

제  
농축2017  
-303호

과제명 유용미생물 생물전환 산채 곡류 활용 소재를 이용한 고령친화 편의식 개발 최종보고서

2019

농림식품기술기획평가원

보안 과제( ), 일반 과제( v ) / 공개( v ), 비공개( ) 발간등록번호( 11-1543000-002977-01 )

## 고부가가치식품기술개발사업 제2차 연도 최종 보고서

### 유용미생물 생물전환 산채 곡류 활용 소재를 이용한 고령친화 편의식 개발 최종보고서

2019.12.13.

(별색바탕 : C50, M20, Y59, K0)

주관연구기관 / (주) 세준에프앤비

협동연구기관 / (주) 웰빙 엘에스

(재) 홍천메디칼허브 연구소

농림축산식품부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “유용미생물 생물전환 산채 곡류 활용 소재를 이용한 고령친화 편의식 개발”(개발기간 : 2017. 11. ~ 2019 . 10 .)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019 . 12 . 13 .

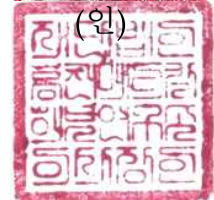
주관연구기관명 : (주) 세준에프앤비 (대표자) 박 승 용



협동연구기관명 : (주) 웰빙 엘에스 (대표자) 이 득 식



(재) 홍천메디칼 허브 연구소 (대표자) 허 필 홍



주관연구책임자 : 박 승 용

협동연구책임자 : 이 득 식

참여기관책임자 : 허 성 일

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	제 농축 2017-303호	해 당 단 계 연 구 기 간	2년	단 계 구 분	(해당단계)/ (총 단 계 )
연구 사업 명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발 사업			
연구 과제 명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	유용 미생물 생물전환 산채 곡류 활용 소재를 이용한 고령 친화 편의식 개발			
연구 책임자	박 승 용	해당단계 참여연구원 수	총: 8 명 내부: 8 명 외부: 0 명	해당단계 연구개발비	정부:160,000천원 민간: 54,000천원 계:214,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 9 명 내부: 9 명 외부: 0 명	총 연구개발비	정부:330,000천원 민간:111,000천원 계:441,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주) 세준에프앤비			참여기업명 (주) 웰빙 엘에스 (재) 흥천메디칼 허브연구소	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

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

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고 서 원문	연구시 설·장 비	기술요 약 정보	소프 트 웨어	화합 물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기 탁 번호	1	2									

국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

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

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)      보고서 면수



<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>유용미생물 생물 전환 산채 곡류 활용 소재를 이용한 고령친화 편의식 개발 - 부드러운 누룽지 개발 - 발효산물이 포함된 소스 개발</p>
<p>연구개발성과</p>	<p>1. 세준에프앤비  <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 선정된 발효소재인 미강과 곤드레를 함유한 소스 개발을 완료 하였으며 이를 통한 즉석 조리형 완제품 개발을 완료 하였음.</li> <li>○ 시제품에 대한 세포내 소화 흡수율 및 전분 분해율을 통하여 기존의 누룽지 제품보다 우수함을 확인 하였고, 한국식품 연구원을 통하여 관능 평가를 완료 하였음.</li> <li>○ 시제품에 대한 이화학적 분석을 완료 하였음.</li> </ul> </p> <p>2. 웰빙 엘에스  <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 면역 활성을 확인한 자체 보유 균주 3종을 선정 하였으며, 면역활성을 확인한 신규 미생물 2종을 선정 완료 하였음.</li> <li>○ 면역 활성을 확인한 5개 균주를 이용하여 5개 소재(미강, 대두배아, 곤드레, 곰취, 눈개승마)에 대한 각각의 Lab scale 발효 적합성 및 발효 조건설정을 완료 하였음.</li> <li>○ 선정된 발효소재인 미강과 곤드레에 대하여 건조 가공조건을 확립 하였 으며, 대량 생산 체제를 구축 하였음.</li> <li>○ 60세 이상의 노인을 대상으로 관능 평가를 실시하여 레시피를 확립 하였고 스파우트 파우치 형태의 시작품을 제작 하였음.</li> </ul> </p> <p>3. 흥천 메디칼 허브 연구소  <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 발효 산물을 이용하여 항산화효능 및 RAW264.7 대식세포를 이용하여 NO 생성을 통한 면역 증강 효능을 확인 하였으며, 장관면역 개선 기작 분석을 동물 실험를 통하여 확인하였음.</li> <li>○ 개발된 제품 3종에 대해 마우스 대식세포와 비장세포를 이용하여 in vivo 및 ex-vivo 시험을 통해 면역증강효능을 확인하였음.</li> <li>○ 각 발효 산물의 지표성분 선정을 완료 하였으며, 발표제품에 대해 지표/기능성분에 대한 시험 분석법 밸리데이션을 완료하였음.</li> <li>○ 최종 개발된 제품에 대한 안전성 평가를 완료하였음.</li> </ul> </p> <p>4. 연구 성과 목표  <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 특허 출원 : 계획 2건 / 실적 2건</li> <li>○ 시제품 : 계획 2건 / 실적 4건</li> <li>○ 고용 창출 : 계획 3명 / 실적 6명</li> <li>○ 학술 발표 : 계획 1건 / 실적 1건</li> <li>○ 비SCI 논문 : 계획 1건 / 실적 0건 (현재 투고 후 심사 중)</li> </ul> </p>

<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 항노화 산업의 경우 건강기능성 식품, 기능성화장품, 의료기기 등의 다양한 분야에서 성장하였으나 정작 일반 식품에 기능성을 부여하여 간편하고 손쉽게 섭취할 수 있는 제품에 대한 연구는 매우 미흡한 실정임.</li> <li>○ 이에 본 연구 과제에서 개발된 제품은 실질적으로 파악된 현상 분석 결과에 대한 해결 수단으로서 특히 소화성이 용이하고 소화 능력 및 면역력 활성화에 도움을 줄 수 있는 새로운 식품 핵심소재, 섭취 기능이 저하된 계층을 대상으로 새로운 곡물 베이스로 한 편의식 으로 새로운 시장 개척이 가능할 것으로 기대됨.</li> </ul>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>유용미생물</p>	<p>실버푸드</p>	<p>면역증강</p>	<p>편의식</p>	<p>농산물</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Effective Micro-organisms</p>	<p>Silver food</p>	<p>Immune-Enhancing</p>	<p>HMR(home meal replacement)</p>	<p>agricultural products</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

## < 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 .....	1
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	4
2-1. 1차년도 연구 결과 .....	4
2-2. 2차년도 연구 결과 .....	62
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	148
4. 연구결과의 활용 계획 등 .....	155

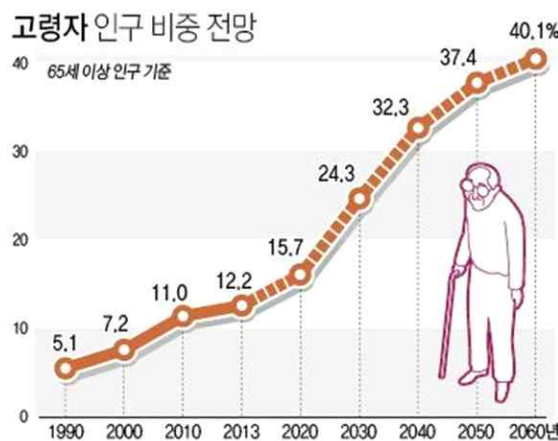
# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발 목적

- 본 연구개발의 목표는 유용미생물 생물전환 산채 곡류활용 소재를 이용하여 기능성과 기호성을 모두 만족하는 간편 고령친화식품(실버푸드)를 개발하는 것임

## 1-2. 연구개발의 필요성

- 최근 사회가 고령화됨에 따라 고령친화 상품의 필요성이 높아지고 있음. UN 기준에 따르면 한 국가의 총인구 중 65세 이상 인구가 차지하는 비중이 7% 이상이면 고령화 사회로 분류하는데 우리나라는 이미 2,000년도에 고령화 사회에 진입하여 2015년 기준 65세 이상 인구비중이 약 12.9%에 달할 정도로 빠르게 고령사회 진입이 이루어지고 있음.

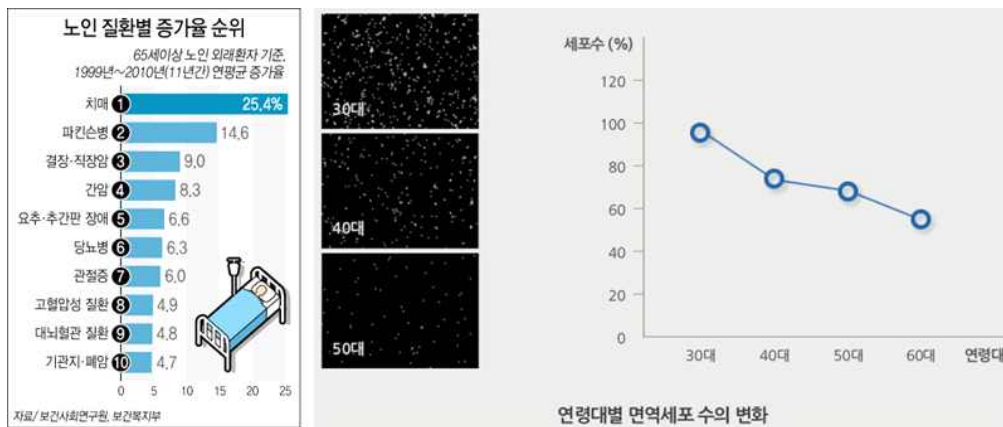


<한국의 고령화 추이, 통계청>

- 또한 고연령화 뿐만 아니라 1인·맞벌이 가구 수요 확대에 인하여 우리나라 가정간편식 시장이 지속적으로 증가하고 있음. 2015년 기준 간편식 시장은 1조 6,720억원 규모로 5년 사이 51.1%로 크게 성장하고 있는 상황에서 기능성을 갖춘 간편 실버푸드의 개발은 필수 불가결한 상황이라고 할 수 있음.
- 우리나라의 경우 노인복지법(1981)에서 규정하고 있는 65세 이상 자를 노인으로 지칭하는 것이 일반적 관례인데, 평균 수명 증가 및 노령화 인구 비율 상승에 힘입어 65세 이상의 인구가 전체에서 차지하는 비율이 2010년 11%를 차지하였으며 2060년 까지 그 비중이 40.1%로 증가할 것으로 전망하고 있음.
- 이렇게 급증하고 있는 노년기의 인간적인 삶, 건강한 삶을 유지하기 위한 대책이 필요함. 노인 삶의 질을 좌우하는 만성퇴행성 질환의 대부분은 평상시 식생활 습관과 매우 밀접한 연관이 있으며, 구체적으로는 소화기능의 저하, 저작기능의 저하 등 음식의 정상적 섭취 및 영양적 균형 유지가 어려운 입장이고, 노인뿐만 아니라 각종 질환에 노출 또는 수술 환자 등 병적 장애에 노출된 특수한 계층의 사람도 비슷한 환경에 놓이게 됨.
- 소화기능 저하의 여러 원인으로서, 타액 분비 감소, 씹는 것과 삼키는 것 불편, 치아의 부재 (65세 이상 노인 중 50%가 치아 없음), 잇몸질환, 치아질환 등이 있으며, 보통 씹는 것이 불편하여 부드러운 음식을 찾게 되며, 위산 및 펩신의 분비 저하, 소화 흡수율 저하

로 인해 영양적 불균형을 초래하게 되어 건강장애로 이어지게 됨.

- 저작곤란도 치아의 부재 및 치아질환, 그리고 특정한 병원의 환자들에게서 흔히 볼 수 있는 것으로, 저작능력이 낮은 노인층은 보통 체중, BMI 지수가 낮고, 악력, 평형기능, 골함량 등 전반적 건강상태도 정상인의 경우보다 낮아 정상적 식품 섭취가 가능하도록 새로운 형태의 영양공급원이 필요함.
- 국내 기술 및 시장 현황은 소화기능 저하, 저작곤란을 겪는 사람들에 대한 건강한 식품을 아직 체계적으로 개발, 공급해 본 적이 거의 없으며, 특수용도식품 중 일부 환자용식품이 주로 액상음료 형태로 제조, 판매되고 있으나, 이는 본 주제에서 다루는 대상자들에 대한 적절한 식품 공급 수단이 되기에 부족함. 일부 병원에서 치료환자들에게 공급하는 저작 및 연하곤란 환자용 gel 형태의 반고체 식품이 있으나, 이는 씹으면 부스러기가 되어 실제 연하곤란 환자들에게 일어날 수 있는 음식물 섭취시의 위험성을 배제하기에는 식품의 물성이 부족한 실정임.



<노인 질환별 증가율 순위 및 연령대별 면역세포 수의 변화>

- 노인은 항원에 반응하여 생산되는 항체의 수가 적고 항체가 항원에 부착하는 능력도 떨어지게 되고 때문에 폐렴, 독감, 감염성 심내막염, 파상풍이 노인에게 더 많이 발생하고 사망에 이르게 되는 한 이유가 될 수 있으며, 또한 이러한 변화는 노인에서 백신이 덜 효과적인 이유 및 노인에서 (일부 백신에서 이용할 수 있는) 추가접종을 받는 것이 중요한 이유를 부분적으로 설명할 수 있음.
- 통계청 추계에 따르면 2017년 말 또는 2018년 초 고령화 비중이 14%를 넘어서는 고령사회로 접어들 것으로 예상됨.-※ 고령화 단계 : 65세 이상 인구 비율 7% 이상(고령화사회), 14% 이상(고령사회), 20% 이상(초고령사회)
- 이에 따라 산업 각 분야에서 고령자의 삶의 질을 개선하고 고령자 층의 수요에 대응한 제품, 서비스 개발이 요구되고 있으며, 특히 고령자는 고령화에 따라 씹는 기능, 소화기능 등이 저하되어 식생활에 어려움을 겪거나 만성질환을 앓고 있는 경우가 많아 건강증진, 노후 생활의 질 개선 등을 위해서는 식품산업에서도 고령자 대상 제품에 대한 많은 관심이 요망됨.

### 1-3. 연구개발 범위

- 노인식을 위한 기능성소재의 생물전환 최적조건 확립

- 자체보유 균주 중 발효미생물 선정 : 3종
- 신규 미생물 선정 : 1종
- 소재발효 적합성 및 발효조건 설정 : 3건
- 생물전환 대량공정 확립
- 기능성제품의 효능평가
  - 발효산물의 전신/장관면역 유효성 평가 : 2건
  - 발효산물의 장관면역개선 기작 분석
- 기능성제품의 품질관리
  - 지표성분의 선정
  - 분석법 밸리데이션 : 1건
  - 영양성분 및 유해성분(미생물 및 중금속) 분석
- 편의성 제고된 기능성제품 개발
  - 저작 기능이 저하된 노령층을 위한 물성이 부드러운 식품 개발
  - 소화 및 면역 기능이 개선된 소스 개발
  - 영양과 맛 품질이 강화된 균형된 특수용도식품 개발
  - 포커스그룹 인터뷰
  - 소비자기호도 조사
  - 유통안정성평가

## 2. 연구수행 내용 및 결과

### 2-1. 1차년도 연구 결과

#### 2-1-1 (주)세준에프앤비

##### (1) 수분 흡수율이 좋은 누룽지 조건

###### 가. 경도 측정

- 기존 당사에서 판매하고 있는 누룽지 보다 수분 흡수율을 높여 복원력을 빠르고 많이 하기 위한 조건 실험을 진행 하였음.
- 가수 조건은 곡물 대비 1배, 1.5배, 2배, 2.5배, 3배 가수한 다음 30분간 취반하였다. 취반온도는 기존 취반기라인 온도인 90℃로 진행 하였으며 Texture Analyzer(CT3 / BROOKFIELD / USA)를 사용하여 경도를 측정하였다. 경도측정은 Target 5mm , Trigger Load 5g, Test Speed 2.00mm/s , Load Cell 10,000g, prove TA23/1000 조건으로 진행하였으며 취반된 밥을 가로세로 3cm x 3cm 두께 2cm 로 절단하여 진행 하였음.

표1. 경도 측정 결과

제 품 군	가 수 량	Hardness(g)
백미 누룽지	1	63.72±2.08
	1.5	53.53±2.78
	2	42.51±1.48
	3	21.05±2.64

- 취반 조건 실험 결과 가수량이 많을 수록 누룽지의 경도는 떨어지는 것을 확인 하였으나. 곡물 대비 2배 이상의 물이 가수 되었을 경우 밥이 툄에 말리는 현상으로 인하여 생산이 불가능 하였으며 오븐에서 더 많은 양의 열량을 필요로 하였음. 이에 추후 실험에서는 가수 1.5배의 누룽지만을 사용 하였음.

###### 나. 아밀로오스 함량

- 아밀로오스는 쌀 전분의 주요 성분 중 하나로 아밀로오스 함량이 높으면 수분 결합력이 떨어짐. 수분 결합력은 쌀의 호화와 밀접한 관계가 있는 것으로 고령자로 하여금 섭취가 원활하게하기 위해서는 아밀로오스 함량의 조절을 통하여 수분 결합력을 조절할 필요가 있음. 1

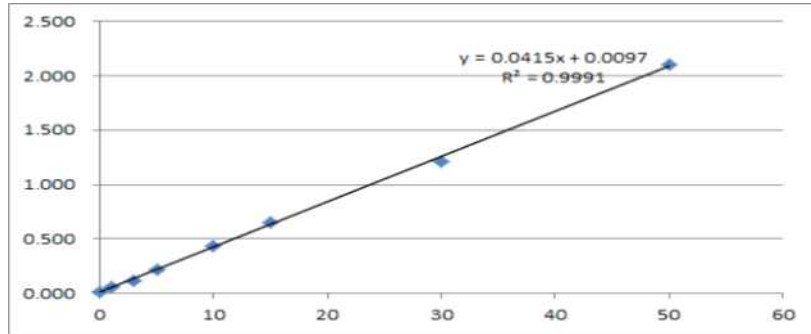


그림 1. 아밀로오스 Standard curv

표2 . 아밀로오스 함량 및 수분 결합력 측정 결과

구 분	아밀로오스함량(mg/g)	수분 결합력(%)
기존 누룽지	15.67±0.28	6.08±0.083
가수 1.5배	12.51±0.85	8.18±0.071
가수 2배	10.27±0.14	11.28±0.081
가수 3배	6.94±0.38	18.11±0.065

- 아밀로오스 함량 측정결과 현 제품 보다 낮은 아밀로오스 함량이 나타났으며 이는 취반조건에서 많은 물량을 넣은 후 취반의 열량을 상승 시켰으며, 또한 압축 공정에서 쌀알을 파손 시킨 후 오븐에서의 열로 즉 물량을 더 높이고, 열량을 높일 수록 아밀로오스 함량이 줄어들고, 수분 결합력은 높아졌으나 압착 공정에서의 문제로 인한 생산성의 문제와, 최종 제품에서 씹힘성이 없는 상태가 되기 때문에 가수량은 1.5배로 확정하였음.

다. 팽윤력 및 수분 용해도 측정

표3. 샘플별 팽윤력 및 수분 용해도

구 분	팽윤력(%)	수분 용해도(%)
기존 누룽지	12.85±1.19	52.31±1.16
가수 1.5배	15.08±1.92	48.64±1.28.

- 팽윤력은 아밀로펙틴 구조와 관련되어 있으며 결정성 영역과 무정형 영역에 수분이 침투하게 되는데 이때 수분을 가열 하게 되면 무정형 영역이 넓어지게 되어 수분을 흡수 할 수 있는 공간이 그만큼 커지게 된다. 분석 결과 기존 12.85, 가수 1.5배 15.08의 팽윤력을 보였으며 수분 용해 도는 52.13, 48.64이 각각 나타났다. 이는 아밀로오스 함량 과 수분 흡착지수와 동일한 경향을 나타냄.



라. 레토르트 처리

- 레토르트 처리 조건은 121℃ 15분으로 설정하였으며 가수 조건은 누룽지 12배로 하였음.

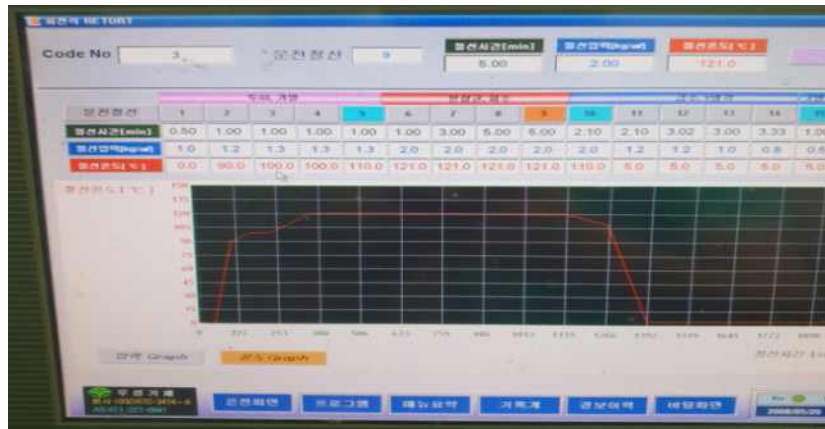


그림2. 레토르트 처리 조건

표4. 레토르트 후 미생물 실험결과

구 분	일반세균	대장균	진균류
기존 누룽지	10이하	음성	음성
가수 1.5배	10이하	음성	음성

마. 스프 개발

- 미강과 곤드레 추출물을 첨가한 레시피 개발

번호	sample 1	백분율 (%)	sample 2	백분율 (%)	sample 3	백분율 (%)
1	미강 발효 추출물	18	미강 발효 추출물	20	미강 발효 추출물	16
2	곤드레 발효추출물	10	곤드레 발효추출물	15	곤드레 발효추출물	8
3	야채 액기스	14	건조김	8	건조김	8
4	건조 김	8	옥수수수염추출분말	8	쌀 튀김	8
5	쌀 튀김	8	고춧가루	6	식물성분해단백	9
6	변성전분	8	변성전분	7	구아검	10
7	텍스트린	6	텍스트린	7	야채 액기스	15
8	저당	6	조미과립	4	사골육수페이스트	9
9	정제소금	1.3	쌀튀김	8	변성전분	4.2
10	쇠고기 국물 농축액	0.8	L-글루타민산나트륨	12	텍스트린	3.7
11	사태양념분말	0.8	5-리보뉴클레오티드	5	혼합제제	2.7
12	향미증진제	2.5	나트륨	2.5	L-글루타민산나트륨	2.2
13	향미증진제	2.5			L-글루타민산나트륨	2.9
14	저당	3.1			5-리보뉴클레오티드	3.5
15	5-리보뉴클레오티드 나트륨	1.5			나트륨	3
16	L-글루타민산나트륨	8				
합계		100		100		100



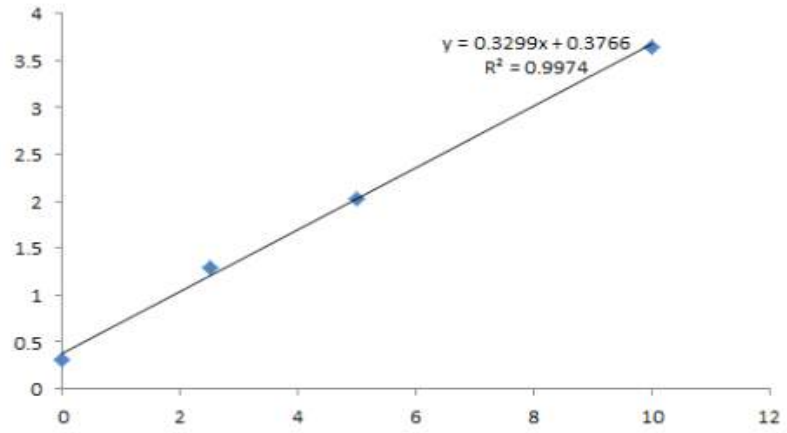
바. in vitro 소화 흡수율 측정

- 미강, 곤드레 물 추출물로 동일한 레시피를 적용한 스프와 발효 추출물이 들어간 스프를 이용하여 세포내 glucose 함량을 측정하여 소화에 도움이 되는지 확인하였음.

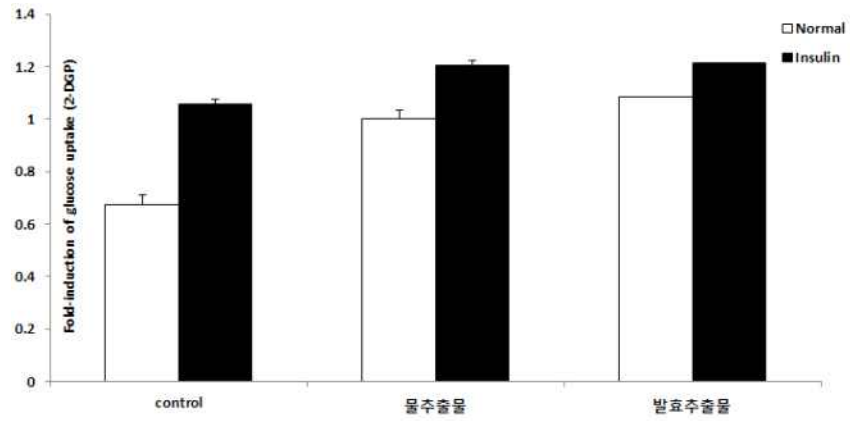
표5. 세포내 glucose 함량

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
발효추출물	1.085	1.221	1.025

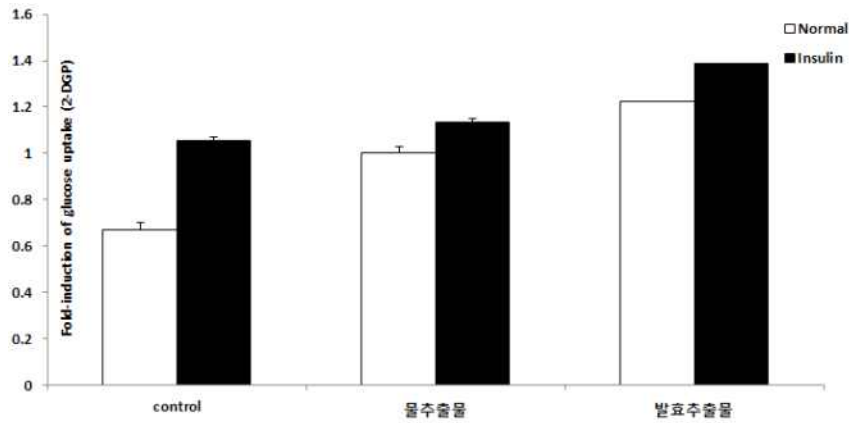
A



B



C



D

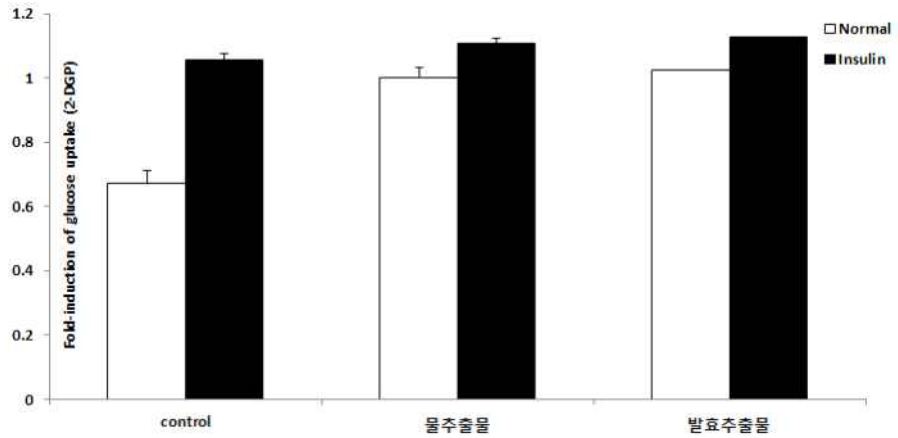




그림3. 세포내 Glucose 함량 측정 결과(A:검량선, B: sample1, C: sample2, D: sample3)

- 세포내 glucose 함량을 측정된 결과를 Fold-induction에 대입 후 물 추출물의 함량을 1로 본 결과 무처리군은 0.67의 함량을 보였으며 발효 추출물의 경우 각각 1.085, 1.22, 1.025 의 함량을 보였음. 전체적으로 일반 물 추출물 보다 발효 추출물 일 때 높은 glucose 함량을 보였음. 이에 가장 효과가 좋았던 Sample 2를 제품으로 선택하였음.

공인성적서(미생물)					공인성적서(영양성분)				
 <b>시험·검사 성적서</b>					 <b>시험·검사 성적서</b>				
발행 번호: R20180816-0110		접수 번호: 180102853-001			발행 번호: R20180816-0002		접수 번호: 180102583-002		
검사 연도일: 2018-08-16		접수 연도일: 2018-08-09			검사 연도일: 2018-08-16		접수 연도일: 2018-08-09		
제품명: 발효 추출물이 혼합된 아미 스프					제품명: 발효 추출물이 혼합된 아미 스프				
[품목]제조번호: <input type="text"/> 품목제조신고번호: <input type="text"/>					[품목]제조번호: <input type="text"/> 품목제조신고번호: <input type="text"/>				
유형·재질·용도명: 식이조리식품					유형·재질·용도명: 식이조리식품				
제조(수입)일: 2018-08-08		유통(유통유지)기한: <input type="text"/>			제조(수입)일: 2018-08-08		유통(유통유지)기한: <input type="text"/>		
성명: 박수홍		업종명: [우] 세운에프앤비			성명: 박수홍		업종명: [우] 세운에프앤비		
소재지: 025107 강원도 춘천시 남면 홍성길 53 전화번호: 033-432-9246		팩스번호: 033-436-9247			소재지: 025107 강원도 춘천시 남면 홍성길 53 전화번호: 033-432-9246		팩스번호: 033-436-9247		
제조원: <input type="text"/>		제조국: <input type="text"/>			제조원: <input type="text"/>		제조국: <input type="text"/>		
시험·검사목적: 식용 1가 리(심혈관질환, 영양분석용)					시험·검사목적: 식용 1가 리(심혈관질환, 영양분석용)				
<b>시험·검사 항목 및 결과</b>					<b>시험·검사 항목 및 결과</b>				
시험·검사항목	시험·검사기준	시험·검사결과	단위	비고	시험·검사항목	시험·검사기준	시험·검사결과	단위	비고
말린색소수(1g당)	기준없음	18	상기 실험허용 한		열량(kcal / 100g)		85.28	상기 실험허용 한	
대장균	기준없음	음성	상기 실험허용 한		탄수화물(g/100g)		18.57	상기 실험허용 한	
진균수(1g당)	기준없음	0	상기 실험허용 한		지방질(g/100g)		0.40	상기 실험허용 한	
황색포도상구균(1g당)	기준없음	0	상기 실험허용 한		트렌스 지방(g/100g)		0.00	상기 실험허용 한	
살모넬라	기준없음	음성	상기 실험허용 한		포화지방(g/100g)		0.00	상기 실험허용 한	
양궁형성 대장균	기준없음	음성	상기 실험허용 한		단백질(g/100g)		1.52	상기 실험허용 한	
클로스트리디움 퍼프린젠스(1g 당)	기준없음	0	상기 실험허용 한		당류(g/100g)		0.00	상기 실험허용 한	
					콜레스테롤(mg/100g)		0.00	상기 실험허용 한	
					나트륨(mg/100g)		14.86	상기 실험허용 한	

4. 미생물분석, 영양성분분석 공인성적서

## 2-1-2 (주)웰빙엘에스

### (1) 유용미생물 탐색

#### 가. 유용미생물 탐색

- 기존 당사 보유 면역증강효과 균주 LS-21(*L. fermentum* JS), LS-01(*B. subtilis*)의 경우 발효시 면역증강 효과는 있으나 소재를 발효시 관능이 좋지 않게 변하는 특성이 있음.
- 따라서 스프개발에 적합한 유용미생물을 신규로 탐색하기 위하여 강원도내 전통 발효식품을 수집하여 미생물 스크리닝을 실시하였음.



<백김치(강원도 정선)>



<막장(강원도 영월)>



<된장(강원도 인제)>



<간장(강원도 인제)>



<비지(강원도 인제)>

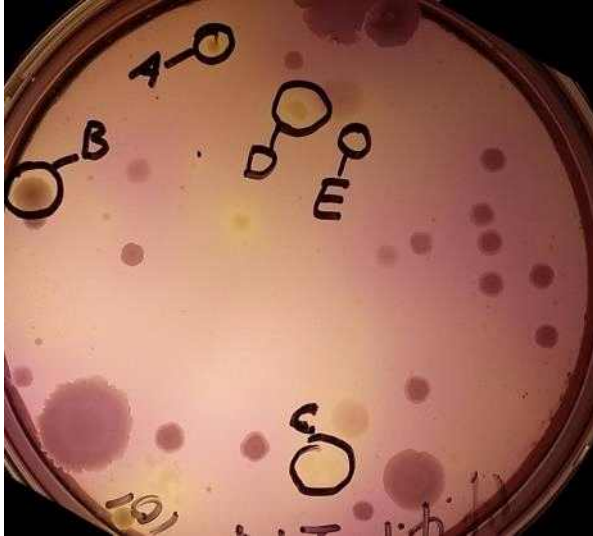


<무김치(강원도 영월)>

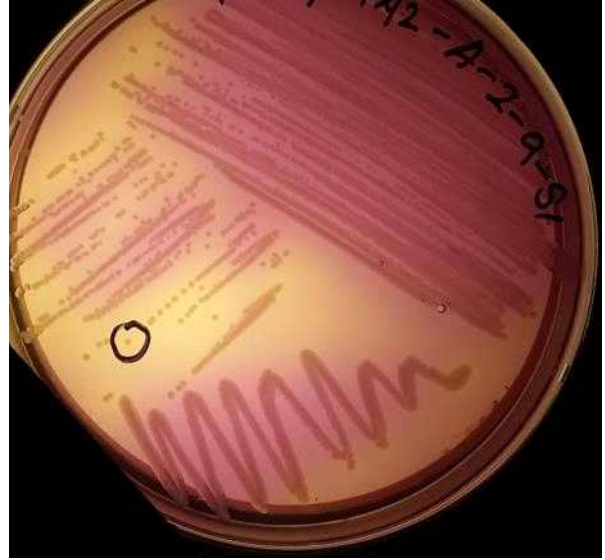
그림5. 수집한 전통 발효식품

- 수집한 전통식품 10g(ml)을 멸균생리식염수 90ml에 현탁하여 37°C에서 1시간동안 반응시키고, 이 반응액 100 $\mu$ l를 BCP-PCA(Bromo cresol purple Plate count agar)에 spreading 하여 37°C에서 24~48시간 배양함.
- 배양된 Colony 중 산을 생성하여 배지를 노랗게 변색시킨 Colony를 백금으로 긁어 채취, Streaking 하여 다시 배양기에서 37°C 24~48시간 배양하는 것을 3~5회 반복하여 단일 콜로니를 얻음





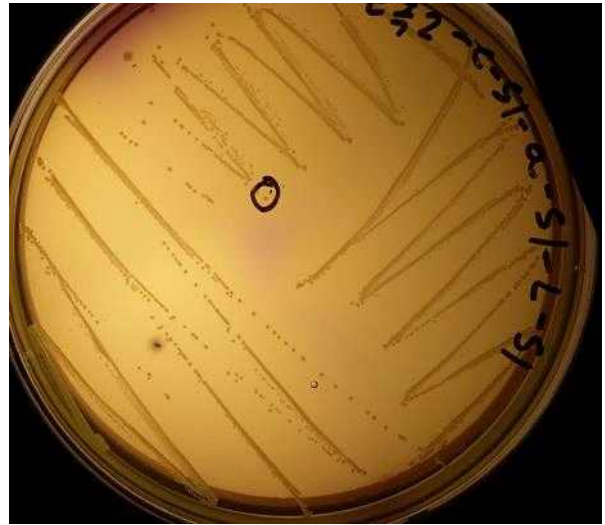
① 스프레딩



② Streaking 1회차



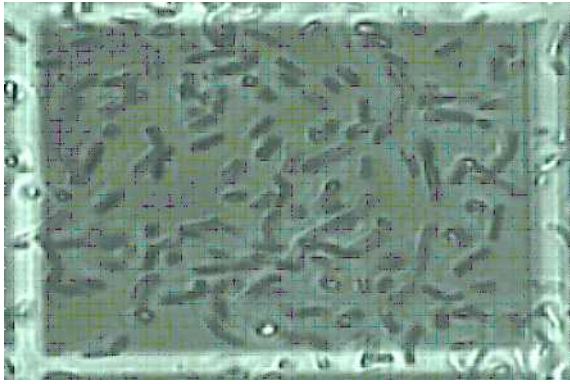
③ Streaking 2회차



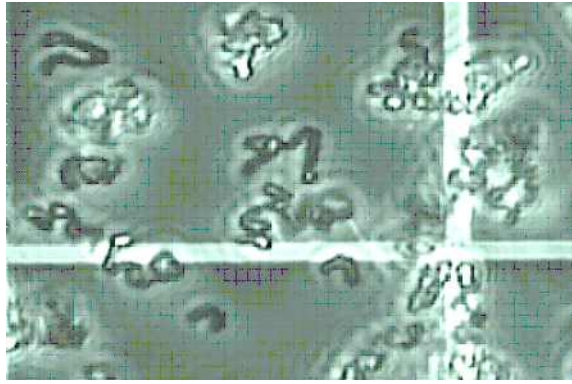
④ Streaking 3~5회차

그림6. 균주분리 과정

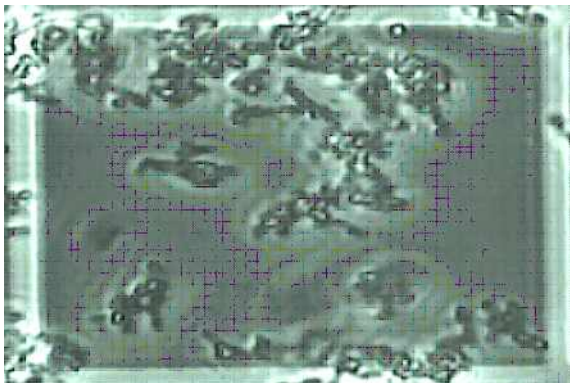
- 반복적인 Streaking을 통해 획득한 균주는 순수분리 되었는지 알아보기 위하여 각각의 MRS Broth 배지에 분리된 콜로니를 접종하여 37°C에서 90rpm 으로 약 15~20hr 현탁배양 후 위상차 현미경으로 관찰하여 균체의 형상을 관찰하였으며 위상차 현미경 상에서 두가지 이상의 형상이 보일 경우 재분리를 실시하였음.



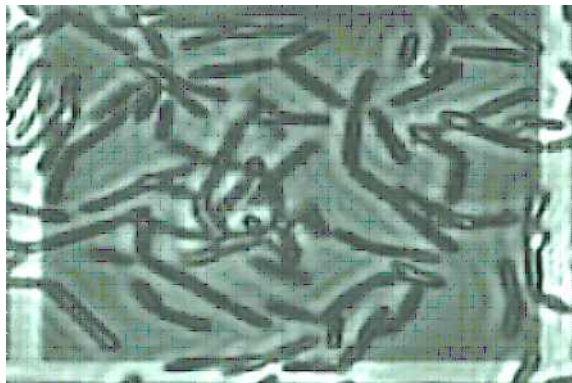
<LS-23(*Lactobacillus sakei*)>



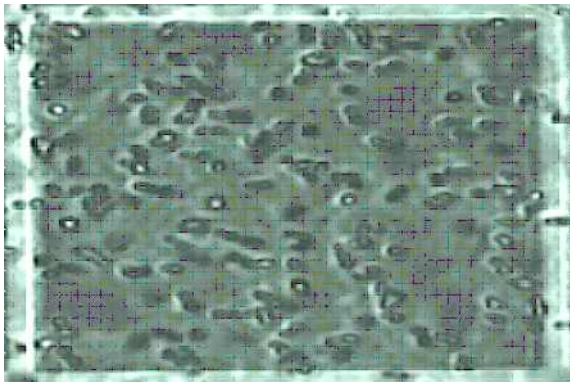
<LS-24(*Leuconostoc mesenteroides*)>



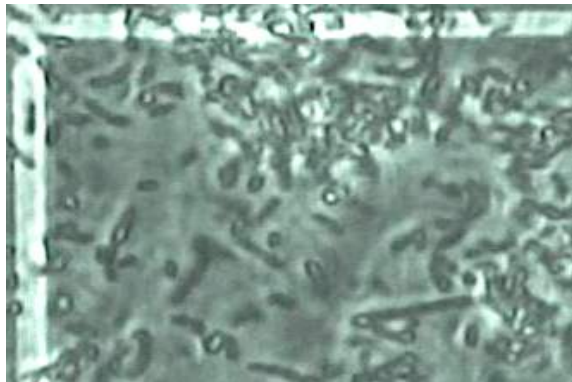
<LS-33(*Weissella cibaria*)>



<LS-62(*Lactobacillus acidophilus*)>



<LS-63(*Enterococcus faecium*)>



<LS-65(*Lactobacillus plantarum*)>

그림7. 분리균주 위상차 현미경 관찰사진

- 스크리닝된 미생물은 PCR을 통하여 16s rRNA의 염기서열을 분석하였으며 분석된 염기서열은 NCBI Database의 16s rRNA sequencing과 비교하여 현재 식품공전상 사용 가능한 유용 미생물만을 선발, 6종의 유산균을 얻음.



A

**Lactobacillus sakei strain BMG 126 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**

GenBank: EU081017.1

[GenBank](#) [Graphics](#) [PopSet](#)

>EU081017.1 *Lactobacillus sakei* strain BMG 126 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
TTGAAGGAGCTTGCTCCTGATTGATAAACATTTGAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAAC
CTGCCCTAAAGTG6GGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAAACCTAACCCGCATGGTG
TAGGGTTGAAAGATGGTTTCGGCTATCATTAGGATGGACCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGAGGTA
AAGGCTCACCAGACCGTGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCG
CGTAGCTGAAGGAAAGTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGTATCTGATAGTAACGAT
CAGGTAGTGACGGTATCCAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAACTACGTAGGT
GGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
TTCGGCTCAACCAGAAAGTGATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAAGGACAGTGGAACTCCAT
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGCGGCTGTCTGGCTGTAACTG
ACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGA
GTGCTAGGTTGTGAGGAGTTTCCGCCCTTCAAGTCCGCAAGTAAACGATTAAGCACTCCGCTGGGGAGT
ACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATT
CGAAGCAACGGGAAGAACCTTACCAGGCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCTTC
GGGGACAAAAGTACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA
ACGAGCGCAACCTTATTACTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTAGTGAAGTCCGGGTGACAAAC
CGGAGGAAGGTGGGGACGACGCTCAAATCATATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGG
ATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGGAGGTTTAGCTAATCTCTTAAAACATTCTCAGTTCGGATTGTAG
GCTGCAACTCGCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTT
CCGGGCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGCCGGTGAGGTAAACCTT
CGGGGAGCCAGCCGCTAA
```

<LS-23(*Lactobacillus sakei*)>

B

**Leuconostoc mesenteroides strain KNUC03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**

GenBank: AY264850.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

>AY264850.1 *Leuconostoc mesenteroides* strain KNUC03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
AGCCGAAGTGCTTGACCTTTAAGTGAGTGGCGAAGGGGTGAGTAACACGTGGNACAACCTGCCTCAAG
GCTGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGAATAAACTTAGTGTGCGATGACACAAAGTTAAA
AGGCGCTTCGGCGTCACTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCATCCAA
GACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTA
CGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCTGTGTGATGA
AGGCTTTCGGGTCGTAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTGACG
GTACCAACAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTAT
CCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACT
CCGGAATGGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTG
GAATGCGTAGATATATGGAAAGAACACCAAGTGGCGAAGGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACGTTGAGGCT
CGAAAGTGTGGGTAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAACACTAGGTGT
TAGGAGGTTTCCGCCCTTAGTGCCGAAGCTAACGCAATTAAGTGTCCGCCCTGGGGAGTACGACCCGAAG
GTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCAACAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAAGCAACGC
GAAGAACCTTACCAGGCTTGACATCCTTTGAAGCTTTTAGAGATAGAAGTGTCTCTTCGGAGACAAAG
TGACAGGTGGTGCATGGTCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA
CCCTTATTGTTAGTTGCCAGCATTACAGATGGGCACTTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAAG
CGGGGACGACTCAGATCATATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAAC
GAGTTGCCAACCCGCGAGGGGTGAGCTAATCTTAAAGTACGTCTCAGTTCGGATTGAGTCTGCAACTC
GACTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCAGCCGCGGT
```

<LS-24(*Leuconostoc mesenteroides*)>



C

## Weissella cibaria 16S rRNA gene, strain ACA-DC 3411t2

GenBank: AJ422031.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>AJ422031.1 Weissella cibaria 16S rRNA gene, strain ACA-DC 3411t2
GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCTTTGTGGTTCAACTGATTTGAAGAGCTT
GCTCAGATATGACGATGGACATTGCAAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTACCTCTT
AGCAGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAATAGCAACCGCATGGTTGCTACTTAA
AAGATGGTTCTGCTATCACTAAGAGATGGTCCCGGGTGCATTAGTTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACC
AAGACGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCATACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAACTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGAT
GAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACACTGTTGTAAGAGAAGAATGACATTGAGAGTAACTGTTCAATGTGTGA
CGGTATCTTACCAGAAAGGAACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTTCCAAGCGTT
ATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTATTTAAGTCTGAAGTGAAGCCCTCAGCTCAA
CTGAGGAATTGCTTTGGAACTGGATGACTTGAGTGCAGTAGAGGAAAGTGAAGTCCATGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTTCTGGACTGTAAGTACGCTTGGAGGC
TCGAAAGTGTGGGTAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAGTGTAGGTG
TTTGAGGGTTTCCGCCCTTAAGTGCCGACGTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCCGAA
GGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACG
CGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCCTTGACAACCCAGAGATGGAGCGTTCCTTCCGGGGACAAGG
TGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAA
CCCTTATTACTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAAGG
TGGGGATGACGTCAAATCATATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAAAC
GAGTTGCCAACCCGCGAGGGTGGAGTAATCTCTTAAAGTACGTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTC
GCCTACATGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTG
TACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGCCGGTGGGGTAACCTTCGGGAGCCAGC
CGTCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGAGAACC
```

<LS-33(Weissella cibaria)>

D

## Lactobacillus acidophilus strain JCM\_1132 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: HM162411.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>HM162411.1 Lactobacillus acidophilus strain JCM_1132 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence
GCGTGCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGCTGAACCAACAGATTCACTTCGGTGATGACGTTGGGAACGCG
AGCGGCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGGAACCTGCCCATAGTCTGGGATACCACTTGGAAACAGGTGC
TAATACCGGATAAGAAAGCAGATCGCATGATCAGCTTATAAAAGGCGGCGTAAGCTGTCGCTATGGGATG
GCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAACGGCCACCAAGGCAATGATGCATAGCCGAGTTGAGA
GACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCGAGTAGGGGAATCTTCC
ACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTT
GTTGGTGAAGAAGGATAGAGGTAGTAAGTGGCCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAA
CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGC
GCAGGCGGAAGAAATAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAACGATCGGAAACTGTTTTT
CTTGAGTGCAGAAGAGGAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAAGAACCC
AGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTA
GATACCTGGTAGTCCATGCCGTAACAGATGAGTGCATAAGTGTGGGAGGTTTTCCGCCCTCAGTGTCTGC
AGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGAGTACGACCACAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGG
CCCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCT
AGTGCAATCCGTAGAGATACGGAGTTCCTTCCGGGACACTAAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTACGC
TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCTTGTCAATAGTTGCCAGCATTAAAGT
TGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCAAGTCAATGATG
TTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGTACAACGAGGAGCAAGCTGCGAAGGCAAGCGAA
TCTCTTAAAGCTGTTCTCAGTTCGGACTGCAAGTCTGCAACTCGACTGCACGAAGCTGGAATCGTAGTAA
TCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGT
CTGCAATGCCCAAAGCCGGTGGCCTAACCTTCGGGAAGGAGCCGTCTAAGCAG
```

<LS-62(Lactobacillus acidophilus)>





<p style="text-align: center;">미생물 안전기탁 통지서</p> <p>복 2019-57 호</p> <p>2019년 10월 23일 즉 2019-57 호로 귀하가 안전기탁 신청한 미생물(대장균)의 안전기탁과 더불어 같이 미생물 안전기탁번호를 통지합니다.</p> <table border="1"> <tr><th colspan="2">내 용</th></tr> <tr><td>1. 미생물명 명칭</td><td>Weissella cibaria LS-33</td></tr> <tr><td>2. 미생물 기재번호</td><td>KCCM 80138</td></tr> <tr><td>3. 기탁 일자</td><td>2019년 10월 23일</td></tr> <tr><td>4. 기탁 접수 일자</td><td>2019년 10월 23일</td></tr> </table> <p>5. 기타사항  (1) 미생물 안전기탁은 열안정성(즉 상온 상태를 유지하여 최대 생산량 또는 생산에서 최소 1개월 유통을 할수있음) 등(1,2),  (2) 미생물 안전기탁은 안전성(유해성)이 없음 경우 해당 미생물은 일반기탁으로 간주됩니다. 유해성이 인정됩니다.</p> <p style="text-align: right;">(주)윌빙앨리스 귀하 한국미생물보존센터 (장)</p> <p style="text-align: left;">(02-7092)</p> <p style="text-align: left;">한국미생물보존센터 152-880 서울특별시 강남구 테헤란로 152, 8층 (우) 06150</p>	내 용		1. 미생물명 명칭	Weissella cibaria LS-33	2. 미생물 기재번호	KCCM 80138	3. 기탁 일자	2019년 10월 23일	4. 기탁 접수 일자	2019년 10월 23일	<p style="text-align: center;">미생물 안전기탁 통지서</p> <p>복 2019-58 호</p> <p>2019년 12월 23일 즉 2019-58 호로 귀하가 안전기탁 신청한 미생물(대장균)의 안전기탁과 더불어 같이 미생물 안전기탁번호를 통지합니다.</p> <table border="1"> <tr><th colspan="2">내 용</th></tr> <tr><td>1. 미생물명 명칭</td><td>Lactobacillus plantarum LS-65</td></tr> <tr><td>2. 미생물 기재번호</td><td>KCCM 80139</td></tr> <tr><td>3. 기탁 일자</td><td>2019년 12월 23일</td></tr> <tr><td>4. 기탁 접수 일자</td><td>2019년 12월 23일</td></tr> </table> <p>5. 기타사항  (1) 미생물 안전기탁은 열안정성(즉 상온 상태를 유지하여 최대 생산량 또는 생산에서 최소 1개월 유통을 할수있음) 등(1,2),  (2) 미생물 안전기탁은 안전성(유해성)이 없음 경우 해당 미생물은 일반기탁으로 간주됩니다. 유해성이 인정됩니다.</p> <p style="text-align: right;">(주)윌빙앨리스 귀하 한국미생물보존센터 (장)</p> <p style="text-align: left;">(02-7092)</p> <p style="text-align: left;">한국미생물보존센터 152-880 서울특별시 강남구 테헤란로 152, 8층 (우) 06150</p>	내 용		1. 미생물명 명칭	Lactobacillus plantarum LS-65	2. 미생물 기재번호	KCCM 80139	3. 기탁 일자	2019년 12월 23일	4. 기탁 접수 일자	2019년 12월 23일	<p style="text-align: center;">미생물 안전기탁 통지서</p> <p>복 2019-59 호</p> <p>2019년 10월 23일 즉 2019-59 호로 귀하가 안전기탁 신청한 미생물(대장균)의 안전기탁과 더불어 같이 미생물 안전기탁번호를 통지합니다.</p> <table border="1"> <tr><th colspan="2">내 용</th></tr> <tr><td>1. 미생물명 명칭</td><td>Saccharomyces cerevisiae LS-107</td></tr> <tr><td>2. 미생물 기재번호</td><td>KCCM 80100</td></tr> <tr><td>3. 기탁 일자</td><td>2019년 10월 23일</td></tr> <tr><td>4. 기탁 접수 일자</td><td>2019년 10월 23일</td></tr> </table> <p>5. 기타사항  (1) 미생물 안전기탁은 열안정성(즉 상온 상태를 유지하여 최대 생산량 또는 생산에서 최소 1개월 유통을 할수있음) 등(1,2),  (2) 미생물 안전기탁은 안전성(유해성)이 없음 경우 해당 미생물은 일반기탁으로 간주됩니다. 유해성이 인정됩니다.</p> <p style="text-align: right;">(주)윌빙앨리스 귀하 한국미생물보존센터 (장)</p> <p style="text-align: left;">(02-7092)</p> <p style="text-align: left;">한국미생물보존센터 152-880 서울특별시 강남구 테헤란로 152, 8층 (우) 06150</p>	내 용		1. 미생물명 명칭	Saccharomyces cerevisiae LS-107	2. 미생물 기재번호	KCCM 80100	3. 기탁 일자	2019년 10월 23일	4. 기탁 접수 일자	2019년 10월 23일
내 용																																
1. 미생물명 명칭	Weissella cibaria LS-33																															
2. 미생물 기재번호	KCCM 80138																															
3. 기탁 일자	2019년 10월 23일																															
4. 기탁 접수 일자	2019년 10월 23일																															
내 용																																
1. 미생물명 명칭	Lactobacillus plantarum LS-65																															
2. 미생물 기재번호	KCCM 80139																															
3. 기탁 일자	2019년 12월 23일																															
4. 기탁 접수 일자	2019년 12월 23일																															
내 용																																
1. 미생물명 명칭	Saccharomyces cerevisiae LS-107																															
2. 미생물 기재번호	KCCM 80100																															
3. 기탁 일자	2019년 10월 23일																															
4. 기탁 접수 일자	2019년 10월 23일																															
<i>Weissella cibaria</i> LS-33	<i>Lactobacillus plantarum</i> LS-65	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> LS-107																														
<p style="text-align: center;">미생물 안전기탁 통지서</p> <p>복 2019-51 호</p> <p>2019년 10월 23일 즉 2019-51 호로 귀하가 안전기탁 신청한 미생물(대장균)의 안전기탁과 더불어 같이 미생물 안전기탁번호를 통지합니다.</p> <table border="1"> <tr><th colspan="2">내 용</th></tr> <tr><td>1. 미생물명 명칭</td><td>Lactobacillus fermentum LS-501</td></tr> <tr><td>2. 미생물 기재번호</td><td>KCCM 80201</td></tr> <tr><td>3. 기탁 일자</td><td>2019년 10월 23일</td></tr> <tr><td>4. 기탁 접수 일자</td><td>2019년 10월 23일</td></tr> </table> <p>5. 기타사항  (1) 미생물 안전기탁은 열안정성(즉 상온 상태를 유지하여 최대 생산량 또는 생산에서 최소 1개월 유통을 할수있음) 등(1,2),  (2) 미생물 안전기탁은 안전성(유해성)이 없음 경우 해당 미생물은 일반기탁으로 간주됩니다. 유해성이 인정됩니다.</p> <p style="text-align: right;">(주)윌빙앨리스 귀하 한국미생물보존센터 (장)</p> <p style="text-align: left;">(02-7092)</p> <p style="text-align: left;">한국미생물보존센터 152-880 서울특별시 강남구 테헤란로 152, 8층 (우) 06150</p>	내 용		1. 미생물명 명칭	Lactobacillus fermentum LS-501	2. 미생물 기재번호	KCCM 80201	3. 기탁 일자	2019년 10월 23일	4. 기탁 접수 일자	2019년 10월 23일	<p style="text-align: center;">미생물 안전기탁 통지서</p> <p>복 2019-52 호</p> <p>2019년 12월 23일 즉 2019-52 호로 귀하가 안전기탁 신청한 미생물(대장균)의 안전기탁과 더불어 같이 미생물 안전기탁번호를 통지합니다.</p> <table border="1"> <tr><th colspan="2">내 용</th></tr> <tr><td>1. 미생물명 명칭</td><td>Lactobacillus plantarum LS-502</td></tr> <tr><td>2. 미생물 기재번호</td><td>KCCM 80102</td></tr> <tr><td>3. 기탁 일자</td><td>2019년 12월 23일</td></tr> <tr><td>4. 기탁 접수 일자</td><td>2019년 12월 23일</td></tr> </table> <p>5. 기타사항  (1) 미생물 안전기탁은 열안정성(즉 상온 상태를 유지하여 최대 생산량 또는 생산에서 최소 1개월 유통을 할수있음) 등(1,2),  (2) 미생물 안전기탁은 안전성(유해성)이 없음 경우 해당 미생물은 일반기탁으로 간주됩니다. 유해성이 인정됩니다.</p> <p style="text-align: right;">(주)윌빙앨리스 귀하 한국미생물보존센터 (장)</p> <p style="text-align: left;">(02-7092)</p> <p style="text-align: left;">한국미생물보존센터 152-880 서울특별시 강남구 테헤란로 152, 8층 (우) 06150</p>	내 용		1. 미생물명 명칭	Lactobacillus plantarum LS-502	2. 미생물 기재번호	KCCM 80102	3. 기탁 일자	2019년 12월 23일	4. 기탁 접수 일자	2019년 12월 23일											
내 용																																
1. 미생물명 명칭	Lactobacillus fermentum LS-501																															
2. 미생물 기재번호	KCCM 80201																															
3. 기탁 일자	2019년 10월 23일																															
4. 기탁 접수 일자	2019년 10월 23일																															
내 용																																
1. 미생물명 명칭	Lactobacillus plantarum LS-502																															
2. 미생물 기재번호	KCCM 80102																															
3. 기탁 일자	2019년 12월 23일																															
4. 기탁 접수 일자	2019년 12월 23일																															
<i>Lactobacillus fermentum</i> LS-501	<i>Lactobacillus plantarum</i> LS-502																															

그림8. 미생물 안전기탁 통지서

나. 기존보유 미생물의 면역강화 활성 검토

- 분리, 기존보유 미생물을 이용하여 곡류 및 산야초를 가공시 살균 또는 멸균 공정을 거쳐야 하기 때문에 미생물의 사균에 대한 면역강화 활성을 검토하여 사용함. 시료는 아래 표 및 그림과 같이하여 제작하여 사용하였음.

