

발간등록번호

11-1543000-000574-01

어린이 성장발육 · 학습력 증진에 적합한 청국장용
콩품종 선별 및 기능성 제품 개발

(Selection of soybean plant strain and development of
new soybean products for the increase of children's
growth and learning ability)

장 마 을

농림축산식품자료실



0014680

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “어린이 성장발육 · 학습력 증진에 적합한 청국장용 콩품종 선별 및 기능성 제품개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2014 년 10 월 10 일

주관연구기관명 : (주)장마을

주관연구책임자 : 박 규 민

1세부연구책임자 : 박 규 민

연 구 원 : 박 정 결

연 구 원 : 박 인 애

연 구 원 : 민 경 선

협동연구기관명 : 부산대학교 산학협력단

1협동연구책임자 : 김 동 섭

2협동연구책임자 : 황 대 연

요 약 문

I. 제 목 : 어린이 성장발육 · 학습력 증진에 적합한 청국장용 콩 품종 선별 및 기능성 제품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 목적

복잡하고 바쁜 현대사회에 들어 영양불균형과 패스트푸드 등으로 인한 각종 질병의 유발로 인하여 전통식품과 슬로우 푸드에 대한 관심이 높아지고 있으며, 어린이의 성장 발육에 도움을 줄 수 있는 제품개발에 관한 요구가 증가하고 있다. 콩은 단백질뿐만 아니라 필수아미노산과 비타민 등 풍부한 영양공급원으로 이용되었으며, 포화지방산과 콜레스테롤의 함량이 낮아 각종 성인병을 막아줄 수 있는 식품재료로 된장 청국장의 원료로 이용되었다. 청국장은 콩을 발효시켜 만든 우리나라의 전통재래 식품으로서 쇠고기에 버금가는 각종 영양분을 함유하고 있을 뿐만 아니라 isoflavone과 saponin과 같은 각종 생리활성물질을 다량함유하고 있기 때문에 기능성 식품으로서 주목을 받고 있다. 그러나 청국장은 발효에 의해 생성되는 특유의 향으로 인해 시장이 성장하지 못하고, 특히 어린이들로부터 호감을 받지 못하고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 청국장 발효에 효과적인 국내 콩 품종을 선별하고, 불쾌취가 적게 발생하는 청국장 발효 균주를 개발하여 GABA 함량이 높은 고부가가치 기능성 청국장 제품 제품을 개발 · 생산 함으로서 농가의 소득 향상 및 기업매출의 증진에 기여하고자 한다.

2. 필요성

산업사회로의 발전에 따라 다양한 어린이 성장발달 저해요인들이 출현하고 있으며, 그 중에서도 특히 식품은 체내로 직접 섭취되어 호르몬분비저해, 성장억제, 뇌 발달 저해, 아토피 유발 등의 다양한 인체질환 유발하고 있다. 최근 시판되는 다양한 어린이 섭취식품들은 많은 종류의 인체유해 식품첨가물들이 함유되어 있으며, 이들 물질들은 어린이에게 숙면방해, 성장호르몬 분비저해 등의 원인으로 작용하고 있는 것으로 알려지고 있다. 또한 어린이의 편중된 식습관, 식품첨가물 등에 의해서 유발되는 만성증후군은 어린이의 성장발달을 저해하는 원인으로 보고되고 있으며, 최근 일부 연구보고에서는 아토피 어린이는 정상적인 어린이에 비하여 성장이 저해되는 것으로 보고되었다. 특히 어린이들이 즐겨먹는 각종 패스트푸드는 어린이들의 두뇌활동을 저해하는 것으로 알려지면서 어린이들을 위한 기호성 슬로우 푸드 제품에 대한 요구가 증가되고 있어 어린이용 제품개발의 필요성이 절실한 실정이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 청국장 제조를 위한 기능성 콩 품종 선별 및 기능성 청국장 발효공정 개발
 - 청국장용 기능성 콩 선별
 - 청국장에 적합한 품종 육성

- 청국장 제조용 기능성 미생물 확보
- 기능성 강화 조건 확립
- 원료콩 별 기능성 청국장 발효공정 확립

○ 제2세부과제 : 어린이 성장발육 및 학습력 증진 기능성 효능 분석

- 청국장이 세포의 성장 및 학습력에 미치는 영향 분석(*In vitro* 시험)
- 모델동물을 이용한 청국장의 효능평가 (*In vivo* 시험)

○ 제3세부과제 : 어린이 기호성 청국장 제품의 개발

- 냄새가 없고 어린이 입맛에 맞는 제품 개발
- 제품의 대량 생산체계 구축 및 건강 기능성 식품 허가 신청

IV. 연구개발결과

청국장 발효에 적합한 콩 품종을 선별하기 위하여 국내에서 생산되는 15종의 콩 품종을 대상으로 청국장 발효능을 비교하였다. 청국장의 기능성분으로 알려진 isoflavone의 함량을 비교한 결과 대풍콩과 풍산나물콩의 함량이 가장 높은 결과를 보여 본 연구의 재료로 사용하였다.

청국장 발효 균주를 분리하기 위하여 시판청국장, 대중음식점의 청국장, 일반 가정에서 섭취하고 있는 청국장 등을 대상으로 균주를 분리하여 1,500여 균주를 1차 선별균주로 분리하고 발효실험에 사용하였다. 선별된 1,500여 균주의 점질물 함량과 GABA 함량을 측정하여 23균주를 2차 선별균주로 정하고, 이 가운데 GABA 함량이 가장 높은 MC31을 본 연구의 실험균주로 선택하였다. 선택된 실험균주는 탄소원 이용 패턴과 16s rRNA sequence 분석 결과를 바탕으로 *Bacillus subtilis* MC31로 명명하였다. GABA 생산을 위한 최적발효조건을 알아보기 위해 *Bacillus subtilis* MC31을 온도와 배양시간을 달리하여 실험한 결과 37℃에서 48시간 동안 배양했을 때 GABA 생산량이 가장 높아 최적 발효조건으로 결정하였다.

청국장의 불쾌취를 감소시키기 위하여 청국장의 냄새를 제거한다고 알려진 유산균 가운데 콩의 GABA 함량을 증가시키는 균주를 분리하여 혼합배양을 시도하였다. 시중에서 구입한 김치와 각 가정에서 섭취하고 있는 김치에서 유산균을 분리하고, GABA 함량을 측정하여 함량이 가장 높은 strain No. 383을 실험 균주로 선택하였다. 실험균주는 동정과정을 통하여 *Lactobacillus sakei* 383으로 명명되었다. 혼합배양에 의한 불쾌취의 감소와 GABA 생산을 위한 최적배양 조건을 살펴본 결과 *Bacillus subtilis* MC31과 *Lactobacillus sakei* 383을 1:1 비율로 접종하여 37℃에서 72시간 동안 발효시켰을 때 GABA 함량이 가장 높았으며, 불쾌취도 감소하여 최적 발효조건으로 결정하였다.

또한, 청국장이 어린이 성장발육 및 학습력증진에 미치는 효능을 분석하였다. 먼저, 뇌하수체 전엽 세포주를 이용하여 6가지 콩품종 중에서 성장호르몬의 분비를 가장 많이 유도하는 대원, 대풍, 태광을 확인하였고, 분비된 성장호르몬은 골아세포와 간세포의 분화를 촉진하였다. 또한, 학습력의 지표인 NGF의 분비는 6가지 품종 중에서 태광과 신화에 의해서 가장 촉진되었으며, PC12세포의 분화와 신호전달과정을 촉진하였다. 이러한 세포실험을 바탕으로 모델동물을 이용

하여 성장발육개선과 학습력증진에 대한 실험을 실시하였다. 그 결과, 청국장의 단기 및 장기 투여는 성장호르몬의 분비 증가, 성장판 성장촉진, 치밀골의 두께 증가, 성장호르몬 수용체의 발현조절 등을 유도하는 우수한 효과를 나타내었다. 치매모델동물을 이용한 실험에서 청국장은 뇌조직의 NGF 발현증가, 혈액내 NGF분지 촉진, NGF수용체 발현조절 등을 유도하였다. 더불어, 독성평가지험에서, 청국장은 임상증상, 장기무게, 간독성, 신장독성 등의 변화를 유발하지 않았으며, 학습력증진 효능평가 시험에서, 청국장은 TMT에 의해 유도된 단기기억과 장기기억의 회복을 촉진하였고, 아세틸콜린 에스터레이즈 활성 억제, 신경세포의 손상방지, NGF분비 촉진, NGF수용체 신호전달과정 조절 등을 유도하였다. 특별히 본 연구에서는 청국장이 아토피 질환을 효과적으로 개선함을 IL-4/Luc/CNS 형질전환마우스를 이용하여 최초로 규명하였다. 청국장은 PA처리로 처리된 모델동물에서 luciferase 신호억제, 귀 두께의 감소, 진피구멍 감소, 림프절 무게감소, 비만세포의 침투억제 등을 유도하였다.

어린이들에게 거부감이 없는 청국장제품의 개발을 위해 어린이들을 대상으로 청국장에 대한 기호도를 조사 한 결과 많은 어린이들이 청국장의 냄새에 대한 거부감을 나타냄으로써 냄새의 제거나 약화가 청국장 제품의 성패를 가르는 중요한 요인으로 파악되었으며, 기존의 제품과 차별된 독자적인 제품형태의 제품개발을 시도하였다. 기호도 조사를 바탕으로 과자형태의 시제품을 개발하였으며, 시식 후 나쁘지 않은 평을 받아 현재 시장조사 중에 있으며, 어린이들의 호감을 증대시키기 위하여 제품개발과 향상을 추진하고 있다. 향후 출시된 제품들도 소비자조사와 기호도 조사 등을 실시하여 제품생산에 반영할 계획이다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구의 결과를 토대로 국내외 11건의 학술논문이 게재되었으며, 특히 2건을 출원 또는 출원 중에 있다. 출원된 2건 중에서 현재 “GABA 함량이 높은 청국장을 발효하는 균주의 분리와 개발”은 출원이 되었으며 제품생산에 이용되고 있는 상태이다. 현재 어린이용 청국장 발효제품은 과자형태로 생산하여 시장성을 살펴보고 있는 상황이다. 또한, 출원 준비 중인 “혼합배양에 의해 불쾌취가 줄어든 청국장 제조방법”을 바탕으로 다양한 제품의 상업화가 이루어질 경우 슬로우 푸드에 대한 소비욕구와 기능성을 가진 제품의 홍보를 통해 수익창출이 기대된다.

SUMMARY

(영문요약문)

I. Title : Selection of soybean plant strain and development of new soybean products for the increase of children's growth and learning ability

II. The purpose and necessity of reasearch

1. Purpose

Recently, many ple in Korean are greatly interested in traditional food and slow food because various type of serious diseases were induced by unbalance of nutritional condition and ingesting a large amount of fast food. Also, it is needed to develop novel products which help children's growth and nutrition. Among of various foods sources, beans have been provided as nutritional source due to it's plentiful protein, essential amino acids and vitamin as well as lower cholesterol and saturated fatty acid level. Especially, it was successfully used as sources which have ability to prevent some chronic disease, for Denjang and Cheonkookjang. Of these, Cheonkookjang is one of Korean traditional foods which made from soybean using fermentation process. They were received on a great intention because they contained several bioactive compounds including isoflavone and saponin as well as various nutrients. However, Cheonkookjang can't get good impression from children due to the have unique and unpleasant smell. Also, above problems inhibited the enhancement of market about Cheonkookjang related products. Therefore, in this study, we are going to contribute the increase of company's sales and farm income through the development of variable functional Cheonkookjang related products containing high concentration of GABA, the selection of appropriate select soybean strain and the identification of bacteria strain producing low specific perfume products.

2. Necessity

With the development to industrial society, many impediment factors which inhibit children's growth are appearing. Among these factors, instant foods are directly induced many physical diseases such as a suppression of hormone secretion, suppression of body growth, inhibition of brain development and atopic dermatitis after ingestion into human body. Recently, it has been widely known that many foods for child may contain several kinds of food additives which could induce a disturbance of deep sleep and inhibition of growth hormone secretion. Furthermore, stereotypes induced by ingestion of food additives and child's unbalanced diet were considered as one of inhibition factors for child growth. Also, some previous studies suggested that the growth rate of child suffering atopic dermatitis was lower than that of normal child. Especially, there is a growing need to

develop a novel functional slow food products for child because various fast foods which were like to be eat child inhibit the development of brain activity.

III. Content and scope of research and development

○ Selection of soybean and development of fermentation process for the production of functional Chungkookjang

- Selection of functional soybean for Chungkookjang
- Development of soybean for Chungkookjang
- Isolation of functional microorganism for the production of Chungkookjang
- Development of the conditions for enrichment of functionality
- Establishing fermentation process for the production of functional Chungkookjang

○ Efficacy study of Chenongkookjang on the growth development and learning capacities for child

- Therapeutic effects analysis of Chenongkookjang on the neuronal cell growth and NGF secretion abilities (*In vitro* analysis).
- Therapeutic effects analysis of Chenongkookjang on various chronic disease including neurodegenerative disease and atopic dermatitis using animals model expressing human disease (*In vivo* analysis)

○ Development of Chungkookjang for children

- Development of smell-less Chungkookjang for children
- Establishing mass production system and application for healthy food permission

IV. Results of research and development

In order to select soybean breedings for Chungkookjang fermentation, fermentation productivity of 15 breedings of soybeans were analysed. Daepoong and Poongsannamul soybeans were selected and used in this research by comparison of the amount of isoflavone which is known as functional compound in soybean. Microorganisms were screened from the Chungkookjangs collected from various samples, and 1,500 strain were selected as 1st-screened strains and used for experiment. Out of 1,500 strains, 23 strains were selected 2nd-screened strains by analysis of the amount of slim material and γ -aminobutyric acid(GABA), and the strain MC31 was selected for experiment. Selected strain was named as *Bacillus subtilis* MC31 by the results of usage of carbon sources and 16s rRNA sequence. Maximum amount of GABA was produced when *Bacillus subtilis* MC31 was cultured at 37°C for 48hrs. For elimination of unpleasant smell in Chungkookjang, Lactic acid bacterium which increases the amount of GABA was used for mixed culture with *Bacillus subtilis* MC31. Lactic acid bacteria were isolated from various Kimchi samples,

and strain No. 383, which produces maximum amount of GABA, was selected for experiment. The selected strain was named as *Lactobacillus sakei* 383 by the results of identification procedure. According to the elimination of unpleasant smell and the amount of GABA production, optimal fermentation condition was that the mixture of *Bacillus subtilis* MC31 and *Lactobacillus sakei* 383 were cultured at 37°C for 72hrs with a 1:1 ratio.

In addition, we investigated the therapeutic effects of Cheongkookjang on the body growth and learning ability of child. Firstly, the results from in vitro analysis showed that three soybean strain including daewon, daepung and taekwang was significantly induced the growth hormone secretion. After secretion, this hormone induced the differentiation of osteoblast cells and liver cells. Also, two soybean strains including taekwang and shinhwa among six different strains stimulated the secretion of Nerve growth Factor (NGF) which is one of key marker for learning ability, and the differentiation of PC12 cells. Furthermore, Cheongkookjang were administrated into various animal models to verify their effect based on the results of in vitro analyses. Treatment of Cheongkookjang for short and long period induced the secretion of growth hormone, the enhancement of growth plate, the increase of compact bone and the different regulation of growth hormone receptor signaling. Furthermore, the model animal for Alzheimer's disease treated with Cheongkookjang showed the increase of NGF expression, high concentration of blood NGF, and regulation of NGF receptor signaling pathway. In toxicity analyses, the administration of Cheongkookjang did not induce any significant alteration on the body and organ weight, liver and kidney histology, serum biochemistry. The pre-treatment of Cheongkookjang prevented the impairment of short-term and long-term memory, the death of neuronal cells as well as stimulate the suppression of acetylcholine esterase activity, the stimulation of NGF secretion. Especially, we founded the new function of Cheongkookjang in IL-4/Luc/CNS-1 Tg mice treated with PA alone. The Cheongkookjang-treated mice showed improvement of common allergic responses including decreased ear thickness, dermis thickness, auricular lymph node (ALN) weight and infiltrating mast cells.

For development of Chungkookjang product which doesn't give resistance to children, the favorite feeling on Chungkookjang was surveyed. Elimination of unpleasant smell of Chungkookjang product was turned out the key-point of success or failure of the product by the result of survey, production of originative Chungkookjang product is in progress. Confectionary type of Chungkookjang product was developed and searched for marketing, more development of product is in progress to increase favorite feeling on Chungkookjang. The survey results about Chungkookjang will be counted on new products.

V. Results of the study and application plan

From most of our results, we published 12 scientific papers containing large novel data on SCI and KCI grade. Especially, our study identified the novel bacteria strain having the capacity with low unique and specific perfume and verified the appropriate soybean strain. The extract of Cheongkookjang produced by above bacteria and soybean

strain applied to the study of therapeutic effects. Especially, this extract improved the several chronic disease including neurodegenerative disorder, atopic dermatitis as well as stimulated the growth of animal body in specific animal model. Furthermore, we submitted 2 patents based on the results from *in vitro* and *in vivo* study. Among these, one entitled "Bacillus subtilis strain with high activity for GABA produce and manufacture method for Cheongkookjang" contributed to use manufacturing process for novel products, while other one have to do with Cheongkookjang product for child. Moreover, if the commercialization of various products were produced based on the manufacture method for Cheongkookjang using mixed culture strain, these slow foods would be catered consumer need as well as created novel income of company.

CONTENTS

Chapter 1. Outline of the research project	13
Section 1. The purpose of research	13
Section 2. The necessity of research	14
Section 3. The range of research	16
Chapter 2. Trend of foreign and domestic on researches	17
Section 1. Trends of research	17
Section 2. The market status	19
Chapter 3. The contents and results	21
Section 1. Selection of soybean and development of fermentation process for the production of Chungkookjang	21
1. Selection of soybean for Chungkookjang	21
2. Screening, identification and functionality of microorganism	22
3. Screening of Lactic acid bacteria	35
4. Production of Chungkookjang by mixed culture	39
4. Components and quality of Chungkookjang produced by mixed culture	43
Section 2. Efficacy study of Chenongkookjang on the growth development and learning capacities for child	51
1. Establishment of hippocampal and neuroblastoma cell line	51
2. Effects of Chenongkookjang on the growth hormone activity	53
3. Effects of Chenongkookjang on the nerve growth factor activity	61
4. Establishment of animal model for human disease	66
5. Evaluation of Chenongkookjang on the body growth and metabolism	68
6. Evaluation of Chenongkookjang on the neurodegenerative disease	80
7. Toxicity study of Chenongkookjang	86

8. Pharmacological effects of Chenongkookjang on the atopic dematitis and the learning ability	93
9. Preparation of submission for KFDA	109
Section 3. Production of Chungkookjang for children	114
1. Production of Chungkookjang for children	114
2. Development of manufacture system for mass production of Chungkookjang	126
3. Preparation for the permission of functional food	134
Chapter 4. Goal achievement and contribution to related industries ..	135
Section 1. Achievements of Goals and Contributions	135
Section 2. Technological aspect	138
Section 3. Economical and industrial aspect	138
Section 4. Social and cultural aspect	138
Chapter 5. Results of the study and application plan	139
Section 1. A Patent Application	139
Section 2. Papers	139
Section 3. Academic Presentaion	141
Section 4. Other Application Plans	142
Chapter 6. International science and technology information collected in the process of the study	144
Chapter 7. Research facilities and equipment status	146
Chapter 8. References	147

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	13
제 1절 연구개발의 목적	13
제 2절 연구개발의 필요성	14
제 3절 연구개발의 범위	16
제 2 장 국내외 기술개발 현황	17
제 1절 국내·외 관련분야에 대한 기술개발 현황	17
제 2절 국내·외 제품생산 및 시장현황	19
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	21
제 1절: 제 1협동 청국장 제조를 위한 기능성 콩 품종 선별 및 기능성 청국장 발효공정 개발	21
1. 청국장용 콩 품종 선별	21
2. 청국장 발효 균주의 분리, 동정 및 기능성 조사	22
3. 냄새 제거를 위한 유산균의 분리	35
4. 혼합배양에 의한 청국장의 제조	39
5. 혼합배양에 의해 제조된 청국장의 성분 및 품질	43
제 2절: 제 2협동 어린이 성장발육 및 학습력 증진 기능성 효능 분석	51
1. 성장발육/학습력증진 기능성탐색을 위한 세포주 확립	51
2. 성장발육개선 <i>in vitro</i> 기능성 탐색	53
3. 학습력증진 <i>in vivo</i> 기능성 탐색	61
4. 실험동물(모델동물) 도입 및 구축	66
5. 성장발육개선 <i>in vivo</i> 기능성 탐색	68
6. 학습력증진 <i>in vitro</i> 기능성 탐색	80
7. 청국장의 독성시험	86
8. 청국장의 약리효능 평가	93

9. KFDA 허가자료	109
제 3절: 제 1세부 어린이 기호성 청국장 제품 개발	114
1. 어린이 기호성 청국장 제품의 개발	114
2. 청국장 제품의 대량 생산체계 구축	126
3. 기능성 식품 허가 준비	134
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	135
제 1 절 연구개발의 달성도 및 기여도	135
제 2 절 기술적 측면	138
제 3 절 경제·산업적 측면	138
제 4 절 사회·문화적 측면	138
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	139
제 1 절 특허 출원	139
제 2 절 논문	139
제 3 절 학술발표	141
제 4 절 그 외 활용계획	142
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	144
제 7 장 연구시설·장비 현황	146
제 8 장 참고문헌	147

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

청국장은 전통발효식품 가운데 가장 단기간 내에 완성할 수 있을 뿐만 아니라 쇠고기에 버금가는 영양적 가치를 가지고 있으며, 특히 비타민 및 무기염의 함량은 쇠고기뿐만 아니라 그 원료가 되는 콩보다 훨씬 우수한 것으로 보고되어 있다. 최근 많은 연구자들의 보고에 의하면 청국장은 콩에서 유래된 isoflavone (genistein, daizein), saponin, phytic acid, oligosaccharide, anthocyanin, trypsin inhibitor 등의 각종 생리활성물질과 항산화물질 및 혈전용해효소 (fibrinolytic enzyme)를 다량 함유하고 있기 때문에 기능성 식품으로서 그 중요성이 재조명되고 있다.

최근 들어 과학적인 연구를 통하여 보고된 청국장의 건강 기능성 효과는 항암, 호르몬 분비촉진, 항산화(노화예방), 혈액순환, 혈전용해, 혈관 강화, 간/위 보호, 위/십이지장 궤양, 갱년기장애, 고지혈증, 고혈압, 당뇨, 뇌졸중, 다이어트, 동맥경화, 두뇌활동촉진, 면역력증가, 설사, 변비, 소화불량, 숙취, 세포 재생촉진, 항균, 심근경색, 심장병, 치매, 전립선비대증, 피부노화/주름방지, 콜레스테롤문제, 활성산소제거, 알레르기 예방 등이 있는데, 청국장의 새로운 생리기능성이 밝혀지면서 소비자의 구매 욕구뿐만 아니라 궁극적으로는 세계적인 식품으로서의 위치를 자리매김할 것으로 기대되고 있다.

이와 같은 청국장은 우수한 영양식품으로 다양한 약리효과가 보고되어 있지만 특유의 냄새 때문에 기피하는 경향이 매우 크며, 아동의 기호에 적합한 제품의 출시는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 어린이의 두뇌개발에 도움을 주며, 청국장 특유의 냄새를 줄인 제품을 개발함으로써 농가의 소득증대 및 기업의 매출증대에 기여하고자 하며 최종목표 및 주요 내용은 다음과 같다.

○ 최종목표 :

- 어린이 성장발육 · 학습력 증진에 적합한 청국장용 콩품종 선별 및 기능성 제품개발

○ 주요내용

- 청국장 제조를 위한 기능성 콩 품종 선별 및 육성
- 청국장의 기능성 성분을 향상시키기 위한 발효공정 개발 및 품종별 적합발효 조건 확립
- 청국장 기능성 성분이 어린이 성장발육 및 학습력 증진에 미치는 영향에 대한 *in vitro* 및 *in vivo* 효능분석
- 어린이 기호에 적합한 청국장 제품개발 및 대량생산체계 구축

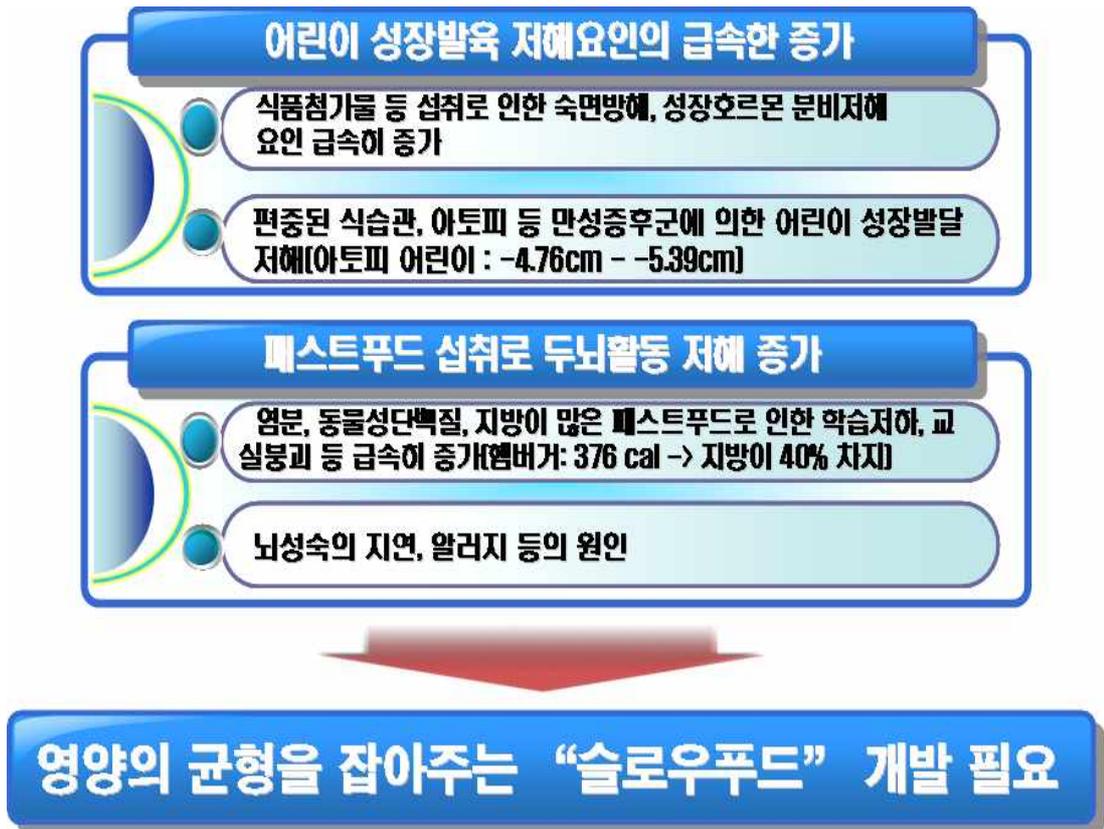
제 2 절 연구개발의 필요성

필요성 요약	<ul style="list-style-type: none"> ■ 어린이 성장발육저해요인의 급속한 증가 ■ 패스트푸드 섭취로 두뇌활동 저해 ■ 기호성 슬로우 푸드(브레인 푸드) 제품개발 요구 증가 ■ 국내 콩의 우수성과 안전에 대한 인식확대로 콩 수요 증가 ■ 청국장 원재료인 콩 품종별 가공적성 검토 미흡 ■ 제조사별 시판청국장의 기능성 성분편차가 매우 심함 ■ 어린이 기호에 적합한 제품출시 전무
--------	--

1. 어린이 성장발육 및 학습력 증진 제품개발의 필요성

- 산업사회로의 발전에 따라 다양한 어린이 성장발달 저해요인들이 출현하고 있으며, 그 중에서도 특히 식품은 체내로 직접 섭취되어 호르몬분비저해, 성장억제, 뇌 발달 저해, 아토피 유발 등의 다양한 인체질환을 유발함

<슬로우 푸드(브레인 푸드) 개발의 필요성>



2. 어린이 성장발육저해요인의 급속한 증가

- 최근 시판되는 다양한 어린이 섭취식품들은 많은 종류의 인체유해 식품첨가물들이 함유되어 있으며, 이들 물질들은 어린이에게 숙면방해, 성장호르몬 분비 저해 등의 원인으로 작용하고 있음
- 어린이의 편중된 식습관, 식품첨가물 등에 의해서 유발되는 만성증후군은 어린이의 성장발달을 저해하는 원인임
- 최근 일부 연구보고에서는 아토피 어린이는 정상적인 어린이에 비하여 약 4.76 cm ~ 5.39 cm정도 성장이 저해됨이 보고됨

3. 패스트푸드 섭취로 두뇌활동 저해

- 어린이들이 즐겨먹는 피자, 치킨, 햄버거 등의 패스트푸드는 요리가 간편하고 맛이 좋아 섭취량이 지속적으로 증가하고 있음
- 이들 패스트푸드는 염분, 동물성단백질, 지방 등이 다량 함유되어 있어 학습력 저하, 교실붕괴 등의 원인으로 지목받고 있음

4. 기호성 슬로우 푸드 제품개발 요구 증가

- 청국장은 패스트푸드의 문제점을 해결할 수 있는 대표적인 어린이 맞춤형 식품으로 성장발육과 학습력 증진에 유용한 식품원임
 - ☞ 청국장이 성장발육에 좋은 이유
 - 단백질 35-40% 함유
 - 어린이 성장에 중요한 칼슘 100 g당 217 mg 함유
 - 칼슘흡수 촉진단백질과 비타민 K 함유
 - 식물성 에스트로젠은 어린이 발달을 촉진
 - 미네랄, 비타민 E 등 면역력 증가성분 함유
 - 100 g당 3 mg의 철분 함유
 - ※매일 최소 2회 이상의 유제품과 4회 이상의 다른 단백질군 소비 권장
(WebMD Health News, 2008. 8. 13)
 - ☞ 청국장이 학습력 증진에 좋은 이유
 - 청국장은 김치와 더불어 대표적인 “슬로우 푸드”
 - 뇌의 신경세포를 구성하는 lecithin이라는 성분을 다량 함유하고 있어 두뇌에 충분한 영양분 공급 → 학습능력 증진

제 3 절 연구개발의 범위

앞서 제시한 바와 같이 청국장은 다양한 기능성분과 생리활성 물질을 함유하여 기능성 식품으로서 잠재적인 가치가 풍부하지만 특유의 냄새 때문에 거부감을 나타내는 소비자가 많고, 특히 어린이들은 청국장을 기피하는 가장 큰 원인으로 알려지고 있다. 따라서 본 과제에서는 어린이들의 두뇌개발에 도움을 줄 수 있는 GABA의 함량이 높으면서, 발효작용을 진행시키는 새로운 균주의 개발로 청국장 특유의 냄새를 감소시키고자 한다. 또한 청국장 발효에 적합한 콩 품종을 선별하고, 발효공정을 최적화하며 동물실험을 통한 효능검사를 실시하여 고부가가치를 지니는 제품을 개발한다면 농가의 소득과 기업의 매출증진에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

구체적인 연구 범위는 다음과 같다.

- 청국장 제조를 위한 기능성 콩 품종 선별 및 기능성 청국장 발효공정 개발
 - 청국장용 기능성 콩 선별
 - 청국장에 적합한 품종 육성
 - 청국장 제조용 기능성 미생물 확보
 - 기능성 강화 조건 확립
 - 원료콩 별 기능성 청국장 발효공정 확립
- 어린이 성장발육 및 학습력 증진 기능성 효능 분석
 - 청국장이 세포의 성장 및 학습력에 미치는 영향 분석
 - 모델동물을 이용한 청국장의 효능평가
- 어린이 기호성 청국장 제품의 개발
 - 냄새가 없고 어린이 입맛에 맞는 제품 개발
 - 제품의 대량 생산체계 구축 및 건강 기능성 식품 허가 신청

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황

- 청국장은 오래전부터 우리나라에만 존재하는 전통발효 식품으로 해외의 기술개발에 대한 현황은 청국장과 유사한 균주를 이용하여 발효시킨 일본의 Natto를 비교할 수 있음
- 우리나라의 청국장과 유사한 일본의 Natto는 혈전증에 약리효과가 탁월한 nattokinase와 혈압상승과 관련된 angiotensin-converting enzyme(ACE)의 억제효과, 항산화력 등이 확인되었는데, 최근 우리나라의 청국장에서도 혈전용해효소를 확인하였을 뿐만 아니라 한국식품개발연구원 팀은 청국장의 항암, 항돌연변이성 효과를 검증하였음
- 우리나라의 전통 콩 발효식품인 청국장은 발효과정에서 *Bacillus subtilis*가 생산하는 효소 작용에 의해 콩 단백질이 저분자의 peptide로 분해되어 소화흡수가 용이하고, 풍미가 특유하며 영양적, 생리적으로 다양한 기능을 나타내는 것으로 보고되어 있음

“소고기” 를 능가하는 효능을 지닌 청국장

□ 청국장의 주요 성분

	수분 (%)	열량 (Kcal)	당질 (g)	단백질 (g)	지방 (g)	칼슘 (mg)	비타민 B ₁ (mg)	비타민 B ₂ (mg)	철분 (mg)	콜레스테롤 (mg)
쇠고기 (한우, 등심)	63.8	218	0.2	21.0	14.1	11	0.07	0.19	2.4	64
대두, 노란콩, 삶은것	61.7	175	9.5	17.8	7.7	75	0.06	0.1	3.2	0
청국장, 생것	56.0	178	6.4	18.6	8.7	118	0.06	0.22	3.3	0

<한국인 영양권장량 7차 개정판 부록 영양기표, 2000>

- 청국장은 전통발효식품 가운데 가장 단기간 내에 완성할 수 있을 뿐만 아니라 쇠고기에 버금가는 영양적 가치를 가지고 있으며, 특히 비타민 및 무기염의 함량은 쇠고기뿐만 아니라 그 원료가 되는 콩보다 훨씬 우수한 것으로 보고되어 있음
- 최근 많은 연구자들의 보고에 의하면 청국장은 콩에서 유래된 isoflavone (genistein, daizein), saponin, phytic acid, oligosaccharide, anthocyanin, trypsin inhibitor 등의 각종 생리활성물질과 항산화물질 및 혈전용해효소(fibrinolytic enzyme)를 다량 함유하고 있기 때문에 기능성 식품으로서 그 중요성이 재조명되고 있음
- 또한 청국장은 된장이나 간장과 같은 다른 콩 발효식품보다 isoflavone의 함량이 높다고 보고되었음

- 최근 들어 과학적인 연구를 통하여 보고된 청국장의 건강 기능성 효과는 항암, 호르몬 분비 촉진, 항산화(노화예방), 혈액순환, 혈전용해, 혈관 강화, 간/위 보호, 위/십이지장 궤양, 갱년기 장애, 고지혈증, 고혈압, 당뇨, 뇌졸중, 다이어트, 동맥경화, 두뇌활동촉진, 면역력증가, 설사, 변비, 소화불량, 숙취, 세포재생촉진, 항균, 심근경색, 심장병, 치매, 전립선비대증, 피부노화/주름방지, 콜레스테롤문제, 활성산소제거, 알레르기 예방 등이 있는데, 청국장의 새로운 생리기능성이 밝혀지면서 소비자의 구매 욕구뿐만 아니라 궁극적으로는 세계적인 식품으로서의 위치를 자리매김할 것으로 기대되고 있음

제 2 절 국내·외 제품생산 및 시장현황

1. 국내 제품시장 현황

- 청국장 생산업체에서 청국장 생산에 사용하고 있는 원료 콩의 형태는 대립종, 중립종 및 소립종의 콩을 모두 사용하고 있으며, 원료 콩의 주산지는 국내산보다 대부분 수입 콩을 사용하고 있음
- 1997년 현재 연간 사용량은 50M/T 이하 6개 업체, 50-100M/T 2개 업체, 100-200M/T 2개 업체, 200M/T 이상 5개 업체로 우리나라의 청국장 생산업체의 생산규모는 아주 영세함을 알 수 있음
- 1997년 총 17개 업체가 청국장을 생산하였으며, 청국장 총생산량은 2.9천 톤, 매출액은 23억 여 원(2천만 원 미만 3개 업체, 2천만 원-1억 원 이하 8개 업체, 5억 이하 5개 업체, 5억 원 이상 1개 업체)으로서, 아주 영세한 시장규모를 면치 못하고 있는 실정임
- 2001년 현재, 대한 장유공업협동조합에 등록된 청국장 제조 회사는 25개 업체이며, 매출량 2.9천 톤으로서 업체 및 매출량은 그다지 크게 증가하지 않았음. 또한 이들 업체 역시 대부분 가내 수공업 형태로 운영되고 있으며, 음성적으로 제조 유통되고 있는 양도 적지 않은 것으로 파악되고 있어 청국장 고품질화에 큰 애로사항이 되고 있는 실정임

(농촌생활연구소 산업체 청국장 생산현황 조사)

생산량	10t미만	10~100t	100~400t	400t이상
업체수	6	6	2	3

< 표 > 연간매출액

(농촌생활연구소 산업체 청국장 생산현황 조사)

매출액	2천만원미만	2천만원~1억	1억~5억	5억이상
업체수	3	8	5	1

- 이상의 결과를 분석하여 보면, 국내 청국장 생산업체의 문제점은 생산규모의 영세성, 발효균주와 제조공정 및 품질의 표준화, 소비자 기호변화에 대응한 고품질 제품 생산과 연구개발 노력이 전무하며, 또한 생산 후 유통망은 주로 재래시장을 이용하고 있음
- 따라서 청국장의 양산체제를 구축하고 분야별 문제점을 파악하여 대책을 마련하는 것이 시급한 실정임

2. 국외 시장 현황

- 한편, 현재 우리나라뿐만 아니라 세계 각국에서는 well-being food에 대한 관심이 급증하고 있으며, 이에 따라 전통적인 식품산업이 각광을 받고 있음. 특히, 1994년부터 식용 콩의 수요가 크게 증가하고 있는데 식용 콩은 가공제품의 원료(두부 26%, 장류18%, 두유 7%)로 51% 이상 사용되고 있는 상황임

- 콩에 대한 많은 연구 성과와 세계적인 well-being food 붐이 맞물려 콩 수요량이 날로 증가하고 있고, 이에 따라 세계의 콩 재배면적도 매년 증가하고 있음. 특히, 미국은 2004년 콩 재배면적이 304만 ha로서 세계 콩 재배 면적으로 41%를 차지하고 있음. 그러나 우리나라의 경우, 1960년대 이후 매년 콩 재배면적이 감소하여 2008년 현재 10만 ha 정도만 콩 재배에 이용되고 있음
- 결과적으로 전통적으로 콩을 대량 재배하였던 우리나라는 주요 콩 수입국으로 전락하게 되었고, 주요 콩 생산국의 지위를 미국, 브라질, 아르헨티나 등에게 넘겨주게 되었음
- 따라서 우리나라는 풍부한 유전자원과 음식문화를 보유하고 있으나 미국 등 주요 생산국과의 생산경쟁력에서 뒤져 우수한 우리 콩을 제대로 섭취하기도 어려운 상황에 놓여있음
- 그러나 유전적으로 변형된 미국산 GMO(genetically modified organism) 콩의 안전성에 대한 논란과 함께 소비자들의 국내산 콩에 대한 인식의 향상으로 국내산 콩의 소비량은 2008년 45만 톤에서 2013년 50만 톤으로 증가할 것으로 예측되고 있음. 또한 1인당 콩 소비량도 2004년 8.5 kg/인에서 2013년 10.5 kg/인으로 증가할 것으로 예측되고 있음
- 이러한 상황에서 발효식품 원료로서 우수한 특성을 가지고 있는 콩 품종의 발굴에 대한 연구는 반드시 필요한 것으로 판단됨. 즉 국내 콩 유전자원을 다각적으로 평가하여 형태적, 생리적, 생태학적, 양적 또는 질적 제반 특성을 찾아내고, 지역적 여건을 고려한 유전자 특성의 변이를 조사하는 것은 콩의 품종적 가치를 높일 수 있을 뿐만 아니라 농업적, 발효식품학적 이용가치를 향상시킬 수 있을 것임
- 또한, 한식 세계화에 따른 전통 발효식품의 고부가가치를 위한 원료 고급화 연구의 일환으로 다양한 생리활성물질을 함유한 우수 콩 자원을 발굴할 필요가 있으며, 발굴된 우수 콩 유전자원을 농가에 적극 전파함으로써 벼 재배 대체, 유희농지 활용, 지력 유지 등의 부가적인 효과를 획득해야 할 필요가 있을 것임

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 청국장 제조를 위한 기능성 콩 품종 선별 및 기능성 청국장 발효공정 개발

1. 청국장용 콩 품종 선별

본 과제에서는 어린이 성장발육 · 학습력 증진에 적합한 청국장용 콩 품종 선별 및 기능성 제품개발을 위하여 다양한 콩 품종을 수집하여 청국장 발효에 적합한 콩 품종을 선별하였으며, 청국장 발효능이 뛰어난 종균을 찾기 위해 여러 가지 재료들로부터 발효 균주들을 분리하고, 분리된 균주들 가운데 어린이의 두뇌활동에 도움을 주는 것으로 알려진 GABA와 choline의 함량이 높은 청국장을 생산하는 실험균주를 선택하였다. 선택된 실험균주의 특성을 알아보기 위해 균주의 동정을 실시하였고, 배양온도와 배양시간과 같은 최적 발효조건을 찾기 위해 연구를 진행 하였다.

가. 육성품종 수집

(1) 콩 품종 수집

콩은 예로부터 우리나라를 비롯한 동양에서 5곡 중의 하나로 일상생활에서 중요한 영양공급원으로 다양하게 이용해 왔고 그 재배지역도 중국 동북부, 한국, 일본, 극동 러시아 등지에서 널리 분포하고 있어 콩의 기원지는 옛 고구려의 영토인 만주와 한반도 일대로 추정하고 있다.

최근에는 여러 연구를 통하여 콩에 함유되어 있는 다양한 생리활성 물질이 밝혀지고 있다. 최근까지 밝혀진 콩의 생리활성 물질로는 단백질, 이소플라본, 식이섬유소, 사포닌, 피트산, 트립신저해제, 글루코사민, 올리고당 및 안토시아닌 색소 등이 있다. 이들 성분들이 현대사회에서 노화, 심혈관계 질환 등의 만성 퇴행성 질환과 각종 암의 원인이 되고 있는 산화 스트레스를 억제하고, 콩의 섭취가 질병의 예방과 치료에 도움이 된다는 연구결과들이 발표되고 있다.

본 연구는 농촌진흥청과 공동으로 수행하는 것으로 지금까지 개발된 콩 품종에서 기능성으로 강조되는 콩을 제공받았다.

(2) 품종 간 특성 비교

제공 받은 품종 15개(신화콩, 황금콩, 풍원콩, 태광콩 대원콩, 풍산나물, 대풍콩, 단백질, 일미콩, 두유콩, 알찬콩, 진품콩, 장원콩, 송학콩, 대양콩)에 대하여 조단백질, 조지방, 이소플라본 등의 함량을 특징하여 최고치와 최저치 등을 분석해 보았다.

표 1에서 보는 바와 같이 조단백 함량은 평균 42.9%이었고, 30.6~51.2% 분포로서, 조지방 함량은 11.8~24.7% 분포로서 평균 19.6%, 불포화지방산 조성 비율은 평균 79.8% 비율로서 75.8~89.1% 분포이며 포화지방산조성은 6.1~17.8% 비율로서 평균 13.7%이었다(표 1).

Table 1. 수집 콩품종의 조단백, 조지방 및 지방산조성 분

구 분	조단백 (%)	조지방 (%)	지 방 산 조 성 (%)				포화
			불포화			계	
			올레인산	리놀렌산	리놀레닉산		
평 균	40.9	19.6	25.1	45.3	8.9	79.8	13.7
최대값	51.2	24.7	42.8	53.6	17.2	89.1	17.8
최소값	30.6	11.8	13.7	6.2	57.1	75.8	6.1
표준편차	2.55	1.93	4.12	2.96	2.17	1.78	1.31

또한 이소플라본 함량은 표 2에서와 같이, 평균 $2,546\mu\text{g/g}$, 범위 $1,896\sim 3,587\mu\text{g/g}$ 이고 다이드제인 함량은 평균 $934\mu\text{g/g}$, 범위 $695.1\sim 1,567\mu\text{g/g}$, 제니스테인 함량은 평균 $964\mu\text{g/g}$, 범위 $792.8\sim 1,136.8\mu\text{g/g}$ 였다.

Table 2. 수집 콩품종의 이소플라본 함량 분포

구 분	이소플라본 ($\mu\text{g/g}$)			
	다이드제인	글라이시테인	제니스테인	합계
평 균	934.6	646.5	964.5	2,545.6
최대값	1,567	883.6	1,136.8	3,587.4
최소값	695.1	409.4	792.1	1,896.6
표준편차	89.41	32.17	21.07	-

전 세계적으로 90년대 후반부터 콩이 나타내는 많은 생리활성 중 일부 생리활성이 isoflavone과 관련이 있다는 결과들이 밝혀지면서 많은 연구자들은 콩에 함유된 isoflavone의 특성에 주목하게 되었으며, 특히 각국의 콩 주요 재배품종에 함유된 isoflavone 함량에 관한 연구가 본격적으로 수행되었다. 그 결과로서 브라질 콩은 $425.4\sim 1,414\mu\text{g/g}$, 일본 콩은 $688\sim 2,389\mu\text{g/g}$, 대만 콩은 평균 $598\mu\text{g/g}$, 미국 콩은 $362\sim 2,209\mu\text{g/g}$ 의 범위에 있다고 보고되었으며(Kim *et al.*, 1999), 본 과제에서 제공받은 콩 품종만의 결과 주요 품종의 함량범위는 $1,896\sim 2,545\mu\text{g/g}$ 이므로 미국 및 일본의 주요 콩 품종과 비교할 때 isoflavone 함량은 다소 범위에 있음을 알 수 있다. 이들 품종 중에서는 대풍콩과 풍산나물콩이 가장 좋은 결과를 얻어 이 콩을 재료로 하여 다음 항의 실험 등을 수행하였다.

2. 청국장 발효균주의 분리, 동정 및 기능성 조사

가. 종균용 균주 분리

(1) 청국장 발효균주 분리

청국장 발효 균주를 분리하기 위하여 여러 가정에서 섭취하고 있는 청국장과 대중음식점에서 제공되고 있는 청국장 그리고 기존 제품으로 판매되고 있는 청국장 등을 시료로 수집하였다(Fig. 1). 수집된 각 시료 5g을 시험관에 넣고, 멸균된 증류수 10ml를 가한 후 교반하여 충분히 혼합한 뒤 30분간 방치하였다. 방치된 시료의 상등액에 멸균된 증류수를 가하여 $10^{-6} \sim 10^{-7}$ 까지 단계별로 희석하였다. 희석된 시료는 90℃의 항온수조에서 15분간 방치하여 열에 약한 미생물들을 1차 제거하였다. 각 시료 100 μ l를 skim milk 배지 (3% skim milk, 1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 2% agar, pH 7.5)에 도말하여 37℃에서 2일 동안 배양하였다.

배양결과 skim milk배지 상에서 clear zone의 크기가 크고 선명하며, 성장속도가 빠른 colony만을 선별하여 skim milk 사면배지에 streaking 하여 1500여 균주를 1차 선별균주로 분리하고, 청국장 발효실험에 사용하였다(Fig. 2).



Fig. 1. Chungkookjang samples.



(A)

(B)

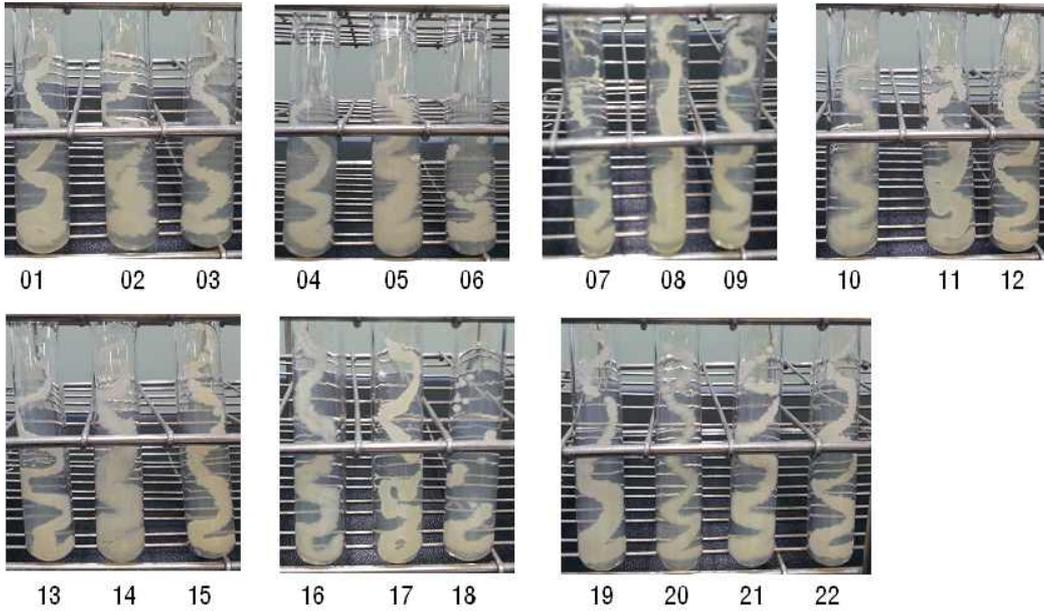
(C)



(D)



(E)



(F)

Fig. 2. Skim milk plates, LB slants, and selected strains by 1st screening.

A~C: Skim milk plate, D~E: LB slant, F: selected strain

(2) 실험균주에 의한 청국장 제조

청국장 발효에 사용 할 콩 15g을 24시간 동안 물에 침지하여 충분히 불린 후, 채로 걸러 발효용기에 넣고, autoclave에서 105℃로 30분간 증자하였다. 증자된 콩은 clean bench 안에서 45~50℃로 냉각시키고, LB broth에서 24시간 동안 종배양하고 6시간 동안 주배양한 1차 선별균주를 2% 접종하여 37℃에서 72시간 동안 발효시켜 청국장을 제조하였다(Fig. 3). 그 결과 1500여 균주들 가운데 청국장고유의 점질물을 형성하지 못하는 균주들을 실험 대상에서 제외하고, 점질물의 생성량이 많은 200여 균주들을 후보균주들로 분리하여, 청국장 발효능과 각종활성을 측정하였다.



Sample Blank



Sample Blank



Control



Control



MS 9



MS 9



MS 80



MS 80



MS 123



MS 123



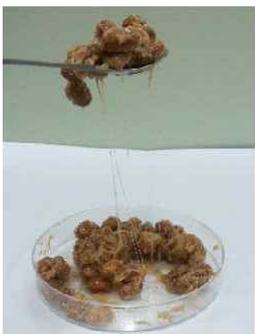
MS 190



MS 190



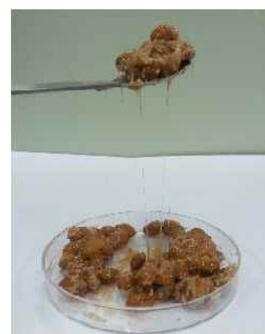
MS 268



MS 268



MC 31



MC 31



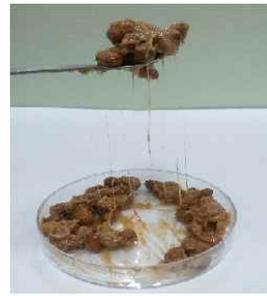
MC 125



MC 125



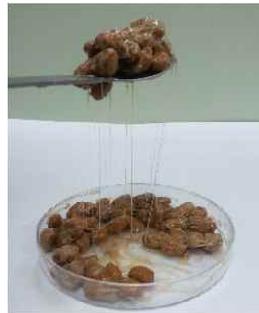
MC 40



MC 40



MC 61



MC 61



MC 150



MC 150



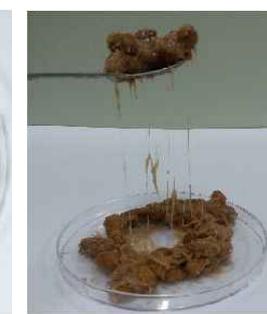
MC 156



MC 156



BC 21



BC 21



BC 26



BC 26



BC 58



BC 58



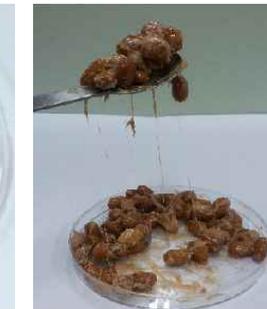
BS 67



BS 67



BS 102



BS 102

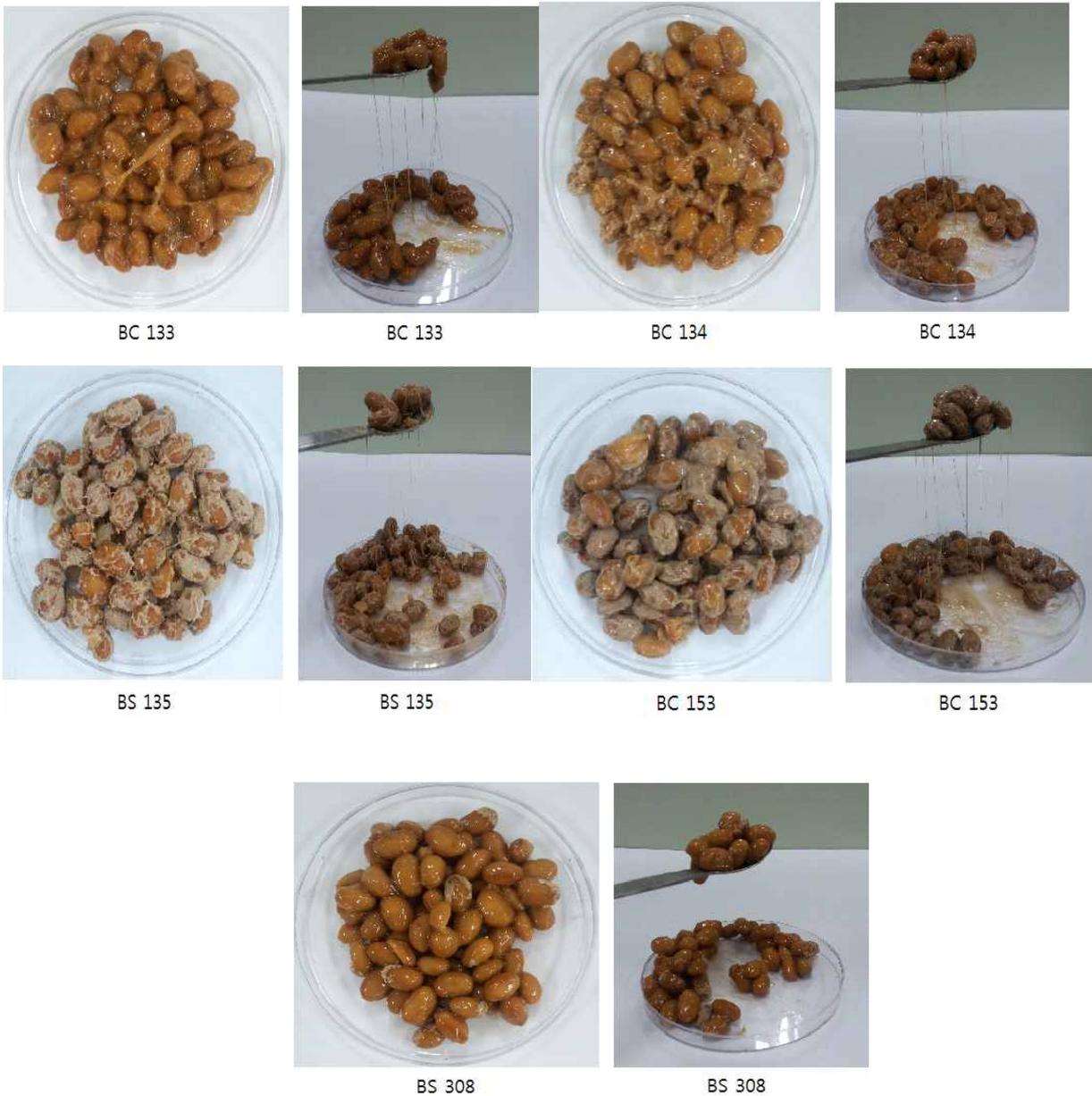


Fig. 3. Sample bean and Chungkookjangs fermented by selected strains.

