 화합물) 분석</li> <li>- <i>In vitro</i> 항산화 활성 확인</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 도라지 이용 제품화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 도라지 경옥고환 등 제조</li> <li>- <b>매출액 발생 : 43,907,800원 (1차년도 십전대보환 포함)</b></li> </ul>
<b>1위탁과제:</b> 활성도라지의 발효공정 최적화 및 표준화 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 표준화 및 발효도라지 차 제조</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 도라지 triterpenoid 계열 화합물 표준화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 도라지 triperpenoid 화합물 4종에 대한 HPLC 분석</li> <li>- 4종 중 3종에서 표준화 실시 완료</li> <li>- 표준 분석법을 통한 1차년도 시료와 주관기업 추출 등의 시료를 대상으로 도라지 triperpenoid 화합물 분석</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 효모발효 도라지차 제조 및 특성 확인</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 효모균주 5종에 대해서 단독 혹은 혼합 균주를 이용한 발효 후 1차년도 도라지 볶음처리 조건으로 차 제조</li> <li>- HPLC 기반 특수성분(도라지 triterpenoid, phenolic acid, flavonol 화합물) 분석</li> <li>- <i>in vitro</i> 항산화 활성 확인</li> <li>- <i>in vitro</i> 소화효소 저해활성 확인</li> </ul>

<b>1위탁과제:</b> 활성도라지의 발효공정 최적화 및 표준화 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 숙성·발효 방식 검토</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 숙성·발효도라지 제조 및 특성 확인</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 개방형 고온숙성법을 이용한 홍도라지와 밀폐형 고온숙성법을 이용한 흑도라지 제조</li> <li>- 홍도라지와 흑도라지에 복합유산균을 이용한 발효도라지 제조</li> <li>- HPLC 기반 특수성분(도라지 triterpenoid, phenolic acid, flavonol 화합물) 분석</li> <li>- <i>in vitro</i> 항산화 활성 확인</li> <li>- <i>in vitro</i> 소화효소 저해활성 확인</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 지역별 숙성 도라지의 특성</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 지역별 숙성 도라지의 영양성분 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 산청군과 의령군 도라지 시료의 고온숙성법을 이용한 숙성(흑)도라지 제조</li> <li>- 영양성분 분석</li> <li>- 생리활성은 1차년도에 완료</li> </ul>
<b>2위탁과제:</b> 활성도라지 산업화를 위한 사업화 연계 방안 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 간 기능 등의 특허동향 조사</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 간 기능 등의 특허 동향 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 간 기능과 면역기능 중심 시장 동향 조사</li> <li>- 간 기능과 면역기능 중심 특허 동향 조사</li> </ul>
<b>1협동과제:</b> 활성도라지 소재의 안전성 및 효능평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 간기능 개선 효능</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 지방간 축적 억제 효능 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 활성도라지는 간세포에서 지방간 축적 억제에는 별다른 효과를 나타내지 않았음</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 염증성 간손상 억제 효능 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 활성도라지는 염증성 간손상 동물모델에서 간 손상 억제 효능을 나타내었음</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 면역기능 개선 효능</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 면역기능 개선 효능 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 십전대보환은 대식세포 및 비장세포를 이용한 실험에서 면역세포 활성화 및 면역조절 인자 발현을 유발하였음</li> <li>- 활성도라지는 대식세포 및 비장세포를 이용한 실험에서 면역세포 활성화 및 면역조절 인자 발현을 유발하였음</li> </ul>

라. 3차년도 : 2018.01.01. ~ 2018.12.31.

세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
<b>주관과제:</b> 활성도라지 이용 제품화 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 활성도라지 추출물 혹은 발효물의 제품화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 소환 제품 제조를 위한 분말원료 제조 및 특성</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 활성(숙성)도라지 등을 고온숙성법을 이용하여 분말원료 제조</li> <li>- 영양성분, 유리아미노산, 타르색소, 중금속 및 미생물 검사</li> <li>- 특수성분 분석 : triterpenoid, phenolic acid, flavonol 화합물) 분석</li> <li>- <i>In vitro</i> 항산화 및 소화효소 저해 활성 확인</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 스틱 액상 제품 제조를 위한 액상원료 제조 및 특성</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 활성(숙성)도라지 등을 이용하여 액상원료 제조</li> <li>- 영양성분, 유리아미노산, 타르색소, 중금속 및 미생물 검사</li> <li>- 특수성분 분석 : triterpenoid, phenolic acid, flavonol 화합물) 분석</li> <li>- <i>In vitro</i> 항산화 및 소화효소 저해 활성 확인</li> </ul>

<b>주관과제:</b> 활성도라지 이용 제품화 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 활성도라지 추출물 혹은 발효물의 제품화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 스틱 액상 제품 제조 : 숙성도라지 플러스업</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 스틱 액상 제품인 숙성도라지 플러스업의 상품기획 진행 (제1위탁기관과 공동진행)</li> <li>- 상기 액상원료를 바탕으로 스틱 액상 제품 제조</li> <li>- 영양성분, 유리아미노산, 타르색소, 중금속 및 미생물 검사</li> <li>- 특수성분 분석 : triterpenoid, phenolic acid, flavonol 화합물) 분석</li> <li>- <i>In vitro</i> 항산화 및 소화효소 저해 활성 확인</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 도라지 이용 제품화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 도라지 경옥고환 등 제조</li> <li>- <b>매출액 발생 : 100,119,516원 (1차년도 십전대보환 포함)</b></li> </ul>
<b>1위탁과제:</b> 활성도라지의 발효공정 최적화 및 표준화 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 활성도라지 추출물 및 발효물 품질 표준화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2차년도 실험결과 일부 진행</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 효모발효 도라지 차의 지방산 조성 분석</li> <li>- 숙성·발효도라지의 영양성분, 지방산, 유리아미노산 조성 분석</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 활성도라지 이용 에너지 음료 제조 및 특성</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 활성도라지와 활성산양삼, 카페인, 타우린 등을 혼합하여 에너지 음료 제조</li> <li>- 영양성분, 유리아미노산 등 검사</li> <li>- 특수성분 분석 : triterpenoid, phenolic acid, flavonol 화합물) 분석</li> <li>- <i>In vitro</i> 항산화 및 소화효소 저해 활성 확인</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 경남 한방 전략약초인 하수오의 숙성·발효 하수오 제조 및 특성</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 상기 숙성·발효도라지 제조 기술을 적용하여 숙성·발효하수오 제조 및 특성 분석</li> <li>- 이화학적 특성, 지방산, 유리아미노산, 무기질 분석</li> <li>- 생리활성물질 분석</li> <li>- <i>In vitro</i> 항산화 확인</li> </ul>
<b>2위탁과제:</b> 활성도라지 산업화를 위한 사업화 연계 방안 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 개발과제의 상용화 전략 수립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 사업화 가능 시장에 대한 조사 및 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 간 기능 관련 건강기능식품 및 숙취해소 음료 시장동향 조사 및 분석</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 사업화 가능 시장에 대한 국내 선행특허 조사 및 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 간 기능 관련 건강기능식품 및 숙취해소 음료 국내 선행특허 조사 및 분석</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 사업화 연계 방안 및 BM 수립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 간 기능 개선 분야 건강기능식품 분야로 사업화 추진</li> <li>- 단기: 건강기능식품 OEM 기업에 원료 납품 → 간 기능 관련 건강기능식품 판매</li> <li>- 장기: 자체 brand 개발 → 홈쇼핑, 온라인 등을 이용하여 제품 판매</li> </ul>
<b>1협동과제:</b> 활성도라지 소재의 안전성 및 효능평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 비알코올성 간 손상 개선 효능평가 및 기전 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 염증성 간 손상 억제 효능 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 활성도라지는 염증성 간손상 동물모델에서 간손상 개선 효과 및 염증 억제 효과를 나타내었음</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 염증 억제 효능 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 활성도라지는 대식세포를 이용한 실험에서 LPS에 의해 증가된 염증 단백질 및 유전자들의 발현을 억제하였음</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 항염증 효능 기전 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 활성도라지는 p38 및 ERK 신호경로를 통해 염증 단백질들의 발현을 억제하였음</li> </ul>

## 2. 정량적 목표달성도

(단위 : 건, 편, 명, 백만원)

성과목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)	
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시		
												SCI	비SCI							
최종목표	5	3		2	60	3	167.6	375.3	2			3	1	5	4	4		2	1	
1차년도	목표	1												1	1					
	실적	1		1			1							1	1				2	
2차년도	목표	2			1	10	1	36			1		1	2	2	2			1	
	실적	2				94.12	2	94.12		1	0		0	3		2			2	1
3차년도	목표	2	4		1	50	2	82.8		1	1	3		2	1	2			1	1
	실적	2	2			100.12	1	100.12		0	0	0	2	2		2			1	1
소계	목표	5	4	0	2	60	3	118.8		1	2	3	1	5	4	4			2	1
	실적	5	2	1	2	194.12	4	194.12		1	0	0	2	6	4	4			5	2
종료 1차년도		1						176.4	81			1								
종료 2차년도		1						460.8	1296			1								
종료 3차년도								921.6	1647		2	1								
소계								1558.8	375.3											
합계		5	4		2	60	3	167.6	375.3	1	2	3	1	5	4	4			2	1

\*생물자원 기탁 : 특허균주 기탁번호 - KACC 92156P, *Lactobacillus brevis* BMK184 - 도라지 발효균주

\*\*기술실시 : 직접실시, 1차년도 고온숙성법 이용 십전대보환 제조 기술 특허기반으로

도라지 함유 십전대보환, 도라지 경육고환 및 발효침향환에 매출액을 기술실시액으로 환산

## 제2절 관련 분야 기여도

- 고온숙성법을 이용한 도라지 함유 십전대보환 제조 기술을 바탕으로 다양한 제품(경옥고, 칩향환 등)을 개발하여 현재 매출액을 발생시켜 기업의 이윤창출과 신규 고용창출 등의 농식품 산업 발전에 기여
- 한편 상기 고온숙성법을 적용하여 산양삼을 베이스 숙취해소, 인지능력 개선 등의 기능성 제품 개발에 활용
- 특히 균주인 발효미생물인 효모와 유산균은 발효도라지에 사용될 수 있을 뿐만 아니라 다양한 식약용 작물에 적용 가능한 결과 제시
- 활성증진 도라지 제조기술은 다양한 뿌리약용작물의 활성 증진을 통한 향후 기능성 소재 개발에 기여
- 다양한 약용작물 복합추출물 베이스 기능성 식물성 소스와 음료 제조기술은 향후 항산화, 항고혈압, 간기능, 항당뇨 음료로 개발할 수 있는 자료를 제시
- 도라지와 관련 제품의 영양성분 및 기능성 성분의 표준화 결과는 실험에 사용되는 약용작물을 이용하여 제품개발 과정에서 기초자료로써 이용이 가능한 결과를 제시
- 도라지의 기능성 대사체 분석과 이들의 표준화 기술은 향후 건강기능식품 원료 개발 시 유용하게 사용될 수 있음
- 도라지 원료와 가공 도라지(숙성 혹은 발효) 소재의 면역, 비만, 간 기능, 염증 등의 다양한 만성대사질환 효능평가를 통한 과학적인 근거를 통한 4차산업 혁명 대비 medi-food 개발 및 이를 통한 마케팅, 홍보 등의 자료로 활용

## 제1절 연구개발 결과의 활용방안 및 기대효과

### 1. 연구개발 결과의 활용방안

- 본 연구결과의 국제저명학술지(생명/식품관련분야 SCI) 게재를 통한 활성도라지의 기능적인 우수한 측면을 부각하고 농·식품산업의 경쟁력 강화를 위한 정책적 활용
- 중국산 약재 수입을 대체할 수 있는 토종 약용작물의 체계적인 수급 및 소비 시스템 구축을 통한 지리산 특산 약용식물의 유전자원 보전, 증식 및 자원화에 활용
- 활성도라지를 활용한 한방특화 웰니스 관광 벨트(거창-함양-산청-합천)을 넘어 경남 대표 건강식품 개발의 기반을 구축함으로써 지역 농산물 소비가 촉진돼 지역경제 발전에 일익을 담당
- 활성도라지 기능성 물질 탐색 기술을 통한 다양한 기능성 가공제품 개발의 기초자료로 활용할 수 있을 뿐만 아니라 이를 통한 다양한 기능성 가공제품의 틈새시장 진입이 가능
- 소비자 기호에 맞는 활성도라지 건강식품 개발을 통한 다양한 고객층 확보하고 건강식품 전문업체인 참여기업의 생산라인을 이용하여 제품을 생산하여 국내 수요창출 뿐 만 아니라 수출 전략상품 개발에 활용
- 건강 지향적 트렌드에 따른 기능성음료 시장 성장으로 활성도라지 활용 기능성음료 개발을 통한 다양한 고객층 확보하고 청정지역(지리산)에 생산된 활성도라지 기능성음료로 신규 시장 진입에 활용
- 활성도라지 기능성 소재를 개발하고, 이를 이용하여 다양한 형태의 고객 맞춤형 건강기능성 소재의 상품화를 통한 내수촉진은 물론 수출 경쟁력 제고
- 활성도라지 기능성 소재 활용 제품은 향후 대사질환 및 간 질환 질병 예방을 위한 건강기능식품 개발에 관한 연구는 초기 단계인 실정이므로 본 연구의 성공적 수행으로 독성과 부작용이 없는 식용 유래의 기능성 대사체 개발이 가능하여 향후 식·의약 소재화에 활용
- 유용자원(신규 건강기능성 소재) 확보 후 특허 출원 및 관련업체(식품, 생물공학, 의약/ 제약회사 등) 기술이전을 통한 산업화에 활용
- 제조 기술 및 신제품 개발을 위한 산·학·연 관계 구축과 독점적 원천소재인 활성도라지의 기능성 규명과 다양한 제품개발을 통한 기술력 확보와 농가 등에 신수요 창출에 활용
- 활성도라지 기능성 소재에 BT 기술을 이용한 고부가가치 식품 소재 제조기술에 대한 기업의 대량생산체계 확립을 통한 사업화와 재배농가의 소득 안정화 및 농촌체험 등과 연계하여 두과 작물 기반 6차산업화 기초자료로 활용
- 본 연구를 수행하는 동안 참여 대학원생/학부생은 이론적인 기초와 함께 실무를 동시 배우므로 차 후 현장중심의 바이오 인력 고급 기술을 갖는 전문 인력과 6차 산업 전문 코디네이터 양성 기회로 활용

## 2. 기대성과 및 파급효과

### 가. 기술적 측면

○ 기능식품 제조 기술/추출기술 등의 우위선점 효과 : 활성도라지를 이용한 다양한 제형의 건강기능식품뿐만 아니라 건강기능성 소재 제조기술의 기술우위 선점 및 한국의 식·의약 산업과 연계된 산업(건강기능식품산업)의 기술적인 진보가 기대

○ 국내토착 생물자원의 확보 효과 : 나고야의정서 발효 시 국내 식·의약품, 화장품산업에 미칠 파급효과를 최소화하기 위해 독점권 보장 원천소재의 대량생산 기술 확보 한편 다양한 생물전환미생물의 지속적인 확보를 통한 국가 생물자원 확보에 기여 및 활성도라지로부터 다양한 기능성 대사체 확보에 기여

○ 식품관련 기술 진보 효과 : 식품과 관련된 전반적인 기반기술의 선점을 통해 기능성식품, 식품 분석학, 발효공학과 미생물 분야, 식품공정·포장학 및 기능성식품학 등의 생물 산업 분야에서의 핵심 기반 기술을 주도할 것으로 기대

○ 생명산업관련 기술진보 효과 : 식품뿐만 아니라 화장품, 제약/의약산업과 관련된 전반적인 기반기술의 선점을 통해 기능성 식품, 발효공학, 미생물 분야, 효소공학, 제약/의약분야 등의 생물 산업 분야에서의 핵심 기반 기술을 주도할 것으로 기대

○ 새로운 신수요 창출 효과 : 도라지 기능성 소재 제품의 기능성 물질 탐색 기술은 다른 식품 개발의 기초자료로서 활용할 수 있음. 한편 본 연구의 성공적 수행으로 건강식품의 개발로 건강식품산업의 글로벌화에 이바지할 것으로 기대