표. 면역강화 활성 검토균주

구 분	균체번호	균종
기존보유	LS-501	<i>Lactobacillus fermentum</i>
	LS-502	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	LS-503	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	LS-107	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	LS-301	<i>Enterococcus faecium</i>
신규분리	LS-23	<i>Lactobacillus sakei</i>
	LS-24	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
	LS-33	<i>Weissella cibaria</i>
	LS-62	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	LS-63	<i>Enterococcus faecium</i>
	LS-65	<i>Lactobacillus plantarum</i>

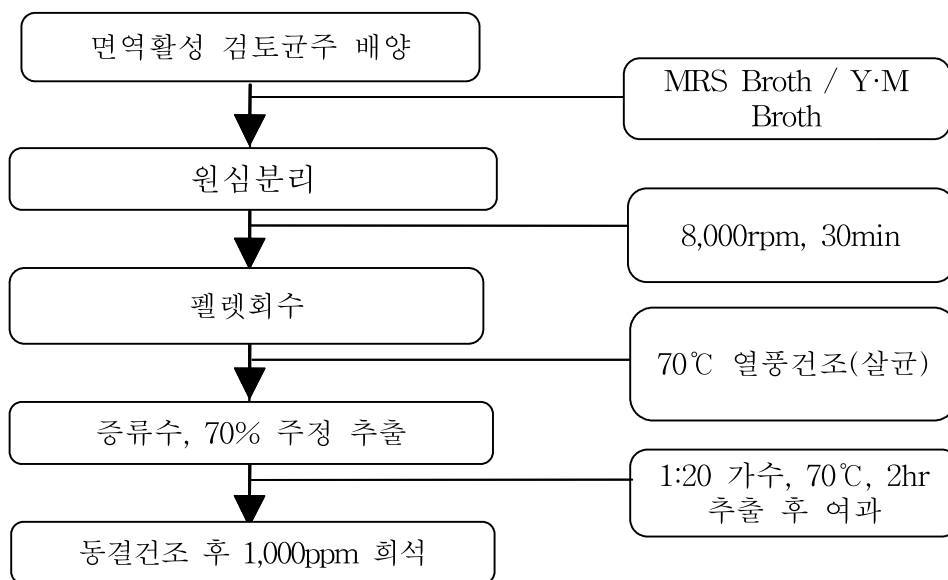


그림9. 면역활성 검토균주 시료제작 과정

- 상기와 같이 제작된 시료를 아래 그림과 같이 Raw264.7 cell에 처리하여 NO 생성능이 우수한 균주를 선별함

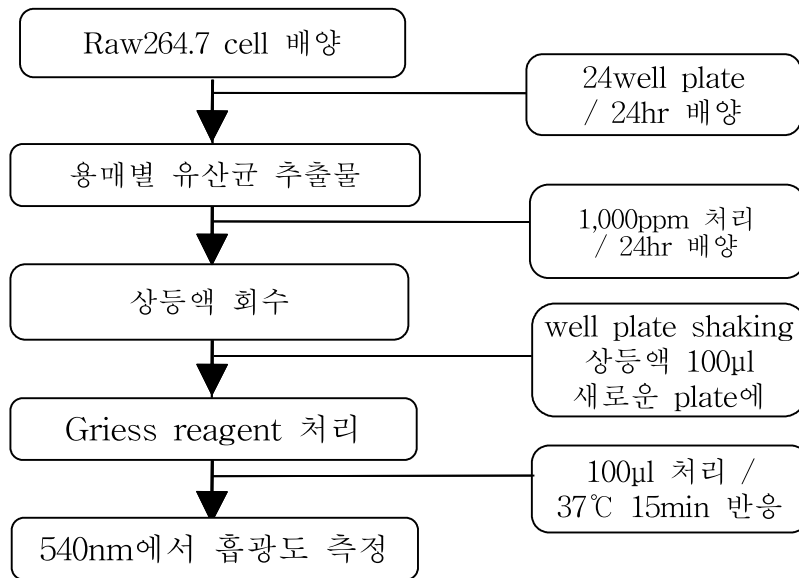
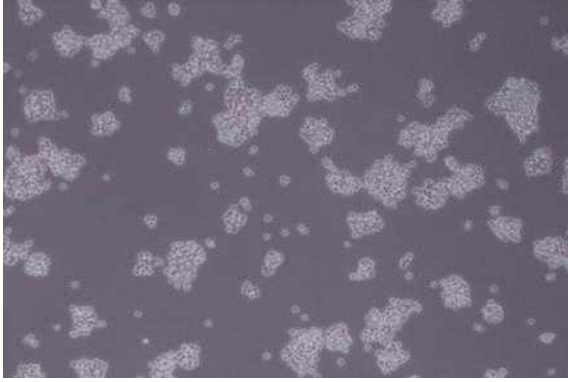


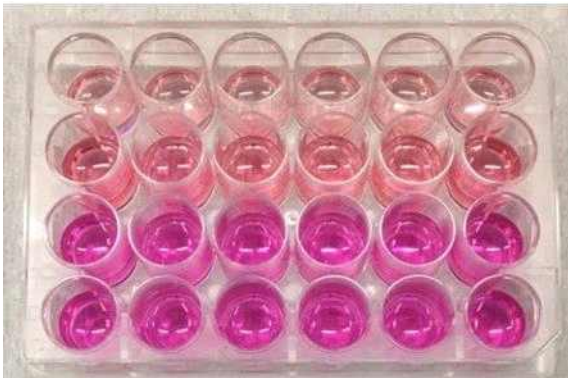
그림10. Raw264.7 cell을 이용한 NO 생성능 측정방법 흐름도



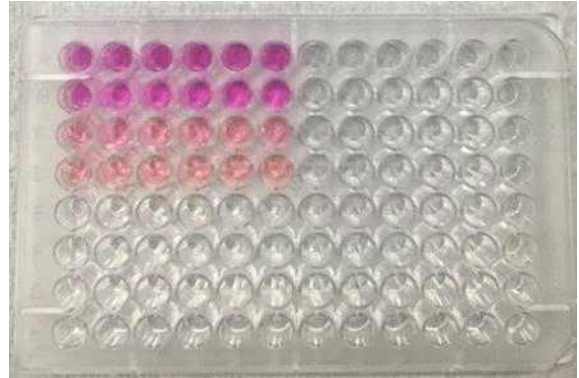
① Raw 264.7 cell 24hr 배양



② 용매별 유산균 추출물 처리후 24hr 배양



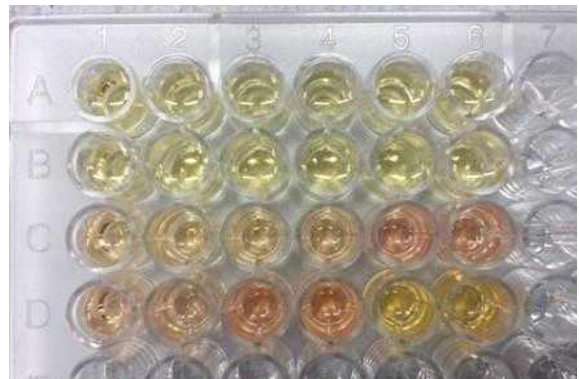
③ 유산균 추출물 처리된 well plate shaking



④ 상등액 100µl 새로운 well plate로 이동



⑤ Griess reagent 처리



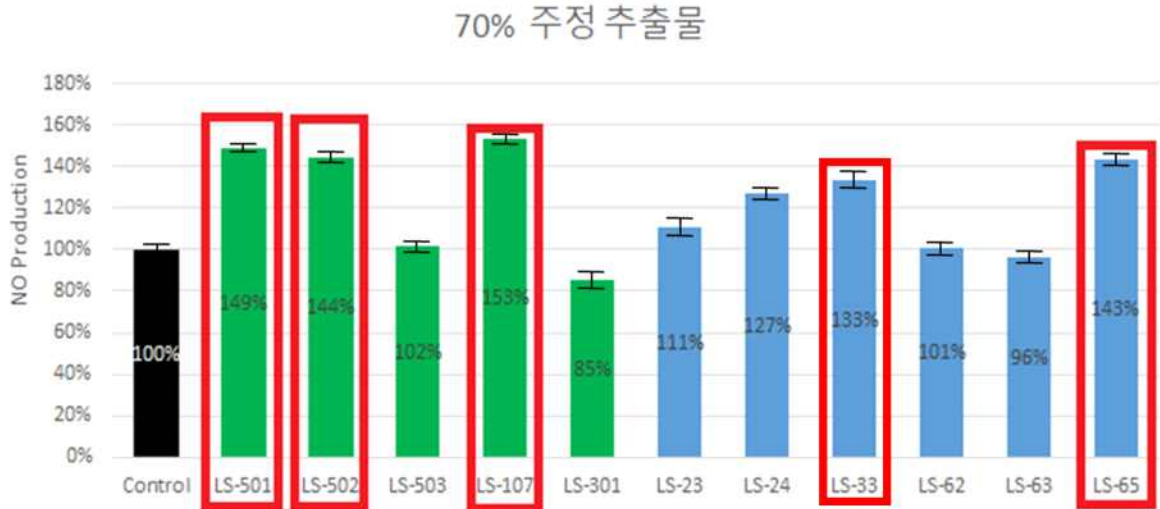
⑥ 37°C 15min 반응

	1	2	3	4	5	6
A	0.061	0.061	0.061	0.062	0.063	0.063
B	0.064	0.063	0.062	0.062	0.063	0.064
C	0.107	0.105	0.109	0.130	0.203	0.204
D	0.136	0.149	0.230	0.239	0.135	0.141

⑦ 540nm에서 흡광도 측정

그림. Raw264.7 cell을 이용한 NO 생성능 측정과정

A



B



그림. 추출물별 기준, 신규 분리 미생물의 면역활성 측정결과

- 70%주정, 증류수 추출물을 1,000ppm 농도로 처리할 경우 70% 주정 추출물 보다는 증류수에서 면역 활성이 더 높게 측정되었으며 증류수 추출물의 경우 무처리구 (Control)대비 최저 76%, 최대 89% 더 높은 면역 활성을 보임. 따라서 증류수 추출물에서 60% 이상의 면역활성을 나타낸 5개 균주(기준:LS 107, 501, 502 / 신규 : LS-33, 65)를 소재의 발효에 사용하기로 결정함.

다. 소재에 따른 미생물 및 발효조건 설정

- 산야초 소재의 경우 홍천 메디컬허브 연구소측에서 선정한 소재인 곰취, 곤드레, 눈개승마를 사용함. 곡물류의 경우 가격이 낮고 구입이 쉽고 발효가 비교적 쉬운 미강, 대두배아를 이용하여 발효 조건을 설정함.
- 산야초 소재는 강원도 정선의 산야초 재배업체로부터 생파치, 건파치를 획득하여 사용함. 건파치의 경우 목나물을 만드는 과정에서 과한 건조 또는 부서짐으로 인한 소재를 획득하였으며 건파치의 경우 산야초를 다듬고 남은 부분, 일부 잎사귀의 짓이겨짐 등으로 인한 파치소재를 얻어 사용함.



- 생파치의 경우 쉽게 부패될 수 있으므로 아래 그림과 같은 처리를 수행하여 최종적으로 열풍건조를 통해 수분이 7% 이하인 목나물 형태로 만들어 사용함.



①파치획득

②Blanching(90℃ 2min)

③열풍건조(70℃)

그림11. 생파치의 가공과정

- 균주의 경우 선별균주 5종을 각각 7L fermenter와 MRS Broth, Y/M Broth 배지를 이용하여 배양함, 유산균의 경우 37℃, 100rpm, 16hr 배양하고 효모의 경우 25℃ 100rpm 24hr 배양한 후 튜블라타입 원심분리기를 이용하여 15,000rpm, 30min 조건으로 분리 후 회수된 균체를 동결건조하고 포도당을 이용하여 1.00x10<sup>9</sup> cfu/g로 희석 후 Deep Freezer 에서 -80℃로 보관하며 실험에 사용하였음.
- 미생물은 같은 종이라 하더라도 유래에 따라 분비하는 물질은 서로 다를 수 있음 특히 유산균의 경우 단독으로 발효할 때 보다는 여러 종류가 서로 같이 발효될 때 생리활성 물질이 많이 분비되는 경우가 많음.
- 따라서 소재의 발효시 미생물 접종은 각각의 선별균주 5종을 0.2%씩 접종하여 총 소재의 건물중량의 1.0%를 접종하여 발효함.

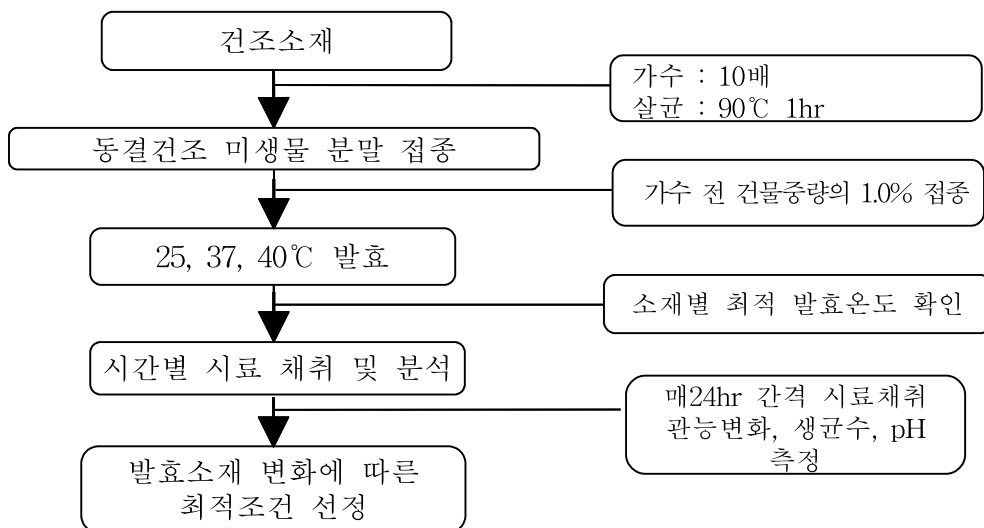


그림12 소재의 최적 발효조건 선정절차



- 발효 종료점은 소재 고유의 물성이 변하지 않고 이미 이취를 생성하지 않은 시간을 최적 발효 시간으로 선정함

표6 25°C 배양조건에 따른 산야초 및 곡물 소재의 생균수, pH, 관능변화 측정결과

소재	발효시간(hr)	생균수(cfu/g)		pH	연화	이취
		유산균	효모			
눈개승마	0	-	-	6.00	-	X
	24	1.30×10 <sup>7</sup>	7.11×10 <sup>8</sup>	5.80	X	X
	48	2.24×10 <sup>8</sup>	2.31×10 <sup>9</sup>	5.21	X	X
	72	7.33×10 <sup>8</sup>	1.10×10 <sup>9</sup>	5.13	O	O
곰취	0	-	-	5.60	-	X
	24	2.30×10 <sup>7</sup>	7.33×10 <sup>8</sup>	5.55	X	O
	48	9.33×10 <sup>8</sup>	2.31×10 <sup>9</sup>	5.23	O	O
	72	1.00×10 <sup>9</sup>	1.00×10 <sup>9</sup>	5.23	O	O
곶드레	0	-	-	5.84	-	X
	24	1.03×10 <sup>7</sup>	5.23×10 <sup>8</sup>	5.61	X	O
	48	1.20×10 <sup>8</sup>	1.27×10 <sup>9</sup>	5.34	O	O
	72	2.30×10 <sup>9</sup>	9.10×10 <sup>8</sup>	5.12	O	O
대두배아	0	-	-	6.31	-	X
	24	3.35×10 <sup>7</sup>	2.30×10 <sup>9</sup>	6.00	O	O
	48	1.24×10 <sup>8</sup>	1.63×10 <sup>9</sup>	5.52	O	O
	72	1.34×10 <sup>9</sup>	7.71×10 <sup>8</sup>	5.30	O	O
미강	0	-	-	6.40	-	X
	24	2.19×10 <sup>7</sup>	2.41×10 <sup>9</sup>	6.21	O	O
	48	3.23×10 <sup>8</sup>	1.70×10 <sup>9</sup>	5.83	O	O
	72	2.00×10 <sup>9</sup>	8.20×10 <sup>8</sup>	5.51	O	O

표7 37℃ 배양조건에 따른 산야초 및 곡물 소재의 생균수, pH, 관능변화 측정결과

소재	발효시간(hr)	생균수(cfu/g)		pH	연화	이취
		유산균	효모			
눈개승마	0	-	-	6.00	-	X
	24	2.00×10 <sup>7</sup>	4.23×10 <sup>7</sup>	5.13	X	X
	48	5.43×10 <sup>8</sup>	9.34×10 <sup>8</sup>	4.74	X	X
	72	1.30×10 <sup>9</sup>	2.10×10 <sup>9</sup>	4.70	X	O
곰취	0	-	-	5.60	-	X
	24	2.30×10 <sup>9</sup>	7.33×10 <sup>8</sup>	5.34	X	X
	48	9.33×10 <sup>8</sup>	2.31×10 <sup>9</sup>	4.55	X	O
	72	1.00×10 <sup>8</sup>	1.00×10 <sup>9</sup>	4.30	O	O
곶드레	0	-	-	5.84	-	X
	24	1.23×10 <sup>8</sup>	1.33×10 <sup>8</sup>	5.61	X	X
	48	1.59×10 <sup>9</sup>	1.20×10 <sup>9</sup>	4.64	X	O
	72	1.20×10 <sup>9</sup>	1.40×10 <sup>9</sup>	4.30	O	O
대두배아	0	-	-	6.31	-	X
	24	2.46×10 <sup>8</sup>	1.30×10 <sup>9</sup>	5.20	X	X
	48	2.00×10 <sup>9</sup>	2.13×10 <sup>9</sup>	4.45	X	X
	72	1.00×10 <sup>9</sup>	8.34×10 <sup>8</sup>	4.60	X	X
미강	0	-	-	6.40	-	X
	24	4.39×10 <sup>8</sup>	3.10×10 <sup>9</sup>	5.33	X	X
	48	2.13×10 <sup>9</sup>	5.60×10 <sup>9</sup>	4.63	X	X
	72	1.35×10 <sup>9</sup>	5.10×10 <sup>8</sup>	4.55	X	X

표8 40°C 배양조건에 따른 산야초 및 곡물 소재의 생균수, pH, 관능변화 측정결과

소재	발효시간(hr)	생균수(cfu/g)		pH	연화	이취
		유산균	효모			
눈개승마	0	-	-	6.00	-	X
	24	1.48×10 <sup>9</sup>	5.37×10 <sup>6</sup>	4.90	X	X
	48	8.49×10 <sup>9</sup>	7.39×10 <sup>7</sup>	4.63	X	X
	72	1.00×10 <sup>8</sup>	3.70×10 <sup>8</sup>	4.45	X	X
곰취	0	-	-	5.60	-	X
	24	3.80×10 <sup>9</sup>	4.45×10 <sup>8</sup>	4.34	X	X
	48	1.73×10 <sup>9</sup>	1.35×10 <sup>9</sup>	4.32	X	X
	72	1.20×10 <sup>9</sup>	1.00×10 <sup>9</sup>	4.30	O	O
곤드레	0	-	-	5.84	-	X
	24	2.03×10 <sup>8</sup>	3.53×10 <sup>7</sup>	4.60	X	X
	48	1.22×10 <sup>9</sup>	2.90×10 <sup>8</sup>	4.30	X	X
	72	5.60×10 <sup>8</sup>	8.89×10 <sup>8</sup>	4.36	O	O
대두배아	0	-	-	6.31	-	X
	24	1.00×10 <sup>9</sup>	3.10×10 <sup>8</sup>	4.30	X	X
	48	2.00×10 <sup>9</sup>	5.60×10 <sup>8</sup>	4.11	X	X
	72	8.00×10 <sup>8</sup>	5.10×10 <sup>8</sup>	4.60	O	O
미강	0	-	-	6.40	-	X
	24	7.70×10 <sup>8</sup>	2.10×10 <sup>8</sup>	4.51	X	X
	48	1.94×10 <sup>9</sup>	6.80×10 <sup>8</sup>	4.30	X	X
	72	1.30×10 <sup>9</sup>	2.40×10 <sup>8</sup>	4.51	O	O

- 각 소재별로 가장 빠른시간 발효되며 이미 이취를 생성하지 않은 조건은 미강, 대두 배아의 경우 40°C 48hr, 곰취, 곤드레의 경우 37°C 24hr, 눈개승마의 경우 25°C 24hr 배양시 최단시간에 물성변화 없이 가장 많은 발효정도를 나타내었음.

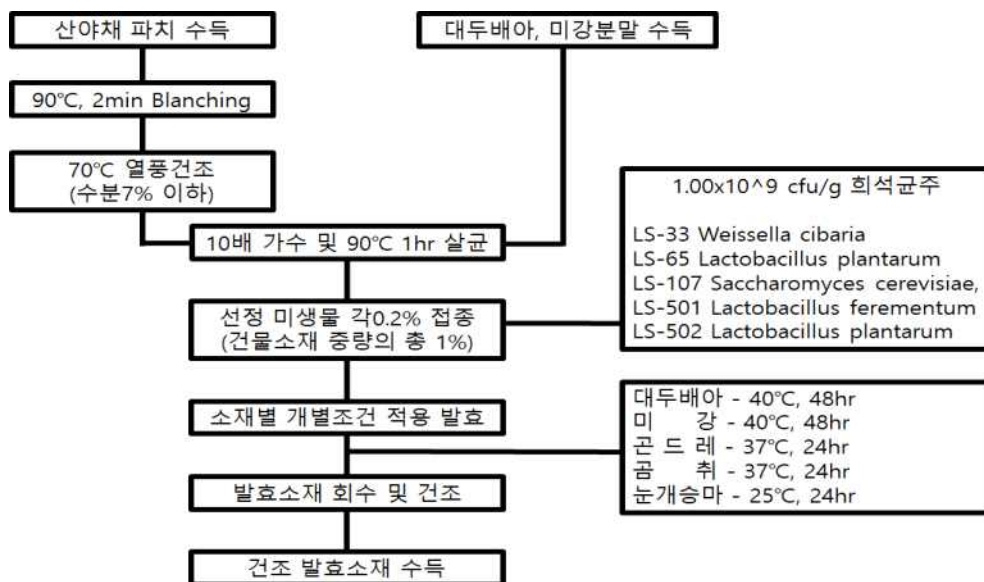


그림13. 최종결정된 소재의 발효조건

- 따라서 상기 실험 결과에 따라 각 소재별 최적 발효 조건은 위의 그림과 같이 10배 가수, 90°C 1hr 살균 후 면역활성이 있는 5개 균주( $1.00 \times 10^9$ cfu/g)를 소재 건물중량의 0.2% 총합 1.0% 접종하며 대두배아, 미강의 경우 40°C 48hr, 곰취, 곤드레의 경우 37°C 24hr, 눈개승마의 경우 25°C 24hr 발효 후 건조 하는 것으로 최종 발효 조건을 결정하였음.



25°C, 24hr 발효 눈개승마



발효 후 건조 눈개승마



37°C, 24hr 발효 곤드레



발효 후 건조 곤드레



37°C, 24hr 발효 곰취



발효 후 건조 곰취



40°C, 48hr 발효 미강



발효 후 건조 미강



40°C, 48hr 발효 대두배아



발효 후 건조 대두배아

그림14 결정된 발효조건에 따라 발효 및 건조된 소재

- 상기 그림 그림 과 같이 결정된 발효조건에 따라 발효 후 건조된 원료는 장관면역 활성, 관능평가 및 제품가공에서의 적합성 검토를 위하여 홍천메디컬허브연구소와 세준에프앤비로 발송함

2-1-3 홍천메디칼허브연구소 수행내용

(1) 발효산물의 장관면역개선 유효성 검증

가. 발효산물 추출물의 대식세포를 이용한 면역증강효능 분석

- 유용소재의 발효 전후 NO 생성량 비교

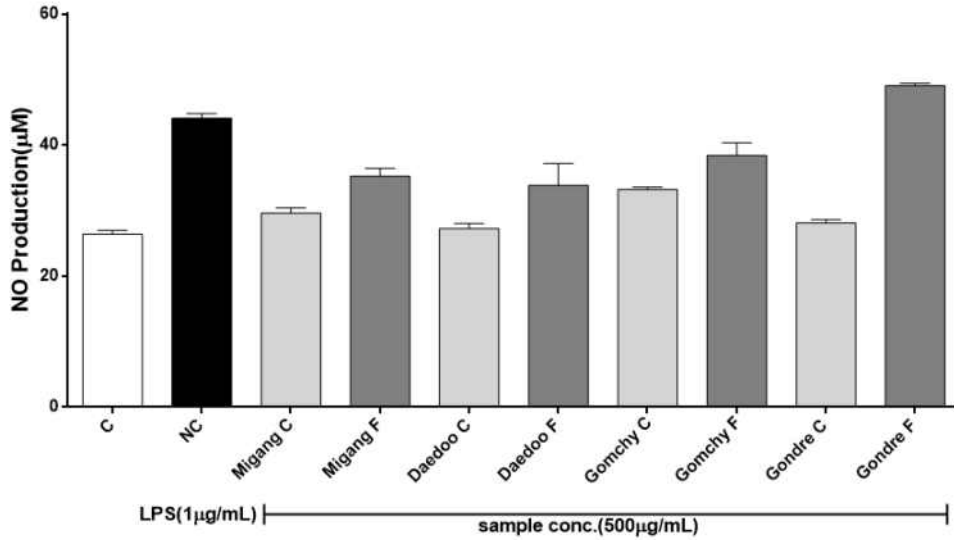


그림15. 유용소재의 발효 전·후 NO생성량 비교(C : 발효전, F : 발효후)

- 미강 (Migang), 대두 (Daedoo), 곰취 (Gomchy), 고려엉겅퀴 (Gondre)의 열수추출물을 제조하여 500 µg/mL의 농도로 처리하여 24시간 배양 후 NO생성량을 비교하였음.
- 상대적으로 발효전 소재 추출물에 비해 발효 후 소재추출물 처리군에서 NO생성량이 증가된 것을 확인할 수 있었음.
- 유용미생물을 활용한 발효산물이 소재의 NO 생성량을 증가시킨 결과로 사료됨.

- 발효산물의 용매추출 조건별 NO 생성량 비교

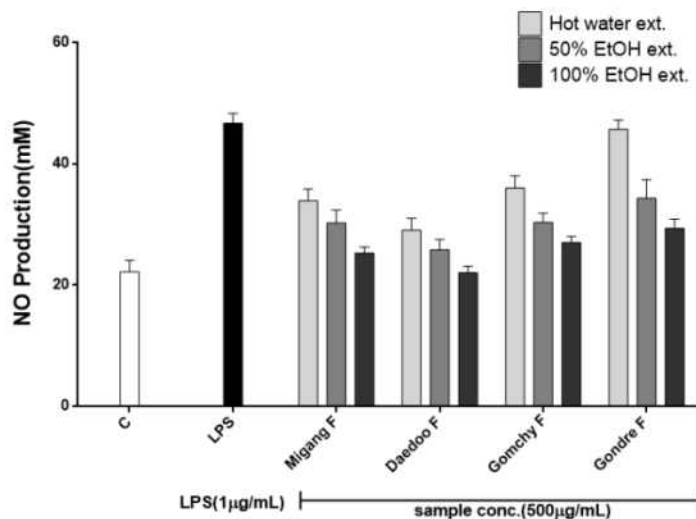
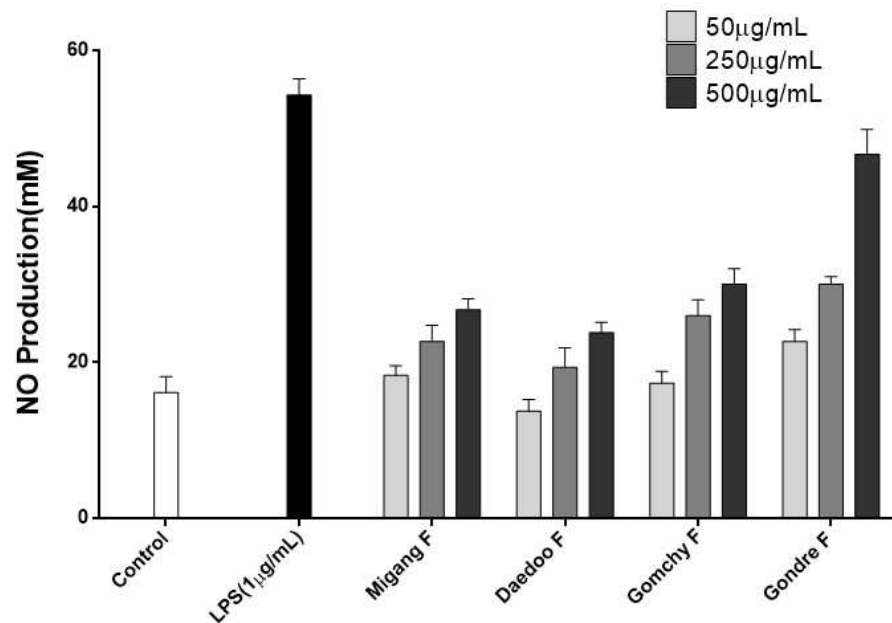


그림16. 발효산물의 추출용매별 NO생성량 비교



- 미강 발효산물(Migang F), 대두 발효산물(Daedoo F), 곰취 발효산물(Gomchy F), 고려영경귀 발효산물(Gondre F)의 열수, 50%주정 그리고 100%주정 추출물을 제조하여 마우스 대식세포(RAW264.7)에 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하여 24시간 배양 후 NO생성량을 비교하여 나타내었음.
  - 발효산물별 NO생성량은 고려영경귀, 곰취, 미강, 대두 순으로 나타났으며, 용매별로는 주정이 함유된 추출조건에 비해 열수추출조건에서 NO의 생성량이 높게 나타남.
  - 이후 실험에서는 발효산물별 열수 추출물을 제조하여 사용함.
- 발효산물 열수추출물의 농도별 NO 생성량 비교
- 미강 발효산물(Migang F), 대두 발효산물(Daedoo F), 곰취 발효산물(Gomchy F), 고려영경귀 발효산물(Gondre F)의 열수추출물을 대식세포에 50, 250, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 후 24시간 후에 NO의 생성량을 측정함.
  - 미강, 대두, 곰취, 고려영경귀의 발효산물 열수추출물의 대식세포에 처리농도가 증가할수록 NO의 생성량은 증가하였으며, 고려영경귀 발효산물 추출물 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 NO 생성량은 46.7  $\mu\text{M}$ 로 가장 높았으며, 다음으로는 곰취, 미강, 대두 순으로 나타남.



나. 발효산물의 추출물 항산화 효능평가

○ 발효산물 추출물의 총페놀성 화합물 함량 분석

- (주)웰빙엘에스에서 제공받은 미강, 대두, 곰취, 고려영경귀의 발효산물을 10배수의 물을 가하여 100°C의 온도에서 4시간씩 2회 추출하여 시험에 사용하였음.

9. 발효산물 추출물별 총페놀성화합물 함량

Sample name	(Tannic acid, g/100g)
Migang F	5.30 ± 0.29
Daedoo F	1.40 ± 0.03
Gomchy F	2.37 ± 0.15
Gondre F	2.83 ± 0.10

- Tannic acid를 이용하여 검량곡선을 그리고 측정값을 환산하여 발효산물 열수추출물의 총페놀성화합물의 함량을 구하였음.
- 발효산물의 열수 추출물에는 총페놀성화합물의 함량이 비교적 높지 않은 것을 나타냄.

○ 발효산물 추출물의 DPPH radical 소거능 측정

표10. 발효산물 추출물별 DPPH radical 소거능

Sample name	scavenging activity, %
Migang F	32.12%
Daedoo F	29.45%
Gomchy F	49.04%
Gondre F	51.22%

- 발효산물 열수추출물 1mg/mL의 농도에서 DPPH 라디칼 소거능을 측정하여 %값으로 나타냄.
- 발효산물의 열수추출물 중 고려엉겅퀴 발효산물의 추출물(1mg/mL)이 51.22%의 DPPH radical 소거능을 나타냄.
- 라디칼 소거능은 고려엉겅퀴, 곰취, 미강, 대두 순으로 나타남.

다. 발효산물 추출물의 면역억제 동물모델을 이용한 장관면역 개선 효능 평가

○ Cyclophosphamide 투여 면역억제모델 설정

- Cyclophosphamide (CY)는 각종 암과 육종, 백혈병, 악성림프종에 널리 사용되는 면역억제제임. 면역억제제인 cyclophosphamide 처리에 의해 면역이 억제된 마우스의 면역력 증강 활성을 측정함으로써 시험물질의 면역 증강 소재로서의 가능성을 평가함.
- 동물윤리 심의번호(실험동물18-02)
- 시험목적 : 면역활성을 나타내는 발효산물을 위내투여하여 면역이 증가된 동물모델과 일반사료를 급여한 동물에서의 장관면역증진을 확인하기 위해 장기의 무게, Peyer's patch cell에서 생성되는 cytokine들을 비교·평가하고자 함.
- 시험기간 : 2018.08.30. ~ 2018.09.20.
- 시험물질 및 대조물질
  - 용매 : 생리식염수
  - 면역억제유발물질: Cyclophosphamide 150mg/kg
  - 대조물질 : 홍삼농축액 500mg/kg
  - 시험물질 : 발효곤드레 추출물 500 mg/kg, 발효곰취 추출물 500 mg/kg,

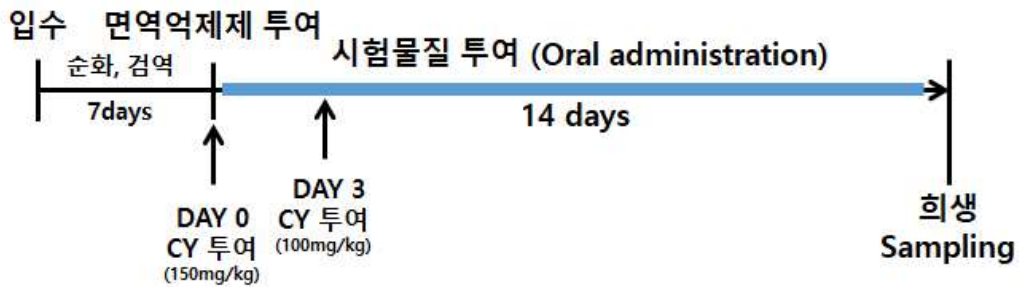


발효대두 추출물 500 mg/kg, 발효미강 추출물 500 mg/kg

- 실험동물 : Balb/c mouse, 수컷, 6주령, 72마리
- 시험군의 구성 및 투여량
- 시험군의 구성

	동물	실험처치	투여용량 (mg/kg/day)	동물 수 (♂)
무처치군	Balb/c	Vehicle	-	10
양성대조군		Cyclophosphamide(CY)	150mg/kg(1회) 100mg/kg(2회)	10
음성대조군		홍삼추출물	500mg/kg	10
시험군 1		CY + 발효곤드레 열수추출물	500mg/kg	10
시험군 2		CY + 발효곰취 열수추출물	500mg/kg	10
시험군 3		CY + 발효대두 열수추출물	500mg/kg	10
시험군 4		CY + 발효미강 열수추출물	500mg/kg	10

- 시험일정



- 시험 결과

- 체중의 변화

- 실험동물은 체중은 면역억제제 투여 전과 투여 후, 후보소재 투여 7일째 및 동물 희생 직전(14일)에 측정하였다. 실험동물의 체중을 측정한 결과는 아래 그림과 같음.

그림17. 면역억제 동물모델에 시험물질 투여 후 체중 변화

- Cyclophosphamide 1회 투여 후부터 Cyclophosphamide 투여한 모든 군에서 체중이 감소하기 시작하고 2회 투여후 7일째까지 체중이 감소하였으나 후보소재 투여 7일 이후부터는 CY와 후보소재 투여군에서 체중의 감소가 관찰되지 않았음.
- 후보소재 투여 7일째 CY 를 투여한 모든 군은 NC 군과 비교하여 유의적으로 체중이 감소되었고( $p < 0.001$ ), 14일에는 CY+발효곤드레군, CY+발효대두군 및 CY+발효미강군에서 유의적인 차이를 나타내었다( $p < 0.05$ ).
- 비교군인 CY+홍삼추출물군을 포함한 CY를 투여한 모든 군 사이에는 유의적인 차이가 없었음.

- 장기 무게 변화

- 면역억제제 투여 후 2주간 각 후보소재를 투여한 실험동물을 희생하여 방혈 없이 각 장기를 적출하였고 비장 및 흉선의 장기 무게와 체중 100g 대비 무게를 측정하였음.

그림18. 면역억제 동물모델에 시험물질 투여 후 장기무게 변화

- 일반적으로 생체 내 면역기능 측정 기준으로 인지되는 비장 및 흉선지수는 식이 성분에 의해 유의적인 영향을 받기 때문에 식이로 인한 이들의 체내측정치 차이는 곧 부분적으로 입과구 생성 능력의 차이를 초래하고, 이것은 특정질환 감염 시 더욱 큰 영향을 받는 것으로 해석되며, 또한, 일반적으로 면역조절제(immunopotentiator)는 비장과 흉선의 무게를 증가시킨다고 알려져 있다.
- 흉선의 무게는 면역억제제를 투여한 CY 군(31.98 mg), CY+홍삼추출물 투여군(31.54 mg), CY+발효곤드레투여군 (28.44 mg), CY+발효곰취투여군, CY+발효대두투여군 및 CY+발효미강투여군에서 NC군과 42.78 mg 과 비교하여 무게가 유의적으로 감소하였다( $p < 0.05$ ). 체중 100g 당 흉선의 무게비율은 절대무게와 유사한 결과를 나타내었음.
- 비장의 무게는 NC군(83.02 mg)과 비교하여 CY 단독투여군(106.32 mg), CY+홍삼추출물 투여군(106.84 mg), CY+발효곰취투여군( 106.8 mg)에서 유의적으로 증가하였고( $p < 0.05$ ), CY+발효곤드레투여군, CY+발효대두투여군 및 CY+발효미강투여군에서는 통계적으로 유의적인 차이가 없었음.

- CY+발효곤드레투여군은 CY 단독투여군보다 유의적으로 비장의 무게가 감소하였음 ( $p < 0.05$ ).
  - 체중 100g 대비 비장의 무게비율은 CY 단독투여군(0.468 mg), CY+홍삼추출물 투여군(0.477 mg), CY+발효곰취투여군(0.464 mg) 및 CY+발효미강투여군(0.437 mg)에서 NC군 0.351 mg 과 비교하여 유의적으로 증가하였고( $p < 0.05$ ), CY+발효곤드레투여군은 CY 단독투여군과 비교하여 유의적으로 비장의 무게가 감소하였음( $p < 0.05$ ).
- 혈액생화학분석
- 실험기간이 종료된 시점에서 12시간 동안 절식시킨 후, 마취하여 심장으로부터 혈액을 채취하였다. 혈액은 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 분석 전까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.
  - 시료 투여로 인한 간 및 신장 기능에 미치는 영향을 알아보기 위해 간 기능 지표인 aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase (ALT) 및 creatinine을 측정하였고, 그 외 알부민(Albumin), Alkaline phosphatase (ALP), Bilirubin을 생화학 측정기(Kornelab20XT, Thermo Scientific, USA)를 이용하여 분석하였다.
  - 일반적으로 AST, ALT활성은 간질환이 발생되었을 때 증가되며, 고지방식이나 알코올 섭취 등으로 간질환이 생기거나 간 유해물질과 유독물질이 존재할 때 간 실질세포가 손상되어 혈액속으로 AST, ALT의 유리가 항진되어 효소활성도가 높아진다.

그림19. 면역억제 동물모델에 시험물질 투여 후 ALT 및 AST 변화

- ALT 농도는 모든 군간 유의적인 차이를 보이지 않았지만 AST는 NC군 (59.70 U/L)에 비교하여 CY 단독투여군(167.2 U/L)이 유의적으로 급격히 증가하였다( $p < 0.01$ ). 그 외 NC군과 비교하여 CY와 발효소재를 투여한 군에서는 통계학적으로 유의미한 차이를 보이지 않았음.
- CY+홍삼추출물 투여군 (39.04 U/L)과 CY+발효미강투여군(57.98 mg)은 CY 단독투여군(167.2 U/L)과 비교하여 유의적으로 감소하였음( $p < 0.01$ ).

그림20. 면역억제 동물모델에 시험물질 투여 후 혈액학적 변화

- Bilirubin은 heme metabolism의 폐기물로 황달과 뇌에 침착되어 신경 독성을 유발하는 것으로 일반적으로 알려져 있음. 그러나 Bilirubin은 항산화 특성을 가지고 있으며 생리학적 농도에서 효율적인 peroxy radical scavenger로서의 기능이 있음.
- NC 군 (0.361 mg/dL)과 비교하여 CY 단독투여군 (0.323 mg/dL)에서 Bilirubin 수치가 약간 감소하는 경향을 보였으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었음.
- CY+발효대두투여군(0.415 mg/dL)은 CY 단독투여군에 비교하여 Bilirubin 수치가 유의적으로 증가하였음( $p < 0.01$ ).
- 그 외 ALP, ALB, Creatin 수치는 NC군과 비교하여 유의적인 차이를 나타내지 않았음.

- 혈액생화학분석 혈액 내 사이토카인분석

- 발효소재를 2주간 투여한 마우스의 심장에서 채혈하여 3,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 얻은 혈장을 실험에 사용하였다. 혈장 내의 사이토카인은 ELISA Kit (Koma biotech, Korea)를 이용하여 IL-6 농도를 측정하였음.
- 사이토카인은 면역세포에서 생성되는 수용성 단백질로서 이들은 하나의 네트워크를 형성하여 세포의 증식과 활성화, 분화의 조절과 염증세포를 활성화시키고 사이토카인

의 생성을 증가 또는 억제하는 등 외부 항원에 대한 여러 면역세포간의 협력을 증대하므로, 이들의 생성과 분비는 면역반응조절에 있어서 매우 중요함.

- Cyclophosphamide는 면역억제제로 주로 T 림프구의 수를 현저히 감소시켜 면역세포로부터 분비되는 단백질로서 표적 세포에 신호를 전달하여 면역반응의 조절에 중요한 역할을 담당하고 있는 사이토카인의 분비를 억제시킴.

#### 그림21. 면역억제 동물모델에 시험물질 투여 후 혈액 내 IL-6 변화

- NC 군 (4.84 pg/ml)과 비교하여 CY 단독투여군(4.37 pg/ml)의 혈액내 IL-6 수치가 감소하는 경향을 나타내었고, CY와 발효소제를 투여한 모든 군에서는 CY 단독투여군보다 증가하는 경향을 나타내었지만 유의성은 나타나지 않았음.

#### - 혈액 내 면역글로블린 분석

- 면역세포 중 B세포는 외부에서 침입한 특이적인 항원에 대해서 면역글로블린 (immunoglobulin, Ig)이라고 불리는 항체를 생산하여 체액성 면역반응을 유도함. IgG는 정상혈액에서 가장 중요한 기능을 하는 면역글로블린으로 전체 면역글로블린의 70-75%를 차지함. IgG는 세균 및 바이러스, 곰팡이 뿐만 아니라 독소 등과 같은 다양한 병원체에 대한 면역을 담당하며, 특히 2차 면역반응 이후 중요한 역할을 담당함. IgG 생성이 증가하면 세균 및 바이러스, 곰팡이, 독소 등과 같은 다양한 병원체에 대한 방어 작용 등 면역력 증강에 효과가 있다고 해석할 수 있음.

그림22. 면역억제 동물모델에 시험물질 투여 후 혈액 내 IgG 변화

- NC 군 (2810.7 ng/ml)과 비교하여 CY 단독투여군(2722.6 ng/ml)은 혈액내 IgG 수치의 차이가 나타나지 않았음.
- CY+발효곤드레투여군(2896.5 ng/ml), CY+발효곰취투여군( 2963.8 ng/ml), CY+발효대두투여군(3106.4 ng/ml) 및 CY+발효미강투여군(3112.2 ng/ml)은 CY 단독투여군보다 증가하는 경향을 나타내었지만 유의성은 나타나지 않았음.

- 분변 내 IgA 분석

- IgA는 장관 내 Peyer's patch에 유도되는 면역 항체로 장관 내의 여러 유해한 이물질, 병원성 미생물의 점막 상피부착을 억제하고, 장내로 유입되는 박테리아, 바이러스에 대한 항체활성을 가지고 있어 장관점막 면역반응에 중요한 역할을 함이고 알려져 있음.

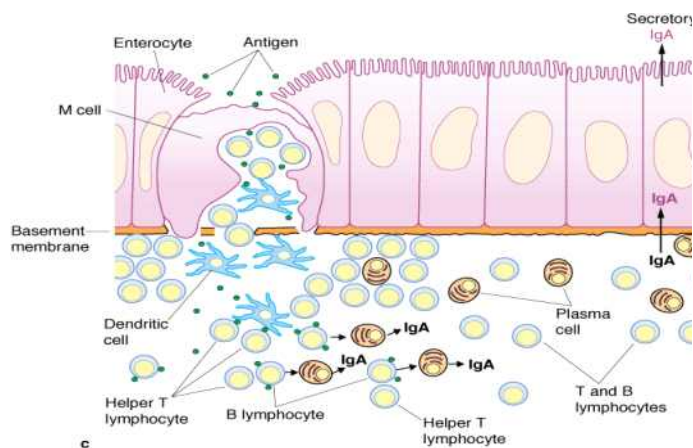
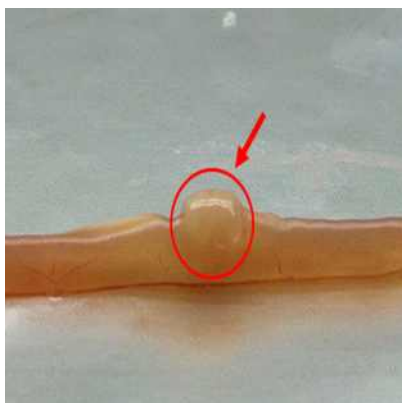


그림23. 좌) Peyer's patch 우) Peyer's patch에서 sIgA 분비 모식도

- Peyer's patch 내 면역세포가 활성화되면 IgA의 생성능이 증가되고 장관 내에 분변 중에는 장내로 분비된 IgA가 상당량이 포함되어 있음. 따라서 면역소재의 2주간 경구 투여 후 분변 중에 존재하는 잔여 IgA를 측정하였음.



표11. 면역억제 동물모델에 시험물질 투여 후 분변 내 IgA 변화

Groups	Dosage	Realtive IgA content in stools(%)
CY		100.0 ± 3.75
CY+Red G	500	103.8 ± 3.78
CY+Gon	500	117.9 ± 6.23***
CY+Gom	500	119.3 ± 6.12***
CY+Dae	500	117.0 ± 4.85***
CY+Mi	500	117.6 ± 5.05***

- Cyclophosphamide 투여로 면역을 억제한 동물모델에 유용미생물 생물전환 산채 곡류활용 소재 4종을 2주간 위내투여한 결과 분변 내 IgA 증가율은 CY 단독투여군과 비교하여 CY+홍삼추출물투여군은 유의적인 차이를 나타내지 않았지만, CY+발효곤드레투여군은 17.9%), CY+발효곰취투여군19.3%, CY+발효대두투여군17.0%, CY+발효미강투여군 17.6% 가 유의적으로 증가하는 것으로 나타남(p<0.001).
- 위 결과를 종합하여 볼 때 Cyclophosphamide 유래 면역억제 동물모델에서 유용미생물 생물전환 산채 곡류활용 소재(발효곤드레, 발효곰취, 발효대두, 발효미강)의 면역증강 효능을 평가한 결과 면역억제물질만 투여한 CY 단독투여군에 비해 유의적인 수준에서 사이토카인과 면역글로불린의 증가가 확인되지는 않았지만 모든 유용미생물 생물전환 산채 곡류활용 소재에서 대체적으로 CY군 대비 혈액 내 사이토카인과 면역글로불린의 농도가 증가하였음.
- 특히 장관내로 분비된 IgA가 모든 발효소재 투여군에서 유의적으로 증가함에 따라 유용미생물 생물전환 산채 곡류활용 소재가 면역억제 동물모델에서 면역증강 효과가 있는 것으로 판단됨.