※ 사진하단의 영문과 숫자는 임의 균주 번호임

(3) Protease 및 poly- γ -glutamate 활성

Protease 활성을 측정하기 위해서 LB broth에 배양한 1차 선별균주를 15,000rpm으로 15min 동안 원심분리한 뒤 상등액을 micro-membrane으로 여과·제균하여 조효소액을 사용하였다. 멸균된 paper disc를 skim milk plate 위에 올려놓고, 조효소액 20 μ l를 적점한 후 37 $^{\circ}$ C에서 72시간 동안 반응시켜 생성된 clear zone의 크기를 측정하여 protease 활성을 측정하였다 (Fig. 4).

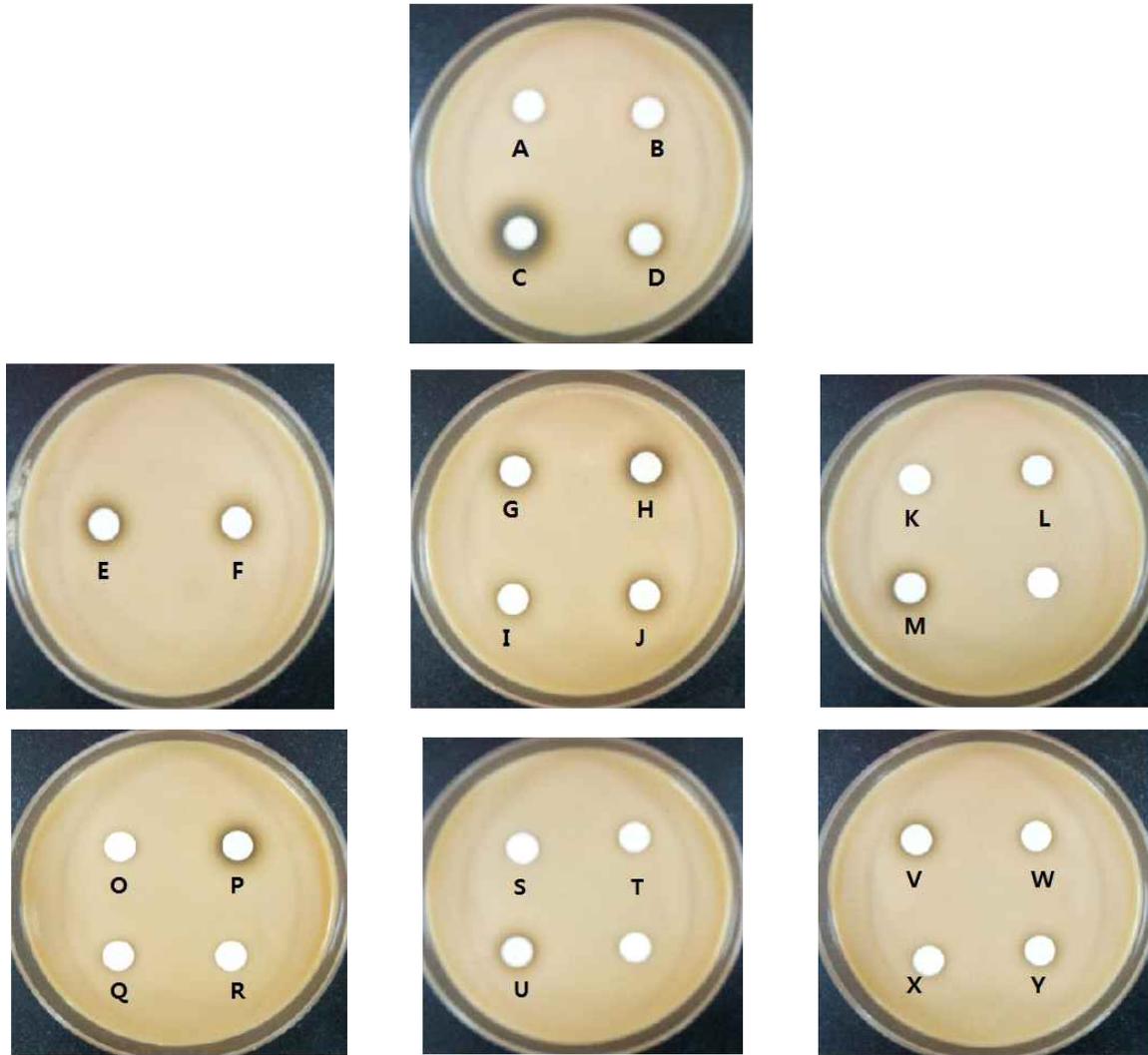


Fig. 4. Protease activity assay by paper disc on skim milk plate.

※ 사진 안의 알파벳은 임의의 균주 표시임.

poly- γ -glutamate 활성을 측정하기 위해서는 콩 15g을 24시간 동안 물에 침지시킨 후 채로 걸러 물기를 뺀 후 발효용기에 넣고 autoclave에서 105°C에 30분간 증자하였다. 증자된 콩은 clean bench 안에서 45~50°C로 냉각시키고, LB broth에서 24시간 동안 종배양하고 6시간 동안 주배양한 1차 선별균주를 2% 접종하여 37°C에서 72시간 동안 발효시켜 청국장을 제조 하였다.

완성된 청국장을 시약 스푼으로 떠올려 점질물의 길이와 굵기를 비교하여 poly- γ -glutamate 활성을 측정하였다(Fig. 5). 그 결과 점질물의 생성량이 높았던 200여 균주들 가운데 protease 활성과 poly- γ -glutamate 활성이 높은 20여 균주를 선택하여 γ -aminobutyric acid(GABA) 생성량을 측정할 후보균주로 선택하였다.

(4) 청국장 발효능 비교

poly- γ -glutamate 활성을 측정하여 청국장 발효능으로 가름하였다.

Figure 5에서 보는 바와 같이 점질물의 길이에 비례해서 활성이 높아진다.



Fig. 5. Fermented Chungkookjangs.

나. 분리균주의 동정

(1) BIOLOG 동정

균주탐색과정과 protease 활성, poly- γ -glutamate 활성 그리고 GABA 함량을 비교·분석하여 본 과제의 실험균주로 최종 선택하고, 실험균주를 순수분리하였다. 실험균주의 탄소원 대사지문은 Biolog사의 MicroLog™ system(USA)을 이용하여 분리균주를 4시간 및 24시간 동안 배양한 후, 발색반응을 측정함으로써 조사하였다. 측정 결과를 MicroLog™ release 4.0 software를 이용하여 95개 탄소원 이용 패턴에 따라 균주를 동정하였다.

GABA 함량이 높은 청국장을 발효시키는 것으로 선택된 MC 31, MC 40을 API kit로 실험한 결과 분리된 균주 모두 *Bacillus subtilis*(*B. subtilis*)일 가능성이 가장 높은 것으로 나타났다(Fig. 6).

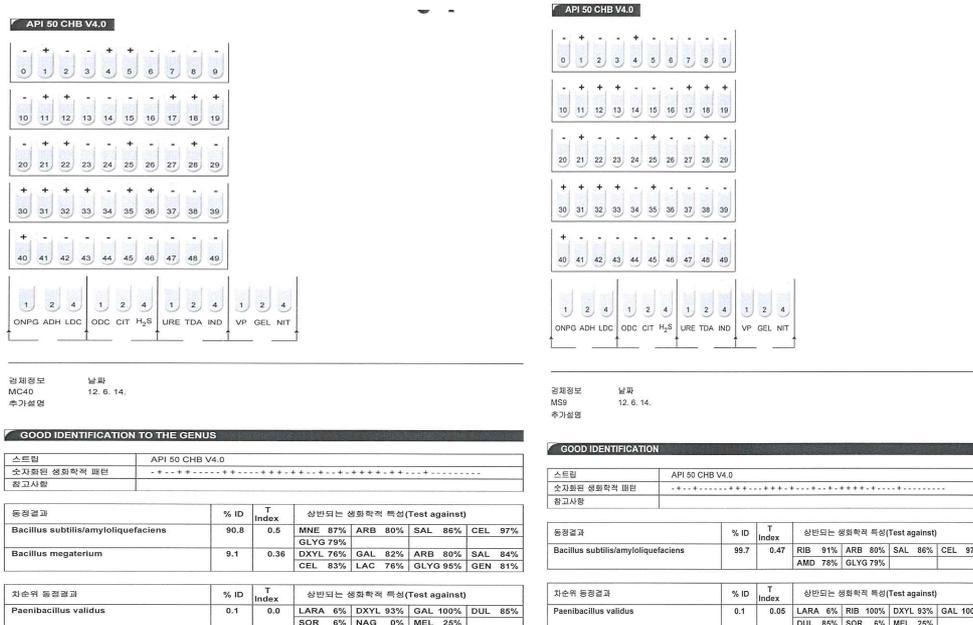


Fig. 6. Identification of selected strains by API kit.

※ 사진안의 Tube 번호 설명은 아래 표에 표기함.

Tube No.	Carbohydrate	Tube No.	Carbohydrate	Tube No.	Carbohydrate
0	Control	17	Inositol	34	Melezitose
1	Glycerol	18	Mannitol	35	D-Raffinose
2	Erythritol	19	Sorbitol	36	Amidon
3	D-Arabinose	20	α Methyl-D-mannoside	37	Glycogene
4	L-Arabinose	21	α Methyl-D-glucoside	38	Xylitol
5	Ribose	22	N Acetyl glucosamine	39	β Gentiobiose
6	D-Xylose	23	Amygdaline	40	D-Turanose
7	L-Xylose	24	Arbutine	41	D-Lyxose
8	Adonitol	25	Esculine	42	D-Tagatose
9	β Methyl-xyloside	26	Salicine	43	D-Fucose
10	Galactose	27	Cellobiose	44	L-Fucose
11	D-Glucose	28	Maltose	45	D-Arabitol
12	D-Fructose	29	Lactose	46	L-Arabitol
13	D-Mannose	30	Melibiose	47	Gluconate
14	L-sorbose	31	Saccharose	48	2 ceto-gluconate
15	Rhamnose	32	Trehalose	49	5 ceto-gluconate
16	Dulcitol	33	Inuline		

(2) 16s rRNA sequence 분석

API kit로 실험하여 *B. subtilis*로 잠정 확인된 분리균주들의 보다 더 정확한 동정을 위하여 16s rRNA sequence 비교·분석하였다. 순수분리된 실험균주를 Luria-Bertani broth에서 20시간 동안 배양한 후, acetyltrimethylammoniumbromide 방법을 이용하여 genomic DNA를 추출한다. 추출한 DNA를 주형으로 polymerase chain reaction(PCR)을 수행한다. PCR을 위해서 AccuPower[®] PCR PreMix tube에 DNA 주형 1 μ l(약 40 ng), 각각 1 μ l의 primers, 17 μ l의 멸균된 3차 증류수를 첨가하여 잘 혼합한다. PCR은 initial denaturation 94 $^{\circ}$ C, 3분; denaturation

94°C, 1분; annealing 55°C, 1분; extension 72°C, 3분의 조건으로 30 cycle을 실시한 후, final extension을 72°C에서 5분간 유지하여 증폭을 종결한다. 16S rDNA를 증폭하기 위하여 사용된 primers는 *E. coli* 16S rDNA 부분의 conserved sequence를 기초로 하여 합성된 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') primer 1492R(5'-TACGGYTACCT TGT TACGACTT-3') primer이다. 16S rDNA의 PCR 증폭산물의 정제는 1% agarose gel에 PCR 증폭산물을 100 V의 전압으로 25분 동안 전기영동한 후, EtBr로 염색하여 원하는 band를 잘라 Qiagen PCR purification kit(Qiagen)를 이용하여 정제한다. 정제된 PCR 증폭산물의 염기서열 결정은 ABI 377기종의 auto-sequencer를 사용하여 dye terminator sequencing method로 protocol에 따라 실시한다. 염기서열 분석을 통하여 얻어진 분리균주의 부분 염기서열은 Blast network service를 이용하여 GenBank, EMBL, DDBJ에 등록된 다른 세균의 염기서열과 비교함으로써 계통분류학적 유연관계를 분석하였다.

16s rRNA sequence를 비교·분석한 결과 GABA 생산량이 높은 MC 31과 MC 40, choline 생산량이 높은 BC58과 MS9 모두 *B. subtilis* 인 것으로 밝혀졌다. 따라서 본 과제에서 선택된 균주를 각각 *B. subtilis* MC 31, *B. subtilis* MC 40으로 명명하였으며(Fig. 7, 8), 본 연구의 실험균주로 사용하였다.

```

Query= MC40.fasta.screen.Contig1
Length=1450

Sequences producing significant alignments:
Score      E
(Bits)     Value

gb|HQ536001.1| Bacillus subtilis strain DP12 16S ribosomal RNA g... 2638 0.0
gb|GQ870259.1| Bacillus subtilis strain O-3 16S ribosomal RNA ge... 2632 0.0
gb|EU236733.1| Bacillus sp. Z1 16S ribosomal RNA gene, partial s... 2632 0.0
gb|HM055602.1| Bacillus subtilis strain GD3b 16S ribosomal RNA g... 2630 0.0
gb|GU972596.1| Bacillus sp. LS02 16S ribosomal RNA gene, partial... 2628 0.0
gb|CP002906.1| Bacillus subtilis subsp. subtilis RO-NN-1, comple... 2628 0.0
gb|HM486416.1| Bacillus subtilis strain SFA6 16S ribosomal RNA g... 2628 0.0
gb|JF412545.1| Bacillus subtilis strain TUL322 16S ribosomal RNA... 2628 0.0
gb|CP002468.1| Bacillus subtilis BSn5, complete genome 2628 0.0
gb|HQ166109.1| Bacillus subtilis strain j8 16S ribosomal RNA gen... 2628 0.0
gb|HM027569.1| Bacillus subtilis strain zj2008 16S ribosomal RNA... 2628 0.0
gb|GU250454.1| Bacillus subtilis strain BFE 5320 16S ribosomal R... 2628 0.0
gb|GU250451.1| Bacillus subtilis strain BFE 5310 16S ribosomal R... 2628 0.0
gb|GU250450.1| Bacillus subtilis strain BFE 5301 16S ribosomal R... 2628 0.0
gb|GU191907.1| Bacillus subtilis subsp. subtilis strain SB 3295 ... 2628 0.0
gb|GU125626.1| Bacillus subtilis strain IMAU80209 16S ribosomal ... 2628 0.0
gb|GQ861459.1| Bacillus subtilis strain LXA10 16S ribosomal RNA ... 2628 0.0
db|AB480760.1| Bacillus subtilis gene for 16S ribosomal RNA, pa... 2628 0.0
Uncultured bacterium clone ZT-5-7 small subunit r... 2628 0.0
emb|AL009126.3| Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168 compl... 2628 0.0
gb|FJ641012.1| Bacillus subtilis strain IMAUB1029 16S ribosomal ... 2628 0.0
gb|FJ457629.1| Bacillus subtilis strain WD20 16S ribosomal RNA p... 2628 0.0
gb|EU869226.1| Bacillus subtilis strain CM-877 16S ribosomal RNA... 2628 0.0
gb|EU880528.1| Bacillus subtilis strain PRE23 16S ribosomal RNA ... 2628 0.0
db|AB440272.1| Bacillus subtilis gene for 16S rRNA, partial seq... 2628 0.0
db|AB440271.1| Bacillus subtilis gene for 16S rRNA, partial seq... 2628 0.0
gb|EU670049.1| Bacillus subtilis strain CO-25 16S ribosomal RNA ... 2628 0.0
gb|EU271854.1| Bacillus subtilis strain SMY 16S ribosomal RNA ge... 2628 0.0
gb|EU253658.1| Bacillus subtilis strain G7 16S ribosomal RNA gen... 2628 0.0
db|AB244295.1| Bacillus sp. A9-2 gene for 16S rRNA, partial seq... 2628 0.0
db|AB300812.1| Bacillus subtilis gene for 16S rRNA, partial seq... 2628 0.0
db|AB300811.1| Bacillus subtilis gene for 16S rRNA, partial seq... 2628 0.0
db|AB300810.1| Bacillus subtilis gene for 16S rRNA, partial seq... 2628 0.0
db|AB300809.1| Bacillus subtilis gene for 16S rRNA, partial seq... 2628 0.0
gb|EF423597.1| Bacillus subtilis strain BCRC 14718 16S ribosomal... 2628 0.0
gb|EF423593.1| Bacillus subtilis strain BCRC 14714 16S ribosomal... 2628 0.0
gb|AY553100.1| Bacillus subtilis strain MD7 16S ribosomal RNA ge... 2628 0.0
gb|AY601722.1| Bacillus subtilis isolate WL-7 16S ribosomal RNA ... 2628 0.0
gb|HQ536000.1| Bacillus subtilis strain CCM9 16S ribosomal RNA g... 2627 0.0
gb|GU980947.1| Bacillus subtilis strain CICC 10023 16S ribosomal... 2627 0.0
gb|FJ982665.1| Bacillus subtilis strain JBE0016 16S ribosomal RN... 2627 0.0
gb|EU256502.1| Bacillus subtilis 16S ribosomal RNA gene, partial... 2627 0.0
gb|EF564556.1| Bacillus subtilis strain W-3 16S ribosomal RNA ge... 2627 0.0
gb|EF564555.1| Bacillus licheniformis strain W-2 16S ribosomal R... 2627 0.0
gb|EF526288.1| Bacillus subtilis strain CICHUJ G75 16S ribosoma... 2627 0.0
db|AB018484.1| Bacillus subtilis gene for 16S rRNA, partial seq... 2627 0.0
gb|JQ361055.1| Bacillus subtilis strain CYBS-6 16S ribosomal RNA... 2625 0.0
db|AB687550.1| Bacillus subtilis gene for 16S ribosomal RNA, pa... 2625 0.0

db|AB680179.1| Bacillus subtilis gene for 16S rRNA, partial seq... 2625 0.0
db|AB680243.1| Bacillus subtilis gene for 16S rRNA, partial seq... 2625 0.0

>gb|HQ536001.1| Bacillus subtilis strain DP12 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence
Length=1457

Score = 2638 bits (1428), Expect = 0.0
Identities = 1445/1452 (99%), Gaps = 5/1452 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query
ATCTGTACACCTTCGGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTACAA
1
60
|||||
Sbjct
ATCTGTACACCTTCGGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTACAA
1454
1395

Query
ACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGCCCGGAACGATTACC CGCGGCATGC
61
120
|||||
Sbjct
ACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGCCCGGAACGATTACC CGCGGCATGC
1394
1335

Query
TGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTACGCGAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAA
121
180
|||||
Sbjct
TGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTACGCGAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAA
1334
1275

Query
CTGGAACAGATTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCC
181
240
|||||
Sbjct
CTGGAACAGATTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCC
1274
1215

Query
ATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTGACGTCATCCCACC
241
300
|||||
Sbjct
ATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTGACGTCATCCCACC
1214
1155

Query
TTCTCCGGTTTGTACC GGCACTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAA
301

```

```

360
Sbjct 1154
TTCCCTCCGGTTGTACCCGGCAGTCACCTT-AGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAA
1096
Query 361
GATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTTCACGACACGAGCTGACGA
420
Sbjct 1095
GATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCT-CACGACACGAGCTGACGA
1037
Query 421
CAGCCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGACGTCTATCTCTAGGATTGTCA
480
Sbjct 1036
CAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGACGTCTATCTCTAGGATTGTCA
977
Query 481
GAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTCGTAATTAACACATGCTCCAC
540
Sbjct 976
GAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTCGTAATTAACACATGCTCCAC
917
Query 541
CGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGGCAGCGTACTCCCCAGG
600
Sbjct 916
CGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGGCAGCGTACTCCCCAGG
857
Query 601
CGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGAAACCCCTAACACTTAGCAC
660
Sbjct 856
CGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGAAACCCCTAACACTTAGCAC
797
Query 661
TCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGC
720
Sbjct 796
TCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGC
737
Query 721
TCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTGCCTTCGCCACTGGTGTCTCCACATCTC
780
Sbjct 736
TCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTGCCTTCGCCACTGGTGTCTCCACATCTC
877
Query 781
TACGCATTTACCCGCTACACGTGGAATCCACTCTCCTCTCTGCACTCAAGTCCCCAG
840
Sbjct 678
TACGCATTTACCCGCTACACGTGGAATCCACTCTCCTCTCTGCACTCAAGTCCCCAG
617
Query 841
TTTCCAATGACCCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTACATCAGACTTAAGAAACCGCCT
900
Sbjct 616
TTTCCAATGACCCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTACATCAGACTTAAGAAACCGCCT
557
Query 901
GCGAGCCCTTTACGCCCAATAATTCGCCGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGC
960
Sbjct 558
GCGAGCCCTTTACGCCCAATAATTC-GGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGC
498
Query 961
TGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATT
1020
Sbjct 497
TGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATT
438
Query 1021
GAACGGTACTTGTCTTCCCTAACAAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCA
1080
Sbjct 437
GAACGGTACTTGTCTTCCCTAACAAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCA
378
Query 1081
CGCGGCGTTGCTCCGTGAGACTTTCGTCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCG
1140
Sbjct 377
CGCGGCGTTGCTCCGTGAGACTTTCGTCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCG

```

```

318
Query 1141
TAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTCAGGTCGGCTACG
1200
Sbjct 317
TAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTCAGGTCGGCTACG
258
Query 1201
CATCGTCGCCCTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTG
1260
Sbjct 257
CATCGTTGCCCTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTG
198
Query 1261
TAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTTTGAACCATGCGGTTCAAACAACCATCCGGT
1320
Sbjct 197
TAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTTTGAACCATGCGGTTCAAACAACCATCCGGT
138
Query 1321
ATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTC
1380
Sbjct 137
ATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTC
78
Query 1381
ACCCGTCCGCCGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGTCGCTCGACT-GCAT-TAT
1438
Sbjct 77
ACCCGTCCGCCGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGTCGCTCGACTTGCATGTAT
18
Query 1439 TAGCACGCCGCA 1450
Sbjct 17 TAGCACGCCGCA 5

```

Fig. 7. 16s rRNA sequence of selected strain MC 31.

Query= MS_9.fasta.screen.Contig1

Length=1444

Sequences producing significant alignments:

		Score	E
		(Bits)	Value
gb JN400257.1	Bacillus subtilis strain WRL-101 16S ribosomal RN...	2652	0.0
gb EU729126.1	Bacillus subtilis strain JSU-2 16S ribosomal RNA ...	2652	0.0
gb HM055602.1	Bacillus subtilis strain GD3b 16S ribosomal RNA g...	2651	0.0
gb GU564472.1	Bacillus sp. CR-7 16S ribosomal RNA gene, partial...	2651	0.0
gb EU915719.1	Bacillus sp. ZSA 16S ribosomal RNA gene, partial ...	2651	0.0
gb FJ263018.1	Bacillus subtilis strain ZHA9 16S ribosomal RNA g...	2649	0.0
gb HQ143563.1	Bacillus subtilis strain DZ3 16S ribosomal RNA ge...	2647	0.0
gb HQ166109.1	Bacillus subtilis strain j8 16S ribosomal RNA gen...	2647	0.0
gb HM854250.1	Bacillus subtilis subsp. Inaquosorum strain KTH-6...	2647	0.0
gb JN392071.1	Bacillus subtilis strain LSSE-22 16S ribosomal RN...	2645	0.0
gb JN700206.1	Bacillus subtilis strain YNB151 16S ribosomal RNA...	2645	0.0
gb JF411313.1	Bacillus tequilensis strain KM34 16S ribosomal RN...	2645	0.0
gb HQ443229.1	Bacillus subtilis strain SBRh5 16S ribosomal RNA ...	2645	0.0
gb GU980947.1	Bacillus subtilis strain CICC 10023 16S ribosomal...	2645	0.0
gb FJ483514.1	Bacillus subtilis strain EG1 16S ribosomal RNA ge...	2645	0.0
gb JF932296.1	Bacillus subtilis strain ZM06 16S ribosomal RNA g...	2643	0.0
gb GQ861468.1	Bacillus subtilis strain LXB3 16S ribosomal RNA g...	2643	0.0
gb JQ287474.1	Bacillus subtilis strain LY-001 16S ribosomal RNA...	2641	0.0
gb HQ536001.1	Bacillus subtilis strain DP12 16S ribosomal RNA g...	2641	0.0
gb HQ536000.1	Bacillus subtilis strain CCM9 16S ribosomal RNA g...	2641	0.0
gb HM631976.1	Bacillus subtilis strain BS-KU 16S ribosomal RNA ...	2641	0.0
gb HMS79812.1	Bacillus sp. HY21(2010) 16S ribosomal RNA gene, p...	2641	0.0
gb EU82846.1	Bacillus subtilis strain H10-5-5 16S ribosomal RN...	2641	0.0
gb JF411282.1	Bacillus tequilensis strain M3-1 16S ribosomal RN...	2639	0.0
gb HM753628.1	Bacillus subtilis subsp. subtilis strain WSE-KSU3...	2639	0.0
gb HQ318605.1	Bacillus subtilis strain CICC 20612 16S ribosomal...	2639	0.0
gb HM107812.1	Bacillus sp. 22(2010) 16S ribosomal RNA gene, par...	2639	0.0
gb HM055597.1	Bacillus subtilis strain GD1 16S ribosomal RNA ge...	2639	0.0
gb GQ861467.1	Bacillus subtilis strain LXA7 16S ribosomal RNA g...	2639	0.0
gb GQ180167.1	Bacillus sp. JR06 16S ribosomal RNA gene, partial...	2639	0.0
gb FJ982665.1	Bacillus subtilis strain JBE0016 16S ribosomal RN...	2639	0.0
gb JF411301.1	Bacillus tequilensis strain km11 16S ribosomal RN...	2638	0.0
gb JF783985.1	Bacillus sp. J20 16S ribosomal RNA gene, partial ...	2638	0.0
gb HM753632.1	Bacillus subtilis subsp. subtilis strain WSR-KSU3...	2638	0.0
gb HM753627.1	Bacillus subtilis subsp. spizizenii strain WSE-KS...	2638	0.0
gb EU256502.1	Bacillus subtilis 16S ribosomal RNA gene, partial...	2638	0.0
gb EU236733.1	Bacillus sp. Z1 16S ribosomal RNA gene, partial s...	2638	0.0
gb EU090295.1	Bacillus subtilis strain CD-6 16S ribosomal RNA g...	2638	0.0
gb AY973493.1	Bacillus subtilis KCC103 16S ribosomal RNA gene, ...	2638	0.0
gb GU972596.1	Bacillus sp. LS02 16S ribosomal RNA gene, partial...	2636	0.0
gb CP002906.1	Bacillus subtilis subsp. subtilis strain RD-NN-1, comple...	2636	0.0
gb HM486416.1	Bacillus subtilis strain SFA5 16S ribosomal RNA g...	2636	0.0
gb JF411302.1	Bacillus tequilensis strain km14 16S ribosomal RN...	2636	0.0
gb JF411300.1	Bacillus tequilensis strain km29 16S ribosomal RN...	2636	0.0
gb JF412545.1	Bacillus subtilis strain TUL322 16S ribosomal RNA...	2636	0.0
gb CP002468.1	Bacillus subtilis BSn5, complete genome	2636	0.0
gb HM027569.1	Bacillus subtilis strain zj2008 16S ribosomal RNA...	2636	0.0

gb GU250454.1	Bacillus subtilis strain BFE 5320 16S ribosomal R...	2636	0.0
gb GU250451.1	Bacillus subtilis strain BFE 5310 16S ribosomal R...	2636	0.0
gb GU250450.1	Bacillus subtilis strain BFE 5301 16S ribosomal R...	2636	0.0

>gb|JN400257.1 Bacillus subtilis strain WRL-101 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Length=1444

Score = 2652 bits (1436). Expect = 0.0
 Identities = 1439/1440 (99%), Gaps = 1/1440 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query	CTGTCACCTTCGGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTACCTCACCAGCTTCGGGTGTACAAACT	2
Sbjct	CTGTCACCTTCGGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTACCTCACCAGCTTCGGGTGTACAAACT	1441
Query	CTCGTGGTGTGACGGCGGCTGTGTACAAGGCCCGGGAACGATTACCAGCGGCATGCTGA	62
Sbjct	CTCGTGGTGTGACGGCGGCTGTGTACAAGGCCCGGGAACGATTACCAGCGGCATGCTGA	1382
Query	TCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACCTG	122
Sbjct	TCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACCTG	1262
Query	AGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATT	182
Sbjct	AGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATT	1261
Query	GTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTGACGTCATCCCACCTTC	242
Sbjct	GTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTGACGTCATCCCACCTTC	1142
Query	AGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCCTTCGCCACTGGTTCCTCCACATCTCTACGC	722
Sbjct	AGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCCTTCGCCACTGGTTCCTCCACATCTCTACGC	781
Query	ATTTACCAGCTACACGTGGAATTCACCTCTCTCTCTGCACTCAAGTCCCAGTTTCC	84
Sbjct	ATTTACCAGCTACACGTGGAATTCACCTCTCTCTCTGCACTCAAGTCCCAGTTTCC	602
Query	AATGACCCTCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCTGCGAG	90
Sbjct	AATGACCCTCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCTGCGAG	542
Query	CCCTTACGCCAATAATCCGGACAACGCTTCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGG	902
Sbjct	CCCTTACGCCAATAATCCGGACAACGCTTCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGG	961
Query	CACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGTACCGCCCTATTGAAACGG	962
Sbjct	CACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGTACCGCCCTATTGAAACGG	1021
Query	TACTTATGCGTTAGCTGACGACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATC	661
Sbjct	TACTTATGCGTTAGCTGACGACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATC	422
Query	GTTTACGGCTGGACTACCAGGGTATCTAATCTGTTGCTGCCACGCTTTCGCTCCTC	721
Sbjct	GTTTACGGCTGGACTACCAGGGTATCTAATCTGTTGCTGCCACGCTTTCGCTCCTC	1141

```

GTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAG
302
Query 1142
TCTGGGCCGCTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCAGGTCCGGCTACGCATCGT
1201
Sbjct 301
TCTGGGCCGCTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCAGGTCCGGCTACGCATCGT
242
Query 1202
CGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTG
1261
Sbjct 241
CGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTG
182
Query 1262
GTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTTTGAACCATGCGGTTCAAACAACCATCCGGTATTAGC
1321
Sbjct 181
GTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTTTGAACCATGCGGTTCAAACAACCATCCGGTATTAGC
122
Query 1322
CCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGT
1381
Sbjct 121
CCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGT
62
Query 1382
CCGCCGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTTGCATTATAGCACCC
1441
Sbjct 61
CCGCCGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTTGCATTATAGCACCC
3

```

Fig. 8. 16s rRNA sequence of selected strain MC 40.

다. 분리균주의 기능성 검토

(1) GABA 함량

신경전달과 두뇌활동에 도움을 준다고 알려진 GABA 함량을 측정하기 위해서 청국장시료 1.0g이 들어있는 비이커에 100% 메탄올 5ml을 넣은 후, 교반하면서 클로로포름 10ml를 첨가하였다. 여기에 물 5ml를 넣어 충분히 섞어준 후 2,800g에서 10분간 원심분리하여 분리된 물층(상층액)을 취하였다. 얻어진 물 층을 냉동시킨 후 동결건조하고 소량의 0.1M 인산칼륨 완충액(pH 8.6)에 용해하여 이를 GABA 분석용 시료로 사용하였다.

GABA 분석용 시료 100 μ l에 1.0M Bicine-NaOH(pH8.6) 100 μ l(Sigma), 100mM α -ketoglutarate 100 μ l(Sigma), 1mM NADP 100 μ l(Sigma제, N5755), 초순수 500 μ l를 가하고 1mg/ml GABAse(100mM Bicine 완충액에 용해) 100 μ l(Sigma)를 가하여 혼합한 후 25 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 340nm에서 흡광도를 측정하였다. GABA 분석용 시료가 들어가지 않은 것과 GABAse가 들어가지 않은 것으로 대조구로 하여 흡광도를 비교·측정하였다. GABA 함량측정 결과 분리된 균주 가운데 함량이 높은 청국장을 발효하는 MC 31과 MC 40을 실험균주로 선택하였다(Table 3).

Table 3. GABA amount in Chungkookjangs fermented by selected strains

sample	relative amount(%)	sample	relative amount(%)
Control	92.1	MS 9	38.1
BS 308	30.2	MS 80	57.1
BS 67	42.9	MS 123	57.1
BS 102	42.9	MS 190	28.6
BS 135	49.2	MS 268	38.1
BC 21	14.3	MC 10	22.2
BC 26	20.6	MC 21	39.7
BC 58	25.4	MC 31	98.4
BC 133	36.5	MC 40	100.0
BC 134	79.7	MC 125	15.9
BC 153	28.6	MC 150	46.0
MC 193	0.0	MC 156	0.0

(2) 생리활성별 후보균주 선정

상기에서 결정된 결과를 바탕으로 청국장 발효용 균주를 생리활성능 별로 grouping한 후, 각 균주별로 청국장 발효를 실시함과 동시에 각종 생리활성능 발현정도를 조사하여 최종 후보 균주를 선발하였다.

3. 냄새 제거를 위한 유산균의 분리

가. 종균용 균주 분리 및 동정

(1) 균주의 분리

시중에서 구입한 김치와 각 가정에서 섭취하고 있는 김치 등 50개의 김치국물을 시료로 수집하였다. 수집된 각 김치국물 1 ml을 시험관에 넣고, 멸균된 증류수를 가하여 $10^{-6} \sim 10^{-7}$ 까지 단계별로 희석하였다. 희석된 시료 100 μ l를 2% CaCO₃가 첨가된 MRS(Difco, USA) Agar 평판배지에 도말하여 37 °C에서 24시간 동안 배양하여 집락이 관찰하기 좋은 농도로 희석된 plate에서 생성된 독립된 colony 중 투명 환을 형성하며 크기, 모양, 색이 다른 colony를 선별하고, 동일 배지에 2~3회 도말하여 300여 균주를 순수분리하였다.

(2) 균주의 동정

최종 선발된 균주를 MRS broth에서 2회 이상 계대 배양하여 활성을 높인 후 실험에 사용하였다. 순수분리된 균주는 Gram 염색과 catalase test를 실시하였으며 포자생성, 호기적 및 혐기적 성장과 API CHL kit(API bioMerieux, France)를 이용하여 49개의 탄소원에 대한 이용성을 조사하여 간이 동정하였다. 최종적으로 16S rRNA gene의 염기서열을 분석하여 상동성을 비교 분석하였다. 두유에서 GABA 생산능이 높은 strain No. 383의 genus와 species를 결정하기 위

하여 형태학적, 생화학적 특성을 검토하였다. Strain No. 383은 Gram 양성(Fig. 9), catalase 음성 그리고 포자를 형성하지 않는 비운동성의 bacilli 형태로 관찰되었다. 이를 단계별로 희석한 후 100 μ l를 MRS broth에 도말하여 30°C에서 2일간 배양한 결과 흰색의 둥근 집락을 형성하였으며 표면은 매끈하였다(Table 4). API 50CHL kit를 이용하여 49개 탄소원의 이용성을 통한 균 동정을 시도한 결과(Table 5), *Lactobacillus brevis*와 유사한 것으로 판정되었다. 균주의 상태에 따라 탄소원을 발효하는 조건이 조금씩 다를 수 있으므로 보다 자세한 결과를 확인하기 위해 16S rRNA gene의 염기서열을 결정하고 GenBank에 등록된 여러 유산균들과 상동성을 비교하였다. 그 결과 Strain No. 383의 16S rRNA는 *Lactobacillus sakei*로 동정되었다(Fig. 10).



Fig. 9. Gram staining of strain No. 383.

Table 4. Morphological characteristics of strain No. 383

Characteristics	Isolate 383
Gram stain	+
Morphology	bacillus
Spore formation	-
Anaerobic growth	+
Colony	circular
Colony color	cream
Colony surface	smooth
Colony opacity	opaque
Catalase reaction	-

Table 5. Biochemical characteristics of Strain No. 383 by API 50 CHL system

Characteristics	API CHL 383	Characteristics	API CHL 383
0 Control	-	25 Esculine	+
1 Glycerol	-	26 Salicine	+
2 Ertythritol	-	27 Cellobiose	+
3 D-Arabinose	-	28 Maltose	-
4 L-Arabinose	+	29 Lactose	+
5 Ribose	+	30 Melibiose	+
6 D-Xylose	-	31 Sucrose	+
7 L-Xylose	-	32 Trehalose	+
8 Adonitol	-	33 Inuline	-
9 β Methyl-xyloside	-	34 Melezitose	-
10 Galactose	+	35 D-Raffinose	-
11 D-Glucose	+	36 Amidon	-
12 D-Fructose	+	37 Glycogene	-
13 D-Mannose	+	38 Xylitol	-
14 L-sorbose	-	39 β Gentiobiose	+
15 Rhamnose	+ ^w	40 D-Turanose	-
16 Dulcitol	-	41 D-Lyxose	-
17 Inositol	-	42 D-Tagatose	-
18 Mannitol	-	43 D-Fucose	-
19 Sorbitol	-	44 L-Fucose	-
20 α Methyl-D-mannoside	-	45 D-Arabitol	-
21 α Methyl-D-glucoside	+	46 L-Arabitol	-
22 N Acetyl glucosamine	+	47 Gluconate	+
23 Amygdaline	+ ^w	48 2 ceto-gluconate	-
24 Atbutine	-	49 5 ceto-gluconate	-

Symbols : +;positive, +^w;weakpositive, -;negative

GCACTTGGCG	CATTAGTATA	CATGCAGTCG	TACCAACTTT	CCCGAAGATT	GAAGGAGCTT	60
GCTCCTGATT	GATAAACATT	TGAGTGAGTG	GCGGACGGGT	GAGTAACACG	TGGGTAACCT	120
GCCCTAAAGT	GGGGGATAAC	ATTTGGAAC	AGATGCTAAT	ACCGCATAAA	ACCTAACACC	180
GCATGGTGTA	GGGTTGAAAG	ATGGTTTCGG	CTATCACTTT	AGG-ATGGAC	CCGCGGTGCA	240
TTAGTTAGTT	GGTGAGGTAA	AGGCTCACCA	AGACCGTGAT	GC-ATAGCCG	ACCTGAGAGG	300
GTAATCGGCC	ACACTGGGAC	TGAGACACGG	CCCAGACTCC	TACGGGAGGC	AGCAGTAGGG	360
AATCTTCCAC	AATGGACGAA	AGTCTGATGG	AGCAACGCCG	CGTGAGTGAA	GAAGGTTTTTC	420
GGATCGTAAA	ACTCTGTTGT	TGGAGAAGAA	TGTATCTGAT	AGTAACTGAT	CAGGTAGTGA	480
CGGTATCCAA	CCAGAAAGCC	ACGGCTAACT	ACGTGCCAGC	AGCCGCGGTA	ATACGTAGGT	540
GGCAAGCGTT	GTCCGGATTT	ATTGGGCGTA	AAGCGAGCGC	AGGCGGTTTC	TTAAGTCTGA	600
TGTGAAAGCC	TTCGGCTCAA	CCGAAGAAGT	GCATCGGAAA	CTGGGAAACT	TGAGTGCAGA	660
AGAGGACAGT	GGAACTCCAT	GTGTAGCGGT	GAAATGCGTA	GATATATGGA	AGAACCACAG	720
TGGCGAAGGC	GGCTGTCTGG	TCTGTAAGTG	ACGCTGAGGC	TCGAAAGCAT	GGGTAGCAAA	780
CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCATGCCG	TAAACGATGA	GTGCTAGGTG	TTGGAGGGTT	840
TCCGCCCTTC	AGTGCCGCAG	CTAACGCATT	AAGCACTCCG	CCTGGGGAGT	ACGACCGBAA	900
GGTTGAAACT	CAAAGGAATT	GACGGGGGCC	CGCACAAGCG	GTGGAGCATG	TGGTTTAATT	960
CGAAGCAACG	CGAAGAACCC	TTACCAGGTC	TTGACATCCT	TTGACCACTC	TAGAGATAGA	1020
GCTTTCCTT	CGGGGACAAA	GTGACAGGTG	GTGCATGGTT	GTCGTCAGCT	CGTGTCTGTA	1080
GATGTTGGGT	TAAGTCCC GC	AACGAGCGCA	ACCCTTATTA	CTAGTTGCCA	GCATTTAGTT	1140
GGGCACTCTA	GTGAGACTGC	CGGTGACAAA	CCGGAGGAAG	GTGGGGACGA	CGTCAAATCA	1200
TCATGCCCTT	TATGACCTGG	GCTACACACG	TGCTACAATG	GATGGTACAA	CGAGTTGCGA	1260
GACCGCGAGG	TTTAGCTAAT	CTCTTAAAAC	CATTCTCAGT	TCGGATTGTA	GGCTGCAACT	1320
CGCCTACATG	AAGCCGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGCCGCGG	TGAATACGTT	1380
CCCGGGCCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATTAGAGTT	TGTAACACCC	AAAGCCGGTG	1440
TAGGTAACCC	TTCGGGGAGC	CAGCCGTCGT	AGAGTGTCCT	CCA		1483

Fig. 10. 16S rRNA gene sequence of selected strain No. 383.

나. 기능성 검토

분리된 균주들의 GABA 함량을 상기의 방법과 동일한 방법으로 측정하여 GABA 함량이 가장 높은 strain No. 383을 실험 균주로 선택하였다(Table 6).

Table 6. GABA content of selected strains

(unit : $\mu\text{g/g}$, dry basis)

Strains	GABA content	Strains	GABA content
2	93.878	224	89.176
10	71.012	226	80.693
29	82.353	238	77.651
32	80.878	246	75.161
38	68.154	249	90.190
41	71.289	250	80.693
75	83.459	256	90.374
103	80.417	269	83.644
104	83.091	270	83.552
138	80.786	271	85.672
154	80.970	275	80.693
158	73.133	278	69.445
190	78.665	284	74.516
193	71.289	317	75.069
214	93.325	381	80.601
222	74.977	383	94.892

4. 혼합배양에 의한 청국장 제조

가. 균주 조합에 의한 청국장 제조

균주 조합에 의해 청국장을 제조하기 위하여 청국장 제조용 실험균주로 이용한 *Bacillus subtilis* MC31과 청국장의 냄새를 제거위해 분리·선택된 *Lactobacillus sakei* 383의 혼합배양을 실시하였다.

증자한 대두에 *Bacillus subtilis* MC31과 *Lactobacillus sakei* 383을 1:1, 1:2, 1:3, 2:1, 2:3, 3:1, 3:2의 비율로 접종하였을 때, 각 비율별 점질물의 생성량은 fig. 11에 나타내었다. 비율 1:1, 1:2, 1:3의 경우 점질물의 양이 각 27.30 ± 0.74 mg/g, 25.83 ± 0.76 mg/g, 25.50 ± 0.95 mg/g으로 *Lactobacillus sakei* 383의 비율이 높아질수록 점질물의 양이 줄어드는 현상을 확인할 수 있었다. 또한 비율 2:1, 2:3, 3:1, 3:2의 경우도 각각 28.44 ± 0.64 mg/g, 27.67 ± 0.88 mg/g, 29.22 ± 1.37 mg/g, 27.61 ± 0.86 mg/g으로 앞의 경우와 비슷하게 *Lactobacillus sakei* 383의 비율이 높아질수록 점질물의 양이 줄어드는 결과를 나타내었다. 따라서 *Lactobacillus sakei* 383은 *Bacillus subtilis* MC31의 생육을 억제하는 것을 알 수 있었다. 일반 청국장에는 점질물이 2.15~6.03% 정도 함유되어 있다는 보고들과 비교하였을 때 본 실험의 결과는 2.55~2.92%로 *Bacillus subtilis* MC31과 *Lactobacillus sakei* 383을 혼합배양하여 발효한 청국장과 유사한 양의 점질물

을 생성하였다. 또한 청국장의 형태와 외관도 단일 발효로 생성된 청국장과 유사하였다(Fig. 12).

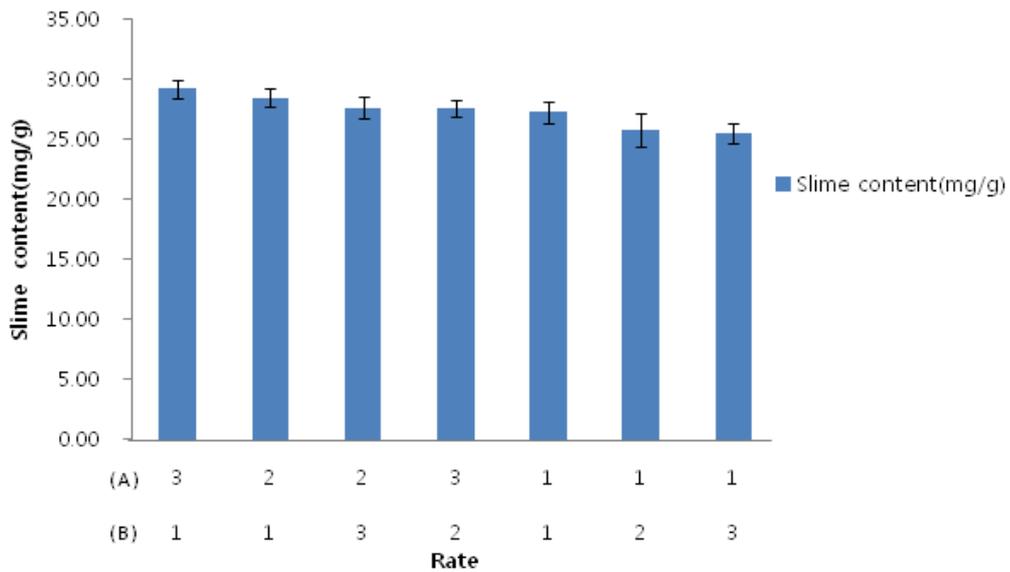


Fig. 11. Slime content in *Chungkookjang* by mixed culture of *Bacillus subtilis* MC31 and *Lactobacillus sakei* 383.

* Inoculation ratio of *Bacillus subtilis* MC31 (A) to *Lactobacillus sakei* 383 (B).



Fig. 12. *Chungkookjang* prepared by mixed culture of *Bacillus subtilis* MC31 and *Lactobacillus sakei* 383.

나. 균주 조합에 의한 청국장 기능성 분석

(1) GABA 함량

Bacillus subtilis MC31과 *Lactobacillus sakei* 383의 혼합배양에 의해 생산된 청국장의 기능 성분 가운데 본 과제 의 중점 대상물질인 GABA의 함량을 측정하였다. GABA 함량 측정은 상

기와 같은 방법으로 수행하였다.

Bacillus subtilis MC31과 *Lactobacillus sakei* 383을 1:1로 접종한 청국장의 GABA 함량을 알아보기 위해 autoclave 시간, 배양온도, 발효시간을 조건으로 하여 GABA 함량을 측정하였다. Autoclave 시간에 따른 GABA 함량의 차이는 거의 없었고(Fig. 13), 발효온도 35℃, 37℃에서 대체적으로 GABA 함량이 높게 측정되었으며, 배양온도가 높아질수록 전체적인 GABA 함량이 조금씩 증가하였다. 제일 높은 GABA 함량은 발효온도 37℃, autoclave 시간 30분에서 0.040 ± 0.000434 mg/g으로 가장 높았다. 그 다음으로 발효온도 45℃, autoclave 시간 40분에서 0.039 ± 0.000435 mg/g의 GABA 함량을 나타내었다. 제일 낮은 GABA 함량은 0.022 ± 0.001097 mg/g으로, 발효온도가 30℃, autoclave 시간은 30분이었다.

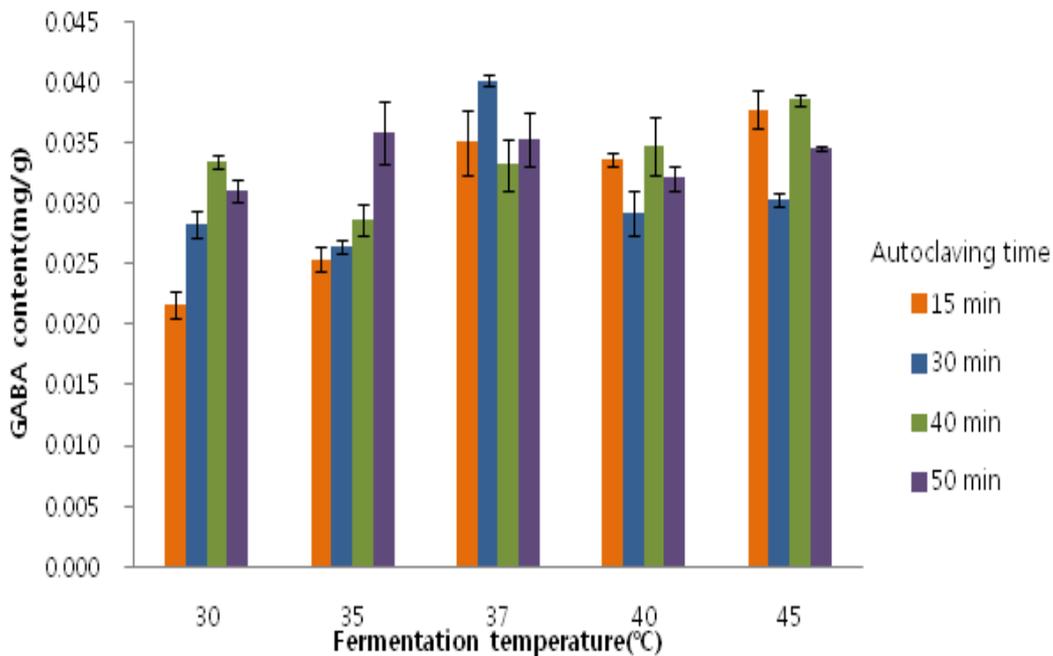


Fig. 13. Effects of different fermentation temperature and autoclaving time on GABA content in *Chungkookjang* by mixed culture of *Bacillus subtilis* MC31 and *Lactobacillus sakei* 383.

발효온도 37℃에서 발효시간과 autoclave 시간에 따른 GABA 함량(Fig. 14)은 autoclave 시간 30분에서 72시간 발효한 청국장이 가장 높았다. 발효시간이 길어질수록 전체적인 GABA 함량이 조금씩 증가하였다. Autoclave 시간에 따른 차이는 48시간에서는 autoclave 시간 15분이 가장 낮고, 30분에서 가장 높았다. 반면 60시간에서는 시간이 증가할수록 GABA 함량이 낮아졌다. 72시간에서는 특별한 차이를 나타내지 않았으나 30분에서 함량이 가장 높았다. 선 연구에서 *Bacillus subtilis* MC31을 단일 배양한 청국장의 GABA 함량은 autoclave 시간 50분, 발효온도 40℃, 발효시간 72시간에서 $1.524 \mu\text{g/ml}$ 으로 나타났다. *Bacillus subtilis* MC31과 *Lactobacillus sakei* 383의 혼합 배양한 청국장에서 *Bacillus subtilis* MC31을 단일 배양한 청국장보다 더 많은 GABA 함량을 얻을 수 있었다.

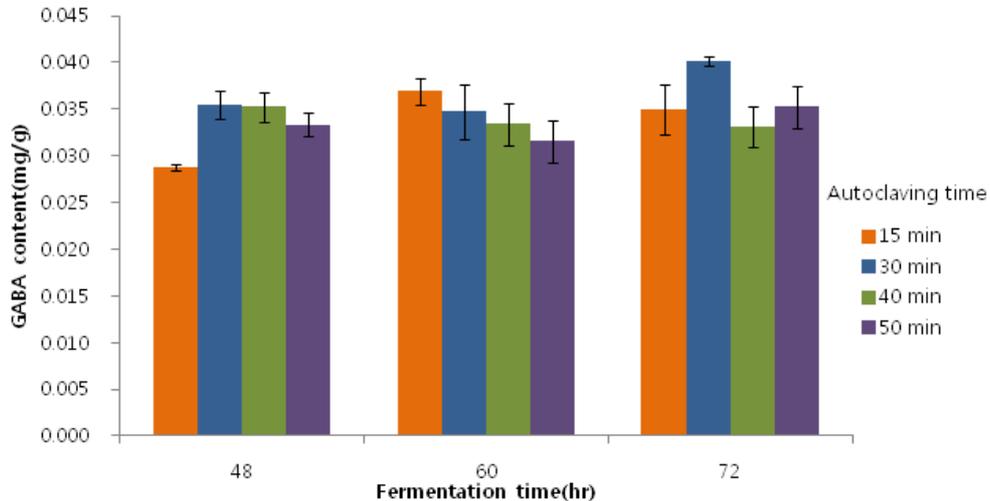


Fig. 14. Effects of different fermentation time and autoclaving time on GABA content in *Chungkookjang* by mixed culture of *Bacillus subtilis* MC31 and *Lactobacillus sakei* 383.
* *Chungkookjang* was fermented at 37°C.

(2) Protease 활성 측정

본 과제의 주요 기능성 성분인 GABA 외에 청국장의 맛과 기능성의 증진에 기여하는 것으로 알려진 점질물의 양을 늘리기 위해서는 protease 활성이 높아야 한다. 따라서 혼합배양에 의해 생산된 청국장의 기능성을 평가하기 위해 protease의 활성을 측정하였다.