○ 항노화 타겟 질병 개선에 대한 과학적 근거 마련 : 과학적 연구결과를 토대로 한 향후 항노화 질환의 건강 예방법으로서 식이조절 및 제한에 대한 연구가 주를 이루고 있는 반면 식품섭취에 의한 혈당개선, 혈압개선, 간지 질 대사 개선에 대한 연구는 종합적으로 이루어지지 않고 있으므로, 본 연구의 성공적인 수행은 식품섭취에 의한 건강 증진 방법의 새로운 조명 및 제시가 가능하여 노령화에 따른 건강 문제를 근본적으로 해결하는데 기여하리라 생각되며, 갱년기 장애 개선, 면역 개선, 기억인지 개선, 혈액순환개선, 신장보호, 간 건강기능성 개선 식품의 개발을 위한 연구의 폭을 더욱 더 넓힐 수 있고 이러한 기능성이 검증된 활성 소재의 개발에 공헌할 것으로 확신

### 나. 경제·산업적 측면

○ 기업홍보 효과 : 브랜드 가치를 높여 고객가치를 창출할 뿐만 아니라 참여기업에 대한 국민의 신뢰도를 높임으로써 건강기능식품 전문제조업체 메카로서 기업이미지 제고와 중소기업 및 중견기업 성장에 견인차 역할 기대

○ 사회적 자본 증진효과 : 재배농가, 농산물생산 및 1차 가공업체 및 각 지자체 등이 공동의 문제를 해결하는 데 적극적으로 참여하는 사회적 자본이 함께 축적되어 지역사회 발전에 기여할 것으로 기대

○ 고용창출 및 주민 소득증대 효과 : 농·식품산업 부문의 고용창출은 물론이고, 기능성산업, 포장재산업, 요식산업, 관광축제산업 등 연관 산업 부문으로의 산업파급 효과 확대에 따른



고용이 창출로 지역경제 활성화에 기여할 것으로 기대되며, 산·학·연·민의 공동연구 사업으로 경남지역의 신규 고용 효과도 기대

○ 우리 토종 약초의 고부가가치 창출 효과 : 지역 토종 약초 이용 및 기능성 음료 등의 건강식품사업의 활성화는 전형적인 1차 산업에 기반으로 하는 지역산업기반의 고부가가치 창출 시스템을 제공함으로써 지속적 성장 동력을 제공하며, 나아가 수입식품에 대한 대응 및 FTA 체제를 극복하는 하나의 수단으로 활용될 것으로 기대

○ 산청군 혹은 경상남도 항노화산업화를 가속화시키는 시너지 효과 : 산청군 한방 항노화 산업 및 경남 미래전략산업 항노화바이오산업 관련 항노화 소재 개발과 집중화를 통해 항노화 제품, 항노화 서비스 및 항노화 관광을 연계시킬 수 있는 시너지 효과를 발휘할 수 있으며 특히 한방특화 웰니스 관광 벨트의 중요한 항노화 제품을 제공하여 산청군뿐만 아니라 경상남도의 농민 및 기업의 이윤창출을 통한 지역경제 활성화에 기여

#### 다. 농·식품 정책적 측면

○ 1:2:3차 산업의 동반상승에 따른 6차산업 육성 효과 : 도라지 활용성 증대에 따른 지역의 소비촉진 및 농가 소득증대에 기여(1차 산업), 생산업, 발효산업 및 가공사업 등의 기능성 식품 산업, 포장재 제조업 등의 2차 산업으로 파급, 도라지를 이용한 요식산업, 각종 축제(3차 산업) 과 연계된 부가가치 창출, 농가 및 가공업체의 간접적인 광고효과와 이익 창출 효과(3.5차 산업) 등 산업 전반에 걸친 동반상승 및 파급효과가 기대되며, 도라지 재배부터 가공, 문화·관광 산업 연계적인 육성을 통한 6차산업화 육성이 기대

○ 지역 혁신역량강화 효과 : 지역 산·학·연·민의 다양한 네트워크가 형성에 기반 한 지속가능한 지역혁신 체제 구축으로 산업경제뿐만 아니라 지역의 학문, 문화, 예술 등 다양한 부문의 동반상승이 기대

○ 토종 약초산업의 글로벌 리더로 성장 효과 : 대체의약 산업으로 불리는 세계 약초시장은 600달러(2001)시장에서 2,124억 달러(2007) 시장으로 비약적 발전, 한류로 인한 한방 화장품의 성공으로 한방에 대한 긍정적 이미지 형성, 신비한 고장이라는 지역의 스토리텔링 관광 상품 개발과 약초 한방상품에 대한 브랜드 선점, 국내 성공을 기반으로 해외로 진출하는 글로벌 브랜드 마케팅에 기여

### 3. 사업화, 추가연구 및 기술이전

#### 가. 추가연구

○ 도라지와 가공 도라지의 면역 기능 및 간 기능 효과의 전임상 평가에서 효과가 있는 기능성에 대해서 추가 임상시험 등을 진행 필요

○ 도라지와 가공 도라지의 면역 기능 및 간 기능 효과 이외에 또 다른 효능 검정을 통한 다양한 식·의약 소재로서의 기능성 탐색 및 이를 이용한 medi-food 개발

## 나. 타 연구의 응용

- 본 연구의 일부에서 진행한 활성 증진 도라지(도라지만 자료 제시), 삼 혹은 더덕 등의 건강기능식품 개발을 위한 타 연구에 응용 혹은 기획 중
- 또한 활성 증진 기술을 이용하여 지리산권역 지역인 함양의 특화작물 산양삼을 이용하여 현재 건강기능식품 개발 연구 진행 중
- 도라지, 산양삼, 당귀, 하수오, 더덕 등의 스마트팜 연계 새싹뿌리약용작물 생산 시스템 구축과 이를 통한 다양한 식품, 화장품 등의 소재 개발 등 기획 중

## 다. 사업화 추진방안 및 기술이전

- 고온숙성법 기반 제품(십전대보환, 경옥고환, 침향환 등)은 지속적인 수출 방안 모색
- 기술이전(실시) 계획
  - ‘숙성도라지 플러스업’ 제품 역시 국내 판매와 지속적인 수출 방안 모색하여 기술실시를 진행할 예정임
  - ‘활성도라지의 면역과 염증 개선’ 과 ‘발효도라지차 제조법’ 은 현재 특허출원 예정으로 이에 대한 기술은 참여기업인 (주)자연애제약에 기술이전을 할 예정임

## 1. 제4차 산업 혁명

- 디지털 혁명을 기반으로 21세기 시작과 동시에 제4차 산업혁명이 출현
- 제4차 산업혁명은 로봇·빅데이터·사물인터넷(IoT)·인공지능(AI) 등 기술의 융합과 조화에 의해 촉발되는 혁신과 변화를 의미
- 지난 산업혁명은 인류의 삶을 변화시켰고 농업은 상대적으로 소외되었던 과거의 우를 범하지 않기 위한 미래 대응이 필요. 특히, 노동집약적 산업인 농업의 특성상 제4차업혁명이 미치는 파급효과가 클 것으로 전망
- 미래 농업은 ‘시스템의 시스템’으로 연결되며, 여기에 인공지능과 빅데이터 등이 결합해 자율 운영되는 첨단산업으로 진화될 것으로 예상
  - 여기서, 시스템의 시스템이란 기존 농기계, 종자, 농장 관리, 생산예측, 관수 등의 개별 시스템이 합쳐진 융합 시스템을 의미
  - 이는 제4차 산업혁명의 핵심기술인 로봇·빅데이터·인공지능(AI) 등이 농업과 결합하면서 첨단화 및 새로운 가치를 창출
- 제4차 산업혁명에 따른 분야별 전망
  - 농업생산 : 첨단 융합 기술을 기반으로 하는 ‘식물공장’, 온실·축사·노지 등을 포괄하는 ‘스마트 팜’, ‘정밀농업기계’ 등이 확대
  - 유통·소비 : 고령화, 1인 가구 확대, 초고속 드론 등 배송기술의 발전 등으로 스마트 생산·유통·소비 시스템이 활성화
  - 농촌경제 : 소셜 네트워크(Social Network)를 기반으로 한 농촌 공유경제 시스템 확산 등 규모화·집단화된 경제 공동체 개념이 확산

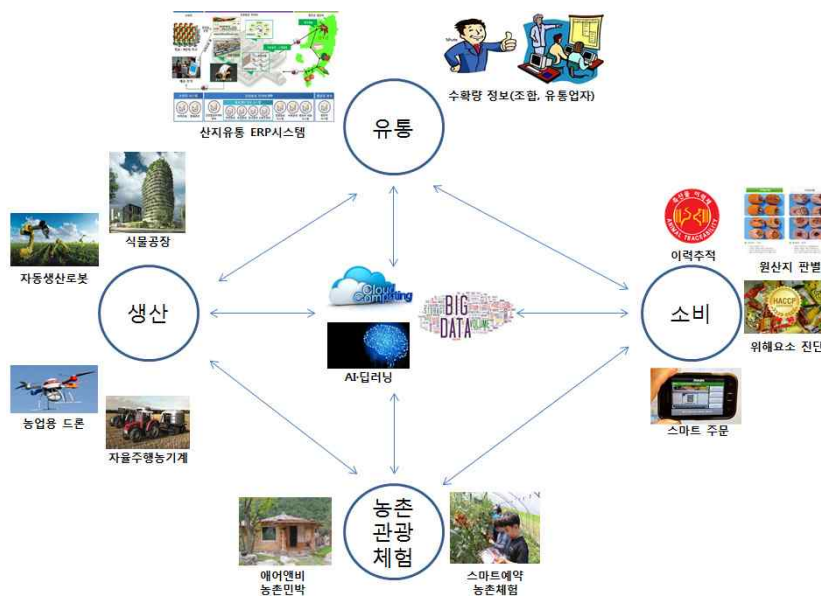


그림 6-1. 제4차 산업혁명이 적용되는 미래 농업의 모습 (출처 : 농림식품기술기획평가원 2017년)

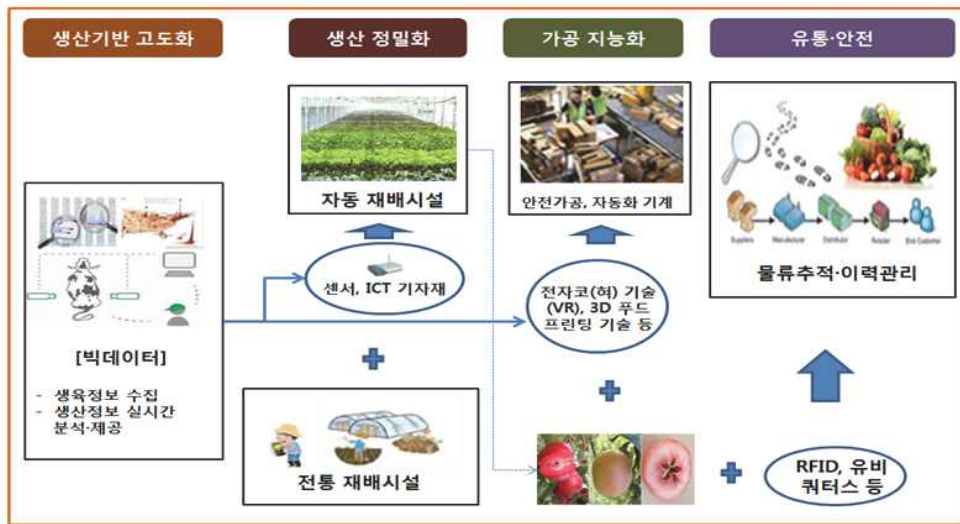


그림 6-2. 농림축산식품 분야 지능정보 기술 적용 개념도 (출처 : 과학기술정보통신부 2016년)

## 2. 발전하는 빅데이터 시장

○ 2015년 국내 빅데이터 시장규모는 2,623억 원의 규모를 나타내었다. 이는 전년 대비 30% 이상의 성장세를 나타내고 있으며 2018년 현재 국내 상황도 성장추세에 있음

○ 하지만 이러한 결과는 대기업 주도하에 성장한 빅데이터 시장 규모임을 감안할 때 중소기업의 시장상황에 맞는 데이터 시스템 구축은 정부 지원 하에 진행되어야 한다. 특히 농식품 분야 관련 빅데이터는 현재까지도 많은 부분 데이터가 구축되어야 하는 실정이며 아직까지 데이터 기반의 산업보다 하드웨어 위주의 빅데이터 구축 사업이 진행되고 있음

○ 2015년 하반기를 기준으로 국내 기업의 빅데이터 시스템 도입률은 약 4.3%로 집계되었다. 이는 2014년 3.9%에서 0.4%p 소폭 상승한 수치이다. 기업 규모를 고려하지 않은 산업 전체 기준에서는 기대보다 다소 낮은 수치로 판단할 수 있으나 빅데이터 도입은 매출액 1천억 원 이상 기업에서 주로 나타날 수 있다는 현실을 고려하여 매출 1천억 원 이상 기업은 약 9.6%의 도입률을 보여 이전 연도와 비교하여 소폭 상승한 것으로 나타남

○ 아직 빅데이터를 도입하지 않은 수요기업들 중 절반 이상은 아직 빅데이터에 대한 논의조차 이루어지지 않았으며, 특히, 데이터 분석의 필요성이 적은 제조 업종에서 관심이 낮은 것으로 나타남

○ 국내 기업 환경에서는 빅데이터에 대한 관심은 주로 IT 및 전산 부서

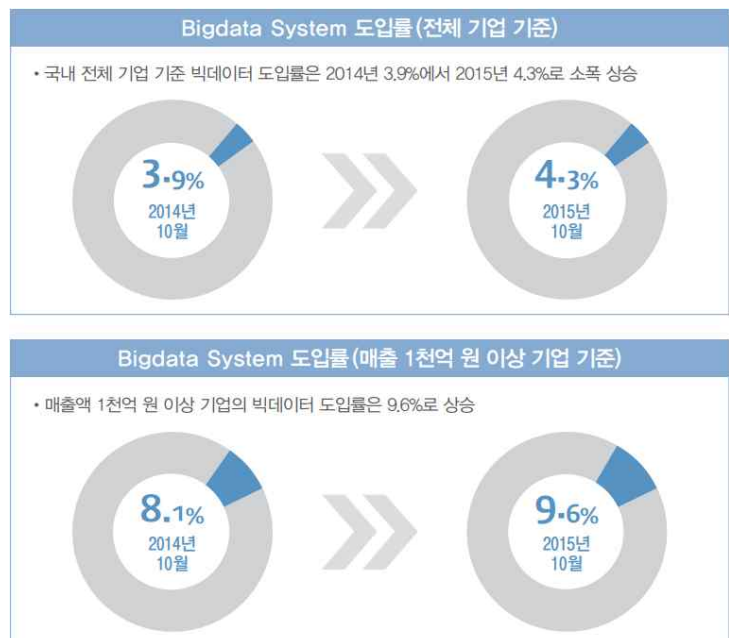


그림 6-3. 국내 기업의 빅데이터 시스템 도입률

가 담당하는 경우가 대부분으로 논의를 주도하는 부서 또한 전산 분야에서 진행되는 것으로 나타났다. 빅데이터의 경우 일반적인 IT시스템과는 달리 마케팅 등 현업 부서에서의 관심이 높을 것이라는 가능성이 제기되기도 했으나 마케팅 조직에서 논의가 주도되는 기업은 80개사로 전체의 9.2% 수준에 불과했으며 IT부서 논의는 161개사 18.6%의 절반 수준으로 나타났다. IT부서에서의 논의는 기존의 DW,BI를 관리하고 주도했던 부서라는 점이 크게 작용한 것으로 풀이됨

구분	도입 관심 수준					Total
	논의된 적 없음	전산부서 차원	마케팅 등 협업부서	CEO/CIO	기타	
공공	122	37	4	3	1	167
금융	14	10	25	10	2	61
유통/서비스	109	33	18	6	1	167
제조	239	61	24	5	2	331
의료	70	6	1	3	-	80
통신/미디어	33	14	8	2	3	60
Total	587	161	80	29	9	866

그림 6-4. 업종별 국내 기업의 빅데이터 도입 관심 수준(미도입 기업)

(출처 : 과학기술정보통신부 2015년)