(2) 발효산물의 면역개선 기작 분석

가. 대식세포를 이용한 발효산물 처리에 의한 바이오마커 발현 분석

- Real-time PCR을 이용한 mRNA 발현 level 분석

표12. primer sequence

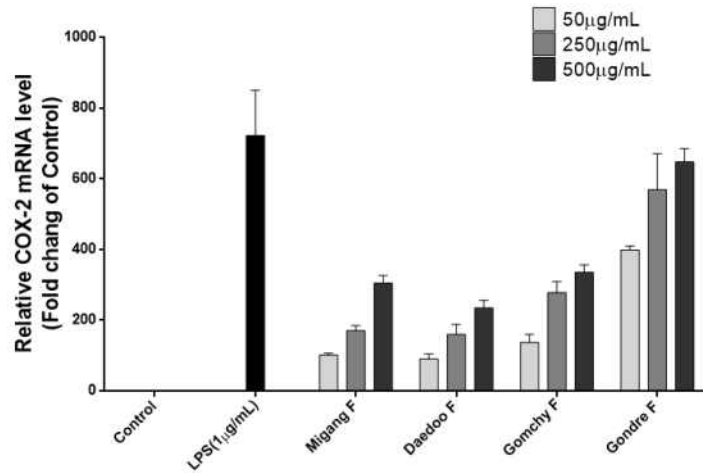
iNOS	sense	5'-CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC-3'
	antisense	5'-GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3'
COX-2	sense	5'-CACTACATCCTGACCCACTT-3'
	antisense	5'-ATGCTCCTGCTTGAGTATGT-3'
TNF- $\alpha$	sense	5'-TCTCATCAGTTCTATGGCCC-3'
	antisense	5'-GGGAGTAGACAAGGTACAAC-3'
GAPDH	sense	5'-CACTCACGGCAAATTC AACGGCAC-3'
	antisense	5'-GACTCCACGACATACTCAGCAC-3'

- Real-time PCR을 이용한 유전자 발현 측정은 24시간 배양된 세포에서 TRIzol reagent

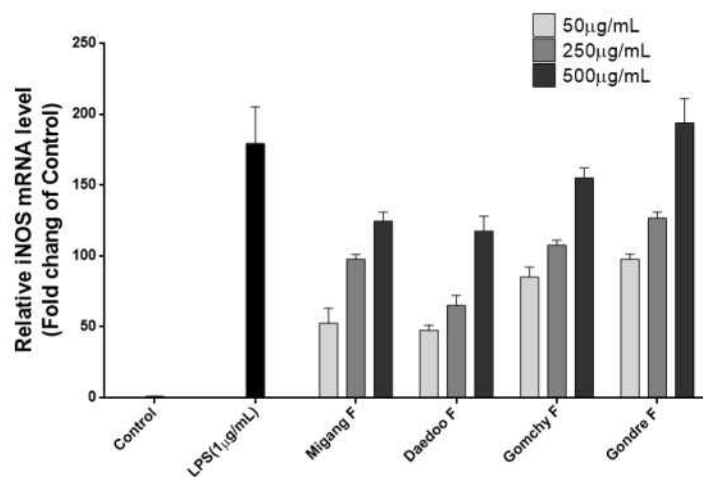
(Invitrogen, CA, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였음.

- 추출된 RNA 정량하여 cDNA를 합성한 후 SYBR green과 GAPDH, COX-2, iNOS, TNF- $\alpha$  primer를 이용하여 real-time PCR을 수행하였고 대조군 유전자로는 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 사용하였다. Real-time PCR system(StepOne Real-time PCR system, Applied Biosystems, Singapore)을 이용하여 형광신호를 정량하였음.

A.



B.



C.

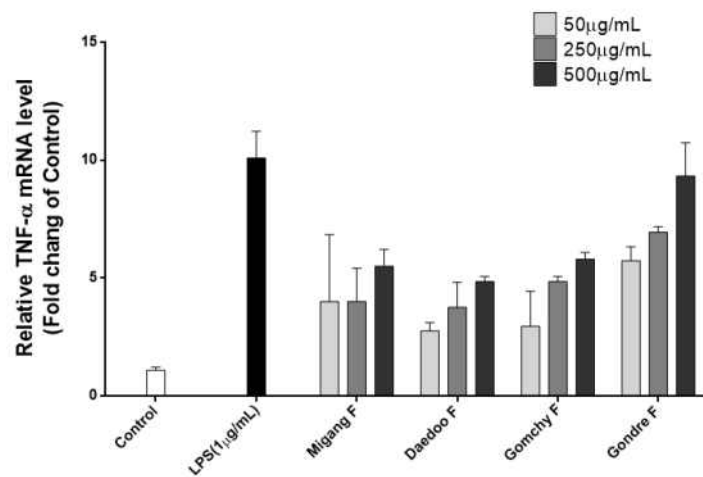


그림24. 추출물 처리에 의한 mRNA 발현 level

- 미강, 대두, 곰취, 고려엉겅퀴의 발효산물 열수추출물의 대식세포에 처리농도가 증가할수록 COX-2, iNOS, TNF- $\alpha$ 의 유전자 발현도 증가하는 것으로 나타남.
- 곡물 소재 중 미강의 면역증강 효능이 대두 발효산물에 비해 상대적으로 높게 나타났으며, 산채소재 중에는 고려엉겅퀴 발효산물 추출물에서 NO 생성률, 면역관련 유전자 발현 level이 더 높게 나타남.

(3) 발효산물에서 지표성분의 선정

가. 유용소재의 확보 및 추출물 제조

○ (발효 전) 산채·곡류 소재 확보

- 산채·곡류 소재의 추출물 제조를 위하여 선행연구 내용과 결과를 반영하여 아래와 같이 후보소재 4종(산채류 2종, 곡류 2종)의 지표성분을 선정하였음.
- 강원도 지역에서 자생하고 있는 곤드레의 지표성분은 pectolinarin( $C_{29}H_{34}O_{15}$ , MW. 622.57) 및 이의 비배당체 형태인 pectolinarigenin( $C_{17}H_{14}O_6$ , MW. 314.29)으로 밝혀져 있음.(Jeong et al., Arch Pharm Res Vol 31, No1, 28-33, 2008).
- 곰취 추출물의 지표성분으로 선정한 caffeoyl quinic acid 계열 중 추출물에서도 검출하기가 용이하고 함량이 높고, HPLC 분리능이 양호하다고 밝혀져 있다(J Korean Soc Food Sci Nutr Vol 45, No1, 61-67, 2016).
- 대두배아 추출물의 지표성분으로 선정한 이소플라본류 6종은 「건강기능식품의 기준 및 규격」 대두배아의 지표성분으로 대표적인 생리활성 물질로 알려져 있음.
- 미강 추출물의 지표성분으로 선정한 GABA는 미강의 유용성분으로 특히 주목되고 있는 기능성 성분의 하나임(Animal Cells and Systems Vol 18, 93-100, 2014).

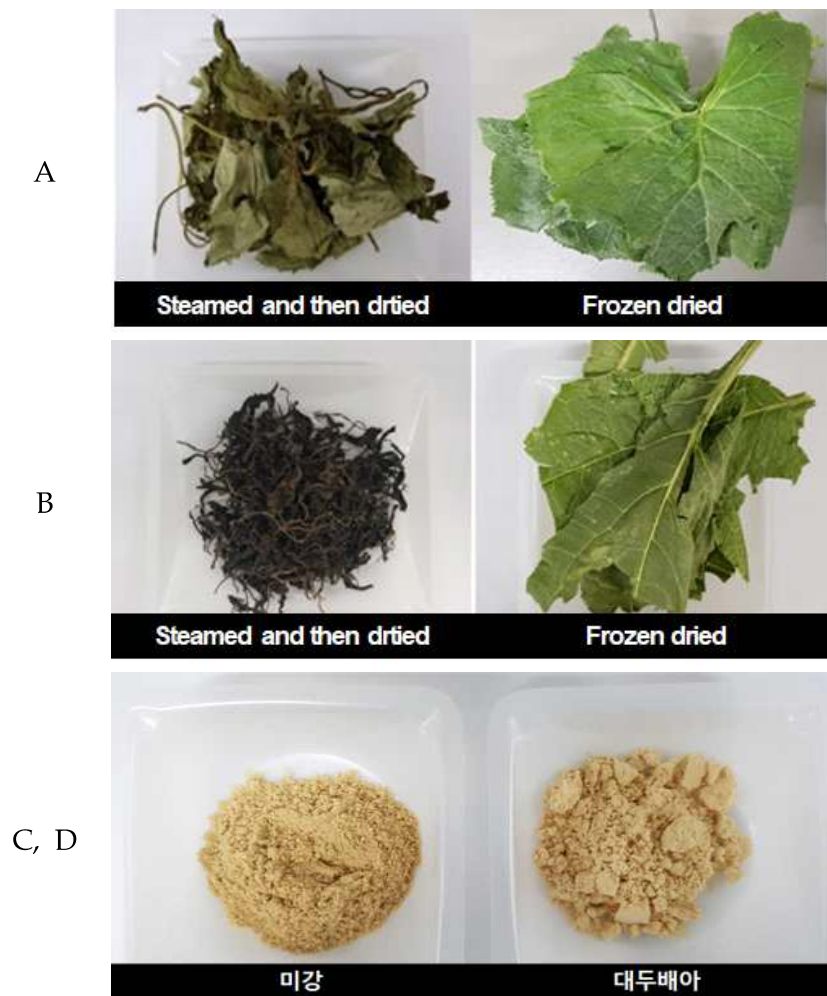


그림25. 산채·곡류 소재류 4종  
(A: 곰취, B: 곤드레, C: 미강, D: 대두배아)

※ steamed and then dried : 데침 후 건조시킨 시료(묵나물), frozen dried : 생물을 동결건조시킨 시료(생물)

○ (발효 후) 발효산물 소재 확보

- 발효산물 추출물 제조를 위하여 선정된 4종의 발효산물을 (주)웰빙엘에스로부터 받아 사용하였음.



A: 산채류 2종(곰취, 곤드레)

B: 곡류 2종(대두배아, 미강)

그림26. 발효산물 소재류 4종

○ 산채·곡류 발효산물 소재의 추출물 제조

- 추출물 제조는 아래와 같이 분쇄, 칭량, 추출, 여과, 농축 과정으로 진행하였음. 추출액을 speed vaccum system을 이용하여 최종 농축하였음.



산채·곡류 소재분말



추출용매 첨가



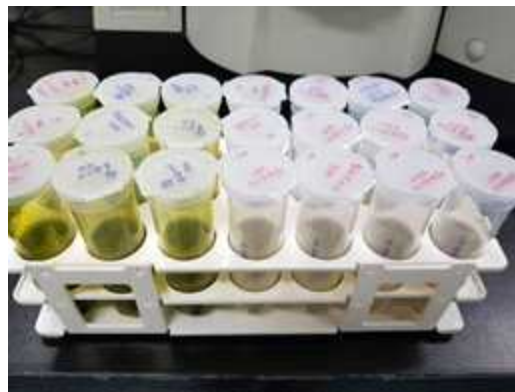
추출(70°C, 2hr)



여과



농축



발효산물 소재 추출물 제조 완료

그림27. 산채·곡류 발효산물 소재 추출물 제조 공정도

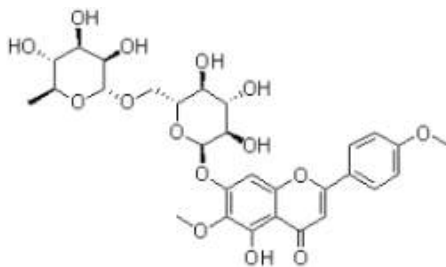
- 본 실험에서 사용한 발효시키지 않은 소재류는 믹서로 세절한 후 사용하였고, 발효산물 소재 분말은 (주)웰빙엘에스로부터 전달받은 시료를 사용하였음.
- 산채·곡류 분말 시료를 각 시료를 약 5g 칭량하여 추출원료로 사용하였음.
- 환류추출기(DH.WEB01008(WiseBath))를 이용하여 추출조건별(원료·추출용매)로 추출을 진행하였음. 추출은 각 조건별 용매를 투입하고 온도, 시간을 맞추어 추출하였음.



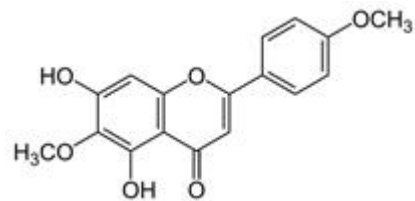
- 추출액을 filter paper(No.1 Whatman international, UK)로 여과하고 최종추출액을 speed vacuum system(HT-4X)을 이용하여 최종 농축 후 추출물을 얻었음. 농축이 완료된 추출물은 추출·분리정제실 데시케이터(SP-WFN)에서 보관하였음.

나. 선정된 산채·곡류 발효산물 소재 유효(지표)성분 선정

- 본 연구에서는 산채·곡류 소재의 참고문헌 검색 및 선행연구 결과를 바탕으로 아래와 같은 지표물질을 선정하였다.
- 곤드레 추출물의 지표물질 선정
  - 곤드레 추출물로부터 지표성분은 Pectolarin 및 Pectolarigenin로 선정하였다.
  - 강원도 지역에서 자생하고 있는 곤드레의 지표성분은 pectolarin( $C_{29}H_{34}O_{15}$ , MW. 622.57) 및 이의 비배당체 형태인 pectolarigenin( $C_{17}H_{14}O_6$ , MW. 314.29)으로 밝혀져 있음.(Jeong et al., Arch Pharm Res Vol 31, No1, 28-33, 2008).



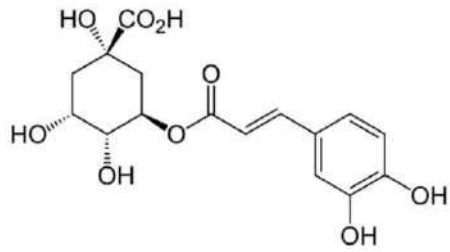
Pectolarin



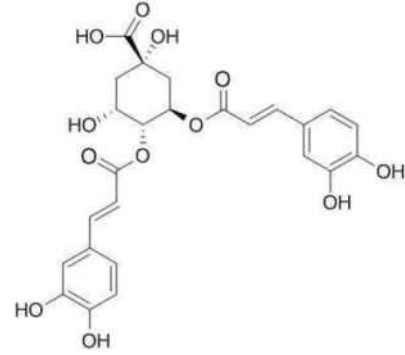
Pectolarigenin

그림28. 곤드레 지표성분 구조

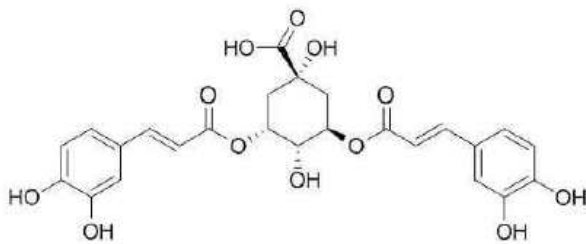
- 곰취 추출물의 지표물질 선정
  - 곰취 추출물로부터 지표성분은 Chlorogenic acid, 3,4-di-caffeoyl quinic acid, 3,5-di-caffeoyl quinic acid, 4,5-di-O-caffeoyl quinic acid로 선정하였다.
  - 곰취 추출물의 지표성분으로 선정한 caffeoyl quinic acid 계열 중 추출물에서도 검출하기가 용이하고 함량이 높고, HPLC 분리능이 양호하다고 밝혀져 있다(J Korean Soc Food Sci Nutr Vol 45, No1, 61-67, 2016).



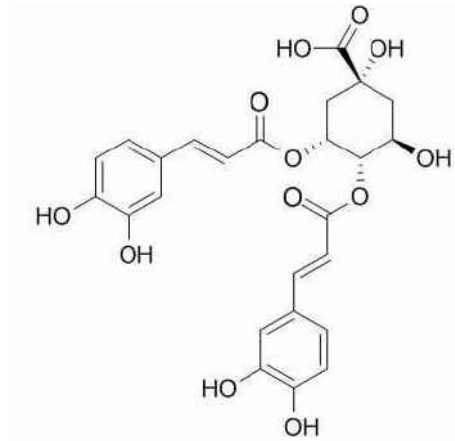
Chlorogenic acid



3,4-di-caffeoyl quinic acid



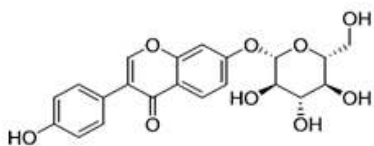
3,5-di-caffeoyl quinic acid



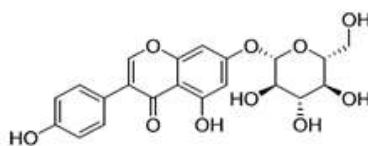
4,5-di-O-caffeoyl quinic acid

그림29. 곰취 지표성분 구조

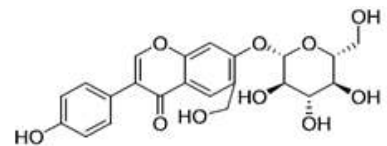
- 대두배아 추출물의 지표물질 선정
  - 대두배아 추출물로부터 지표성분은 Daidzin, Genistin, Glycitin, Daidzein, Genistein, Glycitein로 선정하였음.
  - 대두배아 추출물의 지표성분으로 선정한 이소플라본류 6종은 「건강기능식품의 기준 및 규격」 대두배아의 지표성분으로 대표적인 생리활성 물질로 알려져 있음.



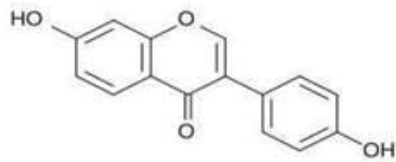
Daidzin



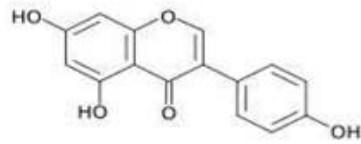
Genistin



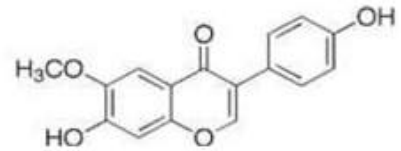
Glycitin



Daidzein



Genistein

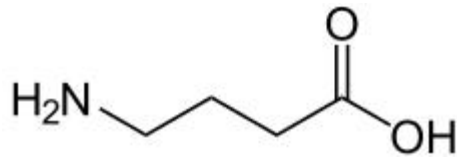


Glycitein

그림30. 대두배아 지표성분 구조

○ 미강 추출물의 지표물질 선정

- 미강 추출물로부터 지표성분은 GABA(Gamma amino butyric acid)로 선정하였음.
- 미강 추출물의 지표성분으로 선정한 GABA는 미강의 유용성분으로 특히 주목되고 있는 기능성 성분의 하나임(Animal Cells and Systems Vol 18, 93-100, 2014).



GABA( $\gamma$ -amino butric acid)

그림31. 미강 지표성분 구조

- 다. 유효(지표)성분의 분석법 확립 및 발효산물 소재의 발효전·후에 따른 함량 분석
- 선정된 발효산물 소재의 유효(지표)성분의 함량 분석을 실시하기 위하여 HPLC를 이용하여 최적 분석 조건을 확립하였음.
  - 곤드레 지표성분 동시분석법 확립 및 발효전·후에 따른 지표성분 함량비교
    - HPLC 분석법 확립

Instruments	Shimadzu HPLC system (HPLC-UV)													
Column	XBridge C18 (4.6 x 250 mm, 5 um)													
Mobile phase	Solution(A) : 0.05% TFA in D.W Solution(B) : 0.05% TFA in ACN													
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>B Conc. (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.1</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>11</td> <td>47</td> </tr> <tr> <td>22</td> <td>47</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>-</td> </tr> </tbody> </table>	Time (min)	B Conc. (%)	0.1	30	6	30	11	47	22	47	25	30	30
Time (min)	B Conc. (%)													
0.1	30													
6	30													
11	47													
22	47													
25	30													
30	-													
Oven temp.	40℃													
Wavelength	340 nm													
Injection volume	10 uL													
Flow rate	1 ml/min													
Run time	30 min													

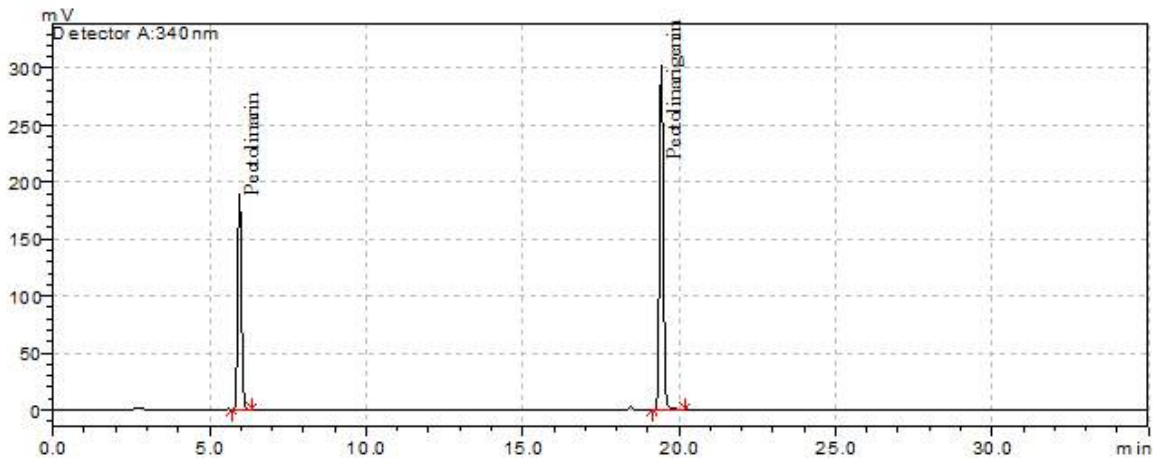
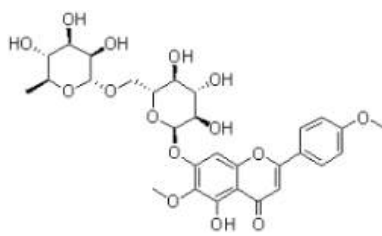
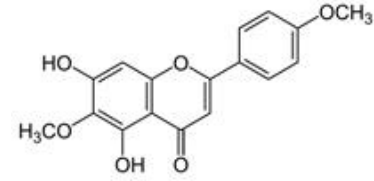


그림32. 곤드레 지표성분 2종의 크로마토그램

- 본 실험에서는 발효 전·후에 따른 곤드레의 지표성분의 함량변이를 확인하기 위하여 곤드레의 조건별 추출물에 대한 지표성분 2종의 함량을 분석하였음.

표13. 곤드레 유효(지표)성분 2종의 정보

	표준품명	Pectolarin	Pectolarigenin
지표 성분	구조식		
	분자식	C <sub>29</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
	분자량	622.57	314.29
	CAS No.	28978-02-1	520-12-7

- HPLC-UV로 곤드레 추출물에서 확립된 2종의 지표성분의 동시분석법으로 함량분석을 진행하였음. 최적화된 크로마토그램 분리는 C18 컬럼(4.6 x 250 mm, 5um, XBridge) 과 이동상은 0.05% Trifluoroacetic acid가 포함된 물과 아세트니트릴을 사용하였고 온도는 40℃를 유지하였다. 유속은 1ml/min, UV 검출기의 파장은 340nm에서 확인하였음.
- 2종의 표준용액을 약 3.6-130 ppm 농도 범위에서 실험을 실시하였으며 면적대 농도비의 관계로 검량선을 작성하였음. 모든 검량선은 실험범위 내에서 높은 상관계수를 나타내었음(R<sup>2</sup>≥0.99).

표14. 곤드레 유효(지표)성분 2종의 calibrarion curve

지표성분	Concentration	Regression equation	R2
Pectolarin	4.1-130	y = 23676x + 6654.3	1
Pectolarigenin	3.6~115	y = 43394x + 8269	1

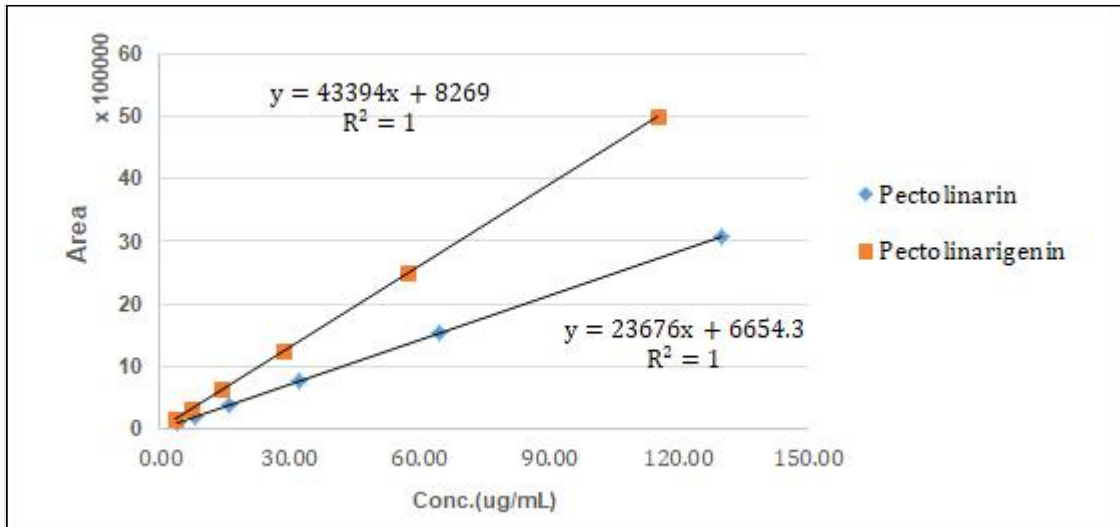


그림33. 곤드레 유효(지표)성분 2종 검량선 그래프

- 분석시료 전처리는 각 조건별 추출물 약 10mg을 25mL의 추출용매(DMSO)에 녹여 syringe filter(0.45 um)로 여과한 후 HPLC 분석에 사용하였음.
- 발효 곤드레의 최적의 추출조건 확립을 위해 발효 곤드레에 함유된 Pectolarin, Pectolarigenin의 분석을 진행하였음.

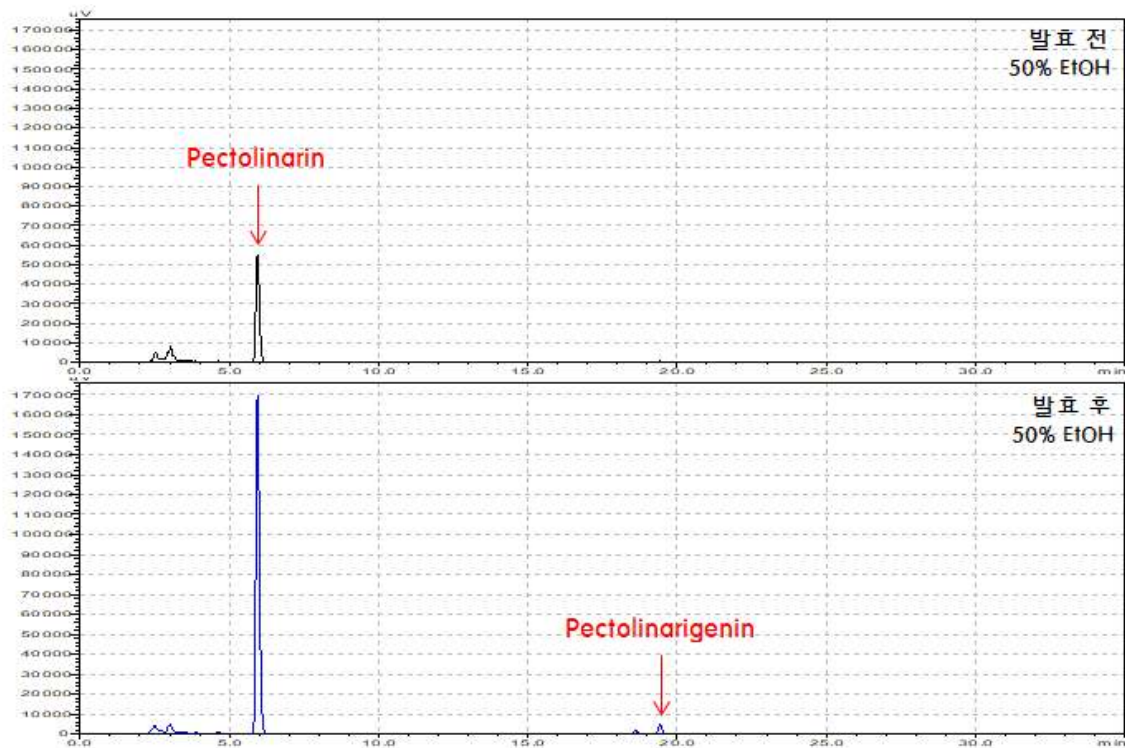


그림34. 곤드레 발효전·후에 따른 추출물의 HPLC chromatogram



- 곤드레 발효 전·후에 따른 pectolinarin 및 pectolinarigenin 함량의 변화를 확인한 결과, 발효 전 pectolinarin의 함량이 77.65 mg/g으로 50% EtOH 용매비율에서 가장 높게 확인되었고 pectolinarigenin의 확인되지 않았음.
- 곤드레의 발효산물에서의 지표성분 함량분석 결과, 50% EtOH 용매 비율에서 지표성분 pectolinarin 함량이 84.54 mg/g, pectolinarigenin 함량이 1.02 mg/g으로 확인되었으며 발효에 의한 pectolinarin 증가 및 pectolinarigenin으로 전환되는 것을 확인할 수 있었음.
- 발효산물 소재 중 곤드레에 대한 지표성분 선정 및 발효전·후에 따른 지표성분 함량 분석을 완료였고, 그 결과를 바탕으로 50% EtOH 용매비율이 발효 곤드레의 최적의 추출 공정으로 판단됨.

표14. 곤드레 발효전·후에 따른 지표성분 함량

발효진행	소재	추출용매	Pectolinarin (mg/g)	Pectolinarigenin (mg/g)
발효 전	건물	열수	0.75 <sup>1)</sup> ±0.80	-
		주정 50%	46.88±0.34	-
	생물	주정 50%	77.65±0.13	-
발효 후	발효산물	열수	11.81±4.25	-
		주정 50%	84.54±0.92	1.02±0.01

<sup>1)</sup>Each value is expressed as means(n=3)

- 곰취 추출물 지표성분 동시분석법 확립 및 발효전·후에 따른 지표성분 함량비교
  - HPLC 분석법 확립

Instruments	Shimadzu HPLC system (HPLC-UV)	
Column	XBridge C18 (4.6 × 250 mm, 5 um)	
Mobile phase	Solution(A) : 0.1% TFA in D.W	
	Solution(B) : ACN	
	Time (min)	B Conc. (%)
	0.1	10
	20	10
	30	18
	64	18
65	100	
75	-	
Oven temp.	30℃	
Wavelength	330 nm	
Injection volume	10 uL	
Flow rate	1 ml/min	
Run time	75 min	

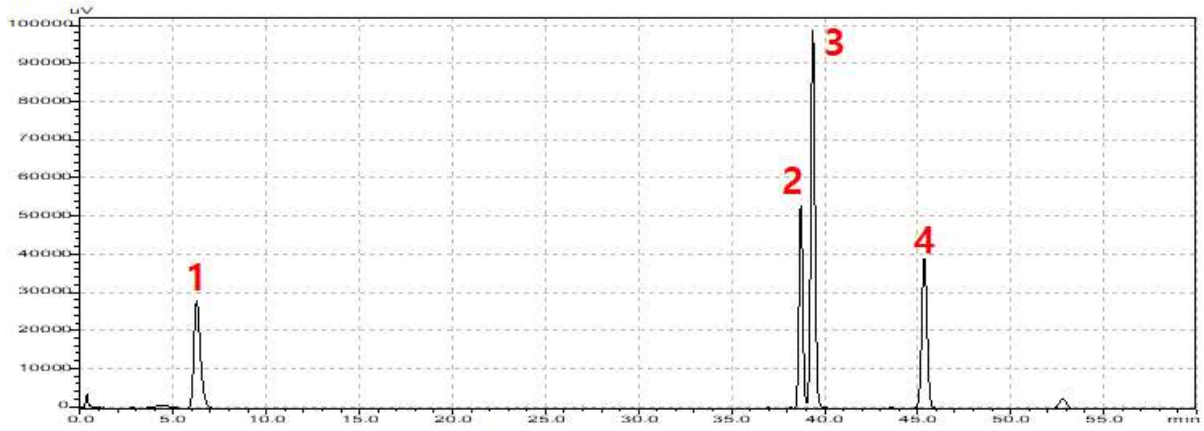


그림35. 곱취 지표성분 4종의 크로마토그램  
 ((1) Chlorogenic acid, (2) 3,4-DCQA, (3) 3,5-DCQA, (4)4,5-DCQA)

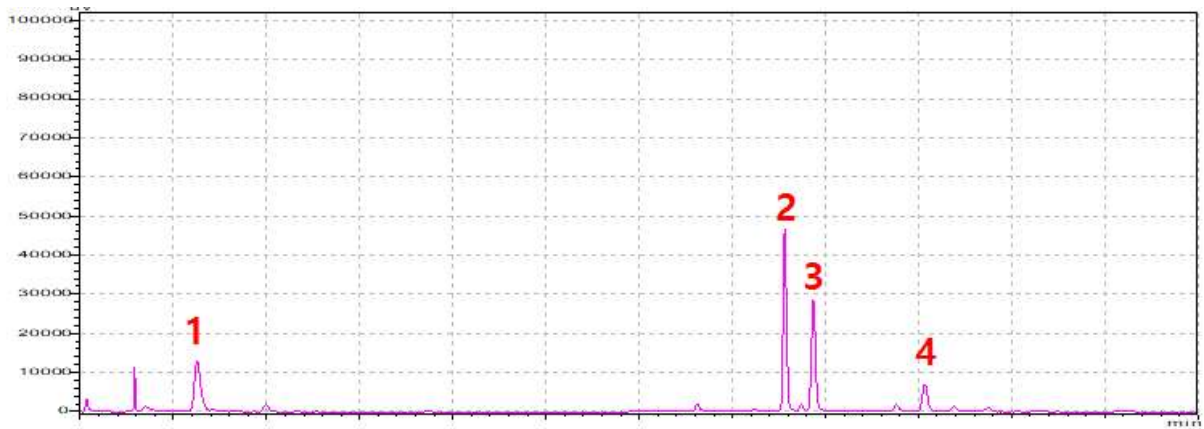
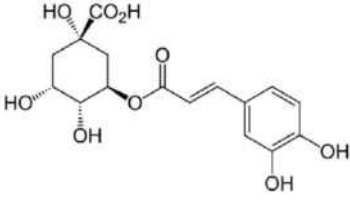
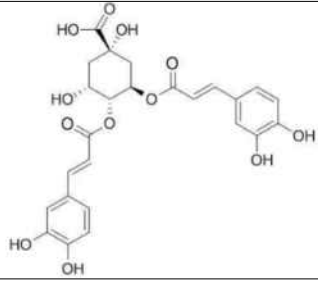
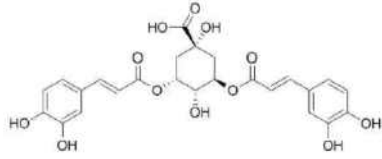
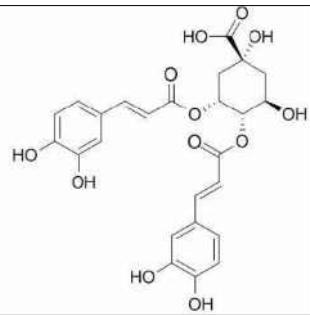


그림36. 곱취 추출물의 크로마토그램  
 ((1) Chlorogenic acid, (2) 3,4-DCQA, (3) 3,5-DCQA, (4)4,5-DCQA)

- 본 실험에서는 발효 전·후에 따른 곱취의 지표성분의 함량변이를 확인하기 위하여 곱취의 조건별 추출물에 대한 지표성분 4종의 함량을 분석하였음.

표15. 곰취 유효(지표)성분 4종의 정보

지표 성분	표준품명	Chlorogenic acid	3,4-di-caffeoyl quinic acid
	구조식		
	분자식	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>
	CAS No.	327-97--9	2450-53-5
	표준품명	3,5-di-caffeoyl quinic acid	4,5-di-O-caffeoyl quinic acid
	구조식		
분자식	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	
CAS No.	14534-61-3	32451-88-0	

- HPLC-UV로 곰취 추출물에서 확립된 4종의 지표성분의 동시분석법으로 함량분석을 진행하였음. 최적화된 크로마토그램 분리는 C18 컬럼(4.6 x 250 mm, 5um, XBridge) 과 이동상은 0.1% Trifluoroacetic acid가 포함된 물과 아세토니트릴을 사용하였고 온도는 40℃를 유지하였다. 유속은 1ml/min, UV 검출기의 파장은 330nm에서 확인하였음.
- 4종의 표준용액을 약 3.28-52.5 ppm 농도 범위에서 실험을 실시하였으며 면적대 농도비의 관계로 검량선을 작성하였음. 모든 검량선은 실험범위 내에서 높은 상관계수를 나타내었음(R<sup>2</sup>≥0.99).

표17. 곰취 유효(지표)성분 4종의 calibration curve

지표성분	Concentration	Regression equation	R2
Chlorogenic acid	3.28-52.5	$y = 25169x + 15640$	0.9993
3,4-di-caffeoyl quinic acid	3.28-52.5	$y = 29150x - 5768.1$	1
3,5-di-caffeoyl quinic acid	3.44-55.0	$y = 56699x - 13724$	1
4,5-di-O-caffeoyl quinic acid	3.28-52.5	$y = 30999x - 10678$	1

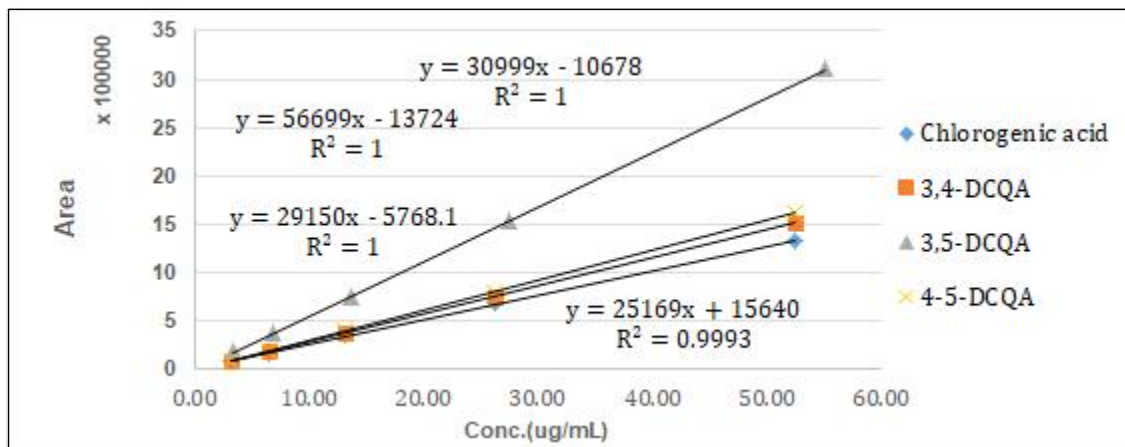


그림37. 곰취 유효(지표)성분 4종 검량선 그래프

- 분석시료 전처리는 각 조건별 추출물 약 15mg을 25mL의 추출용매(50% EtOH)에 녹여 syringe filter(0.45 um)로 여과한 후 HPLC 분석에 사용하였음.

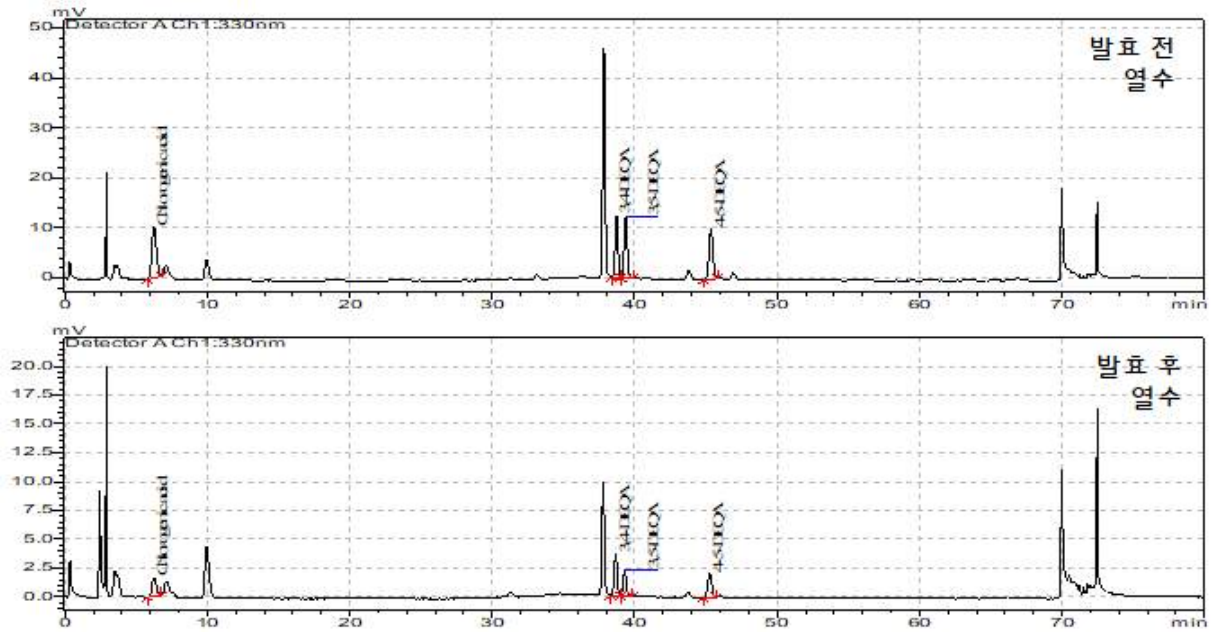


그림38. 곰취 발효전·후에 따른 추출물의 HPLC chromatogram

- 곰취의 발효 전·후에 따른 caffeoyl quinic acid 계열 4종 함량의 변화를 확인한 결과, 발효 전 caffeoyl quinic acid 계열 4종의 총함량이 81.54 mg/g으로 생물곰취 50% EtOH 용매비율에서 가장 높게 확인되었음.
- 곰취의 발효산물에서의 지표성분 함량분석 결과, 50% EtOH 용매 비율에서 caffeoyl quinic acid 계열 4종의 총함량이 7.71 mg/g, 열수조건에서 8.79 mg/g으로 확인되었음.
- 발효산물 소재 중 곰취의 발효전·후에 따른 지표성분 4종의 함량 분석을 통해 발효 후 함량이 줄어드는 것을 확인하였고, 열수조건과 50% EtOH 용매비율에서 지표성분의 총함량은 큰차이를 보이지 않았음.

표18. 곰취 발효전·후에 따른 지표성분 함량

발효진행	소재	추출용매	지표성분	Mean (mg/g)	SUM (mg/g)
발효 전	건물	열수	Chlorogenic acid	13.98	40.50
			3,4-DCQA	10.09	
	3,5-DCQA		5.69		
	4,5-DCQA		10.73		
	주정 50%	Chlorogenic acid	23.04	48.83	
		3,4-DCQA	1.73		
3,5-DCQA	15.23				
4,5-DCQA	8.82				
생물	주정 50%	Chlorogenic acid	21.31	81.54	
		3,4-DCQA	12.52		
3,5-DCQA		27.44			
4,5-DCQA		20.27			
발효 후	발효 산물	열수	Chlorogenic acid	1.47	8.79
			3,4-DCQA	3.22	
	3,5-DCQA		1.37		
	4,5-DCQA		2.73		
주정 50%	Chlorogenic acid	0.61	7.71		
	3,4-DCQA	1.06			
	3,5-DCQA	1.96			
	4,5-DCQA	4.07			

<sup>1)</sup>Each value is expressed as means(n=3)

- 대두배아 추출물 지표성분 동시분석법 확립 및 발효전·후에 따른 지표성분 함량비교

- HPLC 분석법 확립

Instruments	Shimadzu HPLC system (HPLC-UV)	
Column	SHISEIDO C18 (4.6 x 250 mm, 5 um)	
Mobile phase	Solution(A) : D.W:MeOH:Acetic acid(88:10:2)	
	Solution(B) : MeOH:Acetic acid(98:2)	
	Time (min)	B Conc. (%)
	0.1	30
	7	40
	15	50
	25	50
	35	50
	36	30
	50	-
Oven temp.	40℃	
Wavelength	260 nm	
Injection volume	10 uL	
Flow rate	1 ml/min	
Run time	50 min	

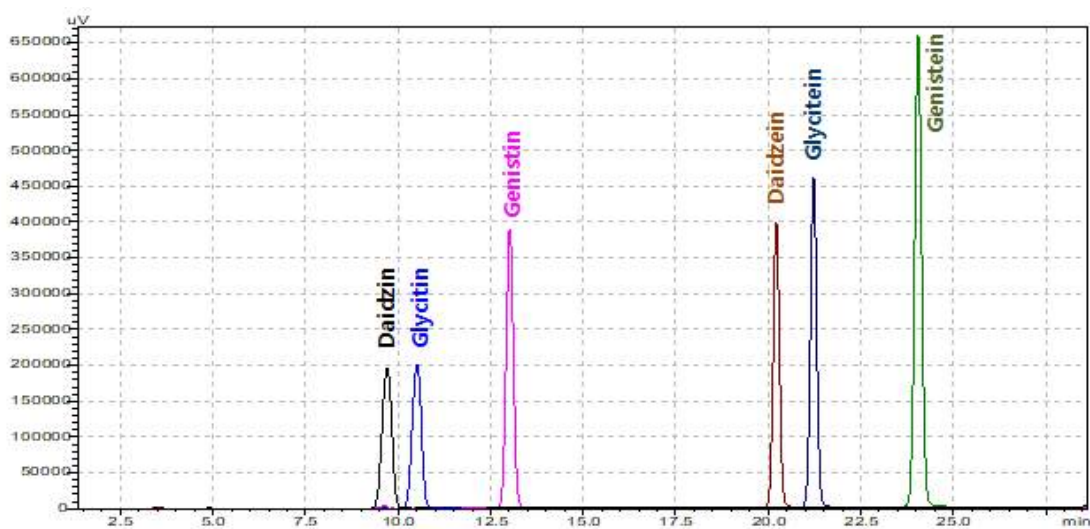
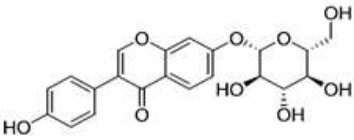
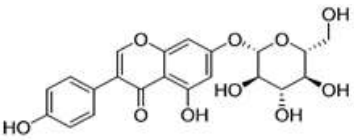
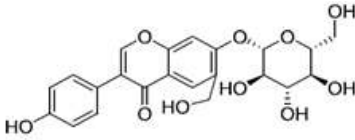


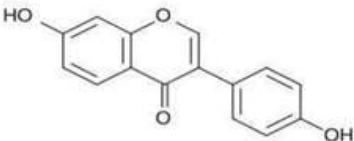
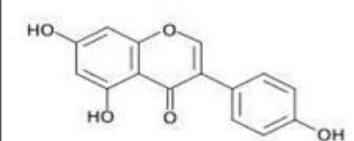
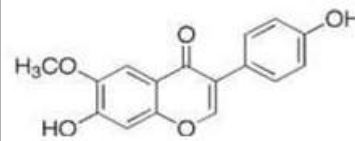
그림. 대두배아 지표성분 6종의 크로마토그램

- 본 실험에서는 발효 전·후에 따른 대두배아의 지표성분의 함량변이를 확인하기 위하여 대두배아의 추출물에 대한 지표성분 6종의 함량을 분석하였음.



표19. 대두배아 유효(지표)성분 이소플라본류 6종의 정보

표준품명	Daidzin	Genistin	Glycitin
구조식			
분자식	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>
분자량	416.38	432.38	446.41
CAS No.	552-66-9	526-59-9	40246-10-4

표준품명	Daidzein	Genistein	Glycitein
구조식			
분자식	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>
분자량	254.23	270.24	286.26
CAS No.	486-66-8	446-72-0	40957-83-3

- HPLC-UV로 대두배아 추출물에서 확립된 6종의 지표성분의 동시분석법으로 함량분석을 진행하였음. 최적화된 크로마토그램 분리는 C18 컬럼(4.6 x 250 mm, 5μm, SHISEIDO)과 이동상은 Acetic acid가 포함된 물과 메탄올을 사용하였고 온도는 40℃를 유지하였음. 유속은 1ml/min, UV 검출기의 파장은 260nm에서 확인하였음.
- 6종의 표준용액을 약 4.3-171.6 ppm 농도 범위에서 실험을 실시하였으며 면적대 농도비의 관계로 검량선을 작성하였음. 모든 검량선은 실험범위 내에서 높은 상관계수를 나타내었음(R<sup>2</sup>≥0.99).

표20. 대두배아 유효(지표)성분 6종의 calibrarion curve

지표성분	Concentration	Regression equation	R2
Daidzin	4.3~137.2	$y = 42565x + 13141$	0.9998
Genistin	4.3~138.6	$y = 45672x - 5722.2$	1
Glycitin	4.6~147.6	$y = 64236x + 8797.5$	0.9999
Daidzein	4.5~142.5	$y = 59577x + 7951.4$	0.9999
Genistein	5.4~171.6	$y = 57719x + 8252.1$	0.9999
Glycitein	4.9~155.1	$y = 101792x + 21936$	0.9999

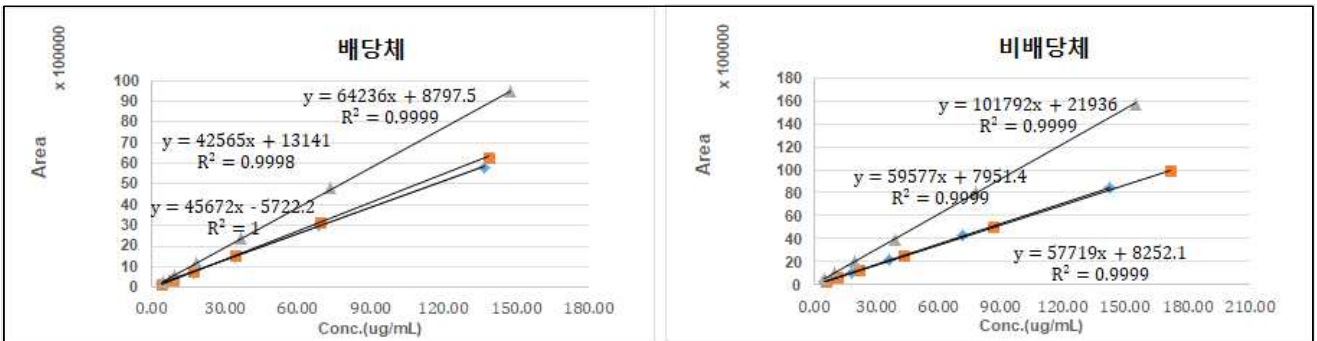


그림38. 대두배아 유효(지표)성분 6종 검량선 그래프

- 분석시료 전처리는 각 조건별 추출물 약 100mg을 10mL의 추출용매(MeOH)에 녹여 30분간 초음파 처리한 후 syringe filter(0.45 um)로 여과한 후 HPLC 분석에 사용하였음.

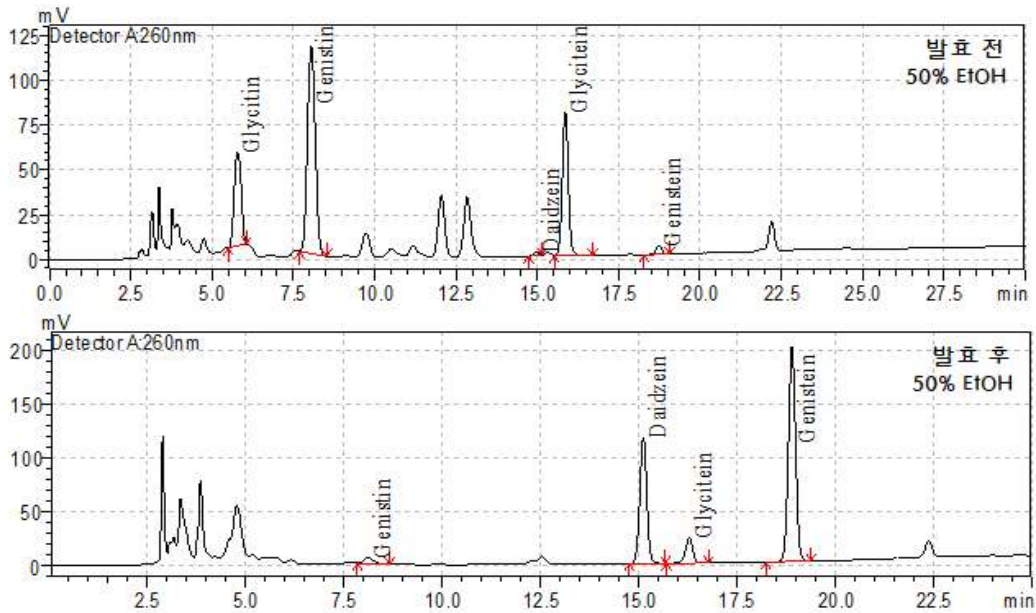


그림39. 대두배아 발효전·후에 따른 추출물의 HPLC chromatogram

- 대두배아의 발효여부에 따른 이소플라본류 함량의 변화를 확인한 결과 발효 전의 배당체함량이 7.49 mg/g에서 발효산물에서 배당체의 함량이 0.11 mg/g으로 감소하고 비배당체의 함량이 7.445 mg/g으로 증가하였음.
- 발효산물 소재 중 대두배이에 대한 발효전·후에 따른 지표성분 함량 분석을 완료하였고, 발효가 진행됨에 따라 이소플라본류의 비배당체 함량이 증가하는 것을 확인하였음.

