

발간등록번호

11-1541000-001745-01

묵은지의 기능성소재 발굴 및 생물기능성 규명

(Discovery and Biofunctionality of Bioactive Compounds
Originated from Old Matured Kimchi)

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “목은지의 기능성소재 발굴 및 생물기능성 규명”에 대한 최종보고서로 제출합니다.

2012년 12 월 29 일

연구기관명 : 배재대학교
연구책임자 : 이기성(주관 총괄 책임자)
책임연구원 : 이기성(배재대학교)
연구원 : 정가진(서울대학교)
연구원 : 한중수(한양대학교)
연구원 : 이창주(배재대학교)
연구보조원 : 이광수(배재대학교)
연구보조원 : 이윤영(한양대학교)
연구기관명 : 충남대학교
책임연구원 : 김균연
연구보조원 : 박기선
연구기관명 : 오모가리영농영립(주)
책임연구원 : 김형중
연구원 : 남권희

요 약 문

I. 제 목 : 목은지의 기능성소재 발굴 및 생물기능성 규명

II. 연구개발의 목적 및 중요성

1. 연구개발의 목적

본 연구에서는 목은지의 기능성 소재를 발굴하고 생리활성을 규명하고자 한다. 목은지에 존재하는 미생물과 숙성발효 중 생성되는 발효산물 및 효소들의 기능성을 조사 분석함으로써 ‘기능성’ 목은지를 개발하고, 더 나아가 기능성 소재를 활용한 건강기능성 제품들을 개발할 것이다. 이와 같은 일련의 실험을 통하여 목은지의 산업화를 시도 하여, 목은지의 수출 증대 및 한식의 세계화에 이바지 하고자 한다.

2. 연구개발의 중요성

김치는 우리나라의 가장 대표적인 발효식품으로 식이섬유, 유산균, 비타민, 무기염류 및 생리 활성 인자 등을 고루 갖춘 건강의 보고이다. 이미 세계보건기구에서는 김치를 건강식품으로 인정하고 있으며, 특히 김치를 6개월 이상 숙성시킨 목은지는 유산균 및 칼슘, 무기질, 철분 함량이 높아 많은 영양소를 한꺼번에 얻을 수 있는 영양 식품으로 알려져 있다. 한국인은 오래전부터 목은 김치에 대한 또 다른 맛과 건강 식품으로서의 기능을 알고 있기 때문에 일부러 목은지를 만들어 먹기도 하였으나, 만드는 방법이나 보관 방법에 따라 목은지의 품질 및 건강의 관점에서 크게 달라질 수 있다.

따라서 목은지의 국제화 및 산업화를 위해서는 목은지의 기능성 소재를 발굴하고 생리활성을 활성화 시킬 수 있다는 과학적 근거가 필요하다. 더 나아가 품질의 균일화를 위한 표준화가 필요할 것이며, 궁극적으로 항염, 대사질환 유전자를 표적으로 하는 첨단기능성 식품으로 개발하여 한식의 세계화를 위한 대표 식품으로 개발하여야 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 목은지의 기능성 소재 발굴 및 생리활성 규명

1) 목은지와 발효숙성 미생물 및 효소의 신규 생리기능성 소재 발굴 연구

- ① 목은지 시료 준비
- ② 목은지 추출물 제조
- ③ 미생물 분석, 미생물 생리활성 및 동정 연구
- ④ 목은지내 세포의 효소 활성도 분석
- ⑤ 목은지 추출액의 기능성소재들의 profile
- ⑥ 항균 물질 분석
- ⑦ 장내 세균총의 변화 연구
- ⑧ 목은지 제조 공정개선 및 품질관리 규격

2) 목은지의 세포면역학적 생리활성 기능 분석

- ① 면역세포에 미치는 영향
- ② 면역세포 활성화 기작의 연구
- ③ 항암 작용 분석
- ④ 항염기능 분석
- ⑤ 항비만효능 분석(동물실험)

3) 목은지의 항염지향적 생리활성 규명연구

- ① 목은지 종류별 항염 물질 탐색·선별
- ② PLD 발현 및 활성화에 미치는 영향 연구
- ③ mTOR 신호전달계에 미치는 영향 연구
- ④ MAPK 신호전달계에 미치는 영향 연구
- ⑤ COX2 및 PGE2 생성에 미치는 영향 연구
- ⑥ NO 합성에 미치는 영향 연구