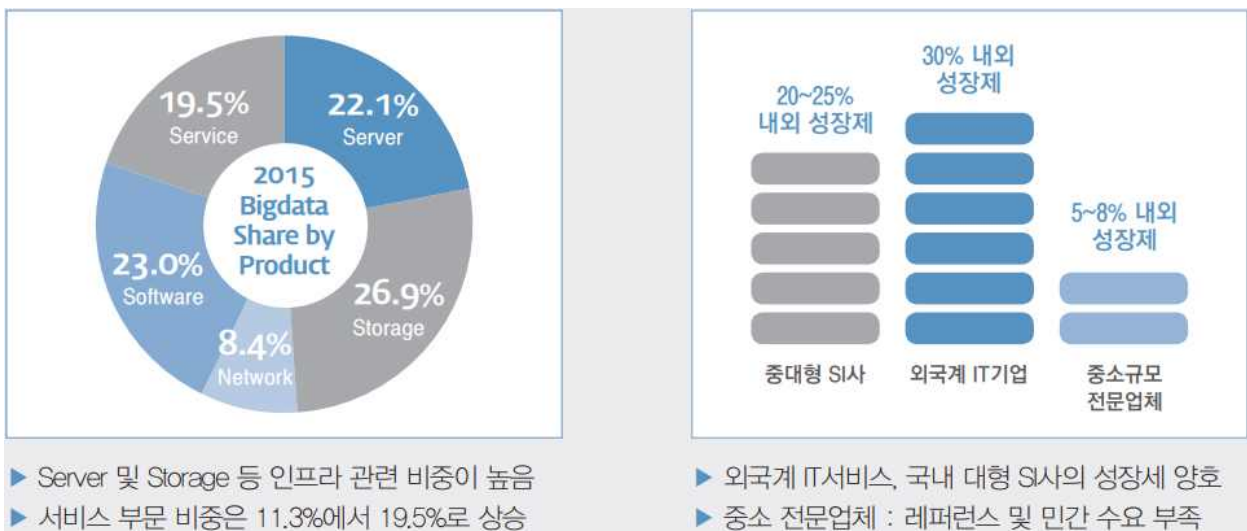


그림 6-5. 빅데이터 시장조사 결과 (출처 : 과학기술정보통신부 2015년)

## 제7장 연구개발결과의 보안등급

코드번호

D-09

- 해당사항 없음

## 제8장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

코드번호

D-10

- 해당사항 없음

## 제9장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호

D-11

### 제1절 주식회사 자연애제약

○ 목적 : “연구실 안전환경조성에 관한 법률”에 의거하여 실험실 안전관리 시스템 구축을 위한 체계적인 실험실 안전관리를 위해 실험실에서의 주의사항, 실험실 위험수준 확인 방법, 운영인력 확보 및 운영방안, 해당 법규 준수를 위한 자료 구축 등 시스템 개발 필요

#### ○ 실험실 안전관리 매뉴얼 구축

- 1) 안전한 실험실 관리 및 실험 수행을 위한 활동들의 체계적 정립
- 2) 세부내용
  - 실험실의 안전보건 수칙
  - 사고시 응급조치
  - 화학실험실에서 사용되는 전기기계 실험기구(설비)에 대한 안전지침
  - 유해위험물질 취급에 관한 지침(guideline)
  - 실험실 관리
  - 화학물질 안전관리
  - 실험실 위험성 평가 및 안전 교육 및 훈련

#### ○ 실험실 관리 시스템 구축

- 1) 실험실에서 행해지는 실험 날짜, 장소, 시간, 실험 실습자와 감독자 구성
- 2) 실험 일정 관리 기능, 실험 실습일지 작성
- 3) 실험 일자별 화학물질 및 시약, 표준품 사용량 관리

#### ○ 교육관리 시스템 구축

- 1) 실험실에서의 안전사고 예방을 위한 교육 시스템 구축
- 2) 실험실 안전관리 매뉴얼에 교육 횟수와 시기에 대한 규정 작성
- 3) 실험 실습자 및 감독자에 대하여 교육의 이수 및 인증을 관리할 수 있는 시스템 구축

- 4) 실험실 안전관리 수준 향상을 위한 교육
  - 5) 안전교육 관리 기능, 실험관련 안전교육 대상 관리, 대상별 안전교육 실시 시기 관리, 대상별 안전교육 내용 관리 및 실험관련 안전교육 실시 실적 관리
- 화학물질 관리 시스템 구축
- 1) 물질안전보건자료(material safety data sheet : MSDS)는 화학물질의 안전한 사용을 위한 필수 관리 요소
  - 2) 법규 및 각종 기술 기준에서 화학물질의 유해성 정보의 확인을 위한 기본요소
  - 3) 연구실험실에서 화학물질의 위험성 및 응급조치사항의 명확한 인지를 위해 실험실내에 MSDS를 반드시 비치
  - 4) 유해화학물질의 성분, 물리적 성질, 위험성, 응급조치사항 및 폐기방법 등의 정보 활용
  - 5) MSDS 시스템을 통하여 사용위치, 사용용도 여러 가지 분류에 따라 신속하게 MSDS를 검색하고 세부 정보를 편리하게 분류해서 볼 수 있는 편의성 제공
- 자체안전점검 시스템 구축
- 1) 관리 상태를 체계적이고 정량적으로 평가하기 위해 체크리스트 활용
  - 2) 관리 상태를 표현할 수 있는 항목을 체계적으로 분류
  - 3) 체크리스트 구성
    - ① 일반 안전
      - 실험실에서의 음식 취사 여부
      - 비상시 퇴출가능 여부
      - 정리정돈 상태
      - 실험실에서 사용되는 화학물질에 따른 안전보호구 확보
      - 장비별 안전수칙의 게시 여부
    - ② 전기 안전
      - 실험실내에서 사용되는 전기 시설의 적절성
      - 전기시설의 사용 적정성
      - 전기안전장치의 설치 적정성
    - ③ 가스 안전
      - 가스용기 안전 보관 여부
      - 가스 누출 감지 장치의 설치 적정성 및 작동 여부
      - 가스 사용 적정성
    - ④ 위험물 안전
      - 화학물질의 보관 적정성
      - MSDS 비치 여부
      - 화학물질 사용 절차 적정성
    - ⑤ 환경 안전
      - 폐시약 용기의 성상에 따른 구분 적정성
      - 폐기물 처리 및 보관 적정성
      - 폐액수집 시설 적정성

## 제2절 경남과학기술대학교 산학협력단

### 가. 연구실 안전조치 이행

#### (1) 기술적 위험요소 분석 :

○ 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 및 「산업안전보건법」에 따른 연구실 안전조치 이행계획(해당 연구실안전점검 및 정밀안전진단실시, 참여연구원의 교육훈련 및 건강검진실시, 보험가입 등) 및 기타 당해 연구개발사업 수행 시 필요한 연구실안전 확보 계획 등을 서술)

○ 경남과학기술대학교 공동실험실습관은 총장이 임명한 관장이 운영을 총괄하고 수행 업무의 특성에 따라 행정실, 분석실, 동물실험실, 안전관리실로 나뉘어져 있으며 전체 정원은 11명으로 교수, 일반직, 조교, 계약직, 용역직 등 다양한 직급으로 구성되어 있다.

○ 안전실은 연구활동중사의 건강보호와 불의의 안전사고를 예방하기 위한 안전교육, 안전점검, 폐기물관리 등 다양한 안전지원 활동을 수행하고 있다. 안전교육, 안전점검, 건강검진을 매년 수시로 실시하며 유전자변형생물체, 방사성 물질 및 발생장치 유지 관리도 철저히 시행하고 있다. 또한 안전보호구, 시약장, 가스누설검지기 설치, 응급샤워기, 응급세안기 설치등을 중점사업으로 지속적으로 실시하여 학교 차원의 관리하에 안전조치를 준수

#### (2) 연구활동중사자 안전보험 가입

○ 목 적: 실험·실습·연구활동 중에 안전사고 발생 시에 신속한 치료와 적절한 보상을 받을 수 있는 보험에 가입하여 선진화된 안전경영을 구현

○ 대 상: 과학기술분야 대학생, 대학원생, 연구보조원 등

#### (3) 연구활동중사자 건강검진 실시

○ 목 적: 연구활동중사자의 건강상태 확인 및 보건증진을 위해 대상자를 선정하여 매년 시행

○ 검진종류: 특수건강검진

○ 대 상: 유해화학물질 다량 취급 연구실험실 종사자(대학생, 대학원생 등)

○ 선정기준: 유해물질 사용량, 실내환경측정결과, 실험폐액 배출량 등

### 나. 안전관리대책

#### (1) 연구활동중사자 안전 교육 실시

○ 목 적: 과학기술분야 실험·실습·연구활동에 종사하는 구성원의 안전의식 고취 및 사고사례 등 다양한 안전정보 제공을 실시

○ 대 상: 과학기술분야 대학생, 대학원생, 연구보조원 등

#### (2) 연구실 안전점검 실시

○ 목 적: 연구실험실의 주기적인 안전상태 확인을 통해 위험요소 발굴 및 개선하여 안전한 교육연구환경을 유지관리

○ 점검종류 : 정기점검, 정밀안전진단

○ 대 상: 과학기술분야 실험실습실, 연구실험실 등

○ 점검내용: 화학, 생물, 전기, 기계, 환기, 보건 분야 안전상태 확인

#### (4) 실험폐기물 관리

○ 목 적: 교육·연구활동 과정에서 배출되는 각종 유해·위험한 실험폐기물의 안전하고 신속



한 처리

○ 대 상: 화학폐기물, 생물폐기물, 방사성폐기물

(5) 연구실 안전문화 활성화 캠페인 실시

○ 목 적: 대학내 연구실 안전문화 확산 및 구성원 안전의식 증진을 위한 캠페인 활동을 통해 인식 제고 및 자율적 참여를 유도 한다.

○ 내 용: 안전사고사례 전시 및 안전실천 약속 서명 등

#### 다. 연구실 안전조치 이행 일정

(1) 매월 4일 연구실 안전점검의 날 운영

추진일정	추진내용	비고
2017.07.01~ 2018.12.31.	- 일상점검일지 작성 등의 법률이행사항 확인	12회/년

(2) 연구실 정밀안전진단 및 위험성평가 실시

추진일정	추진내용	비고
2017.07.01~ 2018.12.31.	- 연구실 정밀안전진단 실시계획 통보 - 정밀안전진단 대상 수요조사 - 연구실 정밀안전진단 실시 - 3등급 연구실 위험성평가 실시	- 전년도 개선실적 확인 - 3등급 유해실험실 개선효과검증

(3) 연구실 안전교육 분기별 4회 실시

추진일정	추진내용	대상인원	비고
2017.07.01~ 2018.12.31.	- 연구실 안전교육 수요조사 실시 - 연구실안전교육 실시(4회/년)	350명 (교수포함)	영남권연구실 안전관리협의회 인력풀활용예정

(4) 연구활동종사자 건강검진

추진일정	추진내용	실시기준	비고
2017.07.01~ 2018.12.31.	- VOCs 고농도 실험실 선별 - 1차 일반 및 특수건강검진실시 - 이상소견자 2차검진실시 - 직업성질환 예방대책마련	- VOCs 고농도실험실 - 유해인자별 MSDS확인	건강검진 관련예산 증액반영

(5) 연구활동종사자 상해보험 전체가입

추진일정	가입기관	추진내용	비고
2017.07.01~ 2018.12.31.	교육시설 재난공제회	- 연구활동종사자 현황자료 대조확인 - 연구실 안전공제 가입자 현황제출 - 연구실 안전공제 재계약(1년간)	

### 제3절 경상대학교 산학협력단

#### 가. 연구실 안전 관리

##### (1) 위험인자 분석

- 화학 분야: 사용 시약의 특성별 위험요소 확인 및 안전표지 부착
- 생물 분야: 병원균 미생물 및 바이러스 등 인체 유해물질 확인 및 안전표지 부착
- 기타 분야: 전기, 기계, 환기, 폐기물 등 연구실내 위험, 유해인자 확인 및 개선

##### (2) 안전 교육

- 자체교육: 월 1 회 이상 연구실 자체 안전교육 실시(위험물질 취급요령, 보호구 착용 등)
- 정기교육: 반기 1회, 학교주관 연구실안전교육 참석(연구과제 참여자 전원)

##### (3) 안전점검

- 일일점검: 매일 연구실책임자 및 연구실종사자가 실시 및 기록
- 정기점검: 연구실안전팀에서 년 2회 측정장비 등을 이용하여 연구실내 불안전사항 점검 실시
- 특별점검: 연구실 안전사고 발생시 점검을 실시하여 문제점 개선 및 재발방지 계획 수립

##### (4) 실험실 정밀안전진단 실시

- 대상: 유해화학물질을 취급하는 연구실, 유해인자를 취급하는 연구실, 독성가스를 취급하는 연구실
- 실시: 2년마다 1회 실시하여 교육과학기술부에 보고

#### 나. 보험 가입 현황

보 험 명	보 상 내 용	대 상	주관부서
연구실 안전보험	사망/후유장해: 1억원/인	연구활동종사자 (학생, 수료생, 연구원등)	안전관리실
	상해 치료비: 1천만원/인 한도		〃
경영자배상책임보험	사망/후유장해: 2억원/인	재학생, (학부생, 대학원생)	학생과
	상해 치료비: 2백만원/인		
	대물배상책임: 2백만원/인		
산업재해보상보험	사망/후유장해: 관련 법률에 정한 기준	과제참여자 (재학생 제외)	산학협력단
	상해 치료비: 무한		
공무원연금보험	사망/후유장해: 관련 법률에 정한 기준	공무원 (교수, 직원)	교무과, 총무과
	상해 치료비: 무한		

#### 다. 추가 이행

1) 실험종사자 건강검진 실시	유해물질 노출 여부 검사 특수 건강검진 실시
2) 실험실 공기질 관리, 환기	유해물질농도 측정관리, 환기대책수립
3) 실험실 환경개선공사	노후 실험실 개선공사 시행
4) 특수위험 실험실에 별도의 소화설비 설치	특수소화기 설치(금속하재 전용 소화기 등)
5) 유기용매 별도 보관	실험실외부 보관창고 보관, 필요시 운반 사용
6) 실험실 환경안전지침 게시	실험실 특성에 맞는 안전수칙 게시(장비사용 등)
7) 고압가스 안전관리	용기고정장치 설치, 경보기 설치, 노후가스 용기 폐기
8) 안전보호장비 시설 보완	응급샤워기, 응급세안기, 응급구급함 등

# 제10장 연구개발과제의 대표적 연구실적

코드번호

D-12


번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록 국가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	Antioxidative and digestion enzyme inhibitory activity of <i>Ganoderma lucidum</i> depends on the extraction solvent	경남과학기술대학교 산학협력단	교신 저자	한국식품저장유통학회지	-	2018.02.28	중복사사	
2	논문	Changes in yeast diversity and volatile flavor compounds during fermentation of mugwort sugar extracts	경남과학기술대학교 산학협력단	교신 저자	한국식품저장유통학회지	-	2018.12.31	중복사사	
3	특허	증진된 기호성과 항산화 활성을 갖는 식물성 브라운 소스 및 그 제조방법	경남과학기술대학교 산학협력단	대표 발명 자	대한민국 특허청	-	2018.11.05	중복사사	
4	특허	증진된 기호성, 장기저장 안전성 및 기능성을 갖는 도라지 함유 십전대보환 및 그 제조방법	(주)자연애 제약	대표 발명 자	대한민국 특허청	-	2018.04.10	중복사사	특허등록, 기술실시 매출액 : 194백만원
5	특허	프로토키테큐산, 에피카테킨 및 올레산이 강화되고 증진된 알파-글루코시다제 및 췌장 리파제 저해활성을 갖는 도라지 및 그 제조방법	(주)자연애 제약, 경남과학기술대학교 산학협력단	대표 발명 자/ 공동 발명 자	대한민국 특허청	-	2017.09.15	중복사사	특허출원, 기술실시 준비 중 (숙성도라지 플러스업 제품화)
6	특허	발효도라지 *플러스업 (상표: 30류)	(주)자연애 제약	-	대한민국 특허청	-	2018.12.26	단독사사	상표출원, 제품 준비 중
7	특허	발효도라지 *플러스업 (디자인: 19류)	(주)자연애 제약	-	대한민국 특허청	-	2018.12.26	단독사사	디자인출원, 제품 준비 중

