

118034

-2

농식품기술개발사업 제2차 연도 최종 보고서

발간 등록번호

11-1543000-003161-01

젖산균을
이용한
식용곤충
발효소스
제조 및
제품개발

젖산균을 이용한 식용곤충 발효소스 제조 및 제품 개발 최종보고서

최
종
보
고
서

2020. 07. 03.

2020

주관연구기관 / 농업회사법인(주)동의보궁
협동연구기관 / 환동해산업연구원

농
림
축
산
식
품
부
농
림
식
품
기
술
기
획
평
가
원

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

'젓산균을 이용한 식용곤충 발효소스 제조 및 제품개발'(연구개발 기간 : 2018. 04. 26.
~ 2019. 12. 31.) 과제의 최종보고서 9부를 제출합니다.

2020 . 07 . 03

주관연구기관명: 농업회사법인(주)동의보급 (대표자) 신 명 화 (인)
협동연구기관명: 환동해산업연구원 (대표자) 김 태 영 (인)



주관연구기관책임자: 농업회사법인(주)동의보급 박 정 철
협동연구기관책임자: 환동해산업연구원 홍 선 미

농림수산식품부훈령 제27조에 따라 최종보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	118034-2	해 당 단 계 연 구 기 간	2018.04.26. ~ 2019.12.31	단 계 구 분	2년/2년
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발(현장으로)			
연구과제명	대 과 제 명	젓산균을 이용한 식용곤충 발효소스 제조 및 제품 개발			
	세부 과제명	식용곤충 발효소스 시스템 구축 및 시제품			
연구책임자	박 정 철	해당단계 참여연구원 수	총: 9 명 내부: 2 명 외부: 7 명	해당단계 연구개발비	정부: 100,000천원 민간: 25,000천원 계: 125,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 17 명 내부: 4 명 외부: 13 명	총 연구개발비	정부: 175,000천원 민간: 45,000천원 계: 220,000천원
연구기관명 및 소속부서명	세부	농업회사법인(주)동의보급		참여기업명 농업회사법인(주)동의보급	
	협동	환동해산업연구원			
국제공동연구	상대국명: 해당사항없음			상대국 연구기관명: 해당사항없음	
위탁연구	연구기관명: 해당사항없음			연구책임자: 해당사항없음	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

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

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허 (출원/등록)	보고 서 원문	연구시 설·장 비	기술 요약 정보	소프 트 웨어	화합 물	생명자원		신품종	
								생 명 정 보	생물자원	정 보	실 물
등록· 기탁 번호	<ul style="list-style-type: none"> • BBE (2019) 24 745-753 • 3Biotech (2018) 9(30) 1-8 	<ul style="list-style-type: none"> • 10-1919770-0000 (등록) • 40-1376141-0000 (상표등록) • 10-2018-0153921 (출원) • 40-2018-0178750 (상표출원) • 40-2018-0178751 (상표출원) • 40-2018-0178749 (상표출원) • 10-2019-0054488 (출원) • 10-2019-0066242 (출원) • 10-2019-0121784 (출원) • 10-2019-0157749 (출원) • 10-2019-0126813 (출원) • 40-1546086-0000 (상표등록) • 40-1546087-0000 (상표등록) 						<ul style="list-style-type: none"> • KCCM12299P • KCCM12300P • KCCM12301P • KCCM12473P • KCCM12472P 			

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)
 본 연구 사업에서는 식용곤충인 흰점박이꽃무지 유충에 염장법을 적용하여 식용곤충의 영양분확보가 가능하고 또한 그 숙성기간 단축과 유해미생물 억제하는 동시에 유용물질을 생산 가능하도록 선별 된 젖산균을 사용하였다. 염장 소금으로 천일염과 정제염을 대상으로 25-45% 농도로 염장 할 경우 유해 미생물의 함량이 줄고, 흰점박이꽃무지 유충의 글루탐산을 이용하여 GABA함량 증가, 항산화 효능이 높아지고, 중성지방을 줄여 항비만 효과가 확인되었다. 식용곤충의 그 결과 영양성분을 유지 하되 식품으로서의 거부감과 문제가 되었던 증금속 저감되고, 더불어 특유의 이취제거, 향과 맛은 증폭한 발효소스를 생산했다. 1, 2, 및 3차 시제품에 대한 색소, 타르(3, 6, 9개월) 안정성분석을 확인하였다. 연구수행은 주관, 협동기관이 체계적, 성실히 이루어졌으며, 국내기반 식용곤충정책에 따라 잘 진행 된 것으로 판단된다.

보고서 면수

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 기존의 건조품, 식품첨가제, 착즙 액상 외의 식용곤충발효식품 개발 • 젖산균 적용 흰점박이꽃무지 발효소스 단기 숙성 생산기술을 확보 • 기능성 액상조미료의 상품화 기술 확립 • 흰점박이꽃무지 이취저감 된 시제품을 개발 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 발효소스 생산시스템 구축 <ul style="list-style-type: none"> - 흰점박이꽃무지 세척, 전처리 공정법 완료(염처리 및 가열) - 염장에 따른 온도, 습도 등 환경조건 - 유통 및 저장방법(적정 향아리 사용) 확립 • 젖산균 활용 조건 확립, 성분분석 및 효능분석 <ul style="list-style-type: none"> - 발효 촉진 균주 3종 분리확보 및 균주 기탁(한국미생물균주센터) - 최적의 반응발효 조건(3-5개월), 염장 염도 25-40% 조건 확립 - 유해미생물(없음), 유효미생물 발육기간, 중금속(안전) 조사 완료 - 일반성분(조단백,조지방 등), 유리아미노산, 가바성분 등 분석완료 - 산도, pH, 가수분해율 분석 완료 - 향산화효능, 중성지방 감소 효능(비만방지) 등 시판제품 비교분석 • 적정발효조건 확립, 안전성 평가 및 대량생산 <ul style="list-style-type: none"> - 유해미생물 살균, 저장 및 색소, 타르 등 안전성 분석 완료 - 3T3L1 세포, Raw세포 등의 안전성 분석 완료 - 기성 액젓과의 비교분석 완료 - 상품특허3건출원, 기술특허3건출원, 상품등록 3건, 기술특허등록1건 • 발효소스 시제품 생산 및 시제품 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 동의보급장 디자인 완료, 품목허가 - 동의보급장 시제품 제작 완료 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 식용곤충의 1차가공 식품에서 새로운 패러다임의 발효기술 적용 • 젖산균발효 리액터에 의한 효능, 기능성 신물질, 소재 제시 기대 • 특허출원, 등록 및 기술이전 등을 통한 국내외 시장 가능 • 액상 이외의 건조조미료 등 유용소재개발을 통한 산업화 다양화 • 기타 식용곤충에 적용하여 곤충농가 및 기업의 활성화 • 지역 혹은 국내 곤충 산업의 활성화 및 수출 경쟁력 확보 기대 • 식용곤충 장류산업 지원을 통한 지역 곤충산업 육성 및 활성화 기대 • 한국곤충산업협회와 농업협동조합과 협력하여 지속적 생산라인 마련 • 식용곤충 발효소스 2차 가공식품으로 고부가가치화 기대 • 국내,외 판매를 통한 기업 매출 증진. • 현재 곤충산업예상 시장 700억원 중 10억원 시장 목표 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>흰점박이꽃무지 유충</p>	<p>간장</p>	<p>발효</p>	<p>젖산균</p>	<p>단기숙성</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>edible insect</p>	<p>liquid seasoning</p>	<p>fermentation</p>	<p>lactic acid bacteria</p>	<p>short ripen</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

제 1 장 연구개발과제의 개요	01
제 1 절 연구개발 목적	01
제 2 절 연구개발의 필요성	01
제 3 절 연구개발 범위	04
제 2 장 연구수행 내용 및 결과	05
제 1 절 연구추진 전략	05
제 2 절 연구수행 방법	07
제 3 절 연구수행 내용 및 결과	18
제 4 절 연구개발 성과	50
제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	56
제 4 장 연구결과의 활용 계획 등	57
제 1 절 활용계획	57
제 2 절 기대효과	58
붙임. 참고 문헌	61

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발 목적

고영양, 기능성 식품개발 소재인 꽃벥이(흰점박이꽃무지 유충)는 기능성 식품으로 우수성이 인정되어 산업적 제품의 다양성이 요구되어, 본 제안은 기존의 건조품, 식품첨가제, 착즙 액상 외의 식용곤충발효식품 개발과 장기 발효에 대한 문제를 해결하기 위해 젖산균 적용 흰점박이꽃무지 발효소스 단기 숙성 생산기술을 확보하고 그 기능성 액상천연조미료(edible insect's fermented sauce)의 상품화 기술 확립과 시제품을 개발한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 중요성

1) 식용곤충 산업적 개발의 중요성 및 필요성

- 곤충산업 육성을 위해 정부의 곤충자원 식·약용 소재화, 상품화, 연구지원 및 개발 활발
- 그러나, 이취, 형태혐오, 서식지 불쾌감 등의 문제로 시제품, 상품화 후의 인지도 낮음
- 식용곤충의 낮은 인지도로 신가공기술과 상품 개발이 필수적
- 단순가공이 아닌 다양화, 고급화, 및 편의성 등의 소비자 니즈(needs) 충족 필요
- 국내에 식용곤충 7종은 건조품, 식품첨가제(분말), 한약재혼합 된 착즙 등의 단순 형태임
- 식용곤충 중 흰점박이꽃무지유충(꽃벥이)과 갈색거저리유충(고소애)은 각 58%, 53% 고단백질식품으로 주목되어 식품개발 활발하나 시장 형성 어려움
- 향당뇨, 항암, 항비만 등의 다양한 생리활성 물질을 포함한 기능성 식품으로 개발 필요
- 국내에서는 곤충까페인 이더블버그(쿠키, 빵 등), 레스토랑 빠빠용키친(파스타, 샐러드 등), 한국식용곤충연구소 케일의 곤충분말을 이용한 제면, 반죽 등의 개발 활발
- 기존의 식품첨가제, 건조 상품과 차별화 된 독창적 기술 및 상품 개발 필요

2) 기능성 발효 식품 개발의 필요성

- 고단백질원인 식용곤충을 발효 숙성한 식품의 새로운 패러다임 제시 필요
- 미생물을 이용한 발효기술 활용 단기 숙성 및 물질의 크기를 작게하여 흡수력 강화
- 발효 기술은 기존 소재가 가지고 있는 기능을 새로운 효능으로 변환 가능
- 또한 유해 성분(중금속 등) 제거 또는 안전한 성분으로 전환 가능
- 젖산균은 유익한 미생물(effective microorganisms, EM)로 유효균으로 활용가치 높음
- 젖산균은 김치, 된장, 간장, 치즈 등 다양한 발효식품 개발 가치 높음
- 항산화, 유기물 저분자, 부패방지 등의 유효물질 생산하여 적용 기술 필요
- 영양, 건강을 고려한 발효식품에 대한 소비자 관심 증가
- 발효식품인 젓갈, 액젓은 단백질 이외의 당질, 지질, 유기산과 기타 성분들이 분해되고 조화되어 진한 감칠맛을 보여 식용곤충의 문제 해결 가능
- 발효 제품은 소화흡수, 영양적으로 우수한 식품 임
- 당화현상을 통한 물질기능 강화, 미생물 유래의 비타민, 유기산 등의 영양성공 공급 가능

2. 국내 기술, 시장 현황

1) 식용곤충 상품화 기술(장류 및 발효제품 중심)

- (국내) 흰점박이꽃무지 유충분말 함유하는 된장의 특허(농업법인 이루다, 2016년)
- (국내) 흰점박이꽃무지 유충분말 함유하는 된장 상품화(캐슬된장, 2016년)
- (국내) 곤충분말, 꿀과 식물발효분말을 포함하는 치즈 특허 등록(씨엔케이푸드, 2017년)
- (국내) 곤충분말, 꿀과 식물발효분말을 포함하는 치즈 시제품(농촌진흥청, 2017년)
- (국외) 일본의 와카야마(和歌山) 현은 ‘이나고소스 프로젝트’ (메뚜기간장)라는 이름으로 지역농민에 의해 곤충발효조미료 개발(2014년 계속)
- (국외) 이후 10종의 곤충발효조미료 개발 진행 중(풀무치, 누에번데기, 누에유충, 슈퍼밀웬, 메뚜기 등, 2015년)
- (국외) 일본은 실크간장 제조하여 발매하나 고가로 산업화 어려움(2017년)

꽃뽕이 된장	고소애 큐브 치즈	이나고소스(메뚜기장)	실크소스(실크간장)
			

2) 국내의 시장현황

- (국내)젓갈류 식품의 시장규모는 공식자료는 업으나 5,000억원 전후 수준
- (국내)액젓 시장의 규모는 1,000억원으로 하선정(현CJ), 대상, 해찬들사가 40% 공급함
- (국내)하선정사 브랜드 액젓의 50% 점유로 매출 약 200억원, 대상 30%로 100억원, 해찬들 10-15%로 40억원 임
- (국외)세계곤충시장 2020년 38조원 추정되며 미국의 경우 20여개 회사 스타트업
- (국외)미국은 에너지바, 쿠키, 과자 등의 가공식품으로 연평균 성장률 200%
- (국외)벨기에와 영국은 곤충 10종 상용화하여 레스토랑 및 셀프리지 백화점에 런칭
- (국외)일본은 밥에 넣을 ‘붕자반’ 과 식용곤충 간장 시제품 생산

곤충산업 시장 규모 추이	국내곤충시장	국외곤충시장																																																					
<p>곤충산업 시장 규모 추이</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">활용분야</th> <th rowspan="2">대상곤충</th> <th colspan="2">시장규모(억원)</th> </tr> <tr> <th>2009년</th> <th>2016년(추정)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>화분매개</td> <td>뒤영벌 가위벌 꿀벌</td> <td>540</td> <td>880</td> </tr> <tr> <td>천적</td> <td>무당벌레 진딧물파리 등</td> <td>230</td> <td>300</td> </tr> <tr> <td>학습-애완용</td> <td>장수풍잉이 사슴벌레 등</td> <td>400</td> <td>540</td> </tr> <tr> <td>이벤트(행사)</td> <td>나비류 반딧불이 등</td> <td>400</td> <td>560</td> </tr> <tr> <td>식·약용 및 사료용</td> <td>동애등에 거미 등</td> <td>-</td> <td>700</td> </tr> <tr> <td>합계</td> <td></td> <td>1570</td> <td>2980</td> </tr> </tbody> </table> <p>(자료:농림축산식품부)</p>	활용분야	대상곤충	시장규모(억원)		2009년	2016년(추정)	화분매개	뒤영벌 가위벌 꿀벌	540	880	천적	무당벌레 진딧물파리 등	230	300	학습-애완용	장수풍잉이 사슴벌레 등	400	540	이벤트(행사)	나비류 반딧불이 등	400	560	식·약용 및 사료용	동애등에 거미 등	-	700	합계		1570	2980	<p>국내곤충시장</p>  <p>2016년 558.2억 원</p> <p>2015년 319.3억 원</p>	<p>국외곤충시장</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">구분</th> <th colspan="2">시장 규모(억 원)</th> </tr> <tr> <th>2007</th> <th>2020</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>천적 곤충</td> <td>9900</td> <td>15조7300</td> </tr> <tr> <td>화분 매개 곤충</td> <td>1조2100</td> <td>3조3000</td> </tr> <tr> <td>애완 곤충</td> <td>4조4000</td> <td>4조4000</td> </tr> <tr> <td>축제 행사용 곤충</td> <td>4조5100</td> <td>4조5100</td> </tr> <tr> <td>기타</td> <td>-</td> <td>9조9000</td> </tr> <tr> <td>합 계</td> <td>11조1000</td> <td>37조8400</td> </tr> </tbody> </table> <p>자료: 할링 세계나비연구소</p>	구분	시장 규모(억 원)		2007	2020	천적 곤충	9900	15조7300	화분 매개 곤충	1조2100	3조3000	애완 곤충	4조4000	4조4000	축제 행사용 곤충	4조5100	4조5100	기타	-	9조9000	합 계	11조1000	37조8400
활용분야			대상곤충	시장규모(억원)																																																			
	2009년	2016년(추정)																																																					
화분매개	뒤영벌 가위벌 꿀벌	540	880																																																				
천적	무당벌레 진딧물파리 등	230	300																																																				
학습-애완용	장수풍잉이 사슴벌레 등	400	540																																																				
이벤트(행사)	나비류 반딧불이 등	400	560																																																				
식·약용 및 사료용	동애등에 거미 등	-	700																																																				
합계		1570	2980																																																				
구분	시장 규모(억 원)																																																						
	2007	2020																																																					
천적 곤충	9900	15조7300																																																					
화분 매개 곤충	1조2100	3조3000																																																					
애완 곤충	4조4000	4조4000																																																					
축제 행사용 곤충	4조5100	4조5100																																																					
기타	-	9조9000																																																					
합 계	11조1000	37조8400																																																					

3) 기술개발의 독창성, 차별성 및 혁신성

(1) 기술개발의 독창성 및 혁신성

- 3P 분석의 결과(2010 -2017년) 꽃벙이 관련 추출물에 대한 논문(Paper), 특허(Patent), 상품(Product) 본 제안의 식용곤충 발효 소스에 대한 예는 없음
- 국외(일본)의 곤충발효소스 10종 중 꽃벙이에 대한 예는 없음
- 효소 또는 자가소화가 아닌 효소생산, 유효기능성 물질 생산 젖산균 이용 기술개발

(2) 기술개발의 차별성

- 발효기간 단축을 위한 단백질 분해효소 생산 균주를 이용하여 초단기 속성 발효기술
- 국내의 꽃벙이 된장은 기존 된장 공정에 꽃벙이가루 20-25%첨가에 의한 단순생산으로 본 과제의 발효 소스와는 차별화 됨
- 국외(일본)의 곤충발효소스는 자연발효숙성법으로 본 과제의 젖산균 활용과 차별화

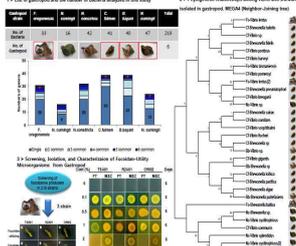
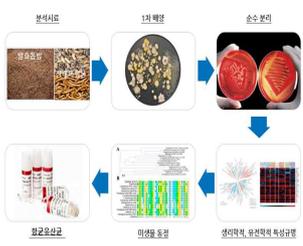
4) 선행연구 내용 및 결과

(1) 농업회사법인(주)동의보급(구, 영천곤충산업)

- (영천곤충산업) 꽃벙이 분말가루, 환, 착즙액(한약재) 등 식품 생산 노하우 보유
- (영천곤충산업) HACCP 시설을 활용하여 연중유통, 가공 가능
- (영천곤충산업)화장품 또는 기능성 음료 생산을 위한 자체기술개발을 시도
- (영천곤충산업)대구카톨릭의대와의 공동연구로 꽃벙이 한방진액 제품 개발
- (영천곤충산업)미생물을 이용한 곤충 분변 분해기술 개발
- (영천곤충산업)꽃무지 일회용사육 키트와 유충사육장치 및 배지조성물 특허 3건 보유
- (영천곤충산업)2016년 중소기업청장상 수상, 2017년 한국소비자연대 브랜드 대상 수상

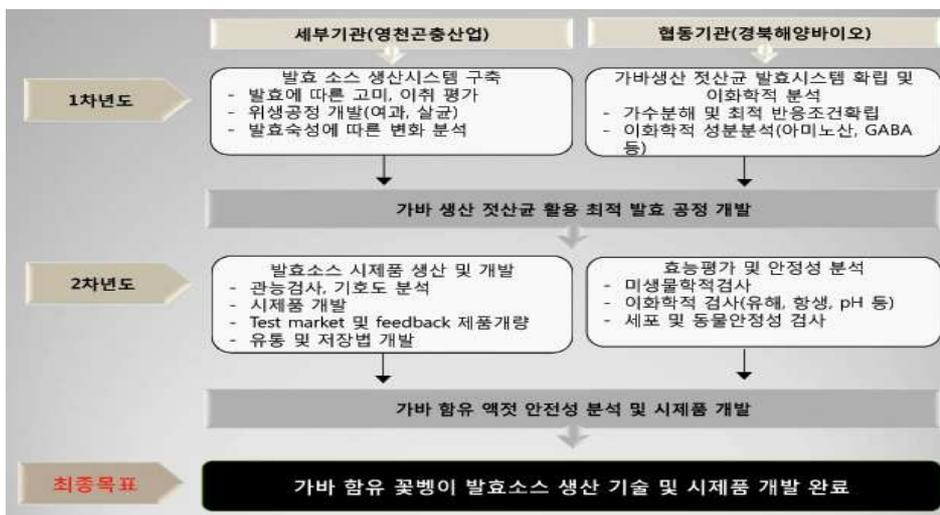
(2) 환동해산업연구원(구, 경북해양바이오산업연구원)

- (GIMB) 곤충 활용 농림축산식품부, 해양수산부, 중소벤처기업부 등의 다수의 과제 수행
- (GIMB) 해양육상생물로부터 분리 된 다수의 젖산균 보유 및 이를 활용한 기술 개발
- (GIMB) 육상, 해양생물의 유용물질 활용 식품, 화장품 등의 다수 제품 개발 및 생산
- (GIMB) HPLC, FPLC, 등을 활용한 일반성분분석, 기능성물질 분석, 중금속 분석 기관
- (GIMB) 대량 발효조, 동결건조기, 원심분리기, 진탕배양기, 인큐베이터 등 보유

꽃벙이 환(동의보급)	HACCP 시설 보유	기능성 젖산균 보유	기능분석 및 효능평가
			

제 3 절 연구개발 범위

구 분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구 범위	담당	성 과
1차년도 (2018년)	최적 발효 및 생산 공정 개발	발효소스 생산시스템 구축	<ul style="list-style-type: none"> 분해 촉진 가능 젖산균 적용 및 최적 반응 조건 설정 부재료 첨가 유무에 따른 효과 규명(고미, 이취제거 등) 미생물 안전성 확보를 위한 위생공정 개발(여과, 살균 등) 유통 및 저장방법 개발 	주관 (영천곤 충산업)	
		젖산균 활용 조건 확립 및 성분분석	<ul style="list-style-type: none"> 젖산균 특성 활용 단기속성조건 확립 : 가수분해 촉진 균주 및 조건 확립 최적의 반응조건 설정 이화학적 성분분석 : 일반성분, 아미노산 등 분석 산도, pH, 가수분해율 등 조사 	협동 (GIMB)	
2차년도 (2019년)	발효소스 안정성 분석 및 시제품 개발	발효소스 시제품 생산 및 시제품 개발	<ul style="list-style-type: none"> 시제품 개발 : 용기, 디자인, 상품 적합 평가 경제성 및 소비자 기호도 분석 Test market 및 feedback 제품 개량 유통 및 저장방법 개발 	주관 (영천곤 충산업)	<ul style="list-style-type: none"> 특허출원 1건 이상 시제품 1건 이상 학회발표 2건 이상 논문 1건 이상
		적정 발효 조건 확립 및 안정성평가	<ul style="list-style-type: none"> 안정성 분석 및 평가 : 일반독성 또는 유전 독성 분석 미생물, 대장균, 생균수 등 검사 중금속, 유해물 검사 	협동 (GIMB)	



제 2장 연구수행 내용 및 결과

제 1 절 연구 추진 전략

1. 연구 추진 방법

1) 참여기관

• 본 연구를 위해 젖산균 및 다양한 생물 유래의 젖산균 분리, 식용곤충 식품, 사료연구 및 곤충 발현 시스템을 이용한 재조합 단백질 생산에 대한 전문 기술을 보유한 환동해산업연구원(구,경북해양바이오산업연구원) 홍선미 박사팀, 식용곤충의 곤충성분을 이용한 혼합 엑기스, 다양한 건조 분말 제품 개발과 식용곤충 먹이 관련 실험 구현 가능하며 식용 곤충 산업화, 기업화를 추진하는 농업회사법인 동의보급(구, 영천곤충산업)의 박정철 이사와 팀을 구성하여 진행하였다.

2) 협업 방법

• 과제의 성공을 위한 참여기관 간의 협업적, 조직적 관리를 위해 정기적인 오프라인 미팅과 워크숍을 가지면서 협업으로 진행하였다.

3) 요구사항 수립

• 곤충사육농가, 흰점박이꽃무지 사육농가 그리고 농진청 등 전문가를 구성하여 요구사항을 청취하며 요구 사항을 수립 할 예정 이는 곤충 종자 관련 전문기관인 경상북도 농업기술센터와 타 농가와의 협업 가능.

• 곤충산업협회 및 관련 정부기관등 기자재 국산화에 대한 시장성 및 운영가능성 협의를 검토 등에 대해 제안하였다.

4) 참여기관 추진 · 방법

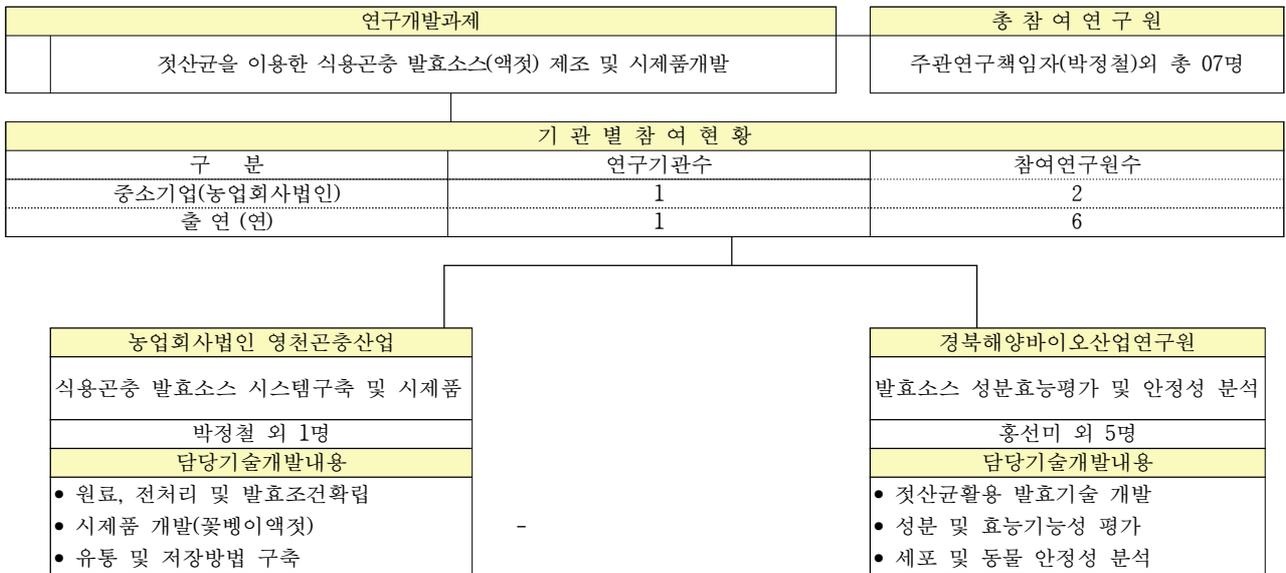
(1) 식용곤충 발효소스 시스템 구축 및 시제품(동의보급)

- 식용곤충(흰점박이꽃무지) 등을 사육하여 열풍, 동결 건조 등을 실행
- 영양성분의 추출을 위한 수세, 건조, 편치 등의 방법으로 전처리 과정 수행
- 이취와 변질 원인 또는 그 해결 방법 제시를 위해 협동기관과 공동 연구 추진
- 다양한 천연 먹이를 이용해 색, 향, 맛의 변화 식품제품으로 가능성 제시

(2) 발효소스 성분효능평가 및 안정성 분석(환동해산업연구원)

- 식용곤충의 장내 미생물에서 분리한 젖산균 중 항균 물질을 분비하는 균만을 스크리닝 하여 최적의 발효조건을 규명하여 재유도에 의해 식용곤충 분말의 유해 미생물의 생성을 억제하여 이취 및 변질을 저감 기술 개발
- 젖산균 자체가 가지는 박테리오신 또는 니신과 같은 항균물질을 최대 생산 가능한 배양 조건을 확보, 확대 적용 가능성 제시
- 염장농도, 소금종류, 젖산균접종 시기 등에 대한 숙성 및 유효기능에 따른 공정법 확립
- 식용곤충 발효소스의 안정성 및 안전성 분석(미생물, 성분, 타르색소, 세포안정성 등)

2. 연구 추진 체계



3. 연구 추진 일정

		1차년도(2018년)												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	발효소스생산시스템 구축														55,000	박정철 (영천곤충)
2	첫산균활용 및 성분분석														70,000	홍선미 (GIMB)
		2차년도(2019년)												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	발효소스 단기 숙성 및 시제품 생산														62,500	박정철 (영천곤충)
2	적정발효조건 확립 및 안정성 평가														62,500	홍선미 (GIMB)

제 2 절 연구 수행 방법

1. 실험재료

흰점박이꽃무지는 동의보감 및 경북지역의 농가에서 자체 계대사육중인 개체를 대상으로 하였으며, 각 1,000마리씩 플라스틱 사육상자(40*30*30cm)에 밀기울 또는 발효톱밥을 50% 정도 채워 사육하였다. 각 유충단계를 산란기준으로 동일화하였으며, 사육 중 번데기가 만들어 지게 되면 다른 사육상자로 옮겼다. 흰점박이꽃무지는 발효톱밥 수분량 유지를 위해 4일 간격으로 스프레이방식으로 사육상자당 20ml씩 공급하였고, 사육온도는 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 $35 \pm 2\%$, 광주기는 L : D = 16 : 8의 실내조건에서 사육하였다. 염장 또는 분말로 사용하기 위한 흰점박이꽃무지 3령유충은 1, 3일 또는 5일간 절식하고 절식기간에 찹쌀가루, 전분 등을 급여하여 유충 장내 이물질을 제거한 후 사용하였다.