2. 목은지를 이용한 대사질환 관련 연구

- 1) 목은지 추출물을 이용한 간세포 독성 연구
- 2) 목은지 추출물을 이용한 세포의 형태학적 분석 및 세포 사멸효과 비교 분석
- 3) 목은지 추출물을 이용한 대사증후군 마커 유전자 확인
- 4) 대사증후군 마커 유전자의 전사활성도 측정
- 5) 인슐린과 목은지 추출물을 이용한 간세포의 대사과정 확인
- 6) 목은지 추출물을 이용한 간 세포 신호 전달체계 완성

3. 기능성 소재 · 식품 제형화 및 상품화

- 1) CODEX 기준, 수출용 기능성 목은지 개발
- 2) 목은지 특이 발효 미생물 및 산물 활용 제품 개발
- 3) 발효공정 시스템 확립 (자연발효, 중균발효)

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발의 결과

- 1) 목은지의 기능성 소재 발굴 및 생리활성 규명

① 목은지 추출물 성분 분석 및 미생물 균집분석

본 연구에서는 목은지와 신선김치들을 blender로 분쇄한 후 곧바로 pH, DO, 산도, 염분도, 무기물, 미생물 분석 등 일반 성분 분석을 수행하였다.

또한 목은지와 신선김치의 미생물 균집 및 개체군 균체수 조사를 일반세균(NA, TYE), 슈도모나스속(PIA), 유산균류(MRS, PES 배지등), 대장균 및 장내세균(EC, EMB 배지등), 식중독균(SS, TCBS, Listeria 배지, Legionella 배지, Staphylococcus 배지 등) 등의 선택배지를 이용하여 조사분석 하였다.

그 결과 목은지(2년)가 신선김치에 비해 염분도가 15.7%낮아짐을 알 수 있었고 Fructose, Sucrose, glucose 등 당성분들도 낮아짐을 알 수 있었다.

목은지의 대장균, 식중독균 검출여부 조사에서는 콜로니 색, 모양등의 기준으로 볼 때 대장균 및 식중독균은 검출되지 않았다.

목은지의 미생물 균집 및 개체군 균체수 조사 결과로부터 다양한 생리활성들이 지닌 184종의 미생물을 분리한 후 170종을 16S rDNA 염기서열 분석법으로 동정하였다.

② 목은지 미생물들의 생리활성 측정

목은지는 수많은 유산균들에 의한 발효과정 중 생성된 대사산물과 효소들의 복합체로서 인체에 해로운 병원성세균, 식품부패균의 증식을 억제하여 장을 튼튼하게 향상시키며 장의 연동운동 증가, 소화흡수 증가, 면역기능 증강효과를 나타내는 것으로 보고되어 있다.

따라서 목은지 속에 남아있는 미생물을 검증하고, 특정 미생물이 남아있다면 목은지 제조 과정에서의 그들의 역할과 최종 산물의 기능성을 조사하여 일반적인 김치에 비하여 목은지가 지니는 생물기능성에 대해서 연구하고자 했다.

NA, MRS등 다양한 배지를 통하여 1차적으로 선별 분리한 184균주를 대상으로 8가지의 생리활성 측정용 배지를 활용하여 세포의 효소 활성 및 가용화 등을 조사분석 하였다. 투명환 및 발색시약 첨가 확인 실험을 통하여 단백질분해 활성 미생물(PA), 지질분해 활성 미생물(LA), 전분분해 활성 미생물(SA), 셀룰로오스분해 활성 미생물(CA), 불용성염 가용화 활성 미생물($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ 첨가배지)들의 생물활성을 조사분석하였다. 이로서 184개 균주의 생리활성 스펙트럼을 완성하였다. *Bacillus subtilis*와 *Bacillus magaterium*은 전분대사과정에서, *Lactobacillus paraplantarum*은 불용성인산염 가용화 과정에서 중요한 역할을 담당하였다.