# 제11장 기타사항

코드번호	D-13
------	------

## 1. 심포지엄, 보고서 및 교육 자료

### 가. 심포지엄 자료



**농생명기술개발사업 3차년도 심포지엄 개최**

□ 심포지엄 개요

- 주 제 : 지리산권역 약용작물의 6차산업 고부가가치 전략
- 일 시 : 2016. 10. 7(금) 14:00 ~ 17:30
- 장 소 : 경남한방약초연구소 세미나실
- 주최 및 후원
  - 주최: 경남한방약초연구소, 지리산권역약용작물 6차산업육성사업단
  - 후원: 한노화산업협동조합개발사업단, 산청한방향노화포럼, (주)자연애제약
- 참석인원 : 40명
- 참석대상 : 경남남도농업기술원, 농업기술원 약용자원연구소, 경남한방약초연구소, 경상남도 한방향노화산업과, 산청군 한방향노화실, 경남과기대, 경상대, 기업체

□ 행사일정

시 간	내 용	비 고
14:00~14:10 (10')	• 등록	
14:10~14:20 (10')	• 개회사 • 환영사 • 축사	6차산업단 단장 조계환 경남한방약초연구소 소장 장사훈 농업기술원 원장 강양수 경남과기대 총장 최우래리 위원장
14:20~14:55 (35')	• 약용작물 생산현황과 발전방안	부산대 이종기 교수
14:55~15:30 (35')	• 농산물을 이용한 기능성 발효음료의 개발	동아대 서근원 교수
15:30~15:40 (10')	• Break time	
15:40~16:15 (35')	• 건강기능식품 진입 전략	KGC라이프앤리전 박지혜 부장
16:15~16:50 (35')	• 산청 한방헬니스리얼푸드 활성화 방안	경남발전연구원 김태영 박사
16:50~17:30 (40')	• 종합토론	


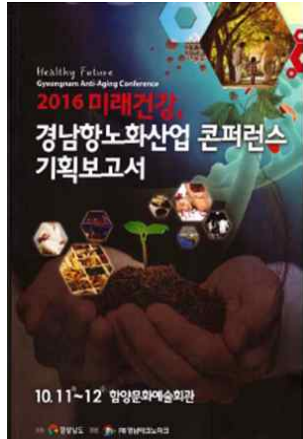
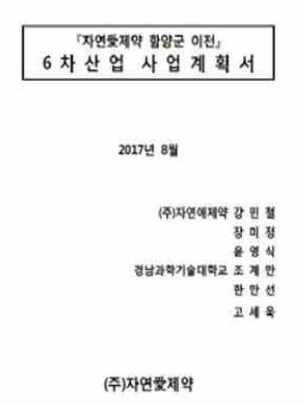


그림 11-1. 2016년 지리산권역 6차산업 관련 심포지엄 : (주)자연애제약 후원.

### 나. 보고서 자료 : 기획보고서와 사업계획서





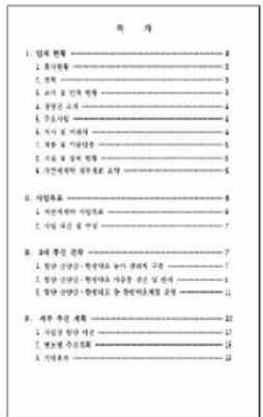


그림 11-2. 2016년 경남향노화산업 콘퍼런스 기획보고서 및 자연애제약 6차산업 사업계획서.

다. 보고서 자료 : 발효도라지 추출물의 안전성 평가 보고서

<p style="text-align: center;"><b>최종 보고서</b></p> <p style="text-align: center;">발효도라지 추출물의 생독성 시험한 급성경구독성 시험</p> <p style="text-align: center;">KIST 시험번호: 211203 최종보고서 제출일: 2012년 11월 08일</p> <p style="text-align: center;">시험목적: 급성구독성시험 경구경구독성 시험을 통한 발효도라지 추출물의 급성구독성 시험</p> <p style="text-align: center;">시험기관: 한국과학기술원 부산 안전성평가연구소 경상대학교 생명공학부 경남 진주시 중앙로 17 Homepage: http://www.kist.ac.kr</p> <p style="text-align: right;">KIST 한국과학기술원</p>	<p style="text-align: center;">발효도라지 추출물의 생독성 시험한 급성경구독성 시험</p> <p style="text-align: center;">KIST 시험번호: 211203</p> <p style="text-align: center;">최종보고서 제출일: 2012년 11월 08일</p> <p style="text-align: center;">시험목적: 급성구독성시험 경구경구독성 시험을 통한 발효도라지 추출물의 급성구독성 시험</p> <p style="text-align: center;">시험기관: 한국과학기술원 부산 안전성평가연구소 경상대학교 생명공학부 경남 진주시 중앙로 17 Homepage: http://www.kist.ac.kr</p> <p style="text-align: right;">KIST 한국과학기술원</p>	<p>3. 재료 및 방법</p> <p>3.1. 시험물질</p> <p>3.1.1. 시험물질</p> <p>명칭: 발효도라지 추출물(100% 건조도 50%, 도라지 50%, 발효 주원 추출물)</p> <p>KIT Code No.: T1121</p> <p>BioChLec No.: 해당없음</p> <p>시험 및 생산 일자/의 책임 소스:</p> <p>교섭기관: 해당</p> <p>제조업체: 경남과학기술대학교 생명공학부(경남대학교 2층 생물공학실험실)</p>
<p style="text-align: center;"><b>최종 보고서</b></p> <p style="text-align: center;">발효도라지 추출물의 생독성 시험한 급성경구독성 시험 (DRS)</p> <p style="text-align: center;">KIST 시험번호: 211203 최종보고서 제출일: 2012년 11월 08일</p> <p style="text-align: center;">시험목적: 급성구독성시험 경구경구독성 시험을 통한 발효도라지 추출물의 급성구독성 시험</p> <p style="text-align: center;">시험기관: 한국과학기술원 부산 안전성평가연구소 경상대학교 생명공학부 경남 진주시 중앙로 17 Homepage: http://www.kist.ac.kr</p> <p style="text-align: right;">KIST 한국과학기술원</p>	<p style="text-align: center;">발효도라지 추출물의 생독성 시험한 급성경구독성 시험 (DRS)</p> <p style="text-align: center;">KIST 시험번호: 211203</p> <p style="text-align: center;">최종보고서 제출일: 2012년 11월 08일</p> <p style="text-align: center;">시험목적: 급성구독성시험 경구경구독성 시험을 통한 발효도라지 추출물의 급성구독성 시험</p> <p style="text-align: center;">시험기관: 한국과학기술원 부산 안전성평가연구소 경상대학교 생명공학부 경남 진주시 중앙로 17 Homepage: http://www.kist.ac.kr</p> <p style="text-align: right;">KIST 한국과학기술원</p>	<p>3. 재료 및 방법</p> <p>3.1. 시험물질 및 투여제</p> <p>3.1.1. 시험물질</p> <p>명칭: 발효도라지 추출물(100% 건조도 50%, 도라지 50%, 발효 주원 추출물)</p> <p>KIT Code No.: T1121</p> <p>BioChLec No.: 해당없음</p> <p>시험 및 생산 일자/의 책임 소스:</p> <p>교섭기관: 해당</p> <p>제조업체: 경남과학기술대학교 생명공학부(경남대학교 2층 생물공학실험실)</p>
<p style="text-align: center;"><b>최종 보고서</b></p> <p style="text-align: center;">발효도라지 추출물의 생독성 시험한 급성경구독성 시험 (Microplate Format)</p> <p style="text-align: center;">KIST 시험번호: 211203 최종보고서 제출일: 2012년 11월 08일</p> <p style="text-align: center;">시험목적: 급성구독성시험 경구경구독성 시험을 통한 발효도라지 추출물의 급성구독성 시험</p> <p style="text-align: center;">시험기관: 한국과학기술원 부산 안전성평가연구소 경상대학교 생명공학부 경남 진주시 중앙로 17 Homepage: http://www.kist.ac.kr</p> <p style="text-align: right;">KIST 한국과학기술원</p>	<p style="text-align: center;">발효도라지 추출물의 생독성 시험한 급성경구독성 시험 (Microplate Format)</p> <p style="text-align: center;">KIST 시험번호: 211203</p> <p style="text-align: center;">최종보고서 제출일: 2012년 11월 08일</p> <p style="text-align: center;">시험목적: 급성구독성시험 경구경구독성 시험을 통한 발효도라지 추출물의 급성구독성 시험</p> <p style="text-align: center;">시험기관: 한국과학기술원 부산 안전성평가연구소 경상대학교 생명공학부 경남 진주시 중앙로 17 Homepage: http://www.kist.ac.kr</p> <p style="text-align: right;">KIST 한국과학기술원</p>	<p>3. 시험물질 및 투여제</p> <p>시험물질 관련 정보는 시험처리지기로부터 제공받았으며, 해당물질은 <i>Staphylococcus aureus</i>에서 배양된 것으로 확인되어 사용하였다.</p> <p>3.1. 시험물질</p> <p>명칭: 발효도라지 추출물 (50% 건조도, 발효 도라지 50%, 발효 주원 추출물)</p> <p>KIT Code No.: T1121</p> <p>BioChLec No.: 해당없음</p> <p>시험 및 생산 일자/의 책임 소스:</p> <p>교섭기관: 해당</p> <p>제조업체: 경남과학기술대학교 생명공학부(경남대학교 2층 생물공학실험실)</p>

그림 11-3. 발효도라지 추출물의 안전성 평가 보고서.



## 2. 홍보 : 언론 홍보 및 박람회·전시회 참가

### 가. 언론 홍보 자료



그림 11-5. 도라지를 이용한 한방향노화 제품 개발 언론 홍보.

## 나. 박람회·전시회 참가 자료

1. 참석 박람회/전시회명 : 제14회 함양군 산삼축제
2. 참석 기관 : 2017년 9월 8일 ~ 2017년 9월 17일
3. 참석 내용 :  
산삼축제에 기업 판매장에 참가하여 도라지 함유 심전대보완, 도라지 경육고단 및 산삼 관련 대환(발효침환, 산삼활력환 등) 제품 전시 및 판촉 행사



지역특화(주력)산업육성 기업지원사업	
주제명	함노희라이오 제품 수출확대를 위한 마케팅 지원 프로그램
협약기간	2017년 7월 3일 ~ 2017년 12월 31일
지원 분야	공동박람회
지원사업비(천원)	10,000
기업부담비(천원)	1,000
지원사업비(10%)	11,000

- 협약대상자
- (전담기관) (주)경남테크노크리 함노희라이오팀장 (지역특화) 양승국
- (수혜기업) ㈜자연에제약 (대표자) 장미정

위 기업지원 사업을 수행을 위한 다음의 협약을 체결한다.

### 제 1 조 (목적 및 범위)

1. 이 협약서는 정부원 지역특화(주력)산업육성 기업지원사업 『함노희라이오 제품 수출확대를 위한 마케팅 지원 프로그램』의 기업지원 신청서의 신청 분야 및 내용에 한정한다.

### 제 2 조 (협약처분)

1. (전담기관)과 (수혜기업)은 이의와 권이 협약을 체결한다.
2. 본 협약서의 해석상 의문이 있거나 이견이 있을 경우에는 관계법령에 따라 상호 협의하여 정한다.
3. 본 협약서(별부 포함)는 2부를 작성하여 (전담기관), (수혜기업)이 각각 1부씩 보관한다.

### 제 3 조 (사업비 지급)

1. (수혜기업)은 사업수행과 관련한 제비용을 (전담기관)에게 청구하여야 하며, 부가가치세는 (수혜기업)이 지급하여야 한다.
2. (전담기관)은 (수혜기업)이 청구한 비용을 물품(제약) 공급자 및 전시회 관련자에게 계좌에 입금한다.
- ※ 갑, 전시회 사외 예약, 수출인을 위한 선입금 등 수혜기업의 선입금 사유가 명확한 것에 대해서는 (전담기관)은 (수혜기업)의 계좌에 직접 입금한다.
3. (전담기관)은 [별표 1] 중 (수혜기업)이 신청된 분야에 한하여 지원하며 초과하는 금액은 (수혜기업)에서 부담한다.
4. 수출인증 분야는 사업기간 내 획득 가능한 인증에 한정한다.
5. 공동박람회 분야의 홍보자료 지원은 100만원 까지 지원하며 초과하는 금액은 (수혜기업)에서 부담한다.
6. 개별박람회 분야의 광고료는 별도 1인에 한하여 지원한다.
7. (수혜기업)은 사업수행 관련한 지원사업비(천원)의 최대 10%의 금액을 자부담해야 한다.
8. 지원금액 대해 발생하는 부가세는 (수혜기업)에서 부담하여야 한다.



참가일자	국가	주관	비고
3.9~3.12	그리스	경남무역	식품박람회
6.7~6.8	베트남(하노이)	한국농식품공사	수출상담회
6.18~6.19	베트남(호찌민)	중소기업청	수출상담회
6.20~6.21	홍콩	중소기업청	수출상담회
6.21	한국(경남)	경상남도	수출상담회
7.19~7.21	중국	산청군	식품박람회
9.8~9.14	호주	경남무역	식품박람회
9.11	한국(서울)	코트라	수출상담회
11.15~11.18	한국(창원)	경남무역	식품박람회



그림 11-6. 주관기업 (주)자연에제약의 식품박람회 및 수출상담회 참가.



### 3. 사업화 실적 : 제품 개발, 매출액(품목제조보고) 및 고용창출

농림축산식품연구개발과제 사업화실적 확인서									
과제명	경남 한방 향노화산업 전략약초 이용 스타상품 개발								
주관연구기관	(주)자연애제약			참여기업			(주)자연애제약		
책임자	강민철			연구기간			2016년 07월 ~ 2018년 12월 (총 2년 6개월)		
정부출연금	450,000천원	기업부담금	180,000천원	총계	630,000천원				
기술이전명	고온속성법을 이용한 한 제조기술			기술실시대상기관			(주)자연애제약		
기술료	직접 실시			기술실시일			2016년07월 ~ 2017년 현재		
구분	기술실시 업체 결산액 (단위: 백만원) * 최근연도 결산보고서에 의해 작성			해당기술을 통한 사업화 실적					
실적	자산 총계	2,708백만원			제품건수	3 (도라지 함유 심전대보환, 도라지 경옥고단, 발효침향환)			
	자본 총계	1,078백만원							
	부채 총계	1,630백만원							
	매출액 총계	1,404백만원				기술개발성과활용 매출액		94,120,300원	
제품별 실적									
구분	제품명	제품사진	제품 출시일	매출액 (백만원)	해당기술의 매출액 기여율 (%)	인산지	품질 인증 여부		
1	심전대보환		2016년 07월			한국			
2	경옥고단		2017년 01월	94,120,300원	5%	한국	한의 원 남품용		
3	발효침향환		2017년 01월			한국			

2017년 10월 30일  
연구책임자: 강민철 

농림축산식품연구개발과제 사업화실적 확인서									
과제명	경남 한방 향노화산업 전략약초 이용 스타상품 개발								
주관연구기관	(주)자연애제약			참여기업			(주)자연애제약		
책임자	강민철			연구기간			2016년 07월 ~ 2018년 12월 (총 2년 6개월)		
정부출연금	450,000천원	기업부담금	180,000천원	총계	630,000천원				
기술이전명	고온속성법을 이용한 한 제조기술			기술실시대상기관			(주)자연애제약		
기술료	직접 실시			기술실시일			2018년01월 ~ 2018년11월		
구분	기술실시 업체 결산액 (단위: 백만원) * 최근연도 결산보고서에 의해 작성			해당기술을 통한 사업화 실적					
실적	자산 총계	2,708백만원			제품건수	3 (도라지 함유 심전대보환, 도라지 경옥고단, 발효침향환)			
	자본 총계	1,078백만원							
	부채 총계	1,630백만원							
	매출액 총계	1,404백만원				기술개발성과활용 매출액		100,119,516원/2018년	
제품별 실적									
구분	제품명	제품사진	제품 출시일	매출액 (백만원)	해당기술의 매출액 기여율 (%)	인산지	품질 인증 여부		
1	심전대보환		2016년 07월			한국			
2	경옥고단		2017년 01월	100,119,516원	5%	한국	한의 원 남품용		
3	발효침향환		2017년 01월			한국			

2018년 12월 28일  
연구책임자: 강민철 

출력일시: 2017.07.05 11:51

4대 사회보험 사업장 가입자 명부									
발급번호	20170705987896		발급일시	2017-07-05 11:50		사업장 관리번호	81681699390		
구분	국민연금	건강보험	산재보험	고용보험					
사업장등록번호	815-81-85935	815-81-85935	815-81-85935	815-81-85935					
사업장명칭	(주)자연애제약	(주)자연애	(주)자연애	(주)자연애					
■ 가입 내역(발급일자 현재기준) 1 / 2									
연번	주민(외국인)등록번호	성명	국민연금	건강보험	산재보험	고용보험			
1	490207-2*****	권오신	2016.03.01	2016.03.01	2016.03.01	2016.03.01			
2	540820-1*****	김연필	2016.03.01	2016.03.01	2016.03.01	2016.03.01			
3	710724-1*****	강민철	2015.06.01	2015.06.01	2015.06.01	2015.06.01			
4	740328-1*****	윤영식	2017.06.01	2017.06.01	2017.06.01	2017.06.01			
5	770130-2*****	장미정	2012.04.16	2012.04.16	미가입	미가입			
6	810821-2*****	박지희	2016.02.15	2016.02.15	2016.02.15	2016.02.15			
7	801228-1*****	마희상	2015.01.01	2015.01.01	2015.01.01	2015.01.01			

1. 위 사업장 가입자 명부는 4대 사회보험 정보연계시스템이 국민연금공단, 국민건강보험공단, 근로복지공단의 가입자 정보를 실시간 연계하여 제공하는 것이며, 발급신청 이후는 발급일로부터 90일까지 4대 사회보험 포털사이트(www.4insure.or.kr)의 [발급사실확인] 메뉴에서 확인 가능합니다.