Bacillus subtilis MC31과 *Lactobacillus sakei* 383을 1:1로 혼합하여 발효한 청국장과 *Bacillus subtilis* MC31을 단일로 접종하여 발효한 청국장에 각각 증류수를 일정비율(1:6, w/v)로 첨가하여 균질화하고 원심분리한 후 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.2)에 casein을 0.6%가 되도록 녹여 기질용액으로 사용하였으며, 기질용액 1 mL을 30°C에서 2분간 예열한 후 조효소액 1 mL을 가하여 30°C, 10분간 반응시켰다. 0.4 M TCA 용액 1mL을 가하여 실온에 30분간 방치하여 반응을 중지시키고, 0.45 µm syringe filter를 거쳐 여과 하였다. 여과액 1 mL을 UV spectrophotometer를 이용하여 280nm에서 흡광도를 측정하였으며, 효소 1 unit은 조효소액 1 mL이 1분 동안 1 µmol tyrosine을 생성하는 효소의 양으로 하였다.

Bacillus subtilis MC31과 *Lactobacillus sakei* 383을 1:1로 혼합하여 발효한 청국장과 *Bacillus subtilis* MC31을 단일로 접종한 청국장의 protease 활성을 측정한 결과 혼합발효에 의해 생산된 청국장의 protease 활성은 39.382±0.654 unit였으며, *Bacillus subtilis* MC31 단일 발효에 의해 생산된 청국장의 경우 32.378±0.067 unit의 protease 활성을 보여 혼합발효로 생산된 청국장이 높은 protease 활성을 보여주었다. 따라서 혼합배양에 의해 생성된 청국장이 GABA 생산 뿐 만아니라, protease 활성도 높아 기능성이 향상되었음을 확인하였다.

다. 냄새제거를 위한 발효조건 분석

Bacillus subtilis MC31과 *Lactobacillus sakei* 383을 일정 비율로 접종한 청국장을 발효하여 점질물의 점도, 불쾌취, 쓴맛을 비교하였다(Table 7). 점도의 경우, *Bacillus subtilis* MC31의 비율이 높을수록 끈끈한 강도가 강했으며, *Lactobacillus sakei* 383의 비율이 높아질수록 점점

물처럼 연해졌다. 불쾌취는 비율 1:1, 1:2, 1:3에서 다른 비율보다 완화된 것을 느낄 수 있었다. 하지만 비율 1:2, 1:3에서는 식초냄새가 비율 1:1보다 강하였다. 쓴맛은 *Bacillus subtilis* MC31의 비율이 높아질수록 강해졌으며, *Lactobacillus sakei* 383의 비율이 높아질수록 쓴맛은 줄어들고 콩 특유의 고소한 맛이 더 강하게 느껴졌다. 이상의 결과를 종합하여 비교하였을 때 비율 1:1의 경우 불쾌취가 거의 없었고, 점질물의 양과 점도는 다른 비율과 비교했을 때 크게 차이가 나지 않았으며, 일반 청국장의 범위에 포함되었다. 따라서 GABA 측정을 위한 청국장을 제조할 때 접종농도는 *Bacillus subtilis* MC31과 *Lactobacillus sakei* 383의 비율을 1:1로 정하였다.

Table 7. Viscosity, foul odor and bitter taste of *Chungkookjang* by mixed culture of *Bacillus subtilis* MC31 and *Lactobacillus sakei* 383

Rate		Viscosity	Foul odor	Bitter taste
(A)	(B)			
1	1	+++	+	++
1	2	++	+	+
1	3	+	+	+
2	1	+++	+++	++++
2	3	++	+++	+++
3	1	++++	++++	++++
3	2	++++	++++	+++

* Inoculation ratio of *Bacillus subtilis* MC31 (A) and *Lactobacillus sakei* 383 (B).

* +++++: over powering detectable activity, ++++: strong detectable activity, ++: detectable activity, +: weak detectable activity.

5. 혼합배양에 의해 제조된 청국장의 성분 및 품질

가. 청국장의 성분분석

(1) *Bacillus subtilis* MC 31과 *Lactobacillus sakei* 383을 혼합 발효한 청국장의 GABA 함량
Bacillus subtilis MC31과 *Lactobacillus sakei* 383을 1:1로 접종한 청국장의 GABA 함량을 알아보기 위해 발효온도와 발효시간을 조건으로 하여 GABA 함량을 측정해 보았다.

Figure 15에 발효온도에 따른 최대 GABA 함량을 100%로 하여 생성된 GABA의 상대적인 함량을 백분율로 표시하였으며 발효온도 37°C에서 가장 높은 GABA 함량을 나타냈다. 발효온도 37°C에서 발효시간에 따른 GABA의 상대적인 함량은 72시간 발효한 청국장이 가장 높았으며 전체적으로 발효시간이 길어질수록 GABA 함량이 조금씩 증가함을 알 수 있었다(Fig. 15). 발효온도 37°C에서 GABA 함량이 높게 나온 것은 *Lactobacillus sakei* 383의 생육에 따른 차이로 보인다. *Lactobacillus sakei* 383의 최적 생육 온도는 35°C이며 *Bacillus subtilis* MC31의 최적 생육온도는 37°C로 청국장 발효온도 37°C가 두 균주의 최적 생육 온도와 비슷하기 때문으로 생각된다.

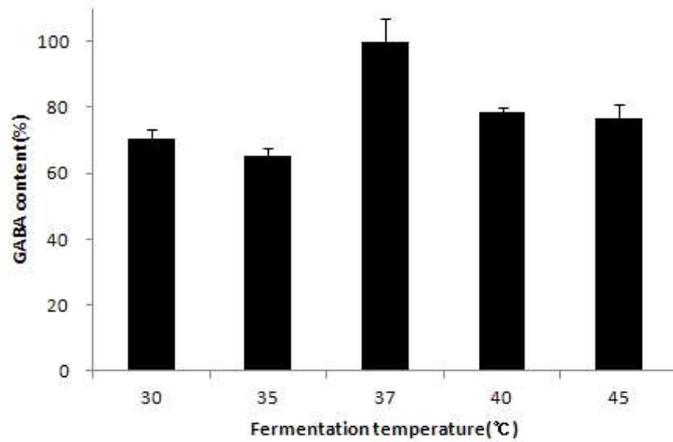


Figure 15. Effects of different fermentation temperature and GABA content(%) in *Chungkookjang* fermented by mixed culture of *Bacillus subtilis* MC31 and *Lactobacillus sakei* 383.

* *Chungkookjang* was fermented for 72 hr.

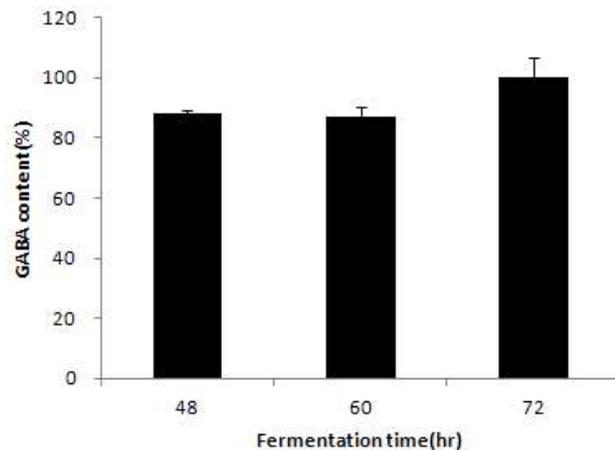


Figure 16. Effects of different fermentation time and GABA content (%) in *Chungkookjang* fermented by mixed culture of *Bacillus subtilis* MC31 and *Lactobacillus sakei* 383.

* *Chungkookjang* was fermented at 37°C.

(2) *Bacillus subtilis* MC 31과 *Lactobacillus sakei* 383을 혼합 발효한 청국장의 아미노산 함량
Bacillus subtilis MC 31과 *Lactobacillus sakei* 383을 37°C, 72시간 동안 혼합 발효한 청국장
 의 아미노산은 22종이 검출되었으며 그 함량은 table 8에 나타내었다. 제일 높은 함량을 나타
 낸 아미노산은 tyrosine이며 ammonium, citrulline, lysine 순으로 함량이 낮아졌다. 단맛을 내
 는 아미노산인 glycine, threonine, alanine 중에서는 threonine이 2.08±0.0165 mg/g, alanine이
 2.31±0.0150 mg/g의 함량을 나타내었으며 glycine은 검출되지 않았다. 쓴맛을 내는 아미노산인

valine, isoleucine, leucine, methionine은 각각 0.05 ± 0.0008 mg/g, 3.40 ± 0.0241 mg/g, 4.75 ± 0.0559 mg/g, 0.59 ± 0.0038 mg/g의 함량을 나타내었다. Glutamic acid는 GABA 생성 전구체로, 혼합 발효한 청국장에서 1.40 ± 0.0142 mg/g의 함량을 나타내었으며 GABA함량은 0.47 ± 0.0027 mg/g으로 나타났다. 김은 두유에 *Lactobacillus sakei* 383을 접종하여 발효한 soycurd에서 아미노산 분석기를 통한 GABA 함량이 8.65 ± 0.40 mg/100g이라고 발표하였으며, 맹에 따르면 *Bacillus subtilis* MC 31을 접종하여 발효한 청국장을 아미노산 분석기로 분석하였을 때, GABA의 함량은 0.20 mg/g이라고 발표하였다. 따라서 *Bacillus subtilis* MC 31을 단일로 접종하여 발효한 청국장보다 *Bacillus subtilis* MC 31과 *Lactobacillus sakei* 383을 혼합하여 발효한 청국장의 GABA 함량이 높아짐을 알 수 있었으며 필수 아미노산의 함량 또한 높아 기능성이 높은 발효 식품이라고 판단된다.

Table 8. Amino acid content of *Chungkookjang* fermented by mixed culture of *Bacillus subtilis* MC31 and *Lactobacillus sakei* 383

(unit : mg/g, Dry basis)

Amino acid		<i>Chungkookjang</i>
Essential amino acid	L-Threonine	2.08 ± 0.0165
	L-Valine	0.05 ± 0.0008
	L-Methionine	0.59 ± 0.0038
	L-Isoleucine	3.40 ± 0.0241
	L-Leucine	4.75 ± 0.0559
	L-Phenylalanine	ND
	L-Lysine	7.44 ± 0.0461
	L-Tryptophan	1.16 ± 0.0266
Non-essential amino acid	L-Asparagine	1.04 ± 0.0163
	L-Glutamic acid	1.40 ± 0.0142
	L-Serine	1.21 ± 0.0192
	Citrulline	8.44 ± 0.0656
	L-Alanine	2.24 ± 0.0211
	L-Cysteine	6.26 ± 0.0491
	L-Tyrosine	15.76 ± 0.0940
	β -Alanine	2.31 ± 0.0150
	Ammonium	9.08 ± 0.0319
	DL- β -aminoisobutyric acid	6.30 ± 0.0284
	L-Ornithine	2.04 ± 0.0119
	L-Histidine	3.42 ± 0.0225
	L-Arginine	2.99 ± 0.0276
	L-Aspartic acid	0.57 ± 0.0060
GABA	0.47 ± 0.0027	
Total amino acids		83.00 ± 0.5977

* *Chungkookjang* was fermented at 37°C for 72 hr.

* ND : Not detected

* All values are mean \pm SD (n=3).

나. 청국장의 품질특성

(1) 미생물 생육 변화

Figure 17은 *Bacillus subtilis* MC 31과 *Lactobacillus sakei* 383을 37°C, 72시간 동안 혼합 발효한 청국장의 미생물의 생육 변화를 나타낸 것이다. 0시간에는 log 7 CFU/g으로 시작하여 *Bacillus subtilis* MC 31의 경우 12시간에는 log 9±0.2102 CFU/g, *Lactobacillus sakei* 383는 log 7±0.3742 CFU/g을 나타내었다. 이후 점점 증가하여 *Bacillus subtilis* MC 31은 60시간에서 log 13±0.3767 CFU/g까지 증가하였으며 *Lactobacillus sakei* 383는 48시간에서 log 10±0.1027 CFU/g까지 증가하였다. 이후 72시간 까지 미생물의 생육도는 일정하였다. 맹과 비교하였을 때 0시간의 생육도가 약 log 2.5 CFU/g정도 차이가 있으며 72시간에서의 생육도 또한 약 log 3.1 CFU/g정도 차이가 있다. 이는 접종 시 균의 상태에 따라 차이가 나는 것으로 판단된다.

Lactobacillus sakei 383은 *Bacillus subtilis* MC 31보다 생육도가 낮음을 알 수 있었다. 주 등에 따르면 *Bacillus subtilis*의 빠른 생육이 유산균의 생육을 억제 시킨다고 보고하였으며 본 실험과 유사한 패턴을 보였다.

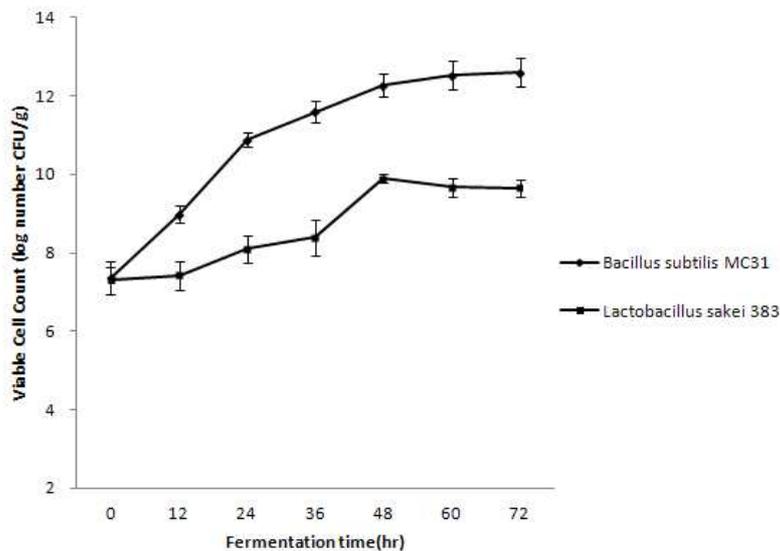


Figure 17. Change of viable cell number of *Chungkookjang* fermented by mixed culture of *Bacillus subtilis* MC31 and *Lactobacillus sakei* 383.

* *Chungkookjang* was fermented at 37°C for 72 hr.

(2) 일반성분 분석

Bacillus subtilis MC31과 *Lactobacillus sakei* 383을 1:1로 혼합하여 발효한 청국장의 일반 성분은 table 9에 나타내었다. 수분 함량은 61.71±0.72%, 조회분 함량은 2.05±0.05%, 조단백 함량은 17.54±0.03%, 조섬유 함량은 1.95%로 나타났다. 이는 선 연구에서 발표한 *Bacillus subtilis* MC31의 단일 발효 청국장의 일반성분 함량과 비교하였을 때 조회분의 함량은 조금

늘었으며 조섬유의 경우는 약간 줄어들었으나 유사한 결과를 나타내었다.

Table 9. Proximate composition in *Chungkookjang* fermented by mixed culture of *Bacillus subtilis* MC31 and *Lactobacillus sakei* 383

Proximate composition	<i>Chungkookjang</i> (%)
Moisture	61.71±0.72
Crude ash	2.05±0.05
Crude protein	17.54±0.03
Crude fat	8.36±0.01
Crude fiber	1.95

* *Chungkookjang* was fermented by *Bacillus subtilis* MC31 and *Lactobacillus sakei* 383 at 37°C for 72 hr.

* Proximate composition was analysed by AOAC method.

* All values are mean±SD (n=3)

(3) 총당과 환원당 정량

청국장의 당류는 발효과정 중에 미생물이 생성하는 가수분해효소가 작용하여 콩의 전분질을 분해되어 생성된다. *Bacillus subtilis* MC31과 *Lactobacillus sakei* 383을 1:1로 혼합하여 발효한 청국장의 총당과 환원당을 정량하여 table 10에 나타내었다. 총당의 경우 삶은 콩에서 34.45±0.83%, 청국장에서는 20.63±0.63%으로 약 1.6배 감소하였다. 환원당은 삶은 콩이 0.96±0.00039%, 청국장이 1.03±0.00015%로 나타났다. 석에 따르면 볏짚을 이용하여 야생균으로 청국장을 제조하였을 때 환원당의 함량이 대조구보다 높게 나타났다고 보고하였다. 이와 같은 결과는 청국장을 발효하는 균주들이 glucose를 생육에 이용하기 때문으로 보인다.

Table 10. Contents of total and reducing sugar in *Chungkookjang* fermented by mixed culture of *Bacillus subtilis* MC31 and *Lactobacillus sakei* 383

	Total sugar (%)	Reducing sugar (%)
Steamed soybean	34.45±0.83	0.96±0.00039
<i>Chungkookjang</i>	20.63±0.63	1.03±0.00015

* *Chungkookjang* was fermented by *Bacillus subtilis* MC31 and *Lactobacillus sakei* 383 at 37°C for 72 hr.

* All values are mean±SD (n=3).

(4) 암모니아태 질소

청국장은 특유의 불쾌취로 대중들이 꺼려하는 식품이다. 이 불쾌취의 원인 중 하나인 암모니아태 질소는 단백질 분해과정에서 deamination에 의해 생성되며 과량 생성되어 함량이 증가할수록 이취와 함께 불쾌감을 준다. 따라서 일반적으로 장류제품의 변패 또는 이상발효의 지표로써 이용된다. *Bacillus subtilis* MC31과 *Lactobacillus sakei* 383을 1:1로 혼합하여 발효한 청

국장의 암모니아태 질소 함량은 213.35 ± 0.08 mg%으로 나타났다. 선 연구에서 *Bacillus subtilis* MC31의 단일 발효 청국장의 암모니아태 질소 함량은 238.74 ± 0.18 mg%으로 나타났으며 이는 본 실험의 결과보다 약간 높은 함량이었다. *Bacillus subtilis* MC31과 *Lactobacillus sakei* 383을 혼합 발효한 청국장이 *Bacillus subtilis* MC31을 단일 발효한 청국장보다 암모니아태 질소 함량이 낮으므로 이는 청국장의 불쾌취가 줄었음을 알 수 있었다(Table 11).

Table 11. Contents of ammonium nitrogen in *Chungkookjang* fermented by mixed culture of *Bacillus subtilis* MC31 and *Lactobacillus sakei* 383

Ammonium nitrogen contents(mg%)	
<i>Chungkookjang</i>	213.35 ± 0.08

* *Chungkookjang* was fermented by *Bacillus subtilis* MC31 and *Lactobacillus sakei* 383 at 37°C for 72 hr.

* All values are mean±SD (n=3).

(5) 아미노태 질소

아미노태 질소는 아미노산성 질소(NH₂-nitrogen)로도 나타내며 단백질 분해효소에 의해 단백질이 아미노산의 형태로 분해되는 정도를 나타낸 것이다. 청국장, 된장과 같은 장류 발효제품의 품질지표로 사용되고 있으며 현재 식품공전에 따르면 청국장의 아미노태 질소 함량을 280 mg% 이상으로 규정되어 있다. *Bacillus subtilis* MC31과 *Lactobacillus sakei* 383을 1:1의 비율로 접종하여 72시간동안 발효한 청국장의 아미노태 질소는 419.49 ± 1.08 mg%의 함량을 나타내었으며 대조구인 삶은 콩의 경우 55.12 ± 2.16 mg%의 함량을 나타내었다. 발효가 진행됨에 따라 대두의 단백질이 분해되어 아미노태 질소가 증가함을 알 수 있었다. 선 연구에 따르면 *Bacillus subtilis* MC31을 단일 접종하여 발효하였을 때 아미노태 질소는 449.25 mg%의 함량을 나타낸다고 보고하였다. 두 청국장의 아미노태 질소 함량을 비교 하였을 때 *Lactobacillus sakei* 383을 혼합발효한 청국장의 아미노태 질소 함량이 약간 낮으나 식품공전에서 지정한 아미노태 질소 함량보다 약 1.5배 높게 나타났다(Table 12).

Table 12. Contents of amino type nitrogen in *Chungkookjang* fermented by mixed culture of *Bacillus subtilis* MC31 and *Lactobacillus sakei* 383

Amino type nitrogen contents(mg%)	
Steamed soybean	55.12 ± 2.16
<i>Chungkookjang</i>	419.49 ± 1.08

* *Chungkookjang* was fermented by *Bacillus subtilis* MC31 and *Lactobacillus sakei* 383 at 37°C for 72 hr.

* All values are mean±SD (n=3).

(6) pH와 총산도

Bacillus subtilis MC31과 *Lactobacillus sakei* 383을 혼합 발효한 청국장의 시간별 pH와 산도의 변화를 각각 fig. 18과 fig. 19에 나타내었다. pH의 경우 0시간에서 6.52 ± 0.0066 을 나타내었으며 시간이 지남에 따라 점점 증가하여 72시간에는 7.88 ± 0.0066 을 나타내었다. 총산도의 경우 pH와 반대로 0시간에서는 $0.17 \pm 0.0020\%$ 에서 점점 감소하여 72시간에는 0.04%를 나타내었다. 미생물 생육변화와 비교하였을 때 *Bacillus subtilis* MC31이 증가 할수록 pH는 증가하였으며 산도는 낮아졌다. 이러한 결과는 청국장은 발효시간이 지남에 따라 pH가 증가한다는 백 등의 보고와 같으며 김 등이 보고한 우리나라 전통 청국장의 평균 pH인 7.21보다는 약간 높은 결과를 나타내었다.

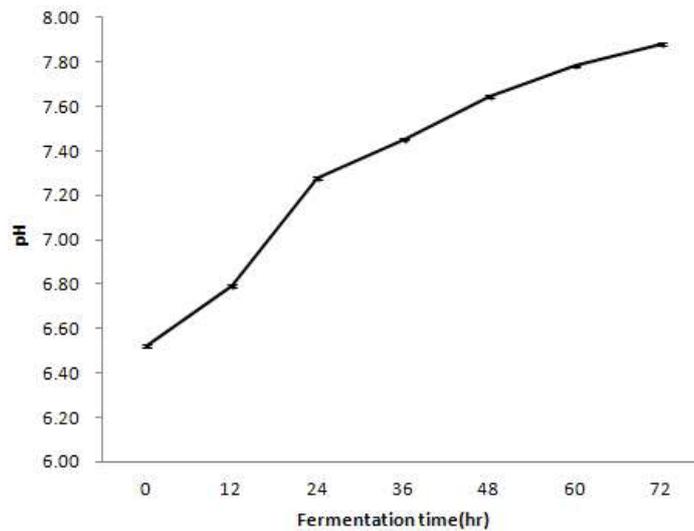


Figure 18. Changes of pH in *Chungkookjang* fermented by mixed culture of *Bacillus subtilis* MC31 and *Lactobacillus sakei* 383.

* *Chungkookjang* was fermented at 37°C for 72 hr.

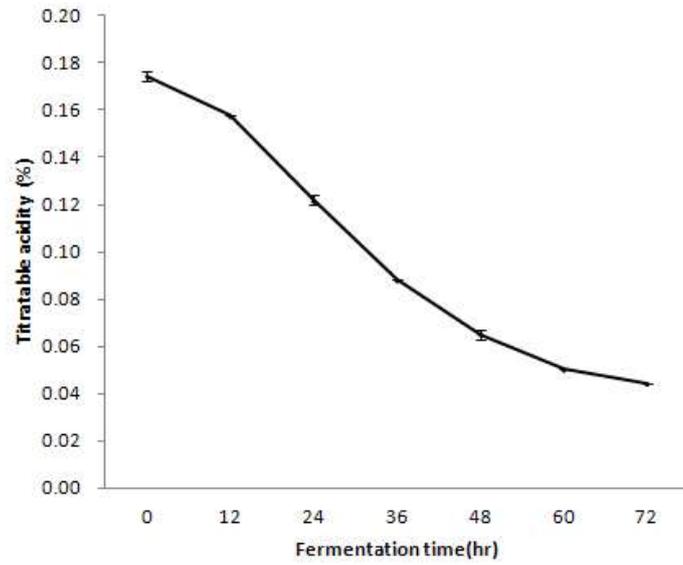


Figure 19. Changes of titratable acidity in *Chungkookjang* fermented by mixed culture of *Bacillus subtilis* MC31 and *Lactobacillus sakei* 383.

* *Chungkookjang* was fermented at 37°C for 72 hr.

제 2 절 어린이 성장발육 및 학습력 증진 기능성 효능 분석

본 협동과제에서는 어린이 성장발육 · 학습력 증진에 적합한 청국장 제품이 아동성장 발육 및 학습력 증진에 미치는 영향을 모델동물을 이용하여 분석하였다. 이를 위하여 청국장 제품을 모델동물에 장기간 혹은 단기간 투여하고, 성장발육개선 기능성과 학습력 증진 기능성을 탐색하였다. 또한, 청국장의 알러지 치료효능을 정량이 가능한 모델동물인 IL-4/Luc/CNS-1 형질전환 마우스를 이용하여 평가함으로써 새로운 기능을 탐색하였다.

1. 성장발육/학습력증진 기능성탐색을 위한 세포주 확립

가. 뇌하수체 전엽 세포주

청국장의 세포독성과 성장호르몬 분비능을 연구하기 위하여 GH3 세포주를 한국세포주은행(Korean Cellline Bank, KCLB)에서 구입하여 사용하였다(Figure 1). 쥐의 뇌하수체 종양으로부터 유래한 GH3 세포주는 성장호르몬과 유즙분비호르몬을 분비하는 세포주로서 호르몬의 분비기전, 신호전달 기전, 소마토스타틴 수용체 등의 발현의 조절기전의 연구에 쓰인다. GH3 세포주는 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Carlsbad, CA, USA), L-glutamine, penicillin 및 streptomycin (Cambrex)을 함유한 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco)에 37°C, 5% CO₂조건의 incubator에서 배양하였다. 배지는 매일 교체했으며, 세포가 배지 내에 80~90% 정도 성장하면 계대시켰다.

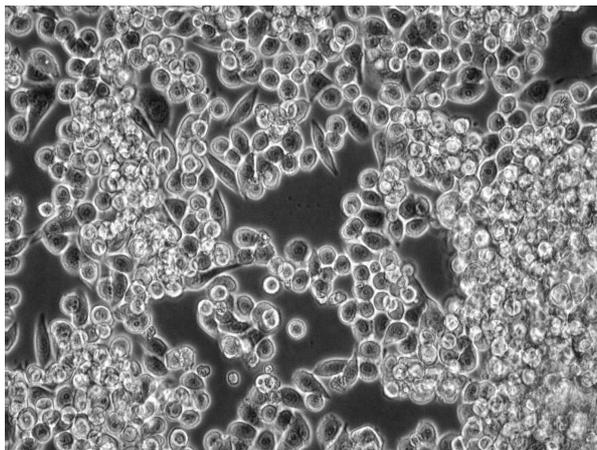


Figure 1. Culture morphology of GH3 cells.

나. 골아세포주

성장호르몬 수용체를 가진 MG63 세포주는 청국장으로 유도된 성장호르몬의 기능과 신호전달을 연구하기 위하여, 한국세포주은행에서 구입하여 사용하였다. MG63 세포주는 사람 골육종에서 유래된 세포이며(Figure 2), 10%의 열처리된 FBS와 penicillin/streptomycin 이 함유된 DMEM 복합 배지로 37°C, 5% CO₂조건의 incubator에서 배양하였다. 배지는 매일 교체했으며, 세포가 배지 내에 80~90% 정도 성장하면 계대시켰다.

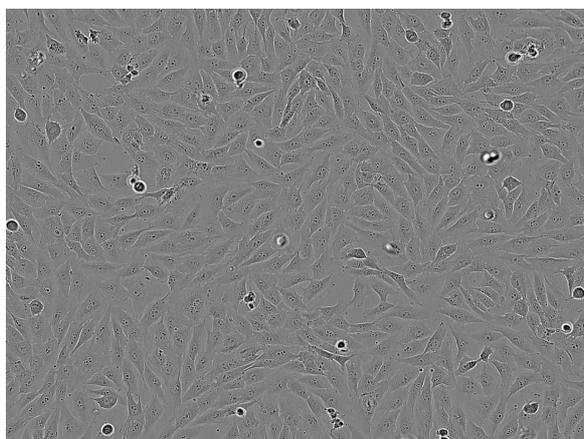


Figure 2. Culture morphology of MG63 cells.

다. 간세포주

또한 청국장으로 유도된 성장호르몬이 골아세포에 국한적인지를 평가하고자, 성장호르몬 수용체를 가진 다른 종류의 세포인 HepG2 세포주를 한국세포주은행에서 구입하여 실험에 사용하였다. HepG2 세포주는 Human hepatocytes이며, MG63 세포주와 마찬가지로 성장호르몬의 신호전달과정을 연구하기 위하여 사용하였다(Figure 3). HepG2 세포주는 10%의 열처리된 FBS와 penicillin/streptomycin 이 함유된 Minimum Essential Medium (Gibco) 복합배지로 37°C, 5% CO₂조건 of incubator에서 배양하였다. 배지는 매일 교체했으며, 세포가 배지 내에 80~90% 정도 성장하면 계대시켰다.

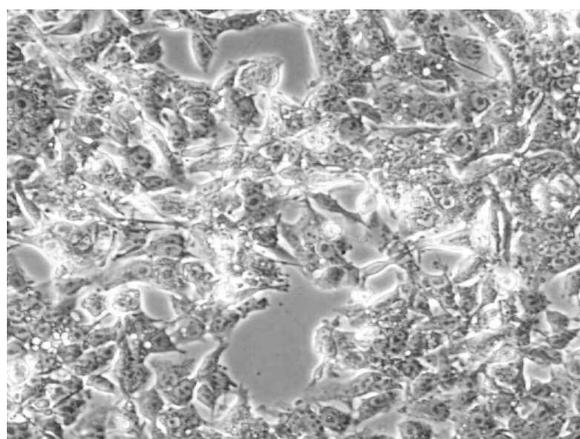


Figure 3. Culture morphology of HepG2 cells.

라. 신경세포주

청국장의 신경세포독성과 신경성장인자(Nerve growth hormone, NGF) 분비능과 NGF 신호전달과정을 연구하기 위하여 B35 세포주와 PC12 세포주를 한국세포주은행에서 구입하여 사용하였다(Figure 4). B35 세포주는 Rat neuroblastoma로서, 10%의 열처리된 FBS와 penicillin/streptomycin 이 함유된 DMEM 복합 배지로 37°C, 5% CO₂조건 of incubator에서 배양하였다. 배지는 매일 교체했으며, 세포가 배지 내에 80~90% 정도 성장하면 계대시켰다.

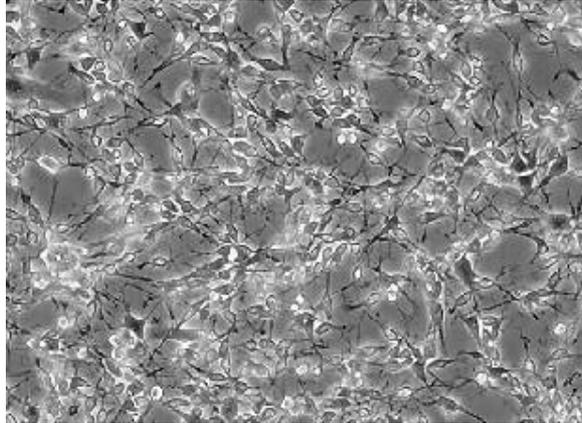


Figure 4. Culture morphology of B35 cells.

또한 Rat Pheochromocytoma인 PC12 세포주는 크롬친화성 세포종으로 epinephrine norepinephrine 등 신경전달물질의 분비가 활발하여 신경계 연구에 많이 사용된다(Figure 5). PC12 세포주는 분비된 NGF의 신호전달과정을 연구하기 위해 사용하였으며, 10%의 열처리된 FBS와 penicillin/streptomycin 이 함유된 RPMI 1640 복합 배지로 37°C, 5% CO₂조건의 incubator에서 배양하였다. 배지는 매일 교체했으며, 세포가 배지 내에 80~90% 정도 성장하면 계대시켰다.

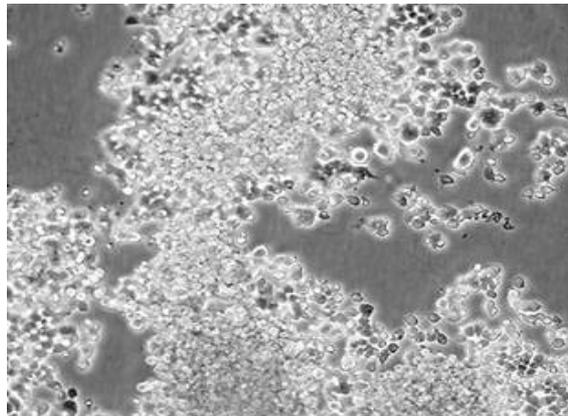


Figure 5. Culture morphology of PC12 cells.

2. 성장발육개선 *in vitro* 기능성 탐색

가. 성장관련인자 분석

(1) 청국장의 품종이 뇌하수체 전엽 세포생존율과 성장호르몬 분비에 미치는 영향

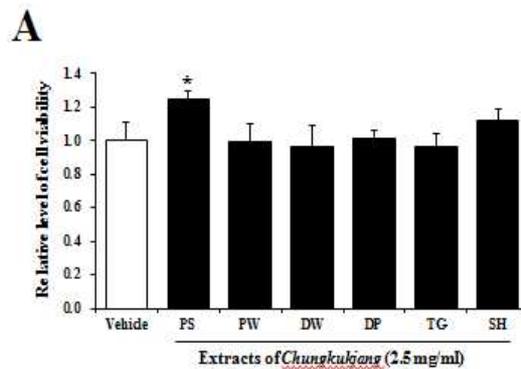
청국장의 6가지 품종(풍산, 풍원, 대원, 대풍, 태광, 신화)이 뇌하수체 전엽 세포의 생존과 성장호르몬 분비에 미치는 영향을 평가하기 위하여, GH3 세포주에 청국장을 2.5 mg/ml의 농도로 3시간 처리한 후, 세포 생존율과 성장호르몬의 분비량을 측정하였다.

세포 생존율은 MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diohenyl tetrazolium bromide, Sigma chemical Co. USA)방법을 통하여 분석하였다. MTT는 살아있는 세포 내 미토콘드리아 내막에 존재하는 oxido-reductase의 효소 작용에 의해 환원되어 보라색의 formazan을 형성하

게 되는데, 용해액 내 보라색 formazan의 발색정도를 흡광도로 측정함으로써 세포 생존율을 예측하는 실험방법으로 이용되고 있다(Gerlier and Thomasset, 1986). 먼저 GH3, MG63과 C6 cell을 96 well (3 x 10⁴cell/well)에 분주하여 24시간 배양한 뒤, Vehicle (dH₂O),청국장을 농도 별로 처리하고, 3시간 동안 배양하였다. 배양용 배지를 제거하고, MTT용액을 50 μ l 첨가한 뒤, 4시간 동안 추가 배양하였다. 세포 내에 보라색 결정이 생성되면 Dimethyl sulphoxide (DMSO, Sigma Co.) 용액을 150 μ l씩 넣고, formazan을 녹였다. 각 well에 나타난 색깔의 변화를 ELISA-reader (VERSA max, micro-reader, MDS. Co, USA)를 이용하여 540 nm에서 측정하였다.

청국장이 GH3 세포주에서 성장호르몬 생성에 미치는 영향을 단백질 수준으로 확인하기 위해, 다양한 농도와 품종별로 청국장을 GH3 세포주에 처리한 후, 24시간 배양한 배양액을 채취하여, 성장호르몬 특이 항체를 이용하여 Slot Blot analysis를 수행하였다. 세포 배양액은 Slot Blot kit (Pharmacia Biotech, CA, USA)를 이용하여 nitrocelulose membrane에 전이시켰다. Membrane은 1시간 동안 실온에서 5% Skim milk로 블로킹 한 후, 일차 항체인 rabbit polyclonal anti-GH antibody (Santa Cruz biotechnology Inc., CA, USA)로 1시간동안 처리하였다. 그리고 이차항체인 horseradish peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG (GenTest, MA)를 실온에서 1시간 처리하였으며, ECL Kit를 이용하여 발현을 확인하였다.

그 결과, 세포 생존율은 풍산을 처리한 그룹에서 20% 증가하였고, 이를 제외한 나머지 모든 그룹에서는 유의성 있는 변화를 나타내지 않았다(Figure 6A). 그러나 성장호르몬의 분비량은 대원 대풍, 태광을 처리한 그룹에서 Vehicle 처리군보다 높았으며, 다른 품종의 청국장을 처리한 그룹에서는 Vehicle 처리군과 유사한 수준의 성장호르몬이 분비되었다(Figure 6B). 따라서 이러한 실험 결과는 청국장이 뇌하수체 전엽 세포에 독성이 없고, 일부 품종에서는 성장호르몬의 분비를 유도함을 제시하고 있다.



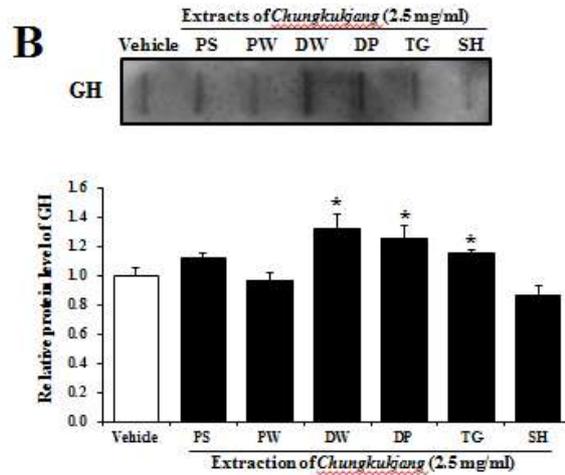
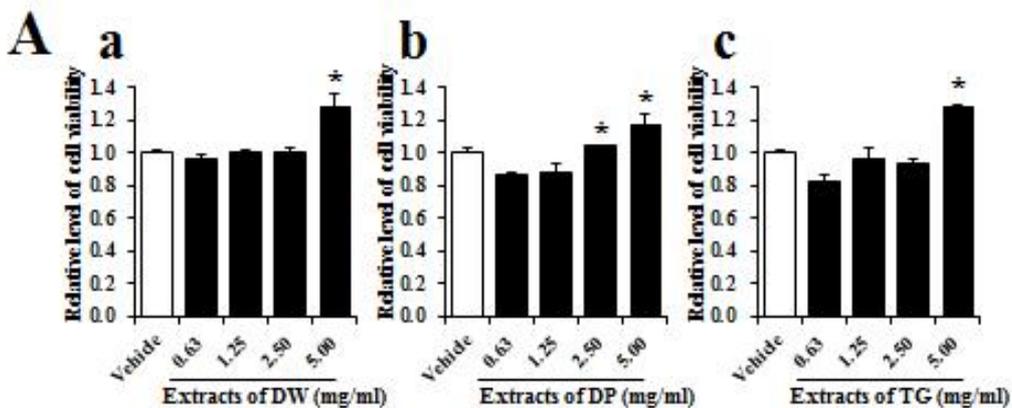


Figure 6. Effects of *Chungkukjang* manufactured by six different Glycine max strain on toxicity and Growth hormone (GH) secretion in GH3 cells. Cells were cultured with one of the different extracts manufactured by different Glycine max strain. Activity of cell viability was measured via MTT assays (A). The culture supernatants were collected from each of the cells. GH concentration in the supernatant was measured using a dot blot assay (B). The values of data represented the means \pm SD of three experiments. * $P < 0.05$ is the significance level relative to the vehicle-treated group.

(2) 청국장의 농도가 뇌하수체 전엽 세포생존율과 성장호르몬 분비에 미치는 영향

성장호르몬 분비량을 바탕으로 세가지 콩 품종(대원, 대풍, 태광)으로 제조된 청국장이 농도 별로 뇌하수체 전엽 세포의 생존과 성장호르몬 분비에 미치는 영향을 평가하기 위하여, MTT 분석과 Dot blot 분석을 실시하였다.

그 결과 세포 생존율은 대조군에 비하여 세가지 품종의 청국장을 대원, 대풍, 태광을 5 mg/ml의 농도로 처리하였을 때, 세포생존율이 높았다(Figure 7A). 또한, 성장호르몬의 분비량은 대원, 대풍의 경우 2.5, 5.0 mg/ml로 처리한 그룹이 Vehicle 처리군 보다 높았다(Figure 7B). 그러나 태광을 처리한 경우에 성장호르몬의 분비량은 5.0 mg/ml을 처리한 그룹에서만 증가하였다. 이러한 결과는 세가지 청국장은 포생존율과 성장호르몬 분비량이 증가함을 제시하고 있다.



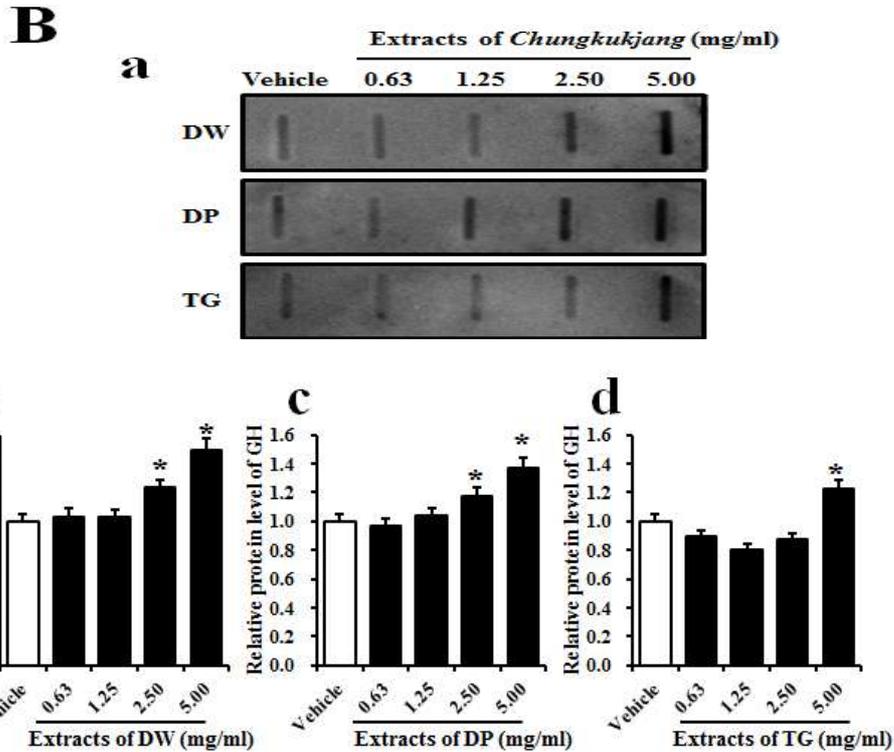


Figure 7. Effects of *Chungkukjang* manufactured by three different Glycine max strain (DW, DP, TG) on toxicity and GH secretion in GH3 cells. Cells were cultured with one of the different extracts manufactured by different Glycine max strain. Activity of cell viability was measured via MTT assays (A). The culture supernatants were collected from each of the cells. GH concentration in the supernatant was measured using a dot blot assay (B). The values of data in represented the means \pm SD of three experiments.

나. 생리활성효능 탐색

(1) 청국장에 의해 분비된 성장호르몬이 골아세포의 분화에 미치는 영향

청국장에 의해 GH3 세포주에서 분비하는 성장호르몬이 실제로 세포의 분화와 성장을 촉진시키는 지를 확인하고자, 골아세포의 성장과 분화에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 배양액을 이용한 세포분화를 측정하였다. 이를 위해, 먼저 GH3 세포주를 serum-free media로 밤새 배양 후에, 청국장을 품종과 농도별로 처리하여 3시간 배양한 뒤, 성장호르몬이 분비된 조건적 배양액(conditional medium)을 확보 하였다. 성장호르몬이 분비된 배양액을 MG63 세포주에 처리하여 시간의 경과에 따른 세포주의 변화를 현미경을 이용하여 관찰하였다. MG63 세포주는 위상차 도립 현미경(Leica Microsystems, Switzerland)를 이용하여 세포상태를 관찰 하였다.

그 결과, MG63 세포의 분화는 태광에서 가장 높았으며, 대원, 대풍, 풍원 등의 순서로 관찰 되었다(Figure 8). 그러나 풍산과 신화를 처리한 그룹에서도 세포 분화를 관찰 할 수 없었다. 또한 성장호르몬의 분비량은 대원, 태광의 조건적 배양액을 처리한 세포에서는 농도의존적으로 분화가 촉진 되었으나, 대풍의 조건적 배양액에서는 농도 의존적이지 않았고, 전체적으로 일정한 증가를 나타내었다(Figure 9). 이러한 결과는 청국장에 의해 분비된 성장호르몬이 세포 성장을 촉진하며, 일부 세포에서 농도의존적으로 발생함을 제시하고 있다.

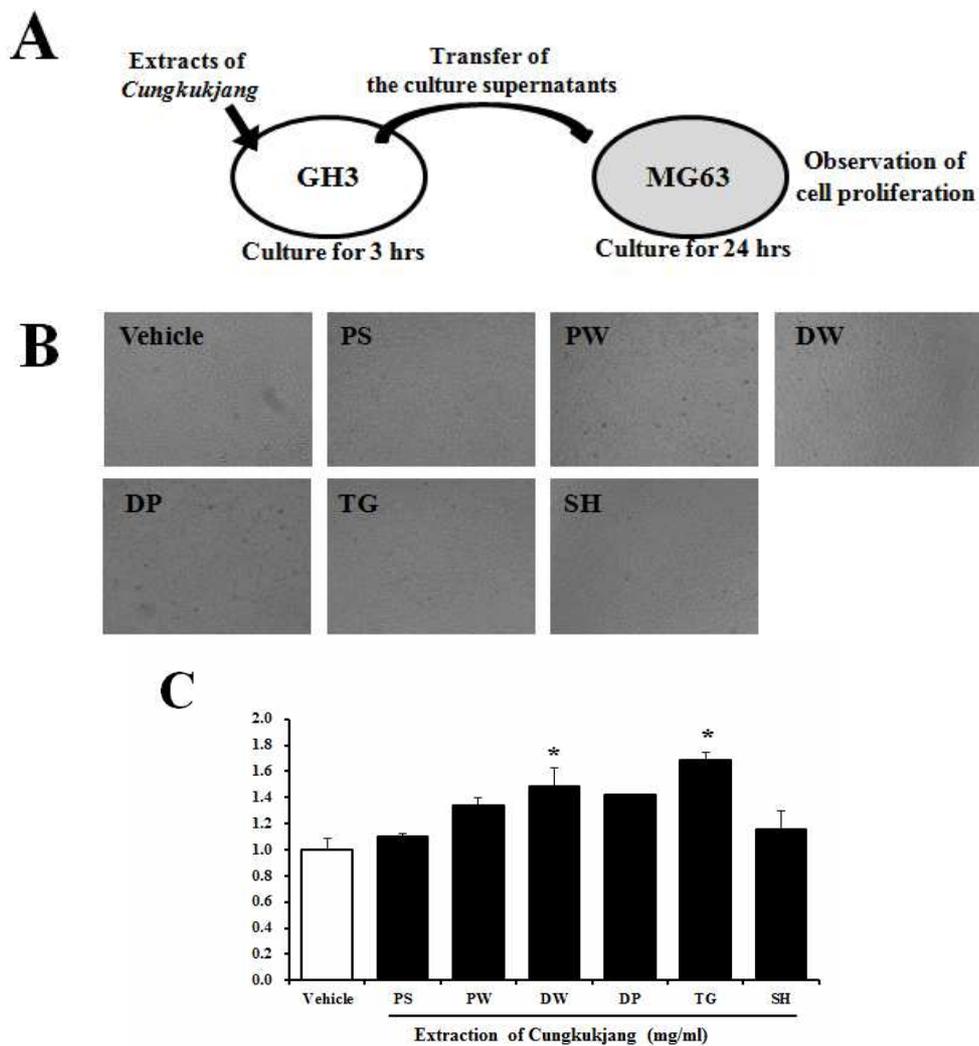


Figure 8. Microscope images and cell viability of MG63 cells treatment with various type of conditional medium which collected from GH3 cells stimulated with several type of *Chungkukjang*. Vehicle-treated cells were treated with dH₂O. Cellular morphology was viewed at 10x magnification(A). Activity of cell viability was measured via MTT assays (B). The values of data represented the means ± SD of three experiments. *P<0.05 is the significance level relative to the vehicle-treated group.

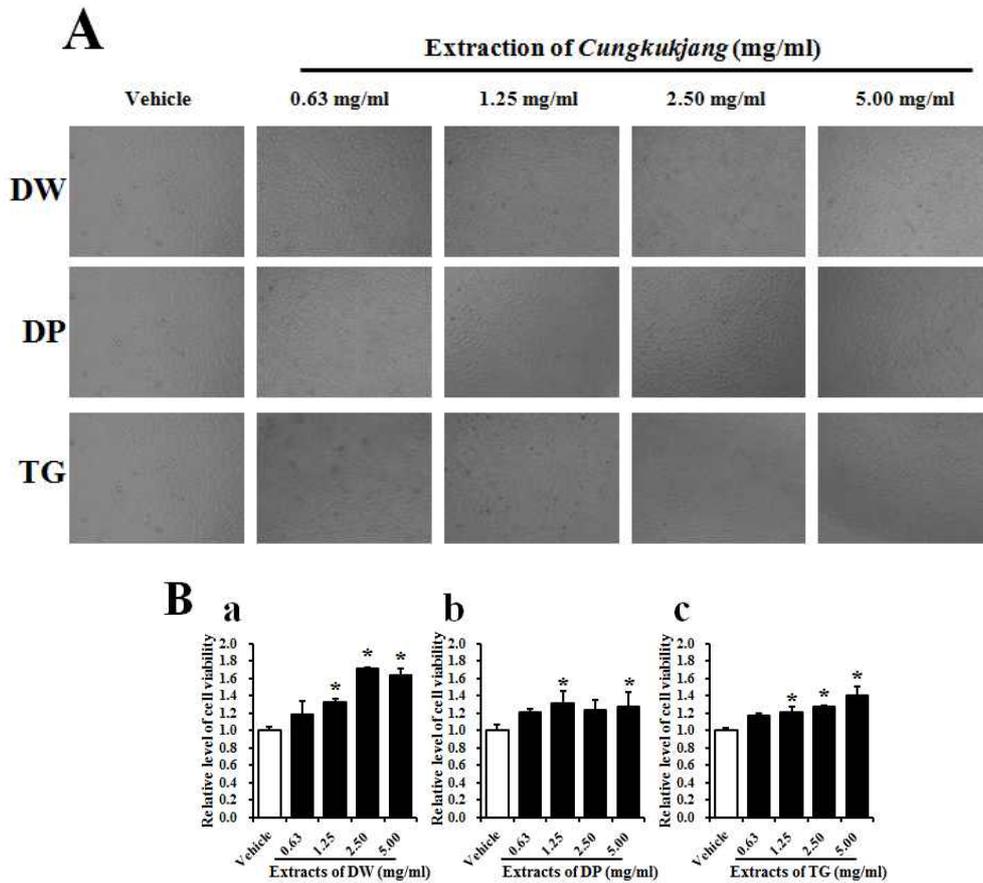


Figure 9. Microscope images and cell viability of MG63 cells treatment with various type of conditional medium which collected from GH3 cells stimulated with several type of *Chungkukjang*. Vehicle-treated cells were treated with dH₂O. Cellular morphology was viewed at 10x magnification (A). Activity of cell viability was measured via MTT assays (B). The values of data represented the means \pm SD of three experiments. *P<0.05 is the significance level relative to the vehicle-treated group.

(2) 청국장에 의해 분비된 성장호르몬이 간세포의 분화에 미치는 영향

청국장에 의해 생성된 성장호르몬의 효과가 골아세포에만 국한적인 반응인지를 알아보고자, 성장호르몬 수용체가 있는 또 다른 세포인, 간세포주를 이용하여 배양액-유도반응을 실시하였다. 간세포주인 HepG2에 성장호르몬이 포함된 조건적 배양액을 처리 한 후 분화와 성장을 관찰 하였다. 그 결과 이전 MG63세포주의 결과와 유사하게, 대원, 대풍, 태광의 조건적 배양액에서는 세포 생존율이 높았으나 풍원에서는 낮았다(Figure 10). 또한, 농도의존적 반응을 시험한 경우, 대원과 대풍의 조건적 배양액을 처리한 그룹은 농도 의존적으로 세포분화가 증가하였으나, 태광의 조건적 배양액을 처리한 그룹에서는 농도의존적인 경향을 나타내지 못하였다(Figure 11). 이러한 결과는 분비된 성장호르몬이 간세포주에 효율적으로 작용함을 제시하고 있다.

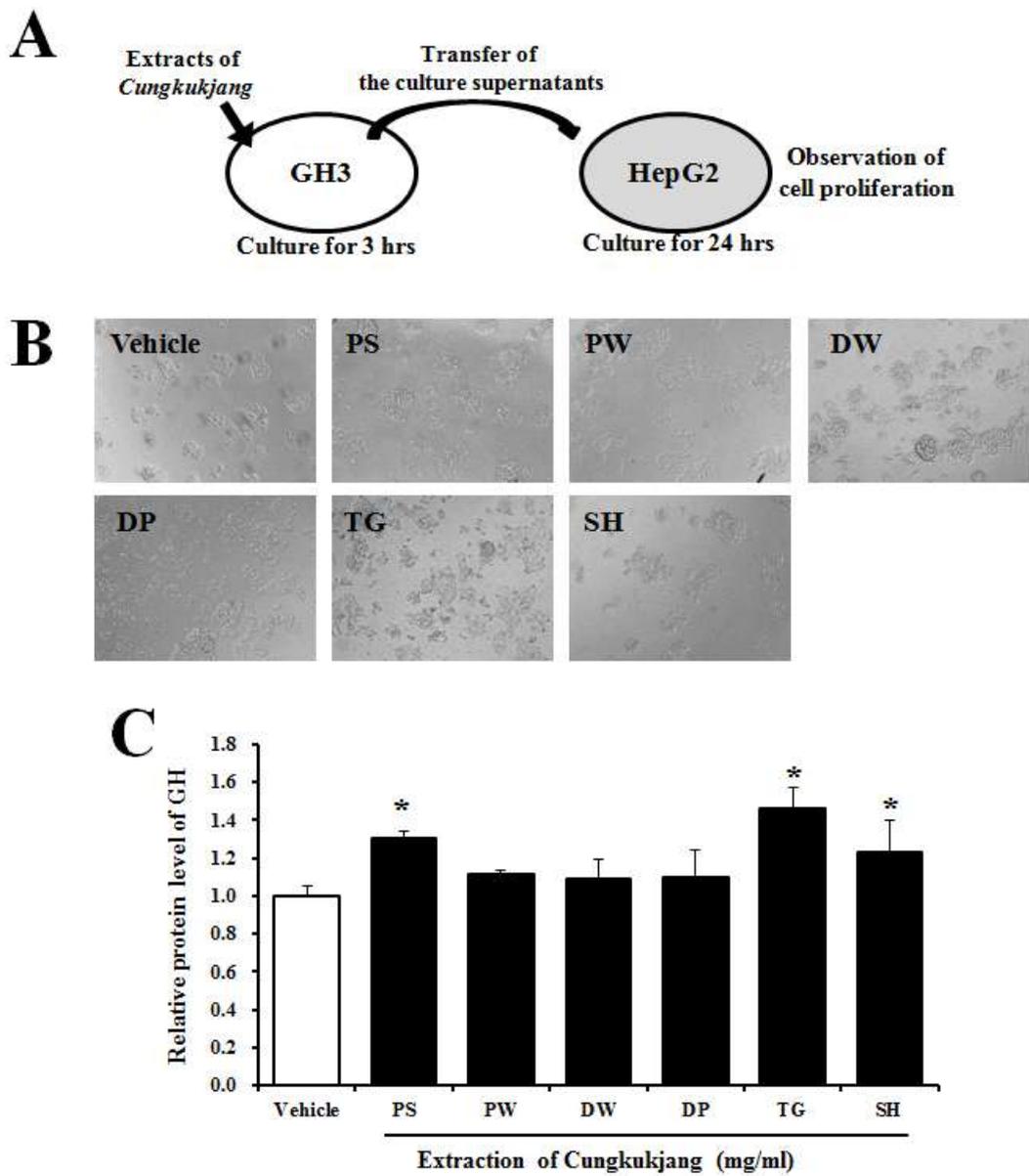


Figure 10. Microscope images and cell viability of HepG2 cells treatment with various type of conditional medium which collected from GH3 cells stimulated with several type of *Chungkukjang*. Vehicle-treated cells were treated with dH₂O. Cellular morphology was viewed at 10x magnification (A). Activity of cell viability was measured via MTT assays (B). The values of data represented the means \pm SD of three experiments. *P<0.05 is the significance level relative to the vehicle-treated group.