2. 흰점박이꽃무지의 열수 추출물제조

흰점박이꽃무지 분말을 제조한 후, 열수를 가해 흰점박이꽃무지 열수 추출물을 제조하였다. 흰점박이꽃무지 3령 중령을 30~35일간 키우고 2~3일동안 절식시켰다. 다음으로 죽은 흰점박이꽃무지 유충을 흐르는 물에 세척한 후, 60°C 에서 24 내지 48시간동안 열풍건조시켰다. 이때 열풍건조 방법으로 마이크로웨이브 (Milestone, USA), 동결건조 (PVTFD100R, IIsin, Korea) 등을 사용한 건조법을 사용 할 수 있다. 건조시킨 흰점박이꽃무지 유충을 식품용 분쇄기를 사용해 1분 분쇄, 3분 휴지(열발생 방지) Cycle을 5회 반복하여 분쇄하여, 흰점박이꽃무지 분말을 제조하였다. 열수추출물을 제조하기 위해, 흰점박이꽃무지 분말을 사용하거나 -20°C 내지 -70°C 조건에서 6개월 내지 1년간 보관한 흰점박이꽃무지 분말을 사용할 수 있다. 또는, 흰점박이꽃무지 유충을 건조하지 않고 -70°C 에서 냉동보관한 후, 물을 넣고 분쇄한 생체를 사용할 수 있다. 제조한 흰점박이 꽃무지 분말(Pb)을 사용해 열수추출물을 제조하였다. 흰점박이꽃무지 유충 분말(Pb) 100g과 물 900ml을 1 : 9 의 비율로 혼합한 후, 초음파를 750 watt, 10 kHz에서 10초 간격으로 5분간 조사하여 혼합하였다(Sonics Vibra-Cell, USA). 상기 초음파 대신에 볼텍스 챔버를 사용할 수 있다. 다음으로, 혼합물을 60°C 의 열수에서 4 내지 6시간 동안 진탕 배양한 후, 배양한 추출물을 원심분리 (3,000 rpm, 10분) 하고 0.45 um corning bottle-top (Sigma, USA)를 사용하여 진공 여과(vacuum filter)하여 약 800~900ml(80~90%)의 흰점박이꽃무지 열수추출물(Hotwater Extract of *Protaetia brevitarsis*, HePb)을 제조하였다. 또는, 상기 혼합물을 60°C 의 열수에서 4 내지 6시간 동안 진탕 배양한 추출액을 별도의 원심분리 또는 여과과정을 거치지 않고 바로 사용할 수 있다. 본 발명의 흰점박이꽃무지 열수 추출물은 상기 방법으로 제조한 액상의 흰점박이꽃무지 열수 추출물일 수 있으며, 흰점박이꽃무지 열수 추출물을 동결건조하고 분말화한 흰점박이꽃무지 추출물의 분말일 수 있다.

3. 젖산균 선발 및 확인

가바를 함유하는 발효물 제조를 위해, 항균활성과 효소활성 등의 기능을 가지는 젖산균 균주인 락토바실러스 플란타룸(*L. plantarum*, Lp) 및 웨이셀라 파라메센테로이드(*W. paramesenteroides*, Wp)를 각각 해양심층수와 발효 톱밥에서 분리 및 동정하여 이용하였다.

락토바실러스 플란타룸(*L. plantarum*)은 해양심층수로부터 분리하였다. 상기 해양심층수는 2015년 11월부터 12월까지 울릉도 태하, 저동 및 현포에서 표층으로부터 수심 200m의 바닷물을 취수하여 냉장 상태로 운반하였다. 상기 해양심층수를 0.1%(v/v) BCP가 첨가된 MRS agar 배지에 도말하여 37°C에서 1일간 배양하였다. 이후 BCP와의 반응에 의해 형성된 노란색 콜로니의 선별을 반복하여 단일 종을 분리하였다.

웨이셀라 파라메센테로이드 균주는 식용 곤충의 먹이인 발효 톱밥에서 분리 및 동정되었다. 상기 식용 곤충의 먹이용 발효 톱밥은 영천곤충산업(대한민국)으로부터 구입하였다. 25°C에서 저장된 발효 톱밥을 PBS에 1%(w/v) 농도로 첨가 후 볼텍스하여 혼합하였다. 상기 발효톱밥 혼합액을 0.1%(v/v) BCP(Bromocresol purple, Sigma, USA)가 첨가된 MRS (Difco, USA) agar 배지에 도말 후 37°C에서 1일간 배양되었다. 상기 BCP는 젖산균의 젖산에 의해 산성화되어 노란색 콜로니가 형성되도록 하는 기능을 수행한다. BCP와의 반응에 의해 형성된 노란색 콜로니만을 선별하여 MRS agar 배지에 도말하여 재선별하는 과정을 반복하여 단일 종을 분리하였다. 분리된 2종의 균주는 MRS 액체 배지에서 배양하여 50%(v/v) 글리세롤을 혼합하여 최종 글리세롤 농도가 25%가 되도록 한 후, -70°C에서 보관하였다.

2종의 젖산균 균주는 16S rRNA의 염기서열 분석을 이용하여 동정되었다. 균주를 동정하기 위해, 우선 mini genomic DNA extraction kit(Promega)를 이용하여 각 균주의 유전체 DNA(genomic DNA)를 분리하였다. 분리된 유전체 DNA를 주형으로, 하기의 27F 및 1492R 프라이머 세트 및 AccPower PCR premix kit(Bioneer, Korea)를 이용하여 TaKaRa PCR Thermal Cycler(Japan)으로 상기 균주 2종의 16S rRNA 유전자 부위를 증폭하였다.

27F 프라이머 (서열번호 1): 5' - AGAGTTTGATCMTGGCTCAG -3'

1492R 프라이머 (서열번호 2): 5' - GGTTACCTTGTTACGACTT-3'

PCR 산물은 PCR clean-up Gel extraction(Macherey Nagel, USA)로 정제하여 ABI3730 DNA analyzer(Applied Bioxytems, USA)로 유전자 서열을 분석하였다. 분리된 락토바실러스 플란타룸 균주, 웨이셀라 파라메센테로이드 균주의 16S rRNA 서열로 확인하였다.

분리된 락토바실러스 플란타룸 균주와 웨이셀라 파라메센테로이드 균주의 16s rRNA 서열정보를 이용하여 16S rRNA 서열 유사도 분석을 수행하였었다. 해양심층수로부터 분리된 젖산균은 16S rRNA 분석 결과 락토바실러스 플란타룸과 99%의 서열 유사도를 나타내었고, 발효톱밥으로부터 분리된 젖산균은 웨이셀라 파라메센테로이드와 99%의 서열 유사도를 보여, 각각 락토바실러스 플란타룸 및 웨이셀라 파라메센테로이드로 명명하였다. 상기 분리된 락토바실러스 플란타룸 균주는 한국미생물보존센터(KCCM)에 2018년 8월 10일자로 기탁되었으며, 수탁번호는 KCCM12299P이다. 상기 웨이셀라 파라메센테로이드 균주는 2018년 8월 10일자로 한국미생물보존센터(KCCM)에 기탁되었으며, 수탁번호는 KCCM12301P을 받았다.

4. 젖산균 배양물(발효 스타터)의 제조

흰점박이꽃무지 열수추출물 1L (pH6.5~7.5)에 2%(w/v) 덱스트로스(D-glucose, Sigma, USA) 80mL(열수추출물 무게의 약 8%)를 처리하여, 젖산균 배양용 배지를 제조하였다. 분리 및 동정된 젖산균을 각각 1mL씩 2 가지 젖산균을 모두 접종하고, 상기 제조한 배지에 1×10^8 cfu/ml 농도로 접종하고, 30 °C에서 24시간 동안 배양하여 흰점박이꽃무지 추출물의 젖산균 배양물을 제조하였다.

젖산균 배양물은, 흰점박이꽃무지의 용매 추출물과 마찬가지로의 방법으로 동결건조하여 분말화하여 보관하고, 이후 실험에서 필요에 따라 물에 녹여 사용하였다.

5. 젖산균 발효물의 가바 생성능 분석

제조된 흰점박이꽃무지 열수추출물과 상기 열수추출물에서 발효시간을 달리한 젖산균 발효물 내 가바 준부를 확인하기 위해 얇은막 크로마토그래피(Thin layer chromatography, TLC) 분석을 수행하였다. 구체적으로 흰점박이꽃무지 열수추출물을 이용한 젖산균 배양은 상기 설명한 것과 동일한 방법으로 수행하나, 다만 젖산균에 의한 발효시간을 각각 12시간 및 24시간으로 하여 준비하였다. 대조군으로 흰점박이꽃무지의 열수추출물(HePb)을 이용하였다. 구체적으로, 흰점박이꽃무지 추출액에서 *L.plantarum* (KCCM12299P) 및 *W. paramesenteroides* (KCCM12301P)를 모두 접종하여 12시간 배양한 것이고, 배양시간 24시간인 배양물이다.

TLC 분석을 위한 샘플은, 발효 시간별로 수집하여 젖산균을 스피ندا운 후 상청액만을 수집하여 시료로 제조 사용하였다. 상기 준비된 시료와, GABA 1 %(w/v) 및 MSG 0.5와 0.2%(w/v) 표준용액을 Merck TLC silica GEL에 3 ul씩 점적한 후 용매로 분리하여 각 시료 내 GABA의 함량을 확인하였다. 상기 분리에 사용된 용매의 조성은 n-부탄올:아세트산:물(n-butanol:acetic acid: water)을 5:2:2의 부피비로 혼합하여 사용하였다. 각 시료의 용매 분리 후 1%(v/v) 닌히드린(ninhydrin)을 분사한 후 열을 가하여 발색하였다. 상기 방법으로 진행된 TLC 분석 결과를 분석하였다.

6. 흰점박이꽃무지의 염장 발효물 제조

흰점박이꽃무지 염장 발효물의 제조에 있어, 젖산균 발효를 위한 최적의 염장 조건을 확립하기 위해, 소금의 종류와 농도 및 젖산균 발효 시간을 달리하여 실험을 수행하였다.

흰점박이꽃무지 염장물을 제조하기 위하여, 먼저 소금의 종류로는 천일염과 정제염의 두 가지를 준비하였다. 흰점박이꽃무지 유청과 상기 각 소금의 혼합비는, 유청 14kg에 소금 6kg, 또는 유청 12kg에 소금 8kg를 혼합하여 소금 함량 30%(w/w) 또는 소금 함량 40%(w/w)로 준비하였다.

흰점박이꽃무지 염장 발효물을 제조하기 위하여, 단순히 절식한 흰점박이꽃무지 유청을 0.75% 식염수 또는 해양심층수 등으로 세척하고 소금을 혼합한 후 염장하고 염장기간 1개월이 경과하였을 때에 제조한 젖산균 배양물의 동결건조물을 최종 농도가 1%(w/w)가 되도록 200g을 혼합하였다. 젖산균 첨가 후 발효는 25 내지 30°C 온도로 유지하여 수행하였다. 발효기간으로서 젖산균 첨가일로부터 1개월, 3개월 및 5개월 후의 LAB Counts(log cfu/ml)를 측정하여 최적 젖

산균 발효 조건을 확인하였다. 비교군으로 젖산균을 첨가하지 않는 염장물을 젖산균 첨가군과 동일한 기간 동안 발효 과정을 거쳐 이용하였다.

젖산균의 LAB Counts는, 배양물을 1%(v/v)로 희석하여 1 ml을 각각 액체 MRS 배지에 아가로스 (BD Difco, USA)를 첨가하여 제작한 고체 MRS 배지(0.1% Bromocresol purple 포함)플레이트에 도말 후 30°C에서 24시간 배양하여 형성된 콜로니의 수를 측정하여 수행하였다.

7. 염장 조건에 따른 흰점박이꽃무지의 염장 발효물 제조

흰점박이꽃무지 염장 발효물 내에서 젖산균이 적절히 증식하면서, 유해 미생물의 성장을 억제하는 적절한 염장 조건을 확립하기 위해 소금의 종류와 농도에 따른 염장 발효물 내 세균의 종류를 분석하였다.

소금은 천일염 또는 정제염을 이용하였으며, 소금 농도는 각각 20%(w/w, 흰점박이꽃무지 유층 16kg 및 소금 4kg 혼합), 30%(w/w, 흰점박이꽃무지 유층 14kg 및 소금 6kg 혼합) 및 40%(w/w, 흰점박이꽃무지 유층 12kg 및 소금 8kg 혼합)로 하고, 염장물 제조 1주일 후 흰점박이꽃무지 열수추출물을 제조하였다. 상기 열수 추출물에 젖산균 배양물을 첨가하여 3개월간 25 내지 30°C 온도 조건에서 젖산균 발효를 수행하여, 총 6개 시료를 준비하였다. 또한 상기 시료와 동일하나 젖산균 배양물을 첨가하여 발효과정을 수행하지 않는 대조군 시료도 각각 6개를 준비하였다.

발효를 마친 샘플을 각각 0.01g/ml의 농도로 물에 희석하여 1%(w/v)의 균질용액 시료를 제조하였다. 상기 균질용액 시료 100uL를 LB 배지에 접종하고 37°C에서 24시간 동안 배양한 후, 무작위로 30개 콜로니를 채취하여 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 (서열번호 1)와 1492R 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT- 3' 프라이머(서열번호 2)를 이용하여 PCR을 수행하여 16S rRNA 유전자를 증폭하였다(Solgene, Korea). PCR 조건은 95°C 5분으로 DNA를 변성시키고, 95°C 30초, 55°C 30초, 72°C 1분 30초로 하여 31회 반응한 후, 72°C에서 5분 정도 연장반응 후 산물을 얻었다.

합성된 16S rRNA 유전자 증폭 산물은 PCR Purification kit(MN, Germanu)를 사용하여 정제한 후 마크로젠(한국) 염기서열 분석업체에 의뢰하여 서열을 확인하고 NCBI Blast 분석을 통해 균종을 판정하였다.

8. 다양한 젖산균 배양 조건에 따른 염장 발효물의 제조

젖산균 발효에 의한 유해 미생물 성장 억제 및 젖산균의 증식 유지를 위해, 적절한 젖산균의 투여 시기 및 발효 기간을 달리하여 제조된 각 염장 발효물에 대해 16S rRNA PCR을 수행하여 보관된 발효물 내 미생물 종류를 분석하였다. 준비된 흰점박이꽃무지 유층의 분말 12kg과 천일염 8kg을 혼합하여 40%(w/w) 소금 염장물을 제조하고, 상기 염장물을 1주일 또는 1개월간 숙성시킨 후 제조된 흰점박이꽃무지 열수추출물의 젖산균 배양액 1%(w/w)을 첨가하였다. 발효는 25 내지 30°C의 온도를 유지하며 젖산균 투여일 기준으로 1개월, 2개월, 3개월, 또는 5개월 발효시켰다.

대조군으로는 상기 젖산균 발효물을 첨가하지 않은 염장물을 그대로 발효기간과 동일 기간 동안 숙성시켜 이용하였다.

발효를 마친 염장 발효물 시료를 25℃에서 보관한 후, 0.01g/ml의 농도로 물에 희석하여 1%(w/v)의 균질용액 시료를 제조하였다. 상기 균질용액 시료를 이용하여 실질적으로 동일한 방법으로 PCR을 수행하여 16S rRNA 유전자를 증폭하였다. 상기 16S rRNA 유전자의 증폭 산물은 PCR Purification kit(MN, Germanu)를 사용하여 정제한 후 마크로젠(한국) 염기서열 분석업체에 의뢰하여 서열을 확인하고 NCBI Blast 분석을 통해 종을 판정하였다. 천일염을 사용한 염장 발효물의 젖산균 투입 시기 및 발효숙성 기간에 따른 미생물 종 및 분포를 나타내었으며, 표 4는 정제염을 사용한 경우의 결과를 나타낸 것이다. 하기 미생물 분포는 전체 16S rRNA 염기서열 분석 결과, 전체 16S rRNA의 시퀀싱 리드 대비 해당 균종으로 밝혀진 시퀀싱 리드의 비율(%)로 표시되었다. 하기 표 4 및 표 5는 40% 천일염 및 40% 정제염 염장물의 발효 조건에 따른 미생물 종류 및 분포(%)를 나타내었다.

9. 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 당도, 염도 및 pH 분석

확립된 조건(소금 40%(w/w), 젖산균 발효기간 3개월)에서 제조된 흰점박이꽃무지 염장 발효물에 대한 당도, 염도 및 pH를 시판되고 있는 액젓을 대조군으로 하여 비교하였다. 염장물의 젖산균 무처리 군의 경우, 흰점박이꽃무지 열수추출물의 젖산균 발효물을 미첨가 한 것을 제외하고는 염장 발효물과 동일한 기간 동안 숙성하였다.

pH와 염도는 흰점박이꽃무지 염장 발효물 및 대조군 액젓을 1/10으로 물에 희석한 다음, pH meter(Pettler Tolendo, USA) 및 염도측정기 (PTAGO salt meter, USA)를 이용하여 측정하였다. 당도는 희석 과정 없이 원액 그대로를 당도계(ATAGO Refractometer, USA)로 측정하였다. 표 5에 각 시료의 당도, 염도 및 pH 분석 결과를 나타내었다.

10. 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 항산화능 분석

흰점박이꽃무지 염장 발효물의 항산화 효과를 확인하기 위해 발효 숙성 기간을 달리 하여 2,2-디페닐-1-피크릴히드라질 (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH)를 이용하여 자유라디칼 소거 활성 분석을 수행하였다. 흰점박이꽃무지 염장 발효물은, 염장시 소금(천일염 또는 정제염) 농도는 40%(w/w)가 되도록 하고, 1주일 간 염장숙성 후 젖산균을 첨가하여 1개월, 3개월 또는 5개월간 발효 숙성을 수행하여 제조되었다.

위에서 제작 된 발효물의 DPPH 억제율을 분석하기 위해서, 상기 각 시료를 100ul씩 채취하여 멸균수 1mL에 희석해, 0.1%(v/v) 시료 용액을 제조하였다.

저장 용액(stock solution)은 메탄올 1mM(100mM Tris-HCl, pH7.4)에 DPPH를 용해하여 제조하였으며, 분석 실험시 상기 DPPH 용액을 100uM 농도로 희석하여 사용하였다. 96 웰 플레이트에 상기 0.1%(v/v) 농도의 각 시료 용액을 10uL씩 분주하고, 100uM의 DPPH 용액을 100uL씩 첨가하여 차광한 후 실온에서 10 내지 30분간 반응시킨 후, 517nm 파장의 빛을 조사하여 흡광도를 측정하여 시간의 경과에 따른 항산화 효과를 DPPH 억제율 (%)로 측정하였다. 음성 대조군으로는 메탄올에 100uL의 DPPH를 처리하여 흡광도를 측정한 후 영점 처리하였다.

DPPH 억제율은 상기 흡광도 측정 결과로부터 하기의 수학적 식 1로 계산되었으며, 그 결과로도 4 및 하기 표 7에 나타내었다.

[수학식 1]

$$\text{DPPH 억제율(scavenging activity, \%)} = (1 - \text{OD sample} / \text{OD blind}) \times 100$$

상기 수학식 1에서, OD sample은 흡광도 측정의 대상이 되는 시료의 517nm 파장 흡광도 값이고, OD blind는 음성 대조군에서의 흡광도 값이다. 또한, 염장에 천일염을 사용한 무숙성 시료의 DPPH 억제율 100을 기준으로 숙성 기간이 다양한 시료의 DPPH 억제율의 상대적인 수치를 계산하여 상대 DPPH억제율(%)로 표시하였다. 또한, 정제점을 사용한 시료에서, 무숙성 시료의 DPPH 억제율 100을 기준으로 숙성 기간이 다양한 시료의 DPPH 억제율의 상대적인 수치를 계산하여 상대 DPPH억제율(%)로 표시하였다.

11. 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 가바 함량 분석

흰점박이꽃무지 염장 발효물의 가바 함량의 증가 여부를 확인하기 위해, 정제염 또는 천일염 함량 40%(w/w)로 제조한 흰점박이꽃무지 유층의 건조 분말을 염장하여 1주일 또는 1개월간 숙성하고, 제조한 *Lactobacillus plantarum* 배양물을 첨가하여 3개월간 발효하여 염장 발효물을 제조하였다. 제조된 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 가바 함량을 상기의 동일한 방법으로 TLC 분석을 통해 확인하였다. 대조군으로는 GABA 1%(w/v) 용액을 이용하였다.

12. 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 세포주 독성 실험

1) 마우스 세포주에서의 독성 실험

흰점박이꽃무지 염장 발효물의 안전성을 확인하기 위해, 마우스 세포주인 Raw264.7 cell(ATCC TIB-71)에서 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 독성 실험을 수행하였다. 실험에 이용된 Raw264.7 cell 세포주는 10%(v/v) 소태아혈청(fetal bovine serum), 및 1%(w/v) Penicillin-streptomycin이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's Medium(DMEM) 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

실험에 이용된 염장 발효물은 위에서 제작된 흰점박이꽃무지 젖산균 발효물과 대조군으로 시판 멸치액젓 2종(청정원, 씨제이), 까나리액젓 2종(청정원, 씨제이) 및 참치액 2종(청정원, 씨제이)을 사용하였다. 각 시료는 상기 배양된 Raw264.7 세포주에 1mg/ml 농도로 첨가한 후에, 24시간동안 배양한 후 세포 생존율(Cell viability, % of control)을 MTT assay 방법으로 측정하였다. 음성 대조군(Control)으로는 상기 시료를 대신하여 새로운 DMEM 배지(fresh DMEM)를 첨가하여 세포 생존율을 측정하였으며, 대조군의 세포생존율을 100%로 두었을 때의 각 시료의 세포 생존율을 상대적으로 계산하였다. 각시료는 염도가 높아 희석하여 0.1% 시료를 사용하여 분석하였다.

2) 인간 비만세포에서의 세포주 독성 실험

흰점박이꽃무지 염장 발효물의 젖산균 첨가 전 염장 숙성 기간에 따른 인간 비만세포에 대한 세포주 독성 실험을 수행하였다. 상기 인간 비만 세포는 3T3-L1(ATCC CRL-3242) 세포주를 이용하였으며, 독성 시험은 Cell counting kit-8 (CCK-8, Dojindo)을 이용하여 측정하였다. 실험에 이용할 3T3-L1 세포주는 10%(v/v) 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS), 1%(w/v) 페니실린

-스트렙토마이신(Penicillin-streptomycin)이 첨가된 DMEM 배지에서, 37°C, 5% CO₂배양조건에서 배양하였다. 실험에 이용된 염장 발효물은 상기 시료와 동일하고, 대조군으로 시판 멸치액젓 2종(청정원, 씨제이), 까나리액젓 2종(청정원, 씨제이) 및 참치액 2종(청정원, 씨제이)을 사용하였다. 세포 생존율(Cell viability, % of control)은 실질적으로 동일한 방법으로 측정하여, 하기 표 9과 도 6b에 측정 결과를 나타냈다. 시료는 염도가 높아 희석하여 0.1% 시료를 사용하여 분석하였다.

13. 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 중성지방 저감 효과

흰점박이꽃무지 염장 발효물의 인간 비만세포(3T3-L1) 내에서 중성지방 함량 저감 효과를 가지는 지 여부를 확인하였다.

인간 비만세포(3T3-L1)는 실질적으로 동일한 조건에서 배양되었으며, 세포 배양 플레이트 내에 세포가 90% 이상 차게 되면 PBS(Phosphate buffered saline)으로 2회 세척하고 Trypsin-EDTA(wellGENE, Korea)를 처리한 후 원심분리하여 세포를 수집해 5X10⁵ cells/well의 밀도로 6-well plate의 각 웰에 세포를 분주하였다. 각 Well에는 동일한 배양 배지가 첨가되었으며, 다시 6-well plate에서 세포가 90% 정도 각 웰에 차게 되면 48시간 방치하였다. 그런 후에 세포의 분화 유도를 위해서, DMEM에 10%(v/v) FBS와 23mg/ml IBMS(sigma USA), 5mg/ml insulin(Sigma, USA), 1Mm dexamethasone(Sigma, USA)이 첨가된 배지를 처리하여 세포 분화를 48시간 동안 유도한 후에, 2일마다 10%(v/v) FBS DMEM 배지에 5mg/ml 인슐린(insulin)이 첨가된 배지로 교체하였다. 양성 대조군으로는 5mg/ml 인슐린을 포함하는 10%(v/v) FBS DMEM 배지를 첨가하였다.

흰점박이꽃무지 염장물 또는 염장 발효물은 천일염 또는 정제염을 40%(w/w) 농도로 사용하여 염장을 수행하고, 발효물은 염장 숙성 1주일 후 흰점박이꽃무지 열수추출물의 젖산균 발효물을 투여하여 다시 3개월간 발효한 것으로서, 시료 6-1, 6-2, 6-4 및 6-5와 동일하다.

각 시료를 최종 농도 0.1%(v/v)가 되도록 물에 희석하고, 각 희석된 시료를 분화 유도 배지의 첨가 시점부터 함께 3T3-L1 세포주에 처리되었으며, 9일동안 분화 과정을 거친 3T3-L1 세포주에서 배지를 제거하고, PBS로 세척한 후, 10%(v/v) 포름알데히드(formaldehyde) 용액으로 10분간 고정하고, PBS로 세척한 후 Oil Red-O 용액을 처리하여 실온에서 20분간 염색하였다. 각 세포 내 지방 함량을 확인하기 위해, 염색 과정을 마친 후 oil-Red-O 용액을 제거하고 증류수로 3회 세척한 다음, 염색된 세포를 100% 이소프로판올(isopropanol)을 이용하여 지방을 추출한 후, 510nm에서 흡광도를 측정하고, 대조군의 흡광도 값에 대한 백분율 값을 상대적 지방 축적률과 비교하여 나타내었다.

14. 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 중금속 저감능 분석

흰점박이꽃무지 염장 발효물 내의 중금속 함량을 조사하여 본원 염장발효물 내 중금속 함량 저감 효과를 확인하였다.

구체적으로, 흰점박이꽃무지 염장 발효물은 천일염 또는 정제염을 40%(w/w) 함량으로 흰점박이꽃무지와 혼합하여 염장물 (미생물 무처리군)을 제조하고, 1주일 간 염장 숙성 후 제조된 흰점박이꽃무지 열수추출물의 젖산균 발효물을 첨가하여 3개월간 발효 숙성을 수행하여 제조

된 것으로서, 시료 6-1, 6-2, 6-4 및 6-5와 동일하다. 대조군은 흰점박이꽃무지 건조분말을 사용하였다.