표21. 대두배아 발효전·후에 따른 지표성분 함량

발효진행	이소플라본	각 이소플라본 함량 (mg/g)	SUM (mg/g)
발효 전	Daidzin	-	7.490
	Genistin	2.72 <sup>1)</sup>	
	Glycitin	4.77	
	Daidzein	0.07	4.694
	Genistein	4.52	
	Glycitein	0.10	
발효 후	Daidzin	-	0.110
	Genistin	-	
	Glycitin	0.11	
	Daidzein	3.34	7.445
	Genistein	0.71	
	Glycitein	3.40	

1)Each value is expressed as means(n=3)

- 미강 지표성분 동시분석법 확립 및 발효전·후에 따른 지표성분 함량비교
  - HPLC 분석법 확립

Instruments	Shimadzu HPLC system (HPLC-UV)												
Column	Cosmosil C18 (4.6 x 250 mm, 5 um)												
Mobile phase	Solution(A) : THF/MeOH/50mM Sodium acetate(pH6.2) (5:75:420)												
	Solution(B) : Methanol												
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>B Conc. (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.1</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>26</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>-</td> </tr> </tbody> </table>	Time (min)	B Conc. (%)	0.1	20	5	20	25	100	26	20	40	-
Time (min)	B Conc. (%)												
0.1	20												
5	20												
25	100												
26	20												
40	-												
Oven temp.	40℃												
Wavelength	286 nm												
Injection volume	10 uL												
Flow rate	0.7 ml/min												
Run time	40 min												

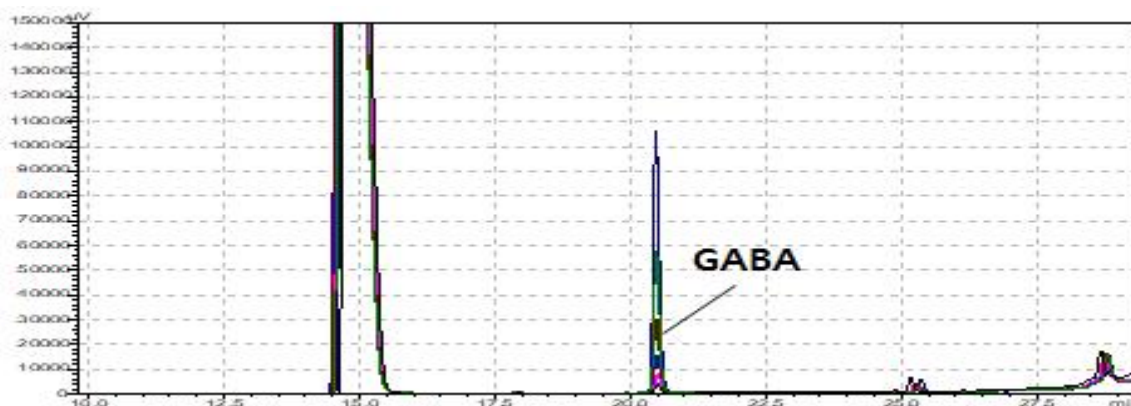
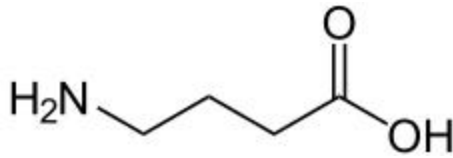


그림40. 미강 지표성분의 크로마토그램

- 본 실험에서는 발효 전·후에 따른 미강의 지표성분의 함량변이를 확인하기 위하여 미강의 조건별 추출물에 대한 지표성분의 함량을 분석하였음.

표22. 미강 유효(지표)성분의 정보

지표성분	표준품명	GABA(Gamma amino butyric acid)
	구조식	
	분자식	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub>
	분자량	103.12
	CAS No.	56-12-2

- HPLC-UV로 미강 추출물에서 확립된 지표성분 분석법으로 함량분석을 진행하였음. 최적화된 크로마토그램 분리는 C18 컬럼(4.6 x 250 mm, 5um, XBridge) 과 이동상은 50mM Sodium acetate가 포함된 물과 아세트니트릴을 사용하였고 온도는 40°C 를 유지하였다. 유속은 0.7ml/min, UV 검출기의 파장은 286nm에서 확인하였음.
- 표준용액을 약 0.31-10 ppm 농도 범위에서 실험을 실시하였으며 면적대 농도비의 관계로 검량선을 작성하였음. 모든 검량선은 실험범위 내에서 높은 상관계수를 나타내었음(R<sup>2</sup>≥0.99).

표23. 미강 유효(지표)성분의 calibration curve

지표성분	Concentration	Regression equation	R2
GABA	3.12-100	y = 9211.9x - 266.44	1

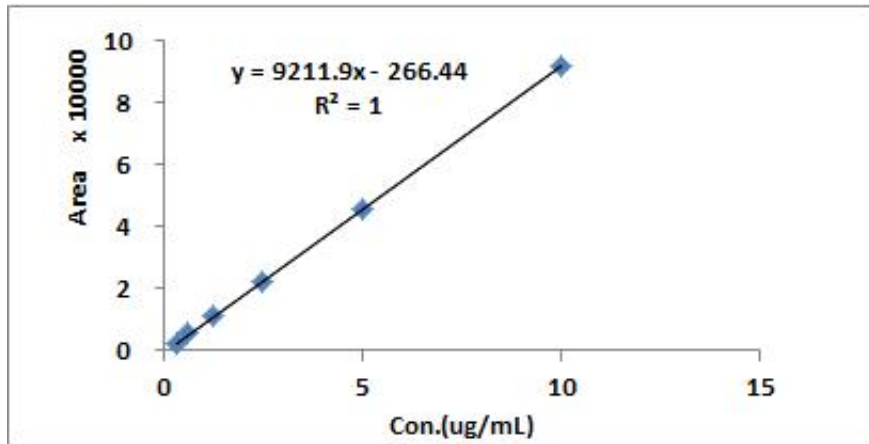


그림41. 미강 유효(지표)성분 검량선 그래프

- 분석시료 전처리는 각 조건별 추출물 약 100mg, 1M Sodium carbonate, Dansyl chloride(in ACN)를 각각 100uL씩 취한 후 증류수 600uL 첨가하고 혼합함. 혼합한 용액을 80°C 수용액상에서 40분간 반응시킨 후 희석된 Acetic acid를 100uL넣고 혼합하여 3,500rpm에서 5분가 원심분리한 후 syringe filter(0.45 um)로 여과한 후 HPLC 분석에 사용하였음

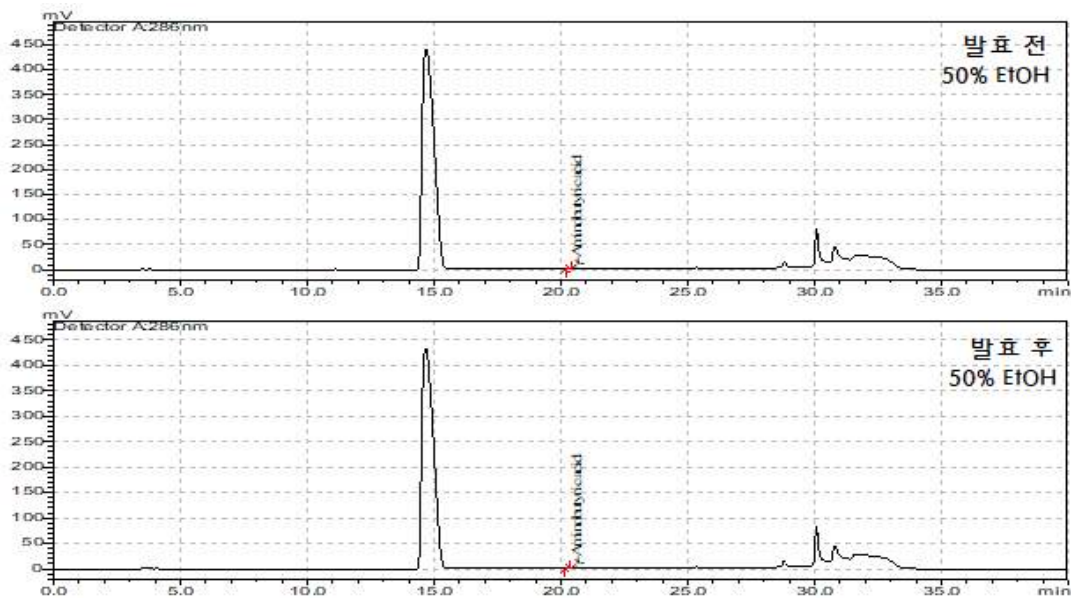


그림42. 미강 발효전·후에 따른 추출물의 HPLC chromatogram

- 미강 추출물의 발효 전·후에 따른 GABA 함량을 비교한 결과는 아래와 같음. 발효 전 50% EtOH 용매비율에서 1.11mg/g, 발효 후 열수추출물에서 1.28mg/g, 50% EtOH 용매비율에서 1.84mg/100g 순으로 GABA 함량이 증가하였음.
- 발효산물 소재 중 미강에 대한 지표성분 선정 및 발효전·후에 따른 지표성분 함량 분석을 완료하였고, 그 결과를 바탕으로 발효 후 GABA의 함량이 증가하는 것을 확인하였음.

표24. 미강 발효전·후에 따른 지표성분 함량

발효진행	추출용매	GABA (mg/g)	Mean
발효 전	주정 50%	1.13	1.11 <sup>1)</sup>
		1.22	
		0.98	
발효 후	열수	1.27	1.28
		1.27	
		1.33	
	주정 50%	1.74	1.84
		1.88	
		1.90	

<sup>1)</sup>Each value is expressed as means(n=3)

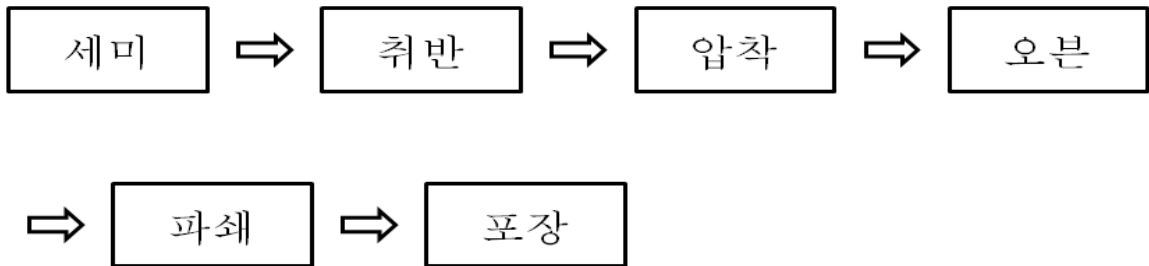


2-2. 2차년도 연구 결과

2-2-1 (주) 세준에프앤비

(1) 노인성 편이식품 제조 공정 확립

가. 누룽지 생산 공정 확립



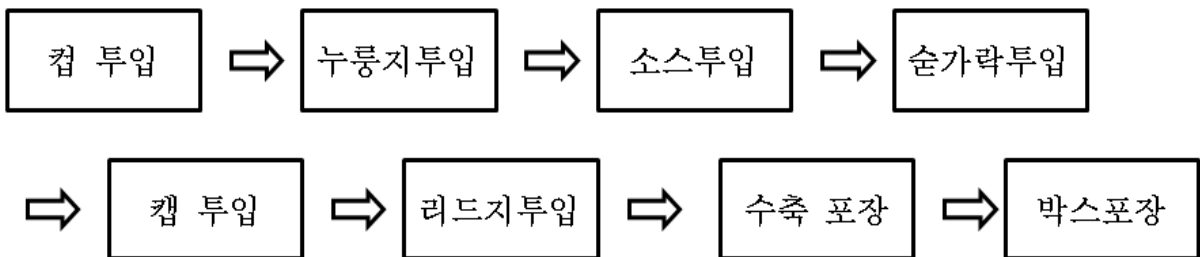
< 누룽지 생산 공정도 >

- 전자레인지 조리시 소스와 어우러져 호화가 이루어 질 수 있는 공정 확립



< 실제 설비 모습 >

나. 최종 제품 포장 공정 확립



< 컵 포장 공정도 >

- 최소의 인력으로 제품을 생산 할 수 있는 공정 확립



〈 실제 설비 모습 〉

(2) 세포 독성 평가 (MTT)

가. 세포 독성 검사 (MTT)

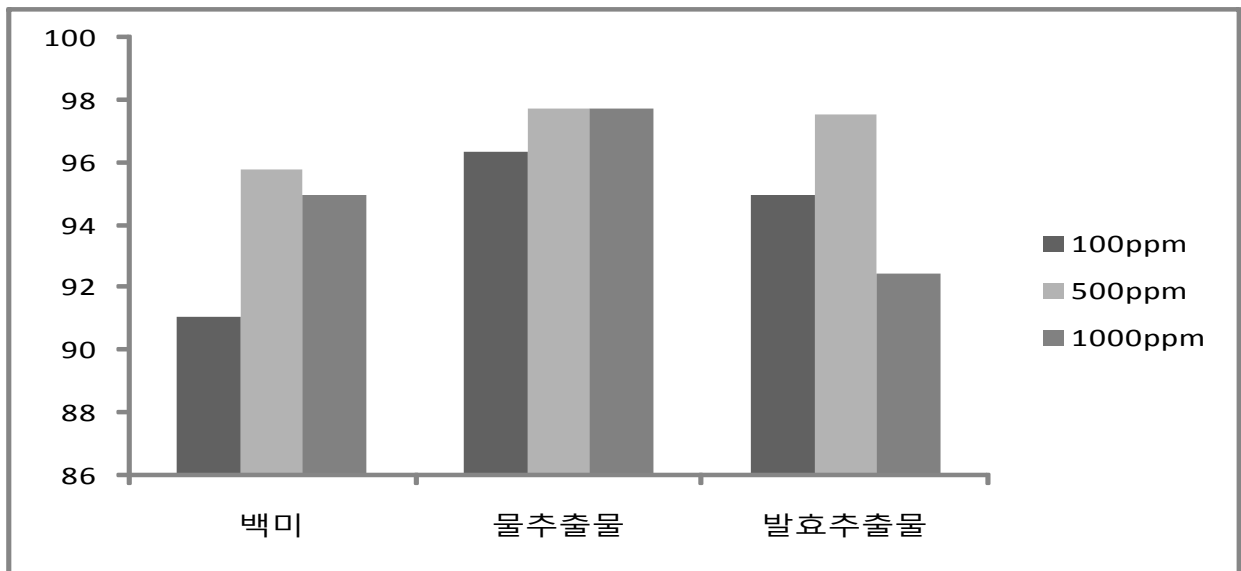


그림43. 세포 생존율 분석 결과

- 세포 생존율 분석 결과 전 sample 군에서 90% 이상의 생존율을 보였음.

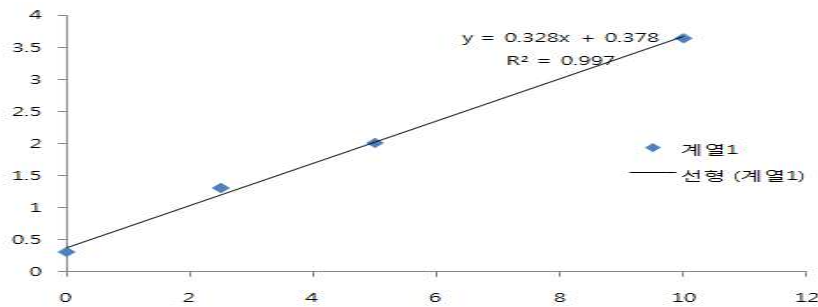
(3) 소화율 측정 (in vitro)

나. 미강, 곤드레 발효 추출물이 함유된 소스를 첨가한 누룽지 제품에 대한 세포내 유입되는 Glucose 함량을 측정 하였음.

○ 세포내 Glucose 함량 실험 방법

- 본 실험에 사용된 세포는 간세포(Hep G)이다. 세포를  $1 \times 10^5$ /ml로 counting 한 후 24시간 배양한 뒤 PBS buffer 로 2회 세척 하였다. FBS가 첨가되지 않은 배지를 100ul 분주하여 12시간 starvation 시킨 후 PBS로 3회 세척하였음. KRPH buffer에 2% BSA를 혼합 한 후 100ul를 분주하여 40min 동안 incubation시켰음. positive control로는 인슐린을 사용하였으며 처리시간은 20분으로 진행하였음. 2-DG(10mM)을 20분간 incubation 한 후 PBS로 3회 세척 하였다. KIT의 MAX A 10ul (Assau Buffer 8ul + Enzyme Mix 2ul)을 넣고 37°C 에서 1시간 동안 incubation 하였음. extraction buffer 90ul을 넣고 85°C 에서 40분간 가열시킨 후 얼음에 5분간 보관 후 neutralization buffer 12ul을 첨가하였음. 이중 5ul을 취하여 assay buffer 45ul로 볼륨을 맞춘 후 Mix B(Glutathione Reductase 20ul+DTNB 16ul+ Recycling Mix 2ul) 38ul을 첨가한 뒤 412nm에서 흡광 측정하였음.
- 실험군은 Control(무처리군), 일반 백미 누룽지, 물추출물로 제조된 스프가 함유된 누룽지, 발효 추출물로 제조된 스프가 함유된 누룽지 4그룹으로 나누어 실험하였으며 백미 누룽지 대비 Fold-induction 값을 측정하였음.

A



B

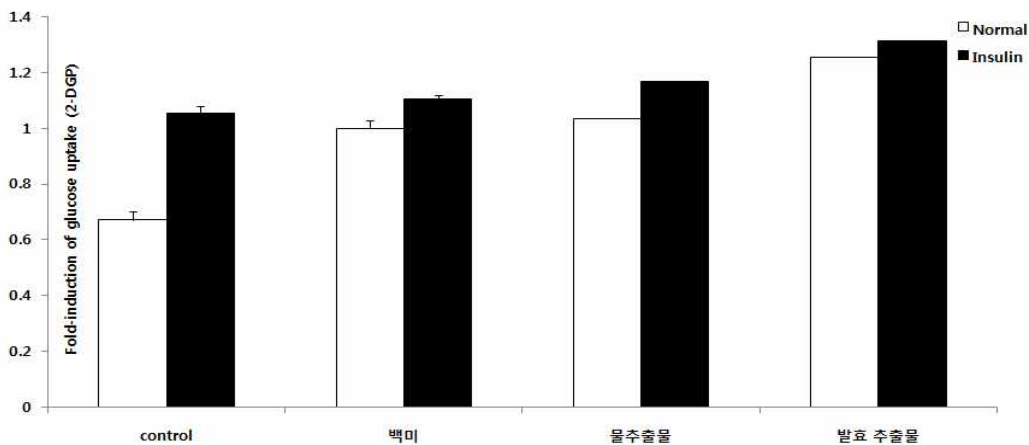


그림44. 세포내 Glucose 함량 측정 결과

표25. 세포내 glucose 함량

샘플	Fold -induction of glucose uptake	
	Normal	Insulin
백미	1	1.104
물추출물	1.03	1.166
발효추출물	1.25	1.314

- 세포내 glucose 함량을 측정한 결과를 Fold-induction에 대입 후 무처리군의 함량을 1로 본 결과 물 추출물로 제조된 스프가 함유한 제품의 경우 1.03의 함량을 보였으며 발효 추출물로 제조된 스프가 함유한 제품은 1.25의 함량을 보였음. 전체적으로 일반 물 추출물 보다 발효 추출물 일 때 높은 glucose 함량을 보였으며 insulin이 함유된 샘플의 경우 동일한 경향을 보였음.

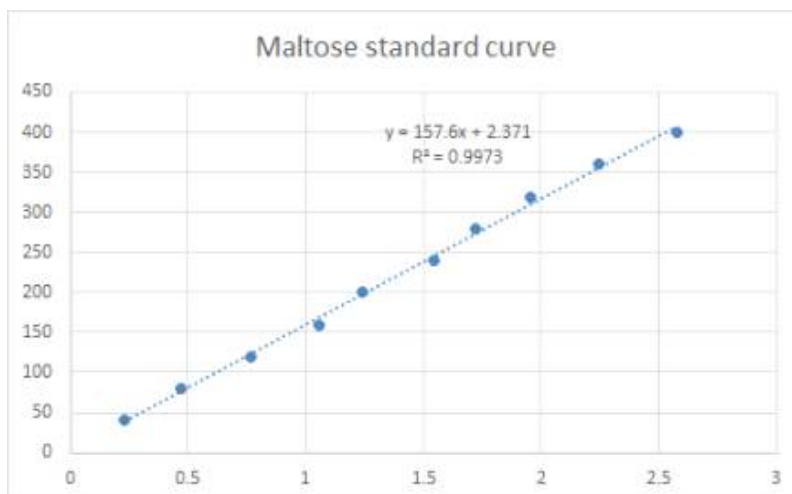
나. In vitro 전분분해율 측정

- 시료의 *in vitro* α-amylase 전분가수분해율은 Xue등의 방법을 변형하여 측정함. 시료 1 g에 0.04%(w/v) NaCl을 포함하는 0.05 M sodium phosphate buffer(pH 6.9) 용액 50 mL를 넣고 37도 항온수조에 넣어 10분간 유지시켰으며 이 용액에 0.2 mL α-amylase(504 U/mL)를 넣어 37도에서 반응함. α-Amylase 효소액은 porcine pancreatic α-amylase(Sigma Co., St. Louis, MO, USA,1,370 U/mg)로부터 조제함. 효소반응 중 0, 15, 30, 45, 60분의 간격으로 0.2 mL 용액을 취하여 생성된 환원당을 3,5-dinitrosalicylic acid 시약을 사용한 비색법으로 흡광도를 측정함. 표준당으로 maltose를 사용함.

$$\text{전분의 가수분해율(\%)} = A/B \times 100$$

A: Standard curve로부터 환산된 maltose함량(mg)

B: 전분함량(mg)



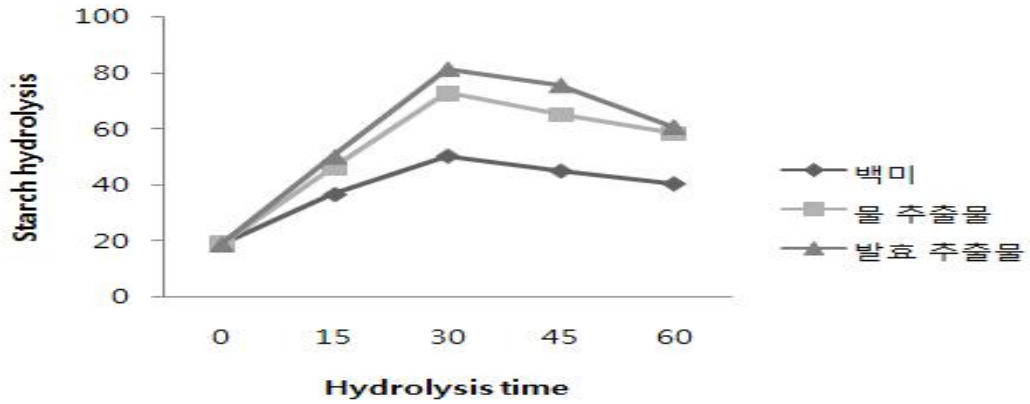


그림45. 세포내 전분 분해율 분석 결과

- 누룽지 시제품의 전분함량은 Megazyme의 total starch kit을 이용하여 측정하였음

표26. 시제품 1g 당 총 전분 함량

구분	시제품 1g 당 총 전분 함량 (%)
백미 누룽지	18.57
물 추출물	18.94
발효 추출물	18.91

- 누룽지 시제품의 전분 분해율 분석 결과 백미는 15분에 36.48% 물 추출물과 발효 추출물로 제조된 스프가 함유된 제품은 각각 46.0, 50.1%로 큰 차이를 보이지 않았으나 30분에 백미는 50.1%, 물 추출물과 발효추출물은 72.8, 81.2%로 나타났으며 발효 추출물이 함유된 시제품이 물 추출물이 함유된 시제품 보다 약 9% 높은 전분 분해율을 보였음.

(4) 이화학적 특성 분석

○ 경도 분석

- Texture Analyzer(CT3 / BROOKFIELD / USA)를 사용하여 경도를 측정하였다. 경도측정은 Target 5mm , Trigger Load 5g, Test Speed 2.00mm/s , Load Cell 10,000g, prove TA23/1000 조건으로 진행하였으며 취반된 밥을 가로세로 3cm x 3cm 두께 2cm 로 절단하여 진행하였음.

표27. 누룽지 3종의 점도, 퍼짐성 및 탁도

제 품 군	Hardness(g)
백 미 누룽지	51.24±3.15
물 추출물	50.15±2.47
발효 추출물	50.71±1.61

- 누룽지는 1차년도 조건으로 제조 하였으며 경도 분석 결과 3 제품군 모두 경도에는 큰 차이를 보이지 않았음.

○ 점성 분석

- 4분간 복원된 누룽지 3종의 점도를 측정한 결과 3제품군 모두 점성에는 큰 차이를 보이지 않았으며 이는 스프가 누룽지의 물리적 특성에 큰 변화를 주지 않았음을 확인 하였음.

표28. 누룽지 3종의 점도, 퍼짐성 및 탁도

시료	점도(cP)	퍼짐성	탁도
백미	88.24±16.73	5.29±0.16	3.07±0.04
물 추출물	89.71±10.45	4.91±0.14	3.01±0.02
발효 추출물	87.28±11.01	5.09±0.11	3.04±0.01

- 아밀로오스 함량은 시료 100mg에 95% ethanol 1ml와 1N NaOH 9ml을 넣어 20분간 방치 후 끓는 물에서 10분간 가열 호화시키고, 100ml이 되도록 증류수를 채운 다음 5ml을 취한 후 여기에 1N CH<sub>3</sub>COOH 1ml와 2% 요오드 용액 2ml를 첨가하고 증류수를 이용하여 최종 볼륨 100ml로 맞춘 다음 20분간 발색시켜 620nm에서 흡광도를 측정하였음.

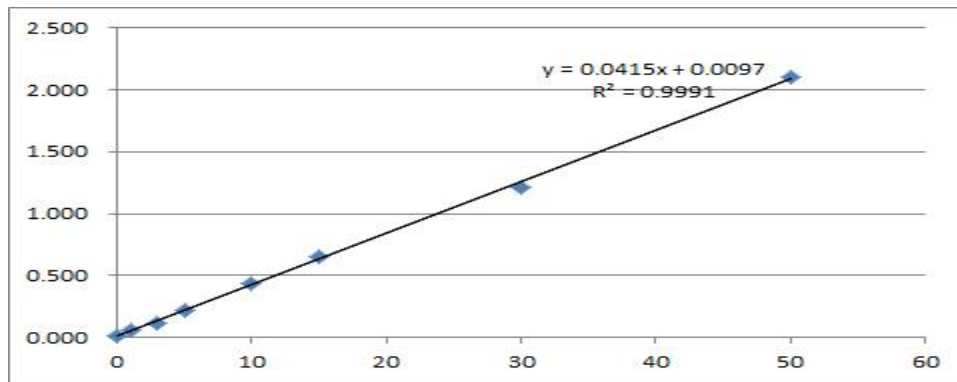


그림46. 아밀로오스 standard curve

○ 수분 흡착도 분석

- 수분흡착도는 Medcalf & Gilles의 방법을 변형하여 시료 500mg에 증류수 30mL을 가한 후 실온에서 1시간 교반 한 후 미리 무게를 잰 원심관에 넣고 8,000rpm에서 30분간 원심분리하였음. 원심분리 된 상등액은 제거하고 침전된 가루의 무게를 측정하여 처음 시료와의 중량비로 계산하였음.

표29. 제품별 아밀로오스 함량 및 수분 흡착능

구 분	아밀로오스함량(mg/g)	수분 흡착도(%)
백미 누룽지	16.16±2.43	352±9.09
물 추출물	16.56±2.98	364±8.72
발효 추출물	16.48±2.21	359±7.34

- 아밀로오스 함량 결과 백미 는 16.16mg/g 물 추출물로 제조된 스프가 함유된 누룽지는 16.56mg/g 발효 추출물로 제조된 스프가 함유된 누룽지는 16.45mg/g의 함량을 보였음. 수분 흡착도는 백미는 352%, 물 추출물 364%, 발효 추출물은 359%의 수분 흡수율을 보였음. 전분을 물에 넣어 가열하면 전분의 미셀 구조가 서서히 파괴되어 수분이 전분사이에 쉽게 침투하여 수분과 결합하게 되고 따라서 전분이 팽윤하게 됨. 이때 아밀로오스는 결정성 구조에서 무정형 구조로 변성이 일어나며 아밀로펙틴은 수분을 흡수하기 쉬운 구조로 변성됨. 아밀로오스 함량이 적을수록 수분 흡착 지수가 높아지기 때문에 고령자로 하여금 섭취가 원활하게 진행 될 것임. 아밀로오스 함량과 수분 흡착도는 1차년도 결과와 별 차이가 없었음.



○ 팽윤력 분석 및 수분 용해도 분석

- 팽윤력과 용해도의 측정은 0.5%의 전분 분산액을 제조하여 95℃의 항온 수조에서 30분간 교반하여 호화한다. 실내 온도가 되도록 얼음물을 상온까지 급냉 시킨 후, 50ml 원심분리기용기에 전분 호화액 10ml을 주입하여 2,100xg 조건에서 20분간 원심분리하였음. 이때 분리된 상등액과 침전물은 120℃의 진공건조기에서 4시간 건조시켜 가용성 전분과 침전물의 건조 무게를 측정하고 아래의 식을 이용하여 팽윤력 및 용해도를 계산하였음.

$$\text{팽윤력(g/g)} = A/B$$

A: 침전물의 무게(g)

B: 침전물의 건조무게(g)

$$\text{용해도(\%)} = A/B \times 100$$

A: 가용성 전분의 무게(g)

B: 시료 건조 무게(g)

표30. 제품별 팽윤력 및 수분 용해도

구 분	팽윤력(%)	수분 용해도(%)
백미	12.88±1.41	59.65±1.77
물 추출물	12.40±1.72	58.41±1.52
발효 추출물	12.75±2.30	58.76±1.58

- 팽윤력은 아밀로펙틴 구조와 관련되어 있으며 결정성 영역과 무정형 영역에 수분이 침투하게 되는데 이때 수분을 가열 하게 되면 무정형 영역이 넓어지게 되어 수분을 흡수할 수 있는 공간이 그만큼 커지게 된다. 분석 결과 백미 12.88, 물 추출물 12.40, 발효 추출물의 팽윤력을 보였으며 수분 용해도는 59.65, 58.41, 58.76이 각각 나타남. 이는 아밀로오스 함량 과 수분 흡착지수와 동일한 경향을 나타냄.

(5) 소비자 기호도 조사

"건강한국 실현에 기여하는 세계 수준의 식품 연구기관"

**한국식품연구원**

Korea Food Research Institute

수신자 (주) 세운에프앤비  
(경유)  
제목 최종 결과보고 자료 제출

1. 귀 사의 무궁한 발전을 기원 합니다.

2. 우리 연구원은 귀사에서 의뢰받은 "유용미생물 생물질한 산채 곡류 활용 소재를 이용한 고형화 현의식 개발 ( 연구책임자 박종대 )" 연구사업을 2019년 6월 부터 2019년 11월 까지 수행 하였습니다.

3. 그 결과를 붙임과 같이 결과보고 자료로 제출하오니 업무에 참조하시기 바랍니다.

붙임 결과보고서 자료 1부. 끝.

**한국식품연구원**

---

발신자 박종대    발신장 최희은    발송일 2019. 7. 20  
박종준

주소 서울과학기술대-1907 (2018-07-30)    전화 063-219-9114 / 063-219-9876 / 063-219-9876    http://www.kfri.re.kr    jdpark@kfri.re.kr

### 누룽지 품질특성 결과

□ 시료	누룽지(3종)	□ 의뢰처(의뢰인)	세운 F&B
□ 의뢰 항목	품질특성	□ 의뢰일	2019. 06. 24
□ 실험자	박종대, 김창희	□ 보고일	2019. 11. 04

1. 시료

- 일반성분 및 이화학적 특성은 잣의 추출물을 함유하는 스프를 포함한 누룽지로 측정하였으며 관능 평가를 실시 하였음. 관능 평가 인원은 60대 이상의 인 30명을 대상으로 진행 하였음.

2. 측정방법

- 점도 : 점도는 Brookfield viscometer(model-DV1, Brookfield Engineering Lab, USA)를 이용하여 spindle No. 3, 100 rpm에서 3회 반복 측정하였음.
- 퍼짐성 : 퍼짐성은 line spread test 방법을 이용하였음.
- 탁도 : 탁도는 UV/VIS Spectrophotometer(model V-650, Jasco, Japan)을 이용하여 590 nm에서 흡광도로 표시하였음.
- 관능특성 : 관능특성은 훈련된 관능요원 12명을 대상으로 9점 척도법을 실시 하였음.
- 통계처리 : SPSS 프로그램을 이용하여 ANOVA 분산분석과 Duncan의 다범위 검정을 사용하여 유의성 검정을 시행하였음.

3. 결과

○ 점도, 퍼짐성 및 탁도 : 4분간 복원된 누룽지의 점도 측정 결과, 백미 88.24 cP, 물 추출물 89.71cp, 발효 추출물 87.28cp 로 나타났음. 퍼짐성에서는 5.29,4.91,5.09로 나타났으며, 탁도는 3.07,3.01,3.04 로 나타남.

표 1. 누룽지 2종의 점도, 퍼짐성 및 탁도

시료	점도(cP)	퍼짐성	탁도
백미	88.24±16.73	5.29±0.16	3.07±0.04
물 추출물	89.71±10.45	4.91±0.14	3.01±0.02
발효 추출물	87.28±11.01	5.09±0.11	3.04±0.01

○ 관능특성 : 스프가 함유된 누룽지 관능평가를 실시한 결과, 3개 샘플 모두 외관은 7점대로 비교적 낮은 점수를 받았음. 맛은 샘플3이 8.16점으로 가장 높은 점수를 받았음. 전반적인 기호도 또한 샘플 3이 3.24점으로 나타났음. 샘플 1과 2의 경우 잣의 함이 너무 강하여 누룽지 고유의 구수한 맛이 약해 졌다는 평가 주를 이루 었으며, 누룽지가 좀 더 부드러웠으면 하는 의견이 주를 이루 었음.

표 2. 관드레 추출물 함유 레토르트 누룽지 기호도 결과

	외관	향	맛	조식감	기호도
백미 누룽지	7.80±1.45	7.80±2.82	7.80±3.03	6.80±2.75	7.48±1.67
물 추출물	7.10±2.01	7.80±1.61	8.00±2.48	6.50±3.04	8.11±1.88
발효 추출물	7.80±1.72	8.10±2.08	8.16±2.61	6.70±1.94	8.24±2.37

\*Values with different superscript in the same column are significantly different at p<0.05.

그림 1. 누룽지 기호도 결과

- 2 -

한국식품연구원  
Korea Food Research Institute  
박종대 jdpark@kfri.re.kr

- 3 -

한국식품연구원  
Korea Food Research Institute  
박종대 jdpark@kfri.re.kr

그림47. 한국식품 연구원 관능 시험 검사 결과

(6) 공인 성적서

미생물 및 중금속 분석

이화학 분석

문서확인번호 : CBUE-MFOW-STVM-6GJQ

**시험·검사성적서**

발행번호	R20191023-0044	접수번호	180106587-001
검사원요일	2019-10-23	접수연월일	2019-10-02
제품명	발효 미장, 곤드레 추출물 함유 누룽지		
(종류) 제조번호		품목제조신고번호	
유형·재질·용도명	기타기준규격외		
제조(수입)일	성명	유통(공급유지)기한	
의뢰자	주소지	업체명	(주)세온푸드앤비
제조원	소재지	제조국	
시험·검사목적	식품 1 기타(양조용)		

**시험·검사 항목 및 결과**

시험·검사 항목	시험·검사기준	시험·검사 결과	판정	비고
납 (mg/kg)	기준없음	0.31	상기실험확인함	
카드뮴 (mg/kg)	기준없음	0.02	상기실험확인함	
비소 (mg/kg)	기준없음	0.11	상기실험확인함	
수은 (mg/kg)	기준없음	0.00	상기실험확인함	
세균수 (CFU/g)	기준없음	0.00	상기실험확인함	
장출혈성대장균	기준없음	음성	상기실험확인함	
장괴스트리니움프로피온켄스 (CFU/g)	기준없음	0	상기실험확인함	
황색포도상구균	기준없음	음성	상기실험확인함	
살모넬라	기준없음	음성	상기실험확인함	

\* 본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며, 발급번호를 통하여 위변조 여부를 확인할 수 있습니다.  
 \* 본 증명서의 위조·변조로 인하여 발생하는 법적책임을 당사확인프로그램을 확인할 수 있습니다.

문서확인번호 : CBUE-MFOW-TAVM-08JQ

**시험·검사성적서**

발행번호	R20191023-0045	접수번호	180106587-002
검사원요일	2019-10-23	접수연월일	2019-10-02
제품명	발효 미장, 곤드레 추출물 함유 누룽지		
(종류) 제조번호		품목제조신고번호	
유형·재질·용도명	기타기준규격외		
제조(수입)일	성명	유통(공급유지)기한	
의뢰자	주소지	업체명	(주)세온푸드앤비
제조원	소재지	제조국	
시험·검사목적	식품 1 기타(양조용)		

**시험·검사 항목 및 결과**

시험·검사 항목	시험·검사기준	시험·검사 결과	판정	비고
총 수분(축분건) (H <sub>2</sub> O, G.L.G2P 합)	기준없음	불명함	상기실험확인함	
요르카푸린 (A/g/kg)	기준없음	불명함	상기실험확인함	
테트라하이드로제오 (mg/kg)	기준없음	불명함	상기실험확인함	
포름산 (g/kg)	기준없음	불명함	상기실험확인함	
아세트산	기준없음	불명함	상기실험확인함	
아세트산 함량 (mg/g)	기준없음	11.03	상기실험확인함	

\* 본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며, 발급번호를 통하여 위변조 여부를 확인할 수 있습니다.  
 \* 본 증명서의 위조·변조로 인하여 발생하는 법적책임을 당사확인프로그램을 확인할 수 있습니다.

영양성분 분석

문서확인번호 : RBZU-WZ2P-1TLJHSNG

**시험·검사성적서**

발행번호	R20191023-0054	접수번호	180106587-003
검사원요일	2019-10-23	접수연월일	2019-10-02
제품명	발효 미장, 곤드레 추출물 함유 누룽지		
(종류) 제조번호		품목제조신고번호	
유형·재질·용도명	기타기준규격외		
제조(수입)일	성명	유통(공급유지)기한	
의뢰자	주소지	업체명	(주)세온푸드앤비
제조원	소재지	제조국	
시험·검사목적	식품 1 기타(양조용)		

**시험결과[판정] 참조**

품질보증 : 상기실험확인함  
 시험검사원 : 김민우, 박정현, 박시혜, 박현용, 손희영, 임희담, 김은혜 시험검사책임자 : 조영준, 최종진

비고 :

\* 위 판정용 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.  
 \* 시험이 무효한 경우 시험·검사 항목 및 결과란은 비고로 표시 가능합니다.  
 \* 검사결과를 받으려거나 용기·포장 등에 기재된 제에는 시험·검사결과서 전체 내용을 모두 표시하여야 합니다.

2019년 10월 23일  
 (주)산업공해연구소

133-78 서울특별시 강변구 디지털로 130 5층 501호 10001-1010 T:02-2020-1207 F:02-3090-1998

\* 본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며, 발급번호를 통하여 위변조 여부를 확인할 수 있습니다.  
 \* 본 증명서의 위조·변조로 인하여 발생하는 법적책임을 당사확인프로그램을 확인할 수 있습니다. http://www.mda.go.kr Page 1 of 2

문서확인번호 : RBZU-WZ2P-1TLJHSNG

**시험·검사 항목 및 결과**

시험·검사 항목	시험·검사기준	시험·검사 결과	판정	비고
열량 (kcal/100g)		166.66	상기실험확인함	
탄수화물 (g/100g)		36.66	상기실험확인함	
당류 (g/100g)		0.00	상기실험확인함	
조단백질 (g/100g)		8.83	상기실험확인함	
조지방 (g/100g)		1.78	상기실험확인함	
트랜스지방 (g/100g)		0.00	상기실험확인함	
포화지방 (g/100g)		0.00	상기실험확인함	
콜레스테롤 (mg/100g)		0.00	상기실험확인함	
나트륨 (mg/100g)		24.17	상기실험확인함	
수분 (%)		5.54	상기실험확인함	
피판(%)		1.91	상기실험확인함	

\* 본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며, 발급번호를 통하여 위변조 여부를 확인할 수 있습니다.  
 \* 본 증명서의 위조·변조로 인하여 발생하는 법적책임을 당사확인프로그램을 확인할 수 있습니다. http://www.mda.go.kr Page 2 of 2

그림48. 공인기관 시험 성적서

## 2-2-2 (주) 웰빙 엘에스

### (1) 선정 발효소재 가공조건 검토

- 1 차년도에서 발효조건이 검토된 5개 소재를 세준에프앤비와 홍천메디컬허브연구소에서 면역활성 및 가공적합성을 검토한 결과 발효미강 과 발효 곤드레가 소재로서 가장 적합하다고 판단됨. 이에 따라 발효미강과 발효곤드레에 대한 가공조건을 검토함.
- 발효가 완료된 소재의 경우 가공편의성을 위하여 건조가 필수불가결한 요소이므로 발효된 소재를 건조하기 위한 조건을 검토함.

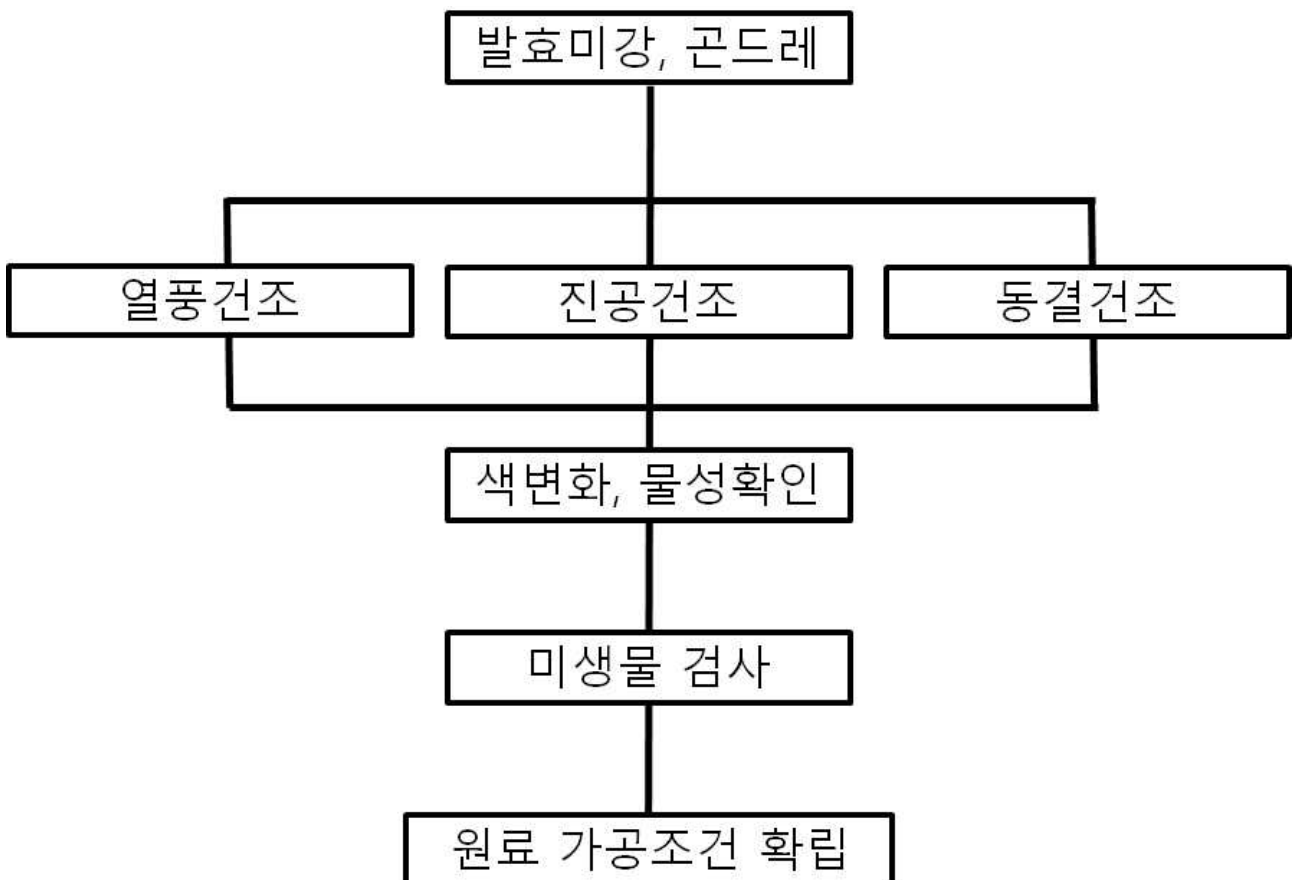



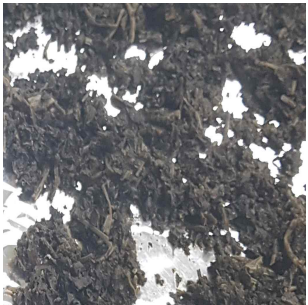
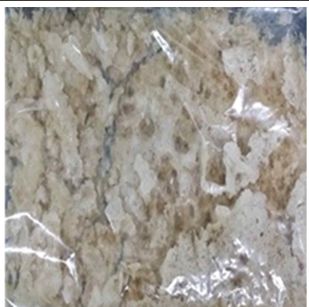
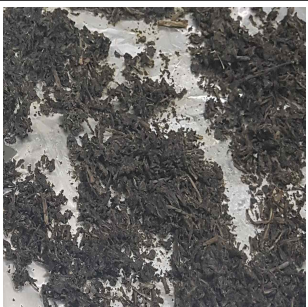


그림49. 발효완료 원료의 건조조건 검토를 위한 흐름도.

- 검토하는 건조 방법은 3가지로 동결건조, 진공건조, 열풍건조로 진행하며 수분함량이 3% 미만이 될 때까지 건조하여 건조비용대비 색, 맛, 물성, 미생물 오염 등 발효소재의 변화가 적은 조건으로 조건을 설정함.

표31. 건조방법에 따른 발효미강 및 발효곤드레의 건조 소요시간 및 색상변화

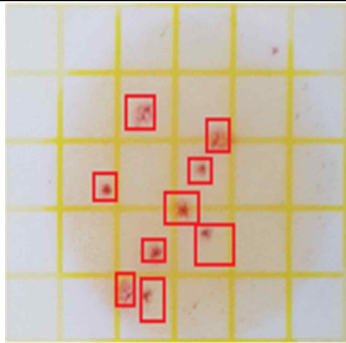
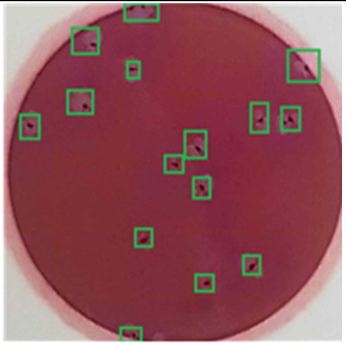

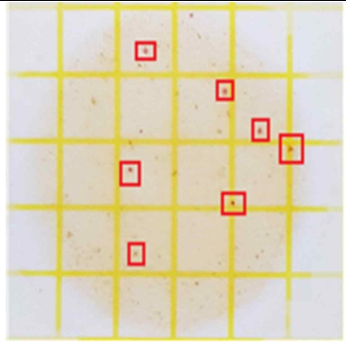
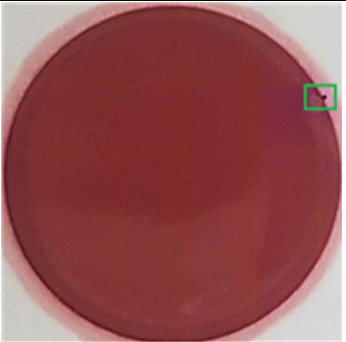
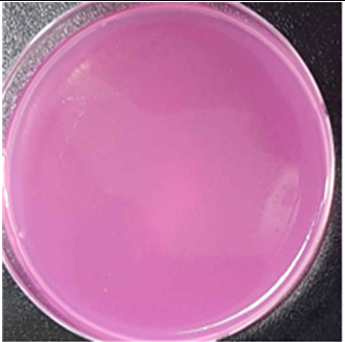

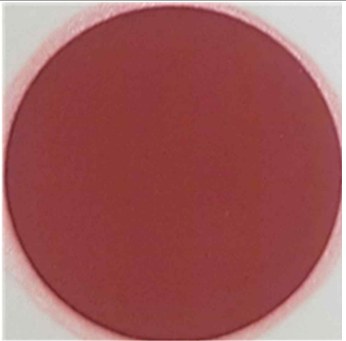
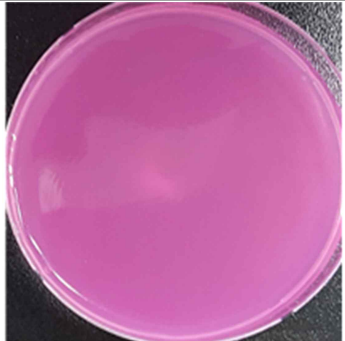
구분	발효미강			발효 곤드레		
	갈변정도	물성	건조시간	갈변정도	물성	건조시간
열풍건조 (70℃)		단단함 (핀밀분쇄 가능)	6hr		잘 부수어짐	6hr
진공건조 (70℃)		매우 단단함 (핀밀분쇄 불가능)	4hr		잘 부수어짐	5hr
동결건조 (-40℃ /25℃)		잘 부수어짐	12hr		잘 부수어짐	16hr

- 발효미강의 경우 진공건조가 가장 빠른 건조시간을 나타내었으나 매우 단단하게 굳어 핀밀을 사용한 분쇄도 불가능할 정도였으며 갈변 정도가 심했음, 열풍건조의 경우 비교적 단단하게 굳는 현상을 보였으나 핀밀을 이용하여 분쇄하는데 무리가 없었으며 동결건조의 경우 색도변화도 가장 적고 잘 부수어졌으나 건조 비용과 건조시간이 오래 소요됨.
- 발효곤드레의 경우 건조방법에 따른 물성 및 색상의 변화는 거의 일어나지 않는 것으로 확인되었으며 진공 건조에서 가장 빠른 건조 정도를 보였음.
- 건조 방법에 따른 발효미강 및 발효곤드레는 한일 푸드믹서 FM-700SS를 이용하여 2분간 분쇄하여 사용하였으며 사전에 미생물학적 오염이 없도록 200ppm 농도의 암모늄 살균제 및 70%발효주정을 이용하여 살균 후 사용하였음. 진공건조된 발효미강의 경우 경도가 너무 단단하여 일반적인 방법으로는 분쇄가 불가능하여 롤밀로 1차 분쇄 후 다른 시료와 동일한 방법으로 분쇄함.



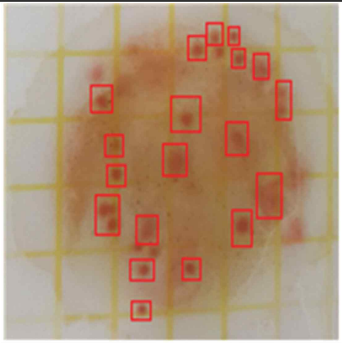
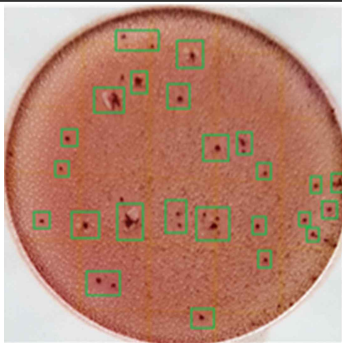
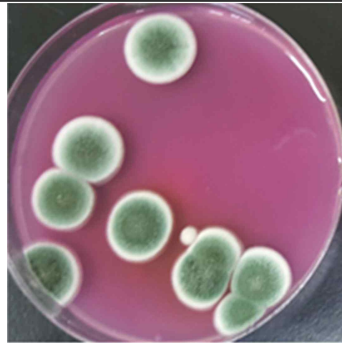
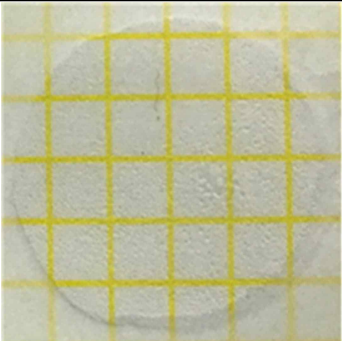
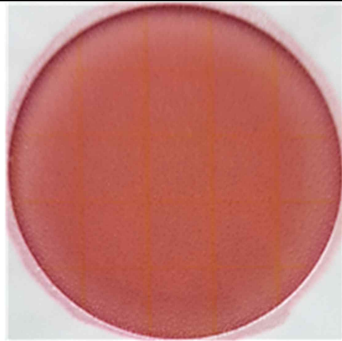
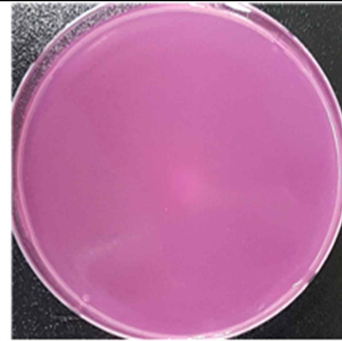
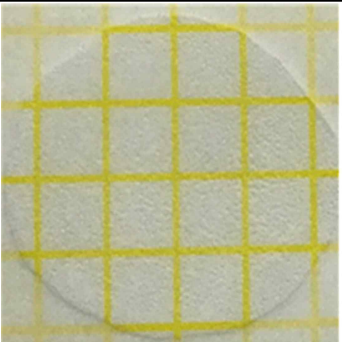
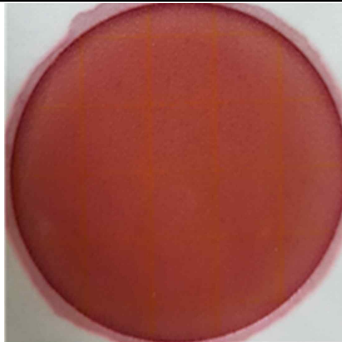
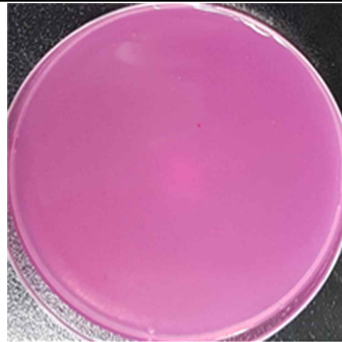
- 발효 후 분쇄가 완료된 시료는 식품공전 시험법 및 대한약전 시험법에 따라 일반미생물, 대장균군, 곰팡이균의 오염정도를 측정하였으며 측정 결과는 아래의 표와 같음.