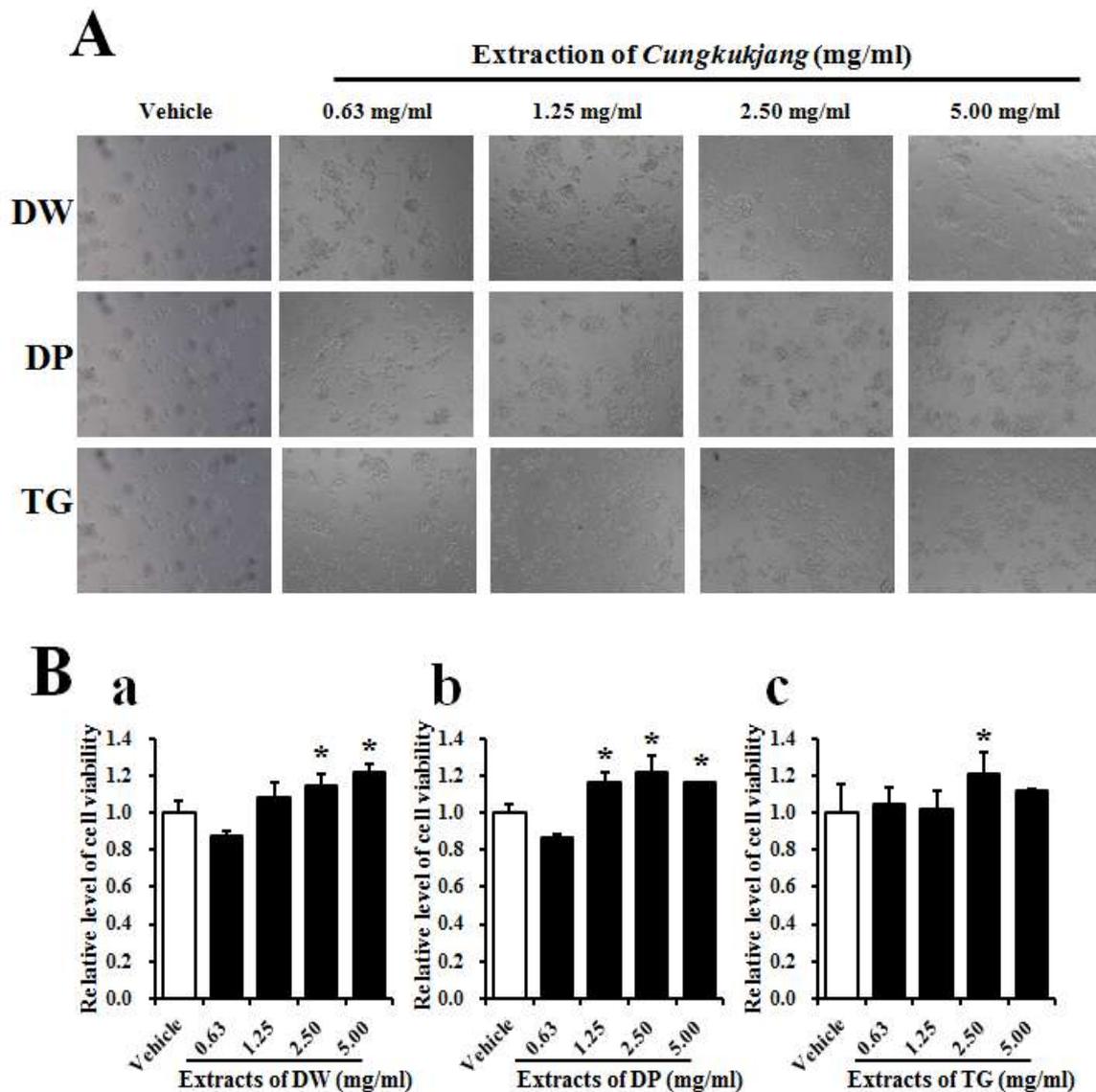


Figure 11. Microscope images and cell viability of HepG2 cells treatment with various type of conditional medium which collected from GH3 cells stimulated with several type of *Chungkukjang*. Vehicle-treated cells were treated with dH₂O. Cellular morphology was viewed at 10x magnification (A). Activity of cell viability was measured via MTT assays (B). The values of data represented the means \pm SD of three experiments. *P<0.05 is the significance level relative to the vehicle-treated group.

3. 학습력증진 *in vitro* 기능성 탐색

가. 세포분화평가

(1) 청국장의 품종이 신경모세포의 세포생존율과 NGF 분비에 미치는 영향

청국장의 6가지 품종(풍산, 풍원, 대원, 대풍, 태광, 신화)에 대하여 학습력 증진 효과를 평가하기 위하여, 신경성장인자(Nerve growth factor, NGF)를 평가 지표로 선정하였다. NGF는 cholinergic 뉴런의 가장 강력한 성장요인이며, 증식, 분화, 생존과 신경세포의 죽음에 영향을 미친다. NGF는 일부 cytokines 혹은 천연 추출물에 반응하는 다양한 세포형태에 의해서 생산되는데, NGF를 생산하는 세포는 neuron, inflammatory cell (lymphocytes 혹은 mast cell), structural cell (fibroblast, epithelial cell, smooth muscle cells) 등이 포함된다. 청국장의 콩품종이 신경모세포의 생존과 NGF의 분비에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 신경세포인 B35 세포주에 청국장을 2.5 mg/ml의 농도로 24시간 처리한 후, 세포 생존율과 NGF의 분비량을 측정하였다.

세포 생존율을 평가하기 위해서 MTT 분석을 실시하였으며, 그 결과 풍산은 대조군과 유사한 수준이었으며, 이를 제외한 나머지 모든 품종을 처리한 그룹에서는 세포생존율이 대조군에 비해 증가하였다. 특히, 대풍과 태광을 처리한 그룹에서 세포생존율의 유의적인 증가를 확인할 수 있었다(Figure 12A).

NGF 분비량은 Millipore의 NGF ELISA kit를 구입하여 권장법에 따라 측정하였다. 먼저 세포배양액을 ELISA kit의 각 well에 100 μ l의 배양액을 넣고, plate sealer로 plate를 덮고 밤새 동안 배양하였다. Plate를 wash buffer 250 μ l로 4번 세척하고, anti-mouse NGF monoclonal antibody 100 μ l를 첨가하고 실온에서 shaking 배양하였다. 2시간 후 wash buffer로 4번 세척해주고, peroxidase conjugated donkey anti-mouse IgG polyclonal antibody 100 μ l를 첨가하고 실온에서 shaking 배양하였다. 여기에 100 μ l의 substrate (TMB)을 첨가하여 실온에서 15분 동안 효소반응을 유도한 뒤, 100 μ l의 stop solution을 첨가하여 반응을 종결하였다. 반응종결에 따라 나타난 변화는 ELISA-reader (VERSA max, micro-reader, MDS Co., USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다. 그 결과, NGF 분비는 전반적으로 대조군과 비슷한 수준이었으나 특히 태광과 신화를 처리한 그룹에서 NGF 분비량이 가장 높은 것으로 확인되었다(Figure 12B).

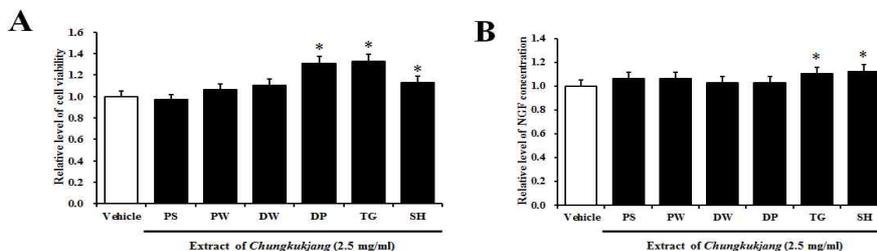


Figure 12. Effects of *Chungkukjang* manufactured by six different glycine max strain on toxicity and NGF secretion in B35 cells. Cells were cultured with one of the different extracts manufactured under different strain. Activity of cell viability was measured via MTT assays (A). The culture supernatants were collected from each of the cells. NGF concentration in the supernatant was measured using an anti-NGF ELISA kit (B). The

values of data represented the means±SD of three experiments. *P<0.05 is the significance level relative to the vehicle-treated group.

이러한 실험결과는 청국장 추출물이 신경세포의 세포독성을 유발하지 않고 생존율을 높여주며, NGF 분비를 촉진하는 것을 제시하고 있다. 따라서 6가지 품종의 청국장 추출물 중에서 세포생존과 NGF 분비에 효과적인 품종으로 태광과 신화를 선정하였다.

(2) 청국장의 농도가 신경모세포의 세포생존율과 NGF 분비에 미치는 영향

세포생존율과 NGF 분비능을 바탕으로 두 가지의 콩 품종(태광, 신화)으로 제조된 청국장이 농도 별(0, 0.63, 1.25, 2.5, 5 mg/ml)로 신경모세포의 세포생존율과 NGF 분비에 미치는 영향을 평가하기 위해서 MTT분석과 NGF ELISA 분석을 실시하였다.

그 결과, 태광을 처리한 그룹에서는 청국장 추출물의 농도가 증가함에 따라 세포생존율은 낮아지는 것으로 관찰되었으며, 5 mg/ml 이하의 농도를 처리한 모든 그룹들이 vehicle 그룹에 비하여 생존율이 높은 것으로 관찰되었다(Figure 13A). NGF 분비는 청국장 추출물의 농도가 증가함에 따라 높아지는 것으로 관찰되었으며, 특히 2.5 mg/ml의 농도에서 가장 많은 분비를 유도하였다(Figure 13B). 신화를 처리한 그룹에서는, 청국장 추출물의 농도에 따른 세포생존율은 전체적으로 vehicle 그룹에 비해 낮았으나, 2.5 mg/ml의 농도를 처리한 그룹에서 유의적으로 증가하였다(Figure 13C). 또한 NGF 분비는 청국장 추출물의 농도에 관계없이 일정한 분비를 나타내는 것으로 관찰되었으나, 그 중 1.25 mg/ml의 농도에서 가장 많은 분비를 유도하였다(Figure 13D). 따라서 이러한 실험결과는 2.50 mg/ml 이상의 농도로 청국장 추출물을 처리하였을 때는 세포독성을 유도하며, 1.25 mg/ml과 2.50 mg/ml 사이의 범위에서 NGF분비능이 우수함을 제시하고 있다. 이를 통해 두 가지 청국장 추출물의 최적농도는 2 mg/ml로 결정하였다.

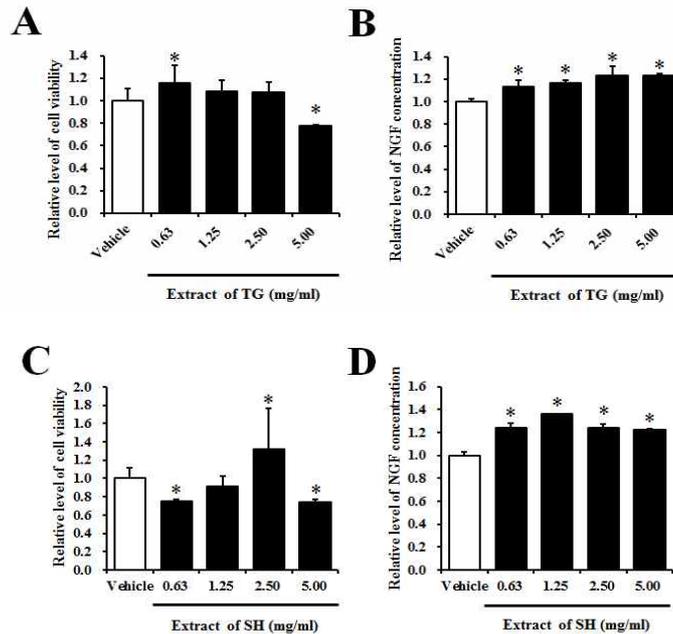


Figure 13. Effects of Chungkukjang manufactured by two different glycine max strain and different concentration toxicity and NGF secretion in B35 cells. Cells were cultured with one of the different extracts manufactured under different concentration. Activity of cell

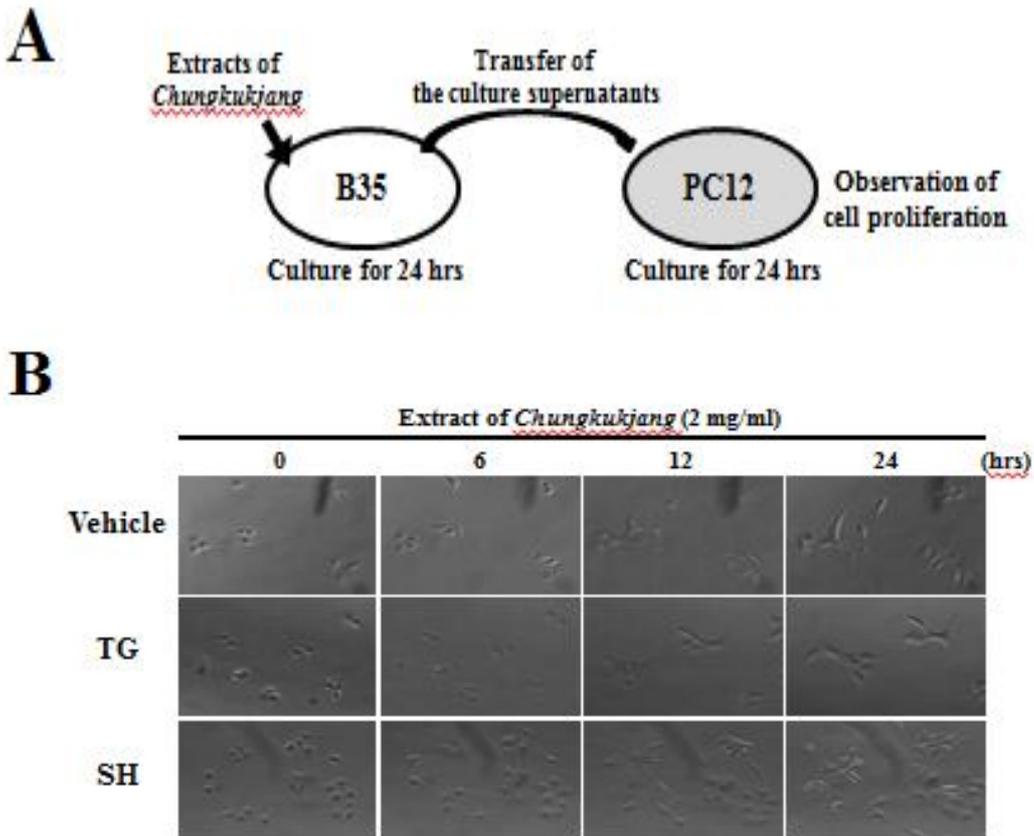
viability was measured via MTT assays (A and C). The culture supernatants were collected from each of the cells. NGF concentration in the supernatant was measured using an anti-NGF ELISA kit (B and D). The values of data represented the means±SD of three experiments. *P<0.05 is the significance level relative to the vehicle-treated group.

나. 신경전달물질 분석

(1) 청국장 추출물에 의해 분비된 NGF가 PC12세포의 분화에 미치는 영향

다음으로 B35 세포주에서 분비된 NGF가 실제로 세포의 분화를 촉진시키는지 확인하고자 PC12 세포주를 이용한 배양액-유도반응을 실시하였다. 이를 위해, 먼저 B35 세포주를 serum-free media로 밤새 배양 후에, 청국장을 태광과 신화 두 품종의 청국장 추출물을 2.00 mg/ml의 농도로 처리하여 24시간 배양한 뒤, NGF가 분비된 조건적 배양액(conditional medium)을 확보하였다. NGF가 분비된 배양액을 PC12 세포주에 처리하여 시간의 경과에 따른 세포주의 변화를 현미경을 이용하여 관찰하였다. PC12 세포주는 위상차 도립 현미경(Leica Microsystems, Switzerland)를 이용하여 세포상태를 관찰 하였다.

그 결과, 청국장 추출물을 처리한 B35 세포주에서 채취한 배양액을 첨가한 PC12 세포주는 대조군 배양액을 처리한 세포보다 약 2배정도 분화가 촉진되는 것으로 관찰되었다(Fig. 3). 따라서 청국장 추출물은 B35 cell의 NGF 발현을 촉진시키며, 분비된 NGF는 기능적으로 다른 세포의 분화를 촉진할 수 있는 기능을 가진다는 것을 제시하고 있다.



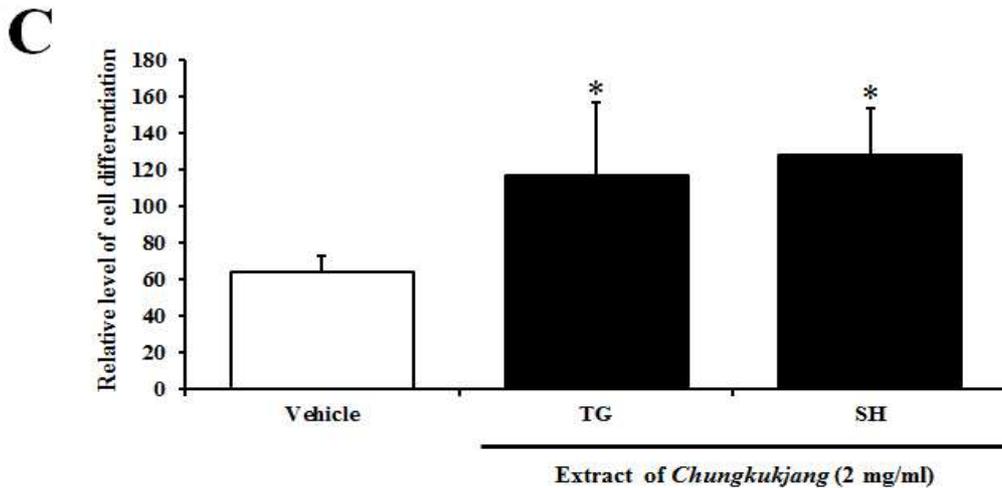


Figure 14. Microscope images of PC12 cells treatment with various type of conditional medium which collected from B35 cells stimulated with several type of *Chungkukjang* manufactured under different concentration. Vehicle-treated cells were treated with dH₂O. Cellular morphology was viewed at 10x magnification.

(2) 청국장추출물이 PC12 cell에서 high affinity receptor를 통한 신호전달에 미치는 영향

청국장으로 유도된 NGF가 PC12 세포주에서 정상적인 기능을 하는지 알아보기 위하여, NGF receptor 중에서 high affinity를 갖는 TrkA receptor와 그 신호전달과정을 평가하였다. high-affinity tyrosine kinase receptor인 TrkA receptor는 NGF의 target cell의 원형질막에서 발견되며, 각 수용체의 내재성 tyrosine kinase activity가 각 상대 수용체를 인산화하도록 한다. 인산화된 TrkA 수용체는 Ras 단백질과 ERK/p-ERK 등의 단계적인 반응을 유발하고, 다양한 단백질 kinase 활성의 결과를 가져온다. 이들 kinase의 일부는 CREB과 같은 전사 활성인자를 활성화시키기 위해 핵으로 이동시킨다. NGF 경로의 Ras-based component는 기본적으로 NGF-sensitive neuron의 분화를 유도하고 유지하는 역할을 한다. 또한 TrkA의 인산화는 세포 사멸을 억제하는 단백질 kinase (Akt kinase)의 활성을 유도하며, 교감신경과 감각 뉴런의 NGF-dependent 생존을 매개한다. 청국장 추출물이 TrkA와 TrkA downstream signaling pathway에 미치는 영향을 알아보기 위하여, western blot을 통해 분석하였다.

대조군과 청국장 배양액을 처리한 PC12 세포주는 PRO-PREP Protein Extraction Solution (iNtRON Biotechnology, Korea)을 첨가하여 분쇄한 후 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질의 농도는 SMARTTM BCA Protein Assay Kit (iNtRON Biotechnology)을 이용하여 정량하였으며, 30 ug의 단백질을 western blot에 사용하였다. 먼저, 10% SDS-PAGE gel에 단백질을 전기영동한 후 Enhanced Chemiluminescence (ECL) membrane (Amersham Life Science, Piscataway, NJ)에 전이하고, 5% skim milk에서 1시간 동안 블로킹하였다. 각 membrane은 anti-TrkA 항체(Cell Signaling Technology), anti-p-TrkA 항체(Cell Signaling Technology), anti-Akt 항체(Cell Signaling Technology), anti-p-Akt 항체(Cell Signaling Technology), anti-ERK 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-p-ERK 항체(Santa Cruz Biotechnology), anti-β-actin 항체 (Sigma-Aldrich)등의 1차 항체로 4°C에서 밤새 배양한 후 HRP-conjugated된 secondary 항체를 첨가하여 ECL Kit (Amersham Life Science, Piscataway, NJ)를 이용하여 발현을 확인하였다.

그 결과, 청국장 추출물의 품종에 따라 증감율의 차이는 있었으나, 청국장 추출물은 TrkA와 Akt의

인산화를 촉진시키고, Erk의 인산화를 억제시키는 것으로 확인하였다(Figure 15). 이러한 결과는 청국장은 NGF의 high affinity receptor를 통한 신호전달을 촉진함으로써 neuritic outgrowth를 촉진함을 제시하고 있다.

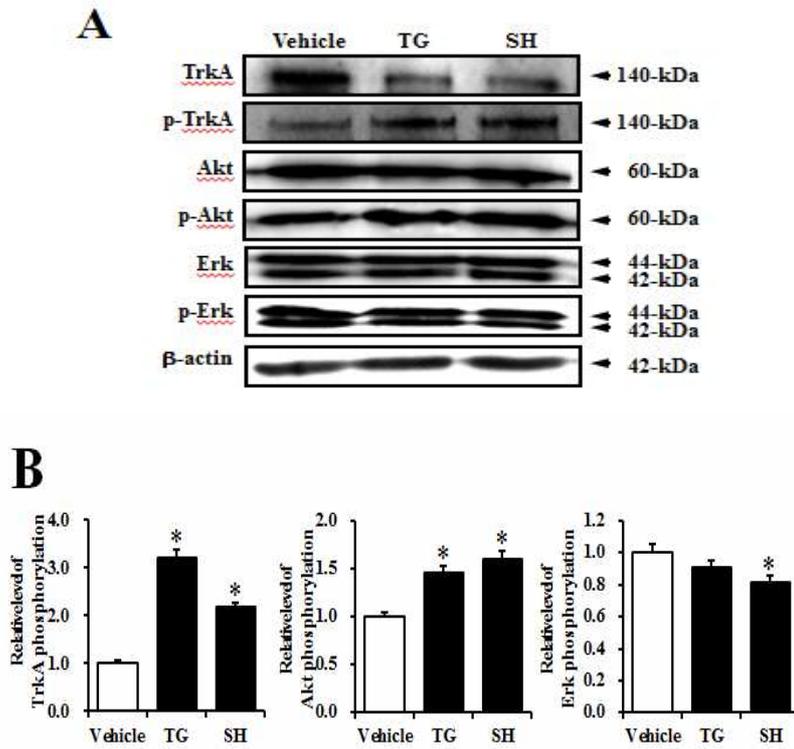


Figure 15. Effects of the *Chungkukjang* on down-stream signaling pathway of NGF receptor TrkA signaling pathway via Western blotting. Total cell lysates were prepared from PC12 cells treated with the conditional medium of vehicle, TG and SH. Fifty micrograms of protein per sample were immunoblotted with antibodies for each protein. Three samples were assayed in triplicate via Western blotting. The values are expressed as the means \pm SD. *P<0.05 is the significance level compared to the cells treated with vehicle conditional medium.

(3) 청국장추출물이 PC12 cell에서 low affinity receptor를 통한 신호전달에 미치는 영향

청국장으로 유도된 NGF가 PC12 세포주에서 정상적인 기능을 하는지 알아보기 위하여, NGF receptor 중에서 low affinity를 갖는 p75^{NTR} receptor와 그 신호전달과정을 평가하였다. Low affinity receptor인 p75^{NTR}는 G-protein receptor family에 속하며, 세포질 부위에 chopper domain과 death domain을 갖고 있어 신호전달을 수행한다. 청국장 추출물이 p75^{NTR}와 p75^{NTR} downstream signaling pathway에 미치는 영향을 알아보기 위하여, western blot을 통해 분석하였다.

대조군과 청국장 배양액을 처리한 PC12 세포주는 PRO-PREP Protein Extraction Solution을 첨가하여 분쇄한 후 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질의 농도는 SMARTTM BCA Protein Assay Kit을 이용하여 정량하였으며, 30 ug의 단백질을 western blot에 사용하였다. 먼저, 10% SDS-PAGE gel에 단백질을 전기영동한 후 ECL

membrane에 전이하고, 5% skim milk에서 1시간 동안 블로킹하였다. 각 membrane은 anti-p75^{NTR} 항체(Cell Signaling Technology), anti-RhoA 항체(Cell Signaling Technology), anti-β-actin 항체 (Sigma-Aldrich)등의 1차 항체로 4°C에서 밤새 배양한 후 HRP-conjugated 된 secondary 항체를 첨가하여 ECL Kit를 이용하여 발현을 확인하였다.

그 결과, p75^{NTR}의 경우 태광을 처리한 그룹에서는 발현이 감소하였으며, 신화를 처리한 그룹에서는 발현이 증가하는 것으로 관찰되었다. 그러나 RhoA 단백질의 발현은 2가지의 청국장 추출물을 처리한 그룹에서 모두 대조군에 비하여 유의적으로 감소하는 것으로 관찰되었다(Figure 16). 이러한 결과는 청국장 추출물이 NGF의 low affinity receptor를 통한 신호전달에서 특이적 반응을 유발하지 못함을 제시하고 있다.

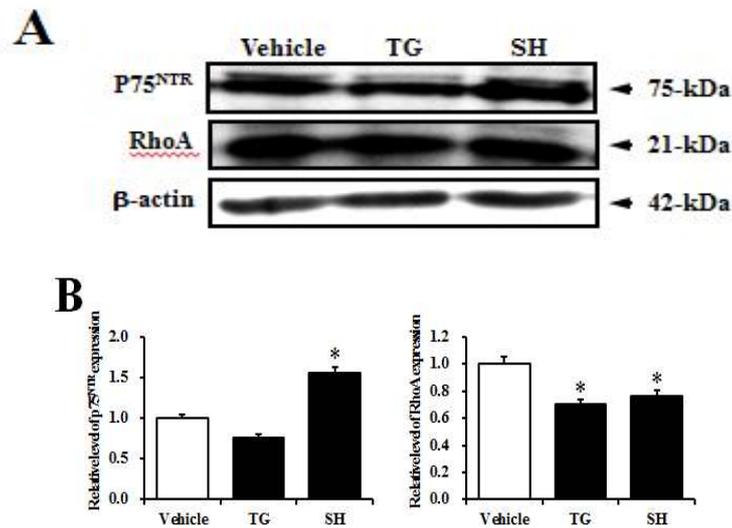


Figure 16. Effects of the *Chungkukjang* on the down-stream signaling pathway of the NGF receptor p75^{NTR} signaling pathway via Western blotting. Total cell lysates were prepared from PC12 cells treated with the conditional medium of vehicle, TG and SH. Fifty micrograms of protein per sample were immunoblotted with antibodies for each protein. Three samples were assayed in triplicate via Western blotting. The values are expressed as means±SD.*P<0.05 is the significance level compared to the cells treated with vehicle conditional medium.

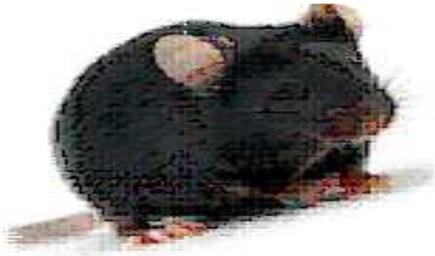
4. 실험동물(모델동물) 도입 및 구축

가. 신경질환모델동물

(1) 치매 증상을 나타내는 모델동물의 확보 (Tg2576 transgenic mice)

청국장 추출물이 치매에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 치매질환동물모델인 Tg2576 형질 전환(transgenic: Tg) 마우스를 사용하였다(Figure 17). 사용된 형질전환 마우스는 알츠하이머성 치매모델 중에서 가장 많이 사용되고 있는 모델이다.

A



B

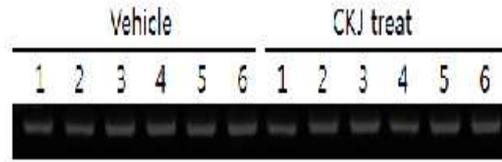


Figure 17. Tg2576 transgenic mice. (A) Phenotype of Tg2576 mice.
(B) The identification of the Tg mice

(2) 치매모델동물의 교배를 통한 대량생산

본 연구에 사용된 Tg2576 마우스를 대량으로 확보하기 위하여 치매모델동물 마우스를 B6SJLF1 마우스와 교배하여 대량생산하였다. 생산된 Tg 마우스는 유전자형을 분석하기 위하여, 마우스 꼬리에서 추출한 genomic DNA를 polymerase chain reaction (PCR) 분석을 통하여 수행하였다. 사용한 프라이머는 다음과 같다 ; Tg2576-specific primers, sense : 5'-CTG ACC ACT CGA CCA GGT TCT GGG T-3' and Tg2576-specific primers, antisense : 5'-GTG GAT AAC CCC TCC CCC AGC CTA GAC CA-3'. Tg2576에 특이적인 PCR 산물을 1.0 % agarose 겔에 전기영동하여 유전자형을 확인하였다. 그 결과 모든 마우스는 형질전환 동물임을 확인하였으며, 두 개의 그룹(n=12): vehicle 처리군과 청국장 처리군으로 나누어 실험에 사용하였다.

(3) 치매질환모델동물의 기초 생리자료 확보

Tg2576는 과발현된 APP(695) 유전자의 670번째 아미노산이 K에서 N으로 671번째 아미노산이 M에서 L로 변이되어 있다. 이 모델은 약 9-12 개월에 아밀로이드 반점이 hippocampus, presubiculum, subiculum, 소뇌, frontal cortex, temporal cortex 등에 생성되며, 인지능력에서의 결함을 나타내는 특징을 보인다.

나. 성장발육실험동물

(1) 성장발육실험동물의 기초 생리자료 확보

청국장 추출물이 성장발육에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 사용한 동물은 Sprague Dawley (SD) 랫드이다(Figure 18). SD 랫드는 safety and efficacy testing, reproductive studies, aging, nutrition, toxicology, pharmacology를 포함하여 biomedical research의 모든 분야에서 실질적으로 이용되고 있는 동물로서, 비교적 대형으로 발육이 우수하여, 오랫동안 전 세계에서 사용 실적이 있는 알비노 모델이다. 이는 Taconic에서 1970년에 NIH 동물 유전 자원 센터 (NIF Animal Genetic Resource)로부터 처음 도입한 동물로서 샘타코에서 구입하였다.



Figure 18. Phenotype of SD rat

5. 성장발육개선 *in vivo* 기능성 탐색

가. 청국장의 단기투여가 실험동물의 성장에 미치는 영향 분석

1차년도에서 우수한 효과를 나타내었던 청국장(풍원)의 단기간 투여가 실험동물의 성장이 미치는 영향을 평가하기 위하여 10일 동안 SD랫드에 50, 100 mg/kg의 청국장 분말을 투여하고 다양한 성장인자의 변화를 관찰하였다.

실험에 사용된 실험동물은 specified pathogen-free (SPF)상태의 SD 랫드(3주령, 100±5 g)로서 썬타코(Osan, Korea)에서 구매하여 사용하였다. 모든 랫드는 방사선 조사된 사료(Purina Com., Seongnam, Korea)를 자유급식 하도록 하였고, 12 시간의 조명주기(08:00~20:00)로 SPF 상태인 부산대학교 청정실험동물센터(온도 22±1°C, 상대습도 50±5%)에서 사육하였다. 또한 본 연구는 부산대학교 동물실험윤리위원회(PNU-IACAU)로부터 과학성과 윤리성에 대한 심사를 거쳐 승인(승인번호: PNU-2012-0006)을 받아 수행되었다. 먼저, 4주령의 랫드를 5마리씩 3군(Vehicle 처리군, L-CKJ 처리군, H-CKJ 처리군)으로 무작위로 배정하였다. Vehicle 처리군은 dH₂O만을, L-CJK 처리군은 청국장 추출물을 저농도인 50 mg/kg 농도로, H-CJK 처리군은 청국장 추출물을 고농도인 100 mg/kg 농도로 경구투여하였다. 10일 후, 랫드는 Zoletil[®] 1ml/kg을 투여하여 마취하여, 체중을 측정하고 조직을 적출하였다.

(1) 청국장 추출물이 대퇴골 길이와 무게에 미치는 영향

청국장 추출물이 대퇴골 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 랫드에 두 가지 농도의 청국장을 투여한 후 대퇴골 길이와 무게, 굵기를 측정하였다. 대퇴골은 네 다리를 가진 척추동물 다리의 근위부 뼈로 걷기와 뛰기를 가능케 하는 역할을 한다. 따라서 본 연구에서는 뼈 성장의 지표로서 대퇴골을 선정하였고, 어린 랫드의 성장과의 관계를 알아보고자 하였다. 그 결과, 대퇴골의 길이와 무게는 vehicle 처리군과 10일 동안 L-CKJ, H-CKJ를 처리한 군에서 유의성 있는 변화를 나타내지 않았다(Figure 19A).

(2) 청국장 추출물이 대퇴골의 성장판 두께에 미치는 영향

청국장 추출물이 대퇴골의 성장판에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 대퇴골 근위 골단의 성장판 두께를 측정하였다. 적출한 대퇴골 조직을 4 일간 탈회시킨 후 10% 포르말린에 2일 이상 고정하고, 파라핀 왁스에 포매한 후에, 4 µm 두께로 박절하였다. 박절한 대퇴골은 hematoxylin

& eosin (H&E, Sigma-Aldrich, MO, USA)으로 염색하고 광학 현미경으로 염색된 조직을 관찰하였다. 성장판과 성장판 내 연골세포의 형태학적 특징은 Leica Application Suite (Leica Microsystems, Switzerland)을 이용하여 측정하였다. 그 결과, 대퇴골 근위부에 위치한 성장판의 두께 변화를 관찰 할 수 있었다. 성장판의 두께는 vehicle 처리군에 비해 고농도의 청국장을 처리한 H-CKJ 처리군에서 두께가 유의적으로 증가하였다. 또한 성장판 내의 연골세포를 비교한 결과, proliferative zone과 hypertrophy zone의 연골 세포의 수는 H-CKJ 처리군에서 가장 높은 것으로 관찰되었다. 반면, L-CKJ 처리군의 골단 성장판의 두께는 vehicle 처리군에 비해 약간 증가하였다(Figure 19B). 이러한 결과는 청국장의 단기투여가 대퇴골의 무게와 길이에 직접적인 영향은 주지 않더라도 어린 랫드의 성장판을 촉진시키는 것을 제시하고 있다.

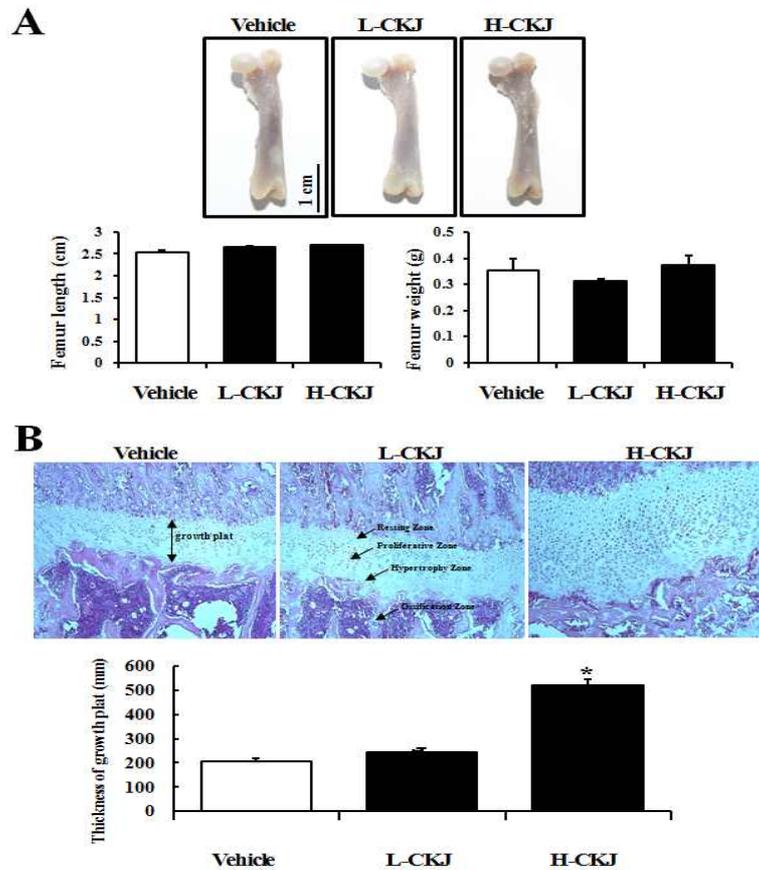


Figure 19. Morphological and histological alteration of femur bone growth in SD rats. (A) Femur length was measured from the fovea capitis to medial condyle after careful trimming. (B) Thickness of epiphyseal growth plate was measured on the femur section stained with H&E. Histological morphology was viewed at 20x magnification. Data are reported as the mean \pm SD of three replicates. * $p < 0.05$ is the significance level compared to the vehicle-treated group.

(3) 청국장 추출물이 성장호르몬의 분비에 미치는 영향

청국장 추출물의 단기투여가 성장호르몬의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 어린 SD 랫드에 청국장을 10일간 투여한 후 성장호르몬의 농도를 측정하였다. 랫드의 혈액 중 성장호르몬의 농도를 측정하기 위해서 랫드의 안와정맥총으로부터 heparinized capillary tube (Cat. No.

2501, Chase, USA)를 이용하여 안와채혈한 후 15,000 rpm으로 30분 간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 성장호르몬의 농도는 효소결합 면역흡착 분석법(ELISA)을 이용하여 제조사가 제공하는 프로토콜을 토대로 Rat Growth Hormone ELISA Kit(#KRC5311, Invitrogen, California, USA)로 측정하였다. 준비한 혈청과 standard는 항체가 코팅된 plate의 각 well에 첨가하여 500-600 rpm 정도로 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 각 well은 a PV100 automatic plate washer (Hofer, Holliston, MA, USA)로 6번 세척하고, horseradish peroxidase (HRP) conjugates를 첨가하여 실온에서 30분 동안 배양했다. 여기에 50 μ l의 stop solution을 첨가하여 반응을 종결하였으며, 반응종결에 따라 나타난 변화는 Vmax plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다. 그 결과, 혈청 내 성장호르몬의 농도는 vehicle 처리군에 비해 L-CKJ 처리군에서 유의적으로 증가하였다. 하지만, H-CKJ 처리군의 성장호르몬 농도는 vehicle 처리군에 비해 높았지만, L-CKJ 처리군에 비해 37% 낮게 관찰되었다(Figure 20A). 이러한 결과는 저농도의 청국장이 뇌하수체로부터 성장호르몬의 분비를 유도시키는 것을 제시하고 있다.

(4) 청국장추출물이 성장호르몬 수용체의 발현에 미치는 영향

청국장 추출물이 성장 호르몬 수용체의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여, 랫드의 간과 근육으로부터 성장호르몬 수용체 단백질의 발현량을 Western Blot 분석법으로 측정하였다. Vehicle과 청국장 처리군의 간과 근육조직에서 조직 100 mg은 PRO-PREP Protein Extraction Solution (iNtRON Biotechnology, Korea)을 첨가하여 균질화 시킨 후 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질의 농도는 SMARTTM BCA Protein Assay Kit (iNtRON Biotechnology)을 이용하여 정량하였으며, 50-100 ug의 단백질을 western blot에 사용하였다. 먼저, 10% SDS-PAGE gel에 단백질을 전기영동한 후 Enhanced Chemiluminescence (ECL) membrane (Amersham Life Science, Piscataway, NJ)에 전이하고, 5% skim milk에서 1시간 동안 블로킹하였다. 각 membrane은 anti-GH receptor (ab78426, Abcam, Cambridge, UK) and anti-actin (A5316, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)등의 1차 항체로 4°C에서 밤새 배양한 후 HRP-conjugated된 secondary 항체를 첨가하여 ECL Kit (Amersham Life Science, Piscataway, NJ)를 이용하여 발현을 확인하였다. 그 결과, 간 조직에서 성장호르몬 수용체는 vehicle 처리군에 비해 청국장 처리군에서 유의적으로 증가하였다. 특히 H-CKJ 처리군에서의 성장호르몬 수용체 단백질은 L-CKJ 처리군에 비해 높게 발현되었으며, 성장호르몬 수용체의 발현은 청국장에 농도의존적인 경향을 나타내었다. 하지만, 근육 조직에서는 아무런 변화가 없는 것으로 관찰되었다(Figure 20B). 이러한 결과는 청국장 추출물이 혈중 성장호르몬의 농도와 간 조직에서 성장호르몬 수용체의 발현을 촉진시킴을 제시하고 있다.

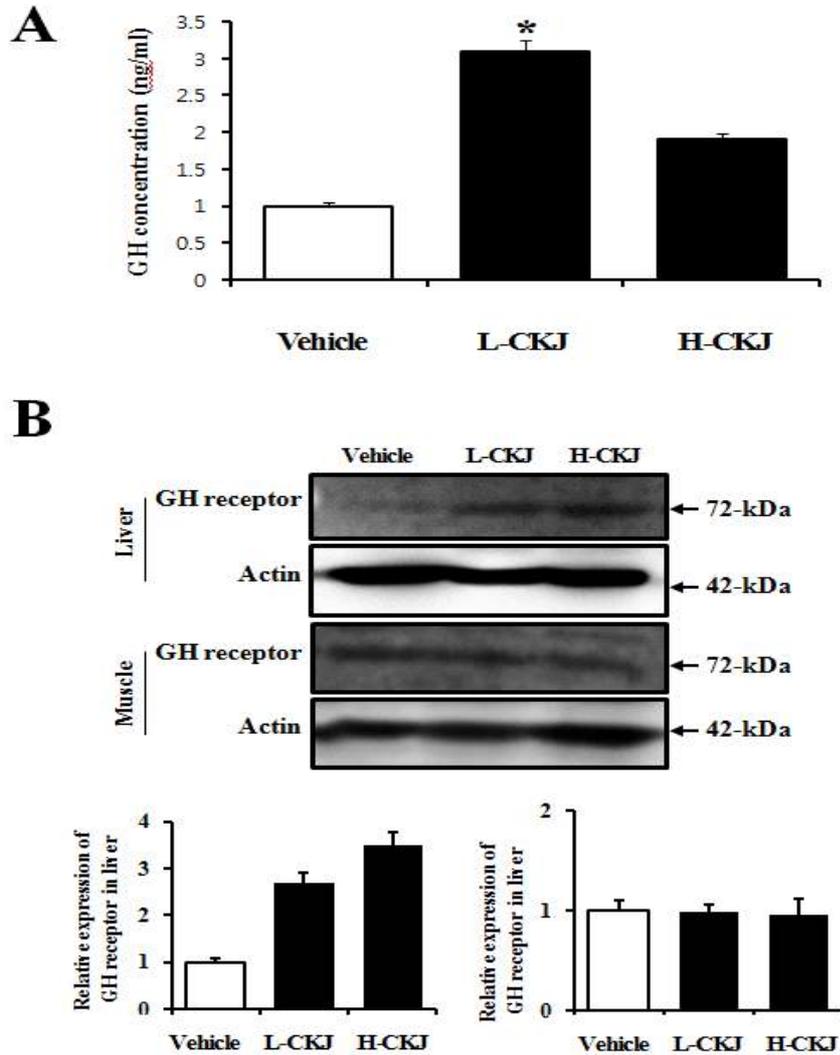
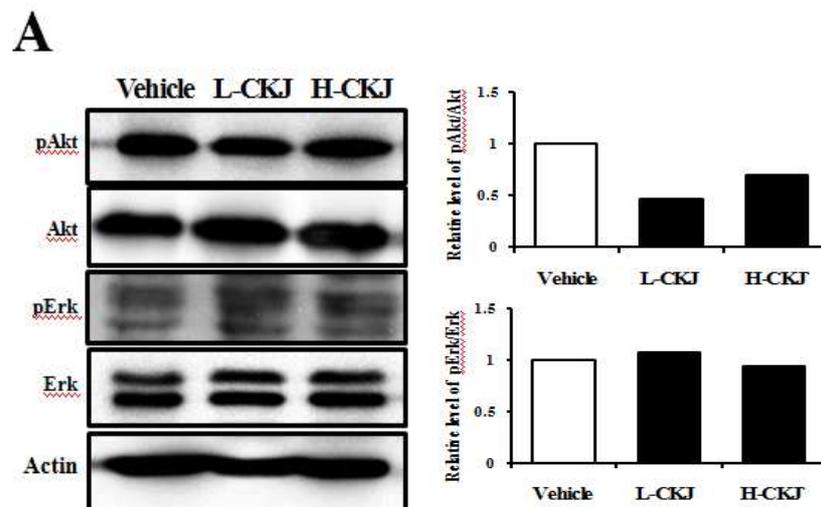


Figure 20. Alterations of GH concentration and GH receptor expression. (A) After final CKJ administration, blood sera were collected from each group of SD rats. GH concentration was detected using an ELISA kit with 0.5 ng/ml of sensitivity. (B) GH receptor level was analyzed in two target organs, the liver and muscle, as described in Materials and Methods. Data are reported as the mean \pm SD of three replicates. * $p < 0.05$ is the significance level compared to the vehicle-treated group.

(5) 청국장 추출물이 성장호르몬 수용체의 신호전달에 미치는 영향

청국장 추출물이 성장 호르몬 수용체의 신호전달에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여, 랫드의 간과 근육으로부터 성장호르몬 수용체의 down stream signaling을 Western Blot 분석법으로 측정하였다. Vehicle과 청국장 처리군의 간과 근육조직에서 조직 100 mg은 PRO-PREP Protein Extraction Solution (iNtRON Biotechnology, Korea)을 첨가하여 균질화시킨 후 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질의 농도는 SMARTTM BCA Protein Assay Kit (iNtRON Biotechnology)을 이용하여 정량하였으며, 50-100 ug의 단백질을 western blot에 사용하였다. 먼저, 10% SDS-PAGE gel에 단백질을 전기영동한 후 Enhanced Chemiluminescence (ECL) membrane (Amersham Life Science,

Piscataway, NJ)에 전이하고, 5% skim milk에서 1시간 동안 블로킹하였다. 각 membrane은 anti-Akt (#9272, Cell signaling, Denvers, MA, USA), anti-pAkt (#4058, Cell signaling), anti-Erk (sc-94, Santa cruz, California, USA), anti-pErk (sc-7383, Santa cruz), and anti-actin (A5316, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)등의 1차 항체로 4°C에서 밤새 배양한 후 HRP-conjugated된 secondary 항체를 첨가하여 ECL Kit (Amersham Life Science, Piscataway, NJ)를 이용하여 발현을 확인하였다. 성장호르몬 수용체의 신호전달과정을 알아보기 위해서 성장호르몬의 민감도에 영향을 주는 주요 인자로서 Akt와 Erk를 선정하였다. 그 결과, 간 조직에서는 vehicle 처리군에 비해 L-CKJ와 H-CKJ 처리군 모두에서 Akt의 인산화 정도가 감소하였다(Figure 21A). 한편 근육 조직에서는 vehicle 처리군에 비해 H-CKJ 처리군에서는 Akt 인산화 정도의 변화가 없었으나, L-CKJ 처리군에서는 약간 감소하였다. 반면 Erk의 인산화 경향은 Akt와 다르게 관찰되었다(Figure 21B). 간 조직에서는 Erk의 인산화는 L-CKJ 처리군에서만 약간 증가하였지만, H-CKJ 처리군에서는 아무런 변화가 없었다(Figure 21A). 근육 조직에서는 Erk의 인산화는 청국장의 농도에 의존적으로 변화하였다(Figure 21B). 이러한 결과는 청국장은 간과 근육 조직에서의 성장호르몬 수용체의 신호전달과정을 조절하는 것을 제시한다.



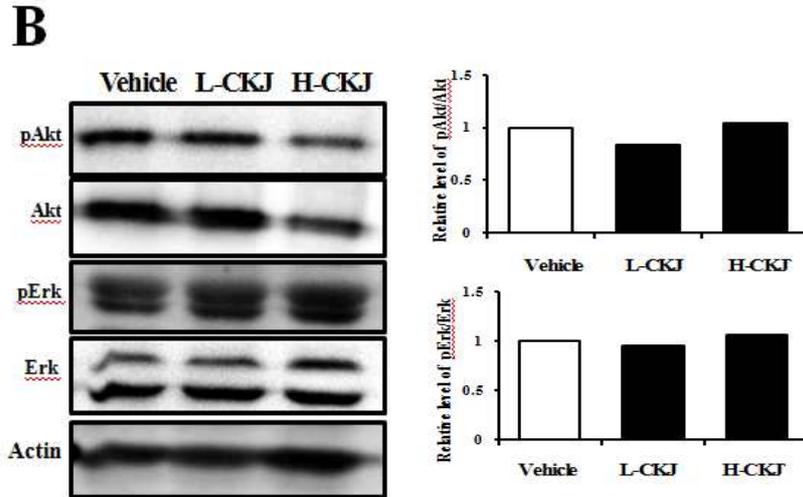


Figure 21. Effects of CKJ administration on GH receptor down-stream pathway proteins in liver (A) and muscle (B) using Western blot. Total cell lysates were prepared from tissues of vehicle-, L-CKJ-, and H-CKJ-treated groups, as described in Materials and Methods. Fifty micrograms of protein per sample was immunoblotted using specific antibodies for each protein. Data are reported as the mean \pm SD of three replicates. * $p < 0.05$ is the significance level compared to the vehicle-treated group.

나. 청국장의 장기투여가 실험동물의 성장에 미치는 영향 분석

(1) 동물실험설계

장기간의 청국장 투여가 실험동물의 성장이 미치는 영향을 평가하기 위하여 6주 동안 SD 랫드에 50, 100, 200 mg/kg의 청국장 분말을 투여하고 다양한 성장인자의 변화를 관찰하였다.

실험에 사용된 실험동물은 specified pathogen-free (SPF)상태의 SD 랫드(3주령, 100 \pm 5 g)로서 샘타코(Osan, Korea)에서 구매하여 사용하였다. 모든 랫드는 방사선 조사된 사료(Purina Com., Seongnam, Korea)를 자유급식 하도록 하였고, 12 시간의 조명주기(08:00~20:00)로 SPF 상태인 부산대학교 청정실험동물센터(온도 22 \pm 1 $^{\circ}$ C, 상대습도 50 \pm 5%)에서 사육하였다. 또한 본 연구는 부산대학교 동물실험윤리위원회(PNU-IACAU)로부터 과학성과 윤리성에 대한 심사를 거쳐 승인(승인번호: PNU-2012-0006)을 받아 수행되었다. 먼저, 4주령의 랫드를 5마리씩 3군(Vehicle 처리군, L-CKJ 처리군, M-CKJ 처리군, H-CKJ 처리군)으로 무작위로 배정하였다. Vehicle 처리군은 dH₂O만을, L-, M-, H-CJK 처리군은 각각 청국장 추출물을 50, 100, 200 mg/kg 농도로 6주 간 경구투여하였다. 6주 후, 랫드는 Zoletil[®] 1ml/kg을 투여하여 마취하여, 체중을 측정하고 조직을 적출하였다.

(2) 청국장 추출물이 체중 및 장기무게에 미치는 영향

실험동물에서 체중과 장기의 변화는 동물의 독성을 나타내는 지표로 사용된다. 청국장 추출물의 장기투여가 체중 및 장기무게에 미치는 영향을 평가하기 위하여 랫드의 체중, 간, 신장, 비장, 심장, 뇌의 무게를 측정하였다. 6주 동안 체중의 변화를 관찰한 결과, 각 투여군 간의 유의적인 차이는 없었다(Figure 22A). 또한 체신장은 vehicle 처리군에 비해 각 청국장 처리군에

서 유의적인 변화가 없었으며, 간, 신장, 비장, 심장, 뇌 조직의 무게의 변화 또한 관찰 되지 않았다(Figure 22B-G). 이러한 결과는 청국장의 투여는 체중, 체신장 및 각 장기의 무게 변화에 아무런 영향을 주지 않으므로 청국장은 독성이 없음을 제시하고 있다.