각 시료를 최종 농도 1%(v/v)가 되도록 물에 희석하고, 각 희석된 시료를 유도 결합 플라즈마 발광분광기에 주입하여, 비소와 카드뮴의 2개 원소(관심 원소)에 대한 발광 강도를 측정하고 검량선의 회귀방정식에 대입하여 관심원소의 농도를 정량하였다. 유도 결합 플라즈마에서 검액 중 관심원소에 대한 농도가 정량되면 시료 중 관심 원소의 농도는 하기 수학적 1의 방법으로 계산하였다.

[수학적 2]

시료 중 원소 농도 (ug/g) = (검량선결과(ug/L) x 최종량(ml) x 희석배수) / 시료무게(g) x 1000

비소(As)와 카드뮴(Cd)의 경우, 식품공전 일반시험법에 준하여 시료 내 함량을 측정하였다 (한국고분자시험연구소, KOPTRI). 구체적으로 각 시료를 물에 1%(v/v) 농도로 희석한 후 질산 처리하고 유도결합플라즈마 발광분광기(Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry, ICP-MS, KHSI-A-158)을 이용하여 성분 분석을 수행하였다. 유도 결합 플라즈마에서 검액 중 관심원소(As 또는 Cd)에 대한 농도가 정량되면 시료 중 관심원소의 농도는 하기 수학적 3에 의해 계산하였다.

[수학적 3]

시료 중 관심 원소 농도 (mg/kg) = 시험용액 농도(ug/kg) x 최종부피(ml)/시료채취량(g) x 희석배수 x 1/1000

수은(Hg)의 경우, 각 시료를 Mercury analyzer Hydra-C(KHSI-A-006)으로 분석하였다. 분석기에서 검액 중 관심원소(Hg)에 대한 농도가 정량되면, 시료 중 관심원소의 농도(ng/g)는 검출량(ng)을 시료채취량 (g)으로 나눈 값이다.

크롬(Cr)의 경우, 각 시료 중 일정량을 마이크로웨이브(Microwave MARS CEM, KHSI-A-063)에 넣고 질산 등으로 처리하여 분해하고 플라스크에 옮겨 증류수를 넣어 용액으로 제조해 유도결합플라즈마 발광분광기(ICP-MS agilent 7700, KHSI-A-059)로 성분 분석을 수행하였다 (한국고분자시험연구소, KOPTRI).

상기 방법에 따라 얻어진 4가지 중금속(비소, 카드뮴, 수은, 및 크롬) 분석하였다.

14. 흰점박이꽃무지 유충 젖산균 발효물의 시제품 제작

1) 적정 소금 및 농도 조건 실험

흰점박이꽃무지 유충 12kg과 천일염 8kg을 혼합하여 30%(1차 시제품, 180501), 20%(2차 시제품 180701) 40%(3차시제품, 181120, w/w) 소금 염장물을 제조하고, 상기 염장물을 1주일 또는 1개월간 숙성시킨 후, 제조된 흰점박이꽃무지 열수추출물의 젖산균 배양액 1%(w/w)을 첨가하였다. 발효는 25 내지 30°C의 온도를 유지하며 젖산균 투여일 기준으로 1개월, 2개월, 3개월, 또는 6개월 발효시켰다. 각 발효가 완료된 흰점박이꽃무지 염장물은 믹서기로 균질화 및/또는 프레스로 압착하여 액상만을 분리하여 면포 및/또는 필터로 여과과정을 거친 후 121°C로 5-20

분간 멸균 후 재여과하여 사용하였다. 대조군으로는 상기 젖산균 발효물을 첨가하지 않은 염장 물을 그대로 발효기간과 동일 기간동안 숙성시켜 이용하였다.

시제품	천일염/정제염	소금 농도	비고
1차	<p>1차 발효소스 실험 계획 (2018.05.01) 1차 발효소스 (30%)</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 30%; border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>Pos aekjeot</p> <p>Pos 1kg</p> <p>↓ Washing DDW x10</p> <p>↓ Washing sea water</p> <p>↓ Salt 420g (29.5%)</p> <p>↓ Lyophilization samples 1g</p> <p>↓ Fermentation on 30 °C</p> <p>↓ Filter cotton</p> <p>↓ Sterilization by heating</p> <p>↓ Aekjeot</p> <p><i>Protaetia brevitarsis seulensis, Pb</i></p> </div> <div style="width: 65%;"> <p>대조군 유산균 접종군</p> <p>천일염 정제염 (한주소금) 천일염 정제염 (한주소금)</p> <p>전숙성 (1개월)</p> <p>전숙성 (3개월)</p> <p>전숙성 (5개월)</p> </div> </div>	30%	적합
2차	<p>2차 발효소스 실험 계획 (2018.07.03) 2차 발효소스 (20%)</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 30%; border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>Pos aekjeot</p> <p>Pos 1kg</p> <p>↓ Washing DDW x10</p> <p>↓ Washing sea water</p> <p>↓ Salt 250g (20%)</p> <p>↓ Lyophilization samples 1g</p> <p>↓ Fermentation on 30 °C</p> <p>↓ Filter cotton</p> <p>↓ Sterilization by heating</p> <p>↓ Aekjeot</p> <p><i>Protaetia orientalis submarmorea, Pos</i></p> </div> <div style="width: 65%;"> <p>대조군 유산균 접종군</p> <p>천일염 정제염 (한주소금) 천일염 정제염 (한주소금)</p> <p>전숙성 (1개월)</p> <p>전숙성 (3개월)</p> <p>전숙성 (5개월)</p> </div> </div>	20%	부적합 (미생물)
3차	<p>3차 발효소스 실험 계획 (2018.11.20) 3차 발효소스 (60%)</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 30%; border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>Pos aekjeot</p> <p>꽃병이 1kg</p> <p>↓ 물 세척 x10</p> <p>↓ 소금물 세척 (90g 소금 + 3L 물)</p> <p>↓ 소금 400g 첨가</p> <p>3. 맨 위층을 소금으로 덮어준다. 2. 꽃병이와 소금 층을 잘는다. 1. 아래에 소금을 얹는다.</p> <p>젓갈 : 어류, 갑각류, 연체류, 곡피류 등의 전체 또는 일부분을 주원료(생물로 기준할 때 40%이상이어야 함)로 하여 시염을 기하여 발효 숙성시킨 것을 말한다.</p> <p>액젓 : 젓갈을 여과하거나 분리한 액 또는 이에 젓갈을 여과하거나 분리하고 남은 것을 재발효 또는 숙성시킨 후 여과하거나 분리한 액을 혼합한 것을 말한다.</p> <p><i>Protaetia brevitarsis seulensis, Pb</i></p> </div> <div style="width: 65%;"> <p>대조군 유산균 접종군</p> <p>천일염 정제염 (한주소금) 천일염 정제염 (한주소금)</p> <div style="border: 1px solid blue; padding: 5px; margin-bottom: 10px;"> <p>3개월 발효</p> <p>발효 3개월 (초기 투여)</p> <p>발효 3개월 (1개월 투여)</p> </div> <div style="border: 1px solid blue; padding: 5px;"> <p>6개월 발효</p> <p>발효 6개월 (초기 투여)</p> <p>발효 6개월 (1개월 투여)</p> </div> </div> </div>	40%	부적합 (고농도)

2) 흰점박이꽃무지 유충 전처리 및 후처리 공정

결과에 따라 이후는 천일염으로만 실험 진행하였으며, 4차의 경우 40%(w./w), 5차 (35%, w/w) 농도로 흰점박이꽃무지의 편치 유무로 차이를 두어 실험을 진행하였다.

시제품	천일염 / 흰점박이꽃무지 유충 편치유무	소금 농도	비고																																																				
4차	<p>4차_발효소스_실험 계획 (2019.04.22) 4차 발효소스 (40%)</p> <p>2019.04.22 염도 60% 발효소스 제조</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>Pos aekjeot</p> <p>꽃병이 20kg / 26.6kg</p> <p>↓</p> <p>물 세척 x10</p> <p>↓</p> <p>소금물 세척 (90g 소금 + 3L 물)</p> <p>↓</p> <p>소금 12kg / 15.96kg 첨가</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>Control Pb</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Cutting Pb</p> </div> </div> <p>※ 찻갈: 어류, 갑각류, 연체류, 극피류 등의 전체 또는 일부분을 주원료(생물표 기준형 미 60%이상이어야 한다)로 하여 식염을 가하여 발효 숙성시킨 것을 말한다.</p> <p>※ 액젓: 찻갈을 여과하거나 분리한 액 또는 이에 찻갈을 여과하거나 분리하고 남은 것을 재발효 또는 숙성시킨 후 여과하거나 분리한 액을 혼합한 것을 말한다.</p> <p><i>Protoaetia brevitarsis seulensis</i> Pb</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>천일염</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>Control Pb</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Cutting Pb</p> </div> </div> <p>발효 3개월</p> <p>2019.05.09 유산균 투여</p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>전발효</th> <th colspan="3">1개월</th> <th colspan="3">2개월</th> <th colspan="3">3개월</th> </tr> <tr> <th>제조</th> <th>1주</th> <th>2주</th> <th>3주</th> <th>4주</th> <th>5주</th> <th>6주</th> <th>7주</th> <th>8주</th> <th>9주</th> <th>10주</th> <th>11주</th> <th>12주</th> <th>13주</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Control</td> <td>05W</td> <td>05D</td> <td>05B</td> <td>05W</td> <td>05D</td> <td>05B</td> <td>05W</td> <td>05D</td> <td>05B</td> <td>05W</td> <td>05D</td> <td>05B</td> <td>05W</td> </tr> <tr> <td>cutting</td> <td>05W</td> <td>05D</td> <td>05B</td> <td>05W</td> <td>05D</td> <td>05B</td> <td>05W</td> <td>05D</td> <td>05B</td> <td>05W</td> <td>05D</td> <td>05B</td> <td>05W</td> </tr> </tbody> </table> <p>전숙성 (17일)</p> <p>2019.05.09 Lp+D20 (10g)</p> <p>2019.06.13 sampling</p> <p>2019.07.-- sampling</p> <p>2019.08.-- sampling</p> </div>	전발효	1개월			2개월			3개월			제조	1주	2주	3주	4주	5주	6주	7주	8주	9주	10주	11주	12주	13주	Control	05W	05D	05B	05W	cutting	05W	05D	05B	05W	40%	적합																		
전발효	1개월			2개월			3개월																																																
제조	1주	2주	3주	4주	5주	6주	7주	8주	9주	10주	11주	12주	13주																																										
Control	05W	05D	05B	05W	05D	05B	05W	05D	05B	05W	05D	05B	05W																																										
cutting	05W	05D	05B	05W	05D	05B	05W	05D	05B	05W	05D	05B	05W																																										
5차	<p>5차_발효소스_실험 계획 (2019.09.06) 5차 발효소스 (30%/35%)</p> <p>2019.09.06 염도 30%, 35% 발효소스 제조</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>Pos aekjeot</p> <p>꽃병이 20kg / 20.0kg</p> <p>↓</p> <p>물 세척 x10</p> <p>↓</p> <p>소금물 세척 (90g 소금 + 3L 물)</p> <div style="text-align: center;">  <p>Cutting Pb</p> </div> <p>↓</p> <p>소금 9kg / 10.5kg 첨가</p> <p>2019.09.16 유산균 투여</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>천일염</p> <div style="text-align: center;">  <p>Cutting Pb</p> </div> <p>발효 3개월</p> <p>2019.09.11 유산균 투여</p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>전발효</th> <th colspan="3">1개월</th> <th colspan="3">2개월</th> <th colspan="3">3개월</th> </tr> <tr> <th>제조</th> <th>1주</th> <th>2주</th> <th>3주</th> <th>4주</th> <th>5주</th> <th>6주</th> <th>7주</th> <th>8주</th> <th>9주</th> <th>10주</th> <th>11주</th> <th>12주</th> <th>13주</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Control</td> <td>05W</td> <td>05D</td> <td>05B</td> <td>05W</td> <td>05D</td> <td>05B</td> <td>05W</td> <td>05D</td> <td>05B</td> <td>05W</td> <td>05D</td> <td>05B</td> <td>05W</td> </tr> <tr> <td>cutting</td> <td>05W</td> <td>05D</td> <td>05B</td> <td>05W</td> <td>05D</td> <td>05B</td> <td>05W</td> <td>05D</td> <td>05B</td> <td>05W</td> <td>05D</td> <td>05B</td> <td>05W</td> </tr> </tbody> </table> <p>전숙성 (17일)</p> <p>2019.09.11 Lp+D20 (10g)</p> <p>2019.06.13 sampling</p> <p>2019.07.-- sampling</p> <p>2019.12.11 sampling</p> </div>	전발효	1개월			2개월			3개월			제조	1주	2주	3주	4주	5주	6주	7주	8주	9주	10주	11주	12주	13주	Control	05W	05D	05B	05W	cutting	05W	05D	05B	05W	35%	적합																		
전발효	1개월			2개월			3개월																																																
제조	1주	2주	3주	4주	5주	6주	7주	8주	9주	10주	11주	12주	13주																																										
Control	05W	05D	05B	05W	05D	05B	05W	05D	05B	05W	05D	05B	05W																																										
cutting	05W	05D	05B	05W	05D	05B	05W	05D	05B	05W	05D	05B	05W																																										

후처리의 방법은 위 방법과 같이 발효는 25 내지 30℃의 온도를 유지하며 젖산균 투여일 기준으로 1개월, 2개월, 3개월, 또는 6개월 발효시켰다. 각 발효가 완료된 흰점박이꽃무지 염장물은 믹서기로 균질화 및/또는 프레스로 압착하여 액상만을 분리하여 면포 및/또는 필터로 여과과정을 거친 후 121℃로 5-20분간 멸균 후 재여과하여 사용하였다. 대조군으로는 상기 젖산균 발효물을 첨가하지 않은 염장물을 그대로 발효기간과 동일 기간동안 숙성시켜 이용하였다.



제 3 절 연구수행 내용 및 결과

1. 발효 스타터 젖산균의 동정 및 가바 생산능 확인

가바를 함유하는 발효물 제조를 위해, 항균활성과 효소활성 등의 기능을 가지는 젖산균 균주인 락토바실러스 플란티움(*L. plantarum*, Lp) 및 웨이셀라 파라메센테로이드(*W. paramesenteroides*, Wp), 락토코쿠스 락티스(*L. lactis*, Ll), 락토바실러스 텍스트리니쿠스(*L. dextrinicus*, Ld), 페디오코쿠스 에시디락티시(*P. acidilactici*, Pa)를 각각 해양심층수와 발효 톱밥에서 분리 및 동정하여 이용하였다. 상기 분리된 유전체 DNA를 주형으로, 하기의 27F 및 1492R 프라이머 세트 및 AccPower PCR premix kit(Bioneer, Korea)를 이용하여 TaKaRa PCR Thermal Cycler(Japan)으로 상기 균주 2종의 16S rRNA 유전자 부위를 증폭하였다. 상기 분리된 락토바실러스 플란티움 균주와 웨이셀라 파라메센테로이드 균주의 16S rRNA 서열정보를 이용하여 16S rRNA 서열 유사도 분석을 수행하였으며, 그 결과는 하기 표 1과 같다. 하기 표 1에 나타난 바와 같이, 해양심층수로부터 분리된 젖산균은 16S rRNA 분석 결과 락토바실러스 플란티움과 99%의 서열 유사도를 나타내었고, 발효톱밥으로부터 분리된 젖산균은 웨이셀라 파라메센테로이드와 99%의 서열 유사도를 보여, 각각 락토바실러스 플란티움 및 웨이셀라 파라메센테로이드, 락토코쿠스 락티스, 락토바실러스 텍스트리니쿠스, 페디오코쿠스 에시디락티시로 명명하였다.

확인된 6균주를 이용하여 제조된 흰점박이꽃무지 열수추출물과 상기 열수추출물에서 발효시간을 달리한 젖산균 발효물 내 가바 유무를 확인하기 위해 얇은막 크로마토그래피(Thin layer chromatography, TLC) 분석을 수행하였다.

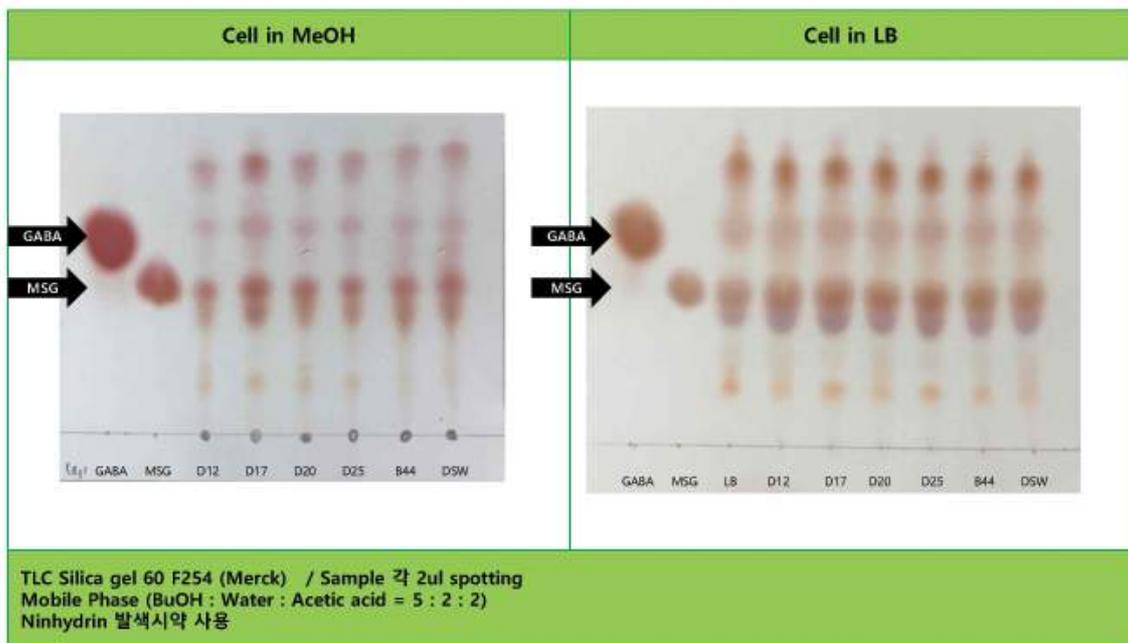


그림 1. 해양심층수와 발효톱밥에서 분리된 6균주의 가바 TLC 분석

구체적으로 흰점박이꽃무지 열수추출물을 이용한 젖산균 배양은 젖산균에 의한 발효시간을 각각 12시간, 24시간, 36시간 및 48시간으로 하여 준비하였다. 대조군으로 흰점박이꽃무지의 열수추출물(HePb)을 이용하였다. 구체적으로, 흰점박이꽃무지 추출액에서 *L.plantarum* (KCCM12299P) 및 *W. paramesenteroides* (KCCM12301P)를 모두 접종하여 12시간 배양한 것이고, 시료 2-2 배양시간 24시간인 배양물이다. 그림 1의 레인 1 내지 레인 3은 각각 왼쪽부터 순차적으로 1% GABA, 0.5% MSG, 0.2 % MSG이고, 레인4 내지 레인 5는 각각 젖산균 배양물인 대조군으로서 미발효 흰점박이꽃무지 열수추출액의 TLC 분석 결과이다.

그림 1에서 확인 가능한 바와 같이, 비교예1의 미발효 흰점박이꽃무지 추출액의 가바 함량과 비교하여, 각각 젖산균 배양이 12시간과 24시간으로 얻은 *L.plantarum* (KCCM12299P) 및 *W. paramesenteroides* (KCCM12301P)과 나머지 4균에서 가바 생성이 확인되었다. 또한 젖산균 배양 12시간 (시료2-1) 보다 배양 24시간(시료 2-2)에서 더 많은 가바가 생성되었음을 정성적으로 확인하였다. 이 후 염장실험을 위해서는 *L.plantarum* (KCCM12299P) 및 *W. paramesenteroides* (KCCM12301P)균을 사용하였다.

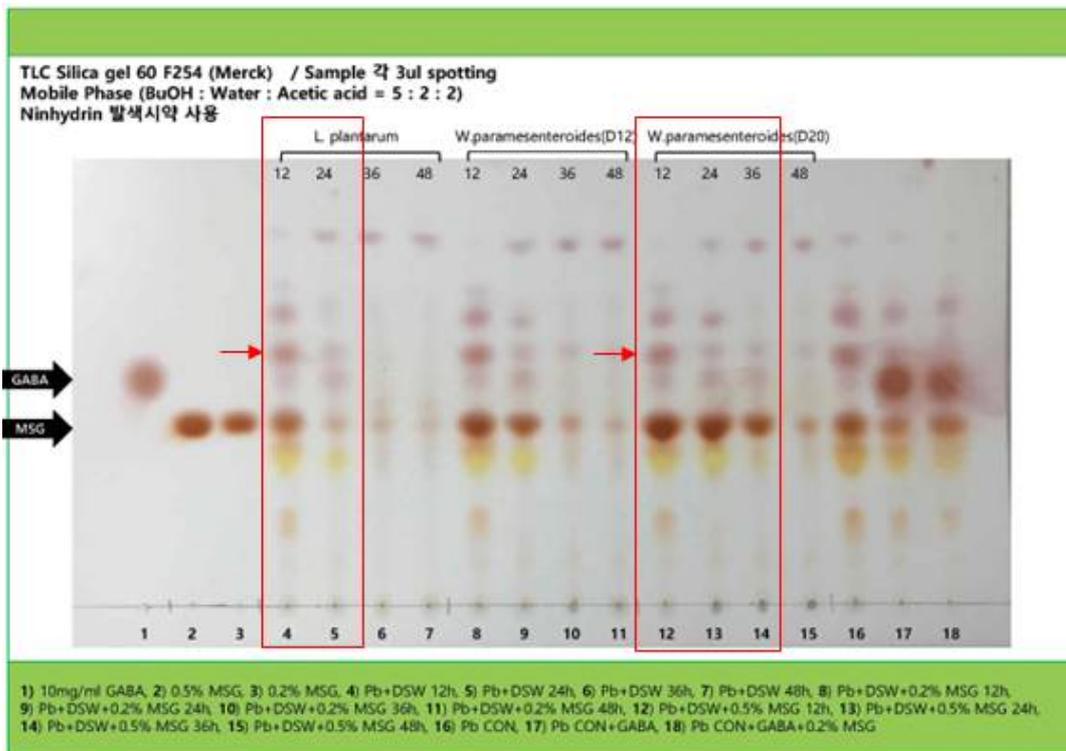


그림 2. 흰점박이꽃무지 유충 추출물에서의 *L.plantarum* (KCCM12299P), *W. paramesenteroides* (KCCM12301P)의 시간별 가바 TLC 분석

2. 젖산균의 생균수에 의한 흰점박이꽃무지 유충 염장 제조 조건

흰점박이꽃무지 염장 발효물의 제조에 있어, 젖산균 발효를 위한 최적의 염장 조건을 확립하기 위해, 소금의 종류와 농도 및 젖산균 발효 시간을 달리하여 실험을 수행하였다.

흰점박이꽃무지 염장물을 제조하기 위하여, 먼저 소금의 종류로는 천일염과 정제염의 두 가지를 준비하였다. 흰점박이꽃무지 유충과 상기 각 소금의 혼합비는, 유충 14kg에 소금 6kg, 또는 유충 12kg에 소금 8kg를 혼합하여 소금 함량 30%(w/w) 또는 소금 함량 40%(w/w)로 준비하였다. 흰점박이꽃무지 염장 발효물을 제조하기 위하여, 단순히 절식한 흰점박이꽃무지 유충을 0.75% 식염수 또는 해양심층수 등으로 세척하고 소금을 혼합한 후 염장하고 염장기간 1개월이 경과하였을 때에 제조한 젖산균 배양물의 동결건조물을 최종 농도가 1%(w/w)가 되도록 200g을 혼합하였다. 젖산균 첨가 후 발효는 25 내지 30°C 온도로 유지하여 수행하였다. 발효기간으로서 젖산균 첨가일로부터 1개월, 3개월 및 5개월 후의 LAB Counts(log cfu/ml)를 측정하여 최적 젖산균 발효 조건을 확인하였으며, 측정 결과를 도 1 및 하기 표 2에 나타냈다. 비교예로서 젖산균을 첨가하지 않는 염장물을 젖산균 첨가군과 동일한 기간 동안 발효 과정을 거쳐 이용하였으며, 천일염 정제염 40% 제조 조건에 대응하여 동일하게 천일염 정제염 30% 비교시료로 각각 기재하였다.

상기 젖산균의 LAB Counts는, 배양물을 1%(v/v)로 희석하여 1 ml을 각각 액체 MRS 배지에 아가로스 (BD Difco, USA)를 첨가하여 제작한 고체 MRS 배지(0.1% Bromocresol purple 포함)플레이트에 도말 후 30°C에서 24시간 배양하여 형성된 콜로니의 수를 측정하여 수행하였다.

하기 표 1 및 그림 3에는 흰점박이꽃무지의 염장물 제조를 위한 염장 조건과, 젖산균 배양 기간에 따른 젖산균 LAB Counts (cfu/ml)를 나타낸 것이다.

[표 1] 흰점박이꽃무지 유충의 소금종류 및 농도별 젖산균 수

구분	염장조건			발효기간		
	소금종류	소금 농도	염장기간	1 개월	3 개월	5 개월
시료 3-1	천일염	40%	1 개월	1.0×10^4	1.0×10^8	2.0×10^7
시료 3-2	정제염	40%	1 개월	1.1×10^4	8.0×10^7	4.0×10^7
비교대조 3-1	천일염	30%	1 개월	2.02×10^4	1.0×10^5	3.5×10^2
비교대조 3-2	정제염	30%	1 개월	1.32×10^4	3.37×10^5	1.39×10^3
대조시료 3-1	천일염	40%	1 개월	1.0×10^4	8.0×10^3	1.0×10^4
대조시료 3-2	정제염	40%	1 개월	1.1×10^4	7.0×10^3	2.4×10^4
대조시료 3-3	천일염	30%	1 개월	2.02×10^4	1.76×10^5	8.7×10^2
대조시료 3-4	정제염	30%	1 개월	1.32×10^4	3.37×10^5	4.2×10^2

표 1 및 그림 3에서 확인 가능한 바와 같이, 30%(w/w)의 소금 농도로 염장한 흰점박이꽃무지 염장물의 젖산균을 투여하지 않은 대조 시료에서 1개월 숙성 후 젖산균 LAB Counts가 천일염과 정제염에서 각각 $2.02 \times 10^4/\text{ml}$ ($2.02\text{E}+04$)와 $1.32 \times 10^4/\text{ml}$ ($1.32\text{E}+04$), 3개월 숙성 후 천일염과 정제염에서 각각 $1.76 \times 10^5/\text{ml}$ ($1.76\text{E}+05$)와 $3.37 \times 10^5/\text{ml}$ ($3.37\text{E}+05$), 5개월 숙성 후 젖산균 LAB Counts가 천일염과 정제염에서 각각 $8.7 \times 10^2/\text{ml}$ ($8.7\text{E}+02$)와 $4.2 \times 10^2/\text{ml}$ ($4.2\text{E}+02$)의 LAB Count를 보였다. 40%(w/w)의 소금 농도로 염장한 흰점박이꽃무지 염장물의 젖산균을 투여하지 않은 대조 시료에서 1개월 숙성 후 젖산균 LAB Counts가 천일염과 정제염에서 각각 $1.0 \times 10^4/\text{ml}$ ($1.0\text{E}+04$)와 $1.1 \times 10^4/\text{ml}$ ($1.1\text{E}+04$), 3개월 숙성 후 천일염과 정제염에서 각각 $8.0 \times 10^4/\text{ml}$ ($8.0\text{E}+04$)와 $7.0 \times 10^4/\text{ml}$ ($7.0\text{E}+04$), 5개월 숙성 후 젖산균 LAB Counts가 천일염과 정제염에서 각각 $1.0 \times 10^4/\text{ml}$ ($1.0\text{E}+04$)와 $2.4 \times 10^4/\text{ml}$ ($2.4\text{E}+04$)의 LAB Count를 보였다.