발급번호: 01MS-229F-R41N-F11-0200

식품(식품첨가물) 품목제조보고서									
보고인	성명(법인명) 표제호 주소 경상남도 산청군 삼정면 덕교리 544	생년월일(법인번호) 1960년 02월 12일 주식 055 974 0558 유미진원							
영양소	명칭(상호) 상장호 소재지 경상남도 산청군 삼정면 덕교리 544	영양등록번호 20170622025							
제품정보	식품의 유형	역상차	요청하는 품목제조 보고번호	201706220252					
	제품명	도라지롤러스업							
	유통기한	제조일로부터24개월							
	품질유지기한								
	원재료 또는 성분명, 배합비율	맛장애 기제							
	용도 용법	맛장애 기제							
	보관방법 및 포장재질	맛장애 기제							
	포장방법 및 포장단위	스틱포장							
	성상	액제식용							
	품목의 특성	<input type="checkbox"/> 고열량 · 저영양 식품 해당 여부 <input type="checkbox"/> [ ]에 [ ]아니오 [ ] 해당 없음 <input type="checkbox"/> 알러지 유발 식품 해당 여부 <input type="checkbox"/> [ ]에 [ ]아니오							
기타									
* 식품위생법 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다. 2018년 12월 16일 보고인 표제호									
경상남도 산청군수 귀하									
품목보고번호	20170622025-2		처리부서	환경위생과	처리자성명	신현정	처리일자	2018년 12월 21일	

본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(http://www.foodsafetymonitor.go.kr) 홈페이지에서 확인하실 수 있습니다.

그림 11-7. 사업화 실적 : 제품 개발, 매출액 및 고용창출

- Ahn KS, Noh EJ, Zhao HL, Jung SH, Kang SS, Kim YS (2005) Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase II by *Platycodon grandiflorum* saponins via suppression of nuclear factor- $\kappa$ B activation in RAW264.7 cells. *Life Sci*, 76, 2315-2328
- Ahn MJ, Yuk HJ, Lee HY, Hwang CE, Jeong YS, Hong SY, Kwon OK, Kang SS, Kim HR, Park DS, Cho KM (2016) Effect of the enhanced biological activities and reduced bitter taste of bitter Melon (*Momordica charantia* L.) by roasting. *J Agric Life Sci*, 49, 107-119
- Akiyama T, Tanaka O, Shibata S (1972) Chemical studies on the oriental plant drugs. XXX. Sapogenins of the roots of *Platycodon grandiflorum* A. DE Candolle. (1) Isolation of the sapogenins and the stereochemistry of polygalacic acid. *Chem Pharm Bull*, 20, 1945-1951
- Chan YC, Wang MF, Chang HC. 2003. *Polygonum multiflorum* extracts improve cognitive performance in senescence accelerated mice. *Am J Chin Med*. 31, 171-179.
- Chandrasekara N, Shahidi F (2011) Antioxidative potential of cashew phenolics in food and biological model systems as affected by roasting. *Food Chem*, 129, 1388-1396
- Chang YJ, Kim E, Choi YS, Jeon KH, Kim YB (2015) Development process for decreasing bitterness of *Doraji* (*Platycodon grandiflorum*). *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 44, 1550-1557
- Chen Y, Wang M, Rosen RT, Ho CT. 1999. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical-scavenging active components from *Polygonum multiflorum* Thunb. *J Agric Food Chem*. 47, 2226-2228.
- Chiang YC, Huang GH, Ho YL, Hsieh PC, Chung HP, Chou FI, Chang YS. 2011. Influence of gamma irradiation on microbial load and antioxidative characteristics of *Polygoni multiflori Radix*. *Process Biochem*. 46, 777-782.
- Chiu PY, Mak DH, Poon MK. 2002. *In vivo* antioxidant action of a lignan- enriched extract of *Schisandra* fruit and an anthraquinone-containing extract of *Polygonum* root in comparison with schisandrin B and emodin. *Planta Med*. 68, 951-956.
- Cho KM, Hwang CE, Joo OS. 2017. Change of physicochemical properties, phytochemical contents and biological activities during the vinegar fermentation of *Elaeagnus multiflora* fruit. *J Food Preserv*. 24, 125-133.
- Cho KM, Hwang CE, Kim SC, Joo OS 2018. Physicochemical properties, phytochemicals, and biological activities of heat-treated *Elaeagnus multiflora* juice and vinegar. *Korean J Food Preserv*, 25, 52-61.
- Cho KM, Joo OS 2014. Quality and antioxidant characteristics of *Elaeagnus multiflora* wine through the thermal processing of juice. *Korean J Food Preserv*, 21, 206-214
- Cho KM, Joo OS 2012. Enhances antioxidant effect of purple sweet potato by roasting. *Korean J Food Preserv*, 19, 735-743.
- Choi HK, Jang YY, Oh JH. 2016. Antioxidant and antimicrobial activities of Jeok Hasuo (*Polygoni*

- multiflora* Thunb) and Baek Haso (*Cynanchi wilfordii* Radix) root extracts. J Food Preserv. 23, 432-437.
- Choi JS, Kim HY, Seo WT, Lee JH, Cho KM. 2012. Roasting enhances antioxidant effect of bitter melon (*Momordica charantia* L.) increasing in flavan-3-ol and phenolic acid contents. Food Sci Biotechnol, 21, 19-26
- Choi JW, Lee HS, Kim YE, Kim BM, Kim IH, Lee CH. 2012. Effect of *Polygoni multiflora* Thunberg extract on lipid metabolism in rats fed high-cholesterol diet. J Korean Soc Food Sci Nutr. 41, 957-962.
- Choi SJ, Lee YS, Kim JK, Kim JK, Lim SS. 2010. Physiological activities of extract from edible mushrooms. J Korean Soc Food Sci Nutr. 39, 1087-1096.
- Folin D, Denis W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. J Biologic Chem. 12, 239-243.
- Guan S, Su W, Wang N, Li P, Wang Y. 2008. A potent tyrosinase activator from *Radix Polygoni multiflora* and its melanogenesis stimulatory effect in B16 melanoma cells. Phytother Res. 22, 660-663.
- Hatano T, Edamatsu R, Hiramatsu M, Mori A, Fujita Y, Yasuhara T, Yoshida T, Okuda T. 1989. Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. Chem Pharm Bull. 37. 2016-2021.
- Hong JH, Kim HJ, Choi YH, Lee IS. 2008. Physiological activities of dried persimmon, fresh persimmon and persimmon leaves. J Korean Soc Food Sci Nutr, 37, 957-964
- Hong MJ, Lee GD, Kim HK, Kwon JH. 1998. Changes in functional and sensory properties of chicory roots induced by roasting processes. Korean J Food Sci Technol. 30, 413-418.
- Hwang CE, Cho KM, Kim SC, Joo OS. 2018. Change of physicochemical properties, phytoestrogen content, and antioxidant activity during lactic acid fermentation of soy powder milk obtained from colored small soybean. Korean J Food Preserv. 25, 696-705.
- Hwang CE, Haque MA, Lee JH, Song YH, Lee HY, Kim SC, Cho KM. 2018. Bioconversion  $\gamma$ -aminobutyric acid and isoflavone contents during the fermentation of high-protein soy powder yogurt with *Lactobacillus brevis*. Appl Biol Chem. 61, 409-421.
- Hwang CE, Seo WT, Cho KM. 2013. Enhanced antioxidant effect of black soybean by cheonggukjang with potential probiotic *Bacillus subtilis* CSY191. Korean J Microbiol. 49, 391-397.
- Hwang CR, Oh SH, Kim HY, Lee SH, Hwang IG, Shin YS, Lee JS, Jeong HS. 2011. Chemical composition and antioxidant activity of *Deoduk* (*Codonopsis lanceolata*) and *Doraji* (*Platycodon grandiflorum*) according to temperature. J Korean Soc Food Sci Nutr, 40, 798-803
- Hwang CR, Oh SH, Kim HY, Lee SH, Hwang IG, Shin YS, Lee JS, Jeong HS. 2011. Chemical composition and antioxidant activity of *Deoduk* (*Codonopsis lanceolata*) and *Doraji*

- (*Platycodon grandiflorum*) according to temperature. J Korean Soc Food Sci Nutr. 40, 798-803.
- Hwang SY, Choi HM, Lim SY. 2013. Total phenolics of dried *Platycodon grandiflorum* and its effect on growth of human cancer cell lines. Korean J Food Sci Technol, 45, 84-89
- Jang EK, Seo JH, Lee SP. 2008. Physiological activity and antioxidative effects of aged black garlic (*Allium sativum* L.) extract. Korean J Food Sci Technol. 40, 443-448.
- Jang JR, Hwang SY, Lim SY. 2011. Inhibitory effect of extracts of *Platycodon grandiflorum* (the balloon flower) on oxidation and nitric oxide production. Korean J Food Preserv, 18, 65-71
- Jeon SM, Kim SY, Kim IH, Go JS, Kim HR, Jeong JY, Lee HY, Park DS. 2013. Antioxidant activities of processed deoduck (*Codonopsis lanceolata*) extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr. 42, 924-932.
- Jeong EJ, Kim KP, Bang BH. 2013. Quality characteristics of cookies containing *Platycodon grandiflorum* powder. Korean J Food Nutr, 26, 759-765
- Jeong SI, Yu HH. 2013. Quality characteristics of Sikhe prepared with the roots powder of *Doraji* (*Platycodon grandiflorum* A. DE. Candolle). J Korean Soc Food Sci Nutr, 42, 759-765
- Jiang ZQ, Xu JM, Long MH, Tu ZM, Yang GX, He GY. 2009. 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-beta-D-glucoside (THSG) induces melanogenesis in B16 cells by MAP kinase activation and tyrosinase upregulation. Life Sci. 85, 345-350.
- Joo OS, Hwang CE, Hong SY, Shin EC, Nam SH, Cho KM. 2018. Antioxidative and digestion enzyme inhibitory activity of *Ganoderma lucidum* depends on the extraction solvent. Korean J Food Preserv. 25, 124-135.
- Kang SA, Chun SS, Kang SK, Chung YC, Cheon EW, Cho SU, Jung KH, Ahn SC, Yul HS. 2014. Gene expression analysis of immune cell activation markers in extracts of *Platycodon grandiflorum* containing medicinal herbs. J Life Sci, 24, 567-572
- Kang SJ. 1987. Nutrition science. Hyongsul Publishing Co., Seoul, Korea. 69.
- Kang SK. 2007. Changes in proximate composition, free amino acid, free sugar and vitamin of *Curcuma longa* L. and *Curcuma atomatica* salib according to picking time. Korean J Food Preserv, 14, 624-632
- Kim AK, Lee CY, Hwang KH, Lee YJ, Kim SJ, Lee YJ, Lee HK, Lee SR, Kim IY, Lee JM, Yu IS, Jung K. 2016. Quality variation of Sibjeondaebotang according to long-term storage. Korean J Pharmacogn, 47, 374-380.
- Kim CH, Jung BY, Jung SK, Lee CH, Lee HS, Kim BH, Kim SK. 2010. Evaluation of antioxidant activity of *Platycodon grandiflorum*. J Environ Toxicol, 25, 85-94
- Kim HS, Seong YH, Yang JW, Jeon BS, Park UY, Park WK, Oh KW, Choi KJ. 1997. Hypoglycemic effects of extract mixture of red ginseng and steamed *Rehmaniae radix* on streptozotocin-induced diabetic rats. Korea J Ginseng Sci, 21, 169-173

- Kim HY, Kim JY, Cho EJ, Choi JM, Hwang CE, Lee HY, Ahn MJ, Lee JH, Kim YG, Ko KH, Goo YM, Oh KY, Cho KM. 2015. Free radical scavenging effect and oxidative stress protective activity of domestic processed *Polygoni multiflori* radix. J Korean Soc Food Sci Nutr. 44, 809-815.
- Kim HY, Woo KS, Hwang IG, Lee YR, Jeong HS. 2008. Effects of heat treatments on the antioxidant activities of fruits and vegetables. Korean J Food Sci Technol. 40, 166-170.
- Kim IC. 2008. Antioxidative properties and whitening effects of the *Polygoni multiflori* radix, *Polygonati rhizoma* and ephedrae herba. J Korean Oil Chem Soc. 24, 533-538.
- Kim JH, Lee SC, Ju YC. 2007. Effect of far-infrared irradiation on the antioxidant activity of extracts from *Phellinus igniarius* and *Ganoderma lucidum*. Korean J Food Sci Technol. 39, 386-389.
- Kim OK. 2008. Antidiabetic effect of Ha-Su-O (*polygoni radix*). J Korean Oil Chemists Soc. 25, 347-354.
- Kim SH, Kang JS, Lee SJ, Chung YJ. 2008. Antidiabetic effect of Korean red ginseng by puffing process in streptozotocin-induced diabetic rats. J Korean Soc Food Sci Nutr, 37, 701-707
- Kim YS, Kim JS, Choi SU, Kim JS, Lee HS, Roh SH, Jeong YC, Kim YK, Ryu SY. 2005. Isolation of a new saponin and cytotoxic effect of saponins from the root of *Platycodon grandiflorum* on human tumor cell lines. Planta Med, 71, 566-568
- Kim YS, Lim YH, Wang SG, Park SJ, Park CR. 1999. The physicochemical properties and antioxidant effects of Samul Chol-Pyon. J Korean Soc Food Sci Nutr. 28, 990-996.
- Koleva II, van Beek TA, Linssen JP, de Groot A, Evstatieva LN. 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. PhytoChem Anal. 13, 8-17.
- Korean Food Standard Codex KFDA, 10. 2016. General test methods, <http://fse.foodnara.go.kr/residue/RS/jsp/menu>. Korea Food Drug Administration, Seoul, Korea
- Ku SK, Choi HY. 2009. Antioxidant activity and quality characteristics of red ginseng sweet jelly (*Yanggaeng*). Korean J Food Cookery Sci. 25, 219-226.
- Kwon OJ, Lee HY, Kim TH, Kim SG. 2014. Antioxidant and pancreatic lipase inhibitory activities of *Anemarrhena asphodeloides*. Korean J Food Preserv, 21, 421-426
- Lee GD, Joo GJ, Kwon JH. 2000. Optimization for roast flavour formation of *Platycodon grandiflorum* tea. J Korean Soc Food Sci Nutr, 29, 752-757
- Lee GS, Park GS. 2011. Quality characteristics of *Jeungpyun* prepared with different ratios of *Polygonum multiflorum* Thunb powder. Korean J Food Cookery Sci. 27, 35-46.
- Lee H, Kang R, Kim YS, Chung SI, Yoon Y. 2010. Platycodin D inhibits adipogenesis of 3T3-L1 cells by modulating Kruppel-like factor 2 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. Phytother Res, 24, S161-S167