표32. 건조 방법에 따른 발효미강의 미생물 오염 측정결과

구분	발효미강		
	일반미생물(cfu/g)	대장균군(cfu/g)	곰팡이(cfu/g)
열풍 건조 (70℃)	 검출( $1.0 \times 10^2$ )	 검출( $1.5 \times 10^2$ )	 검출( $7.0 \times 10^1$ )
진공 건조 (70℃)	 검출( $8.0 \times 10^1$ )	 검출( $1.0 \times 10^1$ )	 불검출
동결 건조 (-40℃ / 25℃)	 불검출	 불검출	 불검출

- 건조방법에 따른 발효미강의 미생물 오염도를 측정한 결과 열풍건조의 경우 곰팡이, 대장균군, 일반미생물 모두 상대적으로 높은 수준으로 오염되었으며 진공 건조의 경우 열풍 건조보다는 오염정도가 낮았으나 일반미생물 및 대장균군의 오염을 나타내었다. 동결건조의 경우 건조 후에도 미생물의 오염은 발견되지 않았다.

표33. 건조 방법에 따른 발효곤드레의 미생물 오염 측정결과

구분	발효곤드레		
	일반미생물(cfu/g)	대장균군(cfu/g)	곰팡이(cfu/g)
열풍 건조 (70℃)	 검출( $2.6 \times 10^2$ )	 검출( $3.0 \times 10^2$ )	 검출( $9.0 \times 10^1$ )
진공 건조 (70℃)	 불검출	 불검출	 불검출
동결 건조 (-40℃ /25℃)	 불검출	 불검출	 불검출

○ 건조방법에 따른 발효곤드레의 미생물 오염도를 측정한 결과 열풍건조의 경우 곰팡이, 대장균군, 일반미생물 모두 오염되었으며 진공 건조, 동결건조의 경우 건조 후에도 미생물의 오염은 발견되지 않았다.

○ 건조방법별 발효 원료의 건조물을 종합적으로 판단할 때 동결건조가 가장 좋을 것으로 확인되었으나 건조시간 및 건조비용을 생각 할 때 경제성이 없다고 판단되어 열풍건조기를 이용하는 방법으로 연구방향을 설정하였다. 진공 건조기의 경우 설비 특성상 음압에 대한 영향으로 개조가 어렵고 미강의 경우 진공건조시 가공하기 어려울정도로 단단해지는 경향이 있어 제외하였다.

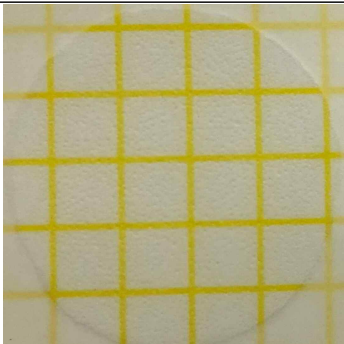
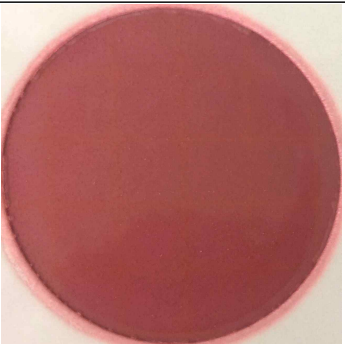
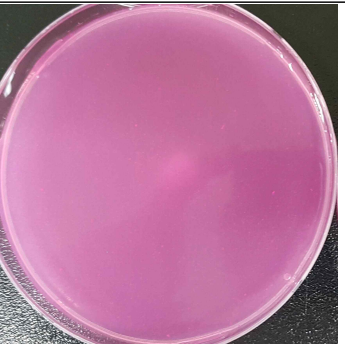
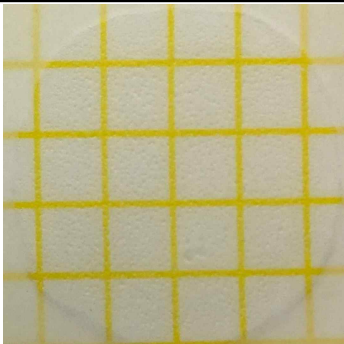
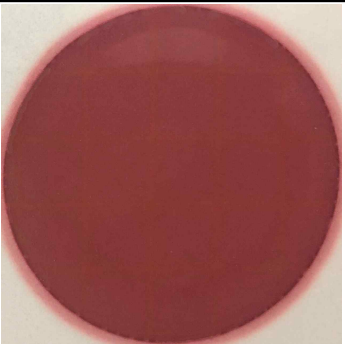
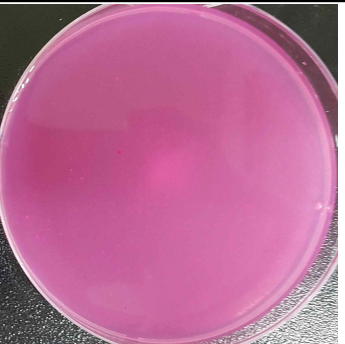




그림50. 탈착이 가능한 HEPA 필터 부착 열풍건조기 개조과정

○ 상기 그림과 같이 열풍건조기에 HEPA 필터를 부착하여 개조한 후 건조하고 그 건조물에 대하여 일반미생물, 대장균군, 곰팡이균에 대하여 시험한 결과 미생물 검출 없이 깨끗하게 건조된 것을 확인하였음.

표34. HEPA 필터부착 후 열풍건조된 발효미강 및 발효곤드레의 미생물시험 결과

구분	일반미생물(cfu/g)	대장균군(cfu/g)	곰팡이(cfu/g)
발효 미강			
	불검출	불검출	불검출
발효 곤드레			
	불검출	불검출	불검출

- 또한 HEPA 필터 부착 열풍건조기의 건조온도에 따른 건조시간 및 색상변화를 관찰한 결과 아래 표와 같이 발효미강의 경우 70°C 18hr 조건으로 건조할 때 발효 곤드레의 경우 65°C에서 20hr 건조하는 것이 가장 적합한 것으로 나타났다. 발효곤드레의 경우 70°C로 15hr 건조시 가장 건조가 빨리 되었으나 색상의 변화가 심하여 색상의 변화가 적은 65°C 20hr 조건으로 결정하였음.

표35. 건조온도에 따른 발효원료의 건조시간, 수분 및 색상변화

발효	건조온도(°C)	45	50	55	60	65	70	
		건조시간(hr)	48hr	48hr	39	28	24	18
미강	수분(%)	건조X	7.6%	7.4%	7.7%	6.8%	7.2%	
	색상변화	L :	-	L : 73.5	L : 27.8	L : 71.0	L : 69.7	L : 69.5
		+a :	-	+a : 10.8	+a : 10.7	+a : 11.5	+a : 12.2	+a : 12.1
		+b :	-	+b : 27.7	+b : 28.0	+b : 29.3	+b : 30.2	+b : 31.0
곤드레	건조온도(°C)	45	50	55	60	65	70	
	건조시간(hr)	48hr	45hr	36	22	20	15	
곤드레	수분(%)	건조X	8.4%	6.7%	7.1%	7.3%	6.5%	
	색상변화	L :	-	L : 29.2	L : 29.5	L : 32.4	L : 32.7	L : 40.1
		+a :	-	+a : 5.0	+a : 4.9	+a : 4.5	+a : 3.7	+a : 4.1
		+b :	-	+b : 14.1	+b : 13.9	+b : 13.1	+b : 11.6	+b : 12.1

- 상기 실험결과를 종합하여 결정된 곤드레파치 및 미강의 가공과정은 아래 그림과 같음.

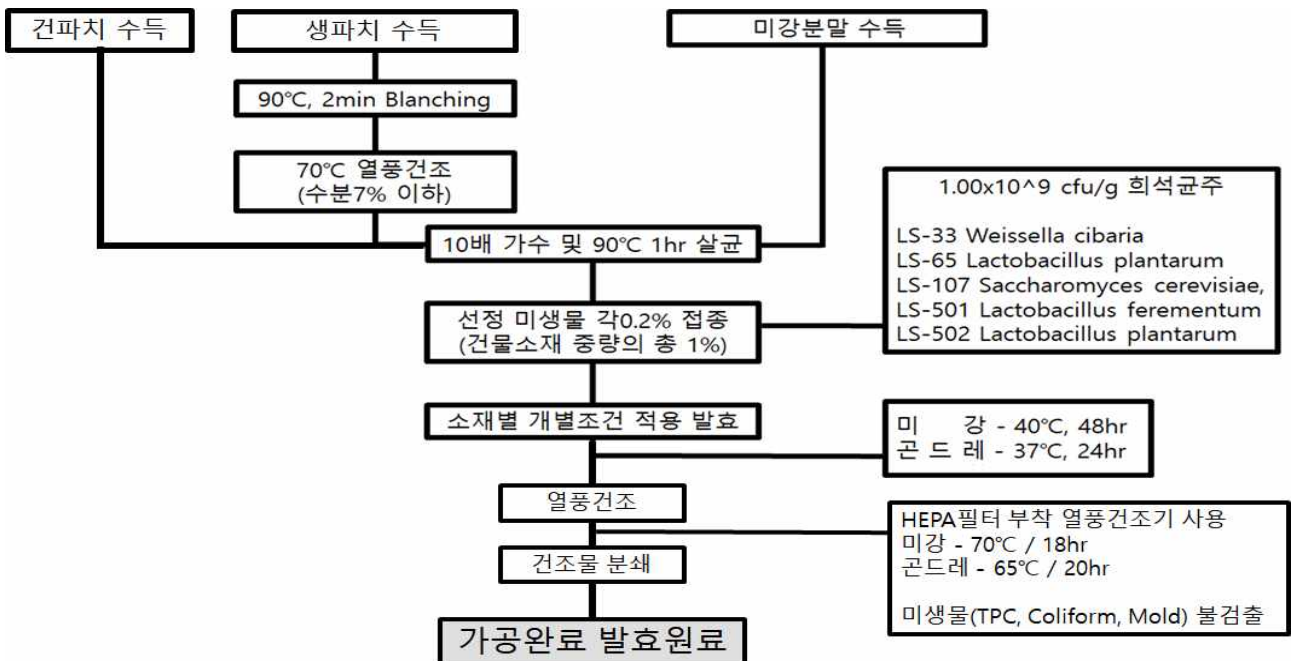


그림51. 곤드레 파치 및 미강분말의 원료가공과정

(2) 대량 생산을 위한 Pilot 실험

- 원료가공과정이 설정된 소재를 대량생산이 가능 하도록 Pilot 조건을 설정함. 실험은 (주)웰빙엘에스에서 보유한 NK증자기(600L), 이동식 발효실 등을 이용하며 대용량 발효, 건조 및 가공시 조건을 검토하여 1차년도 및 2차년도 과제 수행시 설정한 조건에 가까우면서 대량생산이 가능한 조건을 확보함.
- 1차년도에서 가수량을 10배 가수로 결정한 것은 생 곤드레의 수분율과 동일하게 맞추고 미강의 색 변화를 막기 위함이었으나 10배 가수의 경우 대량 생산시 건조 소재의 수율 부분에 있어 불리하므로 가수량을 낮추면서도 발효에 적합한 조건을 찾기 위하여 가수량 조절 실험을 수행함.

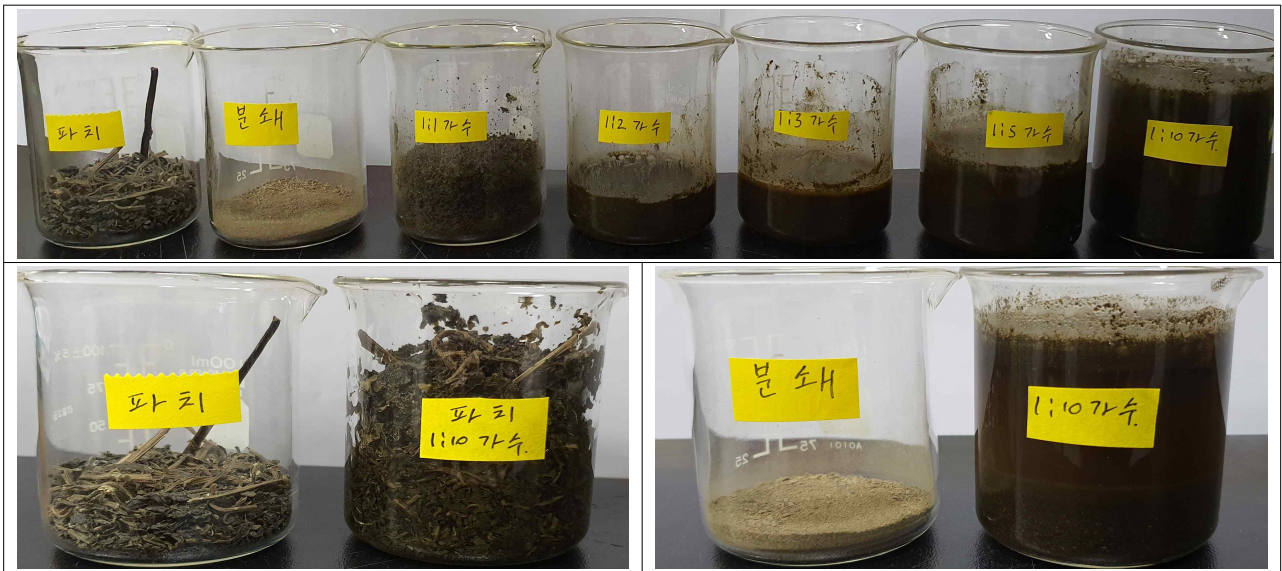
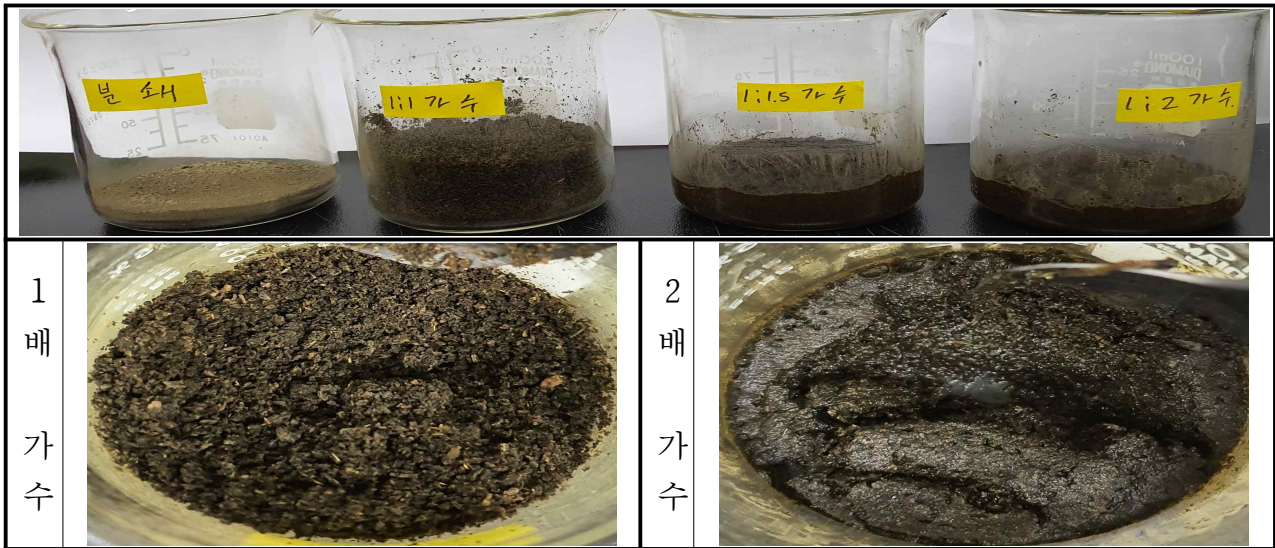


그림52. 곤드레의 상태 및 가수량별 곤드레파치의 부피변화

- 위의 그림을 보면 곤드레의 경우 파치상태보다는 분쇄시에 동일한 중량대비 무게가 1/3 수준으로 크게 감소하였으며 가수 시에도 파치의 경우 중량대비 10배에 해당하는 물을 가수해야 발효가 가능한 정도가 되는 것에 반하여 분말 상태일 때는 중량대비 1~2배에 해당하는 물만 가수해도 발효가 가능한 정도의 상태를 나타내었음(아래 그림 참조)





○ 곤드레 파치 분말의 경우 1배의 물을 가수할 경우 입단구조를 형성하며 오히려 부피가 더 커지는 현상이 나타났는데 1.5배 이상의 물을 가수할 경우 이러한 현상은 사라지는 것을 확인함. 또한 1.5배의 물을 가수 시에는 가수한 물을 흡수하여 굳는 현상이 일어났으나 2배의 물을 가수 시 적당한 유동성을 가지는 것을 확인함.

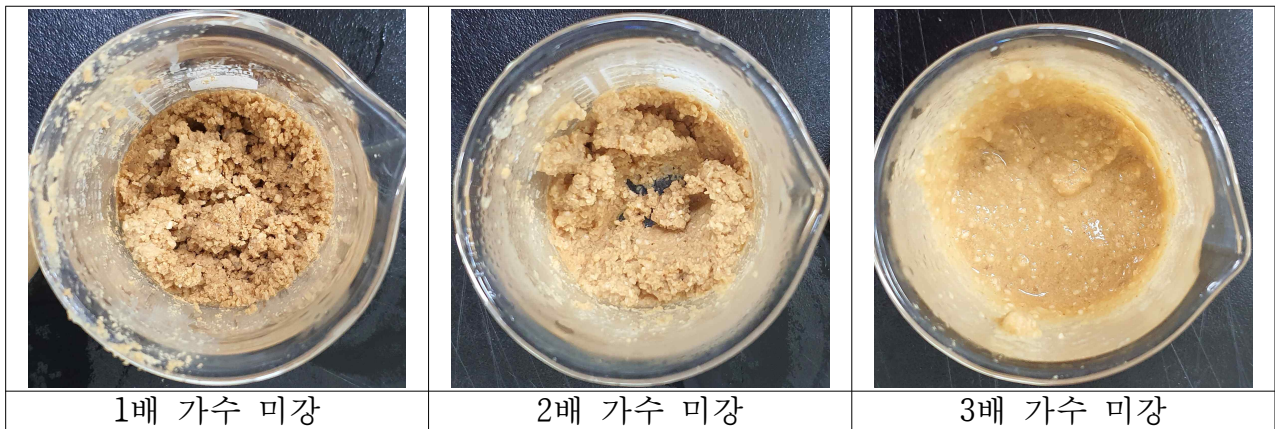


그림53. 곤드레의 상태 및 가수량별 곤드레파치의 부피변화

○ 미강의 경우 대량발효에서 살균 후 호화되는 현상이 가장 큰 문제점으로 미강분말에 가수 후 90℃ 조건으로 1hr 살균 후 변화되는 물성을 확인하였음. 당초 계획시 미강의 색상 변화를 최대한 막는 방향으로 생각하였으나 대량 발효시는 탱크 벽면 등 가열되는 부분에서 갈변현상이 일어날 수밖에 없는 구조를 가졌으므로 갈변에 대한 문제는 배제하기로 함.

○ 가수량에 따른 살균 후 물성변화를 확인결과 물을 미강 중량의 3배 가수할 때 적당히 유동성이 있는 죽(粥)상을 가지는 것으로 확인됨.

○ 상기 가수실험에서 확인된 결과를 바탕으로 대량 생산을 위한 Pilot 실험을 아래 그림 (흐름도 및 수행과정)과 같이 수행함

<b>곤드레 파치</b>	건파치 : 핀밀분쇄(30mesh) 생파치 : 90°C, 2min Blanching 70 °C 열풍건조(수분7% 이하) 핀밀분쇄(30mesh)	<b>미강분말</b>	
<b>NK증자기 투입</b>	2배 가수 및 90°C 1hr 살균	<b>NK증자기 투입</b>	3배 가수 및 90°C 1hr 살균
<b>접종 (각 0.2%, 총 1.0%)</b>	1.0x10 <sup>9</sup> cfu/g 회석균주 LS-33 : Weissella cibaria LS-65 : Lactobacillus plantarum LS-107 : Saccharomyces cerevisiae LS-501 : Lactobacillus fermentum LS-502 : Lactobacillus plantarum	<b>접종 (각 0.2%, 총 1.0%)</b>	1.0x10 <sup>9</sup> cfu/g 회석균주 LS-33 : Weissella cibaria LS-65 : Lactobacillus plantarum LS-107 : Saccharomyces cerevisiae LS-501 : Lactobacillus fermentum LS-502 : Lactobacillus plantarum
<b>발효</b>	발효조건 : 37°C 시료측정 : 유산균, 효모, pH, 이취 (매6hr)	<b>발효</b>	발효조건 : 40°C 시료측정 : 유산균, 효모, pH, 이취 (매6hr)
<b>열풍건조</b>	건조온도 : 65°C 건조Tray 용량 당 건조시간 측정	<b>열풍건조</b>	건조온도 : 70°C 건조Tray 용량 당 건조시간 측정
<b>건조물 분쇄</b>	분쇄시 물성확인	<b>건조물 분쇄</b>	분쇄시 물성확인
<b>Pilot 생산 조건 확립</b>		<b>Pilot 생산 조건 확립</b>	
곤드레 파치 소재 Pilot 생산조건 결정과정		미강 소재 Pilot 생산조건 결정과정	

그림54. 각 소재에 따른 Pilot 생산조건 설정 흐름도



그림55. 대량생산을 위한 Pilot 실험 수행과정

표36. 대량생산 조건으로 발효된 발효소제의 측정결과

소재 (발효온도)	발효시간(hr)	생균수(cfu/g)		pH	이취
		유산균	효모		
곤드레 (37℃)	0	-	-	5.90	X
	6	$7.52 \times 10^7$	$1.04 \times 10^7$	5.81	X
	12	$2.44 \times 10^8$	$4.35 \times 10^7$	5.69	X
	18	$6.31 \times 10^8$	$1.00 \times 10^8$	5.50	X
	24	$1.01 \times 10^9$	$9.21 \times 10^8$	4.75	O
	30	$1.20 \times 10^9$	$4.11 \times 10^8$	4.30	O
미강 (40℃)	0	-	-	6.24	X
	6	$6.35 \times 10^7$	$2.10 \times 10^7$	5.93	X
	12	$7.70 \times 10^8$	$9.40 \times 10^7$	5.14	X
	18	$1.94 \times 10^9$	$2.10 \times 10^8$	4.60	O
	24	$1.30 \times 10^9$	$2.40 \times 10^8$	4.51	O
	30	$8.32 \times 10^8$	$6.00 \times 10^8$	4.84	O

○ 대량생산 조건을 검토한 결과 곤드레는 18hr을 미강은 12hr을 발효하는 것이 가장 좋은 것으로 나타났음 대부분의 경우 가수량이 줄어들 경우 발효시간이 더 길어지거나 생균수의 증가량이 더 적어지는데 본 실험의 경우 발효시간이 더 짧아지며 생균수의 증가도 더 가파르게 일어났음 곤드레의 경우 원료의 분쇄를 통해 미생물이 원료와 접하는 표면적이 증가된 이유와 가수량이 줄어들었지만 적정 정도의 유동성을 가지기 때문인 것으로 생각됨.

표37. 발효 소재의 건조 조건에 따른 건조시간 및 물성변화

소재 (건조온도)	Tray당 용량(kg)	함수율(%)	건조시간(hr)	물성
곤드레 (65℃)	1.0	7.3	20hr	쉽게 부서짐 (손으로 부서짐)
	1.2	7.0	20hr	쉽게 부서짐 (손으로 부서짐)
	1.4	7.3	21hr	쉽게 부서짐 (손으로 부서짐)
	1.6	6.6	24hr	쉽게 부서짐 (손으로 부서짐)
	1.8	7.0	28hr	쉽게 부서짐 (손으로 부서짐)
	2.0	7.1	30hr	쉽게 부서짐 (손으로 부서짐)
미강 (70℃)	1.0	6.9	20	단단함 (핀밀분쇄 가능)
	1.2	7.2	22	단단함 (핀밀분쇄 가능)
	1.4	6.5	25	단단함 (핀밀분쇄 가능)
	1.6	6.8	30	매우 단단함 (핀밀분쇄 어려움)
	1.8	6.9	35	매우 단단함 (핀밀분쇄 불가능)
	2.0	6.7	38	매우 단단함 (핀밀분쇄 불가능)



○ 대량생산된 발효소재의 Tray 투입량 대비 건조시간 및 물성을 확인한 결과 발효 곤드레의 경우 1개 Tray 당 1.6kg을 분주하여 65°C에서 24hr 건조하는 조건이 발효 미강의 경우 1개 Tray 당 1.2kg을 분주하여 70°C에서 22hr 건조하는 조건이 가장 좋은 것으로 확인되었음.

곤드레 발효물의 경우 Tray의 투입량에 따른 물성에는 차이가 없었으나 Tray 투입량이 증가될수록 건조시간이 길어지는 단점이 있었으며 이에 따라 대량생산시 작업자의 시간 및 시간대비 발효 건조물 회수량의 효율을 생각하여 결정하였음.

미강의 경우 1개 Tray당 1.6kg 이상 발효물을 투입하여 건조할 경우 건조물이 매우 단단해지며 핀밀로도 분쇄가 어려울정도의 물성으로 가지게 되기 때문에 1개 Tray 당 1.2kg을 투입하여 22hr로 건조하는 방법을 결정하였음.

○ 상기 실험에 따라 최종 결정된 노인식용 발효곤드레 부산물(파치)의 제조공정은 아래 그림과 같음.

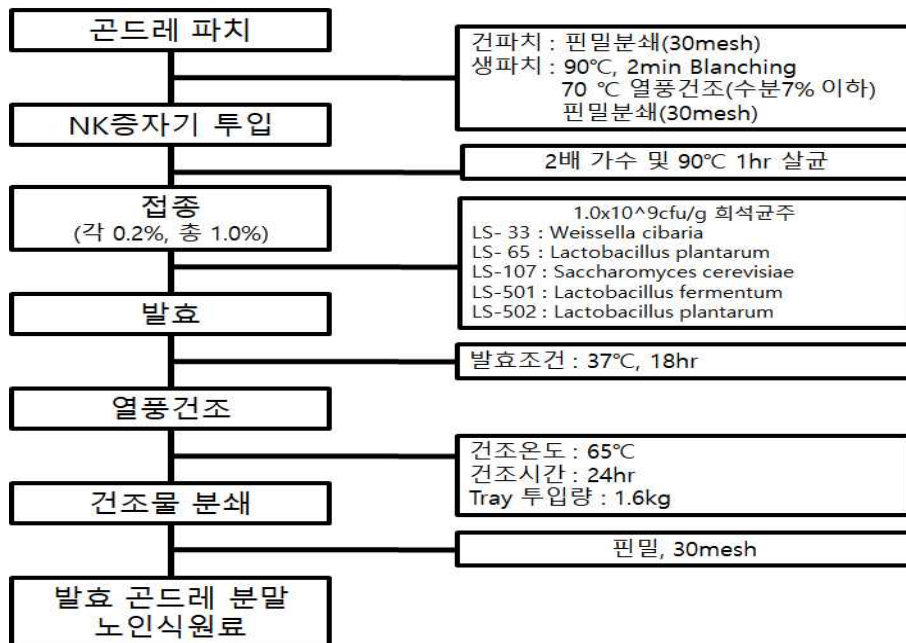


그림56. 최종 결정된 노인식 원료용 발효곤드레 제조공정

○ 상기 실험에 따라 최종 결정된 노인식용 발효미강의 제조공정은 아래 그림과 같음.



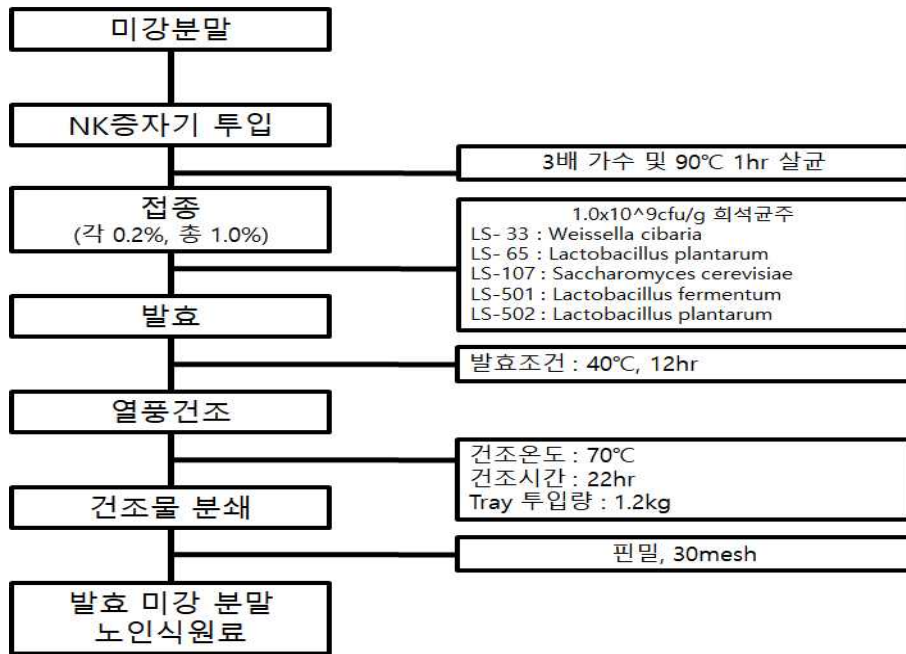


그림57. 최종 결정된 노인식 원료용 발효미강 제조과정

○ 최종 제조공정이 완료된 발효미강 및 발효곤드레 노인식원료를 제조하여 홍천메디컬허브 연구소 및 주관기관인 세준에프엔비에 전달하였음 또한 각 소재에 대하여 품목제조 보고함.

(3) 발효소재 활용 노인편의식 소스레시피 설정

- 발효소재를 활용하여 노인 입맛에 맞는 소스 레시피를 설정함. 기존의 소스의 경우 사용되는 기능성 원료의 함량이 낮아 큰 생리활성 효과를 기대 할 수 없음. 따라서 발효된 원료를 모두 합쳐 50% 이상 사용하는 방향으로 하여 페이스트 소스를 개발함.
- (주)웰빙엘에스는 기존에 소스를 생산한 경험이 있음, 따라서 기존 소스의 레시피에서 주요 원료를 발효곤드레, 발효미강으로 대체하는 방법을 통하여 노인식 소스를 개발함. 만들어진 소스는 65세 이상의 남, 여 노인들 52명에게 제공하여 관능평가를 진행함 노인들의 경우 관능평가 설문지를 보고 직접 작성하는 것은 어렵기 때문에 관능평가지는 (주)웰빙엘에스의 연구원이 설문지에 맞게 질문하고 답변을 받는 방식으로 진행하였음.



표39. 관능평가 결과

종 류	토마토베이스	타르타르베이스	어니언베이스
향	2.3	1.6	1.9
단 맛	2.1	1.8	2.4
신 맛	2.5	0.9	2.3
짠 맛	2.0	2.1	0.4
쓴 맛	2.8	2.4	2.6
색 도	1.5	1.0	0.9
점 도	2.4	1.9	2.6
종합점수(21점 만점)	15.6	11.7	13.1
선호도(순위)	1	3	2

○ 상기 토마토베이스를 기반으로 개발한 소스는 품목제조보고 하였으며 아래와 같이 시작품을 제작함.

(4) 사업화를 위한 시작품 제작

- 시작품 제작을 위하여 위의 소스개발 레시피 실험을 통해 개발된 발효소스를 제조하고 아래와 같은 과정으로 검토함.



그림. 소스 제조과정



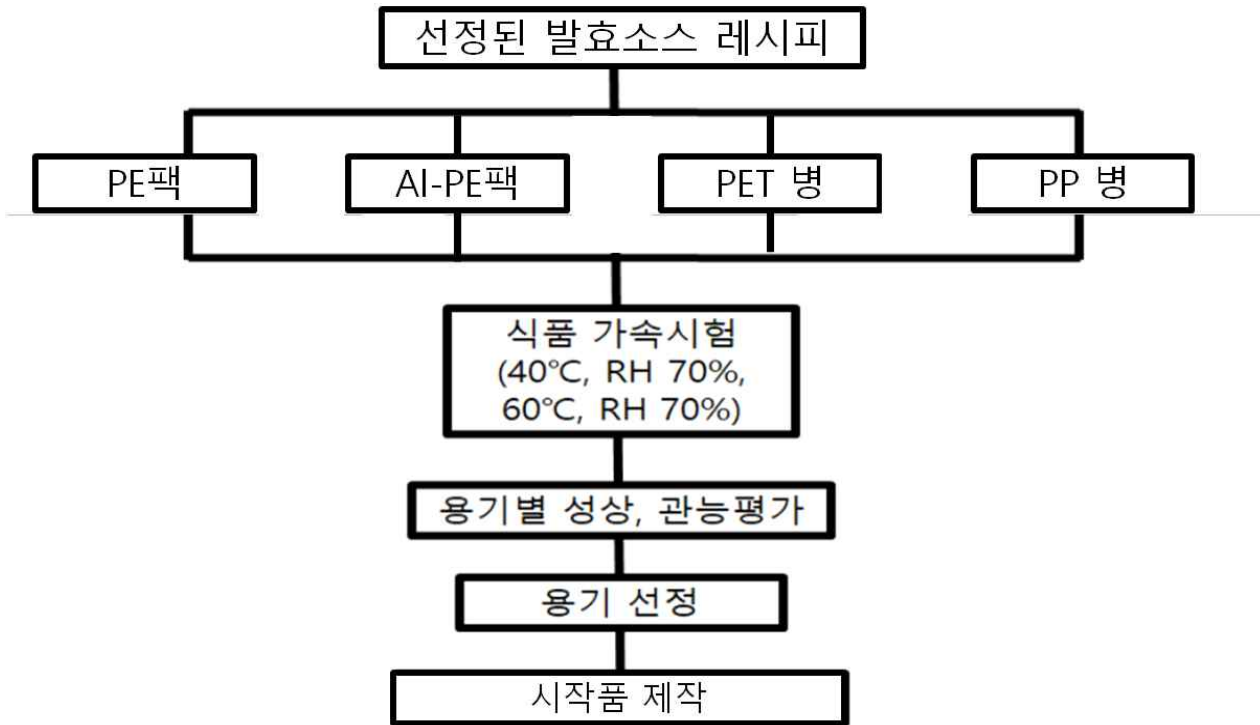


그림. 시작품 제작을 위한 흐름도

- 식품 가속시험의 경우 상기 그림과 같이 소스를 제조하고 용기별로 충전 후 데시케이터를 이용하여 NaCl 포화염용액에 따른 RH 조절방법을 사용하여 시험하였으며 4주간 가속시험하며 각 용기별 성상 및 관능평가를 아래 표와 같이 진행함.



그림. 가속실험을 위한 시료 및 가속실험중인 시료의 모습

표. 발효소스의 가속 1주 성장 및 관능변화








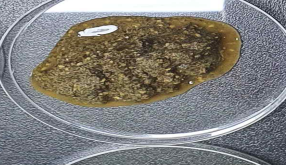




용기	냉장보관 시료	40℃ 가속	60℃ 가속	관능변화
PE팩				변화 없음
Al-PE팩				변화 없음
PET 병				변화 없음
PP 병				변화 없음

표. 발효소스의 가속 2주 성장 및 관능변화















용기	냉장보관 시료	40℃ 가속	60℃ 가속	관능변화
PE팩				변화 없음
Al-PE팩				변화 없음
PET 병				변화 없음
PP 병				변화 없음

표. 발효소스의 가속 3주 성장 및 관능변화










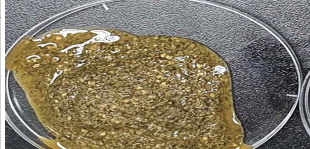


용기	냉장보관 시료	40℃ 가속	60℃ 가속	관능변화
PE팩				변화 없음
Al-PE팩				변화 없음
PET 병				변화 없음
PP 병				변화 없음

표. 발효소스의 가속 4주 성장 및 관능변화



용기	냉장보관 시료	40℃ 가속	60℃ 가속	관능변화
PE팩				변화 없음
Al-PE팩				변화 없음
PET 병				변화 없음
PP 병				변화 없음

- 4주간 40℃, RH70% 및 60℃, RH70% 조건으로 가속시험 및 관능평가를 진행한 결과 특이적인 관능 및 성상의 변화는 없었으며 용기에 따른 차이도 보이지 않음. 또한 본 소스인 물성을 볼 때 광구라 하더라도 직접 내용물을 꺼내거나 거꾸로 세워 털어내야 하는 방식의 PET나 PP 병을 사용하는 것은 불편할 것으로 판단되며 Al-PE팩의 경우에도 속의 내용물에 대한 색을 확인 할 수 없어 불편할 것으로 판단하였음. 따라서 속의 내용물을 볼 수 있으면서 저비용으로 충전이 가능하고 짜는 형태로 사용이 가능한 스파우트 파우치 형태의 PE팩으로 시작품의 제작하는 것을 결정함.



그림. 시작품 사진



### 2-2-3 (재) 홍천메디칼 허브 연구소

#### (1) 원료제품 및 완제품의 면역증강 효능평가

가. 발효곤드레, 발효미강, 시제품 추출물의 RAW264.7 세포주를 이용한 면역증강 효능평가

##### ○ 발효곤드레, 발효미강, 시제품 추출물의 세포생존률 평가

- 각 시료의 용매별 추출물의 세포에 대한 독성을 평가하기 위하여 Desai 등의 방법을 변형하여 MTT assay를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였음.
- 원료제품인 발효곤드레, 발효미강 시제품의 세포독성을 확인한 결과 모든 추출물에서 90%이상의 세포생존율을 보여 세포독성이 없는 것으로 나타났음.

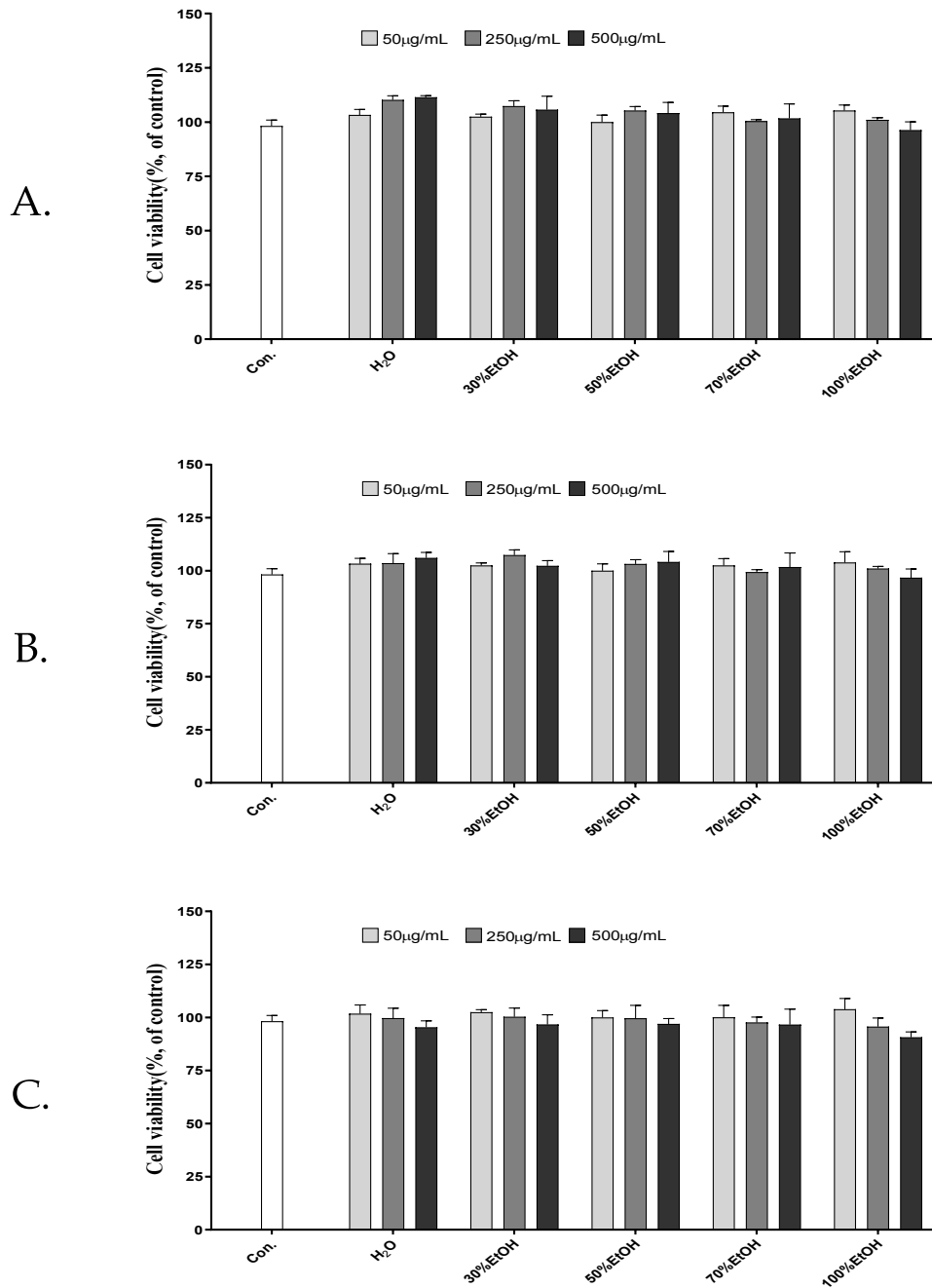


그림60. 발효곤드레(A), 발효미강(B), 시제품(C)의 용매별 추출물 세포독성평가

- 발효곤드레, 발효미강, 시제품 추출물의 NO 생성량 평가
  - 마우스 대식세포주(RAW264.7)를 이용하여 NO 생성량을 이용하여 발효곤드레(A), 발효미강(B), 시제품(C)의 용매추출물별 면역증강 효능을 비교하였음.
  - A 그림은 용매추출물별 발효곤드레의 추출물의 NO 생성량을 나타내었으며, B 그림은 용매추출물별 발효미강 추출물의 NO 생성량을 나타내었으며, C 그림은 용매추출물별 시제품의 NO 생성량을 비교하여 나타내었음.
  - 발효곤드레의 물추출물에서 농도의존적으로 NO의 생성량이 증가하였으며, 50, 250, 500 µg/mL의 농도에서 NO 생성량은 각각 43.85, 58.46, 64.68 µM의 생성량을 나타내

었으며, 알코올의 농도가 높을수록 NO의 생성량은 감소하는 추세를 나타내었음.

- 발효미강의 물추출물에서 농도의존적으로 NO의 생성량이 증가하였으며, 500  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 NO가 61.45  $\mu\text{M}$ 의 생성량을 나타내었으며, 알코올의 농도가 높을수록 NO의 생성량은 감소하는 경향을 나타내었음.
- 시제품의 경우 물추출물에서 농도의존적으로 가장 높은 NO의 생성량을 보였으며, 물추출물, 30% 알코올 추출물, 100% 알코올 추출물 순으로 나타났음.

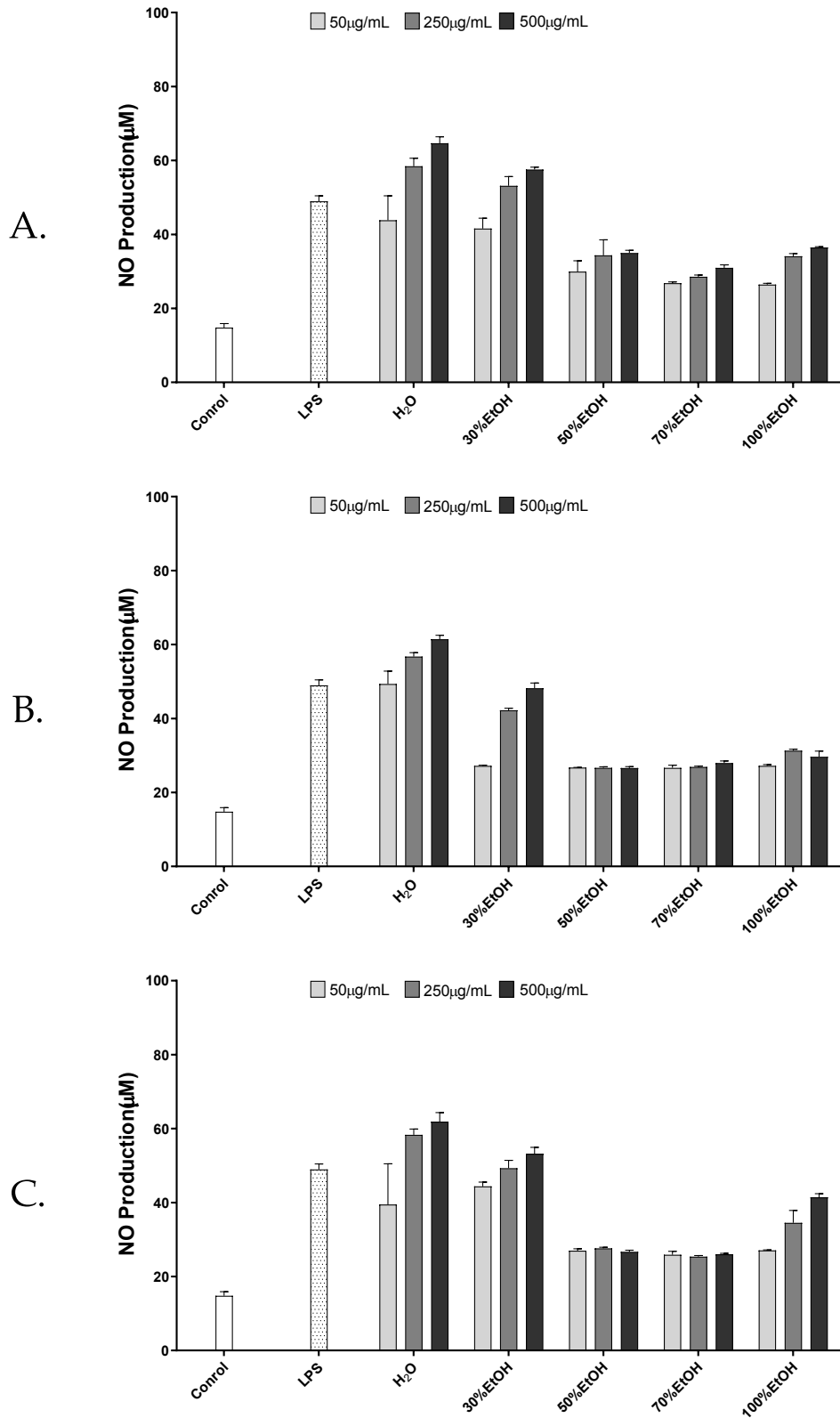


그림 61. 발효곤드레(A), 발효미강(B), 시제품(C)의 용매별 추출물 NO 생성량 평가

- 발효곤드레, 발효미강, 시제품 추출물의 Real-time PCR을 이용한 mRNA 발현 level 분석

표40. primer sequence

iNOS	sense	5'-CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC-3'
	antisense	5'-GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3'
COX-2	sense	5'-CACTACATCCTGACCCACTT-3'
	antisense	5'-ATGCTCCTGCTTGAGTATGT-3'
TNF- $\alpha$	sense	5'-TCTCATCAGTTCTATGGCCC-3'
	antisense	5'-GGGAGTAGACAAGGTACAAC-3'
GAPDH	sense	5'-CACTCACGGCAAATTCAACGGCAC-3'
	antisense	5'-GACTCCACGACATACTCAGCAC-3'

- Real-time PCR을 이용한 유전자 발현 측정은 24시간 배양된 세포에서 TRIZOL reagent (Invitrogen, CA, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였음.
- 추출된 RNA 정량하여 cDNA를 합성한 후 SYBR green과 GAPDH, COX-2, iNOS, TNF- $\alpha$  primer를 이용하여 real-time PCR을 수행하였고 대조군 유전자로는 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 사용하였다. Real-time PCR system(StepOne Real-time PCR system, Applied Biosystems, Singapore)을 이용하여 형광신호를 정량하였음.

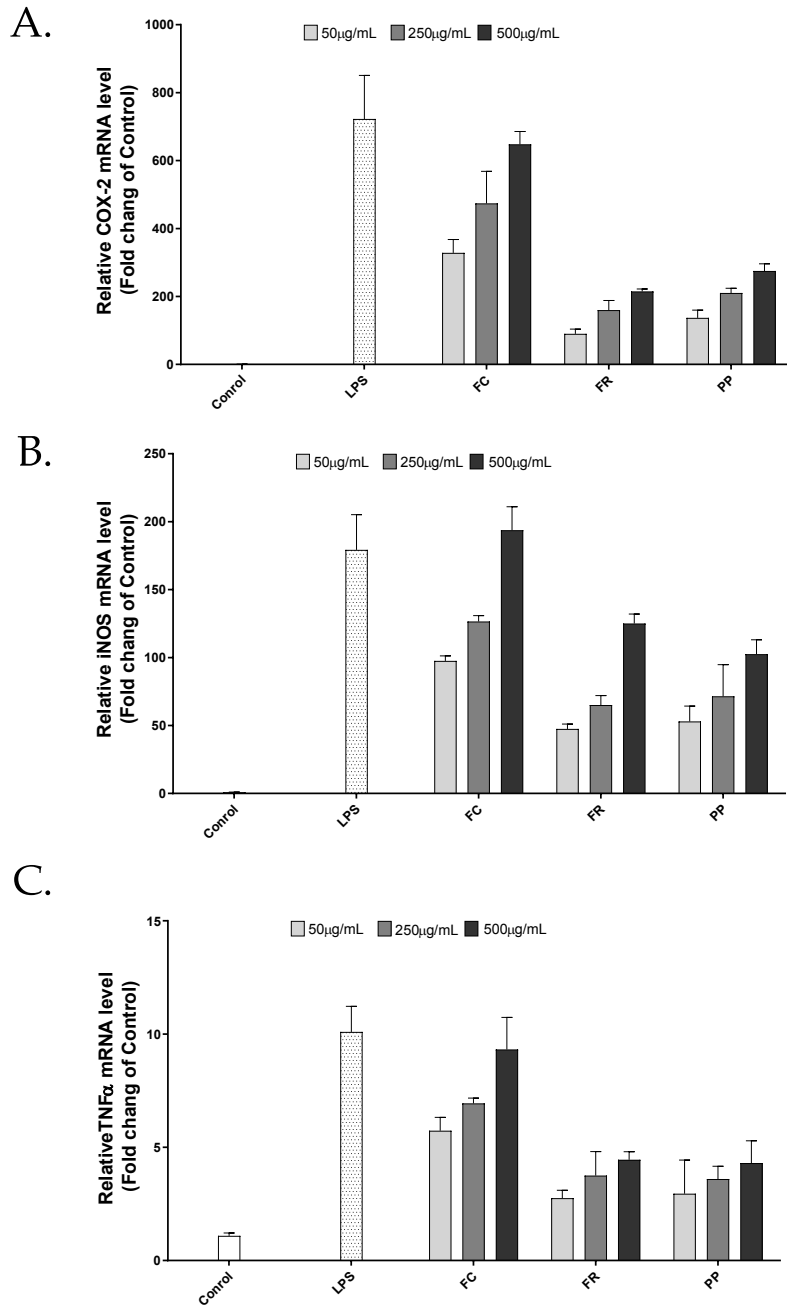


그림62. 발효곤드레, 발효미강, 시제품 처리에 의한 mRNA 발현 level

- 발효곤드레, 발효미강, 시제품의 물추출물이 NO생성량을 가장 많이 증가시켰으므로 유전자 분석에서는 물추출물만을 사용하였음
- 각각의 추출물의 처리 농도가 증가할수록 COX-2, iNOS, TNF- $\alpha$ 의 유전자 발현도 증가하는 것으로 나타남.
- 발효곤드레에서 면역증강 효능이 다른 발효산물에 비해 상대적으로 높게 나타났음.