비교 대조실험으로서 30%(w/w)의 소금 농도로 염장한 흰점박이꽃무지 염장물의 젖산균을 첨가하여발효한 시료에서, 3개월 숙성 후 젖산균 LAB Counts가 천일염과 정제염에서 각각 $1.0 \times 10^5/\text{ml}$ ($1.0\text{E}+05$)와 $3.37 \times 10^5/\text{ml}$ ($3.37\text{E}+05$)이고, 5개월 숙성 후 젖산균 LAB Counts가 천일염과 정제염에서 각각 $3.5 \times 10^2/\text{ml}$ ($3.5\text{E}+02$)와 $1.39 \times 10^3/\text{ml}$ ($1.39\text{E}+03$)로 확인되었다.

40%(w/w)의 소금 농도로 염장한 흰점박이꽃무지 염장물의 젖산균을 첨가하여발효한 시료에서, 3개월 숙성 후 젖산균 LAB Counts가 천일염과 정제염에서 각각 $1.0 \times 10^8/\text{ml}$ ($1.0\text{E}+08$)와 $8.0 \times 10^7/\text{ml}$ ($8.0\text{E}+07$)이고, 5개월 숙성 후 젖산균 LAB Counts가 천일염과 정제염에서 각각 $2.0 \times 10^7/\text{ml}$ ($2.0\text{E}+07$)와 $4.0 \times 10^7/\text{ml}$ ($4.0\text{E}+07$)로 확인되었다.

발효 기간 별로 염장 발효물의 젖산균수를 고려하면, 소금 농도 30%(w/w) 및 40%(w/w)에서 모두 흰점박이꽃무지 염장 발효물 내 젖산균 생균수는 숙성 기간이 3개월인 때에 가장 많았으며, 특히 소금 농도 40%(w/w)의 경우에 더 높은 생균수를 가졌다. 비교대조 실험인 30%(w/w)의 소금 농도로 염장한 경우, 젖산균 발효물의 생균수가 대조군보다 더 낮아졌다.

따라서 흰점박이꽃무지의 염장 발효물 제작의 최적 조건은, 소금 농도 40%(w/w)에서 흰점박이꽃무지를 염장하고, 젖산균을 접종하여 3개월 동안 발효 배양하는 것임을 확인하였다.

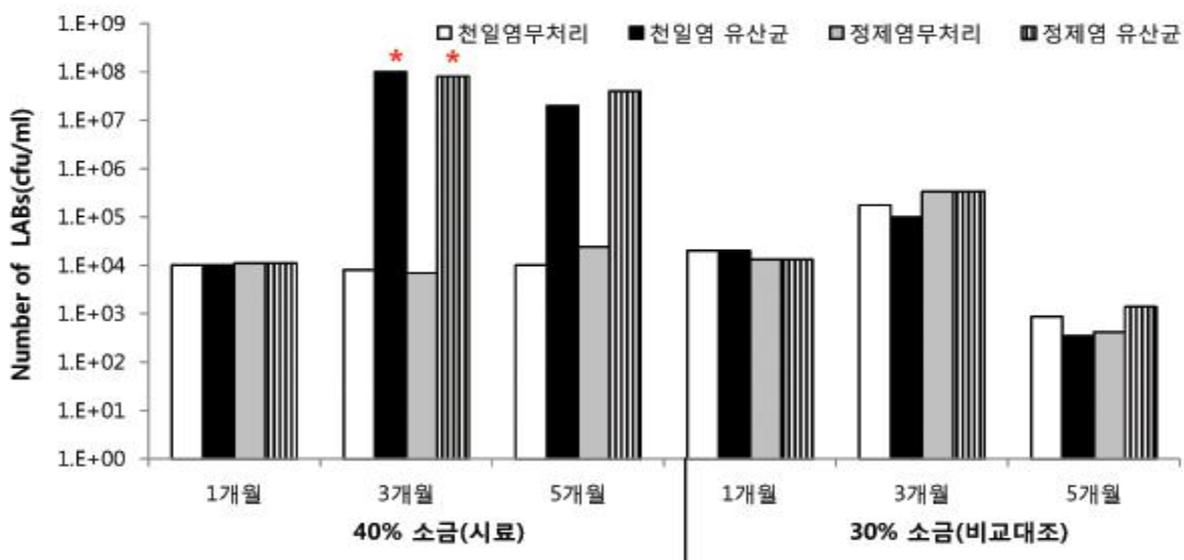


그림 3. 흰점박이꽃무지 유충 염장물제조에서 염장조건별 젖산균 수(cfu/ml)

3. 흰점박이꽃무지 유충 적정 소금 및 염도 분석

흰점박이꽃무지 유충 12kg과 천일염 8kg을 혼합하여 30%(1차 시제품, 180501), 20%(2차 시제품 180701) 40%(3차시제품, 181120, w/w) 소금 염장물을 제조하고, 상기 염장물을 1주일 또는 1개월간 숙성시킨 후, 제조된 흰점박이꽃무지 열수추출물의 젖산균 배양액 1%(w/w)을 첨가하였다. 발효는 25 내지 30℃의 온도를 유지하며 젖산균 투여일 기준으로 1개월, 2개월, 3개월, 또는 6개월 발효시켰다. 각 발효가 완료된 흰점박이꽃무지 염장물은 믹서기로 균질화 및/또는 프레스로 압착하여 액상만을 분리하여 면포 및/또는 필터로 여과과정을 거친 후 121℃로 5-20분간 멸균 후 재여과하여 사용하였다. 대조군으로는 상기 젖산균 발효물을 첨가하지 않은 염장물을 그대로 발효기간과 동일 기간동안 숙성시켜 이용하였다. 젖산균 발효에 의한 유해 미생물 성장 억제 및 젖산균의 증식 유지를 위해, 적절한 젖산균의 투여 시기 및 발효 기간을 달리하여 제조된 각 염장 발효물에 대해 16S rRNA PCR을 수행하여 보관된 발효물 내 미생물 종류를 분석하였다. 1차 시제품 30% 천일염의 경우는 *Enterococcus* sp, *Lactobacillus* sp, *Bacillus* sp, 외의 기타 미생물이 16s DNA 시퀀싱으로 확인되었고 3개월엔 락토바실러스가 확인되었으나 그후에는 기타 미생물들의 번식이 확인되었다(그림 4). 6개월의 L5에서 확인된 락토바실러스는 3회 투입에 의한 생존 결과이다. 30% 정제염의 경우에도 동일한 *Enterococcus* sp, *Lactobacillus* sp, *Bacillus* sp, 외의 기타 미생물이 16s DNA 시퀀싱으로 확인되었고 정제염의 경우는 5개월까지 락토바실러스의 생존이 있는 것으로 확인되었다. , 천일염 함량을 30%로 염장 발효물에서는 첨가된 젖산균이 충분히 증식하지 못한 것을 확인하였으며, 정제염 30%(w/w)로 제조된 염장 발효물의 경우 첨가된 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) 젖산균의 증식이 확인되었다.

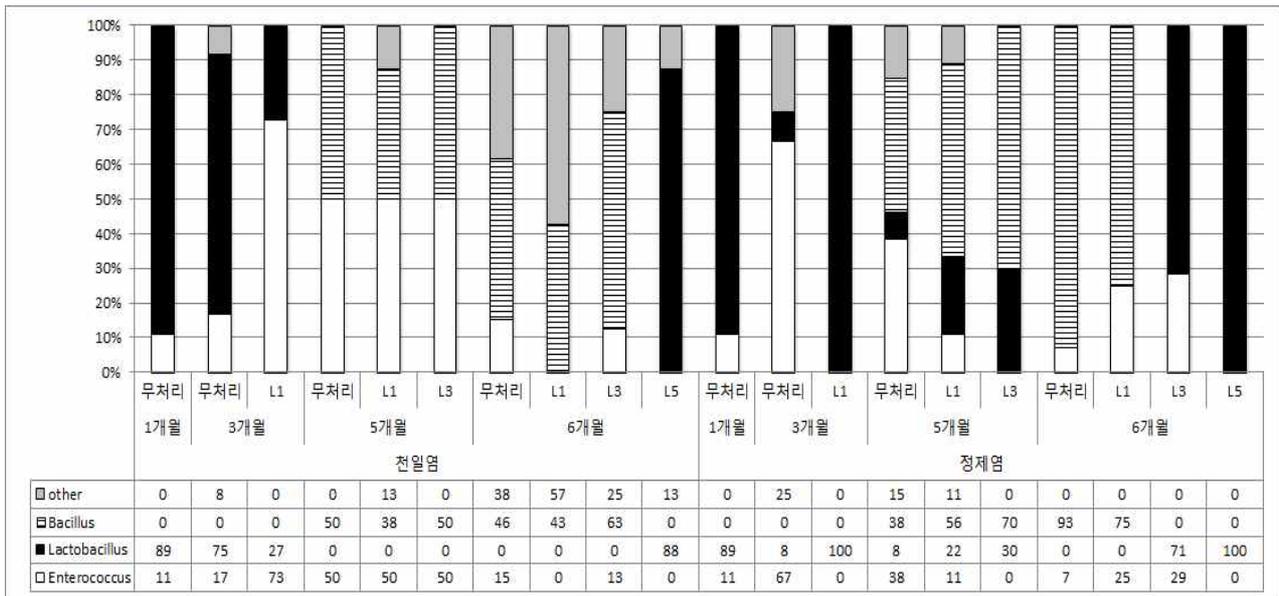


그림 4. 흰점박이꽃무지 유충의 30% 천일염과 정제염에서의 미생물 분포 확인

[표 2] 흰점박이꽃무지 유충의 소금종류 및 농도별 미생물 분포

소금 농도	소금종류	발효물 내 미생물 분포
20%	천일염	Staphylococcus sp 66.6% Bacillus sp 8.4% Listeria sp 8.3% uncultured bacterium 8.3%
20%	정제염	Staphylococcus 54.5%, Listeria sp 27.3%, Entrococcus sp 9.1%, uncultured bacterium 9.1%
30%	천일염	Entrococcus sp.50.4%, Bacillus sp.38.3% uncultured bacterium 13.1%
30%	정제염	Entrococcus sp 11.0%, L.plantarum 22%, Bacillus sp 56.0%, uncultured bacterium 11.0%
40%	천일염	Entrococcus sp 37.5%, L.plantarum 25%, Staphylococcus sp 37.5%
40%	정제염	Entrococcus sp 12.5%, L.plantarum 87.5%

위의 표는 그림 4-6에서 나타난 미생물 분포를 표로 정리한 것이다. 따라서 염장 발효물 제조를 위한 소금 함량이 30%(w/w) 이하인 경우 젖산균의 생균수가 부족하거나 젖산균이 증식하지 못하고 유해 미생물의 발생 가능성이 높아지므로, 이후 실험에서는 염장시 소금 농도를 40%(w/w)로 확립하였다.

이후 실험에서는 정제염과 천일염을 사용한 경우의 조건을 동일하게 하기 위해 두 가지 소금 모두에서 우수한 미생물 성장 억제능을 보인 대로, 40%(w/w)의 소금으로 염장 후, 염장숙성 1주일을 거쳐, 락토바실러스 플란타룸 균주(KCCM12299P)와 웨이셀라 파라메센테로이드(KCCM 12301P) 젖산균 발효를 3개월간 진행하여 염장 발효물을 제조하였다.

4. 다양한 젖산균 배양조건에 따른 염장 발효물 제조

젖산균 발효에 의한 유해 미생물 성장 억제 및 젖산균의 증식 유지를 위해, 적절한 젖산균의 투입 시기 및 발효 기간을 달리하여 제조된 각 염장 발효물에 대해 16S rRNA PCR을 수행하여 보관된 발효물 내 미생물 종류를 분석하였다.

구체적으로, 준비된 흰점박이꽃무지 유충의 분말 12kg과 천일염 8kg을 혼합하여 40%(w/w) 소금 염장물을 제조하고, 상기 염장물을 1주일 또는 1개월간 숙성시킨 후 제조된 흰점박이꽃무지 열수추출물의 젖산균 배양액 1%(w/w)을 첨가하였다. 발효는 25 내지 30°C의 온도를 유지하며 젖산균 투입일 기준으로 1개월, 2개월, 3개월, 또는 5개월 발효시켰다.

대조군으로는 상기 젖산균 발효물을 첨가하지 않은 염장물을 그대로 발효기간과 동일 기간 동안 숙성시켜 이용하였다.

상기 발효를 마친 염장 발효물 시료를 25°C에서 보관한 후, 0.01g/ml의 농도로 물에 희석하여 1%(w/v)의 균질용액 시료를 제조하였다. 상기 균질용액 시료를 이용하여 실질적으로 동일한 방법으로 PCR을 수행하여 16S rRNA 유전자를 증폭하였다. 상기 16S rRNA 유전자의 증폭 산물은 PCR Purification kit(MN, Germanu)를 사용하여 정제한 후 마크로젠(한국) 염기서열 분석업체에 의뢰하여 서열을 확인하고 NCBI Blast 분석을 통해 종을 판정하였다.

하기 표 3에 천일염을 사용한 염장 발효물의 젖산균 투입 시기 및 발효숙성 기간에 따른 미생물 종 및 분포를 나타내었으며, 표 4는 정제염을 사용한 경우의 결과를 나타낸 것이다. 하기 미생물 분포는 전체 16S rRNA 염기서열 분석 결과, 전체 16S rRNA의 시퀀싱 리드 대비 해당 균종으로 밝혀진 시퀀싱 리드의 비율(%)로 표시되었다. 하기 표 3 및 표 4는 40% 천일염 및 40% 정제염 염장물의 발효 조건에 따른 미생물 종류 및 분포(%)를 나타낸다. 그림 7 및 그림 8에 천일염 또는 정제염을 이용한 염장 발효물 제조 조건에 따른 염장 발효물 내 미생물의 분포 그래프를 나타내었다.

[표 3] 40% 천일염 염장물의 발효 조건에 따른 미생물 종류 및 분포(%)

발효기간	젖산균 투입시기	Lactobacillus plantarum	Enterococcus sp.	Staphylococcus sciuri	Bacillus sp.	others
1개월	무처리	25	37.5	37.5	-	-
	1주일	100	-	-	-	-
2개월	무처리	28.6	42.8	-	14.3	14.3
	1주일	100	-	-	-	-
	1개월	100	-	-	-	-
3개월	무처리	14.3	28.6	28.6	-	28.6
	1주일	100	-	-	-	-
	1개월	87.5	12.5	-	-	-
5개월	무처리	-	75	-	-	25
	1주일	87.5	-	12.5	-	-
	1개월	87.5	-	-	-	12.5

표 3 및 그림 7에서 확인할 수 있는 바와 같이, 천일염 40%로 제조한 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 경우, 염장 기간을 1주일 가진 후에 젖산균락토바실러스 플란타룸 균주(KCCM12299P)와 웨이셀라 파라메센테로이드(KCCM 12301P)를 첨가하여 발효하였을 때 발효 기간이 1개월, 2개월 및 3개월일 때 모두 *Lactobacillus plantarum*의 비율이 100%로 나타났으며, 발효 기간이 5개월인 때에는 *Lactobacillus plantarum*이 87.5%, *Staphylococcus sciuri*의 비율이 12.5%로 나타났다. 즉, 40%(w/w) 천일염을 이용한 흰점박이꽃무지 염장 발효물은, 염장물 제조 1주일째에 흰점박이꽃무지 추출물의 젖산균 발효물 투여 후 3개월까지 유효 젖산균이 생존하였으며, 다만 *Weissella paramesenteroides*는 유해 미생물의 성장억제 등에 활용 되고 염에 약하여 생존하지 못하는 것으로 예측되었다.

그러나 동일한 천일염 농도 조건에서, 염장 기간을 1개월로 둔 후에 젖산균락토바실러스 플란타룸 균주(KCCM12299P)와 웨이셀라 파라메센테로이드(KCCM 12301P)를 첨가하여 발효를 수행한 경우에는 처음 2개월 발효를 수행하였을 때에는 일시적으로 *Lactobacillus plantarum*이 100%의 비율로 나타났으나, 3개월째에는 *Lactobacillus plantarum* 87.5%, *Enterococcus* 속 균주가 12.5%로 나타났으며, 5개월 발효를 마친 이후에는 *Lactobacillus plantarum*이 87.5%, 기타 미생물이 12.5%의 비율로 검출되었다.

또한, 젖산균 처리 과정 없이 발효를 수행한 대조군의 경우, 발효 1개월 째에는 락토바실러스 플란타룸이 25%, 2개월 째에는 락토바실러스 플란타룸이 28.6%, 3개월이 되자 락토바실러스의 비율이 14.3%로 감소하고, 5개월 수행하였을 때에는 락토바실러스는 관찰되지 않았으며, 엔테로코쿠스 속 균주의 비율이 75%로 급증하고 기타 균주가 25%로 관측되었다. 종합하면, 천일염 이용시 흰점박이꽃무지 염장 발효물 제조를 위한 젖산균 발효물 투여는 염장 후 1주일째에 이루어졌을 때에 미생물의 성장 억제능이 우수함을 확인할 수 있었다.

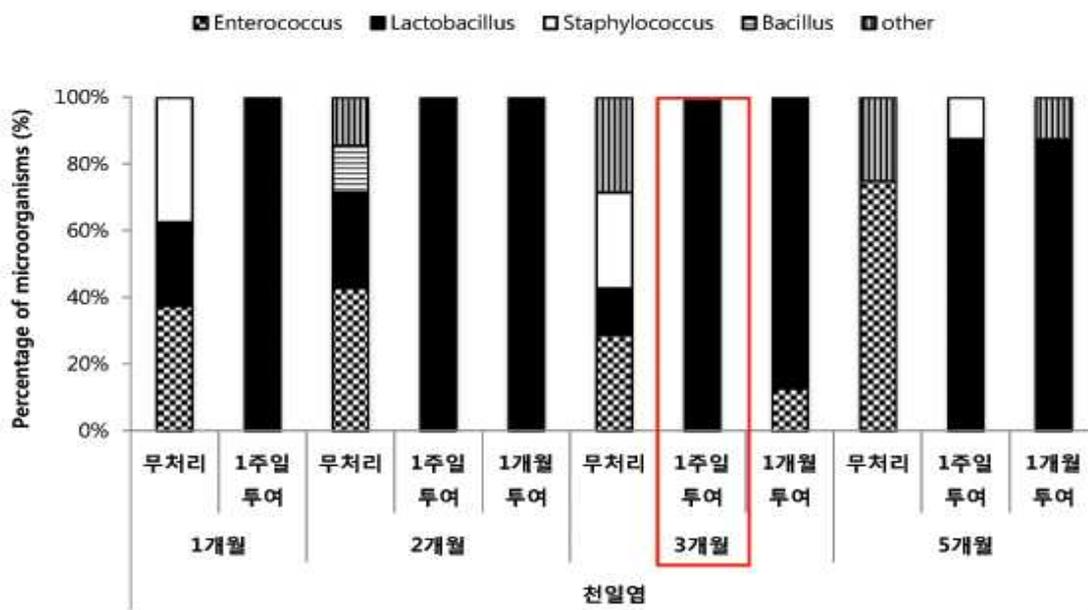


그림 7. 40% 천일염 염장물의 발효 조건에 따른 미생물 종류 및 분포(%)

표 4 및 그림 8 에서 확인할 수 있는 바와 같이, 정제염 40%(w/w)의 농도로 제조된 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 경우, 염장 기간을 1주일 가진 후에 젖산균(락토바실러스 플란타룸 균주(KCCM12299P)와 웨이셀라 파라메센테로이드(KCCM 12301P)을 첨가하여 발효하였을 때 발효기간이 1개월, 2개월, 3개월일 때 모두 *Lactobacillus plantarum*의 비율이 100%로 나타났으며, 발효기간이 5개월인 때에는 *Lactobacillus plantarum*이 87.5%, *Staphylococcus sciuri*의 비율이 12.5%로 나타났다. 즉, 40%(w/w) 정제염을 이용한 흰점박이꽃무지 염장 발효물은, 염장물 제조 1주일째에 흰점박이꽃무지 추출물의 젖산균 발효물 투여 후 3개월까지 유효 젖산균이 생존하였으며, 다만 *Weissella paramesenteroides*는 유해 미생물의 성장억제 등에 활용 되고 염에 약하여 생존하지 못하는 것으로 예측되었다.

또한 동일한 정제염 농도 조건에서, 염장 기간을 1개월로 둔 후에 젖산균(락토바실러스 플란타룸 균주(KCCM12299P)와 웨이셀라 파라메센테로이드(KCCM 12301P)을 첨가하여 발효를 수행한 경우에는, 발효 기간이 2개월, 3개월 및 5개월인 때에 모두 유효 젖산균이 생존하였다. 따라서 정제염을 사용한 경우에는 염장 숙성 기간을 오래 두어도 젖산균 발효 기간이 장기화 되더라도 목적하지 않은 유해 미생물의 발생이 억제됨을 확인하였다.

[표 4] 40% 정제염 염장물의 발효 조건에 따른 미생물 종류 및 분포(%)

발효기간	젖산균 투여시기	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus sciuri</i>	<i>Bacillus</i> sp.	others
1개월	무처리	87.5	12.5	-	-	-
	1주일	100	-	-	-	-
2개월	무처리	75	-	12.5	-	12.5
	1주일	100	-	-	-	-
	1개월	100	-	-	-	-
3개월	무처리	-	37.5	62.5	-	-
	1주일	100	-	-	-	-
	1개월	100	-	-	-	-
5개월	무처리	12.5	50	37.5	-	-
	1주일	87.5	-	12.5	-	-
	1개월	100	-	-	-	-

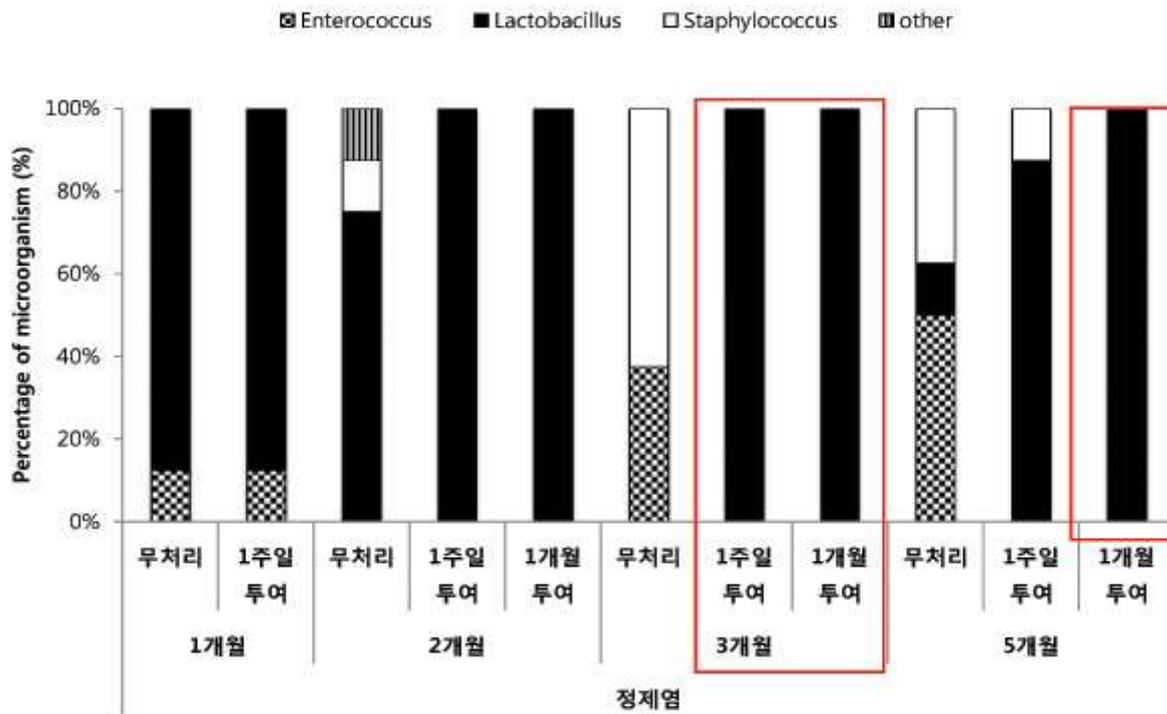


그림 8. 40% 정제염 염장물의 발효 조건에 따른 미생물 종류 및 분포(%)

다만 *Weissella paramesenteroides*는 어느 샘플에서도 발견되지 않아, 염에 약한 특성상 숙성 기간 동안 생존하지 못하였으며, 다만 유해 미생물의 성장 억제 등에 활용되었을 것으로 추측되었다.

따라서, 정제염을 이용하여 흰점박이꽃무지 염장 발효물을 제조하는 경우, 젖산균 발효물을 처리하지 않은 대조군과 비교할 때, 염장물 제조 후 1주일 또는 1개월의 숙성 기간을 거쳐 흰점박이꽃무지 열수추출물의 젖산균 발효물을 투여하는 것이 미생물의 성장 억제능, 미생물에 대한 안전성이 우수함을 확인하였다.

5. 흰점박이꽃무지 유충 염장발효물의 당도, 염도 및 pH 분석

확립된 조건(소금 40%(w/w), 젖산균 발효기간 3개월)에서 제조된 흰점박이꽃무지 염장 발효물에 대한 당도, 염도 및 pH를 시판되고 있는 액젓을 대조군으로 하여 비교하였다. 염장물의 젖산균 무처리 군의 경우, 흰점박이꽃무지 열수추출물의 젖산균 발효물을 미첨가 한 것을 제외하고는 염장 발효물과 동일한 기간 동안 숙성하였다.

구체적으로, pH와 염도는 흰점박이꽃무지 염장 발효물 및 대조군 액젓을 1/10으로 물에 희석한 다음, pH meter(Pettler Tolendo, USA) 및 염도측정기 (PTAGO salt meter, USA)를 이용하여 측정하였다. 당도는 희석 과정 없이 원액 그대로를 당도계(ATAGO Refractometer, USA)로 측정하였다. 표 5에 각 시료의 당도, 염도 및 pH 분석 결과를 나타내었다

[표 4] 흰점박이꽃무지 염장 발효물에 대한 당도, 염도 및 pH 분석

소금종류	젖산균 투입시기(염장기간)	pH	당도 (brix %)	염도 (%)
천일염	젖산균 무처리	6.9	31.5	29.9
천일염	1 주	5.93	32.2	27.2
천일염	1 월	6.03	32.3	27.2
정제염	젖산균 무처리	6.84	30.8	28.2
정제염	1 주	5.94	31.7	27.5
정제염	1 월	6.27	32.0	28.4
멸치액젓(청정원)	-	5.21	34.3	27.5
멸치액젓(씨제이)	-	5.98	36.3	28.0
까나리액젓(청정원)	-	5.41	36.3	28.0
까나리액젓(씨제이)	-	5.53	34.8	27.5
참치액(청정원)	-	5.13	33.1	24.0
참치액(씨제이)	-	4.20	31.2	23.0

천일염으로 염장한 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 pH는 젖산균이 첨가되지 않은 시료는 pH6.9 이고, 젖산균이 첨가된 경우에 염장 숙성 기간이 1주일인 시료에서는 pH 5.93, 염장 숙성 기간이 1개월인 시료에서는 pH 6.03으로 나타났다. 당도는 젖산균 미첨가 시료에서 31.5 brix이나, 젖산균을 첨가한 시료에서는 염장숙성 기간 1주일 및, 1개월일 때 각각 32.2 및 32.3brix로 나타났다. 염도는 젖산균 미처리군이 29.9%로 높았으나, 젖산균을 투여한 그룹에서는 모두 27.2%로 다소 감소하였다.

정제염으로 염장한 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 pH는 젖산균을 첨가하지 않은 시료는 pH6.84 이고, 젖산균을 첨가한 경우에 염장 숙성 기간이 1주일인 시료에서는 pH 5.94, 염장 숙성 기간이 1개월인 시료에서는 pH 6.27로 나타났다. 당도는 젖산균을 첨가하지 않은 그룹에서 30.8 Brix로 나타났으나, 염장 숙성기간 1주일 시료에서는 31.7 brix로 증가하였고, 염장숙성기간이 1개월인 시료에서는 32.0 brix로 나타났다. 염도는 젖산균 미처리군이 28.2%, 염장 숙성 1주일 후 젖산균을 투여한 그룹에서는 27.5%로 나타났으며, 염장숙성 1개월 후 젖산균을 투여한 그룹에서는 28.4%로 나타났다.

시판되는 멸치액젓, 까나리액젓 및 참치액의 pH는 4.52 내지 5.98의 범위에서 나타났으며, 당도는 31.2 내지 36.3 brix%, 염도는 23 내지 28%로 측정되었다.