- Lee HJ. 2009. General experience and antioxidant activity of dioscorea rhizoma and Polygonum multiflorum Thunb in study. Daegu Hanny Univers. 10-19.
- Lee HY, Shin YM, Hwang CE, Lee BW, Kim HT, Ko JM, Baek IY, An MJ, Choi JS, Seo WT, Cho KM. 2014. Production of soybean meat using korean whole soybean and it' s quality characteristics and antioxidant activity. J Agric Life Sci, 48, 139-156
- Lee JH, Hwang CE, Son KS, Cho KM. 2019. Comparisons of nutritional constituents in soybeans during solid state fermentation times and screening for their glucosidase enzymes and antioxidant properties. Food Chem. 272, 362-371.
- Lee JH, Seo WT, Cho KM. 2011. Determination of phytochemical contents and biological activity from the fruits of *Elaeagnus multiflora*. J Food Sci Nutr. 16, 29-36.
- Lee JY, Kim BK, Park HJ. 2013. Quality characteristics and antioxidant activities of fermented deodeok tea with *Pleurotus eryngii* mycelium. J East Asian Soc Dietary Life. 23, 637-644.
- Lee KJ, You HJ, Park SJ, Kim YS, Chung YC, Jeong TC, Jeong HG. 2001. Hepatoprotective effects of *Platycodon grandiflorum* on acetaminophen induced liver damage in mice. Cancer Lett, 174, 73-81
- Lee KS, Choi KJ, Kim MW, Yang CB. 1990. Effects of amino acids and sugar on the maillard browning reactions during extraction and concentrations of red ginseng. J Ginseng Sci. 14, 117-121.
- Lee KS, Choi KJ, Ko SR, Jang JG, Yang CB. 1988. Maillard browning reaction and antioxidant activity of red ginseng stored for long periods. Korean J Ginseng Sci. 12, 121-127.
- Lee SH, Kang KM, Park HJ, Baek LM. 2009. Physiological characteristics of medicinal plant extracts for use as functional material in seasoning sauce for pork meat. Korean J Food Sci Technol. 41, 100-105.
- Lee SH, Song EM, Jang GY, Li M, Kim MY, Park HJ, Kang TS, Jeong HS. 2013. Physicochemical characteristics and antioxidant Activities of *Doragi* (*Platycodon grandiflorum*) at different aging temperatures and for various durations. J Korean Soc Food Sci Nutr, 42, 1405-1411
- Lee SJ, Shin SR, Yoon KY. 2013. Physicochemical properties of black *Doraji* (*Platycodon grandiflorum*). Korean J Food Sci Technol, 45, 422-427
- Lee ST, Kim MB, Kim DK, Ryu JS, Lee HJ, Hae JS. 1998. Production of curd yogurt from the roots of *Platycodon grandiflorum* (Jacq) A. DC. Korean J Medicinal Crop Sci, 6, 265-270
- Lee SV, Choi KH, Choi YW, Hong JW, Baek JU, Choi BT, Shin HK. 2014. Hexane extracts of *Polygonum multiflorum* improve tissue and functional outcome following focal cerebral ischemia in mice. Mol Med Rep. 9, 1415-1421.
- Lee SY, Kim JH, Park JM, Lee IC, Lee JY. 2014. Antioxidant activity and inhibition activity against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase of *Smilax China* L. Korean J Food Preserv. 21, 254-263.

- Lee YA, Kim HY, Cho EJ. 2005. Comparison of methanol extracts from vegetables on antioxidant effect under *in vitro* and cell system. J Korean Soc Food Sci Nutr. 34, 1151-1156.
- Li RW, David LG, Myers SP, Leach DN. 2003. Anti-inflammatory activity of Chinese medicinal vine plants. J Ethnopharmacol. 85, 61-67.
- Liu QL, Xiao JH, Ma R, Ban Y, Wang JL. 2007. Effect of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-beta-D-glucoside on lipoprotein oxidation and proliferation of coronary arterial smooth cells. J Asian Nat Prod Res. 9, 689-697.
- Lv LS, Gu XH, Tang J, Ho CT, Tang J. 2006. Stilbene glycosides from the roots of *Polygoni multiflori* Thunb and their *in vitro* antioxidant activities. J Food Lipids. 13, 131-144.
- Lv LS, Gu XH, Tang J, Ho CT. 2007. Antioxidant activity of stilbene glycoside from *Polygoni multiflori* Thunb *in vivo*. Food Chem. 104, 1678-1681.
- Miliauskas G, Venskutonis PR, Van Beek TA. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food Chem. 85, 231-237.
- Na MK, Park JY, An RB, Lee SM, Kim YH, Lee JP, Seong RS, Lee KS, Bae KH. 2000. Quality evaluation of *Polygonum multiflorum* Radix. Kor J Pharmacogn. 31, 335-339.
- Oh JS, Hong JH, Park TY, Kim KJ, Jin SW, Ban SE, Koh YW, Jeong SW, Im SB, Seo KS. 2016. Chemical compositions of fermented *Polygonum multiflorum* Thunberg. root by *Lentinula deodes* (Berk.) Pegler mycelials cultivation. J Mushr. 14, 184-190.
- Oh JS, Hong JH, Park TY, Yun KW, Kang KY, Jin SW, Kim KJ, Ban SE, Im SB, Koh YW, Seo KS. 2018. Chemical constituents in *Polygonum multiflorum* Thunberg root based on various dry methods. Korean J Plant Res. 31, 283-293.
- Park HJ, Zhang N, Park DK. 2011. Topical application of *Polygonum multiflorum* extract induces hair growth of resting hair follicles through upregulating shh and  $\beta$ -catenin expression in C57BL/6 mice. J Ethnopharmacol. 135, 369-375.
- Park JH, Baek MR, Lee BH, Yon GH, Ryu SY, Kim YS, Park SU, Hong KS. 2009.  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of compounds from roots extract of *Pueraria thunbergiana*. Korean J Medicinal Crop Sci, 17, 357-362
- Park JH, Lee SH, Kim HY, Jang GY, Hwang IG, Woo KS, Kwon OS, Lee JS, Jeong HS. 2012. Changes in chemical components and antioxidant activity of dried *jujube* with different aging temperatures and durations. J Korean Soc Food Sci Nutr, 41, 591-597
- Park YJ, Nam JY, Yoon DE, Kwon OC, Kim HI, Yoo YB, Kong WS, Lee CS. 2013. Comparison of anti-inflammatory, antioxidant and anti-allergic effects of Ganodermaspecies mycelial extracts. J Mushroom Sci Prod, 11, 111-115
- Ryu KC, Chung HW, Kim KT, Kwon JH. 1997. Optimization of roasting conditions for high-quality *Polygonatum odoratum* tea (in Korean). Korean J Food Sci Technol. 29, 776-783.
- Sahin H, Topuz A, Pischetsrieder M, Ozdemir F. 2009. Effect of roasting process on phenolic, antioxidant, and browning properties of carob powder. Eur Food Res Technol, 230, 155-161

- Seo H, Seo GY, Ko SZ, Park YH. 2011. Inhibitory effects of ethanol extracts from *Polygoni multiflori radix* and *Cynanchi wilfordii radix* on melanogenesis in melanoma cells. J Korean Soc Food Sci Nutr. 40, 1086-1091.
- Seo JK, Chung YC, Chun SS, Lee YY, Lee SJ, Shon MY, Sung NJ. 2004. Effect of physiologically active compounds isolated from *Platycodon grandiflorum* on streptozotocin induced diabetic rats. J Korean Soc Food Sci Nutr, 33, 981-986
- Song DS, Woo KS, Seong NS, Kim KY, Jeong HS, Lee HB. 2007. CHTanges in quality of *Rehmanniae radix preparata* with heating conditions. J Korean Soc Food Sci Nutr, 36, 773-778
- Um MY, Choi WH, Aan JY, Kim SR, Ha TY. 2006. Protective effect of *Polygonum multiflorum* Thunb on amyloid  $\beta$ -peptide 25-35 induced cognitive deficits in mice. J Ethnopharmacol. 104, 144-148.
- Van Boekel MA (2006) Formation of flavour compounds in the maillard reaction. Biotechnol Adv, 24, 230-233
- Wang W, Cao CY, Wang DQ, Zhao DZ. 2006. Effect of prepared *Polygonum multiflorum* on striatum extracellular acetylcholine and choline in rat of intracerebral perfusion with sodium azide. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 31, 751-753.
- Wang X, Zhao L, Han T, Chen S, Wang J. 2008. Protective effects of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-beta-D-glucoside, an active component of *Polygoni multiflori* Thunb, on experimental colitis in mice. Eur J Pharmacol. 578, 339-349.
- Woo KS, Jang KI, Kim KY, Lee HB, Jeong HS. 2006. Antioxidative activity of heat treated licorice (*Glycyrrhiza uralensis Fisch*) extracts. Korean J Food Sci Technol, 38, 355-360
- Xiao PG, Xing ST, Wang LW. 1993. Immunological aspects of Chinese medicinal plant as antiageing drugs. J Ethnopharmacol. 38, 167-175.
- Yang HJ, Weon JB, Ma JY, Ma CJ. 2011. The study on compounds of the fermented *Sipjundaebotang* and its neuroprotective activity. YakHTak Hoeji, 55, 121-126
- Yang MC, Jeong SW, Ma JY. 2011. Analysis of constituents in *Sipjundaebotangs* fermented by lactic acid bacteria. Korean J Microbiol Biotechnol, 39, 350-356.
- Yang SJ, Woo KS, Yoo JS, Kang TS, Noh YH, Lee JS, Jeong HS. 2006. Change of Korean ginseng components with high temperature and pressure treatment. Korean J Food Sci Technol, 38, 521-525
- Yang SJ, Woo KS, Yoo JS, Kang TS, Noh YH, Lee JS, Jeong HS. 2006. Change of korean ginseng components with high temperature and pressure treatment. Korean J Food Sci Technol. 38, 521-525.
- Yim TK, Wu WK, Mak DH, Ko MW. 1998. Myocardial protective effect of an anthraquinone-containing extract of *Polygonum multiflorum ex vivo*. Planta Med. 64, 607-611.
- Yu AR, Park HY, Choi IW, Park YK, Hong HD, Choi HD. 2012. Immune enhancing effect of



- medicinal herb extracts on a RAW 264.7 macrophage cell line. J Korean Soc Food Sci Nutr, 41, 1521-1527
- Zhang H, Jeong BS, Ma TH. 1999. Antimutagenic property of an herbal medicine, *Polygonum multiflorum* Thunb detected by the Tradescantia micronucleus assay. J Environ Pathol Toxicol Oncol. 18, 127-130.
- Zhang YZ, Shen JF, Xu JY, Xiao JH, Wang JL. 2007. Inhibitory effects of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D-glucoside on experimental inflammation and cyclooxygenase 2 activity. J Asian Nat Prod Res. 9, 355-363.
- 건강기능식품 국내 시장 규모 동향 분석, 2017, 한국식품안전관리인증원.
- 건강기능식품 기능성 원료 인정 현황, 2016, 식품의약품안전처.
- 건강기능식품기능성 평가 가이드, 2015.12, '간 건강에 도움을 줄 수 있음' 편, 식품의약품안전평가원.
- 경향신문, "건강기능식품 트렌드, '종합형'에서 '맞춤형'으로", 2018.
- 기획뉴스, 2014.02. 빅데이터 농업시대가 열린다., The Science Times.
- 농림축산식품부, 항노화 약초산업 강화를 위한 산양삼 지역 특화작목 기획연구, 2016.
- 미래를 향한 또 한 번의 농업혁명, '빅데이터' 2014.07, BigDataTransfer Insights.
- 박로운, 김현, 송미장 (2015). 농생명산업의 빅데이터 실용사례에 대한 분석과 활용 방안. 한약정보연구회지 3(3): 29-42.
- 빅데이터결과 보고서, 2015, 과학기술정보통신부.
- 서울시립대학교, "건기식 시장 5% 늘어난 1조7900억", 서울대학교식품음료신문, 2014.
- 손진 등, 2016.07, 제4차 산업혁명과 농업, 농림수산식품기술기획평가원.
- 식품의약품안전처, 2015~2017. 통계자료.
- 식품저널 인터넷식품신문 foodnews, "건기식시장 17% 성장 3조8천억...면역 기능성 원료 주목", 2018.
- 정보화통계집, 2017, 과학기술정보통신.
- 최국현 등, 2017.07, 4차산업혁명시대 지능정보기술동향과 농업 R&D 추진방향, 농림식품기술기획평가원.
- 한국농수산물유통공사, 2016가공식품 세분시장 현황(인삼/인삼제품류 시장), 농림축산식품부, 2016.
- 한국농수산물유통공사, 가공식품 마켓리포트(건강기능식품편), 농림축산식품부, 2017.
- 환경부, 환경부 홈페이지(www.me.go.kr) 용어사전, 2018A국토환경정보센터, "미세먼지가 인체에 미치는 영향", 국토환경지식정보(www.neins.go.kr), 2018.

[별첨 1]

## 연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 경남 한방 향노화산업 전략약초 이용 스타상품 개발				
	(영문) Development of star-commodity using the strategy herbs of Gyeongnam herbal anti-aging industry				
주관연구기관	주식회사 자연애제약		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 기업부설연구소	
참 여 기 업	(주)자연애제약, (주)아이피온			(성명) 강 민 철	
총연구개발비 (1,800,000천원)	계	1,800,000	총 연 구 기 간	2016.07.07 ~ 2018.12.31. (30개월)	
	정부출연 연구개발비	450,000	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	20
	기업부담금	180,000		내부인원	4
	연구기관부담금	0		외부인원	16

### ○ 연구개발 목표 및 성과

#### (1) 최종목표 :

- 활성도라지를 이용한 경남 향노화산업 대표 스타상품 개발
- 국내 토종약초의 글로벌 식·의약 소재 개발

#### (2) 정성적 목표 :

- 식품공학 기술 이용 수출전략 상품 십전대보환 개발
- 발효공학 기술 이용 일반가공 상품 발효도라지차 개발
- 활성도라지 추출물 이용 대사질환 개선 식품 개발
- 활성도라지 추출물/발효물 이용 간 기능/지방간 개선 음료 개발

#### (3) 연구성과 :

- 사업화 지표 : 특허출원 5건과 등록 2건, 기술실시 2건, 기술료 194.12백만원, 제품화 4건, 고용창출 1건, 매출액 194.12백만원
- 연구기반 지표 : KSCI급 논문 1편, 학술대회 발표 6건, 교육지도 4건, 인력양성 4명, 홍보/전시 5건, 타 연구 활용 2건

### ○ 연구내용 및 결과

#### (1) 주관기관 : 경남 한방 향노화산업 전략약초 이용 스타상품 개발

- 숙성 혼합 약재 재료 이용 십전대보환 (시)제품화
  - 도라지와 기타 9가지 약재의 성분분석 및 생리활성 확인
  - 고온숙성법 제조 공정 확립 :
- 활성도라지로부터 최적 추출조건 확립
  - 주정농도별 및 온도별 추출조건 확립 : triterpenoids/phenolic acids/flavonols 화합물 분석
  - 라디칼 소거활성과 소화효소 저해활성 확인
- 장백도라지 품종의 숙성(후)도라지 제조 및 특성
  - 영양성분 : 이화학적 특성/5대 일반성분/지방산/유리아미노산 분석
  - 특수성분 : triterpenoids/phenolic acids/flavonols 분석
- 활성(숙성)도라지 등을 고온숙성법을 이용하여 분말원료 제조
  - 영양성분 : 이화학적 특성/9대 영양소/지방산/유리아미노산 분석
  - 위해성분 : 미생물/대장균, 중금속(카드뮴/비소/납), 타르색소
  - 특수성분 : triterpenoids/phenolic acids/flavonols 분석
  - 라디칼 소거활성과 소화효소 저해활성 확인