나. 발효곤드레, 발효미강, 시제품 추출물의 ex-vivo에서의 면역증강효능평가

- 발효곤드레, 발효미강, 시제품 추출물의 ex-vivo에서의 면역증강효능평가

- 8~9 주령의 마우스에서 비장(spleen)을 적출하여 비장세포(splenocyte)를 분리하여 배

양하여 cytokine의 함량을 분석하여 면역증강 효능을 평가하였음. 소재는 세포실험에서 상대적으로 우수한 발효곤드레, 발효미강, 시제품의 물추출물을 처리하였음.

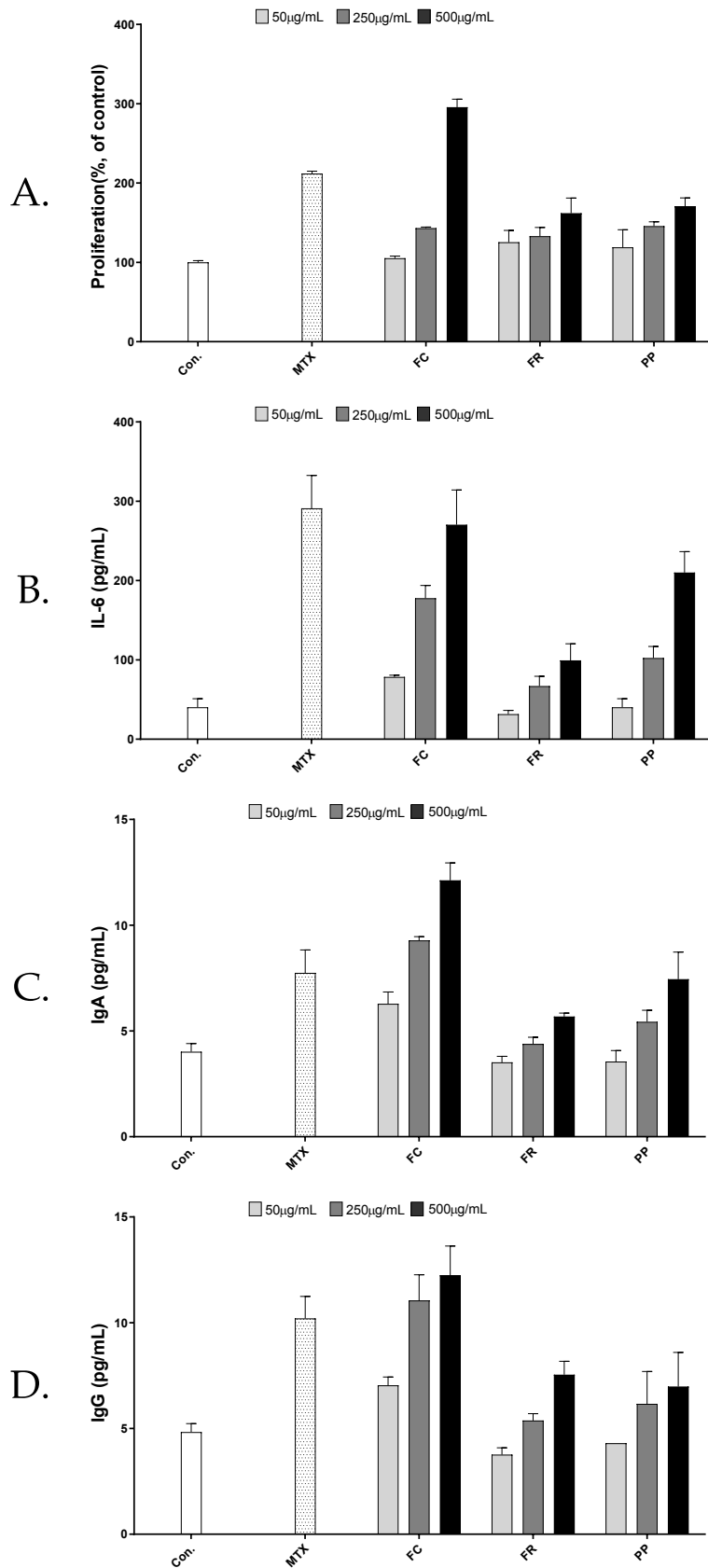


그림63. 발효곤드레, 발효미강, 시제품 추출물의 ex-vivo 면역증강효능평가



- 배양된 splenocyte에 조건별 곤드레 추출물을 50, 250, 500  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하여 세포증식효능, IL-6, IgG, IgA의 함량을 ELISA 분석법을 통하여 평가하였음.
- 세포증식능은 발효곤드레의 물추출물 500  $\mu\text{g/mL}$  처리구에서 대조구에 비해 약 3배 높았으며, 발효미강 물추출물 500  $\mu\text{g/mL}$  처리구에서 1.6배, 시제품 물추출물 500  $\mu\text{g/mL}$  처리구에서 1.7배로 나타났음.
- IL-6는 1 uM MTX(Methotrexate)를 처리한 구에서 291 pg/mL로 나타났으며, 발효곤드레의 물추출물 500  $\mu\text{g/mL}$  처리구에서 270.3 pg/mL로 가장 높게 나타났으며, 다음으로 시제품의 물추출물 500  $\mu\text{g/mL}$  처리구에서 210.0 pg/mL, 발효미강 물추출물 500  $\mu\text{g/mL}$  처리구에서 99.33 pg/mL의 농도로 나타났음.
- IgA의 경우 1 uM MTX를 처리한 구(7.75 pg/mL)에서 보다 발효미강 물추출물 500  $\mu\text{g/mL}$  처리구에서 12.12 pg/mL로 더 높게 나타났음.
- IgG의 경우 1 uM MTX를 처리한 구(10.02 pg/mL)에서 보다 발효곤드레의 물추출물에서 12.24 pg/mL로 더 높게 나타났음.
- 발효곤드레의 열수추출물이 비장세포를 이용한 ex-vivo 면역증강효능평가에서도 비장세포의 세포증식을 증가시키고, 면역관련 사이토카인(cytokine)인 IL-6, IgA, IgG의 분비를 증가시켜 면역증강효능을 나타내는 것으로 사료됨. 또한 이를 이용한 시제품에서는 함유량의 원인으로 비교적 낮게 나타났음.

## (2) 지표성분 시험방법 밸리데이션

### 가. 발효산물 원료의 확보 및 추출물 제조

#### ○ 발효산물 원료 확보

- 발효산물의 추출물 제조를 위하여 선정된 2종의 발효산물(미강, 곤드레)을 (주)웰빙엘에스로부터 전달받아 사용하였음.



A: 원료제품(발효 미강 분말)



B: 원료제품(발효 곤드레 분말)

그림64. 발효산물 원료제품 2종

#### ○ 발효산물 원료의 추출물 제조

- 발효산물 분말 시료를 약 10 g 칭량하여 추출원료로 사용하였음.
- 환류추출기(DH.WEB01008(WiseBath))를 이용하여 주정 50%를 용매로 조제하여 추출용매로 사용하였음. 추출은 용매를 투입하고 70°C에서 2시간 추출하였음.

- 추출액을 filter paper(No.1, Whatman international, UK)로 여과하고 여액은 rotary vaccum evaporator에서 감압농축하였음.
- 농축액은 동결건조기((주)일신바이오베이스)에 시료를 넣고 내부압 0.5Torr에서 -35℃에서 3일간 동결건조 하였음. 동결건조가 완료된 최종추출물은 추출·분리정제실 데시케이터(SP-WFN)에서 보관하였음.



① 시료 칭량



② 추출용매 첨가



③ 추출



④ 여과



⑤ 농축



⑥ 예비동결



⑦ 동결건조



⑧ 발효산물 곤드레 추출물 제조 완료

그림65. 발효산물 추출물 제조 과정

나. 발효산물의 지표성분 선정

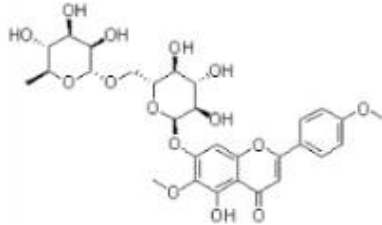
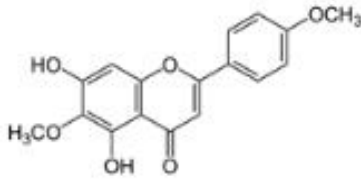
○ 발효곤드레, 발효미강의 지표성분 선정

- 1차년도 최종후보 발효산물 2종의 지표성분의 선정은 선행연구 내용과 결과를 반영하여 지표성분을 최종 선정되었음.
- 곤드레의 지표성분은 pectolinarin( $C_{29}H_{34}O_{15}$ , MW. 622.57) 및 이의 비배당체 형태인 pectolinarigenin( $C_{17}H_{14}O_6$ , MW. 314.29)로 선정됨
- 미강의 지표성분은 GABA(Gamma amino butyric acid,  $C_4H_9O_2$ , MW. 103.12)로 선정됨.
- 1차년도 발효산물의 지표성분 함량분석 결과를 통해 최종 시험법을 설정하였으며, 시험법 검증(Method Validation)을 수행함으로써 설정된 분석법의 타당성을 확인하고자 함.
- 기능(지표)성분의 시험방법은 기능(지표)성분의 규격을 분석하는데 적합하여야 하며, 「건강기능식품의 기준 및 규격」, 「식품의 기준 및 규격」, 「축산물의 가공기준 및 성분규격」, 「식품첨가물의 기준 및 규격」, 국제식품규격위원회(Codex Alimentarius Commission, CAC) 규정, AOAC 방법 등에 따라 국내·외에서 공인된 방법을 사용하여야 함(건강기능식품 기능성원료 인정에 관한 규정 제14조 제5호, 식품의약품안전처고시 제2016-141호).
- 1차년도 곤드레 발효산물의 지표성분 함량분석 결과를 통해 최종 시험법을 설정하였으며, 시험법 검증(Method Validation)을 수행함으로써 설정된 분석법의 타당성을 확인하고자 함.

다. 시험법 검증

○ 발효곤드레, 발효미강의 지표성분 시험법 검증

- 곤드레 발효산물 중 Pectolinarin 및 Pectolinarigenin 함량을 확인하기 위하여 설정된 분석법의 유효성을 검증하였음.
- 설정된 방법으로 분석법의 특이성(Specificity), 직선성(Linearity), 정확성(Accuracy) 및 정밀성(Precision) 항목을 검토하였음.
- 분석물질

항 목	Pectolarin	Pectolarigenin
Chemical structure		
Chemical formula	C <sub>29</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
Molecular Weight	622.57 g/mol	314.29 g/mol
CAS number	28978-02-1	520-12-7
Product No.	SMB00344	BP1069
Lot No.	SLBQ8427V	PRF8051624
Purity	99%	98.79%
Storage	Store at 2-8 °C	Store at 2-8 °C

- 분석시료 : 곤드레 발효산물
- 분석방법 : 고속액체크로마토그래피법

1) 장비

HPLC System	Shimadzu, LC20-A
	Degasser, DG-20A5, L20244809644 CR
	Pump, LC20-AP, L2054900280 AE
	Autosampler, SIL-20A, L20164806615 AE
	Column oven, CTO-20A, L20204807365 AE
	Detector, SPD-20AV, L20144801717 AE
Analytical column	XBridge C18 (4.6x250 mm, 5um)

2) 시약

㉞ 표준물질

- ① Pectolarin (Sigma-Aldrich, Cat. No. SMB00344, Lot. No. SLBQ8427V, purity: 99%)
- ② Pectolarigenin (Chengdu Biopurify, Cat. No. BP1069, Lot. No. PRF8051624, purity: 98.79%)

㉟ 일반시약

- ① Acetonitrile (J.T Baker, HPLC Grade)
- ② Trifluoroacetic acid (Sigma)
- ③ Dimethyl sulfoxide (Daejung, Guaranteed)
- ④ 3차 증류수

3) 표준용액의 조제

- ① Pectolarin 및 Pectolarigenin 표준물질 약 1.5 mg을 정밀히 취하여 Dimethyl sulfoxide에 용해하여 vortexing 후 정용한 것을 stock solution으로 함

② Stock solution을 Dimethyl sulfoxide로 각각 적절히 희석하여 표준용액으로 사용함

4) 시험용액의 조제

① 시료를 전처리한 후 0.45  $\mu$ m filter로 필터한 후 분석용액으로 사용함

5) 분석조건

<b>Instrument</b>	HPLC														
<b>Detector</b>	UV detector(DAD)														
<b>Wavelength</b>	254 nm														
<b>Column</b>	XBridge C18 Column (250 mm $\times$ 4.6 mm, 3 $\mu$ m)														
<b>Mobile Phase</b>	Solution(A) : 0.05% Trifluoroacetic acid in D.W														
	Solution(B) : 0.05% Trifluoroacetic acid in Acetonitrile														
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>B Conc. (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.1</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>11</td> <td>47</td> </tr> <tr> <td>22</td> <td>47</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>STOP</td> </tr> </tbody> </table>	Time (min)	B Conc. (%)	0.1	30	6	30	11	47	22	47	25	30	30	STOP
	Time (min)	B Conc. (%)													
	0.1	30													
	6	30													
	11	47													
22	47														
25	30														
30	STOP														
<b>Flow rate</b>	1.0 ml/min														
<b>Injection volume</b>	10 $\mu$ l														
<b>Oven temperature</b>	40 $^{\circ}$ C														

※ 곤드레 발효산물의 Pectolinarin 및 Pectolinarigenin 시험법 검증(Method Validation) 요약

항목	평가방법	설정값
특이성 (Specificity)	HPLC 분석시 검출시간(Reten time) 검토	◦검출시간 : 1) Pectolinarin : 6 분대 2) Pectolinarigenin : 19 분대에 peak 검출
직선성 (Linearity)	표준물질에 대한 7개 농도로 3반복 직선성 확인	◦Pectolinarin 2.32 ~ 148.50 mg/L, $R^2 = 1$ ◦Pectolinarigenin 0.58 ~ 37.05 mg/L $R^2 = 1$
정확성 (Accuracy)	3개 농도로 표준물질을 첨가하여 회수율 검토	◦Pectolinarin 9.28 ~ 37.13 mg/L 범위에서 회수율 : 100.24 ~ 102.81% %RSD : 0.16 ~ 0.56% ◦Pectolinarigenin 0.58 ~ 2.32 mg/L 회수율 : 104.14 ~ 105.78% RSD(%) : 0.17 ~ 0.58%
정밀성 (Precision)	반복재현성, 일간 정밀성 평가	◦Pectolinarin 함량 평균 24.021 mg/g, SD : 0.07, %RSD : 0.31 ◦Pectolinarigenin 함량 평균 1.071 mg/g, SD : 0.03, %RSD : 3.16
	시료량을 달리하여 정밀성 평가	◦Pectolinarin 함량 평균 24.556 mg/g, SD : 0.24, %RSD : 0.97 ◦Pectolinarigenin 함량 평균 1.092 mg/g, SD : 0.02, %RSD : 2.06

라. 최종 설정된 시험법 검증(Method Validation) 결과

- 특이성 (Specificity)
  - 곤드레 발효산물 중 Pectolinarin 및 Pectolinarigenin의 retention time과 표준물질을 동일한 분석법으로 분석하여 검출된 peak를 확인하였음. 표준물질의 경우 Pectolinarin



약 6분대, Pectolinarigenin 약 19분대에 각각의 peak가 나타났고, 시험용액 또한 동일한 시간대에 peak가 검출되어 동일한 물질임을 확인하였음. 주어진 조건으로 분석할 경우 표준품과 시료 중 Pectolinarin과 Pectolinarigenin의 Peak가 완벽하게 분리가 이루어짐을 확인할 수 있었음. 표준용액과 시험용액의 크로마토그램과 스펙트럼은 아래와 같음

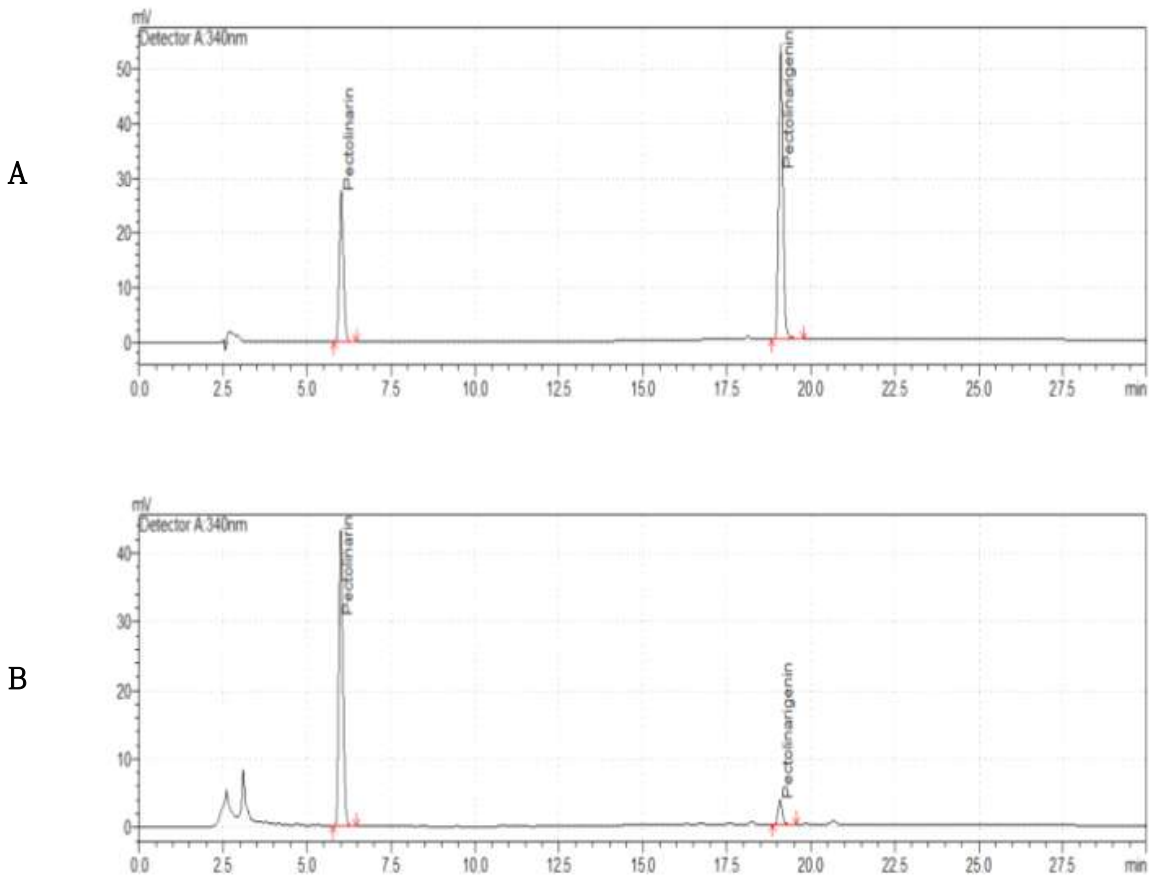


그림66. 표준용액과 시험용액 중 Pectolinarin과 Pectolinarigenin의 크로마토그램  
(A: 표준용액, B: 시험용액)]

○ 직선성 (Linearity)

- 표준물질 Pectolinarin, Pectolinarigenin를 Dimethyl sulfoxide에 녹여 농도별로 희석하여 분석한 결과로 직선성을 평가하였음. 제조된 표준용액을 적절한 농도로 희석하여 분석한 결과, Pectolinarin 2.32 ~ 148.50 mg/L, Pectolinarigenin 0.58 ~ 37.05 mg/L의 범위에서 직선성이 나타남을 확인하였음. 이때 직선의 상관계수는 해당농도범위에서 Pectolinarin  $R^2=1$ , Pectolinarigenin  $R^2=1$ 로 나타났음

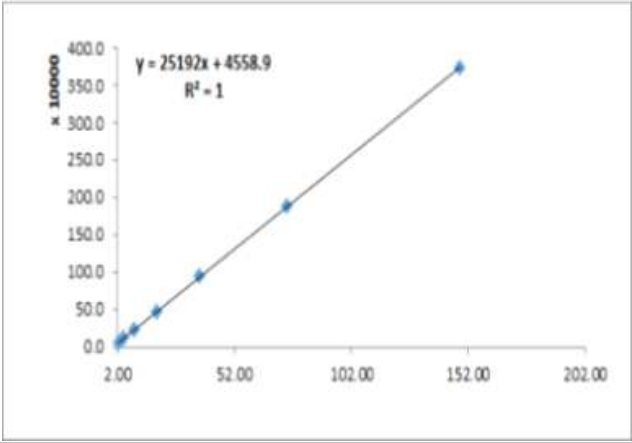
[Pectolinarin과 Pectolinarigenin 표준용액을 이용한 검량선 작성 (1회실험)]

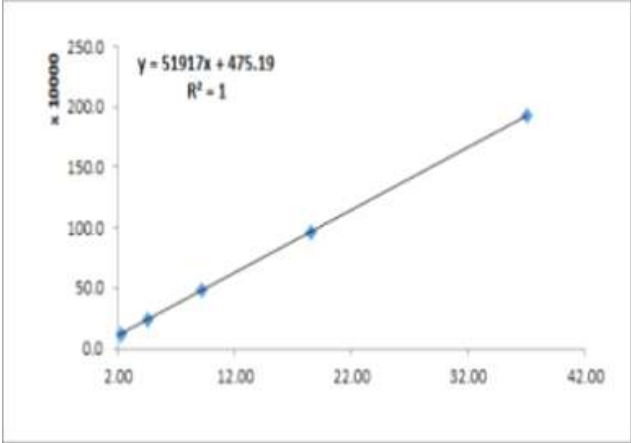


STD level	Pectolarin 농도(mg/L)	Area	검량선 결과
1	2.32	60633	
2	4.64	120246	
3	9.28	239210	
4	18.56	476798	
5	37.13	947049	
6	74.25	1882031	
7	148.50	3740695	
기울기	25173		
y절편	6964.7		
R <sup>2</sup>	1		

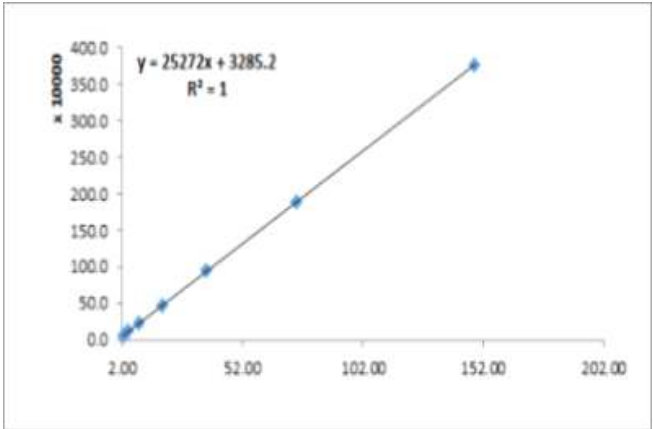
STD level	Pectolarigenin 농도(mg/L)	Area	검량선 결과
1	0.58	30306	
2	1.16	60776	
3	2.32	122279	
4	4.63	242832	
5	9.26	485089	
6	18.52	968772	
7	37.05	1928176	
기울기	52050		
y절편	1694.6		
R <sup>2</sup>	1		

[Pectolarin와 Pectolarigenin 표준용액을 이용한 검량선 작성 (2회실험)]

STD level	Pectolarinarin 농도(mg/L)	Area	검량선 결과
1	2.32	59890	
2	4.64	119305	
3	9.28	237297	
4	18.56	473483	
5	37.13	944251	
6	74.25	1878489	
7	148.50	3742775	
기울기	25192		
y절편	4558.9		
R2	1		

STD level	Pectolarinigenin 농도(mg/L)	Area	검량선 결과
1	0.58	30780	
2	1.16	60134	
3	2.32	121085	
4	4.63	240845	
5	9.26	481150	
6	18.52	962090	
7	37.05	1923881	
기울기	51917		
y절편	475.19		
R2	1		

[Pectolarinarin와 Pectolarinigenin 표준용액을 이용한 검량선 작성 (3회실험)]

STD level	Pectolarinarin 농도(mg/L)	Area	검량선 결과
1	2.32	59628	
2	4.64	119055	
3	9.28	237297	
4	18.56	473823	
5	37.13	944210	
6	74.25	1881702	
7	148.50	3754514	
기울기	25272		
y절편	3285.2		
R2	1		

STD level	Pectolinarigenin 농도(mg/L)	Area	검량선 결과
1	0.58	29600	
2	1.16	59497	
3	2.32	119345	
4	4.63	239396	
5	9.26	477909	
6	18.52	955993	
7	37.05	1911069	
기울기	51592		
y절편	16.718		
R2	1		

○ 정확성(Accuracy), 회수율(Recovery)

- 곤드레 발효산물 중 Pectolinarin과 Pectolinarigenin의 정확성을 측정하기 위해 시료에 Pectolinarin의 경우에는 표준용액을 검출농도로 약 9.28, 18.56, 37.13 mg/L, Pectolinarigenin의 경우에는 약 0.58, 1.16, 2.352 mg/L 넣은 후 동일한 전처리 방법으로 회수율을 측정하였음. 농도별로 3번씩 진행한 결과 Pectolinarin 회수율이 100.24 ~ 102.81 %, 상대표준편차(RSD)는 0.16 ~ 0.56%, Pectolinarigenin 회수율이 104.14 ~ 105.78 %, 상대표준편차(RSD)는 0.17 ~ 0.58 로 나타났음. 전체적으로 100% 이상의 회수율을 보이므로 분석방법에 문제가 없다고 사료됨

[시료 중 Pectolinarin과 Pectolinarigenin의 농도별 정확성, 회수율 확인]

(mg/L)	시료(mg)+ 표준용액 (mg/L)	검출된 Area	시료에 해당되는 Area/(시료량mg)		평균시료 100mg당 시료 Area			
0	-	182104	2494575 (100mg)		2494034			
		183559	2480527 (100mg)					
		183011	2507000 (100mg)					
표준물질 (mg/L)	시료(mg)+ Pectolinarin 표준용액 (mg/L)	검출된 Area	시료에 해당되는 Area/(시료량 mg)	검출된 표준물질 Area	회수율( %)	회수율 평균 (%)	SD	%RSD
9.28	+ 9.28	428321	187053	241268	101.24	100.58	0.57	0.56
	시료 + 9.28	428539	189547	238992	100.27			
	시료 + 9.28	428491	189547	238944	100.24			

18.56	+ 18.56	666774	182064	484710	102.68	102.57	0.22	0.21
	시료 + 18.56	667598	184559	483039	102.32			
	시료 + 18.56	666985	182064	484921	102.72			
37.13	시료 + 37.13	1143823	179570	964253	102.61	102.64	0.16	0.16
	시료 + 37.13	1142706	179570	963136	102.49			
	시료 + 37.13	1140714	174582	966132	102.81			

(mg/L)	시료(mg)+ 표준용액 (mg/L)	검출된 Area	시료에 해당되는 Area/(시료량mg)		평균시료 100mg당 시료 Area			
0	-	17009	233000 (100mg)		234527			
		17293	233689 (100mg)					
		17293	236890(100mg)					
표준물질 (mg/L)	시료(mg)+ Pectolina rigenin 표준용액 (mg/L)	검출된 Area	시료에 해당되는 Area/(시료량 mg)	검출된 표준물질 Area	회수율( %)	회수율 평균 (%)	SD	%RSD
0.58	시료 + 0.58	49820	18528	31292	104.73	104.55	0.17	0.16
	시료 + 0.58	49483	18293	31190	104.38			
	시료 + 0.58	49526	18293	31233	104.53			
1.16	시료 + 1.16	82129	19935	62194	104.10	104.50	0.36	0.35
	시료 + 1.16	82316	19700	62616	104.81			
	시료 + 1.16	81481	18997	62484	104.59			
2.32	시료 + 2.32	147698	21342	126356	105.76	105.16	0.62	0.58
	시료 + 2.32	147946	22280	125666	105.18			
	시료 + 2.32	147871	22984	124887	104.53			

○ 정밀성 (Precision)

1) 재현성

곤드레 발효산물 중 Pectolinarin와 Pectolinarigenin 함량의 분석 재현성 및 반복 정밀성을 확인하기 위해 분석일자를 달리하여 분석을 진행하였음. 결과는 한 번 진행시 시료를 6번 반복 전처리를 진행하여 3일간 분석하여 측정치를 비교하였음. 실험 간의 분석 결과, Pectolinarin의 함량은 평균 24.021 mg/g, 표준편차(SD) 0.07, 상대표준편차(%RSD) 0.31로 분석되었고, Pectolinarigenin의 함량은 평균 1.071 mg/g, 표준편차(SD) 0.03, 상대표준 편차(%RSD) 3.16 이었음

[Pectolinarin 와 Pectolinarigenin 분석재현성]

Pectolinarin	함량 (mg/g)	평균함량 (mg/g)	SD	%RSD
1차 (2019-09-30)	23.968	24.021	0.07	0.31
2차 (2019-10-01)	23.990			
3차 (2019-10-03)	24.105			

Pectolinarigenin	함량 (mg/g)	평균함량 (mg/g)	SD	%RSD
1차 (2019-09-30)	1.034	1.071	0.03	3.16
2차 (2019-10-01)	1.100			
3차 (2019-10-03)	1.080			

[분석일 09월 30일 분석결과]

Pectolinari n	Area	시험용액의 농도 (mg/L)	최종 부피 (mL)	시료 채취량 (mg)	결과값 (mg/g)	Average (mg/g)	SD	%RSD
1	362901	14.1396	25	15.2	23.256	23.968	0.73	3.06
2	362536	14.1251	25	15.1	23.386			
3	362878	14.1387	25	14.9	23.723			
4	362422	14.1206	25	14.8	23.852			
5	362426	14.1207	25	14.5	24.346			
6	362810	14.1360	25	14.0	25.243			

Pectolinarigenin	Area	시험용액의 농도 (mg/L)	최종 부피 (mL)	시료 채취량 (mg)	결과값 (mg/g)	Average (mg/g)	SD	%RSD
1	33634	0.6136	25	15.2	1.009	1.034	0.03	2.77
2	33456	0.6102	25	15.1	1.010			
3	33471	0.6105	25	14.9	1.024			
4	33295	0.6071	25	14.8	1.026			
5	33373	0.6086	25	14.5	1.049			
6	33296	0.6071	25	14.0	1.084			

[분석일 10월 01일 분석결과]

Pectolinari n	Area	시험용액의 농도 (mg/L)	최종 부피 (mL)	시료 채취량 (mg)	결과값 (mg/g)	Average (mg/g)	SD	%RSD
1	364496	14.2878	25	15.1	23.655	23.990	0.50	2.07
2	365277	14.3188	25	15.2	23.551			
3	362372	14.2034	25	15.0	23.672			
4	359824	14.1023	25	14.8	23.821			
5	366934	14.3845	25	14.6	24.631			
6	364129	14.2732	25	14.5	24.609			

Pectolinarigenin	Area	시험용액의 농도 (mg/L)	최종 부피 (mL)	시료 채취량 (mg)	결과값 (mg/g)	Average (mg/g)	SD	%RSD
1	34551	0.6564	25	15.1	1.087	1.100	0.03	2.45
2	34769	0.6606	25	15.2	1.086			
3	33858	0.6430	25	15.0	1.072			
4	33866	0.6432	25	14.8	1.086			
5	34927	0.6636	25	14.6	1.136			
6	34533	0.6560	25	14.5	1.131			

[분석일 10월 03일 분석결과]

Pectolinarin	Area	시험용액의 농도 (mg/L)	최종 부피 (mL)	시료 채취량 (mg)	결과값 (mg/g)	Average (mg/g)	SD	%RSD
1	361213	14.1630	25	14.7	24.087	24.105	0.10	0.41
2	361056	14.1568	25	14.6	24.241			
3	361016	14.1568	25	14.7	24.074			
4	358286	14.1552	25	14.6	24.053			
5	359521	14.0472	25	14.7	23.973			
6	358078	14.0961	25	14.5	24.205			

Pectolinarigenin	Area	시험용액의 농도 (mg/L)	최종 부피 (mL)	시료 채취량 (mg)	결과값 (mg/g)	Average (mg/g)	SD	%RSD
1	32828	0.6360	25	14.7	1.082	1.080	0.01	0.49
2	32751	0.6345	25	14.6	1.086			
3	32505	0.6297	25	14.7	1.071			
4	32489	0.6294	25	14.6	1.078			
5	32738	0.6342	25	14.7	1.079			
6	32418	0.6280	25	14.5	1.083			

2) 반복성

곤드레 발효산물 중 Pectolinarin와 Pectolinarigenin 함량의 반복성시험을 위해 시료량을 달리하여 분석을 진행하였음. 시료량을 각각 15 mg, 25 mg, 35mg으로 다르게 취



해, 각각 6회 반복 실험을 하여 측정치를 비교하였음. 그 결과, Pectolinarin의 함량은 평균 24.556 mg/g, 표준편차(SD) 0.24, 상대표준편차(%RSD) 0.97로 분석되었고, Pectolinarigenin의 함량은 평균 1.092 mg/g, 표준편차(SD) 0.02, 상대표준편차(%RSD) 2.06 이었음

[Pectolinarin와 Pectolinarigenin 반복성]

Pectolinarin	시료 15 mg	시료 25mg	시료 35 mg
Rep-1	24.3846	24.2486	24.5514
Rep-2	24.4103	24.2171	24.9913
Rep-3	24.7229	24.2741	24.9512
Rep-4	24.6897	24.4575	24.7057
Rep-5	24.6075	24.2660	24.8423
Rep-6	24.4405	24.4788	24.7696
Average (mg/g)	24.5426	24.3237	24.8019
SD	0.15	0.11	0.16
%RSD	0.61	0.47	0.66
Average (mg/g)	24.556		
SD	0.24		
Total %RSD	0.97		

Pectolinarigenin	시료 15 mg	시료 25mg	시료 35 mg
Rep-1	1.0563	1.0997	1.0953
Rep-2	1.0593	1.0936	1.1111
Rep-3	1.0664	1.1046	1.1080
Rep-4	1.0700	1.1145	1.0994
Rep-5	1.0666	1.0993	1.1060
Rep-6	1.0746	1.1192	1.1032
Average (mg/g)	1.0655	1.1052	1.1038
SD	0.01	0.01	0.01
%RSD	0.63	0.89	0.52
Average (mg/g)	1.092		
SD	0.02		
Total %RSD	2.06		

[시료 15mg 분석결과]

Pectolinari n	Area	시험용액의 농도 (mg/L)	최종 부피 (mL)	시료 채취량 (mg)	결과값 (mg/g)	Average (mg/g)	SD	%RSD
1	365766	14.338	25	14.7	24.385	24.543	0.15	0.61
2	366146	14.353	25		24.410			
3	370777	14.537	25		24.723			
4	370285	14.518	25		24.690			
5	369067	14.469	25		24.607			
6	366594	14.371	25		24.441			

Pectolina rigenin	Area	시험용액의 농도 (mg/L)	최종 부피 (mL)	시료 채취량 (mg)	결과값 (mg/g)	Average (mg/g)	SD	%RSD
1	32722	0.621	25	14.7	1.056	1.066	0.01	0.63
2	32812	0.623	25		1.059			
3	33028	0.627	25		1.066			
4	33140	0.629	25		1.070			
5	33036	0.627	25		1.067			
6	33281	0.632	25		1.075			

[시료 25mg 분석결과]

Pectolinari n	Area	시험용액의 농도 (mg/L)	최종 부피 (mL)	시료 채취량 (mg)	결과값 (mg/g)	Average (mg/g)	SD	%RSD
1	632533	24.928	25	25.7	24.249	24.324	0.11	0.47
2	631718	24.895	25		24.217			
3	633195	24.954	25		24.274			
4	637945	25.142	25		24.458			
5	632985	24.945	25		24.266			
6	638496	25.164	25		24.479			

Pectolina rigenin	Area	시험용액의 농도 (mg/L)	최종 부피 (mL)	시료 채취량 (mg)	결과값 (mg/g)	Average (mg/g)	SD	%RSD
1	59165	1.130	25	25.7	1.100	1.105	0.01	0.89
2	58841	1.124	25		1.094			
3	59431	1.136	25		1.105			
4	59957	1.146	25		1.115			
5	59148	1.130	25		1.099			
6	60207	1.151	25		1.119			

[시료 35mg 분석결과]

Pectolinarin	Area	시험용액의 농도 (mg/L)	최종 부피 (mL)	시료 채취량 (mg)	결과값 (mg/g)	Average (mg/g)	SD	%RSD
1	882826	34.863	25	35.5	24.551	24.802	0.16	0.66
2	898565	35.488	25		24.991			
3	897128	35.431	25		24.951			
4	888346	35.082	25		24.706			
5	893235	35.276	25		24.842			
6	890634	35.173	25		24.770			

Pectolinarigenin	Area	시험용액의 농도 (mg/L)	최종 부피 (mL)	시료 채취량 (mg)	결과값 (mg/g)	Average (mg/g)	SD	%RSD
1	81222	1.555	25	35.5	1.095	1.104	0.01	0.52
2	82388	1.578	25		1.111			
3	82157	1.573	25		1.108			
4	81524	1.561	25		1.099			
5	82011	1.571	25		1.106			
6	81802	1.566	25		1.103			

마. 벨리데이션 시험 결론

- 곤드레 발효산물 중 Pectolinarin와 Pectolinarigenin 함량을 확인하기 위해 설정한 시험법 validation을 진행한 결과는 아래와 같음.
- 표준물질과 시험용액을 같은 분석법으로 분석한 결과, 표준물질의 경우 Pectolinarin 약 6분대, Pectolinarigenin 약 19분대에 각각의 peak가 나타났고, 시험용액 또한 동일한 시간대에 peak가 검출되었음.
- 표준물질 Pectolinarin, Pectolinarigenin을 Dimethyl sulfoxide에 녹여 표준용액을 제조하였다. 제조된 표준 용액을 적절한 농도로 희석하여 유도체화한 후 분석한 결과, Pectolinarin 2.32 ~ 148.50 mg/L, Pectolinarigenin 0.58 ~ 37.05 mg/L의 범위에서 직선성이 나타남을 확인하였음. 이때 직선의 상관계수는 해당 농도범위에서 Pectolinarin  $R^2=1$ , Pectolinarigenin  $R^2=1$  로 나타났음.
- 실험의 정확성을 측정하기 위하여 시료에 Pectolinarin의 경우에는 표준용액을 검출농도로 약 9.28, 18.56, 37.13 mg/L, Pectolinarigenin의 경우에는 약 0.58, 1.16, 2.32 mg/L 넣은 후 동일한 전처리 방법으로 회수율을 측정하였음. 측정결과 Pectolinarin 회수율이 100.24 ~ 102.81 %, 상대표준편차(RSD) 는 0.16 ~ 0.56%, Pectolinarigenin 회수율이 104.14 ~ 105.78 %, 상대표준편차(RSD) 는 0.17 ~ 0.58 로 나타났음.
- 곤드레 발효산물 중 Pectolinarin와 Pectolinarigenin 함량의 분석 재현성 및 반복 정밀성을 확인하기 위해 분석일자를 달리하여 분석을 진행하였음. 결과는 시료를 6번 반복 전처리하여 3일간 분석하여 확인하였음. 실험 간의 분석 결과, Pectolinarin의 함량은 평균 24.021 mg/g, 표준편차(SD) 0.07, 상대표준편차(%RSD) 0.31로 분석되었고, Pectolinarigenin의 함량은 평균 1.071 mg/g, 표준편차(SD) 0.03, 상대표준 편차(%RSD)

3.16 이었음.

- 곤드레 발효산물 중 Pectolarin와 Pectolarigenin 함량의 반복성 시험을 위해 시료량을 달리하여 분석을 진행하였음. 시료량을 각각 15 mg, 25 mg, 35 mg 으로 다르게 취해, 각각 6회 반복 실험을 하여 측정치를 비교하였음. 그 결과, Pectolarin의 함량은 평균 24.556 mg/g, 표준편차(SD) 0.24, 상대표준편차(%RSD) 0.97로 분석되었고, Pectolarigenin의 함량은 평균 1.092 mg/g, 표준편차(SD) 0.02, 상대표준편차(%RSD) 2.06 이었음.
- 본 연구 결과 곤드레의 지표성분인 Pectolarin와 Pectolarigenin의 HPLC를 이용한 동시분석방법이 적합한 분석방법임이 검증되었음.

### (3) 발효산물 2종(곤드레, 미강) 및 제품의 안정성 연구

- 발효산물 2종(곤드레, 미강) 및 제품을 활용하기 위하여 저장기간에 따른 안정성을 검토하고자 하였음.
- 안정성 시험은 발효산물 2종 및 제품이 저장 조건하에서 장기간에 걸쳐 지표물질의 물리화학적 안정성을 확인하는 시험임.
- 저장 조건하에 보관한 발효산물 2종(곤드레, 미강) 및 제품의 지표성분의 함량변화를 관찰하기위해 설정된 분석조건에 따라 HPLC를 이용하여 자체적으로 함량분석을 3회 실시하여 저장 안정성을 평가하였음.

#### 가. 시료 확보 및 추출물 제조

- 발효산물 2종 및 제품 확보
  - 발효산물 추출물 제조를 위하여 선정된 2종의 발효산물(곤드레, 미강)은 웰빙엘에스, 제품은 세준에프앤비로부터 받아 사용하였음.



A: 곤드레



B: 미강



C: 제품

그림67. 발효산물 소재 2종 및 제품

- 발효산물 2종(곤드레, 미강) 및 제품을 저장기간 · 조건별로 각 5 g씩 나누어 소분하였음(n=3).
- 가속시험 조건
  - 시험기간 : 제조 후 ~ 3개월 실시(초기, 2개월, 3개월)
  - 보관조건 :

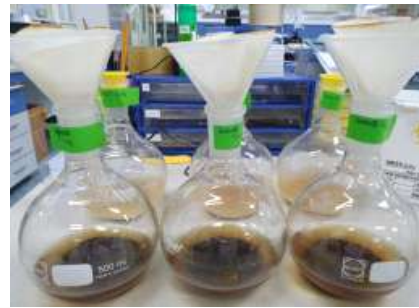
- 1) 냉장( $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ )
  - 2) 실온( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ )
  - 3) 고온( $50\pm 2^{\circ}\text{C}$ )
- 발효산물 2종(곤드레, 미강) 및 제품의 추출물 제조
- 추출물 제조는 아래와 같이 칭량, 추출, 여과, 농축 과정으로 진행하였으며, 추출액을 대량동결건조 system을 이용하여 최종 농축하였다.



발효산물 2종(곤드레, 미강) 무게 측정



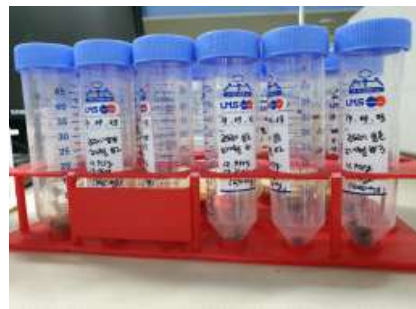
발효산물 2종(곤드레, 미강) 및 제품 소분



추출 및 여과



농축



발효산물 2종 및 제품 추출물 제조 완료

그림68. 발효산물 2종 및 제품 추출물 제조 공정도

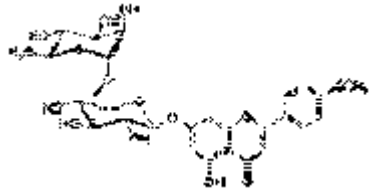
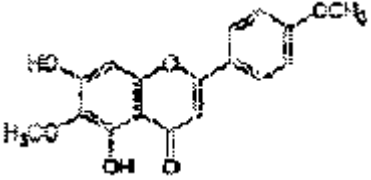
- 발효산물 2종 및 제품의 각 시료를 약 5 g을 칭량하여 추출원료로 사용하였다.
- 환류추출기(DH.WEB01008(WiseBath))를 이용하여 70℃ 2시간으로 추출을 진행하였다.
- 추출액을 filter paper(No.1 Whatman international, UK)로 여과하고 최종추출액을 대량 동결건조기(LP-50)를 이용하여 최종 농축 후 추출물을 얻었다.



나. 발효산물 1종(곤드레) 및 제품 지표성분 함량분석

○ 분석물질

표41. 발효산물 1종(곤드레) 지표물질

항 목	Pectolarin	Pectolarigenin
Chemical structure		
Chemical formula	C <sub>29</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
Molecular Weight	622.57	314.29
CAS number	28978-02-1	520-12-7

○ 분석시료

- (1) 발효산물 곤드레(Lot 1~3, 0~3개월)
- (2) 제품(Lot 1~3, 0~3개월)

○ 분석방법

(1) 시약 및 시액

- 표준물질 : 표준물질은 Sigma-Aldrich와 Biopurify에서 구입하여 사용하였다.
  - Pectolarin (Sigma-Aldrich, 98.0%)
  - Pectolarigenin (Biopurify, 98.0%)
- 일반시약
  - Dimethylsulfoxide(Daejung, Guaranteed)
  - Acetonitrile (Burdick&Jackson, HPLC grade)
  - Trifluoroacetic acid (Sigma-Aldrich, ACS reagent)

(2) 표준용액의 제조

- Pectolarin, Pectolarigenin 각각의 표준품 약 10 mg을 정밀하게 달아 10 mL 용량 플라스크에 넣고 DMSO를 넣어 vortexing하고 초음파로 진탕하여 녹인 후 정용(Stock solution)함.
- Stock Solution을 DMSO로 농도별 적절히 희석하여 표준용액으로 사용함.

(3) 시험용액의 제조

- 시료 약 10 mg을 정밀하게 달아 10 mL 용량플라스크에 넣고 DMSO를 넣어 vortexing하고 초음파로 진탕하여 용해함.
- 이 액 1 mL를 취하여 5 mL 용량플라스크에 넣고 DMSO를 넣어 용해하여 여과한 액을 시험용액으로 사용함.

(4) HPLC 분석

<b>Instruments</b>	Shimadzu HPLC system (HPLC-UV)	
<b>Column</b>	XBridge C18 (4.6 x 250 mm, 5 um)	
<b>Mobile phase</b>	Solution(A) : 0.05% TFA in D.W	
	Solution(B) : 0.05% TFA in ACN	
	Time (min)	B Conc. (%)
	0.1	30
	6	30
	11	47
	22	47
25	30	
30	-	
<b>Oven temp.</b>	40°C	
<b>Wavelength</b>	340 nm	
<b>Injection volume</b>	10 uL	
<b>Flow rate</b>	1 mL/min	
<b>Run time</b>	30 min	

○ 분석결과

(1) Linearity

- 지표물질(곤드레)의 표준용액을 pectolarin 0.5 ~ 101.9 ppm, pectolarigenin 0.3 ~ 24.5 ppm 범위에서 6 농도에서 실험을 실시하였으며, 지표물질(제품)의 표준용액을 Pectolarin 0.3 ~ 25.5 ppm, pectolarigenin 0.1 ~ 12.3 ppm 범위에서 6 농도에서 실험을 실시하였다. 면적대 농도비의 관계로 검량선을 확인하였다. 모든 검량선은 실험범위 내에서 높은 상관계수를 나타내었다( $R^2 \geq 0.99$ ).

㉞ (곤드레) 지표물질 Linearity

표준물질명	개월	Concentration	Regression equation	R2
Pectolarin	0	2.6 ~ 101.9	$y = 22346x - 2805.9$	1.0000
	2	0.5 ~ 51.0	$y = 22908x + 681.22$	1.0000
	3	0.5 ~ 51.0	$y = 23411x - 5031.1$	0.9999
Pectolarigenin	0	0.3 ~ 24.0	$y = 15509x + 1916.8$	0.9999
	2	0.3 ~ 24.5	$y = 40784x - 2519.9$	0.9999
	3	0.3 ~ 24.5	$y = 40941x - 5991.1$	0.9998

기간	STD level	Pectolarin (μg/mL)	Area	Pectolarigenin (μg/mL)	Area	Calibration Curve
초기 (0개월)	1	2.6	56694	0.3	6638	
	2	5.1	112632	0.5	9979	
	3	12.8	284541	2.4	39166	
	4	25.5	564669	4.8	75943	
	5	51.0	1126466	12.0	185759	
	6	101.9	2279361	24.0	375476	
2개월	1	0.5	11978	0.3	10060	
	2	2.6	58965	0.5	19803	
	3	5.1	117303	2.5	97436	
	4	12.8	291087	4.9	193738	
	5	25.5	588144	12.3	493464	
	6	51.0	1166565	24.5	999155	
3개월	1	0.5	10516	0.3	8604	
	2	2.6	59754	0.5	19142	
	3	5.1	112587	2.5	92502	
	4	12.8	284567	4.9	186980	
	5	25.5	591072	12.3	492445	
	6	51.0	1190230	24.5	1000166	

㉞ (제품) 지표물질 Linearity

표42. Pectolarin, Pectolarigenin standard calibration curve(0-3months)

표준물질명	개월	Concentration	Regression equation	R2
Pectolarin	0	0.3 ~ 25.5	$y = 23408x - 43.969$	1.0000
	2	0.3 ~ 25.5	$y = 22949x + 300.4$	1.0000
	3	0.3 ~ 25.5	$y = 21979x - 467.09$	0.9993
Pectolarigenin	0	0.1 ~ 12.0	$y = 40811x - 251.92$	1.0000
	2	0.1 ~ 12.3	$y = 40034x - 500.86$	1.0000
	3	0.1 ~ 12.3	$y = 38149x - 894.72$	0.9995

기간	STD level	Pectolinarin ( $\mu\text{g/mL}$ )	Area	Pectolinarigenin ( $\mu\text{g/mL}$ )	Area	Calibration Curve
초기 (0개월)	1	0.3	6183	0.1	2104	
	2	0.5	12127	0.3	10039	
	3	2.6	59354	0.5	19510	
	4	5.1	118745	2.4	97518	
	5	12.8	298674	4.8	194929	
	6	25.5	596388	12.0	489988	
2개월	1	0.3	6122	0.1	2271	
	2	0.5	12391	0.3	9628	
	3	2.6	58622	0.5	19410	
	4	5.1	117330	2.5	97090	
	5	12.8	292341	4.9	194379	
	6	25.5	585325	12.3	490515	
3개월	1	0.3	5950	0.1	1846	
	2	0.5	11015	0.3	9016	
	3	2.6	54212	0.5	17459	
	4	5.1	105096	2.5	86686	
	5	12.8	290331	4.9	192428	
	6	25.5	555715	12.3	465048	

(2) 발효산물 1종(곤드레) 및 제품 유효(지표)성분 안정성평가

㉔ 발효산물 곤드레

① 초기 안정성시험

- 제조 년 · 월 · 일 :
- 수령 년 · 월 · 일 : 2019. 06. 26.
- 보존조건 : Room Temperature( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ )
- 초기 안정성 시험일 : 2019. 07. 22.

1) Pectolinarin

Pectolinarin		Area	농도 ( $\mu\text{g/mL}$ )	시료 채취량 (mg)	최종 부피 (mL)	함량 (mg/g)	Average (mg/g)	SD	%RSD
콘드레 (0개월)	sample 1-1	272131	12.30	10.3	25	29.86	29.64	0.19	0.66
	sample 1-2	268740	12.15	10.3	25	29.49			
	sample 1-3	269425	12.18	10.3	25	29.57			
	sample 2-1	264200	11.95	10.5	25	28.45	28.12	0.41	1.46
	sample 2-2	256782	11.62	10.5	25	27.66			
	sample 2-3	262262	11.86	10.5	25	28.24			
	sample 3-1	268267	12.13	10.4	25	29.16	29.11	0.05	0.18
	sample 3-2	267700	12.11	10.4	25	29.10			
	sample 3-3	267309	12.09	10.4	25	29.06			

2) Pectolinarigenin

Pectolinarigenin		Area	시험용액 농도 ( $\mu\text{g/mL}$ )	시료 채취량 (mg)	최종 부피 (mL)	함량 (mg/g)	Average (mg/g)	SD	%RSD
콘드레 (0개월)	sample 1-1	26371	1.58	10.3	25	3.83	3.75	0.07	1.90
	sample 1-2	25693	1.53	10.3	25	3.72			
	sample 1-3	25509	1.52	10.3	25	3.69			
	sample 2-1	27380	1.64	10.5	25	3.91	3.89	0.08	2.17
	sample 2-2	26613	1.59	10.5	25	3.79			
	sample 2-3	27677	1.66	10.5	25	3.95			
	sample 3-1	26635	1.59	10.4	25	3.83	3.80	0.03	0.77
	sample 3-2	26256	1.57	10.4	25	3.77			
	sample 3-3	26456	1.58	10.4	25	3.80			

② 2개월 안정성시험

- 제조 년 · 월 · 일 :
- 수령 년 · 월 · 일 : 2019. 06. 26.
- 보존조건
  - 1) 냉장( $4 \pm 2^\circ\text{C}$ )
  - 2) 실온( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ )
  - 3) 고온( $50 \pm 2^\circ\text{C}$ )
- 2개월 안정성 시험일 : 2019. 09. 09.