한국산업규격기준에서는 양조간장의 pH 품질 조건으로 pH 4.5 내지 5.5를 명시하며, 액젓류에 대한 pH 품질 기준은 제시하고 있지 않다. 다만 일본국립민족학박물관 연구보고서 (Kim, 1996)에서는 pH 5.3 내지 6.7를 제시하고 있으며, 본 발명이 제공하는 흰점박이꽃무지 염장 발효물은 상기 일본국립민족학박물관 연구보고서 내의 pH 수치를 만족한다.

본 발명에 따른 흰점박이꽃무지 염장 발효물은 시판되는 액젓류와 염도와 당도가 유사하면서, 염장류 또는 액젓류 식품으로서의 pH 기준을 만족하여, 식품 또는 식품 조성물로서 적합하다.

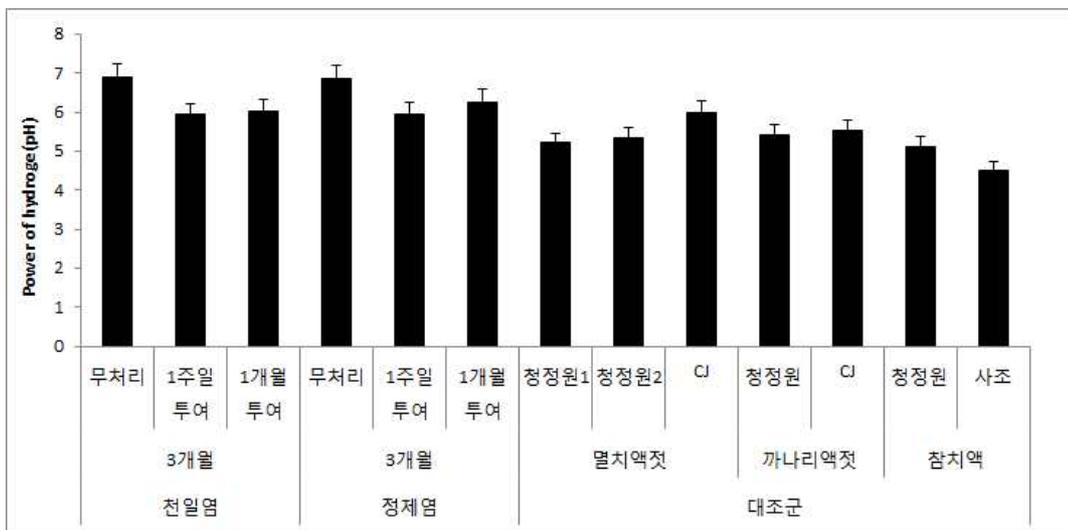


그림 9. 40% 천일염과 정제염 염장물의 시판 소스와의 pH 비교

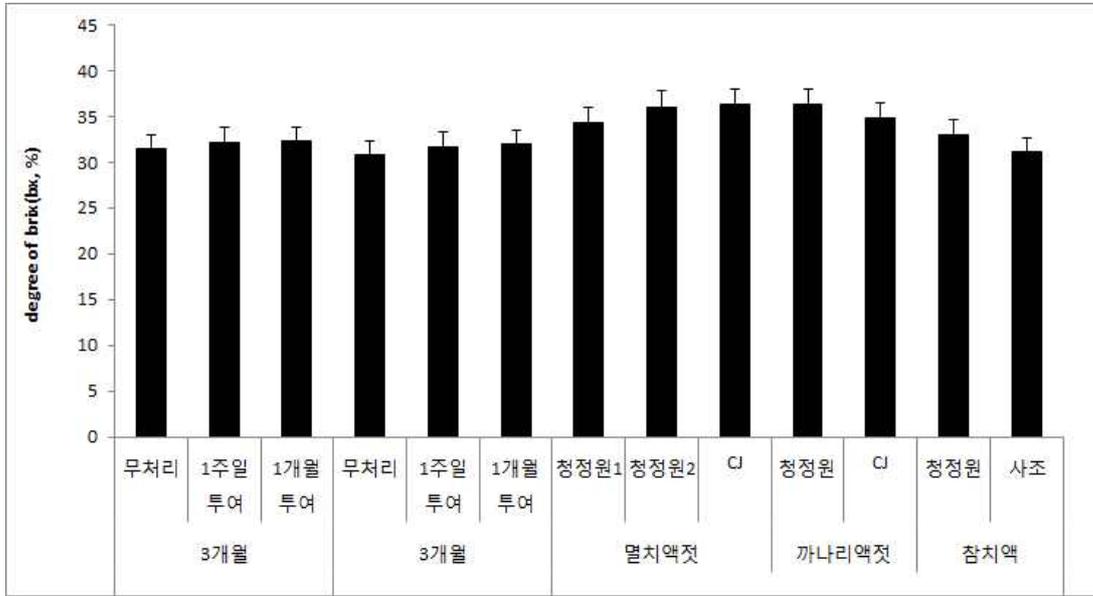


그림 10. 40% 천일염과 정제염 염장물의 시판 소스와의 당도(brix) 비교

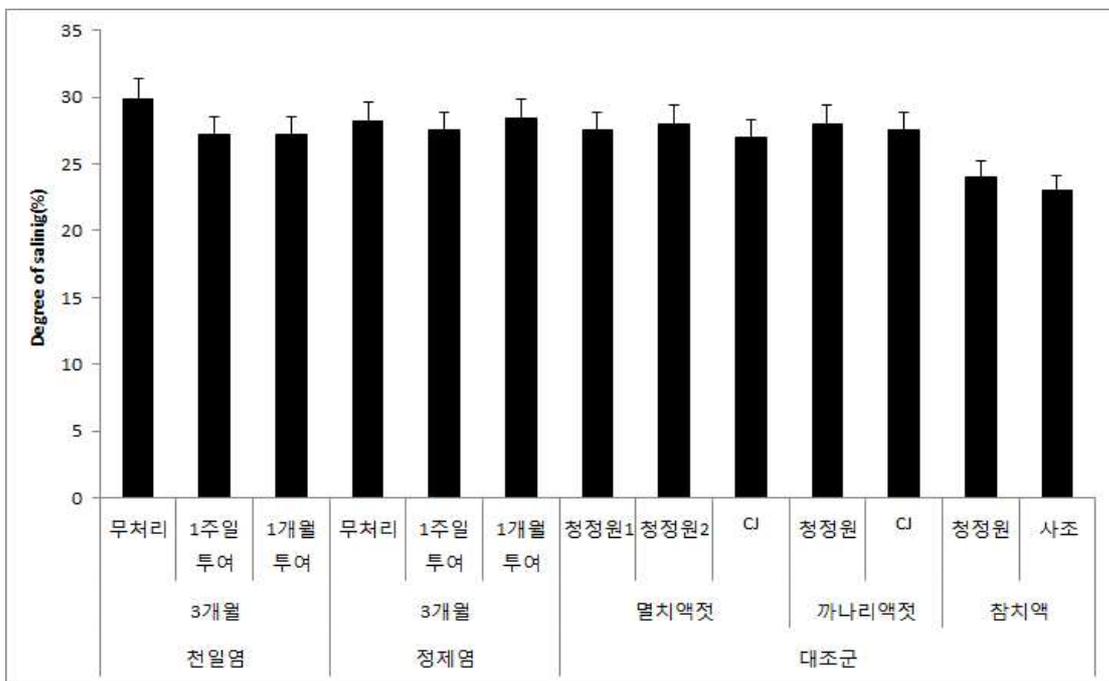


그림 11. 40% 천일염과 정제염 염장물의 시판 소스와의 염도 비교

5. 흰점박이꽃무지 유충 엽장발효물의 성분분석

1) 흰점박이꽃무지 유충 엽장발효물의 성분분석

확립된 조건(소금 40%(w/w), 젖산균 발효기간 3개월)에서 제조된 흰점박이꽃무지 엽장 발효물에 대한 열량, 수분, 조단백질, 탄수화물, 조지방, 총질소, 색소 및 보존료를 분석하였다. 엽장물의 젖산균 무처리 군의 경우, 흰점박이꽃무지 열수추출물의 젖산균 발효물을 미첨가 한 것을 제외하고는 엽장 발효물과 3개월 기간 동안 숙성하였다.

천일염으로 엽장한 흰점박이꽃무지 엽장 발효물의 부처리군의 열량은 24.56 (g/100g), 수분 76.22 (g/100g), 조단백질 10.1 (g/100g), 조탄수화물 4.86 (g/100g), 조지방 0.12 (g/100g)이고 초기 젖산균 투여의 경우는 열량은 18.27 (g/100g), 수분 77.47 (g/100g), 조단백질 12.6 (g/100g), 조탄수화물 2.97 (g/100g), 조지방 0.15 (g/100g)이었다. 정제염으로 엽장한 흰점박이꽃무지 엽장 발효물의 부처리군의 열량은 9.77 (g/100g), 수분 81.75 (g/100g), 조단백질 8.96 (g/100g), 조탄수화물 1.35 (g/100g), 조지방 0.09 (g/100g)이고 초기 젖산균 투여의 경우는 열량은 13.48 (g/100g), 수분 78.18 (g/100g), 조단백질 11.4 (g/100g), 조탄수화물 2.05 (g/100g), 조지방 0.08 (g/100g)로 나타났다. 총질소의 경우 천일염과 정제염의 경우 무처리의 경우가 각각 0.16 %, 0.15 %로 었으나, 젖산균을 투여한 그룹에서는 모두 0.2 %, 0.18%로 다소 높게 나타났다.

타르색소는 모두 불검출이고 보존료의 경우 안식향산이 천일염과 정제염에서 모두 0.01 g/kg 이고 파라옥시안식향산, 소브산, 프로피온산은 검출되지 않았다.

[표 5] 흰점박이꽃무지 엽장 발효물에 대한 성분분석

단위	3개월 숙성 꽃병이장	천일염		정제염	
		무처리	초기젖산균투여	무처리	초기젖산균투여
(kcal/100g)	열량	24.56	18.27	9.77	13.48
일반성분 (%, g/100g)	수분	76.22	77.47	81.75	78.18
	조단백질	10.1	12.6	8.90	11.4
	조탄수화물	4.86	2.97	1.35	2.05
	조지방	0.12	0.15	0.09	0.08
(%, w/v)	총질소	0.16	0.2	0.15	0.18
색소 및 보존료 (g/kg)	타르색소	불검출	불검출	불검출	불검출
	안식향산	0.01	0.01	0.01	0.01
	파라옥시안식향산	불검출	불검출	불검출	불검출
	소브산	불검출	불검출	불검출	불검출
	프로피온산	불검출	불검출	불검출	불검출

2) 흰점박이꽃무지 유충 영양발효물의 유리아미노산 분석

확립된 조건(소금 40%(w/w), 젖산균 발효기간 3개월)에서 제조된 흰점박이꽃무지 영양 발효물에 대한 유리아미노산을 분석하였다. 천일염과 정제염의 영양물에서 프롤린이 가장 많았고 다음으로는 글루탐산, 글리신, 알라닌, 아르기닌 순이었다. 정제염보다는 천일염의 아미노산이 더 아미노산의 양이 많았고 무처리군보다는 초기젖산균 투여군이 높게 나타났다.

[표 6] 흰점박이꽃무지 영양 발효물에 대한 유리아미노산

유리아미노산 (mg/100g)	천일염		정제염	
	무처리	초기젖산균투여	무처리	초기젖산균투여
트레오닌	13.35	15.71	11.63	15.25
시스틴	2.82	5.28	3.64	5.21
티로신	8	14.44	9.3	11.49
아르기닌	33.34	41.97	26.89	35.58
알라닌	64.14	75.79	56.47	67.57
프롤린	270.45	370.97	201.19	286.47
라이신	16.89	20.72	16.67	19.058
히스티딘	29.95	35.44	23.41	26.65
이소로이신	9.27	11.83	9.64	13.3
로이신	8.27	7.08	6.76	7.95
메티오닌	5.21	3.39	3.89	4.01
페닐알라닌	4.46	4.96	7.14	6.64
트립토판	3.03	8.27	8.28	2.87
발린	23.55	27.84	20.09	23
글루탐산	89.21	100.2	81.79	99.1
아스파라긴산	7.98	7.71	7.75	9.37
세린	5.2	7.79	5.89	7.72
글리신	90.8	112.1	76.65	93.01

3) 흰점박이꽃무지 유충 영양발효물의 중금속 저감능 분석

흰점박이꽃무지 영양 발효물 내의 중금속 함량을 조사하여 본원 영양발효물 내 중금속 함량 저감 효과를 확인하였다.

구체적으로, 흰점박이꽃무지 영양 발효물은 천일염 또는 정제염을 40%(w/w) 함량으로 흰점박이꽃무지와 혼합하여 영양물 (미생물 무처리군)을 제조하고, 1주일 간 영양 숙성 후 흰점박이꽃무지 열수추출물의 젖산균 발효물을 첨가하여 3개월간 발효 숙성을 수행하여 제조된 것으로서 동일하다. 대조군은 흰점박이꽃무지 건조분말을 사용하였다.

상기 표 7에서 확인할 수 있는 바와 같이, 식품의약품처의 식품공전에 제시된 식용곤충의 중금속 기준값(카드뮴 0.05 mg/kg, 수은 0.5 mg/kg, 비소 0.1 mg/kg)과 비교하여, 대조군의 중금속 함량은 약 3배 내지 10배 높은 값을 나타내었다.

흰점박이꽃무지의 영양물 또는 영양 발효물은, 카드뮴 함량은 0.0013 및 0.0021 mg/kg으로, 대조군에 비해 약 62배 내지 102배 감소하였으며, 식품공전의 중금속 기준값을 충족하였다.

수은은 모든 시료 영양물 또는 영양발효물에서 검출되지 않았으며, 비소의 경우 0.0091 및 0.0145 mg/kg로 검출되어 대조군에 비해 약 690배 내지 1,100배 감소하였으며, 식품공전의 기준보다 현저히 낮은 비소 수치를 보였다.

크롬은 모든 시료 영양물 또는 영양발효물에서 1.14 ug/100g 및 1.97 ug/100g으로 나타나, 대조군에 비해 2배 내지 20배 이상 감소하였다.

따라서 본 발명에 따른 흰점박이꽃무지의 영양물 또는 영양 발효물은, 소금 및 젖산균에 의한 숙성 과정을 거치며 유해 중금속 성분의 식품 내 함량이 현저히 감소하여, 식품으로서 적합하고 인체 안전성이 우수함을 확인하였다.

[표 6] 흰점박이꽃무지 영양 발효물에 대한 중금속 분석

시료	카드뮴(mg/kg)	수은(mg/kg)	비소(mg/kg)	크롬(ug/100g)
40% 천일염 무처리	0.0015	불검출	0.0113	1.14
40% 천일염 젖산균 초기	0.0016	불검출	0.0115	1.97
40% 정제염 무처리	0.0013	불검출	0.0091	1.18
40% 정제염 젖산균 초기	0.0021	불검출	0.0145	1.83
흰점박이 건조물 대조군	0.1326	0.0236	10.0129	27.28

6. 흰점박이꽃무지 유충 영양발효물의 항산화 분석

흰점박이꽃무지 영양 발효물의 항산화 효과를 확인하기 위해 발효 숙성 기간을 달리 하여 2,2-디페닐-1-피크릴히드라질 (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH)를 이용하여 자유라디칼 소거 활성 분석을 수행하였다.

구체적으로, 흰점박이꽃무지 영양 발효물은, 영양시 소금(천일염 또는 정제염) 농도는 40%(w/w)가 되도록 하고, 1주일 간 영양숙성 후 젖산균을 첨가하여 1개월, 3개월 또는 5개월간 발효 숙성을 수행하여 제조되었다.

표 7에서 영양에 천일염을 사용한 시료 중에서, 무숙성 시료의 DPPH 억제율 100을 기준으로 숙성 기간이 다양한 시료의 DPPH 억제율의 상대적인 수치를 계산하여 상대 DPPH억제율(%)로 표시하였다. 또한, 정제염을 사용한 시료 5-5 내지 5-8 중에서, 무숙성 시료인 5-5의 DPPH 억제율 100을 기준으로 숙성 기간이 다양한 시료 내지 의 DPPH 억제율의 상대적인 수치를 계산하여 상대 DPPH억제율(%)로 표시하였다.

[표 7] 흰점박이꽃무지 영양 발효물에 대한 항산화(DPPH) 분석

영양	영양숙성기간	젖산균 발효기간	DPPH 억제율 (%)	상대 DPPH억제율(%)
천일염 40%(w/w)	무숙성	-	35.7	100%
천일염 40%(w/w)	1주	1개월	30.9	86.6%
천일염 40%(w/w)	1주	3개월	69.4	194.4%
천일염 40%(w/w)	1주	5개월	51.0	142.9%
정제염 40%(w/w)	무숙성	-	37.4	100%
정제염 40%(w/w)	1주	1개월	32.8	87.7%
정제염 40%(w/w)	1주	3개월	45.8	122.5%
정제염 40%(w/w)	1주	5개월	37.4	100%
Vitamin C	-	-	99.4	-

천일염을 사용한 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 경우, 염장하고 발효 숙성을 수행하지 않은 천일염 대조군에 비해, 발효 숙성 기간이 1개월인 때에는 DPPH 억제율이 30.9%로 일시적으로 낮아졌으나, 발효 숙성 기간이 3개월인 때에는 DPPH 억제율이 69.4%로 증가하였고, 발효 숙성 기간이 5개월이 되자 DPPH 억제율이 다시 51%로 감소하였다. 상기 천일염을 이용하여 3개월간 발효 숙성을 진행한 염장 발효물은 무숙성 천일염 대조군에 비해 99.4%가 증가한 상대적인 DPPH 억제율을 나타내어, 항산화 효과가 향상되었으며, 5개월간 발효 숙성이 진행된 염장 발효물의 경우에도 천일염 대조군에 비해 42.9%가 증가한 높은 DPPH 억제율을 보여 우수한 항산화 효과를 확인하였다. 따라서 흰점박이꽃무지 열수추출물의 젖산균 발효물을 첨가한 후 3개월간 숙성시킨 염장 발효물이 가장 높은 항산화 효능이 있는 것으로 조사되었다.

정제염을 이용하여 제조된 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 경우, 염장하고 발효 숙성을 수행하지 않은 정제염 대조군(시료 5-5)의 DPPH 억제율(37.4%)에 비해, 1개월간 발효 숙성을 거친 발효물(시료 5-6)에서는 DPPH 억제율이 32.8%로 일시적으로 수치가 낮아졌으나, 3개월 발효 과정을 거친 발효물(시료 5-7)은 DPPH 억제율이 45.8%로, 대조군에 비해 22.5% 증가하였고, 5개월간 발효 숙성을 수행한 발효물에서는 37.4%의 DPPH 억제율을 보여, 발효 숙성 기간이 3개월인 때에 가장 높은 항산화 효능을 확인하였다.

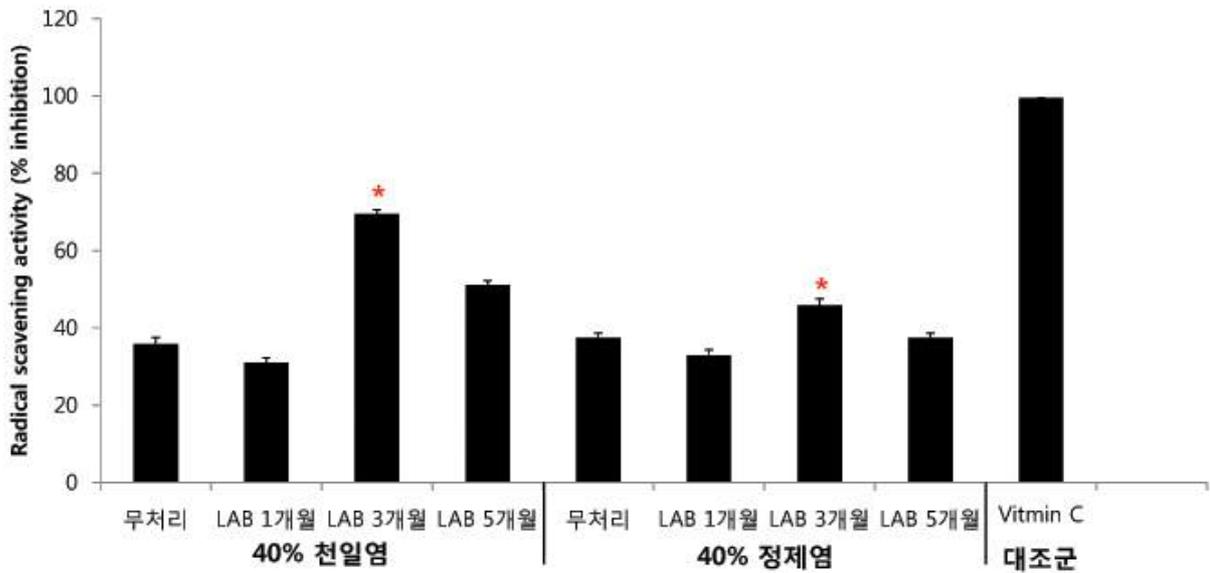


그림 12. 40% 천일염과 정제염 염장물의 항산화(DPPH) 분석

7. 흰점박이꽃무지 유충 염장발효물의 가바함량 분석

흰점박이꽃무지 염장 발효물의 가바 함량의 증가 여부를 확인하기 위해, 정제염 또는 천일염 함량 40%(w/w)로 제조한 흰점박이꽃무지 유충의 건조 분말을 염장하여 1주일 또는 1개월간 숙성하고, 제조한 *Lactobacillus plantarum* 배양물을 첨가하여 3개월간 발효하여 염장 발효물을 제조하였다.

제조된 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 가바 함량을 동일한 방법으로 TLC 분석을 통해 확인하였다. 대조군으로는 GABA 1%(w/v) 용액을 이용하였다.

그림 13에 TLC 결과를 나타냈으며, 대조군은 GABA 1%(w/v) 용액이고 레인 1 내지 레인 6은 표에 나타낸 시료에 각각 해당된다.

그림 13에서 확인할 수 있는 바와 같이, 젖산균을 첨가하지 않은 염장물에서도 GABA의 함량이 확인되었으나, 1주일간 염장숙성 후 젖산균을 첨가하여 발효 숙성을 거친 시료에서 GABA를 나타내는 Band가 더 진하게 나타나, 가바의 함량이 증가하였음을 정성적으로 확인하였다.

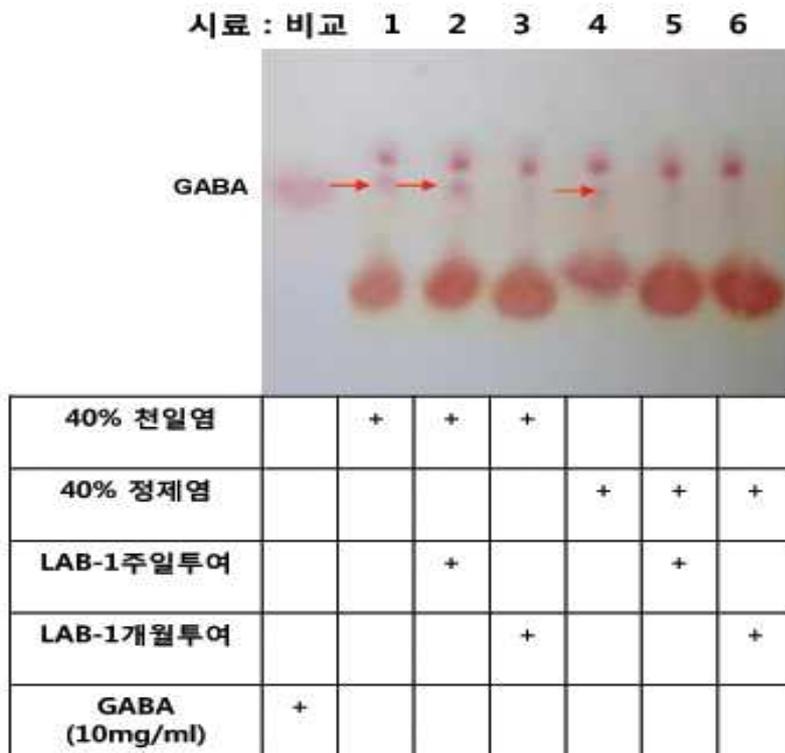


그림 13. 40% 천일염과 정제염 염장물의 가바 확인

8. 흰점박이꽃무지 유충 염장발효물의 세포주 독성 실험

1) 마우스 대식세포주에서의 독성 실험

흰점박이꽃무지 염장 발효물의 안전성을 확인하기 위해, 마우스 세포주인 Raw264.7 cell(ATCC TIB-71)에서 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 독성 실험을 수행하였다.

구체적으로, 실험에 이용된 Raw264.7 cell 세포주는 10%(v/v) 소태아혈청(fetal bovine serum), 및 1%(w/v) Penicillin-streptomycin이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's Medium(DMEM) 배지에서 37°C, 5% CO2 조건에서 배양하였다.

실험에 이용된 염장 발효물은 대조군으로 시판 멸치액젓 2종 (청정원, 씨제이), 까나리액젓 2종 (청정원, 씨제이) 및 참치액 2종(청정원, 씨제이)을 사용하였다.

각 시료는 상기 배양된 Raw264.7 세포주에 1mg/ml 농도로 첨가한 후에, 24시간동안 배양한 후 세포 생존율(Cell viability, % of control)을 MTT assay 방법으로 측정하여, 그 결과를 도 6a 및 표 8에 나타내었다. 음성 대조군(Control)으로는 상기 시료를 대신하여 새로운 DMEM 배지(fresh DMEM)를 첨가하여 세포 생존율을 측정하였으며, 대조군의 세포생존율을 100%로 두었을 때의 각 시료의 세포 생존율을 상대적으로 계산하였다. 하기 표 8의 시료는 염도가 높아 희석하여 0.1% 시료를 사용하여 분석하였다.

[표 8] 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 마우스 세포주인 Raw264.7에서의 독성 실험

염장조건/종류	젓산균 첨가시기/회사	세포생존율(%)
40% 천일염	무첨가	98.8
40% 천일염	염장1주일 경과시점	100.4
40% 천일염	염장1개월 경과시점	101.5
40% 정제염	무첨가	107.5
40% 정제염	염장1주일 경과시점	105.8
40% 정제염	염장1개월 경과시점	110.7
멸치액젓	(청정원)	92.7
멸치액젓	(CJ)	102.5
까나리액젓	(청정원)	95.1
까나리액젓	(CJ)	96.7
참치액	(청정원)	91.5
참치액	(CJ)	98.92
대조군	(DMEM 배지)	100

그림 14 및 표 8에 나타난 바와 같이, 각 시료를 처리한 Raw264.7세포는 천일염을 이용한 흰점박이꽃무지 염장물의 젖산균 무처리군을 제외하고는 모두에서 세포수가 대조군 대비 100% 정도로 유지되거나 소폭으로 세포 생존율이 증가됨을 확인할 수 있었다. 시판 액젓 시료는 멸치액젓(CJ) 외에는 대조군 대비 세포수가 소폭 감소하는 것으로 확인되었다. 따라서, 본 발명의 흰점박이꽃무지 염장물은 시판되는 액젓류에 비해 Raw264.7 세포주에 대해 독성이 낮고 안전함을 확인할 수 있었다.