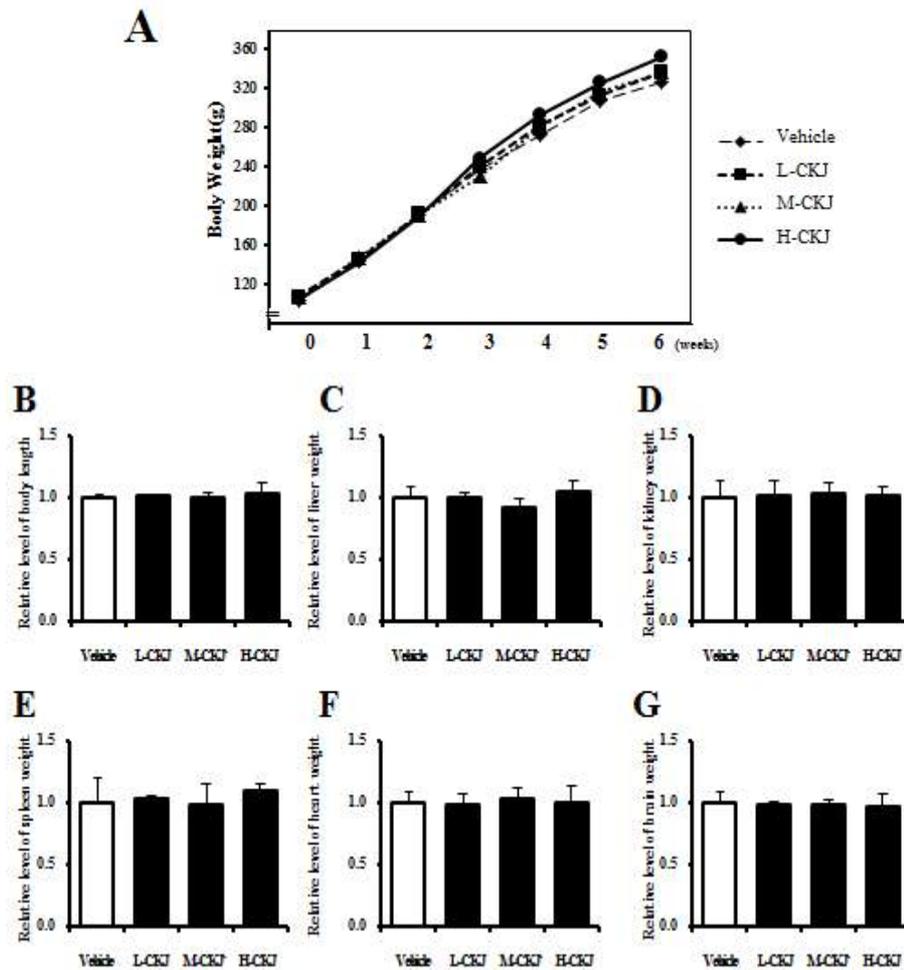


Figure 22. Effects of CKJ on body weight of SD rats. (A) After administration of three concentrations of CKJ to SD rats, body weight was measured using an electronic balance everyday. After final administration, each organ was collected from SD rats and organ weights measured using an electric balance as described in Materials and Methods (B-G). Data are reported as the mean \pm SD of three replicates. * $p < 0.05$ is the significance level compared to the vehicle-treated group.

(3) 청국장 추출물이 대퇴골의 성장판과 피질골에 미치는 영향

청국장 추출물이 대퇴골 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 랫드에 세 가지 농도의 청국장을 투여한 후 대퇴골 길이와 무게, 근위 골단의 성장판 두께, 피질골의 두께를 측정하였다. 그 결과, 대퇴골의 길이와 무게는 vehicle 처리군과 6주 동안 L-, M-, H-CKJ를 처리한 군에서 변화를 나타내지 않았으나(Figure 23A) 성장판과 피질골의 두께에서는 유의적으로 변화하였다.

대퇴골 근위 골단의 성장판과 피질골의 두께를 측정하기 위해서, 적출한 대퇴골 조직을 4 일

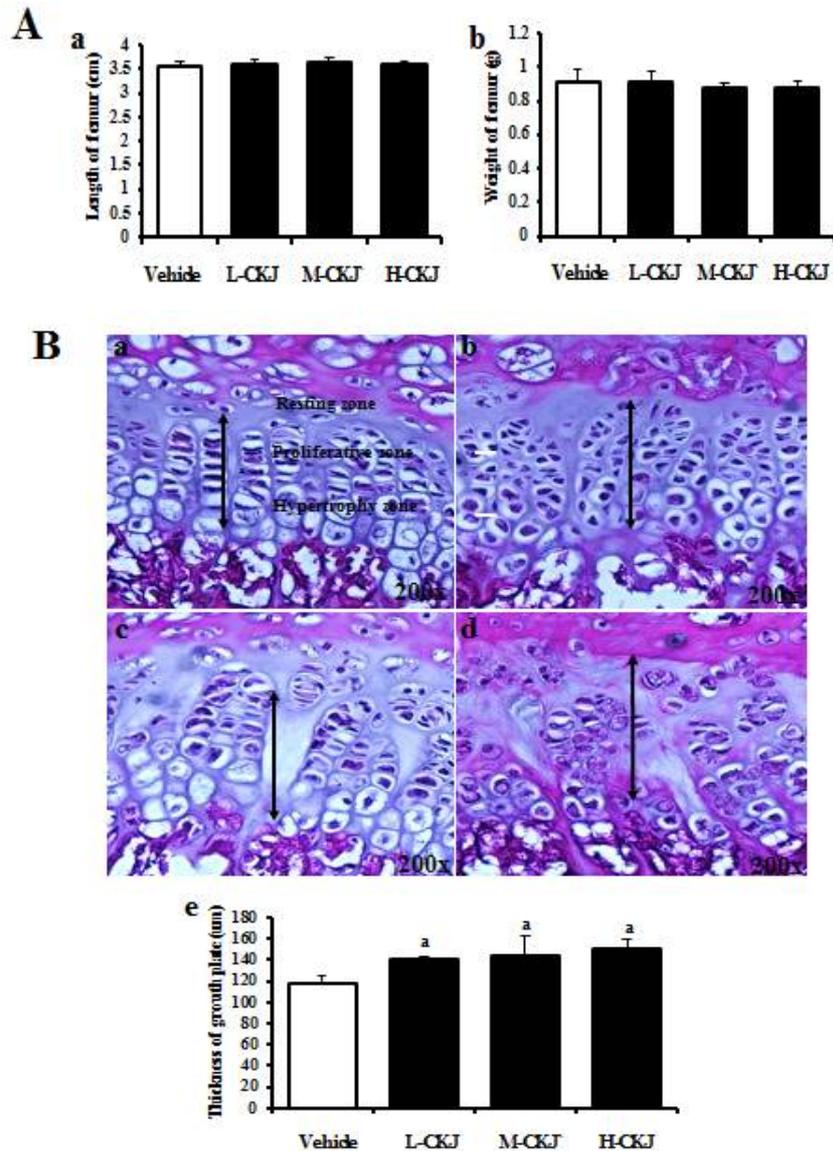


Figure 23. Morphological and histological alteration of femur bone growth in SD rats. (A) Femur length was measured from the fovea capitis to medial condyle after careful trimming. (B) Thickness of epiphyseal growth plate was measured on the femur section stained with H&E. Histological morphology was viewed at 200x magnification. Data are reported as the mean \pm SD of three replicates. * $p < 0.05$ is the significance level compared to the vehicle-treated group.

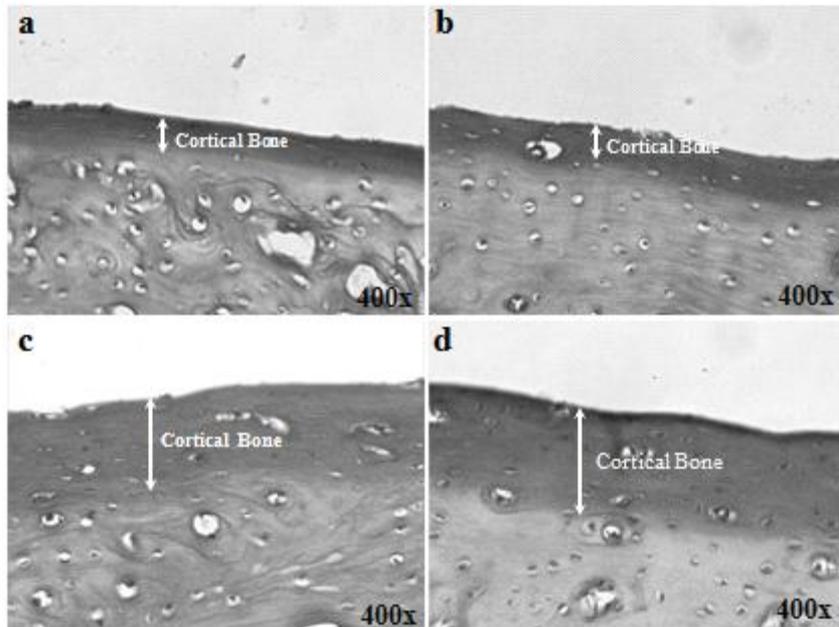
간 탈회시킨 후 10% 포르말린에 2일 이상 고정하고, 파라핀 왁스에 포매한 후에, 4 μm 두께로 박절하였다. 박절한 대퇴골은 hematoxylin & eosin (H&E, Sigma-Aldrich, MO, USA)으로 염색하고 광학 현미경으로 염색된 조직을 관찰하였다. 성장판과 성장판 내 연골세포의 형태학적 특징은 Leica Application Suite (Leica Microsystems, Switzerland)을 이용하여 측정하였다. 그 결과, 대퇴골 근위부에 위치한 성장판의 두께 변화를 관찰 할 수 있었다. 성장판의 두께는 vehicle 처리군에 비해 청국장을 처리한 모든 그룹에서 성장판의 두께가 유의적으로 증가하였다(Figure 23B). 또한, 피질골의 두께는 vehicle 처리군에 비해 청국장을 처리한 모든 그룹에서 증가하였으며, 이는 농도에 의존적으로 증가하는 것으로 관찰되었다(Figure 24). 이러한 결과는

청국장의 장기투여가 단기투여와 마찬가지로 대퇴골의 무게와 길이에 직접적인 영향은 주지 않더라도 랫드의 성장판과 피질골의 성장을 촉진시키는 것을 제시하고 있다.

(4) 청국장 추출물이 성장호르몬의 분비에 미치는 영향

청국장 추출물의 장기투여가 성장호르몬의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여, SD 랫드에 청국장을 6주 간 투여한 후 성장호르몬의 농도를 측정하였다. 랫드의 혈액 중 성장호르몬의 농도를 측정하기 위해서 랫드의 안와정맥총으로부터 heparinized capillary tube (Cat. No. 2501, Chase, USA)를 이용하여 안와채혈한 후 15,000 rpm으로 30분 간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 성장호르몬의 농도는 효소결합 면역흡착 분석법(ELISA)을 이용하여 제조사가 제공하는 프로토콜을 토대로 Rat Growth Hormone ELISA Kit(#KRC5311, Invitrogen, California, USA)로 측정하였다. 준비한 혈청과 standard는 항체가 코팅된 plate의 각 well에 첨가하여 500-600 rpm 정도로 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 각 well은 a PV100 automatic plate washer (Hofer, Holliston, MA, USA)로 6번 세척하고, horseradish peroxidase (HRP) conjugates를 첨가하여 실온에서 30분 동안 배양했다. 여기에 50 μ l의 stop solution을 첨가하여 반응을 종결하였으며, 반응종결에 따라 나타난 변화는 Vmax plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다. 그 결과, 혈청 내 성장호르몬의 농도는 vehicle 처리군에 비해 저농도인 L-CKJ 처리군에서는 변화가 없었으나, M-, H-CKJ 처리군에서는 유의적으로 증가하였으며, 청국장의 농도에 의존적으로 증가하는 양상을 나타내었다(Figure 24A). 이러한 결과는 고농도의 청국장은 뇌하수체로부터 성장호르몬의 분비를 촉진시키는 것을 제시하고 있다.

A



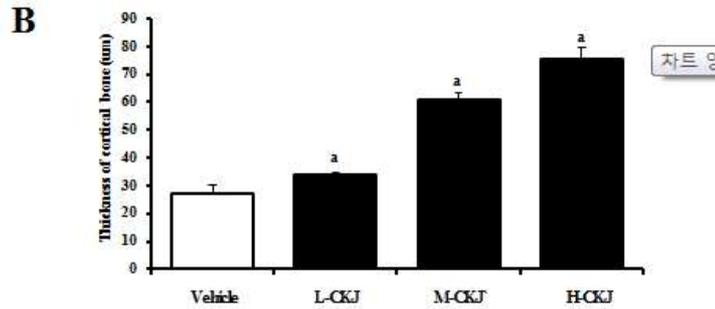


Figure 24. Morphological and histological alteration of cortical bone growth in SD rats. Thickness of epiphyseal growth plate was measured on the femur section stained with H&E. Histological morphology was viewed at 400x magnification. Data are reported as the mean \pm SD of three replicates. * $p < 0.05$ is the significance level compared to the vehicle-treated group.

(5) 청국장 추출물이 성장호르몬 수용체의 발현에 미치는 영향

청국장 추출물의 장기투여가 성장 호르몬 수용체의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여, 랫드의 간과 근육으로부터 성장호르몬 수용체 단백질의 발현량을 Western Blot 분석법으로 측정하였다. Vehicle과 CKJ 처리군의 간과 근육조직에서 조직 100 mg은 PRO-PREP Protein Extraction Solution (iNtRON Biotechnology, Korea)을 첨가하여 균질화 시킨 후 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질의 농도는 SMARTTM BCA Protein Assay Kit (iNtRON Biotechnology)을 이용하여 정량하였으며, 50-100 ug의 단백질을 western blot에 사용하였다. 먼저, 10% SDS-PAGE gel에 단백질을 전기영동한 후 Enhanced Chemiluminescence (ECL) membrane (Amersham Life Science, Piscataway, NJ)에 전이하고, 5% skim milk에서 1시간 동안 블로킹하였다. 각 membrane은 anti-GH receptor (ab78426, Abcam, Cambridge, UK) 그리고 anti-actin (A5316, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)등의 1차 항체로 4°C에서 밤새 배양한 후 HRP-conjugated된 secondary 항체를 첨가하여 ECL Kit (Amersham Life Science, Piscataway, NJ)를 이용하여 발현을 확인하였다. 그 결과, 간 조직에서 성장호르몬 수용체의 발현은 vehicle 처리군에 비해 L-, M-CKJ 처리군에서 유의적으로 감소하였지만, H-CKJ 처리군에서는 변화가 없었다. 근육조직에서의 성장호르몬 수용체는 vehicle 처리군에 비해 M-, H-CKJ 처리군에서 유의적으로 증가하였으나, L-CKJ 처리군에서는 아무런 변화도 없었다 (Figure 24B). 이러한 결과는 간 조직에서 성장호르몬 수용체는 vehicle 처리군에 비해 전체적으로 낮게 발현되지만, 성장호르몬 수용체의 발현은 간과 근육조직에서 청국장의 농도에 의존적으로 증가하는 것을 제시한다.

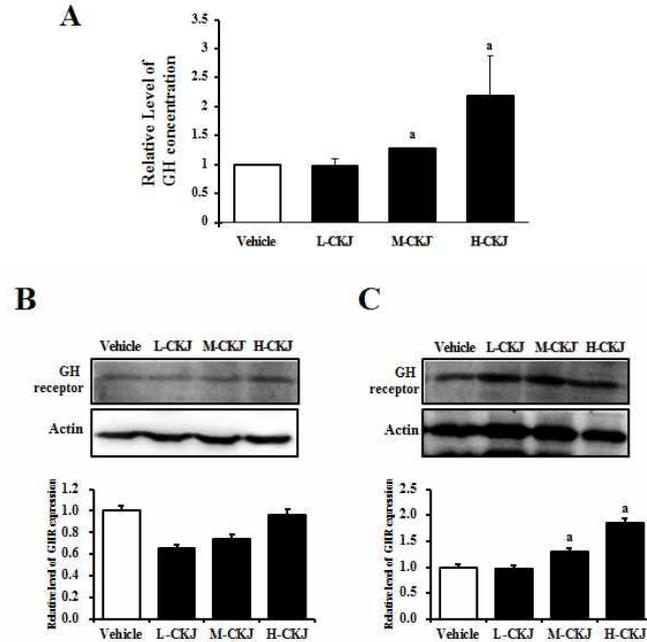


Figure 24. Alterations of GH concentration and GH receptor expression. (A) After final CKJ administration, blood sera were collected from each group of SD rats. GH concentration was detected using an ELISA kit with 0.5 ng/ml of sensitivity. (B) GH receptor level was analyzed in two target organs, the liver and muscle, as described in Materials and Methods. Data are reported as the mean \pm SD of three replicates. * $p < 0.05$ is the significance level compared to the vehicle-treated group.

(6) 성장호르몬 수용체의 신호전달에 미치는 영향

청국장 추출물의 장기투여가 성장 호르몬 수용체의 신호전달에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여, 랫드의 간과 근육으로부터 성장호르몬 수용체의 down stream signaling을 Western Blot 분석법으로 측정하였다. Vehicle과 CKJ 처리군의 간과 근육조직에서 조직 100 mg은 PRO-PREP Protein Extraction Solution (iNtRON Biotechnology, Korea)을 첨가하여 균질화 시킨 후 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질의 농도는 SMARTTM BCA Protein Assay Kit (iNtRON Biotechnology)을 이용하여 정량하였으며, 50-100 ug의 단백질을 western blot에 사용하였다. 먼저, 10% SDS-PAGE gel에 단백질을 전기영동한 후 Enhanced Chemiluminescence (ECL) membrane (Amersham Life Science, Piscataway, NJ)에 전이하고, 5% skim milk에서 1시간 동안 블로킹하였다. 각 membrane은 anti-Akt (#9272, Cell signaling, Denver, MA, USA), anti-pAkt (#4058, Cell signaling), anti-Erk (sc-94, Santa cruz, California, USA), anti-pErk (sc-7383, Santa cruz) 그리고 anti-actin (A5316, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)등의 1차 항체로 4°C에서 밤새 배양한 후 HRP-conjugated된 secondary 항체를 첨가하여 ECL Kit (Amersham Life Science, Piscataway, NJ)를 이용하여 발현을 확인하였다. 성장호르몬 수용체의 신호전달과정을 알아보기 위해서 성장호르몬의 민감도에 영향을 주는 주요 인자로서 Akt와 Erk를 선정하였다. 그 결과, 간 조직에서는 vehicle 처리군에 비해 청국장을 처리한 모든 군에서 Akt와 Erk의 인산화가 감소되었다(Figure 25A). 한편 근육 조직에서는 vehicle 처리군에 비해 모든 농도의 청국장 처리군에서 Akt 인산화가 증가하였으나, M-CKJ 처리군에서 가장 높은 발현을 보였다. 근육 조

직에서 Erk의 인산화 경향은 청국장의 농도에 따라 감소하는 경향을 보였다. Erk 인산화는 L-CKJ 처리군에서는 vehicle 처리군에 비해 약간 높게 발현되었으나, M-, H-CKJ 처리군에서는 감소하는 경향을 보였다(Figure 25B). 이러한 결과는 청국장은 간과 근육 조직에서 Akt 또는 Erk의 인산화를 촉진함으로써 성장호르몬 수용체의 신호전달과정을 조절하는 것을 제시한다.

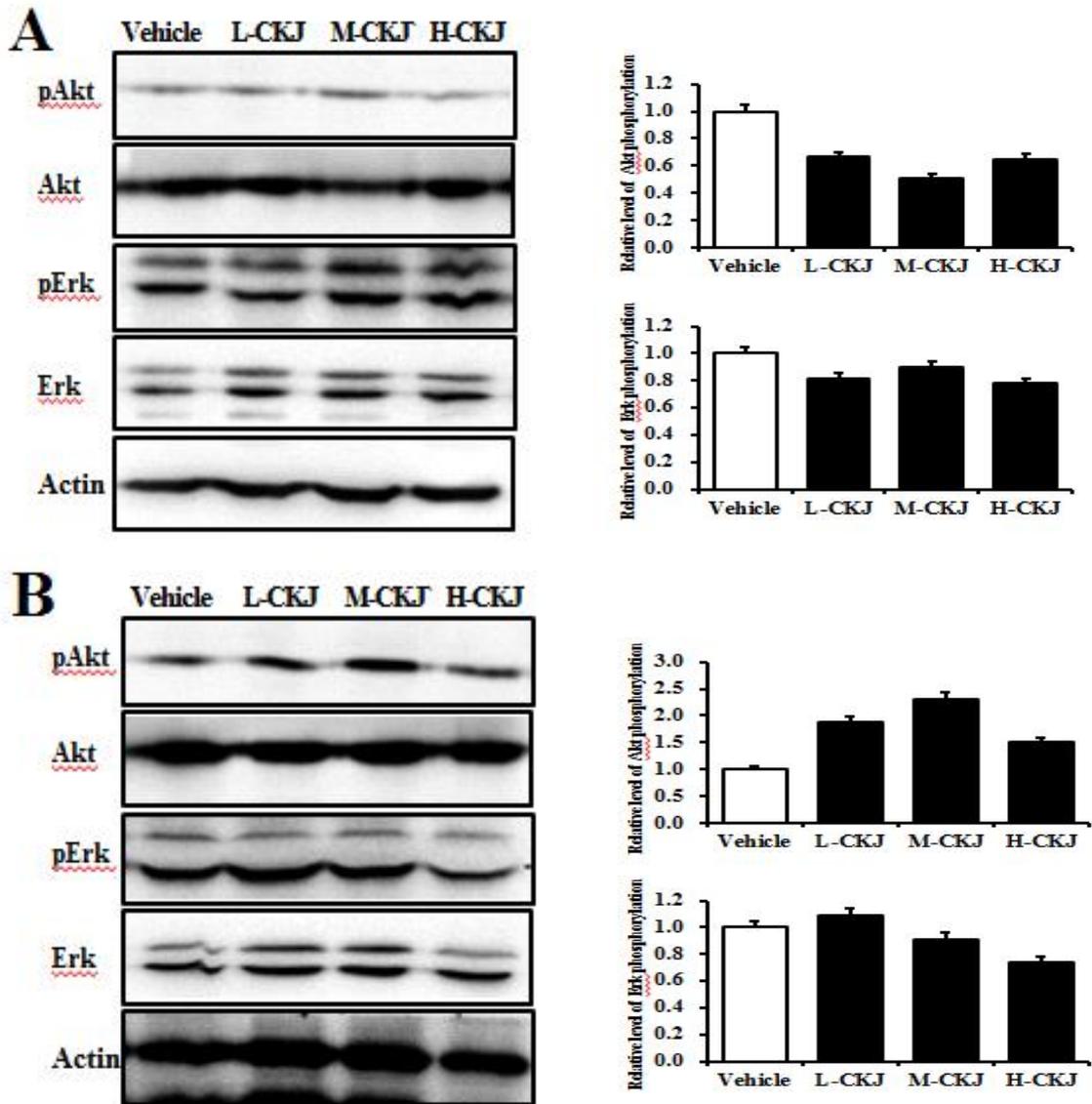


Figure 25. Effects of CKJ administration on GH receptor down-stream pathway proteins in liver (A) and muscle (B) using Western blot. Total cell lysates were prepared from tissues of vehicle-, L-CKJ-, M-CKJ and H-CKJ-treated groups, as described in Materials and Methods. Fifty micrograms of protein per sample was immunoblotted using specific antibodies for each protein. Data are reported as the mean \pm SD of three replicates. * $p < 0.05$ is the significance level compared to the vehicle-treated group.

6. 학습력증진 *in vivo* 기능성 탐색

가. 치매모델동물에서 신경성장인자의 분비에 미치는 영향 분석

(1) 동물실험설계

1차년도 *in vitro* 실험에서 6가지의 품종 중에서 NGF 분비에 가장 효과적인 신화-청국장을 *in vivo* 연구에 사용하였으며, 청국장 투여가 실험동물의 뇌신경성장인자의 분비와 발현에 미치는 영향을 평가하기 위하여 8주 동안 Tg2576마우스에 50 mg/kg의 신화-청국장 분말을 투여하고 다양한 실험동물의 변화를 관찰하였다.

실험에 사용된 모든 실험동물은 방사선 조사된 사료(Purina Com., Seongnam, Korea)를 자유급식 하도록 하였고, 12 시간의 조명주기(08:00~20:00)로 SPF 상태인 부산대학교 청정실험동물센터(온도 22±1℃, 상대습도 50±5%)에서 사육하였다. 또한 본 연구는 부산대학교 동물실험윤리위원회(PNU-IACAU)로부터 과학성과 윤리성에 대한 심사를 거쳐 승인(승인번호: PNU-2012-0071)을 받아 수행되었다. 먼저, 15주령의 Non-Tg 6마리(Control)와 12마리의 Tg2576 마우스를 6마리씩 2군(Vehicle 처리군, SH-CKJ 처리군)으로 무작위로 배정하였다. Control과 vehicle 처리군은 dH₂O만을, SH-CJK 처리군은 신화-청국장 추출물을 50 mg/kg 농도로 8주 동안 경구투여하였다. 8주 후, 마우스는 Zoletil® 1ml/kg을 투여하여 마취하여, 체중을 측정하고 조직을 적출하였다.

(2) 뇌조직에서 NGF의 발현 관찰

신화-청국장의 Tg2576 마우스의 학습력 증진 효과를 평가하기 위하여, 신경성장인자(Nerve growth factor, NGF)를 평가 지표로 선정하였다. NGF는 cholinergic 뉴런의 가장 강력한 성장요인이며, 증식, 분화, 생존과 신경세포의 죽음에 영향을 미친다. NGF는 일부 cytokines 혹은 천연 추출물에 반응하는 다양한 세포형태에 의해서 생산되는데, NGF를 생산하는 세포는 neuron, inflammatory cell (lymphocytes 혹은 mast cell), structural cell (fibroblast, epithelial cell, smooth muscle cells) 등이 포함된다.

신화-청국장추출물이 Tg2576 마우스의 뇌 조직과 혈청의 NGF 분비에 미치는 영향을 평가하기 위하여 NGF 분비량을 면역조직화학법과 ELISA로 측정하였다. 먼저, 뇌 조직의 NGF 분비를 알아보기 위해서는 실험동물에서 perfusion을 수행하여 적출한 뇌 조직을 10% formalin 용액에서 48시간 고정하였다. 병변조직 부위가 관찰될 수 있도록 10 µm의 크기로 절단하여 카세트에 넣고, 카세트에 담긴 조직은 조직처리기(Thermo Shandon Ltd./Thermo Fisherr Scientific, Bakewell, England)를 이용하여 ethyl alcohol 70, 80, 90, 95, 100%에 각각 1-2시간 정도 처리하고, xylene으로 4시간 처리하였다. Paraffin Embedding Station (Leica, Heidelberg, Germany)을 사용하여 embedding 한 후, 냉동실에서 하루정도 보관한 뒤, Rotary Microtome (Leica, Heidelberg, ermany)을 사용하여 블록(block)을 박절하였다. 조직 슬라이드는 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 hematoxylin & eosin (H&E)으로 염색한 후, 광학현미경(Olympus, PA, USA)으로 관찰하였다(Data is not shown). 또한 면역염색은 조직절편을 0.02 M 인산염완충액(pH 7.4; PBS)에서 약 10분 동안 2회 수세한 후 내재성 과산화효소의 활성을 제거하기 위해

0.3% 과산화수소(H₂O₂)가 포함된 메틸알코올을 첨가시킨 용액에서 20분간 처리하고, PBS로 10분간 3회 세척한 다음 5% 정상 말 혈청(normal horse serum)에 30분간 두었다. 그 후 조직 절편들을 세척하지 않고 가볍게 털어 낸 다음 일차항체인 anti-NGF antibody (희석비율 1 : 100, Abcam)를 4 °C에서 overnight 배양시킨다. 그 다음, PBS로 10분씩 3회 세척하였고, 이어서 이차항체인 (goat anti-rabbit)-conjugated HRP streptavidin (Histostain-Plus Kit; Zymed, South San Francisco, CA, USA)를 1:1,500 비율로 희석하여 실온에서 1시간 동안 배양시켰다. 그 다음 이들 조직절편을 PBS로 10분씩 3회 세척한 후, 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6; Tris buffer)에 0.05% DAB (3, 3' -diaminobenzine tetrahydrochloride, Invitrogen)와 0.01% 과산화수소가 혼합된 용액으로 처리하여 약 10분간 실온에서 발색시켰다. 조직절편의 정색상태를 현미경 하에서 확인한 후 Tris buffer, PBS 및 증류수에서 각각 10분간씩 차례로 세척한 다음, Harris' hematoxylin으로 대조염색을 하고, 통상적인 과정을 거쳐 Permount (Polysciences, USA)로 봉입하여 BX50F-3 optical microscope (Olympus, Tokyo, Japan)을 통해 확인하였다.

그 결과, vehicle 처리한 Tg2576 마우스 뇌에서의 NGF 분비는 Non-Tg에 비해 CA1, CA2, dentate gyrus (DG) 영역에서 감소하였다. 신화-청국장을 처리한 Tg2576 마우스에서는 CA3 영역을 제외한 영역에서 NGF 발현이 증가함을 알 수 있었다(Figure 26A). 이러한 결과는 신화-청국장은 Tg2576 마우스의 뇌 조직에서의 NGF 발현을 촉진시키는 것을 제시하고 있다.

(3) 혈액 내 NGF의 분비농도 측정

혈액 내의 NGF 분비량은 Millipore의 NGF ELISA kit를 구입하여 권장법에 따라 측정하였다. vehicle, 신화-청국장 처리군의 마우스로부터 얻은 혈청을 assay diluent를 이용하여 희석하여 sample을 준비하고, sample은 ELISA kit의 각 well에 100 μ l의 넣은 후 plate sealer로 plate를 덮고 밤새동안 배양하였다. Plate를 wash buffer 250 μ l로 4번 세척하고, anti-mouse NGF monoclonal antibody 100 μ l를 첨가하고 실온에서 shaking 배양하였다. 2시간 후 wash buffer로 4번 세척해주고, peroxidase conjugated donkey anti-mouse IgG polyclonal antibody 100 μ l를 첨가하고 실온에서 shaking 배양하였다. 여기에 100 μ l의 substrate (TMB)을 첨가하여 실온에서 15분 동안 효소반응을 유도한 뒤, 100 μ l의 stop solution을 첨가하여 반응을 종결하였다. 반응종결에 따라 나타난 변화는 ELISA-reader (VERSA max, micro-reader, MDS Co., USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다. 그 결과, 혈청 내의 NGF 농도는 면역조직화학법의 결과와 유사한 양상을 나타내었다. Non-Tg 마우스에 비해 vehicle을 처리한 Tg2576 마우스에서는 혈청 내 NGF 농도가 감소하였으나, 신화-청국장을 처리한 Tg2576 마우스에서는 Non-Tg와 유사하게 회복되는 것을 알 수 있었다(Figure 26B). 이러한 결과는 신화-청국장은 Tg2576 마우스의 혈액 내의 NGF 분비를 촉진시키는 것을 제시하고 있다.

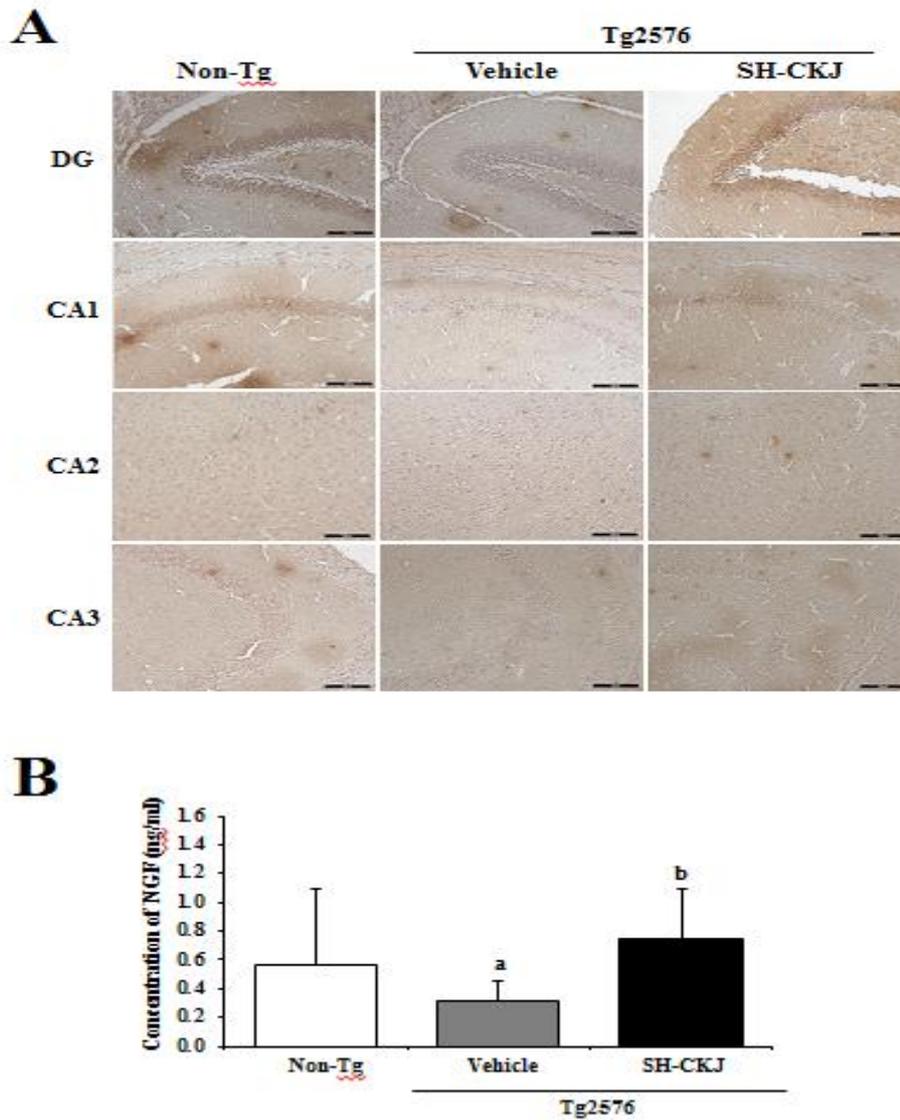


Figure 26. Effects of SH-CKJ treatment on NGF secretion and expression in Tg2576 mice. Tissues from NGF immunostaining were viewed using a microscope at 200x magnification in the hippocampus of brain tissue. NGF in DG, CA1, CA2 and CA3 showed broad distribution and deep intensity in brain tissues of Non-Tg and SH-CKJ treated Tg2576 mice (A). After SH-CKJ treatment for 8 weeks, the serum level of NGF was measured using an anti-NGF ELISA kit (B). Values of the data represent the means \pm SD of three experiments. a, $P < 0.05$ is the significance level relative to the Non-Tg group. b, $P < 0.05$ is the significance level relative to the vehicle treated Tg2576 group. DG, Dentate gyrus; CA1, Cortical area 1; CA2, Cortical area 1; CA3, Cortical area 3.

나. 치매모델동물에서 신경성장인자 수용체의 신호전달에 미치는 영향 분석

(1) 청국장추출물이 Tg2576 마우스에서 NGF high affinity receptor를 통한 신호전달에 미치는 영향 관찰

청국장으로 유도된 NGF가 Tg2576 치매질환모델동물에서 정상적인 기능을 하는지 알아보기 위하여, NGF receptor 중에서 high affinity를 갖는 TrkA receptor와 그 신호전달과정을 평가하였다. high-affinity tyrosine kinase receptor인 TrkA receptor는 NGF의 target cell의 원형질막에서 발견되며, 각 수용체의 내재성 tyrosine kinase activity가 각 상대 수용체를 인산화하도록 한다. 인산화된 TrkA 수용체는 Ras 단백질과 ERK/p-ERK 등의 단계적인 반응을 유발하고, 다양한 단백질 kinase 활성의 결과를 가져온다. 이들 kinase의 일부는 CREB과 같은 전사 활성인자를 활성화시키기 위해 핵으로 이동시킨다. NGF 경로의 Ras-based component는 기본적으로 NGF-sensitive neuron의 분화를 유도하고 유지하는 역할을 한다. 또한 TrkA의 인산화는 세포 사멸을 억제하는 단백질 kinase (Akt kinase)의 활성을 유도하며, 교감신경과 감각 뉴런의 NGF-dependent 생존을 매개한다. 청국장 추출물이 TrkA와 TrkA downstream signaling pathway에 미치는 영향을 알아보기 위하여, western blot을 통해 분석하였다.

vehicle과 SH-청국장을 8주 동안 처리한 Tg2576 마우스의 뇌 조직 100 mg은 PRO-PREP Protein Extraction Solution (iNtRON Biotechnology, Korea)을 첨가하여 균질화 시킨 후 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질의 농도는 SMARTTM BCA Protein Assay Kit (iNtRON Biotechnology)을 이용하여 정량하였으며, 30 ug의 단백질을 western blot에 사용하였다. 먼저, 10% SDS-PAGE gel에 단백질을 전기영동한 후 Enhanced Chemiluminescence (ECL) membrane (Amersham Life Science, Piscataway, NJ)에 전이하고, 5% skim milk에서 1시간 동안 블로킹하였다. 각 membrane은 anti-TrkA 항체(Cell Signaling Technology), anti-p-TrkA 항체(Cell Signaling Technology), anti-Akt 항체(Cell Signaling Technology), anti-p-Akt 항체(Cell Signaling Technology), anti-ERK 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-p-ERK 항체(Santa Cruz Biotechnology), anti-β-actin 항체 (Sigma-Aldrich)등의 1차 항체로 4°C에서 밤새 배양한 후 HRP-conjugated된 secondary 항체를 첨가하여 ECL Kit (Amersham Life Science, Piscataway, NJ)를 이용하여 발현을 확인하였다.

그 결과, 신화-청국장은 TrkA와 Erk의 인산화는 유의미하게 변화하였으나, Akt의 인산화는 변화시키지 못하였다. 청국장 추출물은 Non-Tg에 비해 Tg2576 마우스에서 TrkA의 인산화를 억제시키고, Erk의 인산화는 촉진시키는 것으로 확인되었으며, 그 양상은 신화-청국장 처리군은 Non-Tg와 유사하게 회복되는 것을 확인할 수 있었다. 특히, Tg2576 마우스에서 Erk의 인산화는 312% 증가하였으나, TrkA는 36% 감소하였다. 반면, Akt의 인산화는 어떠한 변화도 일어나지 않았다(Figure 27). 이러한 결과는 신화-청국장은 Tg2576 마우스에서 NGF의 high affinity receptor를 통한 신호전달을 촉진함으로써 TrkA와 Erk의 인산화를 회복시키는 것을 제시하고 있다.

(2) 신화-청국장추출물이 Tg2576 마우스에서 NGF low affinity receptor를 통한 신호전달에 미치는 영향

청국장으로 유도된 NGF가 Tg2576 치매질환모델동물에서 신호전달에 미치는 영향을 알아보기 위하여, NGF receptor 중에서 low affinity를 갖는 p75^{NTR} receptor와 그 신호전달과정을 평가하였다. Low affinity receptor인 p75^{NTR}는 G-protein receptor family에 속하며, 세포질 부위에 chopper domain과 death domain을 갖고 있어 신호전달을 수행한다. 청국장 추출물이

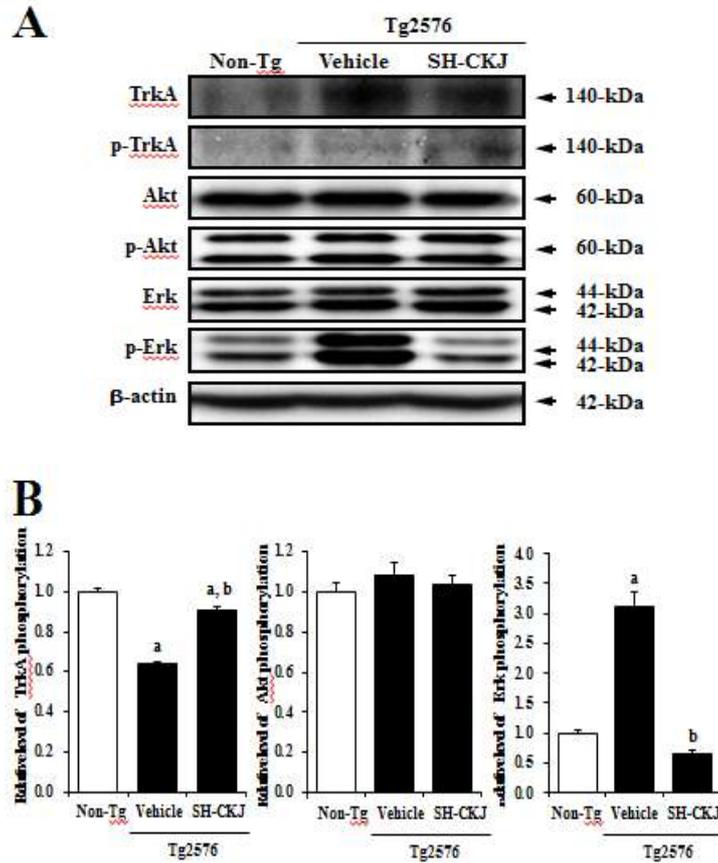


Figure 27. Effects of SH-CKJ treatment on down-stream NGF receptor TrkA signaling pathway via Western blotting. Total homogenates were prepared from brain tissue of Tg2576 mice treated with SH-CKJ for 8 weeks. Thirty micrograms of protein per sample was immunoblotted with antibody for each protein (A). The intensity of each band was determined using an imaging densitometer, and the relative level of each protein was calculated based on the intensity of actin (B). Three samples were assayed in triplicate via Western blotting. Values of the data represent the means±SD. a, P<0.05 is the significance level relative to the Non-Tg group. b, P<0.05 is the significance level relative to the vehicle treated Tg2576 group.

p75^{NTR}와 p75^{NTR} downstream signaling pathway에 미치는 영향을 알아보기 위하여, western blot을 통해 분석하였다.

vehicle과 SH-청국장을 8주 동안 처리한 Tg2576 마우스의 뇌 조직 100 mg은 PRO-PREP Protein Extraction Solution을 첨가하여 분쇄한 후 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질의 농도는 SMARTTM BCA Protein Assay Kit을 이용하여 정량하였으며, 30 ug의 단백질을 western blot에 사용하였다. 먼저, 10% SDS-PAGE gel에 단백질을 전기영동한 후 ECL membrane에 전이하고, 5% skim milk에서 1시간 동안 블로킹하였다. 각 membrane은 anti-p75^{NTR} 항체(Cell Signaling Technology), anti-RhoA 항체(Cell Signaling Technology), anti-β-actin 항체 (Sigma-Aldrich)등의 1차 항체로 4°C에서 밤새 배양한 후 HRP-conjugated된 secondary 항체를 첨가하여 ECL Kit를 이용하여 발현을 확인하였다. 그 결과, 청국장 추출물은 NGF p75^{NTR} 수용체의 신호전달 과정의 주요 인자인 p75^{NTR}, RhoA, Bcl-2, Bax의 4가지 단백질의 발현 양에 영향을 미치지 않았다(Figure 28). 이러한 결

과는 신화-청국장 추출물이 Tg2576 마우스에서 NGF의 low affinity receptor를 통한 신호전달에서 특이적 반응을 유발하지 못함을 제시하고 있다.

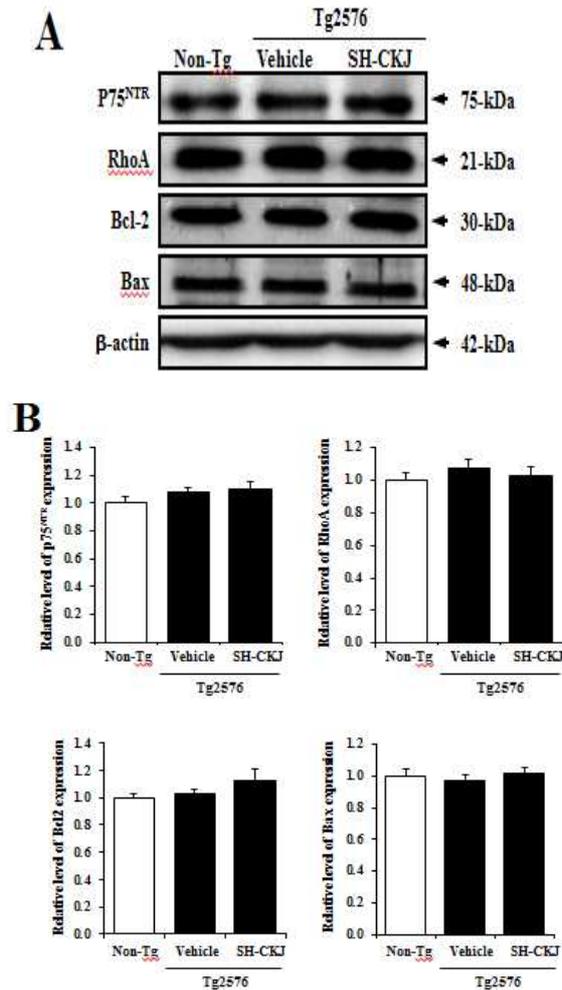


Figure 28. Effects of SH-CKJ treatment on down-stream NGF receptor p75NTR signaling pathway via Western blotting. Total homogenates were prepared from brain tissue of Tg2576 mice treated with SH-CKJ for 8weeks. Thirty micrograms of protein per sample was immunoblotted with antibody for each protein (A). The intensity of each band was determined using an imaging densitometer, and there relative level of each protein was calculated based on the intensity of actin (B). Three samples were assayed in triplicate via Western blotting. Values of the data represent the means±SD.

7. 청국장의 독성시험

가. GLP 시험 프로토콜 확립

산업활동의 급격한 증가와 더불어 화학물질이 환경 및 인간건강에 미치는 악영향은 날로 심각해지고 있으며 이에 따라 화학물질 위해성 평가는 각 나라의 환경정책에서 매우 중요한 부분을 차지하게 되었다. 화학물질 위해성 평가에서 독성시험 자료의 신뢰성 확보는 그 결과에 따른 화학물질 적정관리 방안도출에 있어서 가장 핵심적 사항이며 전체 관리과정의 요체이자 첫 출발점이라고도 할 수 있다. 이러한 맥락에서 국제적으로는 경제협력개발기구(OECD)를 중심으로 독성시험 성적서의 상호인정을 위해 GLP운영기준(GLP)과 시험지침(test guideline)을 제정하고 각 회원국이 이를 준수할 것을 규정하고 있다. 우리나라 부처별 GLP 운영은 대상물질에 따라 분류가 되며 의약품 및 화장품의 경우 식품의약품안전처에서 운영이 된다. 시험 항목으로는 단회투여독성시험, 반복투여독성시험, 생식·발생독성시험, 유전독성시험, 면역독성시험, 발암성시험, 국소독성시험, 기타독성시험으로 구성된다. GLP(good laboratory practice)는 의약품의 비임상적 안전성 평가를 위해 수행하는 비임상 시험의 신뢰성을 보증하기 위하여 시험기관의 지정, 관리기준, 운영 및 사후관리 등에 대한 준수사항을 규정하여 시험의 전 과정을 조직적, 체계적으로 관리하는 규정이다. 일반적인 GLP 약리효능시험 프로토콜의 내용은 기능성 제품이 일반 행동에 미치는 영향과 중추신경계에 미치는 영향, 자율신경계에 미치는 영향, 호흡기계에 미치는 영향, 순환기계에 미치는 영향, 소화기계에 미치는 영향으로 크게 나뉜다. 의약품등의 일반약리시험기준은 2012년 개정된 이후 아래와 같다.

제1조(목적) 이 규정은 약사법 제31조, 제42조 및 같은법 시행규칙 제29조제1항제5호의 규정에 따라 제출되는 의약품 등의 일반약리시험의 항목과 시험방법을 정함을 목적으로 한다.

제2조(정의) 일반약리시험이란 독성시험 및 효력시험, 흡수·분포·대사·배설에 관한 시험을 제외한 전임상시험으로 의약품 등이 신체 각 부위(계) 및 기능 등에 미치는 영향에 관한 시험을 말한다.

제3조(시험항목) 일반약리시험에는 일반행동, 중추신경계, 자율신경계, 호흡기계, 순환기계 및 소화기계에 미치는 영향 등에 대한 시험이 있으며 필요에 따라 시험 항목을 추가 또는 면제할 수 있다.

제4조(시험동물) ① 시험동물은 계통, 성별 및 연령 등을 고려하여 마우스, 래트, 기니픽, 토끼, 고양이 및 개 등을 사용한다. ② 시험계로는 whole animal, 적출기관, 조직, 혈액 및 세포 등을 사용한다.

제5조(투여법) ① 투여경로는 임상투여경로를 원칙으로 한다. 다만, 시험의 종류 및 체내 흡수율 등에 따라 적절히 다른 투여경로를 이용할 수 있다. ② 투여횟수는 1회 투여를 원칙으로 한다. 다만, 반복투여에 의한 영향이 예상되는 경우에는 적당한 투여횟수를 정할 수 있다.

③ 투여용량은 효력용량 또는 임상투여용량이나 그 수 배에 해당하는 용량 및 LD₅₀에서 산출한 용량(예: LD₅₀의 1/5, LD₅₀ 1/10 등) 등에 따라 정한다. ④ 시험항목에 따라 필요한 경우 음성 및 양성대조군을 두어야 한다.

제6조(시험방법) 일반약리시험방법은 다음 각 호와 같다.

일반행동에 미치는 영향

일반행동에 미치는 영향은 다차원관찰법을 통하여 검색한다.

중추신경계에 미치는 영향

1. 자발운동량에 미치는 영향은 자발운동량시험을 통하여 검색한다.
2. 수면에 미치는 영향은 수면제 및 마취제 등으로 유도된 수면에 대한 수면연장작용시험을 통하여 검색한다.
3. 운동협조성에 미치는 영향은 회전봉법 등에 의한 근이완작용시험을 통하여 검색한다.
4. 경련에 미치는 영향은 전기저극이나 경련유발제로 유발시킨 경련에 대한 항경련작용시험을 통하여 검색한다.
5. 통증에 미치는 영향은 초산 writhing법 등을 이용한 진통작용시험을 통하여 검색한다.
6. 체온에 미치는 영향은 체온측정을 통하여 검색한다.

자율신경계에 미치는 영향

자율신경계에 미치는 영향은 적출장관·순막 수축시험 등을 통하여 검색한다.

호흡기계에 미치는 영향

호흡기계에 미치는 영향은 호흡수 및 호흡량 측정 등을 통하여 검색한다.

순환기계에 미치는 영향

순환기계에 미치는 영향은 혈압·심박동수측정·적출심장시험 등을 통하여 검색한다.

소화기계에 미치는 영향

소화기계에 미치는 영향은 장관수송능시험·위액분비량억제시험 등을 통하여 검색한다.

제7조(보칙) 시험물질의 특성에 따라 유사시험이나 세부확인시험을 실시하는 경우는 이 지침의 시험법을 적용하지 않을 수 있다. 또한 시험결과 안전성에 문제가 있다고 판단되는 경우에는 세부 보충시험자료를 요구할 수도 있다.

제8조(재검토기한) 「훈령·예규 등의 발령 및 관리에 관한 규정」(대통령훈령 제248호)에 따라 이 고시 발령 후의 법령이나 현실여건의 변화 등을 검토하여 이 고시를 폐지하거나 개정 등의 조치를 하여야 하는 기한은 2015년 8월 24일까지로 한다.

본 과제에서는 단회독성시험 등 독성시험을 실시함으로써 청국장의 독성여부를 확인하고자 하였으며 그 결과는 아래와 같다.

나. 단회독성시험 등 독성시험실시

(1) 동물실험설계

실험에 사용된 실험동물은 specified pathogen free (SPF) 상태의 암컷 ICR 마우스(8주령, 20±5 g)로서 샘타코(Osan, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 모든 마우스는 방사선 조사된 사료(Purina, Seoungnam, Korea)를 자유급식 하도록 하였고, 12시간의 조명주기(08:00~20:00)로 SPF상태인 부산대학교 청정실험동물센터(온도 22±1℃, 상대습도 50±5%)에서 사육하였다. 또한 본 연구는 부산대학교 동물실험윤리위원회(PNU-IACUC)로부터 과학성과 윤리성에 대한 심사를 거쳐 승인(승인번호: PNU-2013-0465)을 받아 수행되었다. 실험동물을 10마리씩 4개군(vehicle 처리군, 저농도 처리군, 중농도 처리군, 고농도 처리군)으로 무작위로 배정하였다. Vehicle 처리군은 증류수 0.2 ml만을, 저농도 처리군은 청국장 25 mg/kg을, 중농도 처리군은 청국장 50 mg/kg을, 고농도 처리군은 청국장 100 mg/kg을 ICR 마우스에 14일 동안 경구투여하였다. 투여가 완료된 후 마우스는 Zoletil (VirBac, Corros cedex, France)를 이용해서 마취하여 혈액 및 소변과 조직들을 적출하여 분석에 사용하였다.

(2) 청국장이 임상증상에 미치는 영향

청국장이 ICR 마우스에 미치는 독성을 평가하기 위하여, 3가지 농도로 2주 동안 처리하여 임상증상 및 사망률을 관찰하였다. 모든 실험동물에 대한 임상증상관찰 및 사망동물 수는 매일 2회 이상 관찰하였으며, 실험동물의 체중은 격일로 경구 투여전과 부검전에 화학저울(Mettler toledo, Greifensee, Switzerland)를 이용하여 측정하였다. 그 결과, 3가지 농도를 투여한 모든 집단에서 일반적인 중독증상인 침울, 운동감소, 경련, 보행 이상, 진전 등의 어떠한 증상도 관찰되지 않았다. 또한, 최고농도인 100 mg/ml의 농도를 경구 투여한 집단에서도 마우스의 사망은 관찰되지 않았다. 따라서 이러한 결과는 증숙된 청국장은 ICR 마우스의 임상적 독성이나 사망을 유발하지 못함을 나타내며, 청국장의 최소치사량(minimum lethal dose, MLD)은 100 mg/kg 이상임을 제시하고 있다.

(3) 청국장이 체중 및 장기무게에 미치는 영향

독성평가과정에서 체중 및 장기무게는 시험물질의 독성을 나타내는 가장 기본적인 일차지표이다. 먼저, 청국장이 마우스의 체중에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 2주 동안 마우스의 사료 및 음수 섭취량, 체중을 측정하였다. 사료와 음수 섭취량은 청국장을 처리한 3개 집단과 대조군에서 유의적인 차이가 없었다(Data not shown). 또한, 체중은 2주 동안 30 g 내외에서 일정하게 유지되었으며, 실험에 사용된 모든 집단에서 유의적인 차이가 관찰되지는 않았다(Fig. 29). 따라서 이러한 결과는 청국장은 체중, 사료 및 음수섭취량의 변화에 유의적인 영향을 미치지 못함을 제시하고 있다.