1) Pectolinarin

Pectolinarin		Area	농도 ( $\mu\text{g/mL}$ )	시료 채취량 (mg)	최종 부피 (mL)	함량 (mg/g)	Average (mg/g)	SD	%RSD
냉장( $4\pm 2^\circ\text{C}$ ) (2개월)	sample 1-1	214750	9.34	10.4	25	22.46	22.42	0.12	0.55
	sample 1-2	212961	9.27	10.4	25	22.28			
	sample 1-3	215188	9.36	10.4	25	22.51			
	sample 2-1	230897	10.05	10.7	25	23.48	23.46	0.04	0.17
	sample 2-2	230921	10.05	10.7	25	23.48			
	sample 2-3	230222	10.02	10.7	25	23.41			
	sample 3-1	271147	11.81	10.8	25	27.33	27.36	0.03	0.11
	sample 3-2	271505	11.82	10.8	25	27.37			
	sample 3-3	271731	11.83	10.8	25	27.39			
실온 ( $25\pm 2^\circ\text{C}$ ) (2개월)	sample 1-1	246334	10.72	10.9	25	24.60	24.72	0.17	0.69
	sample 1-2	246846	10.75	10.9	25	24.65			
	sample 1-3	249504	10.86	10.9	25	24.91			
	sample 2-1	277463	12.08	10.8	25	27.97	28.16	0.16	0.58
	sample 2-2	280443	12.21	10.8	25	28.27			
	sample 2-3	280095	12.20	10.8	25	28.23			
	sample 3-1	202316	8.80	10.3	25	21.36	21.35	0.10	0.48
	sample 3-2	203035	8.83	10.3	25	21.44			
	sample 3-3	201126	8.75	10.3	25	21.24			
고온 ( $50\pm 2^\circ\text{C}$ ) (2개월)	sample 1-1	247166	10.76	10.1	25	26.63	26.65	0.13	0.49
	sample 1-2	248565	10.82	10.1	25	26.78			
	sample 1-3	246173	10.72	10.1	25	26.53			
	sample 2-1	240099	10.45	10.6	25	24.65	24.69	0.04	0.18
	sample 2-2	240325	10.46	10.6	25	24.67			
	sample 2-3	240934	10.49	10.6	25	24.74			
	sample 3-1	206057	8.97	10.6	25	21.14	21.12	0.04	0.19
	sample 3-2	205999	8.96	10.6	25	21.14			
	sample 3-3	205344	8.93	10.6	25	21.07			



2) Pectolinarigenin

Pectolinarigenin		Area	농도 ( $\mu\text{g/mL}$ )	시료 채취량 (mg)	최종 부피 (mL)	함량 (mg/g)	Average (mg/g)	SD	%RSD
냉장 ( $4\pm 2^\circ\text{C}$ ) (2개월)	sample 1-1	21752	0.60	10.4	25	1.43	1.42	0.02	1.13
	sample 1-2	21257	0.58	10.4	25	1.40			
	sample 1-3	21700	0.59	10.4	25	1.43			
	sample 2-1	23274	0.63	10.7	25	1.48	1.47	0.01	0.71
	sample 2-2	22911	0.62	10.7	25	1.46			
	sample 2-3	23077	0.63	10.7	25	1.47			
	sample 3-1	28041	0.75	10.8	25	1.73	1.74	0.01	0.75
	sample 3-2	28335	0.76	10.8	25	1.75			
	sample 3-3	27886	0.75	10.8	25	1.73			
실온 ( $25\pm 2^\circ\text{C}$ ) (2개월)	sample 1-1	23075	0.63	10.9	25	1.44	1.45	0.01	0.60
	sample 1-2	23238	0.63	10.9	25	1.45			
	sample 1-3	23383	0.64	10.9	25	1.46			
	sample 2-1	32369	0.86	10.8	25	1.98	1.99	0.01	0.34
	sample 2-2	32522	0.86	10.8	25	1.99			
	sample 2-3	32601	0.86	10.8	25	1.99			
	sample 3-1	21759	0.60	10.3	25	1.44	1.46	0.03	2.07
	sample 3-2	21768	0.60	10.3	25	1.45			
	sample 3-3	22646	0.62	10.3	25	1.50			
고온 ( $50\pm 2^\circ\text{C}$ ) (2개월)	sample 1-1	21732	0.59	10.1	25	1.47	1.45	0.02	1.37
	sample 1-2	21101	0.58	10.1	25	1.43			
	sample 1-3	21270	0.58	10.1	25	1.44			
	sample 2-1	20786	0.57	10.6	25	1.35	1.34	0.01	0.87
	sample 2-2	20398	0.56	10.6	25	1.33			
	sample 2-3	20679	0.57	10.6	25	1.34			
	sample 3-1	19238	0.53	10.6	25	1.26	1.26	0.00	0.09
	sample 3-2	19241	0.53	10.6	25	1.26			
	sample 3-3	19273	0.53	10.6	25	1.26			

③ 3개월 안정성시험

- 제조 년 · 월 · 일 :
- 수령 년 · 월 · 일 : 2019. 06. 26.
- 보존조건
  - 1) 냉장( $4\pm 2^\circ\text{C}$ )
  - 2) 실온( $25\pm 2^\circ\text{C}$ )
  - 3) 고온( $50\pm 2^\circ\text{C}$ )
- 3개월 안정성 시험일 : 2019. 10. 15.

1) Pectolinarin

Pectolinarin		Area	농도 ( $\mu\text{g/mL}$ )	시료 채취량 (mg)	최종 부피 (mL)	함량 (mg/g)	Average (mg/g)	SD	%RSD
냉장( $4\pm 2$ °C) (3개월)	sample 1-1	247358	10.78	10.2	25.0	26.42	26.51	0.61	2.28
	sample 1-2	242865	10.59	10.2	25.0	25.95			
	sample 1-3	254339	11.08	10.2	25.0	27.15			
	sample 2-1	239233	10.43	10.7	25.0	24.38	24.90	0.47	1.88
	sample 2-2	245662	10.71	10.7	25.0	25.02			
	sample 2-3	248385	10.82	10.7	25.0	25.29			
	sample 3-1	232731	10.16	10.9	25.0	23.29	23.91	0.79	3.30
	sample 3-2	236246	10.31	10.9	25.0	23.64			
	sample 3-3	248123	10.81	10.9	25.0	24.80			
실온 ( $25\pm 2$ °C) (3개월)	sample 1-1	207029	9.06	10.3	25.0	21.99	22.68	0.64	2.81
	sample 1-2	219090	9.57	10.3	25.0	23.24			
	sample 1-3	215176	9.41	10.3	25.0	22.83			
	sample 2-1	229002	10.00	10.1	25.0	24.74	24.82	0.12	0.50
	sample 2-2	229066	10.00	10.1	25.0	24.75			
	sample 2-3	231065	10.08	10.1	25.0	24.96			
	sample 3-1	223451	9.76	10.2	25.0	23.92	23.03	0.80	3.46
	sample 3-2	208787	9.13	10.2	25.0	22.39			
	sample 3-3	212566	9.29	10.2	25.0	22.78			
고온 ( $50\pm 2$ °C) (3개월)	sample 1-1	223010	9.74	10.0	25.0	24.35	24.47	0.47	1.92
	sample 1-2	228922	9.99	10.0	25.0	24.98			
	sample 1-3	220345	9.63	10.0	25.0	24.07			
	sample 2-1	244920	10.68	10.9	25.0	24.49	23.71	0.82	3.46
	sample 2-2	228242	9.96	10.9	25.0	22.85			
	sample 2-3	237783	10.37	10.9	25.0	23.79			
	sample 3-1	246971	10.76	10.9	25.0	24.69	23.85	0.95	3.96
	sample 3-2	240191	10.47	10.9	25.0	24.02			
	sample 3-3	227932	9.95	10.9	25.0	22.82			

2) Pectolinarigenin

Pectolinarigenin		Area	농도 ( $\mu\text{g/mL}$ )	시료 채취량 (mg)	최종 부피 (mL)	함량 (mg/g)	Average (mg/g)	SD	%RSD
냉장 ( $4\pm 2^\circ\text{C}$ ) (3개월)	sample 1-1	24761	0.75	10.2	25.0	1.84	1.85	0.04	2.23
	sample 1-2	24289	0.74	10.2	25.0	1.81			
	sample 1-3	25647	0.77	10.2	25.0	1.89			
	sample 2-1	23795	0.73	10.7	25.0	1.70	1.72	0.02	1.06
	sample 2-2	24308	0.74	10.7	25.0	1.73			
	sample 2-3	24381	0.74	10.7	25.0	1.73			
	sample 3-1	21670	0.68	10.9	25.0	1.55	1.58	0.06	3.65
	sample 3-2	21675	0.68	10.9	25.0	1.55			
	sample 3-3	23461	0.72	10.9	25.0	1.65			
실온 ( $25\pm 2^\circ\text{C}$ ) (3개월)	sample 1-1	17982	0.59	10.3	25.0	1.42	1.46	0.03	2.11
	sample 1-2	18961	0.61	10.3	25.0	1.48			
	sample 1-3	18771	0.60	10.3	25.0	1.47			
	sample 2-1	20817	0.65	10.1	25.0	1.62	1.61	0.01	0.91
	sample 2-2	20798	0.65	10.1	25.0	1.62			
	sample 2-3	20388	0.64	10.1	25.0	1.59			
	sample 3-1	19546	0.62	10.2	25.0	1.53	1.47	0.05	3.69
	sample 3-2	17968	0.59	10.2	25.0	1.43			
	sample 3-3	17992	0.59	10.2	25.0	1.44			
고온 ( $50\pm 2^\circ\text{C}$ ) (3개월)	sample 1-1	17879	0.58	10.0	25.0	1.46	1.46	0.02	1.34
	sample 1-2	18224	0.59	10.0	25.0	1.48			
	sample 1-3	17586	0.58	10.0	25.0	1.44			
	sample 2-1	20550	0.65	10.9	25.0	1.49	1.45	0.03	2.39
	sample 2-2	19310	0.62	10.9	25.0	1.42			
	sample 2-3	19920	0.63	10.9	25.0	1.45			
	sample 3-1	19303	0.62	10.9	25.0	1.42	1.38	0.04	3.19
	sample 3-2	18959	0.61	10.9	25.0	1.40			
	sample 3-3	17801	0.58	10.9	25.0	1.33			

㉔ 제품

① 초기 안정성시험

- 제조 년 · 월 · 일 :
- 수령 년 · 월 · 일 : 2019. 07. 11.
- 보존조건 : Room Temperature( $25\pm 2^\circ\text{C}$ )
- 초기 안정성 시험일 : 2019. 07. 23.

1) Pectolinarin

Pectolinarin		Area	농도 ( $\mu\text{g/mL}$ )	시료 채취량 (mg)	최종 부피 (mL)	함량 (mg/g)	Average (mg/g)	SD	%RSD
제품 (0개월)	sample 1-1	23641	1.01	10.4	25	2.43	2.43	0.01	0.41
	sample 1-2	23646	1.01	10.4	25	2.43			
	sample 1-3	23476	1.00	10.4	25	2.42			
	sample 2-1	21926	0.94	10.8	25	2.17	2.14	0.03	1.27
	sample 2-2	21566	0.92	10.8	25	2.14			
	sample 2-3	21384	0.92	10.8	25	2.12			
	sample 3-1	22964	0.98	10.2	25	2.41	2.36	0.04	1.87
	sample 3-2	22218	0.95	10.2	25	2.33			
	sample 3-3	22251	0.95	10.2	25	2.33			

2) Pectolinarigenin

Pectolinarigenin		Area	시험용액 농도 ( $\mu\text{g/mL}$ )	시료 채취량 (mg)	최종 부피 (mL)	함량 (mg/g)	Average (mg/g)	SD	%RSD
제품 (0개월)	sample 1-1	2310	0.06	10.4	25	0.15	0.15	0.00	2.06
	sample 1-2	2400	0.06	10.4	25	0.16			
	sample 1-3	2407	0.07	10.4	25	0.16			
	sample 2-1	2427	0.07	10.8	25	0.15	0.16	0.00	2.78
	sample 2-2	2554	0.07	10.8	25	0.16			
	sample 2-3	2566	0.07	10.8	25	0.16			
	sample 3-1	2341	0.06	10.2	25	0.16	0.16	0.01	5.79
	sample 3-2	2334	0.06	10.2	25	0.16			
	sample 3-3	2606	0.07	10.2	25	0.17			

② 2개월 안정성시험

- 제조 년 · 월 · 일 :
- 수령 년 · 월 · 일 : 2019. 07. 11.
- 보존조건
  - 1) 냉장( $4 \pm 2^\circ\text{C}$ )
  - 2) 실온( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ )
  - 3) 고온( $50 \pm 2^\circ\text{C}$ )
- 2개월 안정성 시험일 : 2019. 09. 10.

1) Pectolinarin

Pectolinarin		Area	농도 ( $\mu\text{g/mL}$ )	시료 채취량 (mg)	최종 부피 (mL)	함량 (mg/g)	Average (mg/g)	SD	%RSD
냉장( $4\pm 2^\circ\text{C}$ ) (2개월)	sample 1-1	25567	1.10	10.7	25	2.57	2.54	0.03	1.17
	sample 1-2	25298	1.09	10.7	25	2.55			
	sample 1-3	24982	1.08	10.7	25	2.51			
	sample 2-1	24038	1.03	10.2	25	2.54	2.53	0.01	0.39
	sample 2-2	23926	1.03	10.2	25	2.52			
	sample 2-3	24111	1.04	10.2	25	2.54			
	sample 3-1	25415	1.09	10.7	25	2.56	2.57	0.01	0.36
	sample 3-2	25598	1.10	10.7	25	2.58			
	sample 3-3	25511	1.10	10.7	25	2.57			
실온 ( $25\pm 2^\circ\text{C}$ ) (2개월)	sample 1-1	24633	1.06	10.4	25	2.55	2.57	0.03	1.25
	sample 1-2	24600	1.06	10.4	25	2.55			
	sample 1-3	25145	1.08	10.4	25	2.60			
	sample 2-1	20806	0.89	10.3	25	2.17	2.19	0.05	2.36
	sample 2-2	20619	0.89	10.3	25	2.15			
	sample 2-3	21541	0.93	10.3	25	2.25			
	sample 3-1	23541	1.01	10.7	25	2.37	2.37	0.01	0.37
	sample 3-2	23648	1.02	10.7	25	2.38			
	sample 3-3	23476	1.01	10.7	25	2.36			
고온 ( $50\pm 2^\circ\text{C}$ ) (2개월)	sample 1-1	23906	1.03	10.4	25	2.47	2.50	0.07	2.83
	sample 1-2	23732	1.02	10.4	25	2.45			
	sample 1-3	24981	1.08	10.4	25	2.59			
	sample 2-1	24502	1.05	10.8	25	2.44	2.43	0.01	0.47
	sample 2-2	24293	1.05	10.8	25	2.42			
	sample 2-3	24326	1.05	10.8	25	2.42			
	sample 3-1	23590	1.01	10.9	25	2.33	2.34	0.01	0.56
	sample 3-2	23808	1.02	10.9	25	2.35			
	sample 3-3	23827	1.03	10.9	25	2.35			

2) Pectolinarigenin

Pectolinarigenin		Area	농도 ( $\mu\text{g/mL}$ )	시료 채취량 (mg)	최종 부피 (mL)	함량 (mg/g)	Average (mg/g)	SD	%RSD
냉장 ( $4\pm 2^\circ\text{C}$ ) (2개월)	sample 1-1	3222	0.09	10.7	25	0.22	0.21	0.01	5.19
	sample 1-2	2938	0.09	10.7	25	0.20			
	sample 1-3	2882	0.08	10.7	25	0.20			
	sample 2-1	3064	0.09	10.2	25	0.22	0.21	0.01	4.17
	sample 2-2	2811	0.08	10.2	25	0.20			
	sample 2-3	3060	0.09	10.2	25	0.22			
	sample 3-1	3099	0.09	10.7	25	0.21	0.20	0.01	4.19
	sample 3-2	3026	0.09	10.7	25	0.21			
	sample 3-3	2818	0.08	10.7	25	0.19			
실온 ( $25\pm 2^\circ\text{C}$ ) (2개월)	sample 1-1	3077	0.09	10.4	25	0.21	0.21	0.00	1.88
	sample 1-2	3081	0.09	10.4	25	0.22			
	sample 1-3	2964	0.09	10.4	25	0.21			
	sample 2-1	2109	0.07	10.3	25	0.16	0.16	0.01	5.78
	sample 2-2	2000	0.06	10.3	25	0.15			
	sample 2-3	2301	0.07	10.3	25	0.17			
	sample 3-1	2577	0.08	10.7	25	0.18	0.17	0.01	5.57
	sample 3-2	2259	0.07	10.7	25	0.16			
	sample 3-3	2368	0.07	10.7	25	0.17			
고온 ( $50\pm 2^\circ\text{C}$ ) (2개월)	sample 1-1	2530	0.08	10.4	25	0.18	0.18	0.00	1.29
	sample 1-2	2573	0.08	10.4	25	0.18			
	sample 1-3	2609	0.08	10.4	25	0.19			
	sample 2-1	2648	0.08	10.8	25	0.18	0.19	0.00	2.31
	sample 2-2	2682	0.08	10.8	25	0.18			
	sample 2-3	2790	0.08	10.8	25	0.19			
	sample 3-1	2606	0.08	10.9	25	0.18	0.17	0.01	3.29
	sample 3-2	2463	0.07	10.9	25	0.17			
	sample 3-3	2417	0.07	10.9	25	0.17			

③ 3개월 안정성시험

- 제조 년 · 월 · 일 :
- 수령 년 · 월 · 일 : 2019. 07. 11.
- 보존조건
  - 1) 냉장( $4\pm 2^\circ\text{C}$ )
  - 2) 실온( $25\pm 2^\circ\text{C}$ )
  - 3) 고온( $50\pm 2^\circ\text{C}$ )
- 3개월 안정성 시험일 : 2019. 10. 16.



1) Pectolinarin

Pectolinarin		Area	농도 ( $\mu\text{g/mL}$ )	시료 채취량 (mg)	최종 부피 (mL)	함량 (mg/g)	Average (mg/g)	SD	%RSD
냉장( $4\pm 2$ $^{\circ}\text{C}$ ) (3개월)	sample 1-1	24451	1.13	10.1	25.0	2.81	2.81	0.05	1.85
	sample 1-2	24005	1.11	10.1	25.0	2.76			
	sample 1-3	24929	1.16	10.1	25.0	2.86			
	sample 2-1	26582	1.23	10.9	25.0	2.82	2.82	0.04	1.26
	sample 2-2	26948	1.25	10.9	25.0	2.86			
	sample 2-3	26266	1.22	10.9	25.0	2.79			
	sample 3-1	23457	1.09	10.5	25.0	2.59	2.60	0.06	2.30
	sample 3-2	24162	1.12	10.5	25.0	2.67			
	sample 3-3	23071	1.07	10.5	25.0	2.55			
실온 ( $25\pm 2$ $^{\circ}\text{C}$ ) (3개월)	sample 1-1	24218	1.12	10.2	25.0	2.75	2.72	0.09	3.13
	sample 1-2	24523	1.14	10.2	25.0	2.79			
	sample 1-3	23076	1.07	10.2	25.0	2.63			
	sample 2-1	25646	1.19	10.8	25.0	2.75	2.69	0.06	2.12
	sample 2-2	24623	1.14	10.8	25.0	2.64			
	sample 2-3	24834	1.15	10.8	25.0	2.66			
	sample 3-1	10787	0.51	10.7	25.0	1.20	2.15	0.83	38.47
	sample 3-2	24600	1.14	10.7	25.0	2.66			
	sample 3-3	23904	1.11	10.7	25.0	2.59			
고온 ( $50\pm 2$ $^{\circ}\text{C}$ ) (3개월)	sample 1-1	23565	1.09	10.2	25.0	2.68	2.77	0.08	3.03
	sample 1-2	25068	1.16	10.2	25.0	2.85			
	sample 1-3	24383	1.13	10.2	25.0	2.77			
	sample 2-1	25660	1.19	10.3	25.0	2.89	2.84	0.04	1.33
	sample 2-2	25010	1.16	10.3	25.0	2.81			
	sample 2-3	25152	1.17	10.3	25.0	2.83			
	sample 3-1	26218	1.21	10.5	25.0	2.89	2.78	0.12	4.47
	sample 3-2	25453	1.18	10.5	25.0	2.81			
	sample 3-3	23962	2.22	10.5	25	5.29			

2) Pectolinarigenin

Pectolinarigenin		Area	농도 ( $\mu\text{g/mL}$ )	시료 채취량 (mg)	최종 부피 (mL)	함량 (mg/g)	Average (mg/g)	SD	%RSD
냉장 ( $4\pm 2^\circ\text{C}$ ) (3개월)	sample 1-1	2264	0.08	10.1	25.0	0.20	0.22	0.02	7.20
	sample 1-2	2550	0.09	10.1	25.0	0.22			
	sample 1-3	2754	0.10	10.1	25.0	0.24			
	sample 2-1	2921	0.10	10.9	25.0	0.23	0.23	0.00	1.78
	sample 2-2	3044	0.10	10.9	25.0	0.24			
	sample 2-3	3028	0.10	10.9	25.0	0.24			
	sample 3-1	2305	0.08	10.5	25.0	0.20	0.20	0.01	2.47
	sample 3-2	2450	0.09	10.5	25.0	0.21			
	sample 3-3	2318	0.08	10.5	25.0	0.20			
실온 ( $25\pm 2^\circ\text{C}$ ) (3개월)	sample 1-1	2638	0.09	10.2	25.0	0.23	0.22	0.01	4.00
	sample 1-2	2675	0.09	10.2	25.0	0.23			
	sample 1-3	2418	0.09	10.2	25.0	0.21			
	sample 2-1	2596	0.09	10.8	25.0	0.21	0.21	0.00	1.05
	sample 2-2	2524	0.09	10.8	25.0	0.21			
	sample 2-3	2552	0.09	10.8	25.0	0.21			
	sample 3-1	1121	0.05	10.7	25.0	0.12	0.18	0.05	26.91
	sample 3-2	2506	0.09	10.7	25.0	0.21			
	sample 3-3	2461	0.09	10.7	25.0	0.21			
고온 ( $50\pm 2^\circ\text{C}$ ) (3개월)	sample 1-1	2359	0.09	10.2	25.0	0.21	0.21	0.00	1.35
	sample 1-2	2439	0.09	10.2	25.0	0.21			
	sample 1-3	2366	0.09	10.2	25.0	0.21			
	sample 2-1	2665	0.09	10.3	25.0	0.23	0.22	0.00	1.74
	sample 2-2	2629	0.09	10.3	25.0	0.22			
	sample 2-3	2546	0.09	10.3	25.0	0.22			
	sample 3-1	2576	0.09	10.5	25.0	0.22	0.22	0.00	1.94
	sample 3-2	2612	0.09	10.5	25.0	0.22			
	sample 3-3	2482	0.09	10.5	25.0	0.21			

(3) 발효산물 1종(곤드레) 및 제품 안정성 시험 중 성분 변화 결과

㉠ 곤드레 냉장( $4\pm 2^\circ\text{C}$ )

곤드레	Pectolinarin		
	함량 (mg/g)		
	0개월	2개월	3개월
Lot 1	$29.64^{1)} \pm 0.19$	$22.42 \pm 0.12$	$26.51 \pm 0.61$
Lot 2	$28.12 \pm 0.41$	$23.46 \pm 0.04$	$24.90 \pm 0.47$
Lot 3	$29.11 \pm 0.05$	$27.36 \pm 0.03$	$23.91 \pm 0.79$

<sup>1)</sup>각 시료당 3반복 실험하여 평균값을 나타냄.

콘드레	Pectolinarigenin		
	함량 (mg/g)		
	0개월	2개월	3개월
Lot 1	3.75±0.07	1.42±0.02	1.85±0.04
Lot 2	3.89±0.08	1.47±0.01	1.72±0.02
Lot 3	3.80±0.03	1.74±0.01	1.58±0.06

㉞ 콘드레 실온(25±2℃)

콘드레	Pectolinarin		
	함량 (mg/g)		
	0개월	2개월	3개월
Lot 1	29.64±0.19	24.72±0.17	22.68±0.64
Lot 2	28.12±0.41	28.16±0.16	24.82±0.12
Lot 3	29.11±0.05	21.35±0.10	23.03±0.80

콘드레	Pectolinarigenin		
	함량 (mg/g)		
	0개월	2개월	3개월
Lot 1	3.75±0.07	1.45±0.01	1.46±0.03
Lot 2	3.89±0.08	1.99±0.01	1.61±0.01
Lot 3	3.80±0.03	1.46±0.03	1.47±0.05

㉞ 콘드레 고온(50±2℃)

콘드레	Pectolinarin		
	함량 (mg/g)		
	0개월	2개월	3개월
Lot 1	29.64±0.19	26.65±0.13	24.47±0.47
Lot 2	28.12±0.41	24.69±0.04	23.71±0.82
Lot 3	29.11±0.05	21.12±0.04	23.85±0.95

콘드레	Pectolinarigenin		
	함량 (mg/g)		
	0개월	2개월	3개월
Lot 1	3.75±0.07	1.45±0.02	1.46±0.02
Lot 2	3.89±0.08	1.34±0.01	1.45±0.03
Lot 3	3.80±0.03	1.26±0.00	1.38±0.04

㉠ 제품 냉장( $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ )

제품	Pectolinarin		
	함량 (mg/g)		
	0개월	2개월	3개월
Lot 1	$2.43\pm 0.01$	$2.54\pm 0.03$	$2.81\pm 0.05$
Lot 2	$2.14\pm 0.03$	$2.53\pm 0.01$	$2.82\pm 0.04$
Lot 3	$2.36\pm 0.04$	$2.57\pm 0.01$	$2.60\pm 0.06$

제품	Pectolinarigenin		
	함량 (mg/g)		
	0개월	2개월	3개월
Lot 1	$0.15\pm 0.00$	$0.21\pm 0.01$	$0.22\pm 0.02$
Lot 2	$0.16\pm 0.00$	$0.21\pm 0.01$	$0.23\pm 0.00$
Lot 3	$0.16\pm 0.01$	$0.20\pm 0.01$	$0.20\pm 0.01$

㉡ 제품 실온( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ )

제품	Pectolinarin		
	함량 (mg/g)		
	0개월	2개월	3개월
Lot 1	$2.43\pm 0.01$	$2.57\pm 0.03$	$2.72\pm 0.09$
Lot 2	$2.14\pm 0.03$	$2.19\pm 0.05$	$2.69\pm 0.06$
Lot 3	$2.36\pm 0.04$	$2.37\pm 0.01$	$2.15\pm 0.83$

제품	Pectolinarigenin		
	함량 (mg/g)		
	0개월	2개월	3개월
Lot 1	$0.15\pm 0.00$	$0.21\pm 0.00$	$0.22\pm 0.01$
Lot 2	$0.16\pm 0.00$	$0.16\pm 0.01$	$0.21\pm 0.00$
Lot 3	$0.16\pm 0.01$	$0.17\pm 0.01$	$0.18\pm 0.05$

㉢ 제품 고온( $50\pm 2^{\circ}\text{C}$ )

제품	Pectolinarin		
	함량 (mg/g)		
	0개월	2개월	3개월
Lot 1	$2.43\pm 0.01$	$2.50\pm 0.07$	$2.77\pm 0.08$
Lot 2	$2.14\pm 0.03$	$2.43\pm 0.01$	$2.84\pm 0.04$
Lot 3	$2.36\pm 0.04$	$2.34\pm 0.01$	$2.78\pm 0.12$

제품	Pectolinarigenin		
	합량 (mg/g)		
	0개월	2개월	3개월
Lot 1	0.15±0.00	0.18±0.00	0.21±0.00
Lot 2	0.16±0.00	0.19±0.00	0.22±0.00
Lot 3	0.16±0.01	0.17±0.01	0.22±0.00

(4) 발효산물 1종(곤드레) 및 제품 안정성 시험 중 성분 변화 결과 그래프

㉗ 곤드레

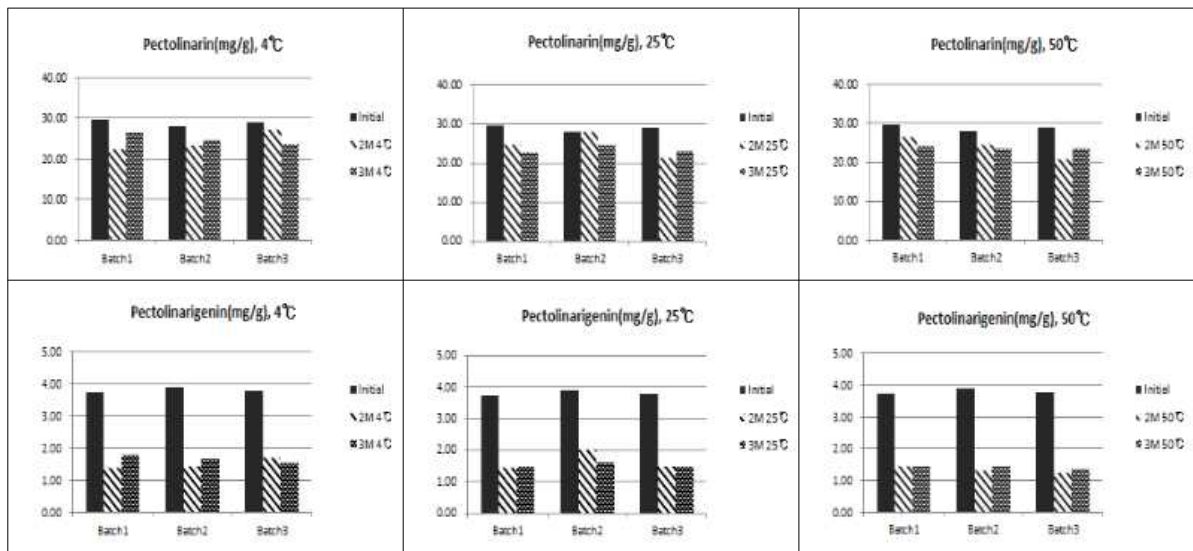


그림 69. 발효산물 곤드레의 저장조건·기간별 지표물질 2종의 변화 그래프

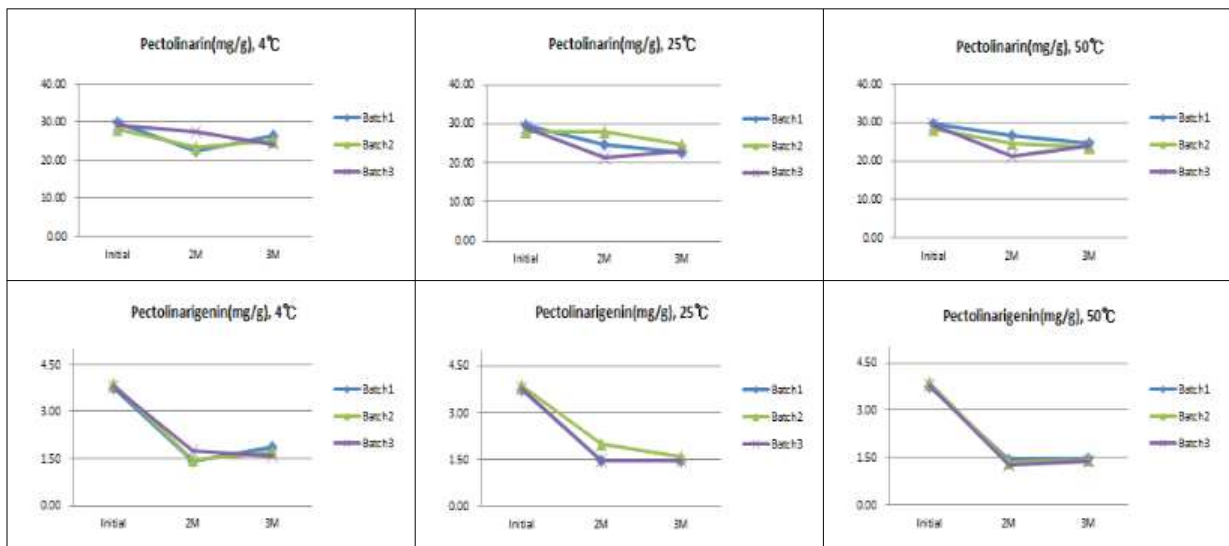


그림 70. 발효산물 곤드레의 Lot·저장기간별 지표물질 2종의 변화 그래프

㉞ 제품

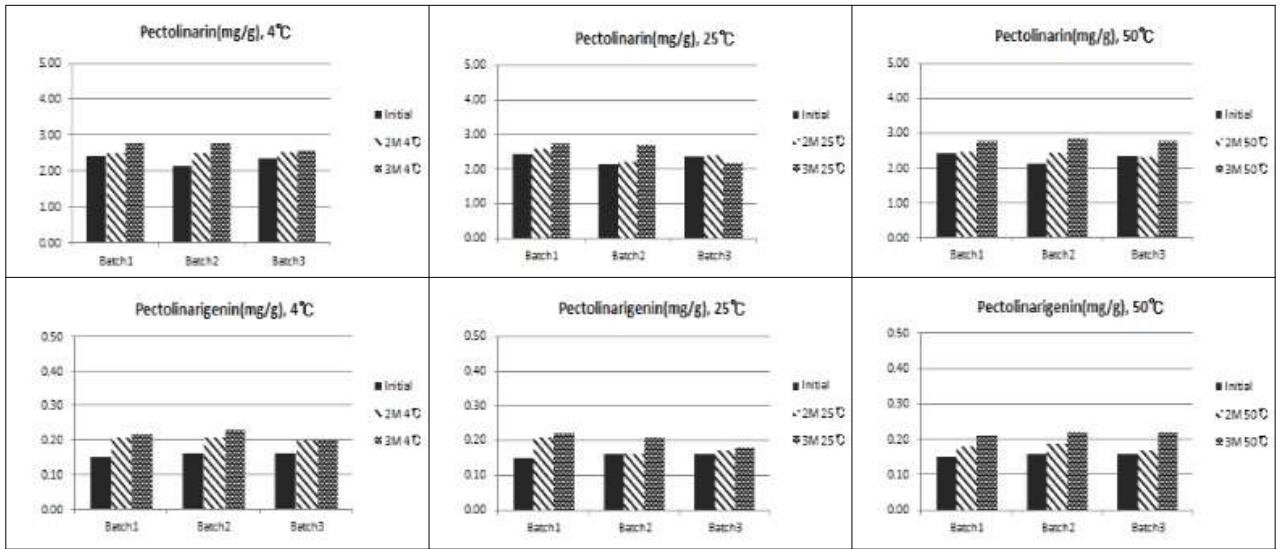


그림 71. 제품의 저장조건 · 기간별 지표물질 2종의 변화 그래프

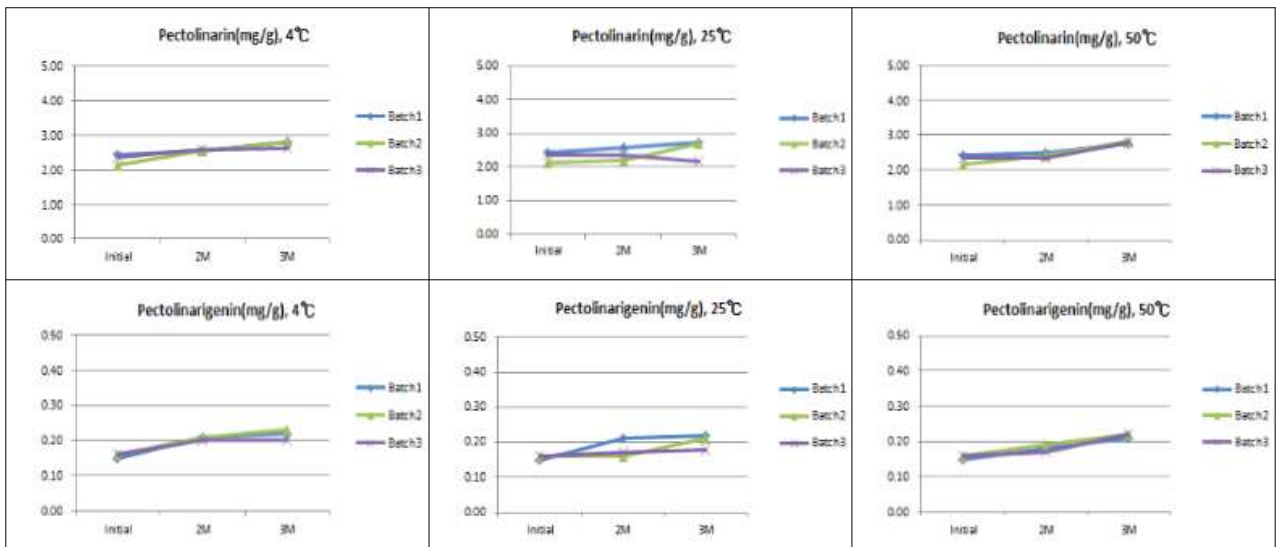


그림 72. 제품의 Lot · 저장기간별 지표물질 2종의 변화 그래프

(5) 발효산물 1종(곤드레) 및 제품 안정성 시험 중 성분 변화 비교 결과 그래프



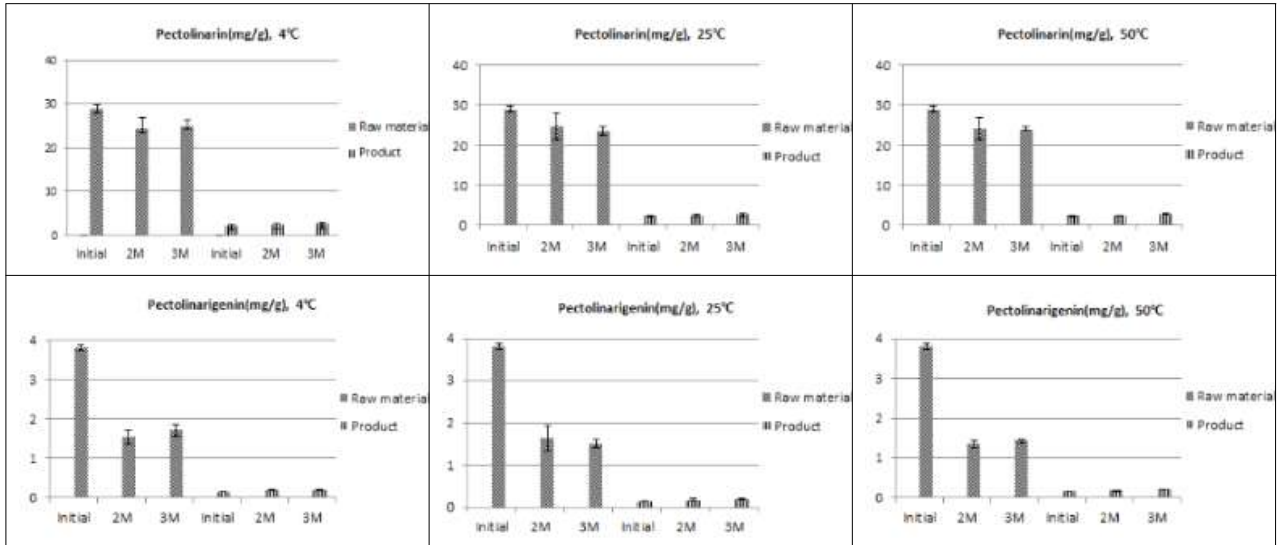


그림 73. 발효산물 곤드레 및 제품의 저장기간별 지표물질 2종의 변화 그래프

- 발효산물 곤드레를 저장조건(4°C, 25°C, 50°C)에서 저장기간별(0개월, 2개월, 3개월)에 따른 지표성분 pectolarin과 pectolarigenin의 함량의 변화를 측정한 결과는 위 그래프로 나타내었다.
- 발효산물 곤드레 중 지표성분 pectolarin과 pectolarigenin은 저장조건과는 상관없이 저장기간별에 따라 성분의 함량이 감소하는 추세를 나타냈고, 제품 중 지표성분의 함량은 크게 변화가 없다는 것을 나타내었다.
- 발효산물 곤드레 중 pectolarigenin의 감소율을 보았을 때, 배당체인 pectolarin이 더 안정적인 구조를 갖고 있다는 것을 확인하였다.

다. 발효산물 1종(미강) 및 제품 지표성분 함량분석

○ 분석물질

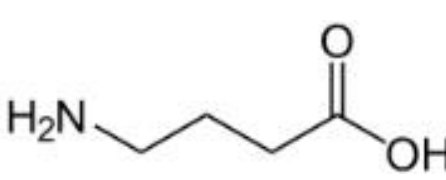
항 목	GABA(Gamma amino butyric acid)
Chemical structure	
Chemical formula	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub>
Molecular Weight	103.12
CAS number	56-12-2

표 43. 발효산물 1종(미강) 지표물질

- 분석시료
  - (1) 발효산물 미강(Lot 1~3, 0~3개월)
  - (2) 제품(Lot 1~3, 0~3개월)
  
- 분석방법
  - (1) 시약 및 시액
    - 표준물질 : 표준물질은 Sigma-Aldrich에서 구입하여 사용하였다.
      - $\gamma$ -Aminobutyric acid (Sigma-Aldrich, 98.0%)
    - 일반시약
      - Sodium carbonate(Ducksan, EP grade)
      - Dansyl chloride(Sigma-Aldrich, HPLC grade)
      - Acetonitrile (Burdick&Jackson, HPLC grade)
      - Methanol(TEDIA, HPLC grade)
      - Tetrahydrofuran(Merck , HPLC grade)
      - Sodium acetate(Sigma-Aldrich , 99.0%)
      - Acetic acid(Sigma-Aldrich , ACS reagent)
  - (2) 표준용액의 제조
    - $\gamma$ -Aminobutyric acid 표준품 약 10 mg을 정밀하게 달아 10 mL 용량플라스크에 넣고 증류수를 넣어 vortexing하고 초음파로 진탕하여 녹인 후 정용(Stock solution)함.
    - Stock Solution을 증류수로 적절히 희석하여 유도체화 과정을 따라 표준용액으로 사용함.
  - (3) 시험용액의 제조
    - 시료 약 10 mg을 정밀하게 달아 10 mL 용량플라스크에 넣고 증류수를 넣어 vortexing하고 초음파로 진탕하여 용해함.
    - Sodium carbonate 약 1.06 g을 정밀하게 달아 10 mL 용량플라스크에 넣고 증류수를 넣어 vortexing하고 초음파로 진탕하여 녹인 액은 1M Sodium carbonate라 함.
    - Dansyl chloride 약 800 mg을 정밀하게 달아 10 mL 용량플라스크에 넣고 Acetonitrile을 넣어 vortexing하고 초음파로 진탕하여 녹인 액을 Dansyl Chloride 용해액이라 함.
    - Acetic acid 약 2 mL를 정확하게 취하여 10 mL 용량플라스크에 넣고 증류수를 넣어 vortexing하여 녹인 액은 20% Acetic acid라 함.
    - 시험용액 or 농도별 표준용액 100  $\mu$ L에 1M Sodium carbonate와 Dansyl chloride 용해액을 각각 100  $\mu$ L을 넣고 증류수 500  $\mu$ L를 넣어 vortexing을 함.
    - 혼합한 용액을 80°C 수용액상에서 40분간 반응시킨 후 20% Acetic acid를 100  $\mu$ L를 넣고 혼합하여, 3,500 rpm에서 5 분간 원심분리한 후, syringe filter로 여과함.

(4) HPLC 분석

<b>Instruments</b>	Shimadzu HPLC system (HPLC-UV)												
<b>Column</b>	Cosmosil C18 (4.6 x 250 mm, 5 um)												
<b>Mobile phase</b>	Solution(A) : THF/MeOH/50mM Sodium acetate(pH6.2) (5:75:420)												
	Solution(B) : Methanol												
	<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Time (min)</th> <th style="text-align: left;">B Conc. (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.1</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>26</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>-</td> </tr> </tbody> </table>	Time (min)	B Conc. (%)	0.1	20	5	20	25	100	26	20	40	-
	Time (min)	B Conc. (%)											
	0.1	20											
	5	20											
25	100												
26	20												
40	-												
<b>Oven temp.</b>	40°C												
<b>Wavelength</b>	286 nm												
<b>Injection volume</b>	10 uL												
<b>Flow rate</b>	0.7 mL/min												
<b>Run time</b>	40 min												

○ 분석결과

(1) Linearity

- 지표물질(미강)의 표준용액을  $\gamma$ -Aminobutyric acid 0.056 ~ 2.75 ppm 범위에서 5 농도에서 실험을 실시하였으며, 지표물질(제품)의 표준용액을  $\gamma$ -Aminobutyric acid 0.011 ~ 2.75 ppm 범위에서 6 농도에서 실험을 실시하였다. 면적대 농도비의 관계로 검량선을 확인하였다. 모든 검량선은 실험범위 내에서 높은 상관계수를 나타내었다( $R^2 \geq 0.99$ ).

㉠ (미강) 지표물질 Linearity

표준물질명	개월	Concentration	Regression equation	$R^2$
$\gamma$ -Aminobutyric acid	0	0.056 ~ 2.69	$y = 11277x + 250.8$	0.9986
	2	0.056 ~ 2.75	$y = 13405x - 617.7$	0.9966
	3	0.056 ~ 2.75	$y = 14310x - 258.31$	0.9993

기간	STD level	$\gamma$ -Aminobutyric acid ( $\mu\text{g/mL}$ )	Area	Calibration Curve
초기 (0개월)	1	0.056	530	
	2	0.109	1314	
	3	0.54	6384	
	4	1.08	13187	
	5	2.69	30336	
2개월	1	0.056	455	
	2	0.109	1174	
	3	0.55	7120	
	4	1.10	12546	
	5	2.75	36751	
3개월	1	0.056	552	
	2	0.109	1088	
	3	0.55	7314	
	4	1.10	16161	
	5	2.75	38853	

⊕ (제품) 지표물질 Linearity

표준물질명	개월	Concentration	Regression equation	R <sup>2</sup>
$\gamma$ -Aminobutyric acid	0	0.011 ~ 2.69	$y = 11416x + 514.6$	0.9961
	2	0.011 ~ 2.75	$y = 12839x + 209.4$	0.9981
	3	0.011 ~ 2.75	$y = 15403x - 104.24$	0.9996

기간	STD level	$\gamma$ -Aminobutyric acid( $\mu\text{g/mL}$ )	Area	Calibration Curve
초기 (0개월)	1	0.011	185	
	2	0.056	714	
	3	0.109	1489	
	4	0.54	7100	
	5	1.08	14164	
	6	2.69	30679	
2개월	1	0.011	304	
	2	0.056	1052	
	3	0.109	1567	
	4	0.55	6469	
	5	1.10	15306	
	6	2.75	35256	
3개월	1	0.011	226	
	2	0.056	960	
	3	0.109	1264	
	4	0.55	7945	
	5	1.10	17258	
	6	2.75	42140	

표 4.  $\gamma$ -Aminobutyric acid standard calibration curve(0-3months)

(2) 발효산물 1종(미강) 및 제품 유효(지표)성분 안정성평가

㉠ 발효산물 미강

(1) 초기 안정성시험

- 제조 년 · 월 · 일 :
- 수령 년 · 월 · 일 : 2019. 06. 26.
- 보존조건 : Room Temperature( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ )
- 초기 안정성 시험일 : 2019. 07. 24.

$\gamma$ -Aminobutyric acid	Area	시험용액 농도 ( $\mu\text{g/mL}$ )	시료 채취량 (mg)	최종 부피 (mL)	함량 (mg/g)	Average (mg/g)	SD	%RSD	
미강 (0개월)	sample 1-1	2458	0.20	10.1	90	1.74	1.99	0.22	11.08
	sample 1-2	2998	0.24	10.1	90	2.17			
	sample 1-3	2849	0.23	10.1	90	2.05			
	sample 2-1	2843	0.23	10.0	90	2.07	2.00	0.06	2.99
	sample 2-2	2705	0.22	10.0	90	1.96			
	sample 2-3	2723	0.22	10.0	90	1.97			
	sample 3-1	2598	0.21	10.6	90	1.77	1.74	0.07	4.11
	sample 3-2	2455	0.20	10.6	90	1.66			
	sample 3-3	2635	0.21	10.6	90	1.80			

(2) 2개월 안정성시험

- 제조 년 · 월 · 일 :
- 수령 년 · 월 · 일 : 2019. 06. 26.
- 보존조건
  - 1) 냉장( $4 \pm 2^\circ\text{C}$ )
  - 2) 실온( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ )
  - 3) 고온( $50 \pm 2^\circ\text{C}$ )
- 2개월 안정성 시험일 : 2019. 10. 17.



γ-Aminobutyric acid		Area	시험용액 농도 (μg/mL)	시료 채취량 (mg)	최종 부피 (mL)	함량 (mg/g)	Average (mg/g)	SD	%RSD
냉장 (4±2℃) (2개월)	sample 1-1	1363	0.15	10.7	90	1.24	1.37	0.12	8.40
	sample 1-2	1652	0.17	10.7	90	1.42			
	sample 1-3	1705	0.17	10.7	90	1.46			
	sample 2-1	1378	0.15	10.6	90	1.26	1.30	0.20	15.44
	sample 2-2	1779	0.18	10.6	90	1.52			
	sample 2-3	1153	0.13	10.6	90	1.12			
	sample 3-1	1140	0.13	10.4	90	1.13	1.10	0.04	3.29
	sample 3-2	1029	0.12	10.4	90	1.06			
	sample 3-3	1074	0.13	10.4	90	1.09			
실온 (25±2℃) (2개월)	sample 1-1	1302	0.14	10.9	90	1.18	1.15	0.11	9.59
	sample 1-2	1382	0.15	10.9	90	1.23			
	sample 1-3	1041	0.12	10.9	90	1.02			
	sample 2-1	975	0.12	10.2	90	1.05	1.17	0.11	8.99
	sample 2-2	1269	0.14	10.2	90	1.24			
	sample 2-3	1230	0.14	10.2	90	1.22			
	sample 3-1	1190	0.13	10.4	90	1.17	1.21	0.06	4.67
	sample 3-2	1353	0.15	10.4	90	1.27			
	sample 3-3	1217	0.14	10.4	90	1.18			
고온 (50±2℃) (2개월)	sample 1-1	801	0.11	10.9	90	0.87	0.95	0.08	8.06
	sample 1-2	938	0.12	10.9	90	0.96			
	sample 1-3	1050	0.12	10.9	90	1.03			
	sample 2-1	1135	0.13	10.8	90	1.09	1.05	0.08	7.56
	sample 2-2	1156	0.13	10.8	90	1.10			
	sample 2-3	925	0.12	10.8	90	0.96			
	sample 3-1	843	0.11	10.8	90	0.91	0.91	0.03	3.49
	sample 3-2	808	0.11	10.8	90	0.89			
	sample 3-3	909	0.11	10.8	90	0.95			

(3) 3개월 안정성시험

- 제조 년 · 월 · 일 :
- 수령 년 · 월 · 일 : 2019. 06. 26.
- 보존조건
  - 1) 냉장(4±2℃)
  - 2) 실온(25±2℃)
  - 3) 고온(50±2℃)
- 3개월 안정성 시험일 : 2019. 10. 21.

$\gamma$ -Aminobutyric acid		Area	시험용액 농도 ( $\mu\text{g/mL}$ )	시료 채취량 (mg)	최종 부피 (mL)	함량 (mg/g)	Average (mg/g)	SD	%RSD
냉장 ( $4\pm 2^\circ\text{C}$ ) (3개월)	sample 1-1	1104	0.10	10.9	90	0.79	0.87	0.08	9.31
	sample 1-2	1384	0.11	10.9	90	0.95			
	sample 1-3	1249	0.11	10.9	90	0.87			
	sample 2-1	992	0.09	10.0	90	0.79	0.85	0.07	8.84
	sample 2-2	1219	0.10	10.0	90	0.93			
	sample 2-3	1045	0.09	10.0	90	0.82			
	sample 3-1	1174	0.10	10.3	90	0.87	0.88	0.07	7.51
	sample 3-2	1302	0.11	10.3	90	0.95			
	sample 3-3	1086	0.09	10.3	90	0.82			
실온 ( $25\pm 2^\circ\text{C}$ ) (3개월)	sample 1-1	1132	0.10	10.5	90	0.83	0.88	0.04	5.03
	sample 1-2	1218	0.10	10.5	90	0.88			
	sample 1-3	1279	0.11	10.5	90	0.92			
	sample 2-1	1208	0.10	10.5	90	0.88	0.82	0.05	6.55
	sample 2-2	1113	0.10	10.5	90	0.82			
	sample 2-3	1028	0.09	10.5	90	0.77			
	sample 3-1	1033	0.09	10.5	90	0.77	0.79	0.05	6.04
	sample 3-2	1143	0.10	10.5	90	0.84			
	sample 3-3	989	0.09	10.5	90	0.75			
고온 ( $50\pm 2^\circ\text{C}$ ) (3개월)	sample 1-1	1034	0.09	10.0	90	0.81	0.77	0.04	4.88
	sample 1-2	914	0.08	10.0	90	0.74			
	sample 1-3	969	0.09	10.0	90	0.77			
	sample 2-1	959	0.09	10.8	90	0.71	0.69	0.02	2.96
	sample 2-2	889	0.08	10.8	90	0.67			
	sample 2-3	922	0.08	10.8	90	0.69			
	sample 3-1	918	0.08	10.2	90	0.73	0.70	0.04	5.26
	sample 3-2	916	0.08	10.2	90	0.72			
	sample 3-3	813	0.07	10.2	90	0.66			

㉔ 제품

(1) 초기 안정성시험

- 제조 년 · 월 · 일 :
- 수령 년 · 월 · 일 : 2019. 07. 11.
- 보존조건 : Room Temperature( $25\pm 2^\circ\text{C}$ )
- 초기 안정성 시험일 : 2019. 07. 25.