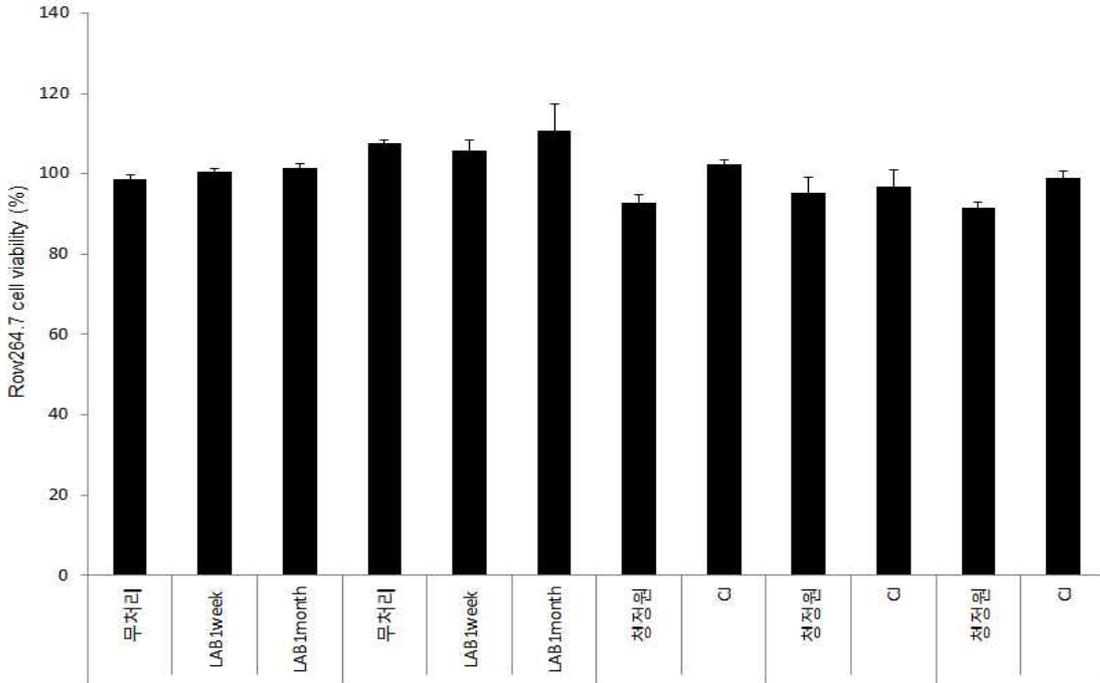


그림 14. 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 마우스 대식세포주인 Raw264.7에서의 안전성

2) 마우스 지방세포에서의 세포주 독성 실험

흰점박이꽃무지 염장 발효물의 젖산균 첨가 전 염장 숙성 기간에 따른 인간 비만세포에 대한 세포주 독성 실험을 수행하였다. 상기 인간 비만 세포는 3T3-L1(ATCC CRL-3242) 세포주를 이용하였으며, 독성 시험은 Cell counting kit-8 (CCK-8, Dojindo)을 이용하여 측정하였다.

구체적으로, 실험에 이용할 3T3-L1 세포주는 10%(v/v) 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS), 1%(w/v) 페니실린-스트렙토마이신(Penicillin-streptomycin)이 첨가된 DMEM 배지에서, 37°C, 5% CO₂배양조건에서 배양하였다.

실험에 이용된 염장 발효물은 상기 시료는 마우스 세포 실험과 동일하고, 대조군으로 시판 멸치액젓 2종 (청정원, 씨제이), 까나리액젓 2종(청정원, 씨제이) 및 참치액 2종(청정원, 씨제이)을 사용하였다.

세포 생존율(Cell viability, % of control)은 상기와 동일한 방법으로 측정하여, 표 9과 그림 15에 측정 결과를 나타냈다. 표 9의 시료는 염도가 높아 희석하여 0.1% 시료를 사용하여 분석하였다.

[표 9] 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 마우스 지방세포주인 3T3-L1에서의 독성 실험

염장조건/종류	젖산균 첨가시기/회사	세포생존율(%)
40% 천일염	무첨가	81.2
40% 천일염	염장1주일 경과시점	103.6
40% 천일염	염장1개월 경과시점	100.4
40% 정제염	무첨가	82.5
40% 정제염	염장1주일 경과시점	84.6
40% 정제염	염장1개월 경과시점	98.2
멸치액젓	(청정원)	83.6
멸치액젓	(CJ)	109.8
까나리액젓	(청정원)	83.1
까나리액젓	(CJ)	79.1
참치액	(청정원)	100.4
참치액	(CJ)	104.8
대조군	(DMEM 배지)	100

그림 15 및 표 9에 나타난 바와 같이, 젖산균을 첨가하지 않은 천일염 흰점박이꽃무지 염장 물을 제외하고는 젖산균을 첨가하여 발효숙성을 수행한 시료 모두에서 세포수가 대조군 대비 100% 정도로 유지되거나 소폭으로 감소하여, 세포가 증식됨을 확인할 수 있었다. 시판 액젓 시료에서는 멸치액젓(CJ) 및 참치액은 대조군(DMEM배지)대비 세포수가 유지되거나 소폭 증식하였으나 멸치액젓(청정원)과 까나리액젓 시료에서는 세포 수가 감소하는 것으로 확인되었다. 따라서, 본 발명의 흰점박이꽃무지 염장 발효물은 3T3L1세포주에 대해 독성이 낮고 안전함을 확인하였다.

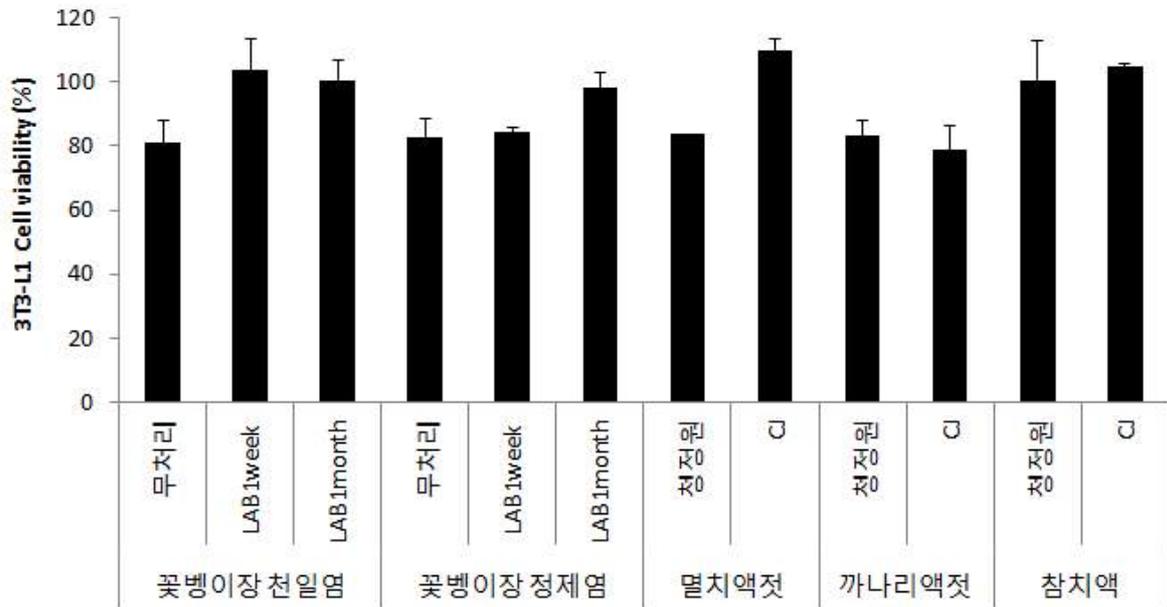


그림 15. 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 마우스 지방세포주인 3T3-L1에서의 안전성

9. 흰점박이꽃무지 유충 염장발효물의 지방축적 억제 실험

흰점박이꽃무지 염장 발효물의 인간 비만세포(3T3-L1) 내에서 중성지방 함량 저감 효과를 가지는 지 여부를 확인하였다.

인간 비만세포(3T3-L1)는 실질적으로 동일한 조건에서 배양되었으며, 세포 배양 플레이트 내에 세포가 90% 이상 차게 되면 PBS(Phosphate buffered saline)으로 2회 세척하고 Trypsin-EDTA(wellGENE, Korea)를 처리한 후 원심분리하여 세포를 수집해 5X10⁵ cells/well의 밀도로 6-well plate의 각 웰에 세포를 분주하였다. 각 Well에는 동일한 배양 배지가 첨가되었으며, 다시 6-well plate에서 세포가 90% 정도 각 웰에 차게 되면 48시간 방치하였다. 그런 후에 세포의 분화 유도를 위해서, DMEM에 10%(v/v) FBS와 23mg/ml IBMS(sigma USA), 5mg/ml insulin(Sigma, USA), 1Mm dexamethasone(Sigma, USA)이 첨가된 배지를 처리하여 세포 분화를 48시간 동안 유도한 후에, 2일마다 10%(v/v) FBS DMEM 배지에 5mg/ml 인슐린(insulin)이 첨가된 배지로 교체하였다. 양성 대조군으로는 5mg/ml 인슐린을 포함하는 10%(v/v) FBS DMEM 배지를 첨가하였다.

흰점박이꽃무지 염장물 또는 염장 발효물은 천일염 또는 정제염을 40%(w/w) 농도로 사용하여 염장을 수행하고, 발효물은 염장 숙성 1주일 후 흰점박이꽃무지 열수추출물의 젖산균 발효물을 투여하여 다시 3개월간 발효한 것이다.

각 시료를 최종 농도 0.1%(v/v)가 되도록 물에 희석하고, 각 희석된 시료를 분화 유도 배지의 첨가 시점부터 함께 3T3-L1 세포주에 처리되었으며, 9일 동안 분화 과정을 거친 3T3-L1 세포주에서 배지를 제거하고, PBS로 세척한 후, 10%(v/v) 포름알데히드(formaldehyde) 용액으로 10분간 고정하고, PBS로 세척한 후 Oil Red-O 용액을 처리하여 실온에서 20분간 염색하였다. 각 세포 내 지방 함량을 확인하기 위해, 염색 과정을 마친 후 oil-Red-O 용액을 제거하고 증류수로 3회 세척한 다음, 염색된 세포를 100% 이소프로판올(isopropanol)을 이용하여 지방을 추출한 후, 510nm에서 흡광도를 측정하고, 대조군의 흡광도 값에 대한 백분율 값을 상대적 지방 축적률과 비교하여 그 결과를 그림 16과 표 10에 나타내었다.

[표 10] 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 지방분화 저감능 실험

염장조건/종류	젖산균 첨가시기/회사	세포생존율(%)
40% 천일염	무첨가	92.2
40% 천일염	염장1주일 경과시점	74.1
40% 정제염	무첨가	89.2
40% 정제염	염장1주일 경과시점	76.7
대조군	인슐린첨가군	100

천일염과 정제염을 사용한 경우에 모두 젖산균 발효를 수행하지 않은 시료의 지방축적률은 89.2% 및 92.2%이며, 젖산균을 첨가하여 발효 숙성을 진행한 시료는 지방축적률이 74.1% 및 76.7%로 크게 감소하였다. 따라서 본 발명에 따른 흰점박이꽃무지 염장 발효물은 비만세포 내에서 지방 축적을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다.

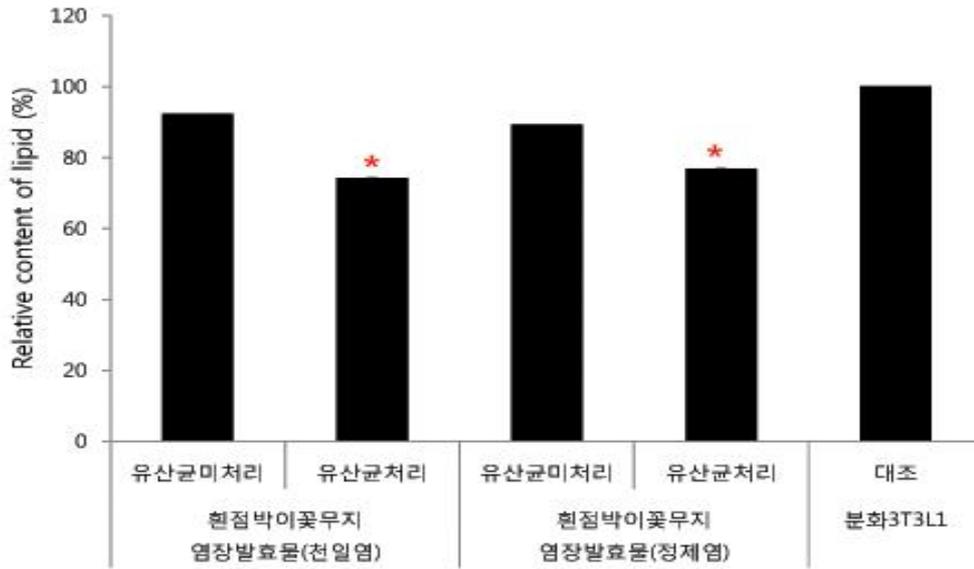


그림 16. 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 3T3-L1에서의 지방분화 확인

10. 흰점박이꽃무지 염장 시제품 제작

흰점박이꽃무지 염장물을 제조하기 위하여, 소금의 종류로는 천일염을 준비하였다. 흰점박이꽃무지 유충과 상기 각 소금의 혼합비는, 유충 14kg에 소금 6kg, 또는 유충 12kg에 소금 8kg를 혼합하여 소금 함량 30%(w/w) 또는 소금 함량 40%(w/w)로 준비하였다. 흰점박이꽃무지 염장 발효물을 제조하기 위하여, 단순히 절식한 흰점박이꽃무지 유충을 0.75% 식염수 또는 해양심층수 등으로 세척하고 소금을 혼합한 후 염장하고 염장기간 1개월이 경과하였을 때에 제조한 젖산균 배양물의 동결건조물을 최종 농도가 1%(w/w)가 되도록 200g을 혼합하였다. 젖산균 첨가 후 발효는 25 내지 30℃ 온도로 유지하여 수행하였다. 상기 염장물을 3개월간 숙성시킨 후, 제조된 흰점박이꽃무지 열수추출물의 젖산균 배양액 1%(w/w)을 첨가하였다. 발효는 25 내지 30℃의 온도를 유지하며 젖산균 투여일 기준으로 3개월, 또는 6개월 발효시켰다. 각 발효가 완료된 흰점박이꽃무지 염장물은 믹서기로 균질화 및/또는 프레스로 압착하여 액상만을 분리하여 면포 및/또는 필터로 여과과정을 거친 후 121℃로 5-20분간 멸균 후 재여과하여 사용하였다. 대조군으로는 상기 젖산균 발효물을 첨가하지 않은 염장물을 그대로 발효기간과 동일 기간 동안 숙성시켜 이용하였다.



그림 17. 흰점박이꽃무지 염장 시제품의 제조과정

11. 흰점박이꽃무지 염장 시제품의 성분분석

확립된 조건(소금 40%(w/w), 젖산균 발효기간 3개월)에서 제조된 흰점박이꽃무지 염장 시제품에 대한 열량, 수분, 조단백질, 탄수화물, 조지방, 총질소, 색소 및 보존료를 분석하였다. 염장 발효물과 3개월 기간 동안 숙성한 것을 편치 유무에 따른 상층액과 편치한 것을 믹서기로 분쇄한 것에 대한 결과이다.

[표 11] 흰점박이꽃무지 염장 시제품의 성분분석

	시험 검사 항목	단위	4차발효소스 상층액	4차발효소스편치, 분쇄	4차발효소스편치, 상층액
일반 성분	열량	(Kcal/100g)	23.93	26.6	23.43
	탄수화물	(%)	3.75	3.32	3.44
	조단백질	(%)	2.03	3.06	2.17
	조지방	(%)	0.09	0.12	0.11
	수분	(%)	67.81	67.82	68.02
	회분	(%)	26.32	25.68	26.26
질소	총질소	(%)	0.33	0.49	0.34
중금속	크롬	µg/100g	3.45	4.24	5.53
	카드뮴	(mg/kg)	0.0022	0.0009	0.0002
	비소	(mg/kg)	0.0143	0.0739	0.0433
	수은	(mg/kg)	0.0004	0.0006	0.0003
유리 아미노산	트레오닌	(mg/100g)	21.44	36.09	25.54
	시스틴	(mg/100g)	불검출	3.54	3.46
	티로신	(mg/100g)	14.95	38.33	23.46
	아르기닌	(mg/100g)	39	65.59	53.55
	알라닌	(mg/100g)	140.67	171.07	129.63
	프롤린	(mg/100g)	491.02	611.23	497.51
	라이신	(mg/100g)	41.77	90.37	52.74
	히스티딘	(mg/100g)	30.55	50.66	34.52
	이소로이신	(mg/100g)	18.63	31.61	20.69
	로이신	(mg/100g)	17.17	34.86	21.55
	메티오닌	(mg/100g)	5.02	10.32	6.35
	페닐알라닌	(mg/100g)	8.9	17.73	11.65
	트립토판	(mg/100g)	4.66	11.13	7.28
	발린	(mg/100g)	44.43	66.62	46.76
	글루탐산	(mg/100g)	71.87	142.51	97.19
	아스파라긴산	(mg/100g)	17.7	40.94	22.04
세린	(mg/100g)	23.12	39.13	28.84	
글리신	(mg/100g)	198.86	217.16	192.75	
기타	타르색소		불검출	불검출	불검출
보존료	안식향산	(g/kg)	0.02	0.02	0.02
	파라옥시안식향산	(g/kg)	불검출	불검출	불검출
	소브산	(g/kg)	불검출	불검출	불검출

12. 흰점박이꽃무지 염장 시제품



흰점박이꽃무지 유충은 분말화 이전에 1일 내지 5일간 또는 3일 내지 5일간 절식과정이 필요하다. 절식 단계는 흰점박이꽃무지 유충에게 식이를 급여하지 않는 방법 또는 찹쌀가루만을 급여하는 방법으로 수행될 수 있다. 상기 절식 단계를 거침으로써 흰점박이꽃무지 유충의 장내 이물질을 제거할 수 있다. 절식 기간이 1일 미만인 경우 장내 잔여 이물질이 충분히 제거되지 않을 수 있으며, 5일 이상 절식이 수행되는 경우 유충이 사망 또는 영양상태가 불량하게 될 수 있다.

염장 단계에 있어서, 소금은 식용이 가능한 것이면 제한 없이 이용할 수 있으며, 예를 들어 정제염, 천일염, 암염, 재제조염, 자염, 암염 및 정염으로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 소금일 수 있다. 일 예에서, 상기 소금은 정제염 또는 천일염이 사용에 용이하다. 흰점박이꽃무지와 소금의 혼합물은, 혼합물 내 소금 함량이 25 내지 45 중량%, 30 내지 45중량%, 34 내지 45 중량%, 25 내지 43 중량%, 30 내지 43중량%, 34 내지 43 중량%, 25 내지 41 중량%, 30 내지 41중량%, 35 내지 41 중량%, 25 내지 40 중량%, 30 내지 40중량%, 또는 34 내지 40 중량% 정도가 염장에 용이한 농도이다. 상기 소금의 농도가 지나치게 낮으면 유해 미생물의 발생 가능성이 높아질 수 있으며, 소금 농도가 지나치게 높은 경우 소금이 과포화상태가 되어 녹지않거나, 용해되어 시판되는 액젓의 28-29 % 염도보다 높아지거나, 젖산균에 의한 발효가 일어나지 않을 수 있다.

염장하는 단계에서, 염장 기간은 유해 미생물의 번식을 막고 젖산균이 적절히 성장할 수 있는 조건이 되도록 적절한 기간을 선택할 수 있으며, 예를 들어, 1일 내지 3개월, 1일 내지 2개월 1일 내지 1개월, 3일 내지 3개월, 3일 내지 2개월, 3일 내지 1개월, 5일 내지 3개월, 5일 내지 2개월, 5일 내지 1개월, 7일 내지 3개월, 7일 내지 2개월 또는 7일 내지 1개월일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 염장 온도는 10 내지 30℃, 10 내지 25℃, 20 내지 30℃ 또는 20 내지 25℃일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 염장 온도가 지나치게 높은 경우 소금의 결정화 되어 염도가 높아지거나 유해 미생물의 증식이 증가하여 젖산균 생장이 방해될 수 있으며, 염장 온도가 지나치게 낮은 경우, 젖산균의 생균수가 적어지거나 숙성일수가 길어질 수 있다.

젖산균은, 젖산균 발효를 위해 적절한 형태, 예를 들어, 정제된 젖산균 또는 배양물의 형태로 첨가될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 젖산균은 흰점박이꽃무지 또는 이의 건조분말을 용매 추출한 후 젖산균을 접종하여 발효한 발효물의 형태로 첨가되었다. 일 예에서, 상기 젖산균이 배양물의 형태로 첨가되는 경우, 상기 배양물은 흰점박이꽃무지 추출물의 젖산균 발효물일

수 있다. 흰점박이꽃무지 추출물의 젖산균 발효물은, 흰점박이꽃무지의 용매 추출물에 젖산균을 접종하고 발효하여 제조할 수 있다. 상기 젖산균을 접종하고 발효하는 과정에서, 지방산 폴리글리콜 에스테르 등의 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 또한 호기상태를 유지하기 위해 산소 또는 산화-함유 기체(공기)를 주입할 수 있다.

젖산균 발효물 제조를 위한, 흰점박이꽃무지의 용매 추출물은, 흰점박이꽃무지 유충, 이의 건조물 또는 분쇄물을 추출 용매로 추출하여 제조된 것이다. 상기 용매 추출물의 제조에 사용되는 흰점박이꽃무지는, 흰점박이꽃무지 유충을 열풍건조, 마이크로웨이브, 동결건조 등의 방법으로 건조한 후, 분쇄기로 분말화한 분말일 수 있다. 이때 분말의 입자 크기에 대한 제한은 없으며, 일반 분쇄기 또는 식품용 믹서기로 1분간 강한 열이 발생하지 않도록 처리하여 제조한 분말일 수 있다. 또는 상기 흰점박이꽃무지 유충을 동결한 후, 버퍼와 함께 마쇄한 분말을 사용할 수 있다. 상기 제조한 분말을 추출물 제조에 바로 사용할 수도 있고, -20℃ 내지 -70℃ 조건에서 6개월 내지 1년간 보관한 흰점박이꽃무지 분말을 사용할 수 있다. 또는, 흰점박이꽃무지 유충을 건조하지 않고 -70℃ 에서 냉동보관한 후, 물을 넣고 분쇄한 생체를 사용할 수도 있다.

추출용매는 물, 탄소수 1(C1) 내지 3(C3)의 알코올 및 물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 예컨대, 물, 에탄올(EtOH) 또는 에탄올 수용액일 수 있다. 상기 용매 추출방법은 통상의 추출법을 사용할 수 있으며, 예를 들어, 추출 용매에 의한 추출, 초임계 유체 추출, 초음파 추출, 열수 추출 등의 방법을 사용할 수 있다. 바람직하게는 열수 추출방법을 사용할 수 있다. 상기 용매추출 시간은 4 내지 6시간, 또는 5 내지 6시간일 수 있다. 용매 추출시의 추출 온도는 10℃ 내지 90℃, 20℃ 내지 80℃, 30℃ 내지 70℃, 또는 30℃ 내지 60℃ 일 수 있다. 예컨대 상기 용매가 물인 경우, 추출온도는 40 내지 80℃, 50 내지 70℃, 55 내지 65℃, 예를 들어 60℃ 일 수 있으며, 상기 용매가 주정(EtOH)인 경우, 추출온도가 10℃ 내지 50℃, 20℃ 내지 40℃, 25℃ 내지 35℃, 예를 들어 30℃ 일 수 있다. 흰점박이꽃무지의 용매 추출물의 젖산균 발효물은, 흰점박이꽃무지 용매 추출물을 그대로 발효를 위한 원료로 사용하거나, 원심 분리 또는 여과 등 후처리 공정을 처리하여 발효 원료로 사용될 수 있다. 흰점박이꽃무지의 유효물질을 활용하기 위해 양적인 손실을 줄이기 위한 상기 흰점박이꽃무지 용매 추출물 전체를 사용할 수도 있고, 흰점박이꽃무지 열수추출물의 상청액만을 사용할 수도 있다. 흰점박이꽃무지 용매 추출물은 흰점박이꽃무지 열수 추출물(Hotwater Extract of *Protaetia brevitarsis*, HePb), 또는 흰점박이꽃무지 주정 추출물(Ethanol Extract of *Protaetia brevitarsis*, EePb)일 수 있다.

흰점박이꽃무지 용매 추출물은 (i) 원심분리와 여과에 의해 흰점박이꽃무지 분말을 일부 제거한 열수 또는 주정 추출물을 사용할 수 있으며, 또는 (ii) 흰점박이꽃무지 분말을 제거하지 않은 추출침전물이다.

추출물의 발효물(추출발효물) 제조에 있어서, 상기 젖산균의 접종량은 1×10^8 내지 1×10^{15} cfu/ml, 예컨대, 1×10^8 내지 1×10^{12} cfu/ml, 1×10^8 내지 1×10^{10} cfu/ml 일 수 있다. 흰점박이꽃무지 추출물에 젖산균을 접종하고 발효 시, 발효 온도는 25 내지 40℃, 25 내지 37℃, 30 내지 40℃, 또는 30 내지 37℃ 이다. 상기 젖산균에 의한 발효 단계의 온도가 지나치게 높은 경우, 소금의 결정화 되어 염도가 높아지거나 젖산균이 증식하지 않고, 유해 미생물이 증식할 위험이 있으며, 발효 온도가 지나치게 낮은 경우 젖산균의 생균수가 적어지거나 숙성일수가 길어질 우려가 있다. 젖산균 발효 시간은 12시간 내지 48시간 미만, 12시간 내지 36시간, 12시간 내지 30시간, 또는 12 내지 24 시간, 예컨대 24시간 동안 발효될 수 있다. 온도와 배양시간이 상기 범위 외

일 경우, 젖산균이 기능이 유지될 수 있을 정도의 젖산균의 생존수가 유지되지 않고, 사균 발생의 우려가 있는 바, 상기 조건에서 발효 배양하는 것이 바람직하다. 발효 숙성 단계는, 젖산균 첨가 후 30일 내지 1년, 30일 내지 9개월, 30일 내지 6개월, 30일 내지 5개월, 또는 30일 내지 3개월간 수행되었다.

흰점박이꽃무지 염장 발효물 및/또는 상기 염장 발효물을 포함하는 식품 조성물의 제조 방법은, 상기 발효 숙성 단계 이후에 여과 단계 및/또는 멸균 단계를 추가로 포함되어야 한다. 발효 숙성 단계 이후에, 발효물에 포함된 흰점박이꽃무지 성체는 그대로 유지된 상태로 분쇄하지 않고 프레스판을 통해 압력을 주어 액상 상태의 것만 채반을 통해 여과하여 얻을 수 있다. 흰점박이꽃무지를 마쇄할 경우 탁도가 높아지고 여과공정이 길어져 영양분 손실을 초래할 수 있어 바람직하지 않다.

여과 단계를 거치지 않는 경우, 상기 식품 조성물은 젖갈의 형태로 제공될 수 있으며, 상기 여과 단계를 거치는 경우, 상기 식품 조성물은 액젓의 형태로 제공될 수 있다. 그러나 젖갈의 형태일 경우 곤충의 키틴질로 인해 고유의 식감이 생길 수 있으며, 유효한 키틴 성분을 섭취할 수 있다. 멸균 단계는 본 발명이 제공하는 식품 조성물의 식미 특성을 유지하고, 유효 성분이 물리적 및/또는 화학적으로 손상되지 않는 범위에서 식품에 사용하기 위한 멸균 방법을 제한없이 사용 가능하며, 예를 들어, 저온 장시간 살균(low temperature long time, LTLT), 고온 단시간 살균 (high temperature short time, HTST), 또는 초고온 살균 (ultra high temperature) 방법이 이용될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

흰점박이꽃무지의 염장 발효물 및/또는 상기 염장 발효물을 포함하는 식품 조성물은 가바(GABA)를 포함할 수 있다. 상기 가바는, 4개의 탄소로 구성되어 있고 글루타메이트 디카르복시라아제(Glutamate decarboxylase, GAD)의 L-glutamate 탈탄산 반응에 의해 이산화탄소와 함께 생성되며 pyridoxal-5' -phosphate dependent 경로로 합성되는 것으로 알려져 있다. 본 발명의 식품 조성물이 가바를 함유함으로써, 신경안정작용, 스트레스 해소, 기억력 증진, 혈압강화 작용, 우울증 완화, 중풍과 치매 예방, 불면, 비만, 갱년기장애, 뇌졸중, 결장암, 및 대장암에 대한 예방 또는 개선용 식품 또는 건강기능식품 조성물로 활용될 수 있다.

젖산균 첨가 과정을 거치지 않은 염장물 및 젖산균을 첨가한 염장 발효물에 대한 가바 함량을 비교한 결과, 젖산균을 첨가하지 않은 단순 염장물에서도 GABA의 함량이 확인되었으나, 1주일간 염장숙성 후 젖산균을 첨가하여 발효 숙성을 거친 샘플의 GABA를 나타내는 Band가 더 진하게 나타나, 가바의 함량이 증가하였음을 정성적으로 확인하였다.