또한 청국장이 마우스의 장기무게에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 실험동물을 부검 시 각 장기의 유관소견 상태와 장기무게를 측정하였다. 각 장기의 무게는 3회 측정하여 평균값을 산출하였으며, 모든 장기의 적출기준은 식약청의 독성시험 SOP에서 제시하는 기준을 준수하였다. 그 결과, ICR 마우스의 모든 장기에서 육안으로 특별한 이상을 관찰할 수는 없었다(Table. 1). 또한, 무게를 측정한 9개의 장기(뇌, 난소, 고환, 간, 신장, 비장, 심장, 폐, 흉선) 중에서 오직 폐에서 약간의 무게 변화가 관찰되었고 다른 장기는 유의적인 변화를 관찰할 수 없었다. 이러한 결과는 청국장은 ICR 마우스의 장기 중 폐의 무게에 약간의 변화를 유발함을 제시하고 있다.

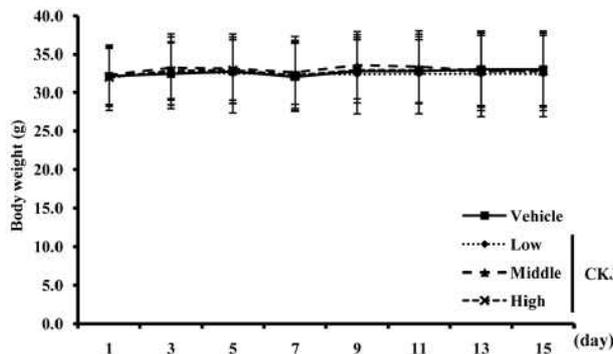


Figure 29. Alteration of body weights of ICR mice. The weight of the whole body was measured daily using an electronic balance for 14 days. Data represent the means±SD from three replicates.

Table 1. Alteration of organ weights of ICR mice

Organs	Vehicle	CKJ concentration		
		Low	Middle	High
Brain (g)	0.47±0.04	0.49±0.02	0.48±0.02	0.49±0.02
Ovary (g)	0.13±0.06	0.14±0.06	0.13±0.05	0.13±0.05
Testis (g)	0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01	0.02±0.01
Kidney (g)	0.26±0.08	0.28±0.12	0.27±0.08	0.25±0.07
Spleen (g)	0.12±0.02	0.15±0.03	0.13±0.02	0.13±0.01
Liver (g)	1.38±0.39	1.34±0.35	1.30±0.31	1.31±0.31
Thymus (g)	0.08±0.02	0.07±0.03	0.08±0.01	0.07±0.02
Heart (g)	0.18±0.04	0.18±0.04	0.17±0.03	0.17±0.03
Lung (g)	0.40±0.05	0.31±0.06*	0.26±0.02*	0.33±0.08*

*P<0.05 indicates a significant difference compared to the vehicle-treated group.

(4) 청국장이 소변에 미치는 영향

청국장 추출물이 변비가 유발된 ICR 마우스의 소변에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 마지막 경구투여 후 24시간 뒤 부검한 마우스의 방광에서 소변을 채취하여 bilirubin, urobilinogen, ketones, 단백질, pH, 비중, 백혈구의 농도를 소변 분석기 URiSCrN optima II (Yeongdong Electronics Co., Ltd., Yongin, Korea)를 사용하여 분석하였다. 그 결과, ketones의 농도가 vehicle 처리군과 비교하여 높게 측정되었음에도 불구하고, bilirubin, urobilinogen, 단백질, pH, 비중, 백혈구의 농도는 유의적인 변화가 나타나지 않았다(Fig. 30). 이러한 결과는 청국장이 ICR 마우스의 소변 독성 지표에 어떠한 독성도 일으키지 않음을 제시하고 있다.

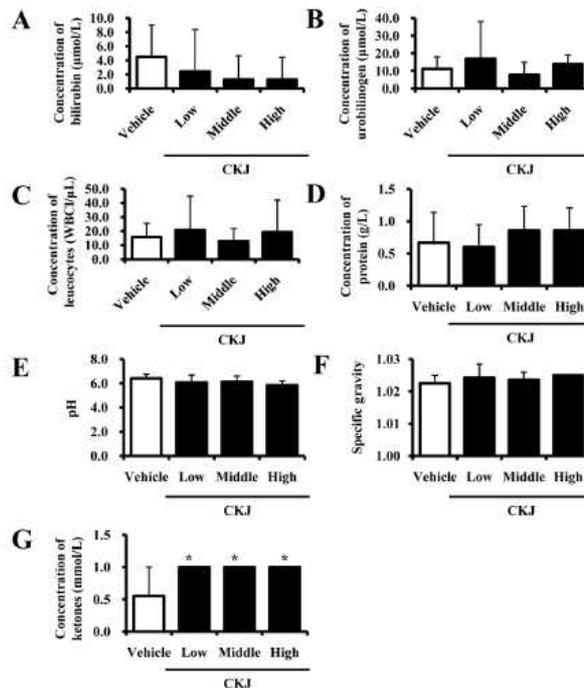


Figure 30. Alteration of urine parameters. After final administration of CKJ, urine was collected from the bladder of ICR mice using a syringe and the levels of seven factors were then analyzed as described in the Materials and Methods. Data represent the means±SD from three replicates. *P<0.05 indicates a significant difference compared to the vehicle-treated group.

(5) 청국장이 간독성에 미치는 영향

청국장이 간에 미치는 독성 영향을 평가하기 위해, 혈청의 생화학적 분석 및 조직의 병리학 적 검사를 수행하였다. 혈액은 ICR 마우스를 Zoletil을 이용하여 마취시킨 뒤 후대정맥을 통해 채취하였다. 채취한 혈액을 실온에서 30분 배양한 뒤, 4°C, 15000 rpm, 15분 원심분리시켜 혈청을 확보하였다. 혈청생화학적 검사는 자동생화학분석기(Hitachi 747 model, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 또한 청국장을 투여 한 ICR 마우스에서 적출한 간 조직은 10% formalin 용액에서 48시간 고정한 뒤, 병변조직 부위가 관찰될 수 있도록 적당한 크기로 절단하여 카세트에 넣었다. 카세트에 담긴 조직은 조직처리기(Thermo Shandon Ltd./Thermo Fisher Scientific, Bakewell, England)를 이용해서 alcohol 70, 80, 90, 95, 100%에 각각 1-2시간 정도 처리하고, xylene으로 4시간 처리하였다. Paraffin Embedding Station (LeiCr, Heidelberg, Germany)을 사용하여 embedding 한 후, 냉동실에서 하루정도 보관한 뒤 Rotary Microtome (LeiCr, Heidelberg, Germany)을 사용하여 블록(block)을 박절하였다. 조직 슬라이드는 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 hematoxylin & eosin (H&E)으로 염색한 후 광학현미경(Olympus, PA, USA)으로 조직의 변화를 관찰하였다.

일반적으로 간독성은 혈청 내 간대사와 관련(xaloacetic transaminase)라고도 사용되며 아미노산 합성에 관여하는 효소로 된 4가지 효소(ALT, AST, ALP, LDH)의 농도변화로 평가된다. ALT는 GPT (Glutamic pyruvic transaminase)라고도 사용되며 간 및 장기에 존재하는 아미노산 합성에 관여하는 효소로서 세포파괴시 혈액으로 유출된다. AST는 GOT (Glutamic o서 간, 심근, 골격근, 적혈구에 주로 존재한다. 일반적으로 간염과 같은 간 장애 발생시 세포막 투과성의 변화와 효소 제거 비율의 차이에 의해 AST와 ALP의 활성비율이 낮아지며, 간괴사가 진행될 경우 그에 비해 비율이 증가한다. 또한 ALP활성은 Intra-, extra hepatic cholestasis에 의존하여 primary biliary cirrhosis에서 아주 높이 상승하므로 담도 폐쇄 등의 담즙분비 질환 지표로 사용된다. LDH는 조직에 분포되어있는 효소로서 pyruvic acid와 lactic acid가 간의 가역적 전환에 관여하여 촉매작용을 한다. LDH를 내포한 조직이 파괴될 때 혈액중으로 흘러나와 혈중 LDH가 상승하며 간질환 중추신경에 영향을 준다. 본 실험에서 청국장의 간독성을 평가하기 위해 이들 4가지 혈청 내 효소를 지표로 사용하였으며, 그 결과 ALT, AST, ALP, LDH 모두 약간 감소하였지만 유의적인 증가가 관찰되지 않았다(Fig. 31A). 더불어 청국장을 투여한 마우스에서 적출한 간 조직에서는 모든 처리군에서 염증, 괴사, bilitubin 침착, iron 침착 등의 병적인 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 31B). 이러한 결과는 청국장은 전체적으로 간조직에 유의적인 독성을 미치지 못함을 제시하고 있다.

(6) 청국장이 신장독성에 미치는 영향

청국장이 신장에 미치는 독성영향을 평가하기 위해, 혈청의 생화학적 분석 및 신장 조직의 병리학 적 검사를 수행하였다. 혈액은 ICR 마우스를 Zoletil을 이용하여 마취시킨 뒤 후대정맥을 통해 채취하였다. 채취한 혈액을 실온에서 30분 배양한 뒤, 4°C, 15000 rpm, 15분 원심분리시켜 혈청을 확보하였다. 혈청생화학적 검사는 자동생화학분석기를 이용하여 측정하였다. 또한 청국장을 투여 한 ICR 마우스에서 적출한 신장 조직은 10% formalin용액에서 48시간 고정한 뒤, 병변조직 부위가 관찰될 수 있도록 적당한 크기로 절단하여 카세트에 넣었다. 카세트에 담긴 조직은 조직처리기를 이용해서 alcohol 70, 80, 90, 95, 100%에 각각 1-2시간 정도 처리하고, xylene으로 4시간 처리하였다. Paraffin Embedding Station을 사용하여 embedding 한 후, 냉동

실에서 하루정도 보관한 뒤 Rotary Microtome을 사용하여 블록을 박절하였다. 조직 슬라이드는 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 hematoxylin & eosin (H&E)으로 염색한 후 광학현미경으

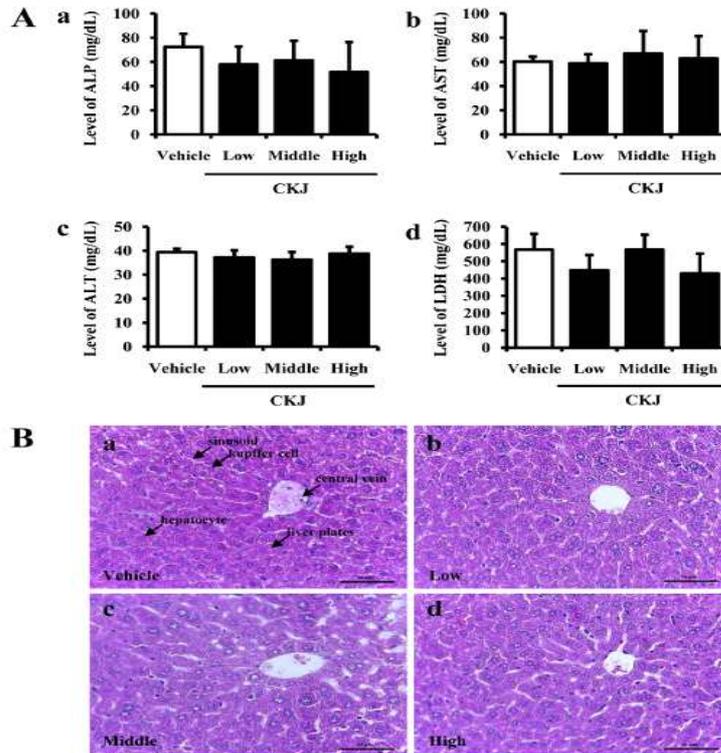


Figure 31. Liver toxicity in ICR mice. After final CKJ administration, blood was collected from the abdominal veins of vehicle- and CKJ-treated mice and serum concentrations of ALP (Aa), AST (Ab), ALT (Ac), and LDH (Ad) were then analyzed as described in the Materials and Methods. (B) Liver tissue of ICR mice was prepared on a histological slide and the cellular morphology was viewed at 400x magnification. Data represent the means±SD from three replicates. *P<0.05 indicates a significant difference compared to the vehicle-treated group.

로 조직의 변화를 관찰하였다.

신장독성은 혈청내 2가지 효소(BUN, Cr)의 농도변화를 지표로 하여 평가된다. BUN은 사구체로부터 여과되어 세뇨관에서 약 40%가 재흡수되고, 나머지는 배설되며, 신장의 기능장애로 인해 농도가 증가한다. 또한 Cr은 근육에서 단백질이 에너지원으로 사용되고 난 후 생성된 크레아틴의 노폐물로서 항상 일정량 유지되며 신장기능에 의해서만 변화한다. 일반적으로 BUN과 Cr은 각각 수치보다는 BUN/Cr ratio를 이용하여 신장독성을 평가되며, 이는 생체 내에서 위장관 출혈, 혈구과괴, 감염, 합성억제 약물복용, 고열 등이 발생할 경우 증가하고, 혈액량 감소, 울혈성 심부전, 간경화나 복수, 신증후군 등이 발생할 경우에는 감소한다. 본 실험에서는 신장독성을 평가하기 위하여 BUN과 Cr 지표를 사용하였으며, 혈청의 생화학적 검사 결과, 모든 청국장 처리군에서 BUN과 Cr의 유의적인 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 4A). 또한 더불어 신장독성을 평가하기 위해 신장조직의 변화를 관찰한다. 신장은 혈청 내 이온구성, 삼투압 농도(osmolality), 혈청량, 수소이온 농도를 조절하고, 대사폐기물과 외부물질의 제거하며, 호르몬을 분비하는 기능을 수행하는 기관으로서 피질과 수질로 구분되면, 독성이 발생할 경우, 피질과 수질 전반에 걸친 근위세뇨관 상피세포의 괴사, 궤양, 수복, 과형성 등이 관찰된다. 특히, 신

장독성을 유발하는 물질인 Paraquat (1, 1'-dimethyl-4, 4'-bipyridyliumion)(PQ)는 비선택적 접촉 및 속효성 제초제 중의 하나로 인간을 포함한 포유동물에 심각한 독성을 나타내는데, PQ 독성이 유도된 마우스에서는 근위 세뇨관의 괴사가 발생한다.

청국장을 투여한 ICR 마우스의 신장에서는 염증, 괴사 등의 병적인 변화를 보이지 않았고 신장세포도 정상적인 구조를 유지하고 있었다. 면역학적 요인이나 독성물질에 기인하여 발생하는 사구체 및 세뇨관의 변성 및 괴사도 관찰되지 않았고 세관세포들이 잘 밀집되어있어 부종도 없음이 확인되었다(Fig. 32). 이러한 결과는 청국장에 의한 유의적인 신장독성은 유발되지 않음을 제시하고 있다.

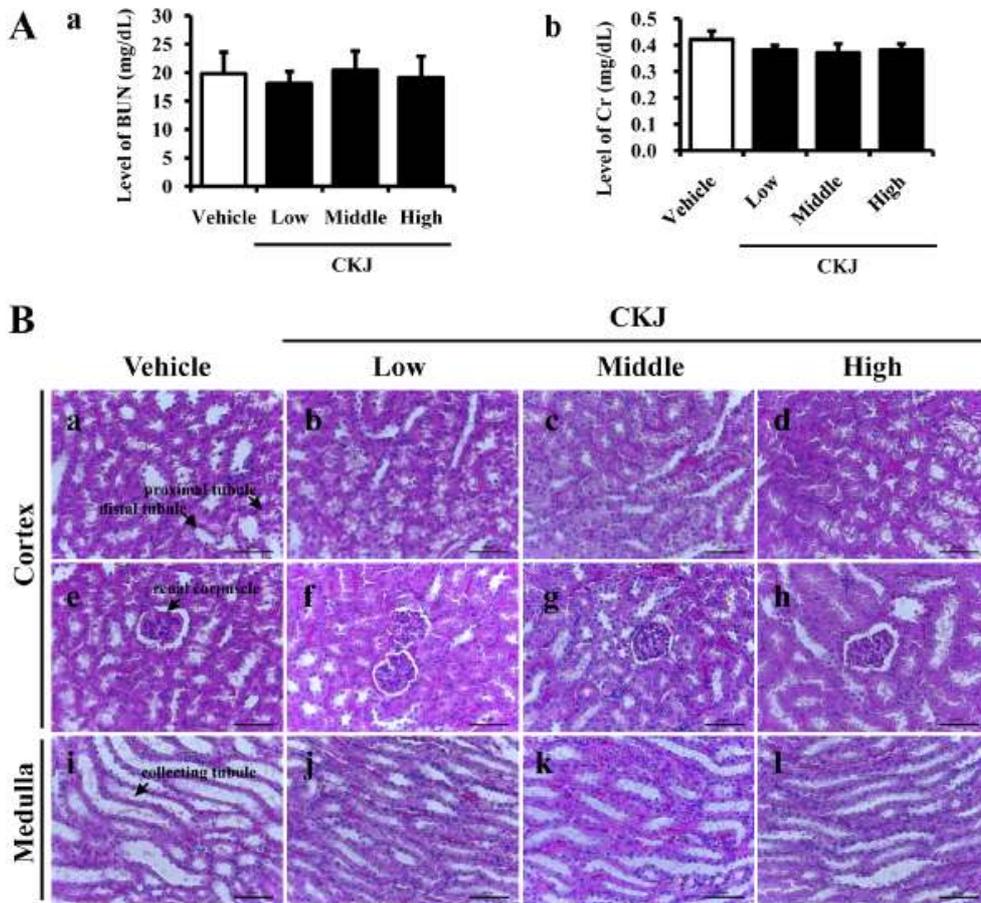


Figure 32. Kidney toxicity in ICR mice. After final CKJ administration, blood was collected from abdominal veins of vehicle- and CKJ treated mice and serum concentrations of BUN (Aa) and Cr (Ab) were analyzed in duplicate as described in the Materials and Methods. (B) Cortex and medulla regions of kidney tissue of ICR mice were prepared on a histological section and the cellular morphology was viewed at 400x magnification. Data represent the means±SD from three replicates. *P<0.05 indicates a significant difference compared to the vehicle-treated group.

8. 청국장의 약리효능 평가

가. 기능성 제품의 GLP 약리효능시험 프로토콜 확립

비임상시험은 사람을 대상으로 하는 시험 이전에 당해 의약품의 안전성과 유효성에 대한 최소한의 정보를 마련하기 위해 요구되는 시험이다. 그 중에서도 질병의 진단, 치료 및 예방의 목적에 사용하는 “약물”의 생체에 대한 작용기전, 흡수, 분포, 대사, 배설, 용법, 용량 등에 관하여 연구하는 것을 약리학(pharmacology)이라고 하며 약물을 개발할 때 임상에 적용하기 이전에 이들 약리에 관한 자료를 마련하여 제출할 것이 요구된다. 비임상시험 단계로서 약리효과 및 그 작용기전을 설명하는 것과 더불어, 표적기관외 다른 기관에서의 바람직하지 않은 효과를 평가하여 바람직하지 아니한 약리작용을 예측하고 약물의 체내동태를 알아보기 위하여 비임상에서의 약리작용에 관한시험을 실시한다. 비임상 약리에 관한 자료로써 효력시험 자료가 마련되어야 하며 그 지침은 아래와 같다.

Table 1 *In vitro*, *ex vivo*, *in vivo* 효력시험

효력시험의 목적 및 고려 사항	
<i>In vitro</i> 시험	목적 : 세포주 등을 이용하여 시험관 내에서 약물에 대한 반응을 확인 - 적절한 세포주 모델 설정 및 목표 질병에 대한 유효성 확인방법 설정 - 유효농도/용량의 결정
<i>Ex vivo</i> 시험	목적 : 동물의 장기등을 적출하여 시험관 내에서 약물에 대한 반응을 확인 - 적출한 장기의 동물 종, 적출기관, 적출 조직 및 보존상태의 적절성 - 시험물질의 적용 농도와 vehicle 설정
<i>In vivo</i> 시험	목적 : 질환모델 동물을 이용하여 약물에 대한 반응을 확인 - 동물 종, 투여방법(투여량, 투여기간, 투여시기) - 중간 차 유무, 동물 종별 유효용량 - 약리 작용이 가역적인지 비가역적인지 여부 - 병리모델에서 선택적으로 작용하는지(정상동물과 병리모델 동물에서의 비교) - 특정 동물 중에서 약물 투여방법 및 기타 조건을 달리하였을 경우 그 효력의 차이 - 기 실시된 임상시험에서의 목표 질병에 대한 약리 작용과 동물에서의 약리작용의 일관성 여부 및 동물종 간 유효용량의 차이 - 각종 병리모델 동물에서의 효력시험을 실시한 경우, 유효성 파라미터의 수치변화 - 모약물 및 대사체의 작용을 설명. 모약물의 대사기전과 대사 중 생성되는 대사물의 종류 및 모약물과 가 대사물의 약리작용 유무

* 출처 : ‘Map of new drug application’, 식품의약품안전청, 식품의약품안전평가원

위의 표 내용과 더불어 본 과제에서는 1차년도와 2차년도에서 확립한 세포주 및 질환 모델 동물을 이용하고 청국장의 최적 농도 및 투여 기간에 따른 *in vivo*, *in vitro* 실험을 통해 청국장의 독성 유발 유무 및 성장 및 학습력 효과 등을 관찰하였다.

나. 기능성 제품의 약리효능 평가

(1) 동물실험설계

모든 마우스는 방사선 조사된 사료(Purina, Seoungnam, Korea)를 자유급식 하도록 하였고, 12시간의 조명주기(08:00~20:00)로 SPF상태에서 온도 온도 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm 5\%$ 의 조건으로 관리되고, 국제실험동물인증협회(AAALAC International, 인증번호 : 001525)의 인증을 획득한 부산대학교 청정실험동물센터에서 사육하였다. 또한 본 연구는 부산대학교 동물실험윤리위원회(PNU-IACUC)로부터 과학성과 윤리성에 대한 심사를 거쳐 승인(승인번호: PNU-2013-0378)을 받아 수행되었다. 피부질환에 미치는 청국장의 영향을 확인하기 위하여 9주령의 IL-4/Luc/CNS-1 Tg 마우스(n=20)를 그룹당 5마리씩 총 4그룹으로 구성하였다. 첫 번째 그룹은 아세트-올리브 오일(AOO) 100 ml을 컷등에 주당 3번씩 3주간 발라주었다. 두 번째 그룹은 100 ml의 15% phthalic anhydride (PA) (in AOO, 4:1, v/v)를 발라주었다. 두 번째 그룹은 PA+vehicle 그리고 PA+CGK 처리 그룹으로 더 나누었으며 청국장은 50 mg/kg으로 4주간 매일 구강투여 하였다. 또한 no 처리 그룹으로 아무처리를 하지 않았다.

(2) 청국장이 귀의 형태와 두께에 미치는 영향

청국장이 PA 처리로 유도된 귀의 표현형을 억제하는지 확인하기 위하여 IL-4/Luc/CNS-1 Tg 마우스에 4주간 청국장과 PA를 처리한 후 귀 형태와 두께를 확인하였다. 그 결과, PA+vehicle 처리 그룹이 AOO 처리 그룹에 비하여 귀의 정맥이 뚜렷해졌으며 귀의 색은 밝은 색에서 어두운 갈색으로 변하였다. 이러한 변화는 PA+CGK 처리 그룹에서 약간 저하되었다(Fig. 33A). 또한 귀 두께의 경우 PA+vehicle 처리 그룹은 no 또는 AOO 처리 그룹에 비하여 두꺼워졌으나 PA+CGK 처리 그룹에서 유의성있는 감소를 나타내었다(Fig. 33B). 따라서 이러한 결과는 청국장이 PA로 유도된 귀 두께 및 정맥의 증가를 효과적으로 억제함을 제시한다.

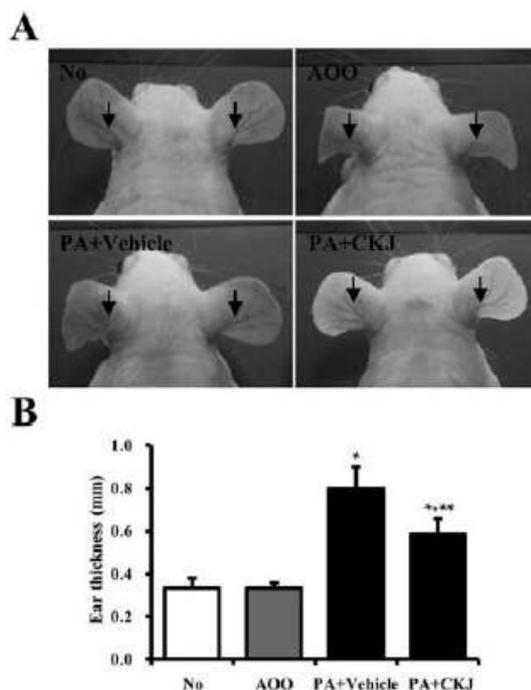


Figure 33. Differences in ear phenotypes and ear thickness. (A) Ear phenotypes of mice in the four groups were observed by photo images taken during the repeated application of phthalic anhydride (PA) + cheonggukjang (CKJ). Arrows indicate the ear vein. PA solution was repeatedly applied to the dorsum of ears of IL-4/Luc/CNS-1 transgenic (Tg) mice during oral gavage of CKJ. (B) After 4 weeks, ear thickness was observed as described in 'Materials and methods'. Data shown are the means \pm standard deviation (SD) (n=5). *P<0.05 indicates a significant difference compared to the acetone.olive oil (AOO)-treated group. **P<0.05 indicates a significant difference compared to the PA + Vehicle.treated group.

(3) 홍문동이 Luciferase 발현에 미치는 영향

본 실험에서 사용한 IL-4 형질전환 마우스는 Luciferase 벡터에 Human IL-4 promotor를 삽입시킨 것으로 이는 알러지 반응이 진행됨에 따라 분비되는 여러 cytokine 중 IL-4 발현으로 인한 promotor 촉진으로 형질전환 마우스 내의 Luciferase 발현양이 높아지게 된다. 이러한 원리를 이용하여 체내에 Luciferase의 기질 중 하나인 D-luciferin(Sigma-Aldrich, MO, USA)을 복강투여하여 D-luciferin의 분해에 따른 형광량을 In Vivo Imaging System(IVIS, Xenogen, CA, USA)을 통해 측정하였다. Whole body image 결과는 no 처리 그룹과 AOO 처리 그룹에서는 어느 인광도 관찰되지 않았으나 PA+vehicle 처리 그룹에서는 가장 높은 수치로 인광이 측정되었고 PA+CGK 처리 그룹에서는 그 수치가 현저히 줄어드는 것을 확인하였다(Fig. 34A). 또한 tissue shot 에서는 whole body image와 마찬가지로 no 처리그룹에서는 어느 인광도 발견되지 않았으나 PA+vehicle 처리 그룹에서는 홍선에서 높은 인광이 측정되었으며 PA+CGK 처리 그룹에서는 그 수치가 줄어들었다(Fig. 34B). 따라서 이러한 결과는 청국장이 PA로 유도된 알러지 반응에 대한 치유효과가 있음을 제시한다.

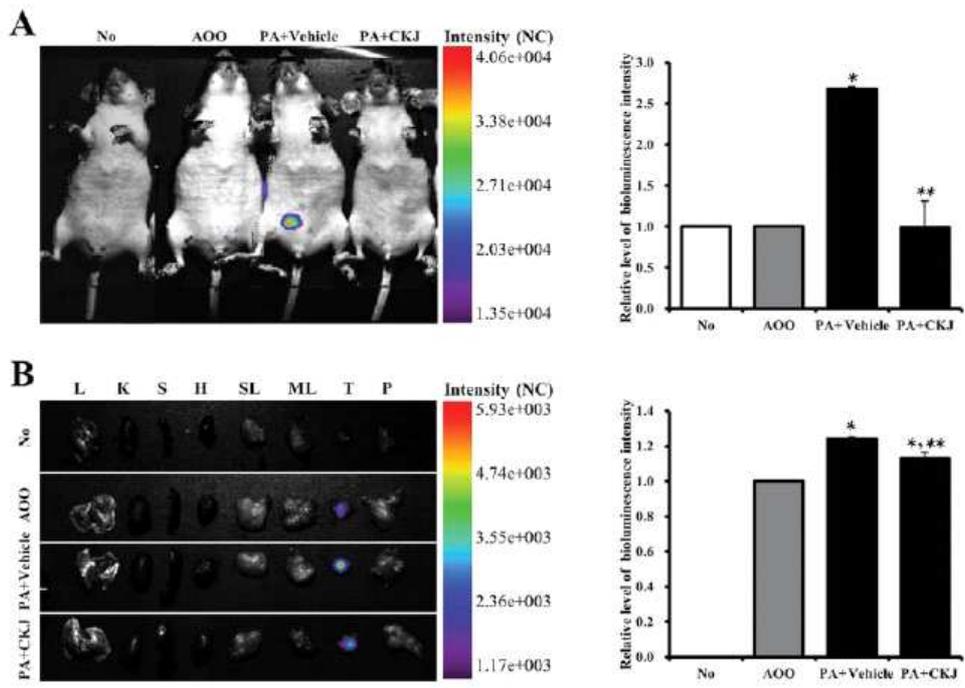


Figure 34. (A) Detection of luciferase signals in the whole body and (B) each organ of IL-4/Luc/CNS-1 transgenic (Tg) mice. Mice were treated with acetone\olive oil (AOO), phthalic anhydride (PA) + Vehicle and PA + cheonggukjang (CKJ) for 4 weeks and then imaged at 24 h after final treatment using the Living Image software. Color overlay on the image represents the photons per second emitted from the organs in accordance with the pseudocolor scale shown next to the image. In this image, red indicates the highest number of photons per second, while blue indicates the lowest number of photons per second. L, lung; K, kidney; S, spleen; H, heart; SL, submandibular lymph node; ML, mesenteric lymph node; T, thymus; P, pancreas. Data shown are the means \pm standard deviation (SD) (n=5). *P<0.05 indicates a significant difference compared to the AOO-treated group. **P<0.05 indicates a significant difference compared to the PA + Vehicle-treated group.

(4) 청국장이 체중과 장기 무게에 미치는 영향

실험기간 동안의 체중변화를 측정하였으나 그룹간의 유의적인 변화는 나타나지 않았다(Fig. 35A). 면역기관의 무게 증가는 알리지 반응 또는 감수성을 나타낸다. 따라서 면역기관의 무게를 측정한 결과 PA+vehicle 처리 그룹은 AOO 처리 그룹에 비해 비장과 림프절의 무게가 증가하였다. 그러나 그 무게는 PA+CGK 처리 그룹에서 유의성있는 감소를 나타내었다(Fig. 35 B,C). 하지만 흉선의 무게는 PA+vehicle과 PA+CGK 처리 그룹간에 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다(Fig. 35D). 따라서 이러한 결과는 청국장이 PA 처리로 인한 비장과 림프절의 무게 증가를 줄이는 효능이 있음을 제시한다.

(5) 청국장이 조직학적 변화에 미치는 영향

각각의 실험그룹에서 적출한 귀조직은 부검 직후 10% 포르말린용액에 48시간 고정한 후, 적당한 크기로 절단하여 카세트에 넣은 후 조직처리기(Shandon Citadel 1000, Shandon Scientific Ltd., Cheshire, UK)를 이용하여 고정시켰다. 고정된 조직은 Paraffin Embedding Station (Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Germany)을 사용하여 함침시킨 후 Rotary Microtome (Leica Microsystems Nussloch GmbH)을 사용하여 박절하였다. 조직 내 표피, 진피 등의 변화를 알아보기 위하여 H&E 염색을 실시하였고, 이는 박절된 조직을 xylene에 3분씩 3번, 100% alcohol에 각각 2분, 1분 담근 후 95, 80, 70% alcohol에 각각 1분 30초씩 담근 후에 물로 1분 세척한 뒤 hematoxylin (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA)에 3분, 1% acid-alcohol에 30초, 10% scott's tap water (Sigma-Aldrich)에 1분, eosin (Sigma-Aldrich)에 3분동안 처리하여 조직 염색을 실시하였다. 염색된 조직은 다시 70, 80, 95, 100% alcohol의 순서로 탈수과정을 거치고 마지막으로 xylene에 3분씩 3번 처리하였다. 마지막으로 kanadabalsam과 xylene을 섞은 고정제를 이용하여 조직을 슬라이드에 고정시킨 후 건조하였다. 귀조직 변화에 미치는 청국장의 영향은 BX50F-3 현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였으며, Leica Application Suite (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)를 이용하여 분석하였다. 또한, 비만세포의 침투를 분석하기 위하여 Toluidine blue 염색을 실시하였으며, 염색방법은 0.25% Toluidine blue 염색용액에 10초간 담근 후에 탈수과정을 거친다는 것을 제외하고는 Hematoxylin과 Eosin 염색법과 동일하게 실시하였다. 그 결과, 표피와 진피의 두께

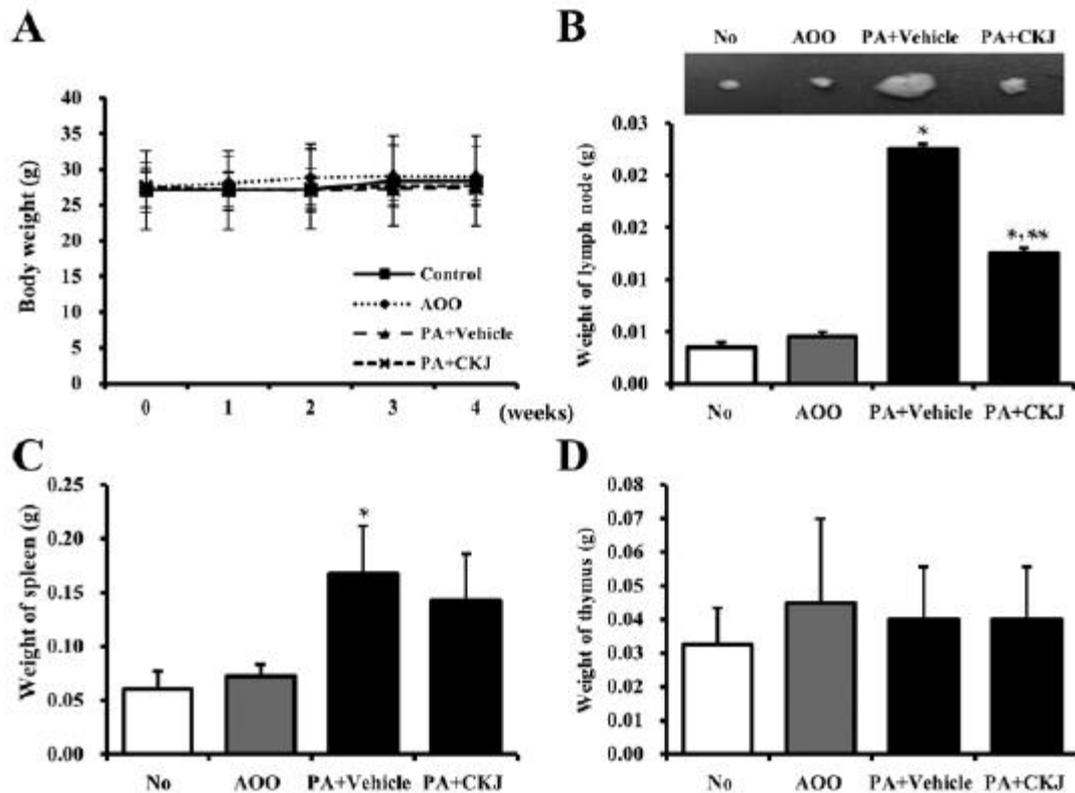


Figure 35. Differences in body and organ weight. (A) Body weight of mice in the four groups were measured with a chemical balance. Phthalic anhydride (PA) solution was repeatedly applied to the dorsum of ears of IL-4/Luc/CNS-1 transgenic (Tg) mice during oral gavage of cheonggukjang (CKJ). After final administration, mice from each group were sacrificed under anesthesia. (B) The auricular lymph nodes (ALN) were then harvested from the neck regions of the mice using a microscissor, after which they were weighed using a chemical balance. (C) The spleen and (D) thymus weight were analyzed using a chemical balance. Data shown are the means \pm standard deviation (SD) (n=5). *P<0.05 indicates a significant difference compared to the acetone-olive oil (AOO)-treated group. **P<0.05 indicates a significant difference compared to the PA + Vehicle-treated group.

는 PA+vehicle 처리 그룹이 AOO 처리 그룹에 비하여 증가하였다. 진피의 두께는 PA+CGK 처리 그룹에서 감소하였으며(Fig. 36A, Bb), 표피의 두께는 PA+vehicle 처리 그룹보다 PA+CGK 처리 그룹에서 더 증가한 결과를 나타내었다(Fig. 36B, Ba). Toluidine blue 염색 결과, PA 그룹에서 mast cell의 수가 급증하였으며 이는 PA+CGK 처리 그룹에서 유의성 있게 감소하였다(Fig. 36A, Ba). 이는 청국장이 PA에 의해 유발된 귀 두께의 증가 및 알러지 유발 면역 세포인 mast cell의 증가를 저해하여 염증반응을 억제시킴을 시사한다.

(6) 청국장이 면역학적 변화에 미치는 영향

청국장이 면역학적 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 혈청 내 면역글로불린 E의 농도를 측정하였다. 혈청내의 면역글로불린 E의 농도를 알아보기 위하여 Mouse IgE ELISA kit (Shibayagi, Inc., Gunma, Japan)를 이용하여 측정하였다. 실온에서 antibody-coated plate의 커

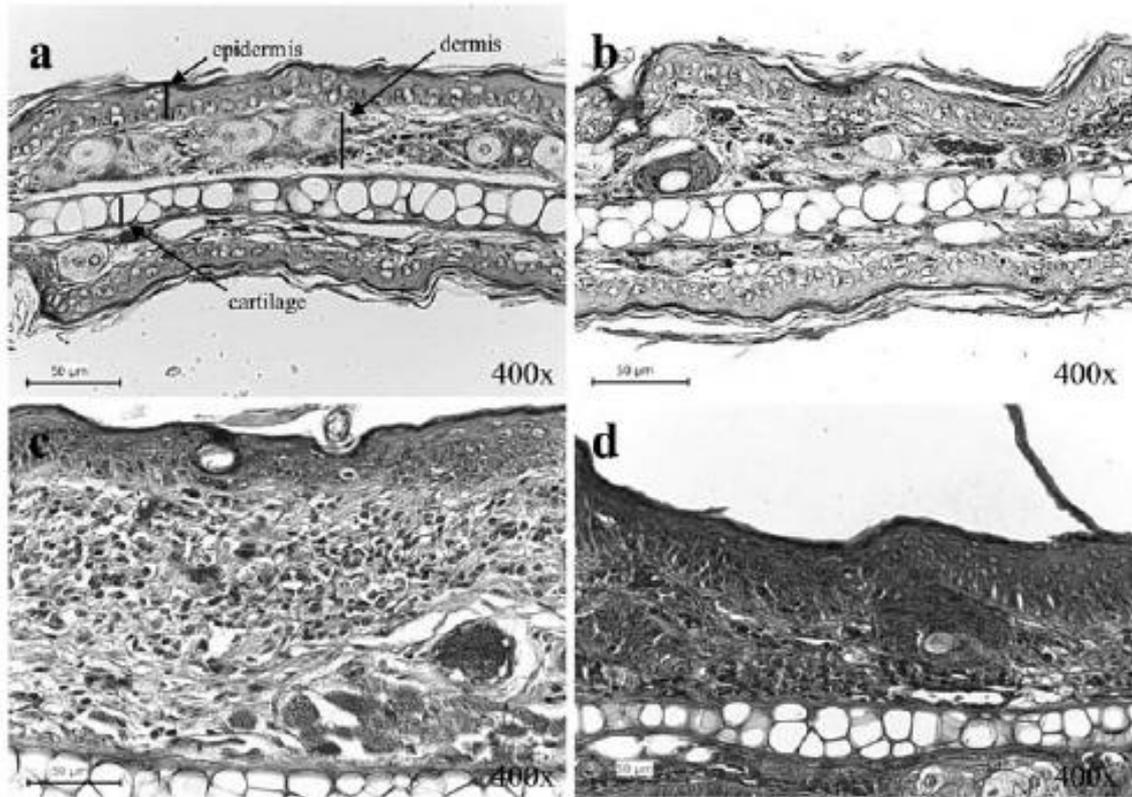
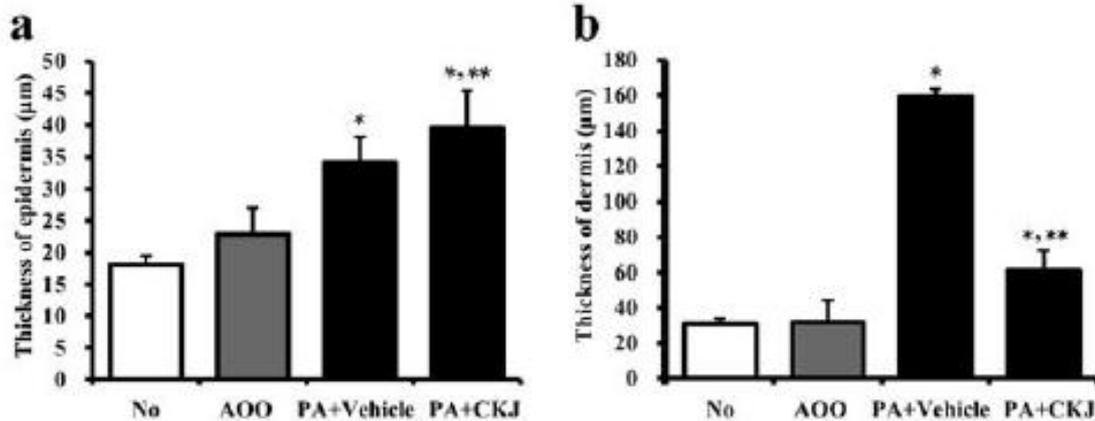
A**B**

Figure 36. Histopathology of ear tissue in IL-4/Luc/CNS-1 transgenic (Tg) mice (A-a) with no treatment (No), and those treated with (A-b) acetone-olive oil (AOO), (A-c) phthalic anhydride (PA) + Vehicle, and (A-d) PA + cheonggukjang (CKJ). PA solution was repeatedly applied to the dorsum of ears of IL-4/Luc/CNS-1 Tg mice during oral gavage of CKJ. After 4 weeks, histological changes were observed as described in 'Materials and methods'. (A) Slide sections of ear tissue were stained with hematoxylin and eosin and observed at x400 magnification. (B-a) The average thickness of the epidermis and (B-b) dermis are presented as graphs. Data shown are the means \pm standard deviation (SD) (n=5). *P<0.05 indicates a significant difference compared to the AOO-treated group. **P<0.05 indicates a significant difference compared to the PA + Vehicle-treated group. ***P<0.001 indicates a significant difference compared to the PA + Vehicle-treated group.

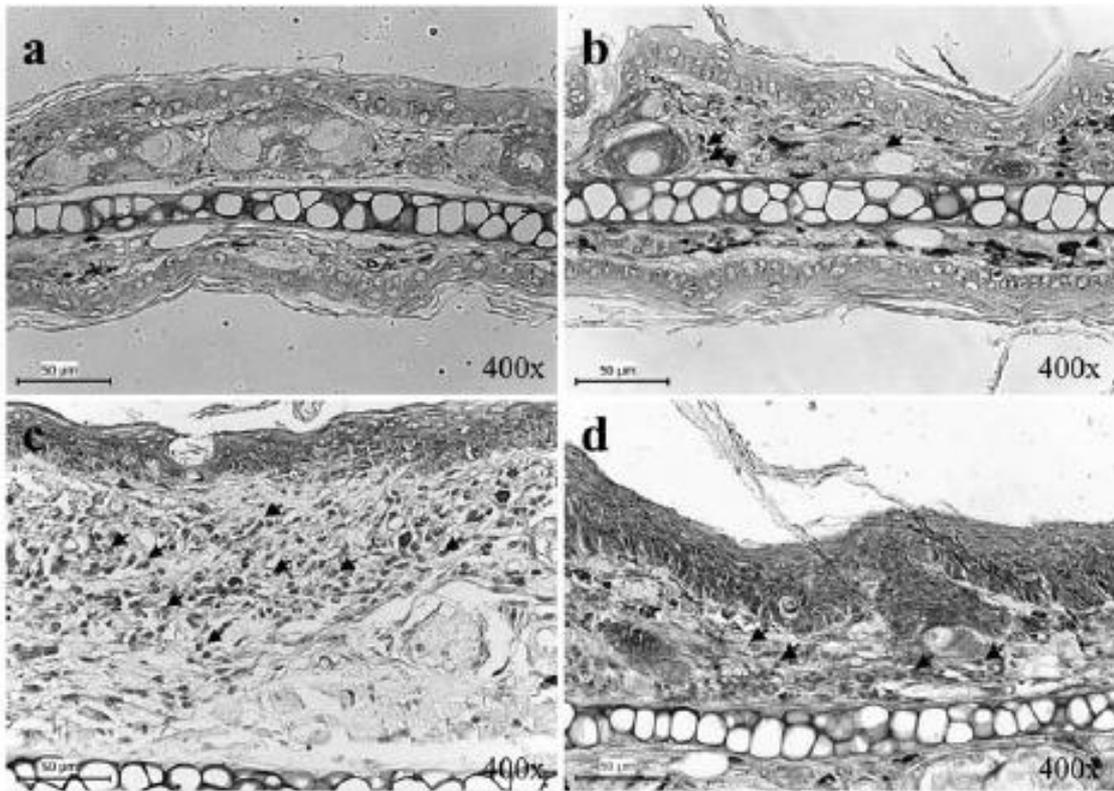
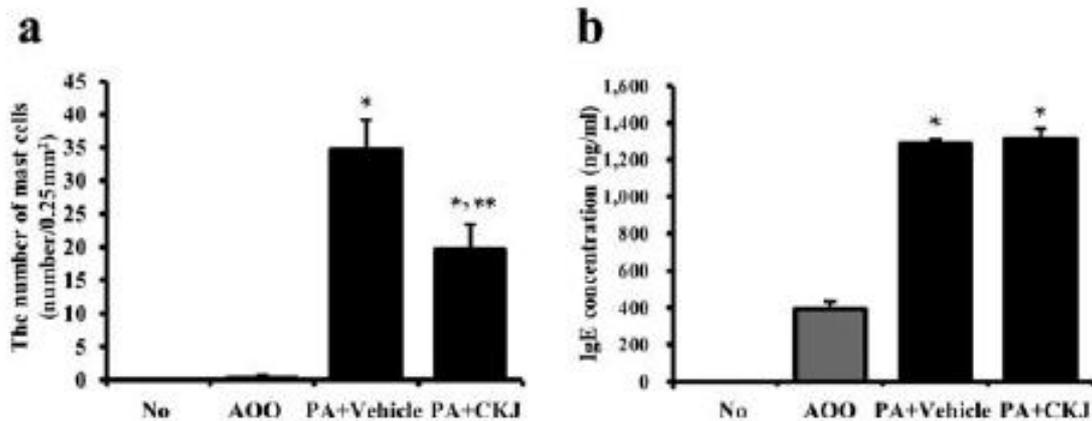
A**B**

Figure 37. Infiltration of mast cells in IL-4/Luc/CNS-1 transgenic (Tg) mice (A-a) with no treatment (No), and those treated with (A-b) acetone-olive oil (AOO), (A-c) phthalic anhydride (PA) + Vehicle, and (A-d) PA + cheonggukjang (CKJ). (A) Slide sections of ear tissue were stained with 0.25% Toluidine blue and observed at x400 magnification. Arrows indicate infiltrated mast cells in the dermis of ear. (B-a) The average number of mast cells is presented as a graph. (B-b) Serum used to measure the IgE concentration was prepared from blood samples collected from the abdominal veins of mice. Serum IgE concentration was quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Data shown are the means \pm standard deviation (SD) (n=5). *P<0.05 indicates a significant difference compared to the AOO-treated group. **P<0.05 indicates a significant difference compared to the PA + Vehicle-treated group.

버를 제거하고 안에 든 내용물을 버린 후 washing buffer(50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)로 채워서 plate를 3회 씻어내었다. 혈청 샘플은 buffer solution를 이용하여 희석한 후 standard solution을 농도별로 50ul 씩 만들었다. 각 well에 희석한 혈청 샘플을 50ul 씩 넣고 standard solution을 50ul 씩 넣었다. 그 후 330rpm에서 1분 동안 shaking 한 후 상온에서 2시간 배양하였다. 배양이 끝난 well 의 내용물을 버린 후 washing buffer로 3번 씻어내고 HRP-conjugated avidin을 50ul 씩 모든 well 에 넣어준 후 330rpm에서 1분간 shaking하여 1시간 배양하였다. 내용물을 버린 후 washing buffer로 3번 헹궈 준 후 chromogenic substrate reagent-TMB를 각 well 에 50ul 씩 넣고 330rpm에서 1분간 shaking하였다. 상온에서 20분 배양한 후 reaction stopper를 50ul 씩 넣고 330rpm에서 1분간 shaking 해준 후 마지막으로 450nm에서 30분 이내에 흡광도를 측정하였다. 그 결과, no 처리 및 AOO 처리 그룹보다 PA+vehicle 처리 그룹에서 면역글로불린 E의 농도가 급격히 증가하였다. 하지만 PA+CGK 처리 그룹에서 유의적인 변화는 관측되지 않았다(Fig. 37). 따라서 이러한 결과는 청국장이 PA로 유도된 면역글로불린 E의 증가를 억제시키지 못함을 제시한다.

(7) 청국장이 사이토카인 발현에 미치는 영향

청국장이 피부질환으로 인한 사이토카인 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 VEGF와 IL-6 단백질의 발현량을 western blot으로 측정하였다. 간략히, IL-4/Luc/CNS-1 Tg 마우스의 귀조직에 PRO-PREP Solution (iNtRON Biotechnology, Korea)을 첨가하여 분쇄한 후 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질의 농도는 SMARTTM BCA Protein Assay Kit (iNtRON Biotechnology)을 이용하여 정량하였으며, 30 ug의 단백질을 western blot에 사용하였다. 먼저, 6-10% SDS-PAGE gel에 단백질을 전기영동한 후 Enhanced Chemiluminescence (ECL) membrane (Amersham Life Science, Piscataway, NJ)에 전이하고, 5% skim milk에서 1시간 동안 블로킹하였다. 각 membrane은 anti-VEGF antibody (Peprotech Inc., Rocky Hill, NJ, USA), anti-IL-6 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), and anti-actin antibody (Sigma-Aldrich)등의 1차 항체로 4°C에서 밤새 배양한 후 HRP-conjugated된 secondary 항체를 첨가하여 ECL Kit (Amersham Life Science, Piscataway, NJ)를 이용하여 발현을 확인하였다. 그 결과 PA+vehicle 처리 그룹에서 VEGF의 발현이 유의적으로 증가하였으나 PA+CGK 처리 그룹에서 감소하였다(Fig. 38A, Ba). IL-6 단백질의 발현량도 이와 유사하게 PA+vehicle 처리 그룹에서 증가하였지만 PA+CGK 처리 그룹에서 감소하였다(Fig. 38A, Bb). 따라서 이러한 결과는 청국장이 PA로 유도된 알러지 반응을 VEGF와 IL-6 단백질 발현 조절을 통해 완화시킴을 제시한다.

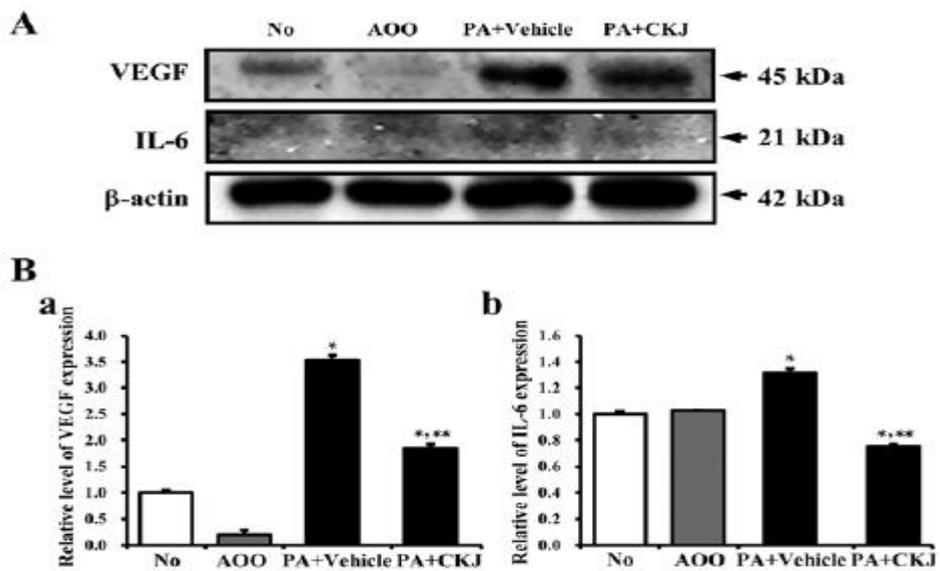


Figure 38. Expression of VEGF and IL-6 in lymph nodes. (A) Alteration of the expression of the two proteins was measured by western blot analysis. After the intensity of each band was determined using an imaging densitometer, (B) the relative level of each protein was calculated based on the intensity of actin protein. Data shown are the means \pm standard deviation (SD) from three replicates. * $P < 0.05$ indicates a significant difference compared to the acetone-olive oil (AOO)_treated group. ** $P < 0.05$ indicates a significant difference compared to the phthalic anhydride (PA) + Vehicle-treated group

다. 기능성 제품의 학습력에 대한 약리효능 평가

(1) 동물실험설계

실험에 사용된 실험동물은 specified pathogen free (SPF) 상태의 수컷 ICR 마우스(6주령, 20 ± 5 g)로서 샘타코(Osan, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 모든 마우스는 방사선 조사된 사료(Purina, Seoungnam, Korea)를 자유급식 하도록 하였고, 12시간의 조명주기(08:00~20:00)로 SPF상태에서 온도 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 5\%$ 의 조건으로 관리되고, 국제실험동물인증협회(AAALAC International, 인증번호 : 001525)의 인증을 획득한 부산대학교 청정실험동물센터에서 사육하였다. 또한 본 연구는 부산대학교 동물실험윤리위원회(PNU-IACUC)로부터 과학성과 윤리성에 대한 심사를 거쳐 승인(승인번호: PNU-2013-0465)을 받아 수행되었다. 청국장의 기억장애 예방효과를 알아보기 위하여 ICR 마우스는 다섯 개의 그룹으로 나누어 실험을 진행하였다($n=16$ per group); 대조군, TMT/vehicle 처리 그룹, TMT/L-CGK 처리 그룹, TMT/M-CGK 처리 그룹, TMT/H-CGK 처리 그룹. 첫 번째 그룹은 실험동안 아무 처리도 하지 않았으며, 두 번째 그룹은 일정한 양의 물을 구강투여하였다. 나머지 세 그룹은 저농도(25 mg/kg, L-CGK), 중농도(50 mg/kg, M-CGK), 그리고 고농도(100 mg/kg, H-CGK)의 청국장을 4주간 매일 구강투여 하였다. 청국장 투여가 끝난 후 기억장애를 유발하기 위하여 대조군은 PBS를 복강투여 하였으며, 나머지 네 그룹은 Trimethyltin (TMT, 2.5 mg/kg)을 복강투여하였다. 투여가 완료된 후 마우스는 행동학적 검사를 실시한 뒤 Zoletil(VirBac, Corros cedex, France)을 이용해서 마취하여 혈액과 조직들을 적출하여 분석에 사용하였다.