$\gamma$ -Aminobutyric acid		Area	시험용액 농도 ( $\mu\text{g/mL}$ )	시료 채취량 (mg)	최종 부피 (mL)	함량 (mg/g)	Average (mg/g)	SD	%RSD
제품 (0개월)	sample 1-1	1018	0.04	10.4	90	0.38	0.42	0.03	7.54
	sample 1-2	1099	0.05	10.4	90	0.44			
	sample 1-3	1073	0.05	10.4	90	0.42			
	sample 2-1	1461	0.08	10.8	90	0.69	0.75	0.05	6.71
	sample 2-2	1560	0.09	10.8	90	0.76			
	sample 2-3	1593	0.09	10.8	90	0.79			
	sample 3-1	1247	0.06	10.7	90	0.54	0.51	0.03	6.44
	sample 3-2	1161	0.06	10.7	90	0.48			
	sample 3-3	1226	0.06	10.7	90	0.52			

(2) 2개월 안정성시험

- 제조 년 · 월 · 일 :
- 수령 년 · 월 · 일 : 2019. 07. 11.
- 보존조건
  - 1) 냉장( $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ )
  - 2) 실온( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ )
  - 3) 고온( $50\pm 2^{\circ}\text{C}$ )
- 2개월 안정성 시험일 : 2019. 10. 18.
- 지표성분이 검출되지 않음

(3) 3개월 안정성시험

- 제조 년 · 월 · 일 :
- 수령 년 · 월 · 일 : 2019. 07. 11.
- 보존조건
  - 1) 냉장( $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ )
  - 2) 실온( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ )
  - 3) 고온( $50\pm 2^{\circ}\text{C}$ )
- 3개월 안정성 시험일 : 2019. 10. 21.
- 지표성분이 검출되지 않음

(3) 발효산물 1종(미강) 및 제품 안정성 시험 중 성분 변화 결과

㉠ 미강 냉장( $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ )

콘드레	$\gamma$ -Aminobutyric acid		
	함량 (mg/g)		
	0개월	2개월	3개월
Lot 1	1.99 <sup>1)</sup> ±0.22	1.37±0.12	0.87±0.08
Lot 2	2.00±0.06	1.30±0.20	0.85±0.07
Lot 3	1.74±0.07	1.10±0.04	0.88±0.07

㉞ 미장 실온(25±2℃)

콘드레	$\gamma$ -Aminobutyric acid		
	함량 (mg/g)		
	0개월	2개월	3개월
Lot 1	1.99±0.22	1.15±0.11	0.88±0.04
Lot 2	2.00±0.06	1.17±0.11	0.82±0.05
Lot 3	1.74±0.07	1.21±0.06	0.79±0.05

㉞ 미장 고온(50±2℃)

콘드레	$\gamma$ -Aminobutyric acid		
	함량 (mg/g)		
	0개월	2개월	3개월
Lot 1	1.99±0.22	0.95±0.08	0.77±0.04
Lot 2	2.00±0.06	1.05±0.08	0.69±0.02
Lot 3	1.74±0.07	0.91±0.03	0.70±0.04

<sup>1)</sup>각 시료당 3반복 실험하여 평균값을 나타냄.

㉞ 제품 냉장(4±2℃)

콘드레	$\gamma$ -Aminobutyric acid		
	함량 (mg/g)		
	0개월	2개월	3개월
Lot 1	0.42±0.03	0±0	0±0
Lot 2	0.75±0.05	0±0	0±0
Lot 3	0.51±0.03	0±0	0±0

㉞ 제품 실온(25±2℃)

콘드레	$\gamma$ -Aminobutyric acid		
	함량 (mg/g)		
	0개월	2개월	3개월
Lot 1	0.42±0.03	0±0	0±0
Lot 2	0.75±0.05	0±0	0±0
Lot 3	0.51±0.03	0±0	0±0

㉞ 제품 고온(50±2℃)

콘드레	γ-Aminobutyric acid		
	함량 (mg/g)		
	0개월	2개월	3개월
Lot 1	0.42±0.03	0±0	0±0
Lot 2	0.75±0.05	0±0	0±0
Lot 3	0.51±0.03	0±0	0±0

(4) 발효산물 1종(미강) 및 제품 안정성 시험 중 성분 변화 결과 그래프

㉟ 미강

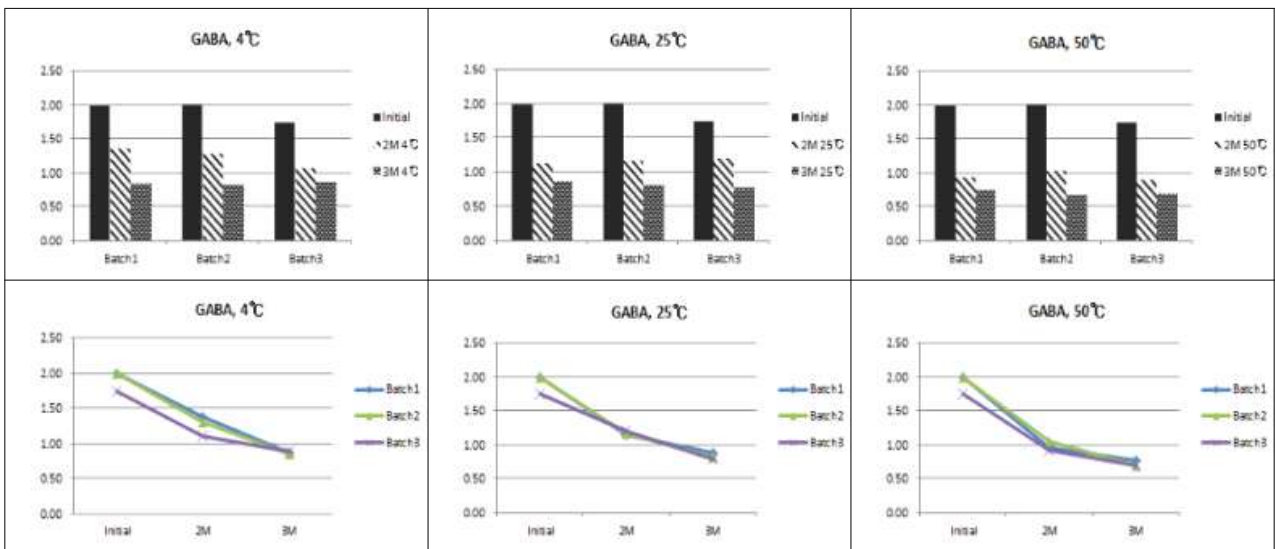


그림 74. 발효산물 미강의 저장조건·기간별 지표물질 변화 그래프

(5) 발효산물 1종(미강) 및 제품 안정성 시험 중 성분 변화 비교 결과 그래프

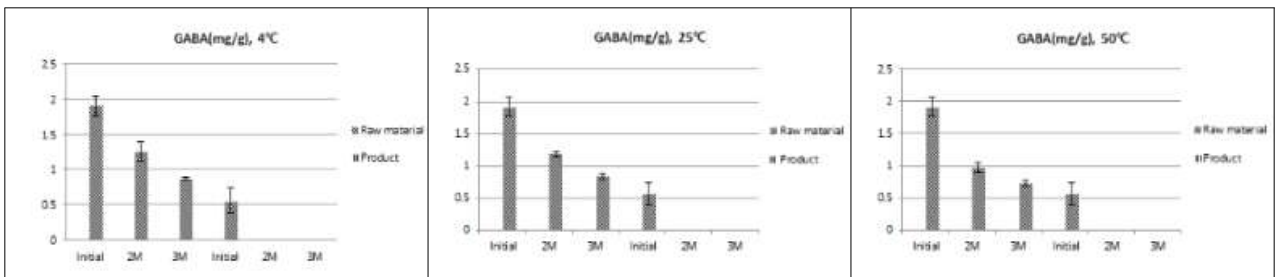


그림 75. 제품의 Lot·저장기간별 지표물질 변화 그래프

- 발효산물 미강을 저장조건(4℃, 25℃, 50℃)에서 저장기간별(0개월, 2개월, 3개월)에 따른 지표성분 γ-Aminobutyric acid의 함량의 변화를 측정한 결과는 위 그래프로 나타내었음.

- 발효산물 미강 중 지표성분  $\gamma$ -Aminobutyric acid은 저장조건과는 상관없이 저장기간 별에 따라 성분의 함량이 감소하는 추세를 나타냈고, 제품 중 지표성분의 함량은 저장기간에 따라 지표성분이 검출되지 않음을 나타내었음.

라. 발효산물 2종(곤드레,미강)과 적용제품의 안정성 요약

	내용	비고
곤드레	1) Pectolinarin 함량변이 Initial에서 3개월(냉장)까지 28.96 mg/g ~ 25.11 mg/g로, 변화율은 15%이내 Initial에서 3개월(실온)까지 28.96 mg/g ~ 23.51 mg/g로, 변화율은 20%이내 Initial에서 3개월(고온)까지 28.96 mg/g ~ 24.01 mg/g로, 변화율은 20%이내 2) Pectolinarigenin 함량변이 Initial에서 3개월(냉장)까지 3.81 mg/g ~ 1.72 mg/g로, 변화율은 55%이내 Initial에서 3개월(실온)까지 3.81 mg/g ~ 1.51 mg/g로, 변화율은 65%이내 Initial에서 3개월(고온)까지 3.81 mg/g ~ 1.43 mg/g로, 변화율은 65%이내	곤드레의 주 지표성분인 Pectolinarin의 함량이 20% 이내의 변화율로 안정적인 성분으로 사료됨
제품 (15% 함유된 곤드레)	1) Pectolinarin 함량변이 Initial에서 3개월(냉장)까지 2.31 mg/g ~ 2.74 mg/g로, 변화율은 20%이내 Initial에서 3개월(실온)까지 2.31 mg/g ~ 2.52 mg/g로, 변화율은 10%이내 Initial에서 3개월(고온)까지 2.31 mg/g ~ 2.80 mg/g로, 변화율은 25%이내 2) Pectolinarigenin 함량변이 Initial에서 3개월(냉장)까지 0.16 mg/g ~ 0.22 mg/g로, 변화율은 40%이내 Initial에서 3개월(실온)까지 0.16 mg/g ~ 0.20 mg/g로, 변화율은 30%이내 Initial에서 3개월(고온)까지 0.16 mg/g ~ 0.22 mg/g로, 변화율은 40%이내	곤드레 15%가 함유된 제품의 경우, 주 지표성분인 Pectolinarin의 함량이 냉장·실온 저장조건에서 20%이내의 변화율로 안정적인 성분으로 사료됨
미강	GABA( $\gamma$ -Aminobutyric acid) Initial에서 3개월(냉장)까지 1.91 mg/g ~ 0.87 mg/g로, 변화율은 55%이내 Initial에서 3개월(실온)까지 1.91 mg/g ~ 0.83 mg/g로,	미강의 지표성분인 GABA는 냉장·실온·고온 모든조건에서 안정성이 낮은 것으로 판

	변화율은 60%이내 Initial에서 3개월(고온)까지 1.91 mg/g ~ 0.72 mg/g로, 변화율은 65%이내	단됨
제품 (20% 함유된 미강)	GABA( $\gamma$ -Aminobutyric acid) 불검출	미강원물의 GABA 함량이 미량이므로, 제품에서의 GABA 함량이 검출한계에서 벗어남



### 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 3-1. 목표

성과목표											연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과				교 육 지 도	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		논 문 평 균 IF	학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SC I	비 SC I							
단위	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	20					30			30			10	10							
최종목표	2					2			3			1	1							
1차년도	1								2				1							
2차년도	1					2			1			1								
소 계	2					2			3			1	1							
종료																				
1차년도																				
종료																				
2차년도																				
종료																				
3차년도																				
종료																				
4차년도																				
종료																				
5차년도																				
소 계																				
합 계	2					2			3			1	1							

3-2. 목표 달성여부

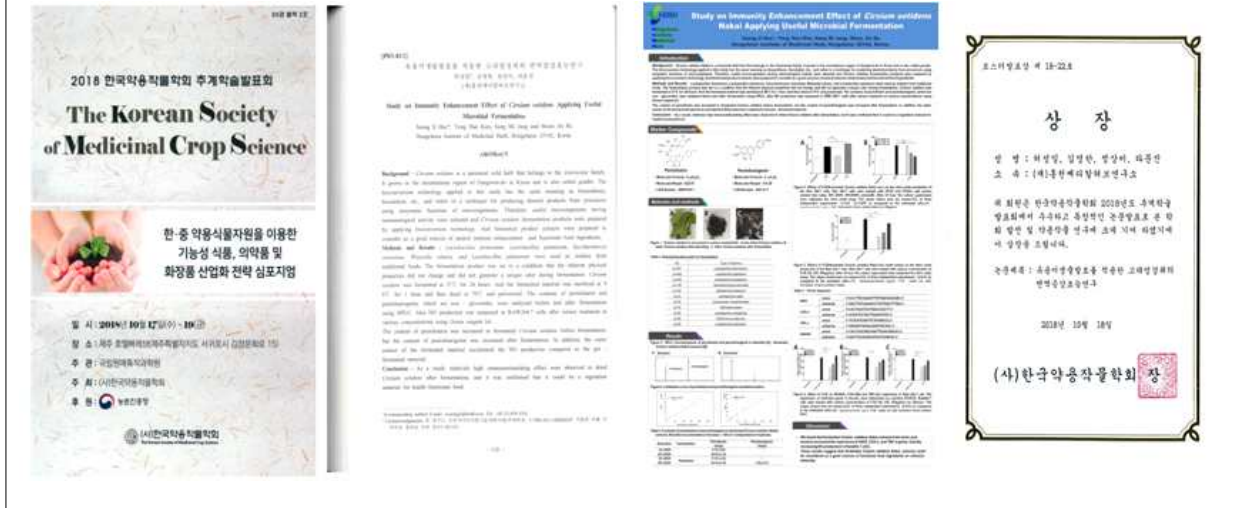
성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술 발표			정책 활용	홍보 전 시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		명	건	건		
가중치	20					30			30			10		10					
최종목표	2					2			3			1		1					
1차년도	목표	1							2					1					
	실적	1							3					1					
2차년도	목표	1				2			1			1							
	실적	1				4			2										
달성율(%)	100					200			166					100					

1) 특허 출원 (목표 2건 / 실적 2건 )

1차년도	2차년도
<p>특허출원 : 10-2018-0123668</p> <p>유용미생물 생물전환산채소재를 이용한 스프 조성물</p>	<p>특허출원 : 10-2019-0164777</p> <p>전통발효식품 유래 미생물로 발효되어 면역증가 활성을 가지며, 저작성이 용이한 노인식용 발효 곤드레 부산물의 제조 방법</p>
<p style="text-align: center;">권인생략 출원번호통지서</p> <p>출원일자 2018.10.17 특기사항 심사청구(우) 공개신청(우) 출원번호 10-2018-0123668(접수번호 1-1-2018-1022345-00) 출원인명칭 (주)세준에프엔비(1-2005-013870-1) 대리인성명 특허법인 프렌즈(9-2012-100082-8) 발명자성명 박승평 전아정 유진교 발명의명칭 유용 미생물 생물 전환 산채 소재를 이용한 소스 조성물</p> <p style="text-align: center;">특 허 청 장</p> <p style="text-align: center;">&lt;&lt;안내&gt;&gt;</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.</li> <li>출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다. ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호</li> <li>귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다. ※ 특허료(patent.go.kr) 접속 &gt; 민원서비스다문로드 &gt; 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식</li> <li>특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의결서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.</li> <li>외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다. ※ 제도 안내 : <a href="http://www.kipo.go.kr/특허마당-PCT/마드리드">http://www.kipo.go.kr/특허마당-PCT/마드리드</a> ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표 디자인은 6개월 이내 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미국대상타이머, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자직교환허가서(PTO/SB39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.</li> <li>본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다. ※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000</li> <li>출원인이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.</li> <li>기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.</li> </ol>	<p style="text-align: center;">권인생략 출원번호통지서</p> <p>출원일자 2019.12.11 특기사항 심사청구(유) 공개신청(우) 참조번호(11519) 출원번호 10-2019-0164777(접수번호 1-1-2019-1281134-60) 출원인명칭 주식회사 웰빙델레스(1-2010-004400-9) 대리인성명 황이남(9-1998-000610-1) 발명자성명 박승순 유현영 이동진 이득식 발명의명칭 전통발효식품 유래 미생물로 발효되어 면역증가 활성을 가지며, 저작성이 용이한 노인식용 발효 곤드레 부산물의 제조방법</p> <p style="text-align: center;">특 허 청 장</p> <p style="text-align: center;">&lt;&lt;안내&gt;&gt;</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.</li> <li>출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호</li> <li>귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다. ※ 특허료(patent.go.kr) 접속 &gt; 민원서비스다문로드 &gt; 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식</li> <li>특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의결서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.</li> <li>외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다. ※ 제도 안내 : <a href="http://www.kipo.go.kr/특허마당-PCT/마드리드">http://www.kipo.go.kr/특허마당-PCT/마드리드</a> ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표 디자인은 6개월 이내 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미국대상타이머, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자직교환허가서(PTO/SB39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.</li> <li>본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다. ※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000</li> <li>출원인이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.</li> <li>기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.</li> </ol>

2) 학회 참석 (목표 1건 / 실적 1건)

2018 한국 약용 작물학회 추가학술발표회 포스터 발표 : 포스터 우수상 수상



3) 고용 창출 (목표 3명 / 실적 5명)

1차년도 (세준 2명 / 웰빙 1명)

<㈜ 세준에프앤비>

■ 가입 내역(발급일자 현재기준)				발급번호: 20181017843101				출력일자: 2018.10.17 12:30 3 / 4			
연번	주민(외국인)등록번호	성명	자격취득일								
			국민연금	건강보험	산재보험	고용보험					
50	860411-1*****	김성범	2017.03.13	2017.03.13	2017.03.13	2017.03.13					
51	870110-6*****	학영환	미가입	2016.08.23	2016.08.23	2016.08.23					
52	870419-2*****	배태배드	2018.01.03	2018.01.03	2018.01.03	2018.01.03					
53	870720-5*****	황사나	미가입	2016.06.27	2016.06.27	미가입					
54	880808-2*****	리희재	2018.08.31	2018.08.31	2018.08.31	2018.08.31					
55	890101-5*****	황창	미가입	2016.06.27	2016.06.27	미가입					
56	890116-1*****	이재훈	2017.11.15	2017.11.15	2017.11.15	2017.11.15					
57	890312-5*****	소홍	미가입	2016.06.27	2016.06.27	미가입					
58	900819-6*****	권부희	미가입	2017.07.06	2017.07.06	2017.07.06					
59	900905-2*****	권아정	2017.06.26	2017.06.26	2017.06.26	2017.06.26					
60	910103-5*****	조양	미가입	2016.06.27	2016.06.27	미가입					
61	920806-5*****	최학	미가입	2014.11.12	2014.11.12	미가입					
62	920911-5*****	수호준	미가입	2015.04.03	2015.04.03	미가입					
63	930523-5*****	수빈스	미가입	2017.02.28	2017.02.28	미가입					
64	930801-1*****	김선홍	2017.09.25	2017.09.25	2017.09.25	2017.09.25					
65	930906-5*****	이산홍	미가입	2015.04.03	2015.04.03	미가입					
66	950822-1*****	김현종	2018.01.19	2018.01.19	2018.01.19	2018.01.19					
67	951113-1*****	한지현	2017.07.18	2017.07.18	2017.07.18	2017.07.18					
68	960514-2*****	박정선	2014.10.16	2015.02.31	2014.10.16	2014.10.16					
69	960613-1*****	정영희	2017.03.13	2017.03.13	2017.03.13	2017.03.13					
70	970128-1*****	박지혜	2018.01.15	2018.01.15	2018.01.15	2018.01.15					
71	980123-1*****	이상규	2018.02.05	2018.02.05	2018.02.05	2018.02.05					
72	980618-1*****	최영호	2018.09.03	2018.09.03	2018.09.03	2018.09.03					
73	980725-2*****	황주현	2018.08.06	2018.08.06	2018.08.06	2018.08.06					
74	981027-1*****	최서홍	2017.08.17	2017.08.17	2017.08.17	2017.08.17					
75	990316-1*****	강상화	2017.09.13	2017.09.13	2017.09.13	2017.09.13					

<㈜ 웰빙 엘에스>

4대 사회보험 사업장 가입자 명부					
발급번호	20180306293746	발급일자	2018-09-06 13:03	사업장 관리번호	20881408450
구분	국민연금	건강보험	산재보험	고용보험	
사업장등록번호	226-81-40845	226-81-40845	226-81-40845	226-81-40845	226-81-40845
사업장명칭	주식회사 웰빙엘에스	주식회사 웰빙엘에스	주식회사 웰빙엘에스	주식회사 웰빙엘에스	주식회사 웰빙엘에스
■ 가입 내역(발급일자 현재기준)					
연번	주민(외국인)등록번호	성명	자격취득일		
1	970213-1*****	김민구	미가입	2019.01.01	2019.01.01
2	800522-1*****	이득익	미가입	2019.01.01	미가입
3	850709-1*****	이동진	2019.01.01	2019.01.01	2019.01.01
4	710225-1*****	이광모	2019.01.01	2019.01.01	2019.01.01
5	810311-1*****	최서우	2018.04.01	2018.04.01	2018.04.01
6	830215-1*****	최복희	2018.05.01	2018.05.01	2018.05.01
7	830622-1*****	문종석	2017.12.22	2017.12.22	2017.12.22
8	840815-1*****	김서현	2019.01.01	2019.01.01	2019.01.01
9	880307-1*****	박종순	2013.01.01	2013.01.01	2013.01.01
10	911229-1*****	문현원	2017.07.01	2017.07.01	2017.07.01
11	931219-1*****	이민섭	2018.09.01	2018.09.01	2018.09.01

2차년도 (세준 2명)

<주 세준에프앤비>

■ 가입 내역(발급일자 현재기준)    발급번호: 2019118738312    출력일시: 2019.11.18 17:23    3 / 4

연번	주민(외국인) 등록번호	성명	자 격 허 득 일			
			국민연금	건강보험	산재보험	고용보험
52	791111-1*****	이정욱	2018.01.25	2018.01.25	2018.01.25	2018.01.25
53	791231-1*****	방태준	2018.09.19	2018.09.19	2018.09.19	2018.09.19
54	800412-1*****	조계선	2014.03.03	2014.03.03	2014.03.03	2014.03.03
55	800903-2*****	누연다보	2018.01.16	2018.01.16	2018.01.16	2018.01.16
56	800819-2*****	한타김봉	2013.11.19	2013.11.19	2013.11.19	2013.11.19
57	811206-2*****	변순영	2018.11.12	2018.11.12	2018.11.12	2018.11.12
58	811231-2*****	관광호여	2019.09.09	2019.09.09	2019.09.09	2019.09.09
59	840215-6*****	후영동부	미가입	2019.09.30	2019.09.30	2019.09.30
60	841024-2*****	김근혜	2018.10.01	2018.10.01	2018.10.01	2018.10.01
61	850411-1*****	김상범	2017.03.13	2017.03.13	2017.03.13	2017.03.13
62	870110-6*****	학행행	미가입	2016.08.23	2016.08.23	2016.08.23
63	870419-2*****	레티베드	2018.01.03	2018.01.03	2018.01.03	2018.01.03
64	870720-5*****	역사나	미가입	2016.06.27	2016.06.27	미가입
65	881028-2*****	양유정	2019.03.11	2019.03.11	2019.03.11	2019.03.11
66	890101-5*****	한빛	미가입	2016.06.27	2016.06.27	미가입
67	890312-5*****	소름	미가입	2016.06.27	2016.06.27	미가입
68	890819-1*****	김현준	2019.09.02	2019.09.02	2019.09.02	2019.09.02
69	910103-5*****	로잇	미가입	2016.06.27	2016.06.27	미가입
70	920822-2*****	최소연	2019.06.03	2019.06.03	2019.06.03	2019.06.03
71	920911-5*****	수로츠	미가입	2015.04.03	2015.04.03	미가입
72	930125-5*****	프림	미가입	2018.12.17	2018.12.17	미가입
73	930203-5*****	라카	미가입	2018.12.17	미가입	미가입
74	930203-5*****	문	미가입	미가입	2018.12.17	미가입
75	930304-2*****	전바프영안	미가입	2019.01.21	미가입	미가입
76	930304-2*****	이안나	2019.01.21	미가입	2019.01.21	2019.01.21
77	930906-5*****	이산트	미가입	2015.04.03	2015.04.03	미가입
78	940614-1*****	대기호	2019.09.26	2019.09.26	2019.09.26	2019.09.26
79	941026-2*****	김다솔	2018.10.04	2018.10.04	2018.10.04	2018.10.04
80	950922-1*****	김현준	2018.01.19	2018.01.19	2018.01.19	2018.01.19
81	951113-1*****	안치현	2017.07.18	2017.07.18	2017.07.18	2017.07.18
82	960312-5*****	양벽	미가입	2018.12.17	2018.12.17	미가입

4) 제품화 (목표 2건 / 실적 4건)

식품(식품첨가물)품목제조보고서

보고인	성명	박승용	생년월일	
	주소		전화번호	033-432-9246
		휴대전화		
영업소	명칭(상호)	(주) 세존에프앤비		
	소재지	강원도 홍천군 남면 홍성길 53		
제품정보	식품의 유형	죽석조리식품	영업신고번호	제115호 품목번호 78
	제품명	발효미장, 발효 곤드레 함유 누룽지		
	유통기한	제조일부더 실온 12개월		
	품질유지기한	제조일부더 개월		
	원재료명 또는 성분명 및 배합비율	(별첨)		
	용도·용법	(별첨)		
	보관방법 및 포장재질	(별첨)		
	포장방법 및 포장단위	(별첨)		
성상	(별첨)			
고열량·자염양 식품 해당 여부	[ ]예 [ ]아니오 [ ]해당 없음			
기타				
「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.				
2019년 10월 7일				
보고인 <b>박승용</b> (사인)				
홍천군수 귀하				
첨부서류	1. 제조방법설명서 1부 2. 식품위생법시행규칙에 따른 식품등의 표시에 관한 규격 검토서 1부 3. 식품의약품안전청장이 정하여 고시한 방법에 따라 실정된 유통기한에 설정사항서 1부			
유의 사항				
1. 품목제조보고서는 제품생산의 개시 전이나 개시 후 7일 이내에 제출하여야 합니다. 2. 배합비율 표시는 식품공전 및 식품첨가물공전에 사용기준이 정하여져 있는 원재료 또는 성분의 경우만 해당합니다.				

식품(식품첨가물) 품목제조보고서

발급번호 : 110K-006-A02-F418-0364

보고인	성명(법인명)	생년월일(법인번호)	
	이력식	1960년 05월 22일	전화번호 0336462738
		휴대전화	
영업소	명칭(상호)	영업등록번호	
	(주)발효미장	20070386464	
제품정보	식품의 유형	기타 농도리 스스	유형하는 품목코드 보고번호
	제품명	발효 곤드레 스스	20070386464503
	유통기한	제조일부더 90일	
	품질유지기한		
	원재료명 또는 성분명, 배합비율	발효미 가루	
	용도·용법	발효미 가루	
	보관방법 및 포장재질	발효미 가루	
	포장방법 및 포장단위	25kg, 30kg, 35kg, 50kg, 75kg, 1kg, 3kg, 5kg	
성상	백색상		
품목의 특성 ■ 고열량·자염양 식품 해당 여부 [ ]예 [ ]아니오 [C]해당 없음 ■ 고열량 식품 해당 여부 [ ]예 [C]아니오 ■ 유·유아를 섭취대상으로 표시 판매하는 식품 해당 여부 [ ]예 [C]아니오			
기타			
「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.			
2019년 12월 04일			
보고인 이력식			
강원도 강릉시장 귀하			
품목보고번호	20070386464-503	차인자성명	최재우
차인부서	보건소 위생과	차인일자	2019년 12월 06일

식품(식품첨가물) 품목제조보고서

발급번호 : 110K-P075-90F-9408-090

보고인	성명(법인명)	생년월일(법인번호)	
	이력식	1960년 05월 22일	전화번호 0336462738
		휴대전화	
영업소	명칭(상호)	영업등록번호	
	(주)발효미장	20070386464	
소재지 강원도 강릉시 관학단지로 24-19(대천동)			
제품정보	식품의 유형	기타 가공품	유형하는 품목코드 보고번호
	제품명	발효 곤드레 분말	20070386464504
	유통기한	24개월	
	품질유지기한		
	원재료명 또는 성분명, 배합비율	발효미 가루	
	용도·용법	발효미 가루	
	보관방법 및 포장재질	발효미 가루	
	포장방법 및 포장단위	1kg, 5kg, 10kg, 20kg	
성상	분말		
품목의 특성 ■ 고열량·자염양 식품 해당 여부 [ ]예 [ ]아니오 [C]해당 없음 ■ 고열량 식품 해당 여부 [ ]예 [C]아니오 ■ 유·유아를 섭취대상으로 표시 판매하는 식품 해당 여부 [ ]예 [C]아니오			
기타			
「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.			
2019년 12월 10일			
보고인 이력식			
강원도 강릉시장 귀하			
품목보고번호	20070386464-504	차인자성명	박재우
차인부서	보건소 위생과	차인일자	2019년 12월 12일


식품(식품첨가물) 품목제조보고서

발급번호 : 110K-1025-99F-V498-200V

보고인	성명(법인명)	생년월일(법인번호)	
	이력식	1960년 05월 22일	전화번호 0336462738
		휴대전화	
영업소	명칭(상호)	영업등록번호	
	(주)발효미장	20070386464	
소재지 강원도 강릉시 관학단지로 24-19(대천동)			
제품정보	식품의 유형	기타 농산가공품	유형하는 품목코드 보고번호
	제품명	발효 곤드레 분말	20070386464505
	유통기한	18개월	
	품질유지기한		
	원재료명 또는 성분명, 배합비율	발효미 가루	
	용도·용법	발효미 가루	
	보관방법 및 포장재질	발효미 가루	
	포장방법 및 포장단위	1, 5, 10, 20kg	
성상	분말		
품목의 특성 ■ 고열량·자염양 식품 해당 여부 [ ]예 [ ]아니오 [C]해당 없음 ■ 고열량 식품 해당 여부 [ ]예 [C]아니오 ■ 유·유아를 섭취대상으로 표시 판매하는 식품 해당 여부 [ ]예 [C]아니오			
기타			
「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.			
2019년 12월 10일			
보고인 이력식			
강원도 강릉시장 귀하			
품목보고번호	20070386464-505	차인자성명	박재우
차인부서	보건소 위생과	차인일자	2019년 12월 12일



5) 비SCI 논문 (1건 - 논문 투고 완료 현재 심사중)

투고완료	투고 논문 및 사사																																																													
<p>한국약용작물학회지 KOREAN JOURNAL OF MEDICINAL CROP SCIENCE (KJMCS) - 논</p> <div style="text-align: center;">  </div> <p>투고정보</p> <table border="1"> <tr> <td>특수지명</td> <td>한국약용작물학회지 KOREAN JOURNAL OF MEDICINAL CROP SCIENCE (KJMCS)</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">논문 제목</td> <td>논문제목</td> <td>고려말갈의 묵나물 추출물의 면역활성증진 효과</td> </tr> <tr> <td>논문제목(영문)</td> <td>Evaluation of immunity enhancement efficacy of dried <i>Cirsium setosum</i> Nakai extracts</td> </tr> <tr> <td>초록</td> <td>Background: Immune stimulation has emerged as an important strategy for improving the immune defense system in the body. In response to these demands, attention has been focused on the development of natural materials and dietary materials that can improve immune potential. <i>Cirsium setosum</i> Nakai is a perennial plant belonging to Asteraceae and grows only in Korea. <i>Cirsium setosum</i> Nakai has alternate leaves and leafy edges, and its tip is pointed. The leaf is somewhat broader, and the flower is purple in July to October. It was also used in a variety of symptoms such as inflammation, edema, hyperpermeation, etc. Recent studies have reported various physiological activities, but most of them are extracts of raw states of <i>Cirsium setosum</i> Nakai. So we evaluated the antioxidant activity and immune enhancement of the blanching then dried <i>Cirsium setosum</i> Nakai extracts, and not only the general food, but also the possibility of the use as a health functional food. Methods and Results: The DPPH radical scavenging activity of the blanching then dried extracts were more effective than hot water extracts and alcohol extracts were more effective than hot water extracts. The content of total phenolic compounds was also higher in freeze dried extracts and more than five times of <i>Cirsium setosum</i> Nakai. However, the level of NO production and</td> </tr> </table>	특수지명	한국약용작물학회지 KOREAN JOURNAL OF MEDICINAL CROP SCIENCE (KJMCS)	논문 제목	논문제목	고려말갈의 묵나물 추출물의 면역활성증진 효과	논문제목(영문)	Evaluation of immunity enhancement efficacy of dried <i>Cirsium setosum</i> Nakai extracts	초록	Background: Immune stimulation has emerged as an important strategy for improving the immune defense system in the body. In response to these demands, attention has been focused on the development of natural materials and dietary materials that can improve immune potential. <i>Cirsium setosum</i> Nakai is a perennial plant belonging to Asteraceae and grows only in Korea. <i>Cirsium setosum</i> Nakai has alternate leaves and leafy edges, and its tip is pointed. The leaf is somewhat broader, and the flower is purple in July to October. It was also used in a variety of symptoms such as inflammation, edema, hyperpermeation, etc. Recent studies have reported various physiological activities, but most of them are extracts of raw states of <i>Cirsium setosum</i> Nakai. So we evaluated the antioxidant activity and immune enhancement of the blanching then dried <i>Cirsium setosum</i> Nakai extracts, and not only the general food, but also the possibility of the use as a health functional food. Methods and Results: The DPPH radical scavenging activity of the blanching then dried extracts were more effective than hot water extracts and alcohol extracts were more effective than hot water extracts. The content of total phenolic compounds was also higher in freeze dried extracts and more than five times of <i>Cirsium setosum</i> Nakai. However, the level of NO production and	<p>고려말갈의 묵나물 추출물의 면역활성증진 효과 이정일*, 정성희, 정광희 국립암센터 종양내과내과연구소</p> <p>Evaluation of immunity enhancement efficacy of dried <i>Cirsium setosum</i> Nakai extracts after blanching Seung E. Heo*, Jung Mi Jung, Jung Bong Hyun Hogukhan Institute of Medical Herb</p> <p>ABSTRACT</p> <p>Background: Immune stimulation has emerged as an important strategy for improving the immune defense system in the body. In response to these demands, attention has been focused on the development of natural materials and dietary materials that can improve immune potential. <i>Cirsium setosum</i> Nakai is a perennial plant belonging to Asteraceae and grows only in Korea. <i>Cirsium setosum</i> Nakai has alternate leaves and leafy edges, and its tip is pointed. The leaf is somewhat broader, and the flower is purple in July to October. It was also used in a variety of symptoms such as inflammation, edema, hyperpermeation, etc. Recent studies have reported various physiological activities, but most of them are extracts of raw states of <i>Cirsium setosum</i> Nakai. So we evaluated the antioxidant activity and immune enhancement efficacy of the blanching then dried <i>Cirsium setosum</i> Nakai extracts, and not only the general food, but also the possibility of the use as a health functional food. Methods and Results: The DPPH radical scavenging activity of the blanching then dried extracts were more effective than hot water extracts and alcohol extracts were more effective than hot water extracts. The content of total phenolic</p>																																																				
특수지명	한국약용작물학회지 KOREAN JOURNAL OF MEDICINAL CROP SCIENCE (KJMCS)																																																													
논문 제목	논문제목	고려말갈의 묵나물 추출물의 면역활성증진 효과																																																												
	논문제목(영문)	Evaluation of immunity enhancement efficacy of dried <i>Cirsium setosum</i> Nakai extracts																																																												
초록	Background: Immune stimulation has emerged as an important strategy for improving the immune defense system in the body. In response to these demands, attention has been focused on the development of natural materials and dietary materials that can improve immune potential. <i>Cirsium setosum</i> Nakai is a perennial plant belonging to Asteraceae and grows only in Korea. <i>Cirsium setosum</i> Nakai has alternate leaves and leafy edges, and its tip is pointed. The leaf is somewhat broader, and the flower is purple in July to October. It was also used in a variety of symptoms such as inflammation, edema, hyperpermeation, etc. Recent studies have reported various physiological activities, but most of them are extracts of raw states of <i>Cirsium setosum</i> Nakai. So we evaluated the antioxidant activity and immune enhancement of the blanching then dried <i>Cirsium setosum</i> Nakai extracts, and not only the general food, but also the possibility of the use as a health functional food. Methods and Results: The DPPH radical scavenging activity of the blanching then dried extracts were more effective than hot water extracts and alcohol extracts were more effective than hot water extracts. The content of total phenolic compounds was also higher in freeze dried extracts and more than five times of <i>Cirsium setosum</i> Nakai. However, the level of NO production and																																																													
<table border="1"> <tr> <td>키워드</td> <td>Blanching plants, <i>Cirsium setosum</i> Nakai, health functional food, free</td> </tr> <tr> <td>논문분야</td> <td>식품 및 영양학</td> </tr> <tr> <td>한국연구재단 지원과제 여부</td> <td>비임용</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">논문제목</td> <td>영양학</td> <td>고려말갈의 묵나물 추출물의 면역활성증진 효과 (영)</td> </tr> <tr> <td>심사영역</td> <td>고려말갈의 묵나물 추출물의 면역활성증진 효과(심사영)</td> </tr> <tr> <td>공백제출 정보 (저자정보서지)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>논문승인/인용 정보 (인사내/외)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>논문승인/인용 정보 (인사내/외)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>ORCID 등록번호 (인사내/외)</td> <td>ORCID ID: http://orcid.org/0000-0001-9131-3131</td> </tr> <tr> <td>연구/비연구</td> <td>연구 심사위원</td> </tr> <tr> <td>심사위원</td> <td>비연구 심사위원</td> </tr> </table> <p>투고자</p> <table border="1"> <tr> <td>학급명</td> <td>제15기</td> </tr> <tr> <td>학번명</td> <td>Heo Seung E</td> </tr> <tr> <td>이메일주소</td> <td>h.seung@hmi.ac.kr</td> </tr> <tr> <td>휴대전화</td> <td>010-5020-5110</td> </tr> <tr> <td>전화번호</td> <td>052-430-1117</td> </tr> <tr> <td>주소기관명</td> <td>[국립암센터] 종양내과연구소</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">주소</td> <td>우편번호</td> <td>25142</td> </tr> <tr> <td>주소</td> <td>강원도 춘천시 죽령로 54 (영동동)</td> </tr> </table>	키워드	Blanching plants, <i>Cirsium setosum</i> Nakai, health functional food, free	논문분야	식품 및 영양학	한국연구재단 지원과제 여부	비임용	논문제목	영양학	고려말갈의 묵나물 추출물의 면역활성증진 효과 (영)	심사영역	고려말갈의 묵나물 추출물의 면역활성증진 효과(심사영)	공백제출 정보 (저자정보서지)		논문승인/인용 정보 (인사내/외)		논문승인/인용 정보 (인사내/외)		ORCID 등록번호 (인사내/외)	ORCID ID: http://orcid.org/0000-0001-9131-3131	연구/비연구	연구 심사위원	심사위원	비연구 심사위원	학급명	제15기	학번명	Heo Seung E	이메일주소	h.seung@hmi.ac.kr	휴대전화	010-5020-5110	전화번호	052-430-1117	주소기관명	[국립암센터] 종양내과연구소	주소	우편번호	25142	주소	강원도 춘천시 죽령로 54 (영동동)	<p>Table 4. Content of polyphenols in <i>C. setosum</i> Nakai extracts by HPLC analysis</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Sample</th> <th>Solvent</th> <th>Flavonoid (mg/g)</th> <th>Blanching then dry (mg/g)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="4"><i>C. setosum</i> Nakai</td> <td>Hot water</td> <td>18.96±0.96</td> <td>4.31±0.25</td> </tr> <tr> <td>30% EtOH</td> <td>78.70±1.57</td> <td>34.39±0.17</td> </tr> <tr> <td>50% EtOH</td> <td>81.02±0.98</td> <td>31.80±0.12</td> </tr> <tr> <td>70% EtOH</td> <td>89.60±3.07</td> <td>51.34±0.24</td> </tr> <tr> <td></td> <td>100% EtOH</td> <td>102.16±1.29</td> <td>44.13±0.39</td> </tr> </tbody> </table> <p>고려말갈의 묵나물 추출물 또는 추출물 중 묵나물의 형태로 입회되어 있다. 예를 들어 이는 자유라디칼의 소거를 통한 항산화 효능을 확인하였으나, 서양에서 흔히 사용되는 GNOX의 활성을 확인시켜 Nitric Oxide 생성을 증가시키고 NO<sub>2</sub> 및 NO<sub>3</sub>의 농도를 증가시켜 면역활성을 증진시키는 것으로 확인되었다. 이는 항산화뿐만 아니라 묵나물도 면역 활성을 증진시키는 작용이 있을 수 있으며, 개별 가능성을 확인할 수 있었다.</p> <p>참조문헌</p> <p>본 연구는 과학기술정보통신부 과제의 일환으로 수행되었습니다. (177001-02-1-H0000)의 지원에 의해 수행된 연구 결과입니다.</p> <p>REFERENCES</p> <p>Freidin M, Hunzler MV, Kessler JA. (1992). Cultural sympathetic nervous system and release the cytokine interleukin 1 beta. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i>. 89:10441-10445.</p> <p>Hibba JB Jr, Tinsley BR, Vavrin Z. (1997). Macrophage cytokine/cytokine for L-lysine dimethyl and nitro nitrogen oxidation to</p>	Sample	Solvent	Flavonoid (mg/g)	Blanching then dry (mg/g)	<i>C. setosum</i> Nakai	Hot water	18.96±0.96	4.31±0.25	30% EtOH	78.70±1.57	34.39±0.17	50% EtOH	81.02±0.98	31.80±0.12	70% EtOH	89.60±3.07	51.34±0.24		100% EtOH	102.16±1.29	44.13±0.39
키워드	Blanching plants, <i>Cirsium setosum</i> Nakai, health functional food, free																																																													
논문분야	식품 및 영양학																																																													
한국연구재단 지원과제 여부	비임용																																																													
논문제목	영양학	고려말갈의 묵나물 추출물의 면역활성증진 효과 (영)																																																												
	심사영역	고려말갈의 묵나물 추출물의 면역활성증진 효과(심사영)																																																												
공백제출 정보 (저자정보서지)																																																														
논문승인/인용 정보 (인사내/외)																																																														
논문승인/인용 정보 (인사내/외)																																																														
ORCID 등록번호 (인사내/외)	ORCID ID: http://orcid.org/0000-0001-9131-3131																																																													
연구/비연구	연구 심사위원																																																													
심사위원	비연구 심사위원																																																													
학급명	제15기																																																													
학번명	Heo Seung E																																																													
이메일주소	h.seung@hmi.ac.kr																																																													
휴대전화	010-5020-5110																																																													
전화번호	052-430-1117																																																													
주소기관명	[국립암센터] 종양내과연구소																																																													
주소	우편번호	25142																																																												
	주소	강원도 춘천시 죽령로 54 (영동동)																																																												
Sample	Solvent	Flavonoid (mg/g)	Blanching then dry (mg/g)																																																											
<i>C. setosum</i> Nakai	Hot water	18.96±0.96	4.31±0.25																																																											
	30% EtOH	78.70±1.57	34.39±0.17																																																											
	50% EtOH	81.02±0.98	31.80±0.12																																																											
	70% EtOH	89.60±3.07	51.34±0.24																																																											
	100% EtOH	102.16±1.29	44.13±0.39																																																											



### 3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책

- 1) 2차년도 비 SCI 논문 1편을 게재 하게 되어 있었으며, 현재 투고는 완료 하였으나 심사가 늦어지고 있는 상태여서 정량 목표 실적에서는 제외 하였음. 심사가 완료되는 시점으로 관련 증빙 자료를 제출할 예정임.

## 4. 연구결과의 활용 계획

### 1. 연구개발 결과의 활용 방안

- 국내의 경우 현재 본사와 거래하고 있는 (주)오뚜기를 통하여 기존 판매 라인을 활용할 예정으로 현재 제품이 판매되고 있는 편의점 및 대형마트를 기점으로 병원내 판매점을 활용할 예정임.
- CP 그룹과 연계하여 태국 및 중국에 제품을 수출할 예정이며 본사 해외 마케팅 팀을 이용하여 태국 및 중국내 HMR 시장현황을 파악하고, 직접 해외 출장하여 한인 마켓 및 현지인의 한식 HMR 제품(K-BOB) 소비 실태 및 소비자 기호도를 조사할 예정임.
- 1단계 Market Access Strategy로 한인 마트, 2단계 편의점, 3단계 대형 마트 진입을 시도할 예정임.
- 홍보물 제작
  - 제품 인지도제고 및 소비자와의 원활한 의사소통을 위하여 즉석 편의식에 대한 자세한 소개와 효능을 보여줄 수 있는 포스터 및 브로셔 제작
- 관련 논문 및 특서
  - 본 개발 제품의 기능성 및 물리적 이화학적 특성 분석을 진행하고 관련 결과를 토대로 논문(한국식품영양과학회) 발표 내용을 공개하여 제품에 대한 신뢰를 구축
  - 또한 관련 특허를 국내·외에 출원하여 본사 고유의 지적 물적 재산을 확보
- CRM 전략 강화 및 고객 DB를 활용한 고객 맞춤형 마케팅 수행
- 새로운 제품을 통한 시장으로부터 수익성을 올리기 위한 Marketing 다각화를 실시 (다각화 효과를 증대하기 위한 국가별, 제품별 맞춤형 1:1 컨설팅, 온라인 네트워크 구축 등)하여 제품홍보.
- 기존 제품대비 향상된 성능에 대하여 국내외 특허출원 사실에 대한 홍보계획을 수립할 예정이며, 이와 함께 시스템 구축 관련 전문잡지, 신문 등과 같은 인쇄 및 인터넷 매체를 통해서도 제품을 홍보할 예정이다. 이에 더하여 고령 친화형 관련 시장의 전시회 및 컨퍼런스 등에도 적극적으로 참여하여 본 개발 기술 및 과학적 근거를 어필할 예정임.

## 2. 기대성과 및 파급효과

### ○ 기술적 측면

- 기존의 특허는 소화 장애인을 위한 핵산 등 몇 가지 식품 조성물의 개발 또는 연하보조제 중기도 흡입 방지 및 목 넘김의 용이성을 부여하기 위한 보조제 개발 분야에 특정 소재를 첨가하는 것에 치중되어 있음.
- 항노화 산업의 경우 건강기능성 식품, 기능성화장품, 의료기기 등의 다양한 분야에서 성장하였으나 정작 일반 식품에 기능성을 부여하여 간편하고 손쉽게 섭취할 수 있는 제품에 대한 연구는 매우 미흡한 실정임.
- 이에 본 연구 과제에서 개발된 제품은 실질적으로 파악된 현상 분석 결과에 대한 해결 수단으로서 특히 소화성이 용이하고 소화 능력 및 면역력 활성화에 도움을 줄 수 있는 새로운 식품 핵심소재, 섭취 기능이 저하된 계층을 대상으로 새로운 곡물 베이스로 한 편의식으로 새로운 시장 개척이 가능할 것으로 기대됨.
- 기존 논문은 고령 계층들을 대상으로 한 식이 섭취 및 영양 불균형의 문제를 파악하고 이를 개선시키기 위한 조사 설계 및 분석 분야에 치중되어 있다. 본 연구 과제에서는 고령화 사회에 가장 큰 문제점인 소화율을 개선시키고 고령화 계층 특징인 씹는 기능 저하에 적합한 부드러운 물성을 지닌 형태로 제품을 개발하고 면역력 및 항산화를 부여하여 건강 상태별 단계의 시작품을 개발하고 각각의 평가기술을 확립할 예정임.

### ○ 경제적 · 산업적 측면

- 국내 및 국외시장 분석 결과 일본에서는 이미 2000년대 이후에 보호를 받아야 하는 노인층 및 특별한 환자를 대상으로 한 식품군 관련 제도를 정비하고, 국가 지원, 식품업계의 시장분석 및 시장 창출 노력에 힘입어 '개호식품'이란 용어로 단계별 규격화된 기술 및 제품을 개발하여 이미 150억엔 이상의 상용화 시장을 형성하고 있음.
- 국내의 경우 기존에 일부 병원 및 '죽' 프랜차이즈 등이 있으나 '죽' 제품에 대한 소화율 개선, 면역강화 등에 대한 연구결과가 없으며 특히 한국 전통 편의식에 대한 연구 또한 매우 미흡한 상태임. 본 연구팀은 백미를 베이스로 한 편의식에 대한 연구를 통하여 생산을 하고 있으나 실질적 기능성 연구에 대한 연구는 아직 미흡한 상태임.
- 따라서 본 연구과제를 통하여 종합적으로 고령화 사회를 대비한 식품 가공 기술 중 한국의 전통 편의식을 통하여 소화 기능 개선, 면역강화 및 항산화에 도움을 줄 수 있는 제품 및 가공기술을 개발하여 고령화 사회 대비 새로운 부가가치를 확보할 계획임.

### 3. 사업성과 및 매출 실적

#### 1) 사업화 계획

		( 2020 년 ) 개발 종료 후 1년	( 2021 년 ) 개발 종료 후 2년	( 2022 년 ) 개발 종료 후 3년
내	시장점유율(%)	5	10	20
	판매량(단위: box )	10,000	20,000	50,000
	판매단가(원)	20,000	20,000	20,000
	국내매출액(백만원)	200	400	1,000

#### 2) 사업화 전략

##### 가. 세준에프앤비

구분	구체적인 내용
형태/규모	<ul style="list-style-type: none"> <li>o 상용화 형태 : 소화 및 면역력 개선에 도움이 되는 곡물 제품</li> <li>o 수요처 : (주) 오뚜기</li> <li>o 예상 단가 : 20,000 / box</li> <li>o 개발 투입인력 및 기간 : 24개월 / 4명</li> </ul>
상용화 능력 및 자원보유	<ul style="list-style-type: none"> <li>o 현재 쌀을 이용한 누룽지 및 떡류를 생산하고 있는 업체로서 국내 최대 생산이 가능한 누룽지 설비와 끓는 물만으로도 4분 이내 즉석 호화가 되는 기술을 보유하고 있음. 또한 보존료 없이 상온 유통기한 1년이 가능한 떡 제조 기술을 확보하고 있는 상태임.</li> <li>o HACCP, ISO 22000, FSSC 22000전통식품 인증을 통하여 품질 안정성을 확보하고 있음.</li> <li>o 기업부설연구소를 설립 후 현재 연구소장을 비롯한 2명의 연구원으로 하여 곡류 가공, in vitro내 효능 검증, 물성 및 이화학적 검증을 진행 할 수 있는 전문 인력을 보유하고 있음</li> </ul>
상용화 계획 및 일정	<ul style="list-style-type: none"> <li>o 과제 종료 후 현재 본사가 납품을 하고 있는 (주) 오뚜기를 통하여 대형 마트, 편의점 등에 납품을 진행할 예정임</li> <li>o 또한 현재 준비하고 있는 수출 라인을 통하여 미국의 한인마트 등을 대상으로 수출을 진행할 예정임.</li> <li>o 타겟 고객층 포지셔닝               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 국민 소득 수준의 증가와 함께 최근 건강증진에 효능이 있는 웰빙 제품에 대한 선호도가 높아지고 있는 추세에 있으므로 소화억제 및 향상, 면역력 강화, 항산화 등 기능성을 포함한 간편 Gluten-free 즉석 라이스 푸드 제품임을 강조하고 이들 제품의 우수성을 효과적으로 홍보할 경우 실버족들을 겨냥한 우수한 소비 시장을 형성할 것으로 판단됨.</li> <li>- 코어타겟 : 60~90세 남녀(브랜드 구축 그룹)</li> <li>- 서브타겟 : 30~40세 여성(아침식사 대용, 아이용 간식 구매자)</li> </ul> </li> </ul>

나. 웰빙 엘에스

구분	구체적인 내용
형태/규모	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 상용화 형태 : 면역기능 증가 발효소재 분말, 노인식 전용 액체소스, 시즈닝 분말</li> <li>○ 수요처 : (주)세준에프앤비</li> <li>○ 예상 단가 : 20,000~30,000원/kg</li> <li>○ 개발 투입인력 및 기간 : 24개월 / 4명</li> </ul>
상용화 능력 및 자원보유	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 당사는 발효를 전문으로 하는 기업으로써 이미 노인 편의식과 관련된 발효 소재 및 접종 균주에 대한 상용화 능력을 보유하고 있음. 노인편의식 소재 발효전문 설비로는 NK 증자기, 향온 향습 발효시설 및 건조기를 보유하고 있으며 곡류 및 산야초를 발효 할 수 있는 전문생산인력을 보유하고 있음.</li> </ul>
상용화 계획 및 일정	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 과제 종료 후 (주)세준에프앤비와의 연계를 통한 상용화를 실시할 예정임. 본 과제를 통하여 개발된 면역기능 증가 발효소재 분말을 원물 형태로 (주)세준에프앤비에 공급함, 공급된 발효소재는 세준에프앤비에서 편의식에 이용할 예정임. 이와 별개로 과제성과인 점성이 있는 액체소스 또는 시즈닝 분말을 생산하여 (주)세준에프앤비에 공급함.</li> <li>○ 개발된 발효 소재 및 소스를 기반으로 노인 편의식 뿐만 아니라 다양한 실버타운 및 노인 전문병원에 납품할 수 있음.</li> </ul>

## <뒷면지>

### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치 식품 기술개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치 식품 기술개발 사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.