식품 조성물은 비만세포 내 지방 축적을 억제하는 것일 수 있으며, 더욱 자세하게는 중성 지방 저감 효과를 가진다. 구체적으로, 인간 비만 세포주를 이용하여 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 중성지방 저감 효과를 실험적으로 확인하였다. 더욱 자세하게는, 본발명에 따른 40 중량% 소금으로 1주일 염장하고 젖산균 발효를 3개월 이상 수행한 경우, 흰점박이꽃무지의 염장 발효물은, 흰점박이꽃무지의 염장 발효물은 염장 및 젖산균 발효를 하지 않은 대조군의 지방축적률 100을 기준으로, 지방 축적률이 95%이하, 93%이하, 90%이하, 또는 80%이하일 수 있다.

흰점박이꽃무지의 염장 발효물 및/또는 상기 염장 발효물을 포함하는 식품 조성물은, 항산화 활성을 가지는 것일 수 있다. 더욱 자세하게는, 본발명에 따른 40 중량% 소금으로 1주일 염장하고 젖산균 발효를 3개월 이상 수행한 경우, 흰점박이꽃무지의 염장 발효물은 염장 및 젖산균 발효를 하지 않은 대조군의 DPPH 억제율 100을 기준으로 상대 DPPH억제율(%)이 110%이상, 또는 120%이상, 예를 들면 110% 내지 200% 또는 120% 내지 200%일 수 있다.

구체적으로, 2,2-디페닐-1-피크릴히드라질 (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH)를 이용하여 자유라디칼 소거 활성 분석을 수행하여 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 항산화 효과를 확인한 결과 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 경우, 염장하고 발효 숙성을 수행하지 않은 대조군)에 비해, 발효 숙성 기간이 3개월인 때에는 DPPH 억제율이 69.4%로 증가하였고, 발효 숙성 기간이 5개월이 되자 DPPH 억제율이 다시 51%로 감소하였다. 상기 천일염을 이용하여 3개월간 발효 숙성을 진행한 염장 발효물은 무숙성 천일염 대조군에 비해 99.4%가 증가한 상대적인 DPPH 억제율을 나타내어, 항산화 효과가 향상되었으며, 5개월간 발효 숙성이 진행된 염장 발효물의 경우에도 천일염 대조군에 비해 42.9%가 증가한 높은 DPPH 억제율을 보여 우수한 항산화 효과를 확인하였다. 흰점박이꽃무지의 염장 발효물 및/또는 상기 염장 발효물을 포함하는 식품 조성물의 염도는, 20 내지 40%, 23 내지 35%, 25 내지 30%, 또는 27 내지 28.5%일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 흰점박이꽃무지의 염장 발효물 및/또는 상기 염장 발효물을 포함하는 식품 조성물의 당도는, 20 내지 40 brix%, 25 내지 37 brix%, 30 내지 35 brix%, 또는 30 내지 33 brix%이었다.. 흰점박이꽃무지의 염장 발효물 및/또는 상기 염장 발효물을 포함하는 식품 조성물의 pH는, 4.5 내지 7.0, 5.0 내지 7.0, 또는 5.5 내지 6.5이었다. 흰점박이꽃무지의 염장 발효물 및/또는 상기 염장 발효물을 포함하는 식품 조성물은 식품 또는 식품 첨가물로 활용되기 적절한 염도, 당도 및 pH를 가져, 식품, 식품첨가물, 및/또는 건강기능식품으로서 유용하다.

[표 12] 동의보급장의 영양정보

영양정보		26.6 kcal /100ml					
단백질	3.06%	탄수화물	3.32%	지방	0.12%	프롤린	611mg
글리신	217mg	트랜스지방	0%	포화지방	0.01g	콜레스테롤	0%

본 연구의 흰점박이꽃무지의 염장 발효물 및/또는 상기 염장 발효물을 포함하는 식품 조성물은, 중금속 함량이 식품공전에 의한 함량보다 낮거나 검출되지 않아, 식품으로서 적절하며, 생체에 대한 안전성이 우수하다. 흰점박이꽃무지의 염장 발효물을 포함하는 식품 또는 기능성 식품 및 및 상기 흰점박이꽃무지의 염장 발효물을 제조하였다. 상기 염장 발효물의 제조 방법은 염장 후 유산균을 첨가하는 단계를 포함하며, 제시한 제조된 식품 조성물은 가바(GABA)를 포함하고, 체내 지방 축적을 저해하며, 중금속 함량이 낮아 식품으로서 안전성을 가진다.

제 4 절 연구개발 성과

1. 특허등록 및 출원(등록 1, 출원 5, 상표등록 3, 상표출원 3)

번호	특허/프로그램명	국가명	출원·등록일	출원·등록순번 / 출원·등록자수	비 고
1	굽벵이를 활용한 기능성 식품의 제조방법	한국	2018.11.13	10-191977-00000	등록
2	동의보급 제[35류]	한국	2018. 07.09	40-137641-0000	상표 등록
3	가바 제[29류]	한국	2018.12.19	40-2018-0178749	상표 출원
4	가바 제[30류]	한국	2018.12.19	40-2018-0178750	상표 출원
5	가바 제[32류]	한국	2018.12.19	40-2018-0178751	상표 출원
6	해방풍 추출물의 젖산균 발효물, 그 제조방법 및 용도	한국	2019.05.09	10-2019-0054488	출원
7	흰점박이꽃무지 추출물의 발효물, 이의 제조방법 및 용도	한국	2019.06.04	10-2019-0066242	출원
8	가바 제[30류]	한국	2019.07.12	40-1546087-0000	상표 등록
9	가바 제[32류]	한국	2019.07.12	40-1546086-0000	상표 등록
10	흰점박이꽃무지의 염장발효식품 및 이의 제조방법	한국	2019.10.01	10-2019-0121784	출원
11	갈색거저리 발효물을 포함하는 사료첨가제 및 이를 포함하는 사료 조성물	한국	2019.10.30.	10-2019-0126813	출원
12	흰점박이꽃무지 발효물을 포함하는 미생물의 성장 촉진용 조성물	한국	2019.11.29.	10-2019-0157749	출원

2. 논문게재 (SCI 2편)

No	논문명	학술지명	저자명	연도	호	국명	SCI	등록
1	Preparation and characterization of sericin powder extracted with deep sea water	3Biotech	Hong, Sun M e e et al.	2018	9(1)	France	SCI (1.8)	s13250-018-1558-7
2	Heterologous Production and Glycosylation of Japanese Eel Follitropin sing Silkworm	Biotech Bio pro Eng	Hong, Sun M e e et al.	2019.7.6	24	Korea	SCI (1.8)	doi: 10.1016

3. 학술발표 (국제 4건, 국내 10건)

No	회의명칭	발표제목	발표자	발표일시	장소	국명
1	일본분자세포생물학회	Potential of the 1,4-Dihydroxy-2-Naphthoic acid producing from Weissella paramesen-teroides as Pb fermenter.	Ju,ES., Kim,TH Kim,JA Hong,sM	2019.12.03	Marine Messe Fukuoka	일본
2	일본분자세포생물학회	Antibacterial activity of their protein extract of LAB against fish pathogens.	Jo Hs Ju,ES., Kim,JA Hong,sM	2019.12.03	Marine Messe Fukuoka	일본
3	일본분자세포생물학회	Role and Application of LAB in Food Presevation of Protaetia brevitarsis.	Kim,JA., Kim,TA. Ju,ES., Hong,sM	2019.12.03	Marine Messe Fukuoka	일본
4	한국영양과학회	roduction of DHNA, a Bifidogenic growth stimulator in Pb Extraction	홍선미, 김태하, 주은신, 김정아	2019.10.23	제주컨벤션 센터	한국
5	한국생물공학회	The GAD genes and GABA production from Protaetia brevitarsis' s MSG	김정아, 주은신, 박정철, 홍선미	2019.10.10	엑스코, 대구	한국

6	한국생물공학회	Potential of the 1,4-Dihydroxy-2-Naphthoic acid producing from <i>Weissella paramesenteroides</i> as Pb fermenter	주은신, 김정아, 박정철, 홍선미	2019.10.10	엑스코, 대구	한국
7	세계산업미생물학회	Enhancement of 1,4-Dihydroxy-2-Naphthoic Acid Production by <i>Weissella</i> sp Fed-Batch Culture in <i>Protaetia brevitarsis</i> extraction	Hong, SM Ju, ES., Kim, JA., Kim, TH	2019.09.09	피사대학	이탈리아
8	한국식품과학회	Production of Pb's salt-sauce using LAB and qualitative evaluation.	주은신, 김태하, 김정아, 박정철, 홍선미	2019.06.26	송도컨벤션센터	한국
9	한국식품과학회	Potential of LAB for improving storage of PB as food.	김정아, 김태하, 주은신, 홍선미	2019.06.26	송도컨벤션센터	한국
10	한국미생물학회	Application of LAB improving storage of Pb as Food	김태하, 주은신, 김정아, 홍선미	2019.04.17	제주컨벤션센터	한국
11	한국미생물학회	The potential of <i>Glehnia littoralis</i> Fermented by LAB	주은신, 김태하, 김정아, 박정철, 홍선미	2019.04.17	제주컨벤션센터	한국
12	한국생물공학회	Characterization of fermented edible insect, <i>P.brevitarsis</i> , inoculated with lactic acid bacteria.	김태하, 주은신, 홍선미	2019.04.10	제주컨벤션센터	한국
13	한국미생물학회연합국제학회	Isolation and characterization of Lactic acid bacteria from edible insect and the Feed	박현미, 김태하, 최성창, 주은신, 홍선미	2018.10.11	더케이호텔	한국
14	분자세포생물학회	Specificity antibody of thyrotropin against Japanese eel glycoprotein hormone	김태하, 최성창, 박현미, 홍선미	2018.11.29	요코하마	일본

4. 생명자원(균주기탁)

번호	균주명	국가명	기탁일	기탁번호	기탁기관
1	Lactobacillus plantarum DSW	한국	2018.08.10	KCCM12299P	- 한국미생물보존센터
2	Weissella paramesenteroides D20	한국	2018.08.10	KCCM12301P	- 한국미생물보존센터
3	Weissella paramesenteroides D12	한국	2018.08.10	KCCM12300P	- 한국미생물보존센터
4	Pediococcus acidilactici D17	한국	2019.03.29	KCCM12472P	- 한국미생물보존센터
5	Lactococcus garvieae B44	한국	2019.03.29	KCCM12473P	- 한국미생물보존센터

5. 고용창출

번호	고용인력	고용기관명	고용창출일	고용형태
1	조현술	환동해산업연구원	2019.09.03	계약직
2	김정아	환동해산업연구원	2018.10.22	계약직
3	주은신	환동해산업연구원	2018.05.23	계약직

6. 교육 및 컨설팅

번호	교육 및 컨설팅명	교육 및 컨설팅 교재명	주요내용	활용년도
1	경북곤충산업의 발전방향	경북곤충산업의 발전방향	한국곤충산업의 현황과 실제, 발전방향 등 논의	2019
2	곤충식품 산업 성공전략	곤충식품 산업 성공전략	곤충산업 육성 정책 및 스마트 팜 적용 기술 소개	2019

7. 정책활용

번호	정책활용상태	시책명	주관부처	일자	기대효과
1	정책건의	사료용 곤충 산업화	영천시 농정과	2019.02.01	곤충사료화를 통한 수익증대

8. 타연구에 활용

번호	연구사업명	연구제목	연구자	종료년도	활용년도
1	미래형혁신기술 개발사업	생물전환공정 기반 천연비타민 K2 생산	홍선미, 박정철	2019	2019

9. 연구인력활용

번호	인력양성명	학위수	인력양성년도	인력양성대상수
1	경북농업6차산업화과정	기타 1	2018	1
2	사이버(농산물가공) 과정	기타 1	2018	1
3	사이버(곤충사육) 과정	기타 1	2018	1

10. 홍보실적

번호	홍보유형	매체명	제목	일시
1	Internet/PC	이코노미타임21	곰뽕이 식품 특허기술로 식용곤충 시장 진출	2019.06.11
2	중앙TV방송	YTN	식용곰뽕이 부부의 꿈	2019.08.20

11. 전시회 참가(전시회, 박람회 등)

번호	유형	행사명칭	전시품목	장소	활용년도
1	전시회	곤충식품페스티벌	동의보급진액	코엑스 서울	2019.02.01

12. 수상실적

번호	일자	수상명칭	공적내용
1	2018.08.10	경북농업6차산업 공로상	경북농민사관학교 경북농업6차산업화 과정을 이수, 단합
2	2019.06.15	농업인표창장	곤충산업 발전에 이바지한 공로에 대한 표창장

13. 인증(통합)

번호	인증명	인증기관	활용년도
1	농촌융복합산업 사업자 인증	농림축산식품부	2018.12.10

14. 사업화

번호	사업화명	제품명	업체명	년도	매출액(천원)
1	동의보급 환	동의보급 환	동의보급	2018.12.10	60,442
2	동의보급 진액	동의보급 진액	동의보급	2019.03.10	106,298
3	동의보급 진액 플러스	동의보급 진액 플러스	동의보급	2019.12.10	0

15. 시제품(동의보급 플러스)

디자인 앞면	상표디자인	시제품
		

○ 사업화성과 및 매출실적

- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0억원	
			향후 3년간 매출	1억원	
		관련제품	개발후 현재까지	1.66억원	
			향후 3년간 매출	2억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : - % 국외 : - %	
			향후 3년간 매출	국내 : 1 % 국외 : 1 %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			위

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		2년		
	소요예산(백만원)		10		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			1.66	3	5
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내		1	2
		국외		0.1	0.5
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획					
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)				
	수 출				

제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

- 젖산균 적용 흰점박이꽃무지 발효소스 단기숙성 생산 기술 확보
- 유효물질 및 기능성 확인
- 세포내 안전성 및 안정성 확보
- 흰점박이꽃무지 액상조미료시제품 개발 및 상품화

3-2. 목표 달성여부

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차년 (2018)	최적 발효 및 생산 공정 개발	세부(동의보급) 발효소스 생산시 스텝 구축	100	<ul style="list-style-type: none"> • 부재료 첨가 유무에 따른 효과규명(고미, 이취제거 등) • 미생물 안전성 확보를 위한 위생공정 개발(여과 살균 등) • HACCP 시설 완료
		협동(환동해산업연구원) 젖산균 활용 조건 확립 및 성분분석	100	<ul style="list-style-type: none"> • DHNA 생산균주 5종 선발 및 16sRNA 확인 • 웨이셀라1종 및 락토바실러스 1종활용 가바 생산 조건 분석(염도, 당도, pH 분석 완료) • 흰점박이꽃무지 염장 적정 조건 확립(소금종류, 농도, 숙성시간, 생균수, 미생물 검사) • 흰점박이꽃무지 1-3차 염장발효물의 일반성분, 질소, 중금속, 아미노산 분석 완료
2차년 (2019)	발효소스 안정성 분석 및 시제품 개발	세부(동의보급) 발효소스 시제품 생산 및 시제품 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> • 흰점박이꽃무지 동의보급장 용기, 디자인 • 동의보급장 파일럿 생산 • 동의보급장 및 관련 곤충제품 홍보, 전시회
		협동(환동해산업연구원) 적정발효조건확립 및 안정성평가	100	<ul style="list-style-type: none"> • 동의보급장 파일럿생산 후 일반성분, 질소, 중금속, 색소, 보존료 등의 안전성분 분석 • 동의보급장 파일럿생산 후 세포안정성 완료(마우스 Raw267, 사람 3T3-L1 등) • 흰점박이꽃무지 염장발효물의 젖산균 생균수 확인 및 16s RNA 분석 완료 • 흰점박이꽃무지 염장발효물의 효능평가 완료(항산화, 중성지방저감, 독성안정성 등)

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

- 2 차년도의 목표 달성 완료 됨
- 본 연구에서 제시한 흰점박이꽃무지 염장 공정법은 다른 식용곤충에 접목하여 곤충의 식품으로서의 유효물질의 제시와 식품으로서 소비자에게 다가갈 수 있는 다양한 방법 제시를 위한 후속연구 필요

제 4 장 연구결과의 활용 계획 등

제 1 절. 활용계획

1. 안전한 식용곤충 식품 고품질 및 장기 유통 가능

- 식품으로서 식용 곤충의 향, 색, 맛의 대중화 및 일반화
- 식용곤충 사육, 기업 관련 농상민과 의 소득 증대 및 식품관련 업계 활성화에 기여
- 현재의 제한된 곤충자원 활용 영역을 확대하여 지속적 수요가 있는 신시장 창출
- 곤충 유래의 기능성 검증을 통한 식품 개발은 여타의 곤충에 대한 신소재화의 가능성 증대
- 항균 젖산균 포함 식용곤충을 이용한 식품 보존 첨가물 개발은 기존 식·의약소재 이외에 새로운 분야로 기술범위 확대
- 식용곤충 생체 내 면역증강물질(항균 펩타이드) 대량생산을 위한 면역유도 방법 개발
- 국내 등록 된 식용곤충에 적용 가능한 고기능성 면역증강물질 함유 천연 보존 첨가물 개발
- 개발된 항균젖산균을 이용한 식용곤충 분말의 조성 및 제조기술을 식품제조 관련 기업에 이전하여 고품질의 다양한 식품이 상품화 될 수 있도록 함
- 식용곤충 건분말의 내성 균주를 제어할 수 있는 천연 항균제제 개발
- 고효율 항생제 대체물질 및 고기능성 보존 젖산균 소재 개발 및 산업화
- 식용 곤충사육농가 보급 및 이를 이용한 보존 첨가제 개발
- 항균 젖산균으로부터 천연항생제 정제 및 세균병, 바이러스병 치료제로 활용
- 곤충 유래 항균제 대체물질 및 기능성 식품 보존 소재 개발을 위한 기술 확립

2. 식용곤충과 프로바이오틱스 융복합 다양한 제품 개발

- 안전성과 고품질의 식용곤충의 안정적으로 공급가능
- 식품으로 등재된 식용곤충들의 신속하고 다양한 식품 출시 가능
- 천연 항균 젖산균 융합을 통한 식용곤충의 식품 산업화 촉진하여 곤충 수요증대에 따른 농가 및 산업체 확대와 소득 증대
- 다양한 곤충의 불포화지방산 및 미량원소 함유 특징을 이용한 노인이나 유아를 위한 식품 개발 가능
- 식용곤충과 천연 항균 젖산균을 이용한 다양한 소재 개발로 혐오감을 극복한 다양한 유형의 곤충식소재의 공급
- 연구개발 된 상품과 기술,논문은 학회보고와 특허등록
- 대중성 있는 연구개발로 기업유치와 고용창출 (6차 사업화)

3. 식용곤충과 젖산균 유래 항균물질을 이용한 산업화 모델개발

- 지역 농가에 신규 소득원 아이템으로 적용

- 식용곤충을 활용한 지역 관광축제 자원화 육성으로 지역경제 활성화 도모
- 식용 곤충의 유치/초등학교 교과학습연계 상품 개발로 체험학습의 다양화
- 새로운 식용곤충 자원 탐색 및 연구 기대
- 식용 곤충의 유통 및 판매 지침서 개발에 활용

제 2 절. 기대효과

1. 기술적 측면

1) 식용곤충과 프로바이오틱스 융합 제품 개발

- 식용곤충 이용 다양한 소재 개발을 통한 식품 산업에서의 곤충 이용성 증대
- 가정이나 외식업체에서 사용하기 편리한 메뉴 및 조리 중간가공식품 기술 개발
- 곤충섭취시 소화율 증대 기술 개발을 통한 높은 소화용이한 식용곤충 제품 개발 가능
- 건강보충용, 영양취약계층 등 다양한 소비자 층에 접근할 수 있는 다양한 제품 개발을 통해 갈색거저리의 소비 증대를 통한 관련 농가 및 업체 소득 증대
- 프로바이오틱스 제품의 기능성고 안전성에 대한 검증을 통해 식용곤충에 적합한 천연 항균물질 확보하여 브랜드화 가능
- 한국 식품의 세계화가 있어 국내 식용곤충과 우수한 항균 젖산균을 발굴하여 새로운 아이템의 제품 개발
- 기능성 젖산균과 식용곤충이 조합 된 제품개발은 그 가공품을 활용한 생산 부분의 고용 창출과 더불어 기능성 식품 산업 제약산업, 포장재 산업 등 연관 산업 부분의 고용 창출되어 경제 활성화에 기여
- 식용곤충의 장기 보존과 더불어 항균 기능성 젖산균을 생산하여 새로운 가공 기술을 접목하여 다양한 기능성 젖산균 제품을 생산
- 식용곤충의 영양학적 우수성과 항균 젖산균의 기능이 융합한 고기능성 신규 식품 소재 및 제품화로 새로운 기술 경쟁력 강화가 기대 됨
- 식용곤충 장내 미생물을 활용한 젖산균주의 개발은 소비자의 신뢰를 확보
- 식용곤충 사육 시 발생하는 이취의 제거를 통해 식품으로서의 가치를 업그레이드 하여 농가, 기업의 더 많은 이익 창출

2) 안전한 곤충식품 개발

- 천연 항균 젖산균을 포함하는 식용곤충(흰점박이꽃무지, 갈색거저리)을 이용한 식품 개발은 식의약소재 이외에 새로운 분야로 기술범위 확대
- 젖산균이 만드는 항균 기능성 물질을 통한 식품 첨가제 개발은 여타의 곤충에 대한 새로운 소재화의 가능성을 증대
- 젖산균 유래 천연 항생제 대체물질 및 고기능성 식품 소재의 이용효과 및 작용기전 구명
- 고기능성 생리활성물질의 산업적 활용을 위한 기술력 확보 및 관련 기술 제공

3) 식용곤충과 젖산균 유래 항균물질을 이용한 산업화 모델개발

- 식용곤충 종류별 유통 및 판매 기준과 규격지침의 산업화 자료 구축
- 기존의 교육프로그램과 차별화된 교보재를 통한 생생한 생태교육 프로그램 구현

2. 경제적·산업적 측면

1) 식용곤충과 프로바이오틱스 융합 제품 개발

- 식용곤충의 고단백 함유의 특징을 활용하여 육류 대체 식품으로 이용도 증대 기대
- 다양한 형태의 식용 곤충과 유산균 유래 항균물질 융합 식품 소재 개발로 혐오감을 극복한 곤충의 식품소재 시장 점유율을 확대하여 곤충 사육 농가의 부가가치 창출 가능
- 본 연구결과를 바탕으로 다양한 형태의 일반식품 혹은 취약집단을 위한 환자식, 유아식, 노인식품 개발을 통해 국민건강증진에 이바지할 것으로 기대됨
- 식용곤충 섭취량 증대 및 사육농가와와의 협력을 통해 국내 식량 자급률 상승 가능
- 전 세계적으로도 관련 연구 및 제품화가 적고 다양성이 적어 블루오션 산업으로써, 이후 부가가치 창출 가능성이 높음(6차산업)

2) 안전한 곤충식품 혹은 화장품·의약품 소재 개발

- 고부가가치 천연항생제 생산 식용곤충(흰점박이꽃무지, 갈색거저리) 개발에 따른 곤충농가의 소득 증대 및 농가 수 확대
- 식용곤충 자체의 부가가치 상승뿐 만 아니라 식품 또는 사료회사 및 동물의약품 회사 등 관련 산업의 동반 성장으로 인한 경제적·산업적 이득이 예상됨
- 개발된 고기능성 항생 펩타이드 유사체는 항생제 내성문제를 해결할 수 있는 천연 항생물질로 항균제, 항진균제, 항암제, 항바이러스제 및 무공해 항생제 등의 산업화에도 적용 가능하여 높은 부가 가치 창출할 것으로 기대됨
- 면역증가 및 항균효과를 가지는 천연 식품소재 개발을 통한 고품질 안정 축산물 생산
- 면역증강물질 첨가로 고품질의 꽃병이, 갈색거저리 기능성 식품 개발 가능
- 꽃병이와 갈색거저리는 각종 유용물질(다량 단백질) 포함하여 본 연구의 고품질화는 식품 및 가공제품 산업을 가속화
- 면역증강물질 생산 갈색거저리 개발 및 효능분석에 따른 논문게재, 특허출원, 산업체 기술 이전
- 곤충 유래 천연 항균성 젖산균은 프로바이오틱스로 인정되어 이를 활용한 제품개발은 신뢰도 기 확보 가능

3) 식용곤충과 젖산균 유래 항균물질을 이용한 산업화 모델개발

- 식용곤충과 항균젖산균 융합 제품의 다양화, 시장의 활성화로 국내 곤충시장의 변화 모색
- 미래 산업사회의 사업 콘텐츠 확립 및 새로운 환경문화 생성의 초석 마련
- 새로운 수익사업 및 환경교육산업에 이바지

3. 사회문화적 측면

1) 식용곤충과 프로바이오틱스 융합 제품 개발

- 육류의 단백질 제품에 익숙해 있는 사회에 또 다른 미래 기능성 식품으로서의 제품 제시
- 혐오감을 극복한 곤충의 식품소재 시장 점유율을 확대하여 곤충 사육 농가의 부가가치 창출
- 취약집단을 위한 환자식, 유아식, 노인식품 개발을 통해 국민건강증진에 이바지 기대
- 식용곤충 섭취량 증대 및 사육농가와의 협력을 통해 국내 식량 자급률 상승 가능

2) 안전한 곤충식품 혹은 화장품·의약품 소재 개발

- 곤충농가의 소득 증대 및 농가 수 확대
- 식용곤충 자체의 부가가치 상승과 관련 산업의 동반 성장으로 인한 사회적 인식 개혁
- 무공해 항균제 등의 산업화에도 적용 가능하여 높은 부가 가치 창출할 것으로 기대
- 항균효과를 가지는 천연 변질 저감 물질 개발을 통한 고품질 식용곤충 식품, 화장품, 혹은 의약품 소재 생산
- 다른 식용곤충의 식품으로써 적용범위 확대 가능
- 식용곤충의 각종 유용단백질을 다량 함유하고 있어 식품 첨가물 사용 시 시너지 효과 기대

3) 식용곤충과 젖산균 융합으로 인한 곤충산업의 재인식

- 식용곤충 시장의 활성화로 국내 곤충시장의 변화
 - 미래 산업사회의 사업 콘텐츠 확립 및 새로운 환경문화 생성의 초석 마련
- 차세대 미래 단백질 공급원으로서 다가갈 새로운 아이템 제공
- 곤충산물의 안정적인 유통시스템 구축에 필요한 곤충산물 이력관리와 곤충사육에 활용하여 질병 분석자료로도 제시가능하며 곤충 대량사육 생산성 향상에도 기여할 수 있을 것으로 판단

붙임. 참고문헌

1. Armitage SAO, Thompson JJW, Rolff J, Siva-Jothy MT(2003) Examining costs of induced and constitutive immune investment in *Tenebrio molitor*. *J Evol Biol* 16, 1038~1044.
2. Barnes AI, Siva-Jothy MT(2000) Density-dependent prophylaxis in the meal worm beetle *Tenebrio molitor* L.(Coleoptera: Tenebrionidae): cuticular melanization is an indicator of investment in immunity. *Proc R Soc Lond B* 267, 177~182.
3. Jiraphon S, Tasanee J(2001) Industrial mass rearing of mealworm beetle(*Tenebrio molitor* L.). *Kaen Kaset Khon Kaen Agriculture Journal* 29(4), 194~200.
4. Ludwig D, Carl F(1960) Further studies on the relationship between parental age and the life cycle of the mealworm, *Tenebrio molitor*. *Ann Entomol Soc Am* 53(5), 595~600.
5. Tracey SKM(1958) Effects of parental age on the life cycle of the mealworm, *Tenebrio molitor* Linnaeus. *Ann Entomol Soc Am* 51(5), 429~432.
6. Wagner WE Jr., Harper CJ(2003) Female life span and fertility are increased by the ejaculates of preferred males. *Evolution* 57(9), 2054~2066.
7. Worden BD, Parker PG(2001) Polyandry in grain beetles, *Tenebrio molitor*, leads to greater reproductive success: material or genetic benefits? *Behavioral Ecology* 12(6), 761~767.
8. Yang W, Xie ZH, Zhou ZJ, Yang CP(2005) The learning behavior of *Scleroderma sichuanensis* Xiao(Hymenoptera: Bethyloidea) fed on the fictitious hosts *Tenebrio molitor* L.(Coleoptera: Tenebrionidae). *Acta Entomologica Sinica* 48(5), 731~735.
9. Zaniccio, J, Molina-Rugama AJ, Serrao J, Pratisoli D(2001) Nymphal development and reproduction of *Podisus nigrispinus*(Heteroptera: Pentatomidae) fed with combination of *Tenebriomolitor*(Coleoptera: Tenebrionidae) pupae and *Muscadomestica*(Diptera: Muscidae) larvae. *Biocont Sci Technol* 11(3), 331~337.
10. AOAC. 1995. Official methods of analysis. 16th ed. Association of official Analytical Chemists, Washington, DC, USA. 4:17, 32:21, 22, 32. Bukkens, S. G. F. 1997. The nutritional value of edible insects. *Ecol. Food Nutr.* 36:287~319.
11. Cho, P. S. 1969. Illustrated encyclopedia of fauna & flora of Korea, Vol. 10. Insecta(II).