(2) 청국장이 기억장애 보호에 미치는 영향

청국장이 단기 기억장애에 미치는 영향을 알아보기 위하여 행동학적 검사를 실시하였다. 단기 기억손실에 미치는 영향을 평가하기 위하여 novel-object recognition test를 1시간 간격을 두어 실시한 결과,, 대조군의 새로운 물체에 대한 선호도는 retention period에서 증가하였다. 그러나 TMT/vehicle 처리그룹에서는 유의성 있는 차이가 나타나지 않았다. 세 농도의 CGK 처리 그룹의 경우 농도의존적으로 새로운 물체에 대한 선호도가 증가(15-34%)하여 대조군과 유사한 결과를 나타내었다(Fig. 39A). 청국장이 장기기억에 미치는 영향을 알아보기 위하여 passive avoidance test를 24시간 간격으로 실시하였다. 그 결과, TMT/vehicle 처리그룹은 기억장애가 유발되어 대조군에 비해 대기시간이 감소한 반면 청국장 처리 그룹은 모두 유의성 있는 대기시간의 증가를 나타내었다(Fig. 39B). 따라서 이러한 결과는 청국장 섭취가 TMT로 유도된 기억장애를 효과적으로 보호함을 제시한다.

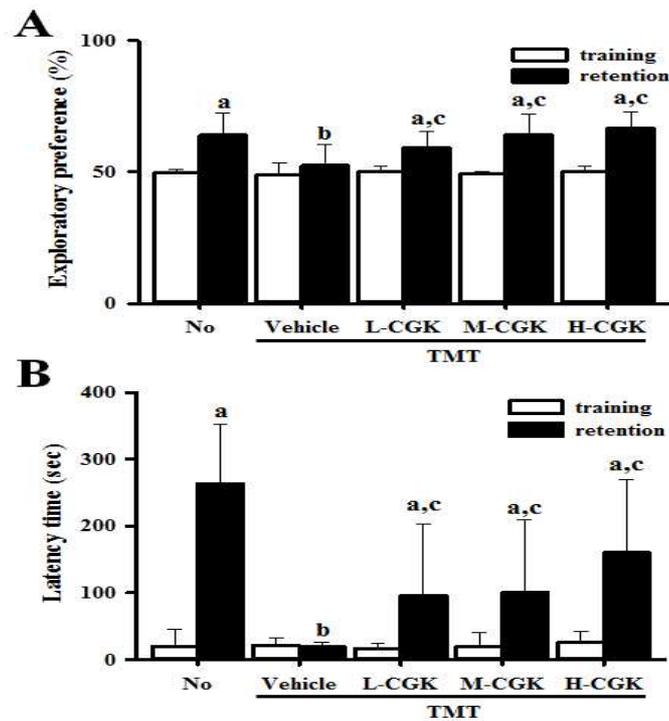


Figure 39. Alteration of cognitive defects of ICR mice. (A) A novel objective recognition test was conducted to measure the time spent exploring any one of two objects for 10 min. (B) A passive avoidance test was conducted to check the step-through latency for 300 s. The behavioral changes in mice were measured for 3 days after TMT injection. Ten mice per group were assayed in the cognitive defect test. Data shown are the means \pm SD (n=10). a, $p < 0.05$ compared to the training group. b, $p < 0.05$ compared to the No treated group. c, $p < 0.05$ compared to the TMT/vehicle treated group.

(3) 청국장이 신경세포사의 보호에 미치는 영향

청국장이 TMT로 유발된 세포사의 보호에 미치는 영향을 알아보기 위하여 cresyl violet 염색을 실시한 뒤 광학현미경을 이용하여 관찰하였다. 그 결과, TMT/vehicle 처리 그룹의 dentate gyrus 부분에서 죽은 세포의 수는 대조군에 비하여 유의적으로 증가하였다. 그러나 그 수는 CGK를 투여함으로 감소하였으며 특히 TMT/H-CGK 처리 그룹에서 가장 큰 감소를 나타내었다(Fig. 40A and B). 따라서 이러한 결과는 청국장 섭취가 신경세포사를 효과적으로 예방함을 제시한다.

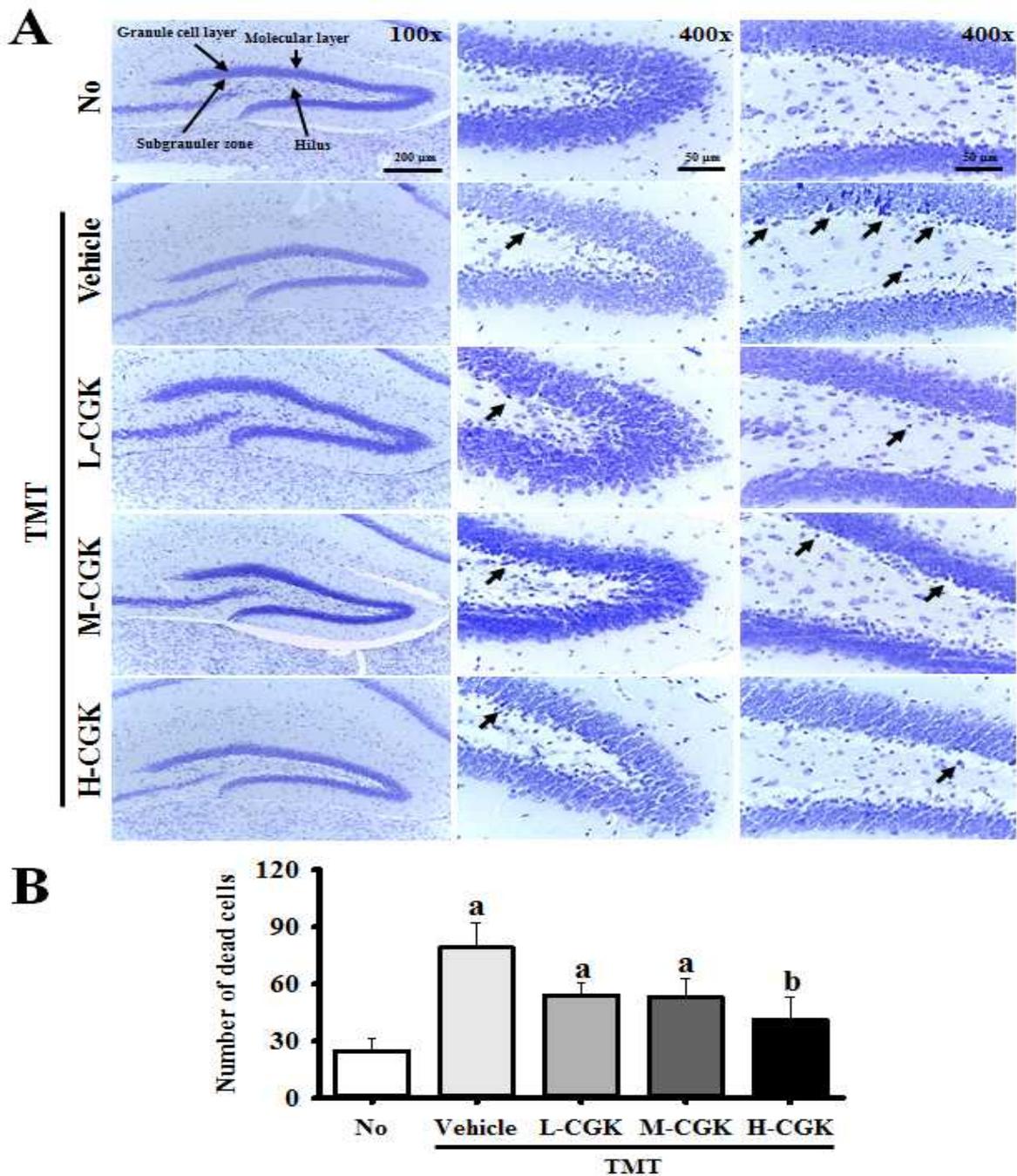


Figure 40. Observation of Nissl-stained neurons in the hippocampus of mice. After TMT injection into mice pretreated with CGK for 4 weeks, brain tissues were collected from the No, TMT/vehicle, TMT/L-CGK, TMT/M-CGK and TMT/H-CGK treated groups. Histological changes were determined as described in the Materials and Methods. The slide sections of brain tissue were stained with Nissl and then observed at 400x magnification. Data shown are the means \pm SD ($n=5$). a, $p < 0.05$ compared to the No treated group. b, $p < 0.05$ compared to the TMT/vehicle treated group.

(4) 청국장이 acetylcholinesterase (AChE) activity에 미치는 영향

청국장이 TMT로 인해 증가된 AChE activity에 미치는 영향을 확인하기 위하여 AChE assay kit (ab138871, Abcam, Cambridge, UK)을 이용하여 분석하였다. 그 결과, AChE activity는 TMT/vehicle 처리 그룹에서 대조군보다 약 25% 증가하였다. 그러나 CGK 처리 그룹에서는 농도와 관계없이 TMT/vehicle 처리 그룹뿐만 아니라 대조군보다 더 감소하는 결과를 나타내었다(Fig. A). 따라서 이러한 결과는 청국장 섭취가 AChE activity를 저해시킴으로써 기억력을 효과적으로 개선함을 제시한다.

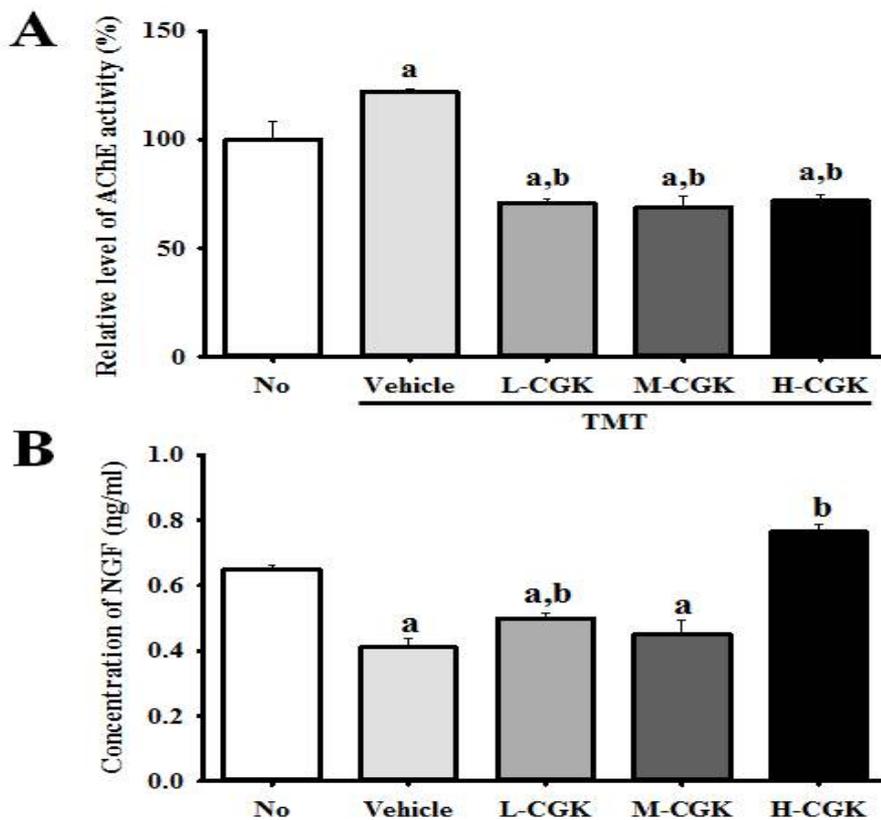


Figure 41. Measurement of AChE activity and NGF concentration. (A) AChE activity was measured using the homogenate of hippocampus tissue collected from two mice after TMT treatment. (B) NGF concentration in the blood serum of the subset group was measured using an anti-NGF ELISA kit. Data are reported as the mean \pm SD of three experiments. a, $p < 0.05$ compared to the No treated group. b, $p < 0.05$ compared to the TMT/vehicle treated group.

(5) 청국장이 신경세포의 성장과 생존에 미치는 영향

청국장이 신경세포의 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 NGF ELISA kit (CTY304, Chemicon International Inc., CA, USA)를 이용하여 NGF 농도를 분석하였다. 그 결과, 혈청에서의 NGF 농도는 TMT/vehicle 처리 그룹뿐만 아니라 TMT/L-CGK, TMT/M-CGK

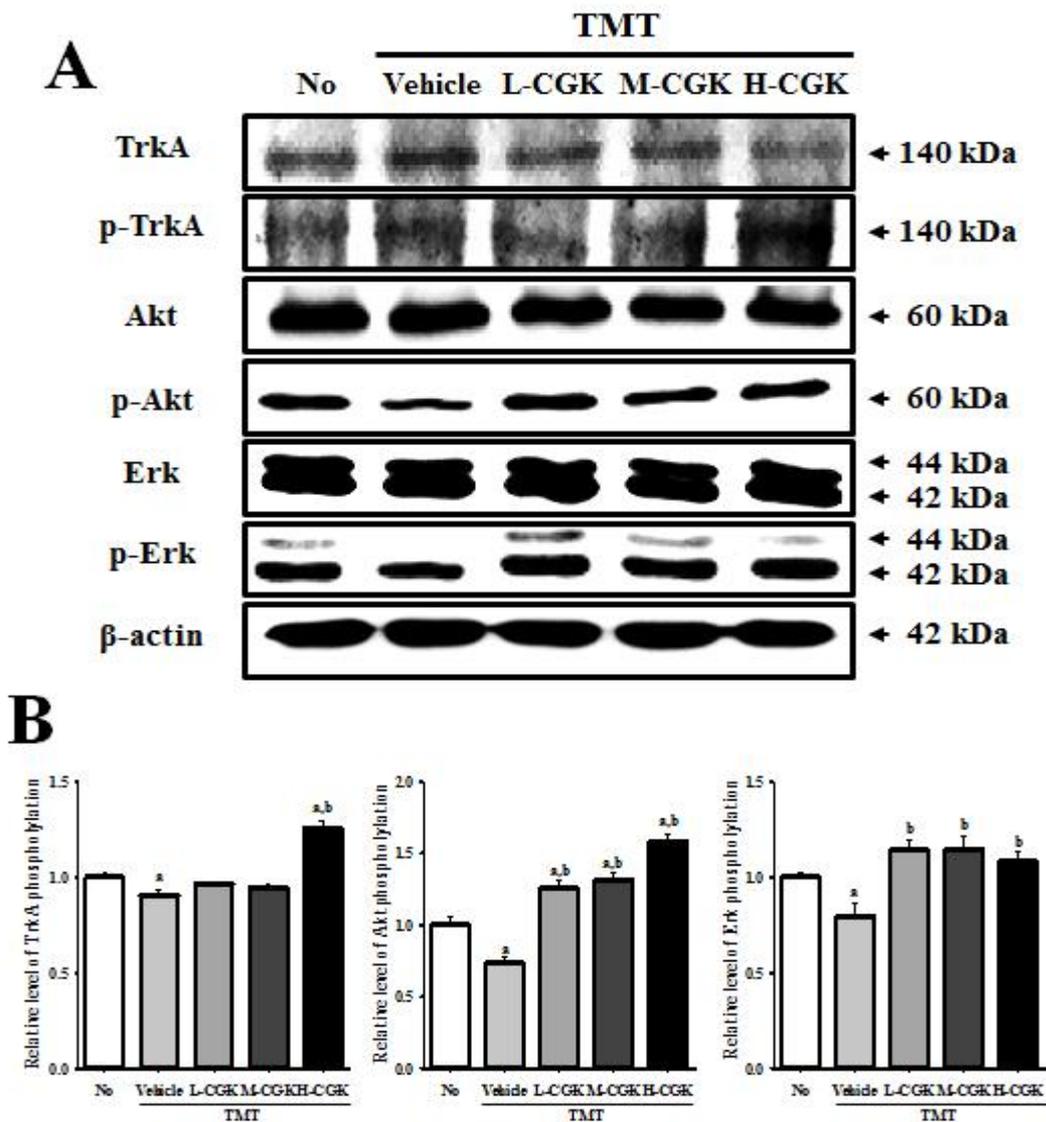


Figure 42. Alteration in the downstream signaling pathway of high affinity NGF receptor. Total tissue lysates were prepared from the hippocampus of TMT injected mice treated with vehicle or CGK as described in the Materials and Methods. A total of 50 μ g of protein per sample were immunoblotted with antibodies for each protein. Three samples were assayed in triplicate by Western blotting. Data are reported as the mean \pm SD. a, $p < 0.05$ compared to the No treated group. b, $p < 0.05$ compared to the TMT/vehicle treated group.

처리 그룹에서도 감소하였다. 그러나 TMT/H-CGK 처리 그룹의 경우 TMT/vehicle 처리 그룹보다 약 180% 증가하였다. 이러한 결과는 청국장 섭취가 NGF 분비능을 증가시킴을 제시한다.

청국장이 NGF signaling pathway의 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 western blot을 실시하였다. 간략히, 마우스의 뇌조직 100 mg을 정량하여, PRO-PREP Protein Extraction Solution (iNtRON Biotechnology, Korea)을 첨가하여 분쇄한 후 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질의 농도는 SMARTTM BCA Protein Assay Kit (iNtRON Biotechnology)을 이용하여 정량하였으며, 30 μ g의 단백질을

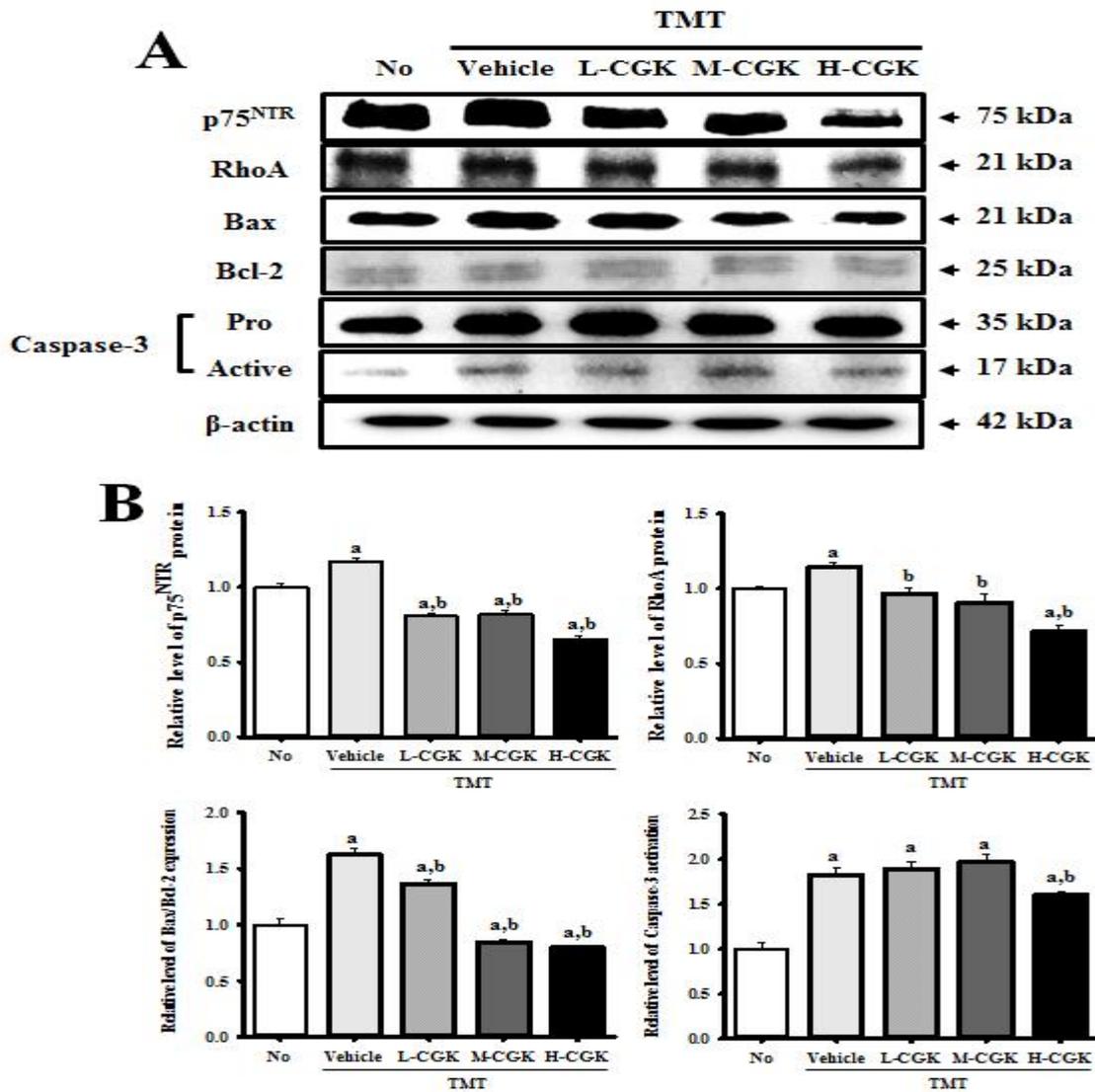


Figure 43. Alteration of the downstream signaling pathway of low affinity NGF receptor. Total tissue lysates were prepared from the hippocampus of TMT injected mice treated with vehicle or CGK as described in the Materials and Methods. A total of 50 μ g of protein per sample was immunoblotted with antibodies for each protein. Three samples were assayed in triplicate by Western blotting. Data are reported as the mean \pm SD. a, $p < 0.05$ compared to the No treated group. b, $p < 0.05$ compared to the TMT/vehicle treated group.

western blot에 사용하였다. 먼저, 6-10% SDS-PAGE gel에 단백질을 전기영동한 후 Enhanced Chemiluminescence (ECL) membrane (Amersham Life Science, Piscataway, NJ)에 전이하고, 5% skim milk에서 1시간 동안 블로킹하였다. 각 membrane은 anti-TrkA (Cat. No. 2505, Cell Signaling, Danvers, MA, USA), anti-pTrkA (Cat. No. 9141, Cell Signaling), anti-Akt (Cat. No. 9272, Cell Signaling), anti-pAkt (Cat. No. 4058, Cell Signaling), anti-ERK (Cat. No. sc-94, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-pERK (Cat. No. sc-7383, Santa Cruz Biotechnology), anti-p75^{NTR}(Cat. No. ab8874, Abcam),

anti-RhoA (Cat. No. 2117, Cell Signaling), anti-Bcl2 (Cat. No. ab7973, Abcam), anti-Bax (Cat. No. ab7977, Abcam), anti-caspase-3 (Cat. No. 9662, Cell Signaling), and anti-actin antibody (Cat. No. A5316, Sigma-Aldrich) 등의 1차 항체로 4°C에서 밤새 배양한 후 HRP-conjugated된 secondary 항체를 첨가하여 ECL Kit (Amersham Life Science, Piscataway, NJ)를 이용하여 발현을 확인하였다. 그 결과, NGF 고친화성 수용체 연관 단백질 (TrkA, Akt, Erk)의 인산화는 TMT/vehicle 처리 그룹에서 감소하고 청국장 처리 그룹에서 증가하는 경향을 나타내었다. 특히, TrkA와 Akt의 인산화는 TMT/H-CGK 처리 그룹에서 가장 높게 나타났다(Fig. 42). 한편, NGF 저친화성 수용체 연관 단백질 중 P75^{NTR}, RhoA 단백질의 발현량과 Bax/Bcl-2 단백질의 비율은 vehicle/TMT 처리 그룹에서 증가하였다가 청국장 처리로 감소하는 경향을 나타내었으며 특히 TMT/H-CGK 처리 그룹에서 가장 많이 감소하였다. 하지만 Caspase-3 단백질의 활성의 경우 TMT/L-CGK와 TMT/M-CGK 처리 그룹에서는 vehicle/TMT 처리 그룹과 유사한 경향을 나타내었으나 TMT/H-CGK 처리 그룹에서 유의적인 감소를 나타내었다(Fig. 43). 따라서 이러한 결과는 NGF 농도는 청국장 섭취로 증가하며 NGF signaling pathway를 통해 신경세포 보호효과를 나타냄을 제시한다.

(6) 청국장이 산화적 스트레스에 미치는 영향

마지막으로, CGK가 TMT로 유발된 산화적 스트레스에 미치는 영향을 확인하기 위하여 lipid peroxidation (MDA)의 농도를 MDA assay Kit (Cat. No. MAK085, Sigma-Aldrich)를 이용하여 분석하였고 superoxide dismutase (SOD)의 활성은 SOD Assay kit (Cat. No. S331, Dojindo Molecular Technologies, Inc., Japan)을 이용하여 분석하였다. 그 결과 MDA의 농도는 TMT/vehicle 그룹이 대조군에 비하여 약 20% 높았으나 청국장 처리 그룹에서는 농도와 관계 없이 유의적인 감소를 나타내었다. SOD 활성의 경우 MDA 농도와는 반대로 TMT/vehicle 처리 그룹이 대조군에 비해 약 37% 감소하였다. 그러나 TMT/L-CGK와 TMT/M-CGK 처리 그룹에서 SOD 활성은 대조군 수준으로 회복되었으며, TMT/H-CGK 처리 그룹에서는 대조군 이상의 활성을 나타내었다(Fig. 44). 따라서 이러한 결과는 CGK 섭취는 MDA 농도 저해와 SOD 활성 증가를 통해 항산화 효과를 나타냄을 제시한다.

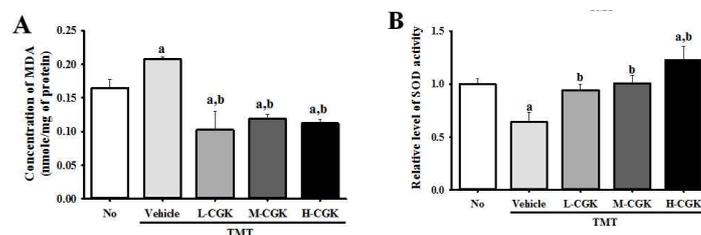


Figure 44. Alteration of oxidant stress parameters in the examined group. (A) The level of MDA was determined in the hippocampus tissue collected from the brains of mice using a lipid peroxidation assay kit that could detected MDA at 0.1 nmole/mg to 20 nmole nmole/mg. (B) SOD activity was measured in the homogenate of hippocampus tissue collected from two mice pretreated with GCK after TMT treatment. Three samples were assayed in triplicate by MDA and SOD assay. Data are reported as the mean±SD. a, $p < 0.05$ compared to the No treated group. b, $p < 0.05$ compared to the TMT/vehicle treated group.

9. KFDA 허가자료

마지막으로 본 연구에서는 향후 다양한 청국장제품에 대한 식약처 인증을 위해 인증절차 등에 대한 조사를 수행하였고, 이들 중 안전성에 대한 자료, 효능에 대한 자료 등 기초자료를 예비자료를 준비하여 대비하고자 하였다.

제 3 절 어린이 기호성 청국장 제품의 개발

1. 어린이 기호성 청국장 제품의 개발

가. 기호성 조사

본 과제에서는 어린이 성장발육 · 학습력 증진에 적합한 청국장용 콩품종 선별 및 기능성 제품개발로 어린이들이 쉽게 먹을 수 있는 제품을 개발하기 위해 우선 어린이들에게 청국장에 대한 기호도 조사를 수행하였다.

(1) 어린이 기호성 조사

어린이의 성장발육과 학습력 증진에 도움을 줄 수 있는 청국장 제품을 개발하기 위해 초등학생 118명을 대상으로 하여 아래의 설문지를 활용하여 청국장과 평소 즐겨먹는 제품에 관한 설문조사를 실시하였다.



안녕하십니까?
 저희는 부산대학교 연구팀(김동섭 교수)의 일원으로서 어린이용 청국장 제품을 개발하기 위한 연구를 수행하고 있습니다. 올바른 연구를 위해 어린이들을 대상으로 청국장에 대한 간단한 선호도 조사를 실시하고 있습니다. 바쁘겠지만 잠시 시간을 내어 설문에 응답해 주시면 고맙겠습니다. 본 설문지의 내용 및 결과는 부산대학교에서 진행 중인 '어린이용 청국장 개발'을 위한 연구의 참고자료로만 이용되고, 연구 이외의 다른 목적으로 사용되거나 제공되지 않을 것입니다. 어린이 여러분의 경험을 바탕으로 질문에 답해주시기 바랍니다. 감사합니다.
 부산대학교 식품공학과 김동섭

기본사항 설문조사

1. 어린이는 현재 몇 학년입니까?
 ① 1-2학년() ② 3-4학년()
 ③ 5-6학년() ④ 기 타()

2. 어린이는 여자 혹은 남자입니까?
 ① 여자() ② 남자()

3. 어린이의 부모님의 연령은? (아빠 : 45 세, 엄마 : 43 세)

청국장 설문조사

1. 어린이는 청국장이란 음식을 알고 있나요?
 ① 매우 잘 알고 있다() ② 잘 알고 있다()
 ③ 들어본 적 있다() ④ 모른다()

2. 만약 알고 있다면 어떤 음식이라고 알고 있나요?
 ① 냄세나는 음식() ② 건강에 좋은 음식()
 ③ 맛있는 음식() ④ 우리나라 전통음식()

3. 어린이는 청국장을 먹어본 경험이 있나요?
 ① 많이 먹어봤다() ② 가끔 먹어봤다()
 ③ 한두번 먹어봤다() ④ 먹어본 적 없다()

4. 먹어본 경험이 있다면 주로 어디서 먹었나요?
 ① 집() ② 외식()
 ③ 학교() ④ 기타(남의 집, 체험활동)()

5. 청국장을 먹었을 때 어떠셨나요?
 ① 별다른 느낌이 없었다() ② 맛이 있었다()
 ③ 냄새가 이상했다() ④ 기타()

6. 청국장을 또 먹고 싶은 생각이 듭니까?
 ① 매우 먹고 싶다() ② 약간 먹고 싶다()
 ③ 그저 그렇다() ④ 먹고 싶지 않다()

7. 만약 청국장을 과자(제품)로 만들면 먹겠습니까?
 ① 잘 먹겠다() ② 약간 먹고 싶다()
 ③ 그저 그렇다() ④ 먹고 싶지 않다()

8. 과자로 만든다면 어떤 형태가 좋겠습니까?
 ① 사탕() ② 아이스크림()
 ③ 초콜렛() ④ 기타()

9. 평소에 가장 좋아하고, 즐겨먹는 과자이름을 생각나는 3가지만 써주세요.
 ① (포카칩) ② (바나나칩)
 ③ (새우깡) ④ ()

청국장에 대한 설문조사 결과 대부분의 어린이들은 Fig. 1과 같이 청국장에 대해 알고 있거나 들어본 적이 있다고 하였다.

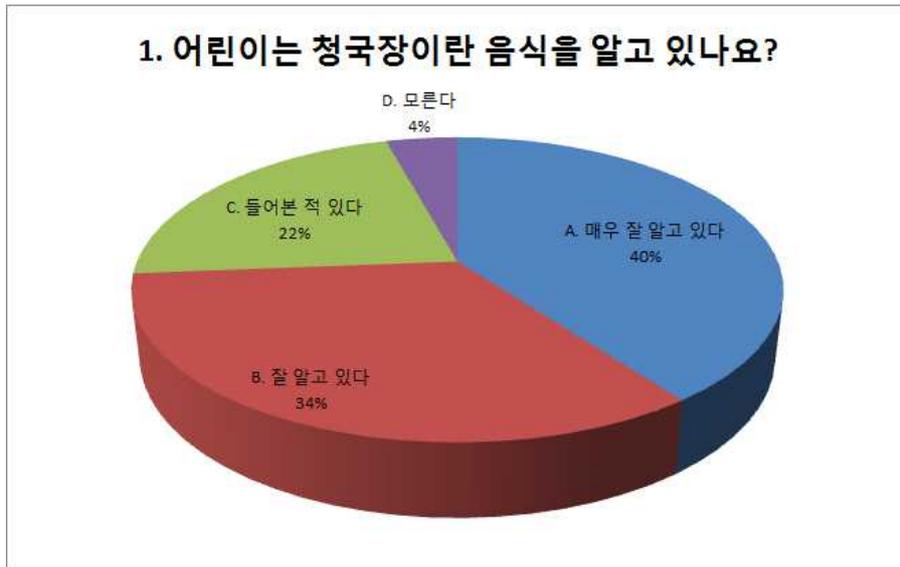


Fig. 1. 청국장 설문 조사 1번 문항

그리고 75% 정도의 어린이들은 청국장이 몸에 좋거나 우리나라 전통음식이라는 호의적인 답을 했지만 25% 정도의 어린이들은 맛이 없거나 냄새에 대한 거부감을 표시하였다(Fig. 2).



Fig. 2. 청국장 설문 조사 2번 문항

실제로 청국장을 먹어본 경험에 대해서는 76% 정도의 어린이들이 먹어본 경험이 있고, 먹어본 장소는 집에서 먹는 경우가 가장 많은 것으로 나타났다.(Fig. 3, 4) 하지만 24%에 해당하는 어린이들은 청국장을 먹어본 경험이 없다고 답하였고, 이들 가운데 대부분은 밀양지역에 거주

하는 어린이들로 오히려 도시에 거주하는 어린이들이 청국장에 대해 많이 알고 있었으며, 먹어본 경험도 많은 것으로 조사되었다. 이러한 결과는 웰빙과 어린이들의 건강에 대한 부모들의 관심의 차이로 인한 것으로 보이며, 추후에 어린이용 청국장을 개발하는데 고려해야할 사항으로 여겨진다.

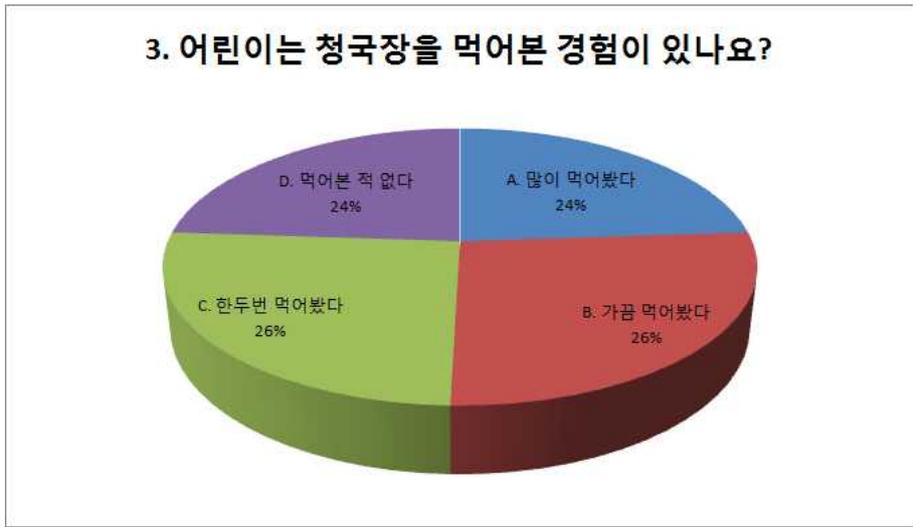


Fig. 3. 청국장 설문 조사 3번 문항

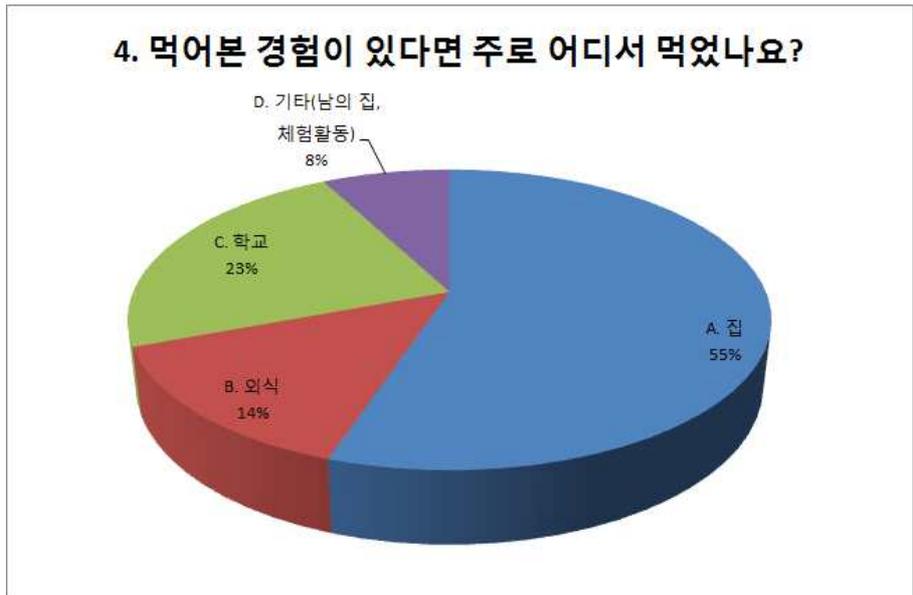


Fig. 4. 청국장 설문 조사 4번 문항

청국장을 먹어본 경험이 있는 어린이들 가운데 46% 정도는 맛이 있었다고 답했지만, 40%가 넘는 어린이들은 냄새가 이상하거나 맛이 없었다고 응답했다(Fig. 5). 그리고, 절반이 넘는 어린이들은 청국장을 다시 먹고 싶지 않거나 그저 그렇다고 답하였다(Fig. 6).

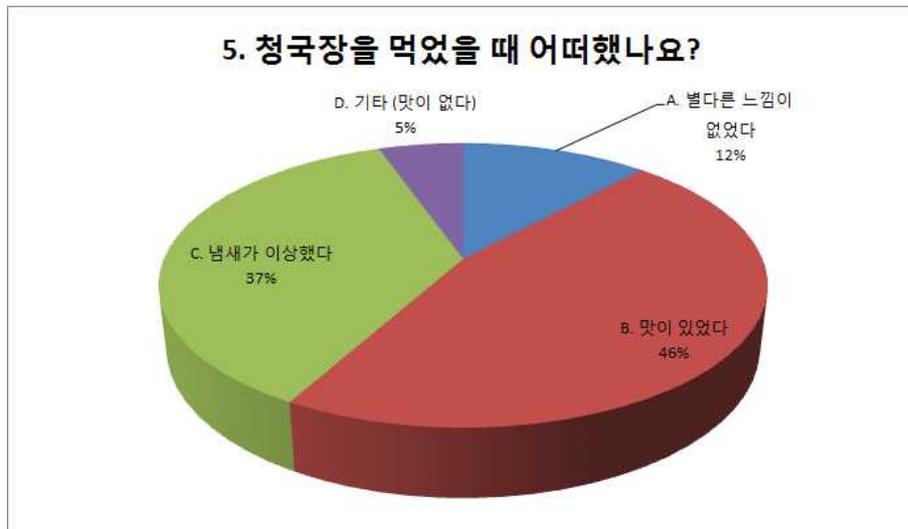


Fig. 5. 청국장 설문 조사 5번 문항

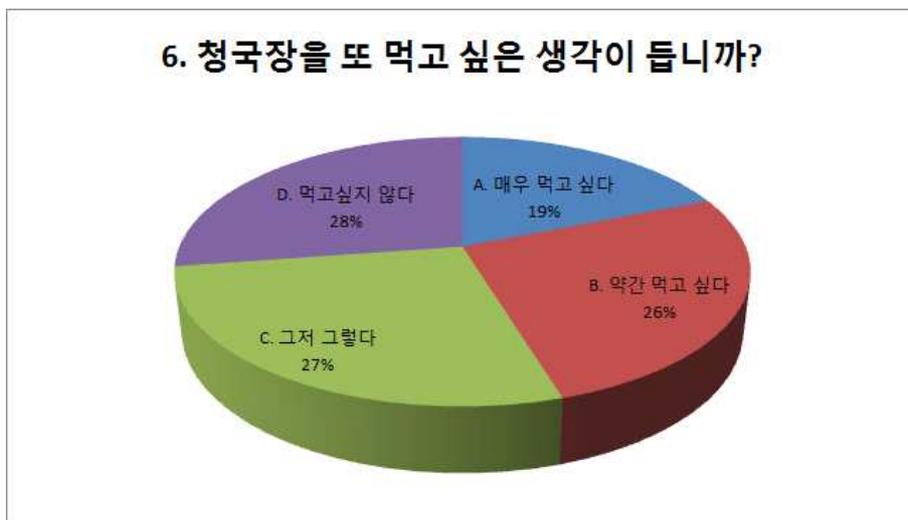


Fig. 6. 청국장 설문 조사 6번 문항

만약 청국장을 어린이들이 좋아하는 과자제품형태로 만들면 먹고 싶다는 어린이들이 10% 이상 증가하였다.(Fig. 7) 따라서 어린이들의 기호에 맞는 청국장 제품을 개발한다면 청국장에 대한 어린이들의 거부감을 감소시키고 청국장 소비도 증가될 수 있을 것으로 여겨진다.

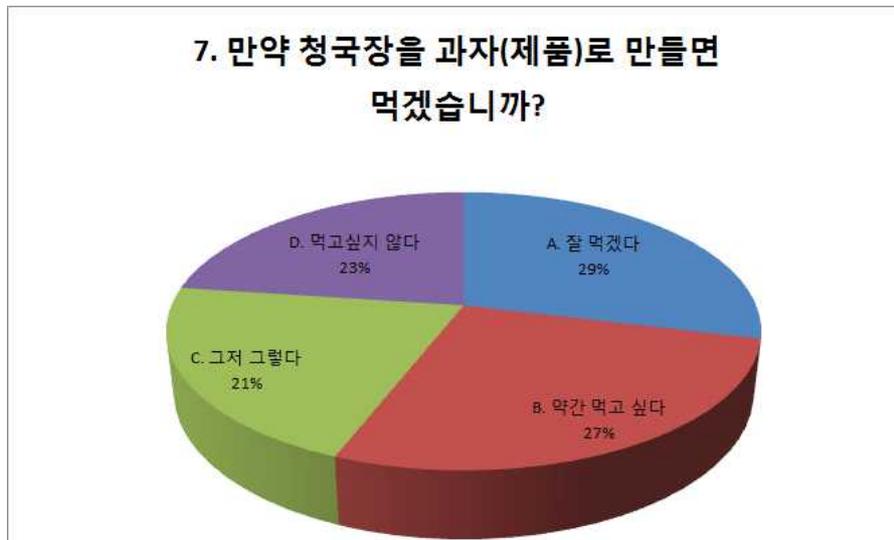


Fig. 7. 청국장 설문 조사 7번 문항

그러나 설문조사 내용 중 청국장의 냄새가 이상하다고 응답한 어린이들은 대부분 청국장을 다시 먹고 싶지 않다고 답하였고, 또한 과자형태의 제품으로 만들어도 먹지 않겠다는 강한 거부감을 표시 하였다. 따라서 향후 연구에서는 청국장제품의 냄새를 제거하거나 약화시키는 연구가 어린이를 대상으로 하는 제품의 성패에 영향을 미칠 수 있는 중요한 요인으로 판단된다.

(2) 어린이 선호제품 파악

청국장을 제품으로 만들 때 어린이들이 가장 선호하는 제품의 형태를 알아보기 위해 즐겨먹는 기존의 과자제품을 알아보았으나, 대부분 나트륨이 많이 첨가된 과자제품들과 초콜렛이 함유된 제품들을 선호하였다. 따라서 어린이의 성장발육과 두뇌활동에 도움을 줄 수 있는 제품을 개발하려는 본 연구의 목적에 부합하지 못한 것으로 판단하여 기존제품과 차별된 독자적인 제품형태를 개발하려고 한다.

(3) 제품형태 선호도 조사

어린이들에게 제공할 수 있는 제품을 생산하기 위해 어린이들의 보호자들을 대상으로 (주)장마을에서 개발한 시제품에 대한 설문조사를 실시하였다.

(가) 청국장의 소비자 기호도 조사

각종 청국장 시제품에 대한 소비자의 기호도를 조사하기 위하여 아래와 같이 설문지를 작성하였다. 본 설문지를 통해 청국장 제품에 대한 제품 분석을 수행하였고, 이에 대한 피드백을 다시 제품에 반영하여 완성도가 높은 제품을 만들고자 하였다. 설문지의 구성은 다음과 같다.

- 설문지 : 총 5문항(객관식)
- 설문조사지역 : 부산, 경남, 서울
- 총 설문조사인원 : 200명 (부산 50명, 경남 50명, 서울 100명)
- 설문조사 내용

1번 제품 : 일반청국장이 첨가된 과자

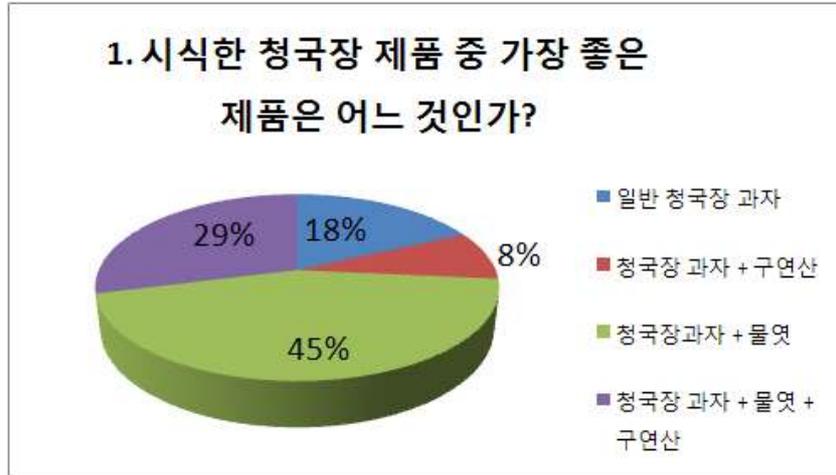
2번 제품 : 청국장과자 +구연산

3번 제품 : 청국장가과 +물엿

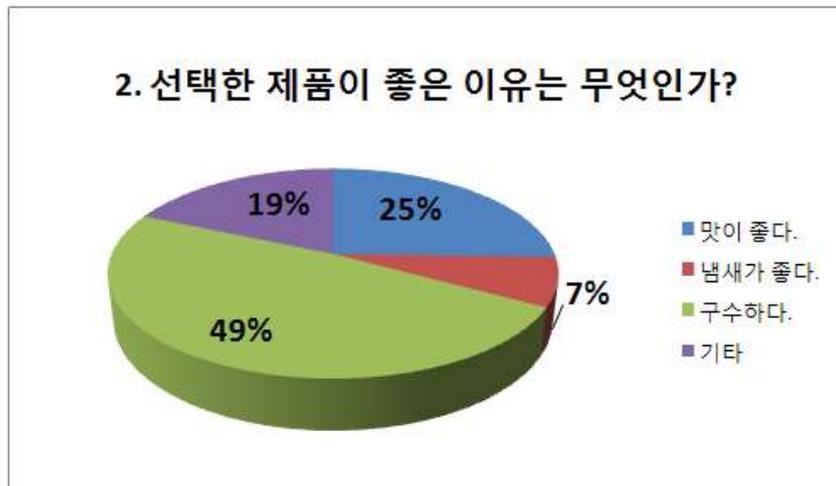
4번 제품 : 청국장과자 +물엿 +구연산

설문지

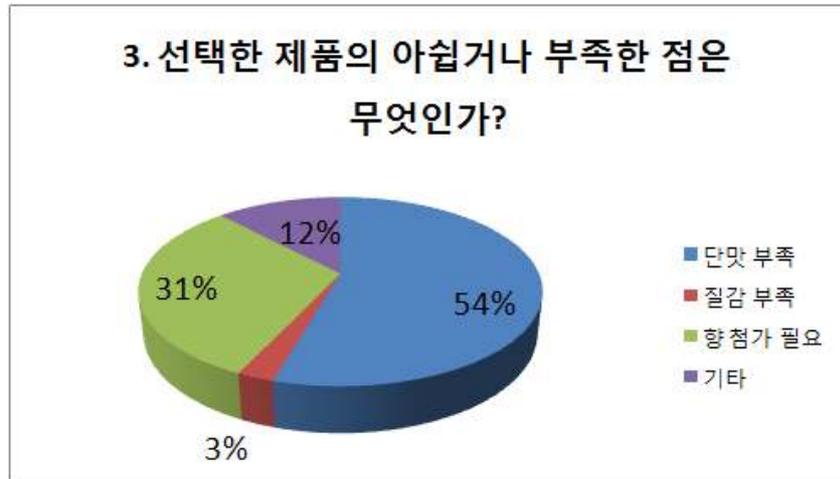
1. 시식한 청국장 제품 중 가장 좋은 제품은 어느 것인가요?
① 1번 제품 ② 2번 제품 ③ 3번 제품 ④ 4번 제품
2. 선택한 제품이 좋은 이유는 무엇인가요?
① 맛이 좋다 ② 냄새가 좋다
③ 구수하다 ④ 기타 (새콤달콤하다. 달지 않다, 질감이 좋다 등)
3. 선택한 제품이 아쉽거나 부족한 점이 있다면 무엇인가요?
① 단맛이 부족하다 ② 씹히는 감이 부족하다
③ 향을 첨가해야 한다 ④ 기타 (짹짹했으면 좋겠다, 크기가 작다 등)
4. 시중에 선택한 청국장 제품이 유통된다면 우리 아이에게 추천하겠습니까?
① 적극적으로 추천한다 ② 가끔 추천하고 싶다
③ 별로 하고 싶지 않다 ④ 절대 추천 안 한다
5. 시중 스낵(80-100 g 기준. 예-새우깡, 꼬깔콘) 크기의 제품일 경우,
어느 정도 가격이 적당하다고 생각하십니까?
① 500-100원 ② 1000-1500원
③ 1500-2000원 ④ 2000-3000원



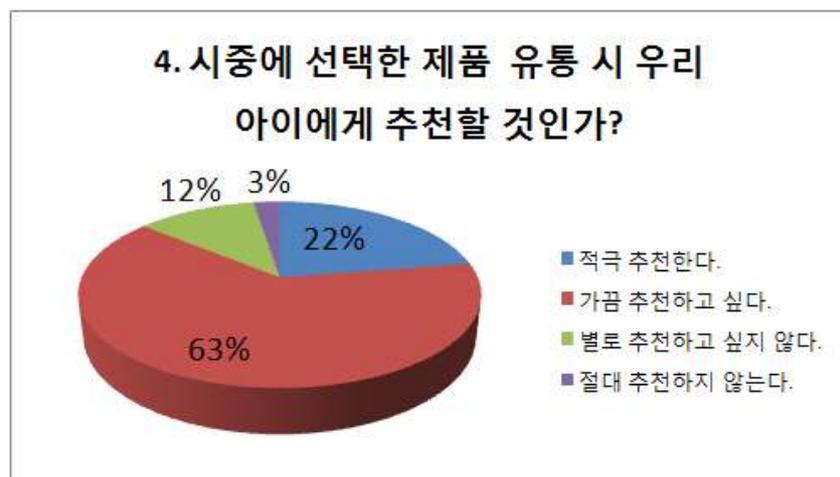
1번 문항 응답 분석결과는 다음과 같다. 3번 제품인 청국장과 물엿을 첨가한 것이 좋다고 한 사람들이 가장 많았다. 따라서 사람들은 무엇인가 맛이 느껴지는 것을 원하는 것으로 분석되었다. 두 번째로 많은 4번도 같은 이유로 보고 있으나 선호도가 가장 작았던 2번 제품의 청국장 과자에 구연산만 첨가한 제품과 같이 새콤한 맛은 선호하지 않는 것으로 분석되었다.



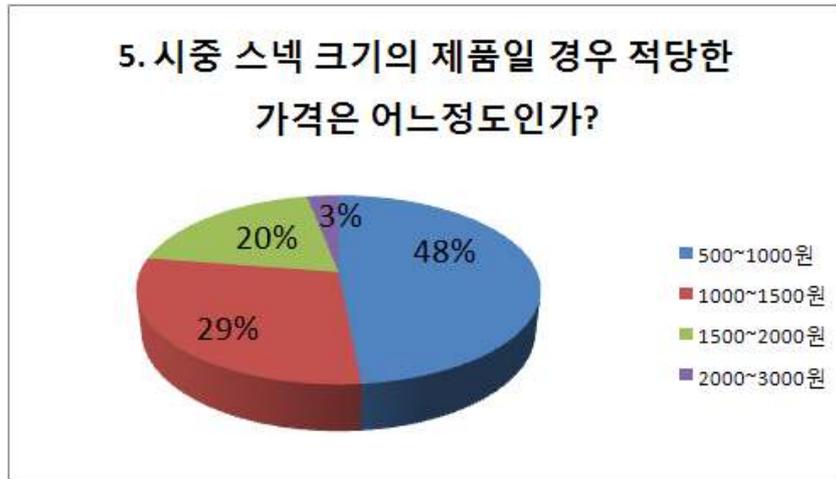
2번 문항 응답의 분석결과는 다음과 같다. 선택한 제품 중 “구수하다”와 “맛이 좋다”를 선택한 응답자가 많은 것으로 보아 청국장 특유의 향과 과자의 특성이 잘 맞아 떨어진 것으로 판단되었다. “냄새가 좋다”라고 선택한 응답자는 가정 적어 청국장 특유의 냄새가 부정적인 영향을 미쳤음을 알 수 있었다.



3번 문항 응답의 분석결과는 다음과 같다. 선택한 제품은 “단맛 부족”과 “향 첨가 필요”를 응답한 사람이 많았는데 이것은 제품의 맛이 그렇게 강하지 않은 것을 응답자들이 느낀 것으로 분석되었다. 또한 기존의 시중에 나와 있는 비슷한 제품들의 맛이 강한 것의 결과라고 판단되었다.



4번 문항 응답의 분석결과는 다음과 같다. “가끔 추천하고 싶다”가 극적으로 많은 것으로 보아 과자라는 제품 특성상 식사처럼 항상 섭취할 수 없기에 나타난 반응으로 분석되었다. 또한 “적극적으로 추천 한다”가 다음으로 많은 것은 앞 문항에서 나온 반응과 다소 모순적이지만 맛이 강하지 않아서 가볍게 먹기에 좋아서 선택된 것으로 분석되었다.



5번 문항 응답의 분석결과는 다음과 같다. 가격이 높을수록 응답자 수가 적은 것은 제품에 대한 평가보다는 현재의 불황인 경제적 환경 때문인 것으로 분석되었다.