- 활성(숙성)도라지 등을 이용하여 액상원료 제조
  - 영양성분 : 이화학적 특성/9대 영양소/지방산/유리아미노산 분석
  - 위해성분 : 미생물/대장균, 중금속(카드뮴/비소/납), 타르색소
  - 특수성분 : triterpenoids/phenolic acids/flavonols 분석
  - 라디칼 소거활성과 소화효소 저해활성 확인
- 스틱 액상 제품인 ‘숙성도라지 플러스업’의 상품기획 및 제품 제조
  - 영양성분 : 이화학적 특성/9대 영양소/지방산/유리아미노산 분석
  - 위해성분 : 미생물/대장균, 중금속(카드뮴/비소/납), 타르색소
  - 특수성분 : triterpenoids/phenolic acids/flavonols 분석
  - 라디칼 소거활성과 소화효소 저해활성 확인

**(2) 1위탁기관 : 활성도라지의 발효공정 최적화 및 표준화**

- 도라지 발효를 위한 유산균 3종과 효모균 5종 확보
- 도라지 triterpenoid 계열 화합물 표준화
- 볶음 처리조건과 발효도라지 제조
  - 영양성분 : 5대 일반성분/지방산/유리아미노산 분석
  - 특수성분 : triterpenoids/phenolic acids/flavonols 분석
  - 라디칼 소거활성과 소화효소 저해활성 검정
- 증자, 유산발효, 유산발효-고온숙성, 고온숙성을 통한 활성도라지 제조
  - 영양성분 : 이화학적 특성/5대 일반성분/지방산/유리아미노산 분석
  - 특수성분 : triterpenoids/phenolic acids/flavonols 분석
  - 라디칼 소거활성과 소화효소 저해활성 확인
- 효모균 5종을 이용한 발효도라지 차 제조
  - 영양성분 : 이화학적 특성/5대 일반성분/지방산/유리아미노산 분석
  - 특수성분 : triterpenoids/phenolic acids/flavonols 분석
  - 라디칼 소거활성과 소화효소 저해활성 확인
- 활성도라지 제조 : 홍도라지, 흑도라지, 발효홍도라지, 발효흑도라지 제조
  - 영양성분 : 이화학적 특성/5대 일반성분/지방산/유리아미노산 분석
  - 특수성분 : triterpenoids/phenolic acids/flavonols 분석
  - 라디칼 소거활성과 소화효소 저해활성 확인
- 활성도라지와 활성산양삼, 카페인, 타우린 등을 혼합하여 에너지 음료 제조
  - 영양성분 : 이화학적 특성/유리아미노산 분석
  - 특수성분 : triterpenoids/phenolic acids/flavonols 분석
  - 라디칼 소거활성과 소화효소 저해활성 확인
- 경남 한방 전락약초인 하수오의 숙성·발효 하수오 제조 및 특성
  - 숙성·발효도라지 제조 기술을 적용하여 숙성·발효하수오 제조
  - 영양성분 : 이화학적 특성, 지방산, 유리아미노산, 무기질 분석
  - 생리활성물질 분석 및 항산화 확인

**(3) 2위탁기관 : 활성도라지 산업화를 위한 사업화 연계 방안 구축**

- 간 기능 개선 음료 등 관련된 시장조사 :
  - 도라지 재배 현황, 간 건강 관련 건강기능성식품 시장, 간 건강 관련 숙취해소 음료 시장, 간 건강 관련 주요 기업 보유 특허 조사 등
- 간 기능 및 면역 기능 등의 특허 동향 분석
  - 간 기능과 면역기능 중심 시장 동향 및 특허 동향 조사
- 사업화 가능 시장조사 및 분석
  - 간 기능 관련 건강기능식품 및 숙취해소 음료 시장 동향 조사 및 분석
- 사업화 가능 시장 선행특허 조사 및 분석
  - 간 기능 관련 건강기능식품 및 숙취해소 음료 국내 선행특허 조사 및 분석
- 인허가 전략 및 BM 수립

#### (4) 협동기관 : 활성도라지 소재의 안전성 및 효능 평가

- 간세포(HepG2 및 FL83B)과 대식세포주(Raw264.7)에서 세포독성 확인
  - 활성도라지는 원료도라지에 비해 세포독성이 낮음
- 활성도라지의 지방간 축적 억제 효능 분석
  - 간세포에서 지방간 축적 억제에는 별다른 효과가 미비
- 활성도라지의 염증성 간 손상 억제 효능 분석
  - 염증성 간 손상 동물모델에서 간 손상 억제 효능
- 십전대보환/활성도라지의 면역기능 개선 효능 분석
  - 대식세포 및 비장세포에서 면역세포 활성화 및 면역조절 인자 발현을 유발
- 활성도라지의 비알코올성 간 손상 모델에서 염증성 간 손상 억제 효능 분석
  - 염증성 간손상 동물모델에서 간손상 개선 효과 및 염증 억제 효과
- 활성도라지의 비알코올성 간 손상 모델에서 염증 억제 효능 분석
  - 대식세포에서 LPS에 의해 증가된 염증 단백질 및 유전자들의 발현을 억제
- 활성도라지의 비알코올성 간 손상 모델에서 항염증 효능 기전 분석
  - p38 및 ERK 신호경로를 통해 염증 단백질들의 발현을 억제

### ○ 연구성과 활용실적 및 계획

#### (1) 활용실적

- 제품화 4건 : 십전대보환, 경옥고환, 발효침향환, 숙성도라지 플러스업
- 홍보·전시 5건 : 언론 홍보 2건, 식품박람회/수출상담회 등 3건
- 기타 : 인력양성 4명, 타 연구 활용 2건 등

#### (2) 활용계획

- 기술실시 2건 진행 및 1건 진행 예정 :
  - ‘고온숙성법 이용 십전대보환 제조 기술’ 기반으로 제품화하여 매출액 발생
  - 상기 기술을 적용하여 경옥고환, 발효침향환 제조하고 제품화하여 매출액 발생
  - 활성(숙성)도라지를 이용한 스틱 액상 제품의 홍보/마케팅을 통한 국내외 판로 개척에 활용
- 활성도라지 혹은 발효적하수오 등의 인체적용 시험 등의 진행이 필요
- 제4차산업 대응 항노화산업 육성 : 산청군 혹은 경남 항노화산업화를 가속화시키는 시너지 효과
- 산청군 1·2·3차 산업의 동반상승에 따른 농촌융복합산업 육성
- 활성도라지 기반 비즈니스 모델 활용한 4차산업 혁명 대비 농식품의 대표 메디푸드 제품화

#### (3) 기대성과

- 활성도라지 이용 경남 대표상품 및 수출전략 상품 개발
- 활성도라지 활용 기능성음료 개발을 통한 신규 기능성 음료 시장 개척
- 참여기업 기술이전을 통한 산업화
- 활성도라지 추출물 혹은 발효물의 임상효능 검증 필요
- 국내토착 생물자원의 확보 효과
- 식품관련 기술 진보 효과
- 항노화 타겟 질병 개선에 대한 과학적 근거 마련
- 우리 토종 약초의 고부가가치 창출 효과
- 1·2·3차 산업의 동반상승에 따른 6차산업 육성 효과
- 산청군 혹은 경상남도 항노화산업화를 가속화시키는 시너지 효과
- 약초산업의 글로벌 리더로 성장 효과

[별첨 2]

## 자 체 평 가 의 건 서

			코드번호	D-15	
과제번호			11600903		
사업구분	자유공모과제				
연구분야	기능성식품 및 소재		과제구분	단위	
사업명	고부가가치식품개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	경남 한방 향노화산업 전략약초 이용 스타상품 개발		과제유형	(기초,응용,개발)	
연구기관	주식회사 자연애제약		연구책임자	강민철	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2016.07.07.~ 2016.12.31	80,000	40,000	120,000
	2차년도	2017.01.01.~ 2017.12.31	185,000	70,000	255,000
	3차년도	2018.01.01.~ 2018.12.31	185,000	70,000	255,000
	4차년도				
	5차년도				
	계	2016.07.07.~ 2018.12.31	450,000	180,000	630,000
참여기업	(주)자연애제약, (주)아이피온				
상대국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2019. 02.08.

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)자연애제약	이 사	강 민 철

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확 약	
-----	--

## I. 연구개발실적

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구는 결과 중 ‘고온숙성 기술을 적용한 도라지 함유 십전대보환’ 제조 기술은 생리활성뿐만 아니라 안전성을 증가시킬 수 있는 기술로서 이를 통하여 제품 개발이 완료되었고, 이를 통하여 경옥고환/발효침향환 등의 제품 제조에 적용하였고 現在에는 본 특허기술을 바탕으로 인지능력 개선 제품과 숙취해소 제품 개발을 타 연구사업 진행 중에 있음. 으로 본 기업에 파급효과가 아주 우수한 연구개발 결과임. 또한, 활성증진 도라지 제조기술은 원료 대비 향상된 기능성 소재 제조 기술로서 도라지 원료보다 활성도라지(숙성도라지 혹은 발효숙성도라지) 독성이 낮게 나타나, 향후 건강기능식품 개발 혹은 메디푸드 개발 시 아주 우수한 소재로 판단이 됨. 본 연구결과들은 기존의 실험을 바탕으로 다양한 접근법을 통한 새로운 기술을 도출한데 있어 그 창의성이 매우 높은 것으로 판단됨

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구결과의 파급효과로는 상기에 기술한 것처럼 고온숙성 기술을 적용한 도라지 함유 십전대보환’ 제조 기술은 생리활성과 안전성이 증진된 기술로서 이를 통하여 십전대보환뿐만 아니라 경옥고환/발효침향환 등의 제품 제조에 적용하였고 現在에는 본 특허기술을 바탕으로 인지능력 개선 제품과 숙취해소 제품 개발에 대해서 타 연구 사업 진행 중으로 본 기업에 파급효과가 큰 연구 결과로서 올해 농식품부에 신기술로 신증할 예정임. 본 연구결과의 효능평가 시스템을 활용한 식품섭취에 의한 면역기능, 간기능 및 염증질환 개선에 대한 종합적인 연구가 이루어질 것으로 기대되며 특히, 본 연구를 통해 개발된 활성도라지(숙성도라지 혹은 발효숙성도라지)는 간 기능과 염증 질환 개선 효과가 있을 뿐만 아니라 도라지 원료보다 독성이 낮아 건강기능식품 개발 혹은 메디푸드 개발 시 아주 우수한 소재로 활용이 가능함. 도라지의 소비촉진 및 농가 소득증대에 기여(1차 산업), 약초 생산업, 발효산업 및 약초 가공사업 등의 기능성 식품산업, 포장재 제조업 등의 2차 산업으로 파급, 한방 약초를 이용한 요식산업, 한방 약초 축제 등 한방약초축제(3차 산업)과 연계된 부가가치 창출, 농가 및 가공업체의 간접적인 광고효과와 이익 창출 효과(3.5차 산업) 등 산업 전반에 걸친 동반 상승 및 파급 효과가 기대됨. 한편, 한류로 인한 한방 화장품의 성공으로 한방에 대한 긍정적 이미지 형성, 신비한 고장이라는 지역의 스토리텔링 관광 상품 개발과 약초 한방상품에 대한 브랜드 선점, 국내 성공을 기반으로 해외로 진출하는 글로벌 브랜드 마케팅에 기여

### 3. 연구개발결과에 대한 활용 가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구결과로 파생된 결과 중 일부 제품화를 통하여 매출이 발생하였음. 즉, 고온숙성 기술을 적용한 도라지 함유 십전대보환 제품, 경옥고환, 발효침향환 등에 대해서 기술실시를 진행하여 제품화를 통한 국내(한의원 등)에 판매하고 있어 그 활용성이 아주 우수한 것으로 판단됨. 또한, 활성 증진 도라지 제조기술은 다양한 뿌리약용작물(산양삼 등)의 활성 증진을 통한 향후 기능성 소재 개발에 활용할 수 있을 뿐만 아니라, 도라지 원료보다 독성이 낮아 향후 건강기능식품 소재 혹은 4차 산업혁명 대비 메디 푸드 개발에 활용성이 높을 것으로 판단됨. 도라지 가공 소재(활성도라지)의 영양성분 및 기능성 성분의 표준화 결과는 실험에 사용되는 활성도라지를 이용하여 제품개발 과정에서 기초자료로써 이용이 가능한 결과를 제시, 그리고 국내외 간 기능(숙취해소 포함)과 면역 기능의 시장과 특허 동향 분석을 기초로 도출한 도라지의 사업화 전략은 향후 도라지 제품의 사업화에 활용 가능함. 효능평가(면역, 간, 염증 등)와 기기분석 기술을 이용한 기능성 대사체 분석 기술은 향후 건강기능식품 원료 혹은 메디 푸드 소재 개발 시 유용하게 사용할 수 있음.

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구는 경남 한방 향노화 산업 전략약초(도라지 혹은 적하수오) 이용 고부가가치 제품 개발을 목표로 3년간 진행하였음, 본 연구기관 내 연구 성과로 특허출원 5건과 등록 2건 (1건 진행 중), KSCI급 논문 2편, 학술대회 발표 6건, 교육지도 4건, 인력양성 4명(박사 1명, 학사 3명), 홍보전시 5건, 보고서 2건 등의 다양한 성과를 창출하였고 특히, 고온숙성 기술을 적용한 도라지 함유 십전대보환 제품, 경옥고환, 발효침향환 등에 대해서 기술실시를 진행하여 제품화를 통하여 국내에 판매하여 연구 기간 동안인 30개월 동안 약 192.4백만원의 매출액을 발생시켰음. 끝으로 경남 혹은 산청군 미래먹거리 산업으로 향노화산업을 전략산업으로 지정하여 육성하고 있는 중이라 산청군 한방약초산업의 제2의 부흥을 위한 초석을 마련할 수 있었음. 現在 부족한 SCI급 논문은 작성하고 있어 종료 2차년도 내에는 3편 이상 논문이 게재될 것으로 판단됨.

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

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구 수행 중 심포지엄, 워크숍 및 교육을 통해 경남 향노화산업 연계 6산업에 대한 기본 틀을 제공하였고 고온숙성 기술을 적용한 도라지 함유 십전대보환' 제조 기술로 제품화하여 매출액을 약 192.4백만원 발생시켰음.

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
도라지 함유 제품화 기술 개발	30	100	고온숙성 기술을 이용한 도라지 함유 제품화 3종 (십전대보환, 경옥고환, 발효침향환) 출시 및 매출액 약 192.4백만원 발생
활성도라지 활용 기능성 음료 제품화 기술 개발	20	100	활성도라지를 이용 기능성 음료 레시피 확립을 통한 제품 출시 예정(숙성도라지 플러스업) 및 활성도라지 함유 에너지 음료 시제품 개발 완료
활성도라지 소재와 제품의 영양·특수성분 표준화	15	100	활성도라지인 숙성도라지와 발효숙성도라지의 소재와 이를 이용한 제품의 영양성분(9대 영양성분, 지방산, 유리아미노산 등) 및 특수성분(triterpenoides, phenolic acids 및 flavonols) 분석 완료
시장과 특허 동향 분석을 통한 상용화 전략 수립	15	100	간 기능(숙취해소 포함)과 면역 기능의 건강기능식품 시장 동향과 특허 동향 분석을 통한 도라지 베이스 상용화 전략 도출 완료
활성도라지의 간기능/면역기능/염증 개선 효과	20	100	활성도라지의 경우 원료보다 낮은 독성을 나타내는 안전성 평가와 간 기능, 면역 기능, 비만 및 염증 개선 효능평가 완료
<b>합 계</b>	<b>100점</b>		

## III. 종합의견

### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구에서는 경남 한방 향노화산업 전략약초인 도라지를 이용한 고부가가치 식품 개발을 위한 활성이 증진된 도라지 제조기술과 이를 통한 제품 제조공정과 레시피 확립을 통하여 특허출원과 사업 중 고온숙성 기술 기반 십전대보환 상품화, 활성도라지 이용 스틱 액상 제품화를 진행하였으며, 활성도라지의 안전성과 전임상 효능평가를 완료하여 향후 기능성 원료 개발에 대한 기초자료를 확보하였음. 간 기능(숙취해소 포함)과 면역 기능의 건강기능식품 시장 동향과 특허 동향 분석을 통한 도라지 베이스 상용화 전략 도출하여 기업 향후 사업화를 위한 전략에 활용할 수 있을 것으로 판단됨. 한편 정량적 성과목표 중 100% 달성하지 못한 특허등록은 종료 2차년도 내에는 모두 달성할 수 있을 것으로 판단되며 특히, 現在 부족한 SCI급 논문은 작성하고 있어 종료 2차년도 내에는 3편 이상 논문이 게재될 것으로 판단됨. 최종적으로 현재 십전대보환 등의 매출액은 꾸준히 발생하고 있고 숙성도라지 플러스업 신제품 출시로 매출액이 발생될 것으로 사료됨.