- Samhwa, Seoul. Korea. P. 689, 693. Cho, D. H., Y. M. Cho, and J. I. Lee. 2003. Fruitbody formation of *Cordyceps militaris* in *Allomyrina dichotoma* Linnaeus. *Kor. J. Plant Res.* 16: 1-7.
12. Chung, M. Y., J. S. Hwang, T. W. Goo, and E. Y. Yun. 2013. Analysis of general composition and harmful material of *Protaetia orientalis*. *J. Life Sci.* 23:664-668.
13. Dewanto, V., W. Xianzhong and R. H. Liu. 2002. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J. Agric Food Chem.* 50: 4959-4964.
14. Finke, M. D., 2002. Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. *Zoo Biol.* 21, 286-293.
15. Finke, M. D., 2015. Complete nutrient content of four species of commercially available feeder insects fed enhanced diets during growth. *Zoo Biol.* 34, 554-564.
16. Heo, J. C., D. Y. Lee, M. S. Son, C. Y. Yun, J. S. Hwang, S. W. Kang, T.H. Kim, and S. H. Lee. 2008. Effects of mole crickets (*Gryllotalpaorientalis*) extracts on anti-oxidant and anti-inflammatory activities. *J.Life Sci.* 18, 509-514.
17. Gu, G. 1973. On the agricultural and forestry injurious insects in the Korean Coleoptera, Seoul National Univ. pp. 163.
18. Hwang, S. Y., Y. G. Lee, S. G. Hwang, H. B. Lim, Y. I. Kim, K. H. Jang, B. H. Jeon, D. W. Lee, and H. C. Lee. 2001. Subchronic toxicity of *Protaetia brevitarsis* in rate. *Kor. J. Ori. Med. Physiol Pathol.* 15:703-707.
19. Kang, I. J., H. K. Kim, C. K. Chung, S. J. Kim, and S. H. Oh. 2000. Effects of *Protaetia orientalis* (Gory et Perchlon) larva on the lipid metabolism in ethanol administered rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 29: 479-484.
20. Kang, S. J., C. W. Park, S. C. Han, Y. K. Yi, and Y. G. Kim. 2005. A grub (*Protaetia brevitarsis seulensis*) rearing technique using cellulose-digesting bacteria and natural recycling of rearing byproduct to an organic fertilizer. *Kor. J. Appl. Entomol.* 44(3): 189-197.
21. Kang, M. G. 2011. Study on the effects of fermented Aloe vera mixed diet on the larval growth of *Protaetia brevitarsis seulensis* and protective effects of its larval extracts on rat hepatotoxicity. *Agric. Bio. Kyungbook Nat. Univ.*

22. Kim, C. W. 1978. Distribution atlas of insects of Korea(Seris 2, Coleoptera). Korea University Press, Seoul Korea.
23. Kim, J. I. 1998. Insects' Life in Korea(III) Coleoptera. Korea Univ. Seoul. Korea. pp. 255.
24. Kim, C. H. 2001. Ecological and developmental characteristics of *Protaetia* spp. in Korea. Department of Agricultural Biology Graduate School, Kangwon National University.
25. Kim. C. H., J. S. Lee, M. S. Go, and K. T. PArk. 2002. Ecological characteristics of *Protaetia orientalis submarmorea* (Burmeister) (Coloptera: Cetoniidae). Korean J. Appl. Entomol. 41: 43-47.
26. Kim, H. G. 2005. Bionomical characteristics of *Protaetia brevitarsis* and *Allomyrina dichotoma*. Department of Biology Graduate School Jeonju University.
27. Kim, H. G., K. H. Kang, and C. Y. Hwang. 2005. Effect of some environmental factors on oviposition and developmental characteristic of *Protaetia brevitarsis* and *Allomyrina dichotoma*. Kor. J. Appl. Entomol. 44: 283-286.
28. 정철모, 2007, 농촌관광진흥을 위한 경관 농업의 확대방안, 농촌관광연구지
29. 농업과학기술원, 2006, 유용곤충 산업화를 위한 전국 곤충사육농가 실태조사 보고서
30. 농업과학기술원, 2008, 유용곤충 산업화 발전방안 수립을 위한 심포지엄
31. 농림수산식품부, 2010, 곤충산업의 육성 및 지원에 관한 법률
32. 국립농업과학원, 2012, 국내외 식 • 약용 및 사료화 곤충산업 발전을 위한 심포지엄
33. 농수산식품부, 2012, 곤충사육 매뉴얼

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 젓산균을 활용한 식용곤충 발효소스 제조 기술 개발				
	(영문) Development and Production on fermented edible insect sauce by LAB				
주관연구기관	농업회사법인(주)동의보급	주 관 연 구 책 임 자	(소속) 농업회사법인(주)동의보급		
참 여 기 업	농업회사법인(주)동의보급		(성명) 박 정 철		
총연구개발비 (천원)	계	220,000	총 연 구 기 간	2018. 04. 26 ~ 2020. 12. 31(1년 8월)	
	정부출연 연구개발비	175,000	총 참 연 구 원 수	총 인 원	8
	기업부담금	45,000		내부인원	2
	연구기관부담금			외부인원	6

○ 연구개발 목표 및 성과

- 젓산균 적용 흰점박이꽃무지 발효소스 단기숙성 생산 기술 확보 완료
- 유효물질 및 기능성 확인(가바, 유효 아미노산, 질소함량 완료, 항산화, 중성지방저감 기능 확인)
- 세포내 안전성 및 안정성 확보(마우스, 사람세포에서의 독성 검사 완료)
- 흰점박이꽃무지 액상조미료시제품 개발 및 상품화(시제품 개발 및 영양성분 분석 완료)

○ 연구내용 및 결과

- 젓산균 활용 흰점박이꽃무지 염장발효 공정 구축
 - 소금종류(천일염, 정제염), 농도(30-40%), 숙성기간(3개월-6개월 당도, 염도, pH 변화확인)
 - 흰점박이꽃무지 염장발효물의 젓산균 변화 16s RNA확인
 - 흰점박이꽃무지 염장발효물의 숙성 및 항균 유효 젓산균 2종 및 공배양 시행
 - 염장발효물의 숙성기간에 따른 성분변화 및 유해미생물 분포 확인(락토바실러스 유효)
 - 유효 젓산균의 흰점박이꽃무지의 글루탐산을 활용한 가바생성능 확인
- 가바 함유 흰점박이꽃무지 염장발효물의 특성
 - 유산균 접종유무에 따른 배양시간별 가바 함량 변화(TLC)
 - 흰점박이꽃무지 염장발효물의 유산균 첨가유무에 따른 항산화 기능 향상 확인
 - 흰점박이꽃무지 천일염과 정제염 염장발효물의 세포내 독성 분석 완료(마우스, 사람)
 - 흰점박이꽃무지 천일염과 정제염 염장발효물의 세포내 독성 시판제품과 비교분석 완료
 - 중성지방 저감 기능에 대한 세포내 분석 완료
 - 중금속저감 기능에 대한 이화학적 성분 분석 완료
 - 색소, 보존료 등에 대한 저장, 유통에 대한 분석 확인

- 흰점박이꽃무지 염장발효물 시제품(동의보감 장) 개발 및 영양성분 분석
 - 천일염 30-40%의 20kg 흰점박이꽃무지 염장 파일럿 생산(3-6개월)
 - 젖산균 첨가에 따른 항균효과, 항산화효과, 미생물저감, 중금속저감 등의 기능 분석
 - 흰점박이꽃무지 천일염과 정제염 염장발효물의 세포내 독성 시판제품과 비교분석 완료
 - 중성지방 저감 기능에 대한 세포내 분석 완료
 - 색소, 보존료 등에 대한 저장, 유통에 대한 분석 확인
 - 유리아미노산 중 프롤린, 글리신, 글루탐산 함량이 높음

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 연구성과 활용실적
 - 젖산균 활용 식용곤충 염장 숙성 발효(postbiotics) 관련 실험연구 및 제품화
 - 흰점박이꽃무지 유충 진액과 환 제품 판매 실적 166백만원(2018-2019년, 연구기간) 달성
 - 특허등록 1건, 상표등록 3건, 특허 출원 5건, 상표출원 3건, 학회 발표 14건, SCI 논문 2건, 정책 1건, 홍보 1건, 시제품 1건, 식용곤충산업화 교육 2건, 6차산업 교육이수 등
- 연구성과 활용계획
 - 타 식용곤충에 바이오컨버전 기술 접목 후 제품화
 - 식용곤충 추출발효공정법 특허등록, 기관 MOU, 기술이전, 및 제품판매
 - 정부R&D사업 연계 추진 계획

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	118034-2		
사업구분	농식품기술개발사업				
연구분야	농림식품융복합		과제구분	단위	
사업명	농생명기술개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	첫산균을 활용한 식용곤충 발효소스 제조 기술 개발		과제유형	개발	
연구기관	농업회사법인 주식회사 동의보급		연구책임자	박 정 철	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2018.04.26.~2018.12.31	75,000	20,000	95,000
	2차연도	2019.01.01.~2019.12.31	100,000	25,000	125,000
	계	2018.04.26.~2019.12.31	175,000	45,000	220,000
참여기업	농업회사법인 주식회사 동의보급(구, 영천곤충산업)				
상대국	-	상대국연구기관	-		

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2020. 02. 29

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
농업회사법인 주식회사 동의보급	대표이사	박 정 철

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약	
-----------	--

I. 연구개발실적

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 흰점박이꽃무지 유충을 천일염과 정제염으로 염장발효함에 있어 Weissell sp 유산균과 Lactobacillus sp의 공배양으로 가바(4-aminobutanoic acid; GABA)생산과 항균기능 및 숙성화를 촉진하기 공정법 구축 완료
- 가바 함유 흰점박이꽃무지 염장발효물의 중성지방(triglyceride) 저감기능, 항산화 기능, 및 중금속 저감, 독성 안정성 및 콜라겐 형성을 돕는 프롤린 유리아미노산의 함량 효능 평가완료
- 흰점박이꽃무지 유충 원료로 사용한 젖산균 발효물로 가바함유 파일럿생산 완료
- 흰점박이꽃무지 젖산균 염장발효물로 일반성분분석, 당도, 염도, pH, 유리아미노산, 총질소, 중금속, 보존료, 및 색소에 대한 안정성 분석 완료(30 brix, 28% 염도, 5.5 pH)
- 흰점박이꽃무지 염장발효물제품인 '동의보급장' 시제품을 제작하여 시판되는 액젓제품과의 독성, 중성지방저감 기능 비교 분석을 통해 안전한 간장제품 제시
- 국내외에 있어 식용곤충의 젖산균 염장발효 제품에 대한 전례 보고가 없고 식용곤충 포스트바이오틱스 관련 결과를 제시함으로 창의적 연구 결과로 사료 됨

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

○ 기술적 측면

- 식용곤충과 프로바이오틱스 새로운 융합 제품 개발 및 제시
- 흰점박이꽃무지 유충 염장발효물은 시판되는 어류, 대게장 등의 액젓제품에 비교하여 당도, 및 염도도 적정 수준에 맞음
- 사용된 젖산균은 포도상구균, 대장균, 리스테리아를 항균효과 높아 기타적용 확대
- 단백질, 탄수화물, 지방 분해효소의 영향으로 저분자화 되어 소화흡수율이 높음
- 중성지방 저감, 항산화기능 및 중금속 저감 효과를 가진 흰점박이꽃무지 염장 발효물로 곤충식품의 새로운 조미료 제품 출시
- 식용곤충 산업 분야의 이취, 저장, 유통에 관련 된 문제 해결과 새로운 식용곤충 식품의 패러다임을 제시

○ 경제적, 산업적 측면

- 식용곤충의 고단백의 저분자화로 소화흡수율을 높여 환자식, 고령자 소비자 확대 가능
- 소비자의 혐오감, 거부감을 해결할 건강 음료 제품 제시
- 고부가가치 프로바이오틱스 소재 개발에 따른 곤충농가의 소득 증대 및 농가수 확대
- 단백질, 탄수화물, 지방 분해효소의 영향으로 저분자화 되어 소화흡수율이 높음
- 흰점박이꽃무지 이외의 다른 식용곤충에 적용확대하여 곤충산업의 가속화
- 곤충자원의 식품소재 산업화의 업그레이드 및 신가치 창출
- 농생명산업인 그린산업과 화이트산업이 동반성장에 다른 국가 경쟁력 제고

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 젖산균을 이용하여 흰점박이꽃무지의 유층 염장발효물 숙성 공정기술 완료
- 중성지방 저감과 항산화 기능의 GABA가 함유 흰점박이꽃무지 염장발효 제품 개발
- 흰점박이꽃무지의 염장 숙성 중 발생하는 스트렙토코쿠스 등의 유해 미생물에 대한 항균성을 가지는 유산균의 적용 확대 가능
- GABA 생산 흰점박이꽃무지 유층 염장 발효 파일럿 공정법을 확립
- 기존의 식용곤충의 성분을 업그레이드하여 소비자들에게 안정성과 효능을 함께 제공
- 프로바이오틱스 융합제품에 의해 식용곤충산업분야의 이취 및 거부감에 관련된 문제해결
- 농민, 기업, 소비자에게 기타 식용곤충 등에 적용확대 기대 높음
- 유산균발효공정 및 효능분석에 따른 특허출원, 기술이전 및 논문게재

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 제시 한 계획 연구개발 목표 및 연구내용을 성실히 수행하였으며 당초 계획에 비하여 정성적 및 정량적 목표를 상회하는 연구 성과를 확보하였음

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 산업재산권(특허출원 5, 특허등록 1, 상표등록 1)
- 특허출원 5건
 - ① 흰점박이꽃무지 추출물의 발효물, 이의 제조방법 및 용도(10-2018-0153921/2018.12.03.)
 - ② 흰점박이꽃무지 추출물의 발효물, 이의 제조방법 및 용도(10-2019-0066242/2019.06.04.)
 - ③ 흰점박이꽃무지의 염장발효식품 및 이의 제조방법(10-2019-0121784/2019.10.01.)
 - ④ 갈색거저리 발효물을 포함하는 사료첨가제 및 이를 포함하는 사료 조성물 (10-2019-0126813/2019.10.30.)
 - ⑤ 흰점박이꽃무지 발효물을 포함하는 미생물의 성장 촉진용 조성물(10-2019-0157749/2019.11.29.)
 - 특허등록 1건
 - ① 굼벵이를 활용한 기능성 식품의 제조방법(10-191977-00000/2018. 11.13)
 - 상표등록 1건
 - ① 동의보급 제[35류](40-137614-0000/2018. 07.09)

○ 학회발표 13건

- ① Potential of the 1,4-Dihydroxy-2-Naphthoic acid producing from *Weissella paramesenteroides* as Pb fermenter. 2019.12.03. 일본분자세포생물학회(일본, 후쿠오카)
- ② Antibacterial activity of their protein extract of LAB against fish pathogens. 2019.12.03. 일본분자세포생물학회(일본, 후쿠오카)
- ③ Role and Application of LAB in Food Preservation of *Protaetia brevitarsis*. 2019.12.03. 일본분자세포생물학회(일본, 후쿠오카)
- ④ Production of DHNA, a Bifidogenic growth stimulator in Pb Extraction. 2019.10.23. 한국영양과학회(제주컨벤션센터)
- ⑤ The GAD genes and GABA production from *Protaetia brevitarsis*'s MSG/. 2019.10.10. 한국생물공학회(대구엑스코)
- ⑥ Potential of the 1,4-Dihydroxy-2-Naphthoic acid producing from *Weissella paramesenteroides* as Pb fermenter. 2019.10.10. 한국생물공학회(대구엑스코)
- ⑦ Enhancement of 1,4-Dihydroxy-2-Naphthoic Acid Production by *Weissella* sp Fed-Batch Culture in *Protaetia brevitarsis* extraction. 2019.9.9. 세계산업미생물학회 (이탈리아)
- ⑧ Production of Pb's salt-sauce using LAB and qualitative evaluation. 2019.6.26. 한국식품과학회(송도컨벤션센터)
- ⑨ Potential of LAB for improving storage of PB as food. 2019.6.26. 한국식품과학회(송도컨벤션센터)
- ⑩ Application of LAB improving storage of Pb as Food 2019.4.17. 한국미생물학회(제주컨벤션센터)
- ⑪ The potential of *Glehnia littoralis* Fermented by LAB 2019.4.17. 한국미생물학회(제주컨벤션센터)
- ⑫ Characterization of fermented edible insect, *P.brevitarsis*, inoculated with lactic acid bacteria. 2019.4.10. 한국생물공학회(제주컨벤션센터)
- ⑬ Isolation and characterization of Lactic acid bacteria from edible insect and the Feed 2018.10.11. 한국미생물학회연합국제학회(더케이호텔, 서울)

○ 논문발표 2건

- ① Preparation and characterization of sericin powder extracted with deep sea water 2018.12.16. 3Biotech 9(1), 30-38 Hong sunmee
- ② Heterologous Production and Glycosylation of Japanese Eel Follitropin using Silkworm 2019.7.06. Biotech Biopro Eng 24, 30-38 Hong sunmee

○ 생명자원 기탁 4건

- ① *Weissella paramesenteroides* D20 (KCCM12301P)
- ② *Weissella paramesenteroides* D12 (KCCM12300P)
- ③ *Pediococcus acidilactici* D17(KCCM12472P)
- ④ *Lactococcus garvieae* B44(KCCM12473P)

○ 정책건의 1건

- ① 사료용 곤충 산업화: 영천시 농정과/2019. 02.01

○ 홍보실적 2건

- ① 굼벵이 식품 특허기술로 식용곤충 시장에서의 두각. 2019. 06. 11/ 이코노미타임21
- ② 식용굼벵이 부부의 꿈. 2019. 08.20 / YTN

○ 교육 및 컨설팅 2건

- ① 경북곤충산업의 발전방향 2019.2.15. 경북대학교 생태환경대학
- ② 곤충식품산업 성공전략 2019.6.5. 코엑스

○ 박람회 및 전시회 참가 1건

- ① 곤충식품페스티벌. 동의보급 진액 2019. 06. 05/ 코엑스 서울

○ 수상실적 2건

- ① 경북농업6차산업 공로상. 신명화 2018.8.10. 경북농민사관학교 6차산업화과정
- ② 농업인표창장. 박정철 2019.6.5. 국립농업과학원장

○ 인증 1건

- ① 농촌융복합산업 사업자 인증 2018. 12. 10/ 농림축산식품부

○ 인력양성 3건

- ① 경북농업6차산업화과정 2018년
- ② 농산물가공과정(사이버) 2018년
- ③ 곤충사육과정(사이버) 2018년

○ 제품화 및 사업화 2건

- ① 동의보급 환 2018년, 6,000만원 매출
- ② 동의보급 진액 및 환 2019년, 106백만원 매출
- ③ 동의보급장 2019년, 시제품 홍보

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
흰점박이꽃무지 젖산균 활용 염장발효생산 시스템 구축	20	100	웨이셀라 및 락토바실러스 공배양에 의한 염장발효 숙성공정 확립
젖산균 활용 흰점박이꽃무지 GABA 생산 조건 확립	20	100	락토바실러스균 첨가후 염장발효물의 가바생산 확인(TLC)
젖산균 발효 흰점박이꽃무지장 영양분석완료 및 작성	20	100	일반성분분석, 아미노산, 및 중금속 분석 완료(한국기능식품연구원)
젖산균 발효 흰점박이꽃무지 염장발효(동의보급장)효능 평가	20	100	중성지방 저감효과, 항산화기능, 항균기능, 독성안정성 확인완료
젖산균 발효 흰점박이꽃무지 염장발효 안전성 평가(세포)	20	100	in vitro(Raw, 3T3L1) 세포 안전성, pH, brix, 일반성분분석, 유해, 유효 미생물 확인 완료
합계	100점		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 사업은 고영양, 고단백 미래식품으로서의 식용곤충 중 흰점박이꽃무지 유충을 염장발효에 있어 유산균으로 숙성도 증가에 활용하여 신경안정 기능을 가진 GABA(4-aminobutanoic acid) 생산하기 위해, GABA 생산 가능한 유산균 *Weissella paramesenteroides* 2종(KCCM12300P, 12301P)과 *Lactobacillus plantarum*(KCCM12299P) 1종을 선발하고, 천일염과 정제염의 30-40%의 농도, 숙성기간 3개월 조건을 완성하였다. 이를 통해 유산균을 이용한 GABA 함유 식용곤충추출 염장발효물(동의보급장) 체내의 중성지방의 적감에 유효함과 항산화 효능도 높았다. 또 기존의 식용곤충의 문제점이 되는 중금속 오염에 대한 대안으로 생각된다. 이는 기존의 흰점박이꽃무지 기종 상품과 다른 제품을 제시하고, 업그레이드 하여 이취제거, 맛향상과 더불어 유산균배양에 의한 콜라겐 형성에 관여하는 프롤린 아미노산(611mg/100ml, w/w)과 중성지방저감, 항산화효과 및 기존 액젓비교해 세포안정성이 높음을 확인하였고, GABA가 함유된 동의보급장 시제품을 제작완료하였다(기술출원, 상품출원).

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

계획된 연구개발 목표 및 연구내용을 성실히 수행하여 당초계획보다 정성적 및 정량적 목표를 상회하여 달성하였으며, 향후 흰점박이꽃무지 외의 식용곤충 또는 유용곤충에 적용하여 식품 이외의 면역증강, 항균기능 외의 기타 대사물 활용 사료 등에 적용할 것으로 기대 됨.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 식용곤충과 프로바이오틱스 새로운 융합 제품 개발 및 적용확대
- 흰점박이꽃무지 유충 영양발효물은 시판되는 액젓과는 다른 공정고도화에 의한 고부가가치화
- 사용된 유산균은 포도상구균, 대장균, 리스테리아를 항균효과의 방부 대체 효과
- 단백질, 탄수화물, 지방 분해효소의 영향으로 저분자화 되어 소화흡수율을 높여 고령자 등의 소비자층 확대
- 중성지방저감기능 및 항산화효과의 흰점박이꽃무지 유산균 영양발효물로 곤충식품의 일반화 유도
- 식용곤충 산업 분야의 이취, 저장, 유통에 관련 된 문제 해결과 새로운 식용곤충 식품의 패러다임을 제시
- 식용곤충의 고단백의 저분자화로 소화흡수율을 높여 환자식, 고령자 소비자 확대 가능
- 소비자의 혐오감, 거부감을 해결할 건강 음료 제품, 화장품에 적용
- 고부가가치 프로바이오틱스 소재 개발에 따른 곤충농가의 소득 증대 및 농가수 확대
- 단백질, 탄수화물, 지방 분해효소의 영향으로 저분자화 되어 소화흡수율이 높음
- 흰점박이꽃무지 이외의 다른 식용곤충에 적용확대하여 곤충산업의 가속화
- 곤충자원의 식품소재 산업화의 업그레이드 및 신가치 창출
- 농생명산업인 그린산업과 화이트산업이 동반성장에 다른 국가 경쟁력 제고

IV. 보안성 검토

○ [국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정] 제 24조의 4 제1항에 해당하지 않음으로 일반으로 분류

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

○ 해당사항 없음

2. 연구기관 자체의 검토결과

○ 해당사항 없음

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	농생명기술개발사업	
연구과제명	젖산균을 활용한 식용곤충 발효소스 제조 기술 개발			
주관연구기관	농업회사법인 주식회사 동의보급	주관연구책임자	박 정 철	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	175,000	45,000	-	220,000
연구개발기간	2018. 04. 26. ~ 2019. 12. 31			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① GABA 생산 젖산균주 확보 및 특성분석	① GABA 생산 유산균주 5종 KCCM 등록
② 흰점박이꽃무지(꽃벵이) 염장발효 숙성 공정확립	② 꽃벵이염장 소금종류, 농도, 유산균, 숙성기간 구축, 특허출원 1건
③ 흰점박이꽃무지 젖산균 염장발효물의 효능평가	③ 중성지방저감, 항산화, 항균, 독성안정성
④ 흰점박이꽃무지 젖산균 염장발효물의 이화학분석	④ GABA, 유리아미노산, 중금속, 색소, 보존료, 총질소 분석완료
⑤ 여장발효물(동의보급장, 시제품)의 안전성, 안정성 및 성분분석	⑤ in vitro(Raw, 3T3L1) 세포 안전성, pH, brix, 일반성분분석, 유해, 유효 미생물 확인 완료 시제품 1건(동의보급장)

* 본 사업은 고영양, 고단백 미래식품으로서의 식용곤충 중 흰점박이꽃무지 유충을 활용하여 천일염 또는/ 및 정제염으로 염장하여 신경안정기능을 가진 GABA(4-aminobutanoic acid) 생산하기 위해, GABA 생산 가능한 유산균 *Weissella paramesenteroides* (KCCM12300P, 12301P)과 *Lactobacillus plantarum*(KCCM12299P)을 선발하고, 탄소원으로 전분(다당류)을 첨가하여 흰점박이 열수추출물배양조건을 완성하였다. 또한 천일염(정제염가능), 30-40% 소금, 젖산균초기투여(1주일, Wp, Lp공배양물), 3개월 발효 등의 공정조건을 확립하였다. 이를 통해 젖산균을 이용한 GABA 함유 흰점박이꽃무지 염장발효물이 인간체내의 중성지방 저감효과에 유효함과 항산화 효능에 우수함을 증명하였다. 이는 시판액젓의 다른 패러다임으로 식용곤충이용 유산균배양에 의한 콜라겐 형성에 관여하는 프롤린 아미노산(311mg/100ml, w/w)과 중성지방저감, 항산화, 항균효과를 가지고, GABA가 함유된 동의보급장 시제품을 제작완료하였다(기술출원, 상품출원).

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		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	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	30				30								20			10	10			
최종목표	1				1								2			1	1			
연구기간내 달성실적	8	4			1	166		1			2		2.0	14	2	3	1	2	3	
달성율(%)	800	400			100			100			200		700			100	200			

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	흰점박이꽃무지 유충(꽃벵이) 염장 투여 젖산균 배양기술(GABA 생산)
②	흰점박이꽃무지 염장발효물의 숙성발효 조정(성분, 효능 유지)
③	GABA함유 흰점박이꽃무지 염장발효의 중성지방, 중금속 저감효능 조성물

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장에로 결 해	정책 자료	기타
①의 기술	✓	✓				✓	✓	✓		
②의 기술	✓	✓				✓	✓			
③의 기술	✓	✓				✓	✓			

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	유해균 억제 항균기능 젖산균포함 염장발효물 제시
②의 기술	흰점박이꽃무지 염장 유산균발효물의 성분, 기능 및 안전성 향상
③의 기술	중성지방억제 효능을 통한 비만억제제 기대

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)	
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시		
												SCI	비SCI							논문평균IF
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명					
가중치	30	10				20	10							20				10		
최종목표																				
연구기간내 달성실적	8	4				1	166		1			2		2.0	14	2	3	1	2	3
연구종료후 성과창출 계획		<u>1</u>		<u>1</u>			<u>200</u>		<u>3</u>			<u>1</u>			<u>1</u>				<u>3</u>	

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	흰점박이꽃무지의 염장 발효식품 및 이의 제조방법		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	10,000 천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	종료 후 1년 이내	실용화예상시기 ³⁾	종료 후 2년 이내
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	젖산균 발효기술 및 여과 멸균기술 지도 필요		

주 의

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