설문조사 결과 (주)장마을에서 개발한 시제품의 선호도가 좋은 점수를 받은 것으로 판단되었다. 비록, 향을 첨가해야한다는 의견과 단맛을 선호한다는 의견들이 있기는 하였으나 어린이 성장발육과 뇌기능에 도움을 주고자하는 본 과제 의 목표를 고려한다면 현재 개발 중인 시제품의 방향이 올바른 것으로 생각되어 제품개발을 지속할 계획이다.

나. 어린이용 시제품 개발

(1) 청국장 함유 소포장 제품 개발

어린이들에게 제공할 수 있는 제품으로 우선 냄새가 없고 간편한 제품을 개발하였다. 아래 사진과 같이 세 가지 형태의 청국장으로 생청국장과 소포장 단위로 구연산 맛이 나는 소포장 단위의 분말로 소지하기 간편하고 직접 섭취할 수 있는 형태로 시제품을 제작하였다. 또한, 분말을 환 형태로도 시제품을 제작하였다(Fig. 8).



(A)

(B)



Fig. 8. 어린이용 청국장 시제품

※ A, B: 생청국장, C: 소형 분말형(비타민청국장) D: 비타민청국장환

(2) 혼합제품의 개발

1차년도에 어린이들을 대상으로 하여 맛에 대한 설문조사를 실시한 결과 대부분의 어린이들은 단맛을 내는 과자 형태의 제품들을 선호하였다. 하지만 청국장 제품에 단맛이 나는 설탕 등을 첨가하는 것은 어린이의 성장발육에 도움을 주고자 하는 본 과제의 목표에 적합하지 않으므로, 어린이들이 좋아한다고 응답한 과자 형태로 청국장을 팽화시킨 시제품을 개발하였다 (Fig. 9). 시제품의 맛을 본 대부분의 어른들의 고소하고 담백해서 좋다고 하였으나, 어린이들이 호감을 갖기에는 약간 부족하다는 평을 내렸다. 따라서 과자 형태의 제품에 구연산 등을 첨가하여 새콤한 맛을 부여하는 등의 연구를 통하여 어린이들의 관심을 끌 수 있는 더 좋은 제품을 개발하기 위해 노력하고자 한다.





Fig. 9. 과자 형태의 시제품

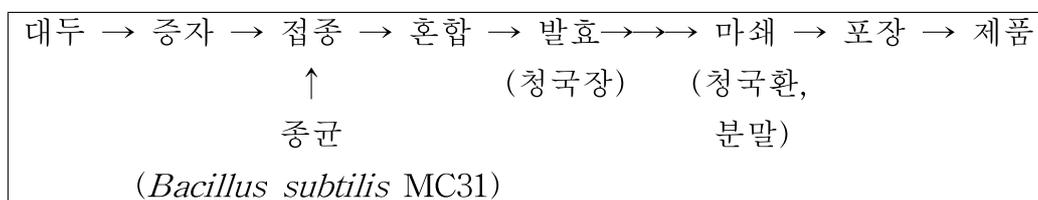
2. 청국장 제품의 대량 생산체계 구축

본 과제를 통해 생산되는 어린이용 청국장 제품의 대량생산과 제품의 표준화를 이루기 위하여 생산과정의 관리체계를 구축하기 위한 작업을 진행하고 있다.

가. 대량생산을 위한 공정 표준화 체계 구축

1, 2차년도에 얻어진 결과를 토대로 어린이용 청국장 제품을 대량생산하기 위해 (주)장마을에서는 제1협동과제에서 얻어진 결과를 표준공정으로 정하였다.

○ 어린이용 청국장 제조공정 모식도



< 어린이용 청국장 공정 표준화 단계 >

㉠ 콩을 깨끗한 물로 충분히 세척한다.



㉡ 세척된 콩은 하룻밤 동안 물에서 침지하여 충분히 불린다.



㉔ 불린 콩은 100℃에서 1시간 동안 삶는다.



㉕ 실험균주로 분리·선정된 *Bacillus subtilis* MC31을 접종한다.
(콩 100 kg당 균주 2 g으로 접종한다.)

㉖ 균주가 접종된 청국장 혼합물은 최적배양 조건으로 밝혀진 40℃에서 48시간 동안 발효시켜 생청국장을 완성한다.



- ㉔ 생청국장을 건조·분쇄·반죽 등의 처리를 통하여 분말청국장, 청국환 등 어린이용 청국장 제품을 생산한다.



현재 배양시설에서 동일한 발효조건으로 하루 1500kg의 청국장을 생산하고 있으며, 앞으로 제1협동과제에서 얻어진 유산균이 첨가된 혼합배양에 조건이 확립되면 냄새가 줄어든 어린이용 청국장 제품을 생산하기 위한 공정도 표준화하여 제품을 생산할 예정이다.

나. 제품의 품질관리체계 구축

(주)장마을에서는 어린이용 청국장제품의 일정한 품질관리를 위하여 배양실의 온도와 습도 등 발효과정의 변수들을 항상 점검하고, 생산된 제품의 색, 냄새 등을 검사하여 자가품질검사를 시행함으로써 일정한 제품을 생산하기 위해 노력하고 있다. 아직까지는 수작업을 통한 소규모의 관리체계이기는 하지만 현재 간단한 실험을 진행 할 수 있는 실험실을 마련하여 품질관리 체계를 향상시키기 위한 노력을 하고 있으며, 앞으로 제품의 시장성 확보와 경쟁력 증진을 위해 규모를 확대·개선 할 예정이다.

○ 식품위생법시행규칙 자가품질검사기준[제19조관련]

1. 식품등의 검사

가. 식품등에 대한 자가품질검사는 판매를 목적으로 제조·가공하는 품목별로 실시하여야 한다. 다만, 즉석판매제조·가공 대상식품의 경우에는 동일한 성분·규격을 적용받는 식품유형별로 이를 실시할 수 있다.

나. 기구 및 용기·포장의 경우 동일한 재질의 제품으로 크기나 형태가 다를 때에는 재질별로 자가품질검사를 실시할 수 있다.

다. 자가품질검사주기의 적용시점은 제품제조일을 기준으로 산정한다.

라. 검사항목의 적용은 당해 제품의 해당항목에 한한다. 다만, 식품제조·가공과정중 특정 식품첨가물을 사용하지 아니한 경우에는 그 항목을 생략할 수 있다.

마. 식품등의 자가품질검사는 다음의 구분에 의하여 실시하여야 한다.

(1) 별표 9 제1호 사목(1)(나)의 규정에 의한 검사실을 갖추지 아니할 수 있도록 정하여져 있는 식품제조·가공업

< (나) 건과류·껌류·맥아엿·절임식품·김치·건포류·면류(건면류·생면류 및 숙면류에 한한다)·조미식품(고추가루·실고추 및 천연향신료에 한한다)·도시락류·떡류 및 메주를 제조·가공하는 경우, 선박에서 통·병조림을 제조하는 경우와 단순가공품(자연산물을 그 원형을 알아볼 수 없도록 분해·절단 등의 방법으로 변경시키거나 이와 같이 1차 가공처리한 식품원료를 식품첨가물을 사용하지 아니하고 단순히 서로 혼합만 하여 가공한 제품이거나 이러한 것에 식품제조·가공업의 허가를 받아 제조·포장된 조미식품을 포장된 상태 그대로 첨부한 것을 말한다. 이하 같다)만을 가공하는 경우 >의 대상식품(도시락류를 제외한다) 및 즉석판매제조·가공업의 대상식품중 빵류(크림빵에 한한다)·식육제품·어육제품·두부류·묵류·식용유지류·인삼제품류·음료류·추출가공식품 및 순대류

○ 식품별 성분에 관한 규격 : 6월마다 1회 이상

(2) 별표 11 제3호 아이스크림 제품류 및 동표 제14호 기타 식품류중 (9) 도시락류

○ 식품별 성분에 관한 규격 : 1월마다 1회 이상

(3) 삭제 <2004.1.31>

(4) (1)(2)외의 식품제조·가공업자

○ 식품별 성분에 관한 규격 : 1월마다 1회 이상

(5) 식품첨가물제조업자 또는 용기·포장류제조업자

(가) 식품첨가물별 성분에 관한 규격 : 1월마다 1회 이상

(나) 기구 또는 용기·포장별 규격 : 동일재질별로 2월마다 1회 이상

2. 기타 자가품질검사와 관련한 세부사항은 식품의약품안전청장이 정하는 바에 의한다.

○ 청국장의 자가품질검사서

청국장 자가 품질 검사서

각 제품의 완제품(판매용 포장까지 완료된 제품)을 100개 중 1개를 무작위로 고른 후 다음 항목에 따라 검사를 하시오

생청국장	매우 그렇다	그렇 다	그렇지 않다
1. 청국장의 색은 너무 검거나 노랗지 않고 진한 갈색을 띠는가?			
2. 청국장의 진이 최소 5cm이상 늘어나는가?			
3. 청국장의 알은 맛스럽게 윤기가 나는가?			
4. 청국장 본연의 향미가 너무 강하거나 약하지 않고 부드럽게 나는가?			
5. 청국장 본연의 향미 외에 이취가 없는가?			
청국장 환	매우 그렇다	그렇 다	그렇지 않다
1. 청국장 환의 색은 너무 검거나 노랗지 않고 진한 갈색을 띠는가?			
2. 청국장 환 본연의 색 외에 다른 색은 없는가?			
3. 씹었을 때 청국장 본연의 향미가 너무 강하거나 약하지 않고 부드럽게 나는가?			

4. 씹었을 때 청국장 환 본연의 질감 외에 다른 질감은 없는가?			
5. 청국장 환 외에 다른 이물질은 없는가?			
분말 청국장	매우 그렇다	그렇 다	그렇지 않다
1. 청국장 분말의 색은 너무 검지 않고 진한 미색을 띄는가?			
2. 청국장 분말에 덩어리가 진 부분은 없는가?			
3. 청국장 분말에 다른 이물은 없는가?			
4. 청국장 향이 너무 강하지 않고 부드럽게 느껴지는가?			
5. 분말의 입자가 너무 굵거나 얇은 것은 없는가?			
청국장 과자	매우 그렇다	그렇 다	그렇지 않다
1. 청국장 과자의 맛에 따라 각각 색을 선명하게 띄는가?			
2. 청국장 과자의 맛에 따른 본연의 색 외에 이색은 없는가?			
3. 청국장 과자의 맛에 따른 과일 향미와 청국장 향이 부드럽게 나는가?			
4. 청국장 과자의 질감은 씹기 편하게 바삭 거리는가?			
5. 과자의 모양이 잘 유지되어 있는가?			

청국장 자가 품질 검사서

각 제품의 완제품(판매용 포장까지 완료된 제품)을 100개 중 1개를 무작위로 골른 후
다음 항목에 따라 검사를 하시오

생청국장	매우 그렇다	그렇다	그렇지 않다
1. 청국장의 색은 너무 검거나 노랑지 않고 진한 갈색을 띠는가?	✓		
2. 청국장의 진이 최소 5cm이상 늘어나는가?	✓		
3. 청국장의 알은 맛스럽게 윤기가 나는가?		✓	
4. 청국장 본연의 향미가 너무 강하거나 약하지 않고 부드럽게 나는가?		✓	
5. 청국장 본연의 향미 외에 이취가 없는가?	✓		
청국장 환	매우 그렇다	그렇다	그렇지 않다
1. 청국장 환의 색은 너무 검거나 노랑지 않고 진한 갈색을 띠는가?		✓	
2. 청국장 환 본연의 색 외에 다른 색은 없는가?	✓		
3. 씹었을 때 청국장 본연의 향미가 너무 강하거나 약하지 않고 부드럽게 나는가?		✓	
4. 씹었을 때 청국장 환 본연의 질감 외에 다른 질감은 없는가?	✓		
5. 청국장 환 외에 다른 이물질은 없는가?	✓		
분말 청국장	매우 그렇다	그렇다	그렇지 않다
1. 청국장 분말의 색은 너무 검지 않고 진한 미색을 띠는가?		✓	
2. 청국장 분말에 덩어리가 진 부분은 없는가?		✓	
3. 청국장 분말에 다른 이물질은 없는가?	✓		
4. 청국장 향이 너무 강하지 않고 부드럽게 느껴지는가?		✓	
5. 분말의 입자가 너무 굵거나 얇은 것은 없는가?	✓		
청국장 과자	매우 그렇다	그렇다	그렇지 않다
1. 청국장 과자의 맛에 따라 각각 색을 선명하게 띠는가?		✓	
2. 청국장 과자의 맛에 따른 본연의 색 외에 이색은 없는가?		✓	
3. 청국장 과자의 맛에 따른 과일 향미와 청국장 향이 부드럽게 나는가?			✓
4. 청국장 과자의 질감은 씹기 편하게 바삭 거리는가?	✓		
5. 과자의 모양이 잘 유지되어 있는가?	✓		

2013. 06. 03.
확인자 : 김경선 (인)



<제품 검사 과정>

3. 기능성 식품 허가 준비

현재까지의 연구 성과들을 기본으로 하여 청국장, 청국환, 청국분말 제품들을 식약청으로부터 기능성 식품으로 허가받기 위해 필요한 준비를 하고 있음.

품목제조보고사항변경보고서			
보고인	①성명	박규민	②주민등록번호
	③주소	밀양시 초동면 신호리 242-3	
명업소	④명칭(상호)	장마을	
	⑤소재지	밀양시 초동면 신호리 242-3	
⑥영업의종류	식품제조가공업	⑦영업허가(신고)번호	제 75호
⑧항목구분	변경 전	변경 후	
⑨제품명	조선분말청국장	분말청국장	
⑩원재료명 또는 성분 및 배합비율	콩100%	콩(대두)100%	
	⑪변경사유		
식품위생법 제22조제6항 및 동법시행규칙 제26조의 규정에 따라 식품(식품첨가물)품목제조 보고사항을 변경하고자 보고합니다.			
년 월 일			
보고인 박규민 (서명 또는 인)			
밀양시장 귀하			
구비서류	품목제조보고서사본 (품목제조보고의 변경보고서는 제품생산의 개시 전이나 제품생산의 개시 후 7일 이내에 제출하여야 합니다.)		

품목제조보고사항변경보고서			
보고인	①성명	박규민	②주민등록번호
	③주소	밀양시 초동면 신호리 242-3	
명업소	④명칭(상호)	장마을	
	⑤소재지	밀양시 초동면 신호리 242-3	
⑥영업의종류	식품제조가공업	⑦영업허가(신고)번호	제 75호
⑧항목구분	변경 전	변경 후	
⑨제품명	청국장환	청국장환	
⑩원재료명 또는 성분 및 배합비율	콩91%, 다시마9%	콩98%(한국), 알긴산2%	
	⑪변경사유		
식품위생법 제22조제6항 및 동법시행규칙 제26조의 규정에 따라 식품(식품첨가물)품목제조 보고사항을 변경하고자 보고합니다.			
년 월 일			
보고인 박규민 (서명 또는 인)			
밀양시장 귀하			
구비서류	품목제조보고서사본 (품목제조보고의 변경보고서는 제품생산의 개시 전이나 제품생산의 개시 후 7일 이내에 제출하여야 합니다.)		

품목제조보고사항변경보고서			
보고인	①성명	박규민	②주민등록번호
	③주소	밀양시 초동면 신호리 242-3	
명업소	④명칭(상호)	장마을	
	⑤소재지	밀양시 초동면 신호리 242-3	
⑥영업의종류	식품제조가공업	⑦영업허가(신고)번호	제 75호
⑧항목구분	변경 전	변경 후	
⑨제품명	조선생청국장	생청국장	
⑩원재료명 또는 성분 및 배합비율	콩100%	콩(대두)100%	
	⑪변경사유		
식품위생법 제22조제6항 및 동법시행규칙 제26조의 규정에 따라 식품(식품첨가물)품목제조 보고사항을 변경하고자 보고합니다.			
년 월 일			
보고인 박규민 (서명 또는 인)			
밀양시장 귀하			
구비서류	품목제조보고서사본 (품목제조보고의 변경보고서는 제품생산의 개시 전이나 제품생산의 개시 후 7일 이내에 제출하여야 합니다.)		

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발의 달성도 및 기여도

연차	세부연구개발 목표	달성도(%)	관련분야의 기술발전예의 기여도
제 1 협동	1차년도 콩 품종 비교 검토 및 청국장용 기능성 종균 탐색	100	<ul style="list-style-type: none"> - 다양한 콩 품종을 수집하고 품종 간 청국장 발효능을 비교하여 병국장 발효에 좋은 품종을 확보하였음 - 각종 청국장과 김치로부터 안전성이 확보된 청국장 발효균주를 분리하여 청국장 발효능과 GABA 생산량을 비교하여 제품생산에 이용할 실험균주를 선택하여 유용생물자원 수집에 기여하였음 - 분리균주들을 분리, 동정하고 특성을 알아내어 학술지에 논문을 게재하여 우리나라 재래 식품에서 유래한 미생물의 우수성 및 응용가능성을 홍보하였음
	2차년도 기능성관련 조절물질 규명 및 기능성 강화 조건 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> - 분리균주의 Protease, 혈전용해 등 기능성 관련물질 생산을 측정하여 생리활성 발현조건을 조사하여 배양액 이용을 위한 기초자료를 확보하는데 기여하였음 - 균주조합에 의한 청국장 제조공정을 알아보기 위해 활성균주별 생육조건을 살펴보았음 - 냄새 제거 및 감소를 위한 혼합발효 조건을 분석하였음 - 배양액 추출물은 다양한 식품에 응용 가능하므로 유용미생물과 식품의 접목을 위한 기초자료를 제공하였음.
	3차년도 기능성 청국장 발효공정 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> - 발효온도, 시간 등 변수들을 검토하여 최대 GABA을 위한 최적발효조건을 확립하였음 - 불쾌취를 억제하기 위하여 젖산균과 고초균의 혼합배양 조건을 검토함 - 혼합배양에 의해 생산된 청국장의 이학적 특성을 검토하여 청국장의 부가가치를 향상시키는데 기여하였음

연차	세부연구개발 목표	달성도(%)	관련분야의 기술발전예의 기여도
제 2 협동	1 차년도	100	<ul style="list-style-type: none"> - 성장발육/학습력증진 기능성탐색을 위해 노하수체전엽 세포주, 골아세포주, 간세포주 신경세포주를 확보하고 배양조건을 확립하였음 - 6가지 청국장 품종 중 뇌하수체전엽 세포주의 성장호르몬 분비능을 촉진하는 3개 품종을 선별하고 작용기전을 분석하였음 - 6가지 청국장 품종중에서 신경세포로부터 신경성장인자(NGF)의 분비를 촉진시키는 2개 품종을 선별하고 작용기전을 분석하였음
	2 차년도 중	100	<ul style="list-style-type: none"> - 청국장의 in vivo 효능평가를 위해 치매모델동물(Tg2576 형질전환마우스)과 성장발육 측정 동물을 도입하고 이들의 대량생산 및 기초생리자료를 확보하였음 - 성장발육개선에 대한 기능성 탐색을 통해 단기 혹은 장기간의 청국장 투여가 성장호르몬의 분비촉진, 성장판 두께증가, 치밀골 두께증가, 성장호르몬 수용체 신호전달기전 변화 등을 유도함을 규명하였음 - 학습력증진에 대한 기능성 탐색을 통해 청국장이 치매모델동물에서 NGF의 뇌발현과 혈액내 농도증진을 유도하고, NGF수용체의 신호전달과정을 조절함을 규명하였음
	3 차년도	100	<ul style="list-style-type: none"> - 청국장 기능성제품에 대한 독성평가를 위해 GLP수준의 시험법을 확립하였고, 실험동물을 이용한 독성시험을 통해 청국장이 체중, 장기무게, 소변, 간독성, 신장독성 등에 유의적인 독성을 유도하지 못함을 규명하였음 - 청국장의 약리효능시험 프로토콜을 확립하였고, 청국장이 아토피 치료효능이 우수함을 최초로 IL-4/Luc/CNS-1형질전환 마우스를 이용하여 규명하였음 - 청국장 투여는 단기기억장애, 장기기억장애, 신경세포의 사멸을 방지하고, acetylcholinesterase 활성과 산화적 스트레스를 억제하는 효과를 나타냄을 규명하였고, 식약청 허가준비절차에 대한 자료를 정리하였음

	연차	세부연구개발 목표	달성도(%)	관련분야의 기술발전예의 기여도
제 1 세 부	1차년도	어린이 기호성 제품개발	100	<ul style="list-style-type: none"> - 소비자 설문 조사를 통해서 청국장 제품 개발에 필요한 사항들을 파악하였고 제품개발에 가장 큰 문제점인 불쾌취 제거의 중요함을 재차 확인하였음 - 청국장에 대한 기존의 이미지를 개선하고 어린이들에게 호감을 줄 수 있는 제품 개발을 위해 기존의 청국장 제품과 더불어 분말형태와 환형태의 시제품을 제작하였음 - 어린이의 거부감을 줄이기 위해 밝은 이미지의 디자인을 준비하고 소포장 시제품을 제조하였음
	2차년도	생산체계 구축	100	<ul style="list-style-type: none"> - 설문조사를 실시하였으며 제품형태에 대한 선호도를 살펴보았으며, 어린이들의 호감을 유도하기 위해 빵튀기 형태의 시제품을 제작하였음 - 제작된 시제품의 시장경쟁력과 부가가치를 높이기 위해 청국장제품의 물리화학적 특성조사하였고, 분말제품과 같은 2차 가공 제형을 검토하였음 - 청국장의 냄새를 제거하기 위해 고초균과 젖산균의 혼합배양 제품을 개발하고, 생산된 청국장 제품의 특성을 조사하였음 - 대량생산을 위한 공정 표준화 체계 구축하였으며 제품의 품질관리체계를 실시하였음
	3차년도	기능성 극대화 및 허가	100	<ul style="list-style-type: none"> - 청국장의 기능성을 극대화 하기위해 유효성분을 분석하고 생산공정을 조정하였으며 최적 생산공정 확립하고 청국장 제품의 안정성 검토를 실시하였음 - 제품의 생산성과 시장성을 높이기 위해 청국장 제품의 규격을 설정하고 유통기한 확정하였음 - 식약청으로부터 기능성 제품으로 허가받기 위해 각종 자료를 준비하고 허가절차 추진함

제 2 절 기술적 측면

- 청국장 발효 공정의 최적화를 통하여 농산물의 기능성 증진 기술의 선진화
- 청국장에 특화된 가공방법의 개발과 제품개발전략에 맞춘 가공기술의 보유
- 고부가가치 및 기능성 식품소재의 개발로 관련 산업의 국제 경쟁력 향상에 기여
- 기능성 소재 개발에 따른 특허등록으로 기술 선점 및 특허 출원을 통한 지적 재산권 확보
- 사업수행 과정에서 얻어진 자료들을 논문으로 제작하여 국내외 학술지에 게재

제 3 절 경제·산업적 측면

- GABA 함량이 증가된 기능성 청국장 제품 개발
- 콩 가공 제품 수요 증가로 국내 농가 수익 창출
- Natto에 대응하여 국내산 콩 제품 및 청국장 수요 창출
- 식품 재료분야 이외의 기능성 소재로 다양한 적용 가능성 창출
- 발효 및 가공기술 노하우를 응용하여 다른 유용식물유래 기능성식품 및 제품 생산
- 기능성 소재 및 다양한 기능성 제품의 생산을 통하여 고부가가치 창출
- 기업의 신제품 개발로 경쟁력 제고

제 4 절 사회·문화적 측면

- 청국장을 이용한 고부가가치 웰빙 기능성 식품 소재 개발로 농업분야에서 주변 국가와의 경쟁에서 차별성과 우월성을 확보하여 농가 발전 도모
- 청국장의 우수한 기능성 검증 및 이용으로 국민보건 향상과 국가 위상제고

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 특허출원

1. 발명의 명칭 : GABA 함량이 높은 청국장을 발효하는 균주의 분리와 개발

출원(등록)일자: 2013-06-05

출원번호: 10-2013-0064659

출원인 명칭: 부산대학교 산학협력단

발명자 성명: 김동섭, 손홍주, 황대연, 이충렬, 맹소연

2. 발명의 명칭 : 혼합배양에 의한 GABA 함량이 높은 기능성 청국장 및 그의 제조방법

출원(등록)일자: 출원중

출원번호:

출원인 명칭: 부산대학교 산학협력단

발명자 성명: 김동섭, 이가영

제 2 절 논문

1. 저널: 생명과학회지

저자: 맹소연, 김은아, 이가영, 김로의, 황대연, 손홍주, 박규민, 김동섭

제목: GABA 함량이 높은 청국장을 발효하는 균주의 분리 및 동정

게재 년도, 볼륨, 페이지: 2013, 23(1), p.1-8

2. 저널: 생명과학회지

저자: 맹소연, 김은아, 이가영, 김로의, 황대연, 손홍주, 이병원, 이충렬, 김동섭

제목: B. subtilis MC 31를 이용한 청국장의 품질특성

게재 년도, 볼륨, 페이지: 2013, 23(4), p.560-568

3. 저널: Appl Biochem Biotechnol

저자: Na-Ri Lee, Sang-Mee Lee, Kwang-Sik Cho, Seong-Yun Jeong, Dae-Youn Hwang, Dong-Seob Kim, Chang-Oh Hong, Hong-Joo Son

제목: Improved Production of Poly- γ -Glutamic Acid by *Bacillus subtilis* D7 Isolated from Doenjang, a Korean Traditional Fermented Food, and Its Antioxidant Activity

게재 년도, 볼륨, 페이지: 2014, 173, p.918 - 932

4. 저널: 생명과학회지

저자: 이나리, 박성보, 이상미, 고태훈, 황대연, 김동섭, 정성윤, 손홍주
제목: Bacillus subtilis D7에 의하여 발효된 백태 청국장의 특성
게재 년도, 볼륨, 페이지: 2013, 23(4), p.529-536

5. 저널: 한국미생물생명공학회지

저자: 이나리, 고태훈, 박성보, 이상미, 황대연, 김동섭, 박근태, 손홍주
제목: Bacillus subtilis에 의한 발아 및 미발아 황태 청국장 발효
게재 년도, 볼륨, 페이지: 2013, 41(2), p.160-167

6. 저널: 한국식품저장유통학회지

저자: 김은아, 맹소연, 김로의, 이가영, 황대연, 손홍주, 이충렬, 김동섭
제목: 김치로부터 GABA를 생산하는 커드 형성 젖산균의 분리 및 동정
게재 년도, 볼륨, 페이지: 2013, 20(5), p.1-7

7. 저널: Lab Anim Res

저자: Ji-Eun Sung, Moon-Hwa Kwak, Ji-Eun Kim, Young-Ju Lee, Ro-Ui Kim, Eun-Ah Kim, Ga-Young Lee, Dong-Seob Kim, Dae-Youn Hwang
제목: Therapeutic effects of fermented soycrud on phenotypes of atopic dermatitis induced by phthalic anhydride
게재 년도, 볼륨, 페이지: 2013, 29(2), p.103 - 112

8. 저널: Lab Anim Res

저자: Young-Ju Lee, Ji-Eun Kim, Moon-Hwa Kwak, Hong-Joo Son, Dong-Seob Kim, Dae-Youn Hwang
제목: In vitro and in vivo study of effects of fermented soybean product (chungkookjang) on NGF secretion ability and NGF receptor signaling pathway
게재 년도, 볼륨, 페이지: 2013, 29(2), p.113 - 126

9. 저널: International J. Mol. Med.

저자: Young-Ju Lee, Ji-Eun Kim, Moon-Hwa Kwak, Jun-Go, Dong-Seob Kim, Hong-Joo Son, Dae-Youn Hwang
제목: Quantitative evaluation of the therapeutic effect of fermented soybean products containing a high concentration of GABA on phthalic anhydride-induced atopic dermatitis in IL-4/Luc/CNS-1 Tg mice
게재 년도, 볼륨, 페이지: 2014, 33, p.1185 - 1194

10. 저널: Nutritional Res.

저자: In-Sik Hwang, Ji-Eun Kim, Young-Ju Lee, Moon-Hwa Kwak, Jun-Go, Hong-Joo Son, Dong-Seob Kim, Dae-Youn Hwang
제목: Fermented soybean product (Cheonggukjang) improved some attributes of protein and

growth hormone measurements in Sprague-Dawley rats

게재 년도, 볼륨, 페이지: 2014, 33, p.355 - 367

11. 저널: Lab Anim Res

저자: Young-Ju Lee, Ji-Eun Kim, Moon-Hwa Kwak, Jun-Go, Hong-Joo Son, Dong-Seob Kim, Byeong-Cheol, Hee-Seob Lee, Dae-Youn Hwang

제목: Toxicity of fermented soybean product (cheonggukjang) manufactured by mixed culture of Bacillus subtilis MC31 and Lactobacillus sakei 383 on liver and kidney of ICR mice

게재 년도, 볼륨, 페이지: 2014, 30(2), p.54 - 63

제 3 절 학술발표

1. 국제학술대회

해당사항없음

2. 국내학술대회

가. 학회: 생명과학회

발표자: Na-Ri Lee, Tae-Hun Go, Jin-Ha Jung, Ki-Hyun Park, Hong-Joo Son

제목: Production and functionality of poly- γ -glutamic acid by Bacillus subtilis D7

발표일시: 2012. 10. 25

나. 학회: 생명과학회

발표자: So-yon Mann, Eun-ah Kim, Ga-young Lee, Ro-ui Kim, Dae-youn Hwang, Hong-joo Son, Kyu-min Park and Dong-seob Kim

제목: Isolation and Identification of GABA Producing Microorganism from Chungkookjang

발표일시: 2012. 10. 25

다. 학회: 생명과학회

발표자: Eun-ah Kim, So-yon Mang, Ga-young Lee, Ro-ui Kim, Dae-youn Hwang, Hong-joo son, Kyu-ming Park and Dong-seob Kim

제목: Isolation and Identification of Soycurd forming Lactic Acid Bacteria Which Produce GABA from Kimchi

발표일시: 2012. 10. 25

라. 학회: 미생물생명공학회

발표자: Ga-young Lee, Ro-ui Kim and Dong-seob Kim

제목: Improvement of γ -amino Butyric Acid(GABA) Productivity and Flavor in Chungkookjang by Mixed Culture of Bacillus subtilis MC31 and Lactobacillus sakei 383

발표일시: 2013.07.03

마. 학회: 미생물생명공학회

발표자: Su-In Kim, Min-Gi Jung and Dong-seob Kim

제목: Identification of lactic acid bacteria which produces fermented soycurd with improved sour taste

발표일시: 2014.06.25

바. 한국실험동물학회

발표자: 이영주, 김지은, 곽문화, 고준, 김동섭, 손홍주, 황대연

제목: Therapeutic effects of cheonggukjang on atopic dermatitis induced by phthalic anhydride in IL-4/Luc/CNS-1 Tg mice

발표일시: 2014. 02. 20

사. 한국실험동물학회

발표자: 고준, 김지은, 곽문화, 고은경, 송성화, 성지은, 황대연

제목: Therapeutic effects of phytochemicals contained fermented soybean (cheonggukjang) and gold-nanoparticles on neurodegenerative disorders

발표일시: 2014. 08. 21

아. 한국실험동물학회

발표자: 고준, 김지은, 곽문화, 고은경, 송성화, 성지은, 김동섭, 황대연

제목: Therapeutic effects of fermented soybean product (cheonggukjang) on trimethyltin-induced neurodegenerative disorders

발표일시: 2014. 08. 21

제 4 절 그 외 활용계획

○ 활용방안

- 신균주를 이용한 청국장의 발효 기술 개발을 통하여 GABA 함량, 기능성 성분이 증가되고 소비자의 거부감을 유발하는 불쾌치가 줄어든 새로운 청국장 제품을 생산하고, 이 과정에서 획득된 기술 노하우는 특수 기능성 제품 개발에 응용 가능할 것으로 예측되며, 결과적으로 다양한 기능성 식품 및 제품의 창출 및 국민 건강 증진에 활용할 수 있을 것임
- 고부가가치의 청국장 제품 개발을 통하여 국내 콩 재배 농가의 확대 및 농가 수익 증가를

유도하고, 각종 콩 발효 제품 개발을 위한 학문적 기초자료로 활용할 수 있음

- 청국장 성분 표준화, 발효 기술 표준화 등을 통하여 기존 청국장 제품과 차별화될 수 있는 청국장의 품질 향상을 꾀할 수 있으며, 나아가 기능성이 증가된 다양한 고부가가치 콩 발효 응용분야 창출 및 활성화에 활용할 수 있음

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 과제를 수행하는 동안 청국장을 포함한 각국의 전통발효식품에 관련된 기초 및 응용연구에 대한 많은 과학기술정보를 아래와 같이 수집하였다. 요약하면, 콩 발효 식품인 청국장을 포함한 동양 전통발효식품의 과학화를 위하여 발효에 관여하는 미생물의 분리 및 천이에 대한 자세한 연구가 이루어졌으며, 발효식품의 품질 관리와 다양한 효능(항산화능, 면역력증가, 대사증후군에 대한 효과 등) 등을 구명함으로써 기능성 식품으로서의 가치를 높이는 연구가 주류를 이루고 있었다.

현재에도 발효식품 관련 종균 및 영양학적 가치에 대한 연구가 지속적으로 이루어지고 있으며, 새로운 생리활성에 대한 결과도 우수 학술지를 통하여 이루어지고 있다. 특히 일본에서는 우리의 청국장과 비슷한 발효식품인 Natto 유래 poly- γ -glutamate와 levan을 이용한 제품 등이 출시된 것으로 알려져 있다. 따라서 본 과제 완료 이후, 청국장유래 물질들의 식품학적 응용에 관한 연구가 계속되어야 할 것으로 판단되며, 이때 아래의 정보들은 많은 도움이 될 것이다.

- Quality of chungkukjans prepared with various Bacillus strains. International Journal of Food Science and Technology (2007) 43, 587-592
- Immunostimulatory activity of polysaccharides from Cheonggukjang. Food and Chemical Toxicology (2013) 59, 476-484.
- The influence of the Korean traditional Chungkookjang on variables of metabolic syndrome in overweight/obese subjects: study protocol (2013) BMC Complementary and Alternative Medicine 13, 297-302.
- Supplementation of Korean fermented soy paste doenjang reduces visceral fat in overweight subjects with mutant uncoupling protein-1 allele (2012) Nutrition Research 32, 8-14
- Determination of non-volatile and volatile organic acids in Korean traditional fermented soybean paste (Doenjang) (2010) Food and Chemical Toxicology 48, 2005-2010.
- Application of solid-state fermentation to food industry - A review. Journal of Food Engineering (2006) 76, 291-302.
- Antioxidative Activity and Safety of the 50% Ethanol Extract from Red Bean Fermented by Bacillus subtilis IMR-NK1 (2002) Journal of Agricultural and Food Chemistry 50, 2454-2458.
- Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential (2007) Bioresource Technology 98, 1380-1385.
- Microbial changes during the production of Sufu - a Chinese fermented soybean food (2004) Food Control 15, 265-270.
- The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia (2003) International Journal of Food Microbiology 2732, 1-3.
- Soyfoods and soybean products: from traditional use to modern applications (2012) Applied Microbiology and Biotechnology 96, 9-22.

- Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third millenium (2005) Journal of Applied Microbiology 98, 789-805.
- Poly-gamma-glutamate in bacteria (2006) Molecular Microbiology 60, 1091-1098.
- Poly (glutamic acid) - An emerging biopolymer of commercial interest (2011) Bioresource Technology 102, 5551-5561.

제 7 장 연구시설·장비 현황

해당사항 없음

제 8 장 참고문헌

Bouras, C., Hof, P. R., Giannakopoulos, P., Michel, J. P. and Morrison, J. H. (1994) Regional distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques in the cerebral cortex of elderly patients: a quantitative evaluation of a one-year autopsy population from a geriatric hospital. *Cereb Cortex* 4, 138-150.

Choi, J. G., Moon, M., Jeong, H. U., Kim, M. C., Kim, S. Y. and Oh, M. S. (2011) Cistanches Herba enhances learning and memory by inducing nerve growth factor. *Behav Brain Res* 216, 652-658.

Dearman, R. J., Skinner, R. A., Humphreys, N. E. and Kimber, I. (2003) Methods for the identification of chemical respiratory allergens in rodents: comparisons of cytokine profiling with induced changes in serum IgE. *J Appl Toxicol* 23, 199-207.

Dubois, M., Gillers, K. A., Hamilton, J. K., Robers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28, 350-352.

Eom, S. M. 2006. Changes in chemical constituents of soybeans during germination and quality characteristics of Chungkukjang prepared with germinated soybeans. M.S. dissertation, Sejong University, Seoul, Korea.

Eom, S. M., Jung, B. Y. and Oh, H. I. 2009. Changes in chemical components of Cheonggukjang prepared with germinated soybeans during fermentation. *J Appl Bio Chem* 52, 133-141.

Galli, S. J. (2000) Mast cells and basophils. *Curr Opin Hematol* 7, 32-39.

Gao, X. K., Nakamura, N., Fuseda, K., Tanaka, H., Inagaki, N. and Nagai, H. (2004) Establishment of allergic dermatitis in NC/Nga mice as a model for severe atopic dermatitis. *Biol Pharm Bull* 27, 1376-1381.

Hong, J. Y., Choue, R. W., Baek, J. Y., Cho, H. J. and Song, Y. B. 1999. The study of correlation between serum vitamin K concentration and bone metabolism in postmenopausal women. *Korean J Nutr* 21, 287-295.

Hong, J. Y., Choue, R. W., Baek, J. Y., Cho, H. J. and Song, Y. B. 1999. The study of correlation between serum vitamin K concentration and bone metabolism in postmenopausal women. *Korean J Nutr* 21, 287-295.

- Hur, J., Lee, P., Kim, J., Kim, A. J., Kim, H. and Kim, S. Y. (2004) Induction of nerve growth factor by butanol fraction of *Liriope platyphylla* in C6 and primary astrocyte cells. *Biol Pharm Bull* 27, 1257–1260.
- Hwang, H. A., Lee, N. K., Cho, I. J., Haggm, Y. T., Kwon, K. O. and Kim, B. Y. 2008. Selected of microorganisms and optimization of manufacture process for Cheonggukjang. *J Korean Food Sci Technol* 40, 406–411.
- In, J. P and Lee, S. K. 2004. Effect of yucca (*Yucca shidigera*) extract on quality characteristics of Chungkukjang using *Bacillus subtilis* p01. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 47, 176–181.
- Jeo, G., Lee, M. Y., Yoon, J. Y., Jang, S., Jung, M., Jeong, H. S. and Lee, J. 2010. Effects of heat treatment and selected medicinal plant extracts on GABA content after
 Joo, H. K. 1996. Studies on chemical composition of commercial Chungkukjang and flavor compounds of Chungkukjang by mugwort (*Artemisia asiatica*) or red pepper seed oil. *Korea Soybean Digest* 13, 44–56.
- Kawakami, T., Ando, T., Kimura, M., Wilson, B. S. and Kawakami, Y. (2009) Mast cells in atopic dermatitis. *Curr Opin Immunol* 21, 666–678.
- Kimura, M., Tsuruta, S. and Yoshida, T. (1998) Correlation of house dust mite-specific lymphocyte proliferation with IL-5 production, eosinophilia, and the severity of symptoms in infants with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 101, 84–89.
- Laouini, D., Kawamoto, S., Yalcindag, A., Bryce, P., Mizoguchi, E., Oettgen, H. and Geha, R. S. (2003) Epicutaneous sensitization with superantigen induces allergic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 112, 981–987.
- Lee, J. J., Kim, A. R., Lee, H., Kim, C. H., Chang, H. C. and Lee, M. Y. 2010. Effects of powders of soybean and Doenjang on cholesterol level and antioxidant activities in rats fed with a high cholesterol diet. *J Life Sci* 20, 1134–1142.
- Lee, J. J., Lee, D. S. and Kim, H. B. 1999. Fermentation patterns of Chungkookjang and Kanjang by *Bacillus licheniformis* B1. *Korean J Microbiol* 35, 296–301.
- Lee, N. R. 2012. Production and functionality of amino acid biomaterial, poly- γ -glutamic acid by *Bacillus subtilis* D7 isolated from Doenjang, a traditional Korean fermented food. M. S. Thesis. Pusan National University, Miryang, Korea.

- Lim, A. K., Jung, H. K., Hong, J. H., Oh, J. S., Kwak, J. H., Kim, Y. H. and Kim, D. I. 2008. Effects of the soybean powder with rich aglycone isoflavone on lipid metabolism and antioxidative activities in hyperlipidemic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37, 302-308.
- Lim, S. Y., Park, K. Y. and Rhee, S. H. 1999. Anticancer effect of Doenjang in vitro sulforhodamine B (SRB) assay. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28, 240-245.
- Man, M. Q., Hatano, Y., Lee, S. H., Man, M., Chang, S., Feingold, K. R, Leung, D.Y., Holleran, W., Uchida, Y. and Elias, P. M. (2008) Characterization of a hapten-induced, murine model with multiple features of atopic dermatitis: structural, immunologic, and biochemical changes following single versus multiple oxazolone challenges. *J Invest Dermatol* 128, 79-86.
- Mann, S. Y., Kim, E. A., Lee, G, Y., Kim, R. U., Hwang, D. Y., Son, H. J. and Kim, D. S. 2013. Isolation and Identification of GABA-producing Microorganism from Chungkookjang. *J Life Sci* 23, 102-109.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31, 426-429.
- Oh, H. I. and Eom, S. M. 2008. Changes in microflora and enzyme activities of Cheonggukjang prepared with germinated soybeans during fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 40, 56-62.
- Paik, H. D., Lee, S. K., Heo, S., Kim, S. Y., Lee, H. H. and Kwon, T. J. 2004. Purification and characterization of the fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus subtilis* KCK-7 from Chungkookjang. *J Microbiol Biotechnol* 14, 829-835.
- Park, J. M., Lee, S. S. and Oh, H. I. 1995. Changes in chemical characteristics of traditional Kochujang meju during fermentation. *Korean J Food Nutr* 8, 184-191.
- Shon, M. Y., Seo, K. I., Lee, S. W., Choi, S. H. and Sung, N. J. 2000. Biological activities of Chungkugjang prepared with black bean and changes in the phytoestrogen content during fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 32, 936-941.
- Spergel, J.M., Mizoguchi, E., Brewer, J. P., Martin, T. R., Bhan, A. K. and Geha, R. S. (1998) Epicutaneous sensitization with protein antigen induces localized allergic dermatitis and hyperresponsiveness to methacholine after single exposure to aerosolized antigen in mice. *J Clin Invest* 101, 1614-1622.

Tiraboschi, P., Hansen, L. A., Thal, L. J. and Corey-Bloom, J. (2004) The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD. *Neurology* 62, 1984-1989.

Uezato, T., Sato, E. and Miura, N. (2012) Screening of natural medicines that efficiently activate neurite outgrowth in PC12 cells in C2C12-cultured medium. *Biomed Res* 33, 25-33.

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 어린이 성장발육 · 학습력 증진에 적합한 청국장용 콩품종 선별 및 기능성 제품개발				
	(영문) Selection of soybean plant strain and development of new soybean products for the increase of children's growth and learning ability				
주관연구기관	(주)장마을		주 관 연 구 책 임 자	(소속)(주)장마을	
참 여 기 업	(주)장마을			(성명)박 규 민	
총연구개발비 (천원)	계	440,400	총 연 구 기 간	2011.8.19~2014.8.18(3년)	
	정부출연 연구개발비	330,000	총 참 연 구 원 수	총 인 원	45
	기업부담금	110,400		내부인원	45
	연구기관부담금	0		외부인원	0
<p>○ 연구개발 목표 및 내용</p> <ul style="list-style-type: none"> - 새로운 균주를 이용하여 GABA 함량이 높은 어린이 대상 청국장 제품개발 - 균주의 혼합배양에 의해 불쾌취가 감소된 고부가가치 청국장 제품개발 - 세포주와 실험동물을 이용한 청국장의 성장발육 및 학습력 개선 효능평가 - 청국장의 독성 및 새로운 기능 규명 <p>○ 연구결과</p> <p>본 연구에서는 새롭게 분리된 균주를 사용하여 어린이들의 두뇌활동에 도움을 주는 GABA 함량이 높은 청국장을 제조 하였으며, 어린이들의 거부감을 유발하는 불쾌취를 제거하기 위하여 유산균을 혼합배양함으로써 냄새가 개선된 청국장을 제조하였다. 이들 청국장이 어린이들의 성장발육과 학습력 개선에 미치는 영향은 세포주와 모델동물을 이용하여 평가하고 작용기전을 규명하였으며, 독성평가도 실시하여 독성이 없음을 규명하였다. 또한, 청국장의 새로운 기능으로서 아토피질환의 개선에 효과가 있음을 새로운 모델동물을 이용하여 규명하였다. 이러한 결과를 바탕으로 청국장 제조 공정에 따라 생산된 청국장을 환, 분말 그리고 어린이들이 호감을 보일 수 있는 과자형태의 시제품을 제조하여 소비자들의 설문조사 등의 방법으로 시장성을 살펴보고 있다. 그리고 관령제품의 허가를 위하여 효능실험 및 식약청 허가에 필요한 자료들을 준비하고 제품인증을 추진하고 있다.</p> <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> - 11건의 국내외 학회지 논문게재, 8건의 학술대회 발표 - 2건의 특허출원(1건은 진행 중) - 분말, 환, 과자형태의 시제품 개발 - 시제품의 시장성을 조사하고 있으며, 특허를 바탕으로 기술의 우수성을 확보함 					

자체평가 의견서

연구개발분야	식품발효	과제구분	<input type="checkbox"/> 지정공모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제	관리번호	111030-3	
연구과제명	어린이 성장발육 · 학습력 증진에 적합한 청국장용 콩품종 선별 및 기능성 제품개발					
주관연구기관	(주)장마을					
연구담당자	주관연구책임자	박 규 민				
	협동/위탁/세부 연구책임자	기관(부서)	부산대학교 식품공학과	성 명	김 동 섭	
		기관(부서)	부산대학교 바이오소재공학과		성 명	황 대 연
		기관(부서)		성 명		
연구기간	총 기 간	2011.8.19 ~ 2014.8.18	당해년도기간	2013.8.19 ~ 2014.8.18		
연구비(천원)	총 규 모	440,400	당해년도규모	146,700		

1. 연구는 당초계획대로 진행되었는가?

당초계획 이상으로 진행 계획대로 진행 계획대로 진행되지 못함

○ 계획대로 수행되지 않은 원인은?

2. 당초 예상했던 성과는 얻었는가?

예상외 성과 얻음 어느 정도 얻음 얻지 못함

3. 연구과정 및 성과가 농림어업기술의 발전·진보에 공헌했다고 보는가?

공헌했음 현재로서 불투명함 그렇지 않음

4. 경제적인 측면에서 농림어가의 소득증대에 공헌했다고 보는가?

공헌했음 현재로서 불투명함 그렇지 않음

6. 연구개발착수 이후 국내 다른 기관에서 유사한 기술이 개발되거나 또는 기술 도입함으로 연구의 필요성을 감소시킨 경우가 있습니까?

- 없다 약간 감소되었다 크게 감소되었다

○ 감소되었을 경우 구체적인 원인을 기술하여 주십시오?

7. 관련된 기술의 발전속도나 추세를 감안할 때 연구계획을 조정할 필요가 있다고 생각하십니까?

- 없다 약간 조정필요 전반적인 조정필요

8. 연구과정에서의 애로 및 건의사항은?

현재 국내 청국장 제품 생산업체들의 대부분이 영세하고 규모가 작기 때문에 연구 인력이나 시설 등의 확보에 많은 어려움이 있으며, 연구 결과에 의해 얻어진 결과들을 제품생산에 적용하기 곤란한 경우가 많음. 그리고 기능성이 좋은 제품을 개발하더라도 소비자들의 선입관과 기호도를 변화시키기에는 제품의 홍보방법이나 비용부담이 너무 어렵기 때문에 시장성이 확보되지 못하는 문제가 가장 시급함.

(※ 아래사항은 기업참여시 기업대표가 기록하십시오)

1. 연구개발 목표의 달성도는?

- 만족 보통 미흡

(근거 : 개발된 제품은 좋으나 시장성 확보에 어려움이 있음)

2. 참여기업 입장에서 본 본과제의 기술성, 시장성, 경제성에 대한 의견

가. 연구성과가 참여기업의 기술력 향상에 도움이 되었는가?

- 충분 보통 불충분

나. 연구성과가 기업의 시장성 및 경제성에 도움이 되었는가?

- 충분 보통 불충분

3. 연구개발 계속참여여부 및 향후 추진계획은?

가. 연구수행과정은 기업의 요청을 충분히 반영하였는가?

충분 보통 불충분

나. 향후 계속 참여 의사는?

충분 고려 중 중단

다. 계속 참여 혹은 고려중인 경우 연구개발비의 투자규모(전년도 대비)는?

확대 동일 축소

4. 연구개발결과의 상품화(기업화) 여부는?

즉시 기업화 가능 수년 내 기업화 가능 기업화 불가능

5. 기업화가 불가능한 경우 그 이유는?

구 분	소 속 기 관	직 위	성 명
주관연구책임자	(주)장마을	대표이사	박 규 민(인)
참여기업대표	(주)장마을	대표이사	박 규 민(인)

3. 연구개발 지속가능여부 및 향후 추진계획은?

가. 연구수행과정은 기업의 요청을 충분히 반영하였는가?

충분 보통 불충분

나. 향후 계속 할지 의사는?

중단 고려 중 중단

다. 계속 할지 혹은 고려중인 경우 연구개발비의 투자규모(전년도 대비)는?

확대 동일 축소

4. 연구개발결과와 상품화(기업화) 여부는?

즉시 기업화 가능 수년 내 기업화 가능 기업화 불가능

5. 기업화가 불가능한 경우 그 이유는?

구분	소속기관	직위	성명
주관연구책임자	(주)장마음	대표이사	박규
참여기업대표	(주)장마음	대표이사	박규



연구결과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	식품발효	
연구과제명	어린이 성장발육 · 학습력 증진에 적합한 청국장용 콩품종 선별 및 기능성 제품개발			
주관연구기관	(주)장마을		주관연구책임자	박 규 민
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	330,000,000원	110,400,000원	0원	440,400,000원
연구개발기간	2011.8.19 ~ 2014.8.18			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input checked="" type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 청국장 제조를 위한 기능성 콩 품종 선별 및 기능성 청국장 발효공정 개발	- 어린이용 청국장제품 개발을 위해 청국장발효에 적합한 콩 품종을 알아보았음 - 기능성 청국장 발효를 위한 최적 배양조건을 살펴보았음
②청국장용 기능성 콩 선별	- 청국장 발효에 적합한 콩 품종을 알아보기 위해 15종의 콩을 비교하여 대콩콩과 풍산나물콩이 청국장 발효에 가장 적합함을 밝혔음
③청국장 제조용 기능성 미생물 확보	- 청국장 발효과정에서 GABA 생산량이 많은 고초균과 유산균을 분리하여 과제진행을 위한 실험균으로 확보, 기탁하였음
④기능성 강화 조건 확립	- 분리균주들의 GABA 생산량을 비교하여 기능성 분 생산을 위한 최적 발효조건을 확립하였음
⑤세포주를 이용한 청국장의 성장발육/학습력증진 기능성 탐색	- 뇌하수체전엽세포주 및 신경세포주 등을 이용하여 청국장이 성장호르몬 및 신경성장인자의 분비에 미치는 영향을 평가하였음
⑥모델동물을 이용한 청국장 생리활성 검증	- 치매질환모델동물 등을 이용하여 청국장이 뇌질환 및 어린동물의 성장발육에 우수한 효능이 있음을 규명하였음
⑦청국장이 GLP독성평가/효능평가	- 새로운 균주를 이용하여 개발된 청국장이 실험동물에 유의적인 독성이 없었으며, 아토피질환과 뇌질환에 우수한 효과를 나타냄을 규명하였음

<p>⑧ 어린이 기호성 청국장 제품의 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 소비자 설문 조사를 통해서 청국장 제품 개발에 필요한 사항들을 파악하였고, 청국장에 대한 기존의 이미지를 개선하고 어린이들에게 호감을 줄 수 있는 제품 개발을 위해 기존의 청국장 제품과 더불어 분말형태와 환형태의 시제품을 제작하였음 - 어린이의 거부감을 줄이기 위해 밝은 이미지의 디자인을 준비하고 소포장 시제품을 제조하였음
<p>⑨냄새가 없고 어린이 입맛에 맞는 제품 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 청국장의 냄새를 제거하기 위해 고초균과 젖산균의 혼합배양 제품을 개발하고, 생산된 청국장 제품의 특성을 조사하였음 - 설문조사를 실시하였으며 제품형태에 대한 선호도를 살펴보았으며, 어린이들의 호감을 유도하기 위해 빵튀기 형태의 시제품을 제작하였음
<p>⑩제품의 대량 생산체계 구축 및 건강 기능성 식품 허가 신청</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 청국장의 기능성을 극대화 하기위해 유효성분을 분석하고 생산공정을 조정하였으며 최적생산공정 확립하고 청국장 제품의 안정성 검토를 실시하였음 - 대량생산을 위한 공정 표준화 체계 구축하였으며 제품의 품질관리체계를 실시하였음 - 식약청으로부터 기능성 제품으로 허가받기 위해 각종 자료를 준비하고 허가절차 추진함

3. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	신균주 고초균을 이용한 청국장 제조법
②	청국장 제조에 적합한 공품종 선별
③	GABA 함량이 높은 신균주 분리
④	최대 GABA 생산을 위한 발효조건 확립
⑤	세포주를 이용한 성장호르몬 및 신경성장인자 분비능 분석기술
⑥	모델동물에서 학습력 평가기술 및 실험동물에서 뼈성장 분석기술
⑦	독성평가 기술 및 모델동물에서 아토피질환 평가기술
⑧	환, 분말형태의 청국장 제조
⑨	팽화과정을 통한 과자형 청국장 제품 제조방법
⑩	청국장 제조용 표준화 공정

4. 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 해 결	정책 자료	기타
①의 기술					v	v				
②의 기술					v					
③의 기술		v				v				
④의 기술		v				v				
⑤의 기술				v						v
⑥의 기술					v					v
⑦의 기술	v					v				
⑧의 기술		v					v			
⑨의 기술		v					v			
⑩의 기술					v			v		

5. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	- 특허를 통한 기술력 보유
②의 기술	- 기술과 기능성 강화를 통한 제품의 가치 상승
③의 기술	- 특허를 통한 기술력 보유
④의 기술	- 특허를 통한 기술력 보유
⑤의 기술	- 우수품종에 대한 기초정보제공으로 고부가가치 제품 제조에 활용
⑥의 기술	- 국제수준의 논문을 통한 청국장 효능의 과학적 규명
⑦의 기술	- 청국장의 새로운 기능규명으로 소비촉진
⑧의 기술	- 새로운 형태의 제품 개발로 인한 기호도 증진
⑨의 기술	- 새로운 형태의 제품 개발로 인한 기호도 증진
⑩의 기술	- 공정 표준화로 인한 기업의 생산 증진