## 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

본 연구는 경남 한방 향노화 산업 전략약초(도라지) 이용 고부가가치 제품 개발 목표에 초점을 맞추어 평가 시 고려해주시고, 연구성으로 본 연구기관 내 연구 성과로 특허출원 5건과 등록 2건 (1건 진행 중), KSCI급 논문 2편, 학술대회 발표 6건, 교육지도 4건, 인력양성 4명(박사 1명, 학사 3명), 홍보전시 5건, 보고서 2건 등의 다양한 성과를 창출하였고 특히, 고온숙성 기술을 적용한 도라지 함유 십전대보환 제품, 경옥고환, 발효침향환 등에 대해서 기술실시를 진행하여 제품화를 통하여 국내에 판매하여 연구 기간 동안인 30개월 동안 약 192.4백만원의 매출액을 발행시켰음. 현재 미흡한 성과인 특허등록은 종료 2차년도 내에는 모두 달성할 수 있을 것으로 판단되며 특히, 現在 부족한 SCI급 논문은 작성하고 있어 종료 2차년도 내에는 3편 이상 논문이 게재될 것으로 판단됨. 경남 혹은 산청군 미래먹거리 산업으로 향노화산업을 전략산업으로 지정하여 육성하고 있는 중이라 본 주관기업은 이에 맞게 제조설비 확충 진행 중이며, 수출을 위하여 지속적으로 수출상담회 참가뿐만 아니라 베트남 지사 설립을 계획하고 있어 국내 매출뿐만 아니라 수출실적 역시 종료 3년 이내 발생할 것으로 판단되어 사업화에 초점을 맞추어 평가를 고려해주시길 바랍.

## 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 연구의 결과에서 ① 고온숙성 기술을 이용한 도라지 함유 제품화 3종 (십전대보환, 경옥고환, 발효침향환) 출시 및 매출액 약 192.4백만원 발생하였고 국내 판매뿐만 아니라 수출방향을 지속적으로 모색, ② 활성도라지를 이용 기능성 음료 레시피 확립을 통한 제품 출시 예정(숙성도라지 플러스업)으로 바로 사업화에 활용, ③ 활성도라지인 숙성도라지와 발효숙성도라지의 소재와 이를 이용한 제;품의 영양성분(9대 영양성분, 지방산, 유리아미노산 등) 및 특수성분(triterpenoids, phenolic acids 및 flavonols) 분석 완료하여 향후 건기식 상품화 혹은 메디푸드 상품화뿐만 아니라 타 뿌리약용작물에 적용하여 다양한 기능성 소재 개발 가능, ④ 활성도라지 기반 간 기능, 면역 기능 및 염증 개선 기능성 식품 상품화와 향후 건기식과 메디푸드 기능성 소재 개발에 활용 가능 및 ⑤ 간 기능(숙취해소 포함)과 면역 기능의 건강기능식품 시장 동향과 특허 동향 분석을 통한 도라지 베이스 상용화 전략을 바탕으로 향후 건기식과 메디푸드 사업화 활용 가능함.

## IV. 보안성 검토

과제 기획부터 일반과제로 선정됨.

### 1. 연구책임자의 의견

제품화를 위한 제품공정의 경우 특허출원 혹은 등록이 완료되어 특별한 보완이 필요 없음.

### 2. 연구기관 자체의 검토 결과

연구책임자 의견과 동일함.

[별첨 3]

## 연구성과 활용계획서

### 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	기능성식품 및 소재
연구과제명	경남 한방 향노화산업 전략약초 이용 스타상품 개발			
주관연구기관	주식회사 자연애제약		주관연구책임자	강 민 철
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	450,000	180,000	0	630,000
연구개발기간	2016.07.07. ~ 2019.12.31. (30개월)			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 (기술실시) <input checked="" type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타 <input type="checkbox"/> 미활용 (사유: _____ )			

### 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 도라지 함유 제품화 기술 개발	① 고온숙성 기술에 대한 특허등록 완료 고온숙성 기술을 이용한 도라지 함유 제품화 3종 (십전대보환, 경옥고환, 발효침향환) 출시 및 매출액 약 192.4백만원 발생
② 활성도라지 활용 기능성 음료 제품화 기술 개발	② 활성도라지를 이용 기능성 음료 레시피 확립을 통한 제품 출시 예정(숙성도라지 플러스업) 및 활성도라지 함유 에너지 음료 시제품 개발 완료
③ 활성도라지 소재와 제품의 영양특수 성분 표준화	③ 활성도라지인 숙성도라지와 발효숙성도라지 소재와 이를 이용한 제품의 영양성분(지방산/유리아미노산 등) 및 특수성분(triterpenoides, phenolic acids 및 flavonols) 분석 완료
④ 시장과 특허 동향 분석을 통한 상용화 전략	④ 간 기능(숙취해소 포함)과 면역 기능의 건강기능 식품 시장 동향과 특허 동향 분석을 통한 도라지 베이스 상용화 전략 도출 완료
⑤ 활성도라지의 간기능/면역기능/염증 개선 효과	⑤ 활성도라지의 경우 원료보다 낮은 독성을 나타내는 안전성 평가와 간 기능, 면역 기능, 비만 및 염증 개선 효능평가 완료

### 3. 연구목표 대비 성과

성과목표	사업화 지표										연구기반 지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액 (백만원)	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술 발표			정채 활용	홍보 전시	
												SCI	비SCI						
최종목표	5	4	0	2	60	3	118.8		1		2	3	1	5	4	4		2	1
연구기간내 달성실적	5	2	1	2	194.12	4	194.12		1		0	0	2	6	4	4		5	2
달성율(%)	100	50	-	100	323	133	163		100		0	0	200	120	100	100		250	200

### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	도라지 함유 제품화 기술 개발
②	활성도라지 활용 기능성 음료 제품화 기술 개발
③	활성도라지 소재와 제품의 영양특수성분 표준화
④	시장과 특허 동향 분석을 통한 상용화 전략
⑤	활성도라지의 간기능/면역기능/염증 개선 효과

### 5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화흡수	외국기술 개선개발	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장으로 해결	정책 자료	기타
① 도라지 함유 제품화 기술 개발		V					V	V		
② 활성도라지 활용 기능성 음료 제품화 기술 개발		V				V				
③ 활성도라지 소재와 제품의 영양·특수성분 표준화		V				V	V			
④ 시장과 특허 동향 분석을 통한 상용화 전략								V		
⑤ 활성도라지의 간기능/면역기능/염증 개선 효과		V					V			V (건기식 등록시 활용)

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
① 도라지 함유 제품화 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>고온숙성기술을 이용한 도라지 함유 십전대보환 지적 재산권을 확보하였고 이를 기술실시(자가실시)하여 3종의 제품화를 통해 매출액 발생</li> <li>現在 베트남의 수출길을 모색하고 있어 향후 수출전략 상품으로 판매</li> </ul>
② 활성도라지 활용 기능성 음료 제품화 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>활성도라지를 이용 숙성도라지 플러스업의 상품기획과 제품을 출시 완료, 현재 국내 판매 준비 중</li> <li>활성 증진 도라지 제조 기술 (숙성 혹은 발효숙성)은 참여기업에 소유권 이전을 진행할 예정</li> </ul>
③ 활성도라지 소재와 제품의 영양 특수성분 표준화	<ul style="list-style-type: none"> <li>활성도라지인 숙성도라지와 발효숙성도라지 소재와 이를 이용한 제품의 영양성분(지방산/유리아미노산 등) 분석을 바탕으로 향후 다양한 제품화에 활용</li> <li>활성도라지인 숙성도라지와 발효숙성도라지 소재와 이를 이용한 제품의 특수성분(triterpenoides/phenolic acids /flavonols) 분석 데이터를 활용한 건기식 혹은 메디푸드 소재 혹은 제품 개발에 활용</li> </ul>
④ 시장과 특허 동향 분석을 통한 상용화 전략	<ul style="list-style-type: none"> <li>간 기능(숙취해소 포함)과 면역 기능의 건강기능식품 시장 동향과 특허 동향 분석을 통한 도라지 기반 사업화 BM을 활용한 숙성도라지 플러스업 상용화 전략 및 향후 건기식 혹은 메디푸드 소재 혹은 제품의 사업화에 적극 활용</li> </ul>
⑤ 활성도라지의 간기능/면역기능/염증 개선 효과	<ul style="list-style-type: none"> <li>활성도라지의 경우 원료보다 낮은 독성을 나타내는 안전성 평가와 간 기능, 면역 기능, 비만 및 염증 개선 효능평가</li> <li>환/스틱 액상 제품의 상품화와 향후 건기식 혹은 메디푸드 기능성 소재 및 제품 개발에 활용 가능</li> </ul>

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액 (백만원)	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비SCI						
최종목표	5	4		2	60	3	1677.6	375.3	2		2	3	1	5	4	4		2	1
연구기간내 달성실적	5	2	1	2	194.12	4	194.12		1		0	0	2	6	4	4		5	2
연구종료 후 성과창출 계획	1	2			20		1588.8	375.3	1		2	3	1			1			

8. 연구결과의 기술이전 조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 <sup>1)</sup>	증진된 기호성, 장기저장성 및 기능성을 갖는 도라지 함유 십전대보환 및 그 제조방법		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input checked="" type="checkbox"/> 기타( 자가 실시 )		
이전소요기간	2017.10월부터~	실용화예상시기 <sup>3)</sup>	한의원 납품용 제품출시 및 판매 중
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>			

핵심기술명 <sup>1)</sup>	프로토키테큐산, 에피카테킨 및 올레산이 강화되고 증진된 알파-글루코시다제 및 췌장 리파제 저해활성을 갖는 도라지 및 그 제조방법		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	20,000천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input checked="" type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타(                    )		
이전소요기간	6개월	실용화예상시기 <sup>3)</sup>	2019 중반기
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>	- 특허등록 필수 진행, 대량생산 시 문제점 발생에 대한 공동 모니터링 등		

## 평가의견에 대한 조치 및 개인정보 삭제 확인서

### □ 평가의견에 대한 조치

평가의견	조치내용	비고
○협동과제의 연구계획서에서의 동물실험 특히 2,3차년도가 보고서에는 잘 나타나지 않으므로 이의 연구가 더욱 보완 되어야 함. 데이터에 통계처리가 안되면 신뢰성이 적으므로 통계처리 수정이 필요함	○동물실험에 데이터 중 일부 통계처리를 하지 않은 것은 보완 검토를 통해 논문 투고 시 통계처리를 할 예정이며, 대부분은 유의성 검정하여 통계처리하여 톡드(*)와 샷(#)으로 표기하였음 (최종보고서, 페이지 242-267)	제1협동
○주관기관과 위탁, 협동 및 참여기업과의 목표달성을 위하여 활성도라지의 발효공정 최적화 및 표준화, 활성도라지 소재의 안전성 및 효능 평가, 활성도라지 산업화를 위한 사업화 연계 방안 구축 및 산업화 등의 주요 연구내용이 원활히 수행된 것으로 판단됨	○본 연구를 통해 심전대보환과 숙성도라지 농축스틱 제품을 상품화하였고 매출액을 발생시켰음 (최종보고서, 페이지 97, 299)	제1세부
○최초 다양한 소재를 중심으로 활성을 평가하고 추출 조건을 적절히 확립하였음. 당초 목표에 대한 충분한 성과를 달성하였으며 이를 제품화 및 기술사업화에 적용하였음.	○본 연구를 통해 도라지의 최적 추출 조건을 확립하고 심전대보환과 숙성도라지 농축스틱 제품을 상품화하였고 매출액을 발생시켰음 (최종보고서, 페이지 97, 299)	제1세부
○제품화하여 매출을 발생시킨 것은 성과가 있다고 판단함.	○본 연구를 통해 심전대보환과 숙성도라지 농축스틱 제품을 상품화하였고 매출액을 발생시켰음 (최종보고서, 페이지 97, 299)	제1세부
○향후 건강기능식품 개별인증 획득을 통한 고부가가치 가능 -원료 표준화 추가 확보, 인체적용시험을 통한 식약처 신청 과제 연계	○향후 원료 표준화 및 비임상시험 보완을 통해 식약처 개별인정 사업과 연계하여 인체적용시험을 통해 건기식 추진 예정	제1세부
○향후 개발제품의 품목제조보고서, 자가품질검사서, 영양성분 분석표 등의 서류의 보완이 요구됨	○품목제조보고서와 영양성분 분석 완료하여 수정 보완 (최종보고서, 페이지 97)	제1세부
○계획서상 제시한 목표들 달성하기 위해 성실히 기술개발을 진행하였음.	○해당사항 없음	
○미생물을 활용한 발효물을 기존 심전대보탕 원방속의 인삼을 대체할 수 있어 산업적 가치를 향상시킴. 단, 기존의 심전대보탕과의 차별성을 확보할 수 있는 결과물이 없는 것이 아쉬움.	○기존 인삼 함유 심전대보환과의 차별성을 특허기술에서 일부 제시하였음 (최종보고서, 페이지 36-42)	제1세부
○지역내 생산 도라지의 부가가치 제고를 위해 발효, 숙성을 통한 도라지의 활성성분을 분석하고 안전성 및 면역증진 효과 등 효능평가실적을 제시하여 지역재배 도라지의 이용성 증진에 도움이 될 것으로 판단되나 목표중 동물 및 전임상에 대한 보완 결과의 제시가 요구됨	○향후 원료 표준화 및 비임상시험 보완을 통해 식약처 개별인정 사업과 연계하여 인체적용시험을 통해 건기식 추진 예정	제1세부

평가의견	조치내용	비고
○ 도라지의 환제품과 이를 활용한 도라지 함유 십전대보환, 스틱제품 제조기술 확보	○본 연구를 통해 십전대보환과 숙성 도라지 농축스틱 제품을 상품화하였고 매출액을 발생시켰음 (최종보고서, 페이지 97, 299)	제1세부
○ 간기능 저하 모델에서 발효도라지의 효과 및 가감 십전대보환의 효능을 평가하고 면역학적 기능성을 평가하였음. 이는 기존의 기능성식품 등록 기준에 준해 사업화를 위한 학술적 기반을 제공하였음.	○향후 원료 표준화 및 비임상시험 보완을 통해 식약처 개별인정 사업과 연계하여 인체적용시험을 통해 건기식 추진 예정	제1세부
○ 개발된 기술 및 노하우는 향후 기술 이전뿐 아니라 타 산업체에서도 즉시 사업화 및 매출을 유도할 수 있음. 이에 기술 이전을 독려하고 매출과 고용을 창출 할 수 있도록 지도하여야 할 것임.	○향후 타 기업에게도 기술설명회를 통해 진행해보겠음	제1세부
○ 협동과제의 연구계획서에서의 동물실험 특히 2,3차년도를 구체적으로 작성하여 수정 보완 하여야 함. 데이터에 통계처리가 안 되면 신뢰성이 적으므로 통계처리 수정이 되어야함	○동물실험에 데이터 중 일부 통계처리를 하지 않은 것은 보완 검토를 통해 논문 두고 시 통계처리를 할 예정이며, 대부분은 유의성 검증하여 통계처리하였음 (최종보고서, 페이지 242-267)	제1협동
○ 개발제품의 품목제조보고서, 자가품질검사서, 영양성분분석표 등 추가 제시	○품목제조보고서와 영양성분 분석 완료하여 수정 보완 (최종보고서, 페이지 97)	제1세부
○ 특허 및 자체 시험을 넘어 공인 성적서 등을 추가로 확보함으로써 기술이전 등에 대한 역량을 강화시킬 것으로 판단됨.	○품목제조보고서와 영양성분 분석 완료하여 수정 보완 (최종보고서, 페이지 97)	제1세부

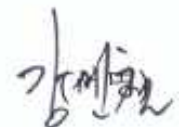
## □ 개인정보 삭제 확인

본인은 연구과제 최종보고서의 개인정보(주민등록번호 등)를 삭제하여 제출함을 확인합니다.

2019. 06. 14.

주관연구책임자

강민철



## 주 의

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