③ 기능성 소재들의 profile

또한 목은지 추출액의 기능성소재들의 profile을 위해 유기산 및 아미노산, 무기물 분석을 실행하였다. 그 결과 유기산 분석에서 신선목은지에서만 Citric acid가 48.1ppm농도로 함유되어있다. 한편 Oxalic acid는 Citric acid와 정반대로 목은지에서만 나타났다. Lactic acid는 목은지 1년에 비해 2년 목은지에서 높게 나타났다.

무기물 분석결과 목은지(2년)에서 Ca과 P성분함량이 가장 높았던 반면 Na함량은 가장 낮았다. 지방산 분석결과 전통방식의 목은지는 일반 시중에 판매되는 목은지에 비해 EPA, DHA와 가드올레산, 아라키돈산, 에이코사트리에노산 등 불포화지방산이 다양하게 나타났다.

아미노산 분석결과 총 아미노산 함량은 2년된 목은지에서 1,445mg으로 가장 높았으며 알기닌(Arg), 아스파르트산(Asp), 티로신(Tyr) 함량은 목은지(1, 2년)에서 낮은 함량을 나타냈다. 다른 아미노산들은 신선목은지에 비해, 목은지에서 증가하거나 비슷한 함량을 보였다. 특히 2년 목은지에서 나타난100KDa 이상의 고분자 단백질은 목은지의 validation biomarker로 활용 가능성이 있다.

④ 목은지의 세포면역학적 및 항염지향적 생리활성 규명 연구

대식세포주인 Raw 264.7에 LPS (Lipopolysaccharide)를 처리하면 다양한 생리활성물질(Cytokines)이 발현되어 체내 염증반응이 유도된다. 특히, TNF α ,

IL-6, IL-1 β 의 발현이 LPS에 의해 상당히 증가하였는데, 1mg/ml의 2년 묵은지를 5분 단시간 처리했을 때, IL-1 β 의 발현은 35% 감소하였다. 또한, 1mg/ml의 2년 묵은지를 1시간 처리하였을 때 IL-6의 발현은, 97%나 감소한 반면, IL-1 β 의 발현량은 반대로 증가하였다. 한편, LPS를 6시간동안 처리하였을 때, TNF α 의 발현이 감소하는 경향을 보였고 특히, 신선지에서 그 효과가 가장 좋았다. 다음으로, ELISA를 이용하여 생리활성물질들의 생성량을 검사했을 때, 여러 생리활성물질들 중에서 TNF α 가 LPS에 의해 그 생성량이 증가한데 비해 신선지, 1년 묵은지, 2년 묵은지에서 모두 상당한 감소를 보였다. 마지막으로, 염증매개 반응의 폭지에 위치한 것으로 알려져 있는 PLD와 묵은지의 생리활성물질 억제 효과가 관련있는지 확인하기 위하여 PLD 활성을 측정한 결과, LPS에 의해 증가되었던 PLD 활성이 신선지에서 2년 묵은지로 갈수록 점차 감소함을 확인하였다.

2) 묵은지를 이용한 대사질환 관련 연구

인슐린 저항성은 제 2형 당뇨병을 유발하는 중요한 요소이다. 당뇨병은 높은 혈당이 유지되거나, 인슐린 시그널에 관련된 유전자들의 결핍 및 돌연변이에 의해 야기된다. 본 연구에 이용한 묵은지 추출물은 인슐린 저항성을 개선시키는 한편, 인슐린 시그널 관련 유전자들의 활성화와 관련이 깊다. 먼저 인간의 간세포로부터 유래된 세포주(HepG2)를 이용하여 MTT assay 및 FACS 분석을 통해 독성 실험을 1차 진행하였으며, 적정농도를 기준으로 mRNA와 단백질 수준에서 비교 분석 하였다. 묵은지 추출물은 인슐린 신호전달체계 중 IRS-1, ER, 그리고 대사질환 관련 유전자들인 AKT, mTOR, p70S6K의 변화가 나타났다. 흥미로운점은 묵은지 추출물을 처리한 후, 저농도의 인슐린을 처리하여도 고농도의 인슐린을 처리한 것과 같이 간세포의 대사과정이 활성화되는 결과를 얻어내었다. 이러한 결과는 묵은지 추출물이 대사관련 질환을 예방 및 치유할 수 있다는 것을 의미하며, 기능성 식품으로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

3) 기능성 소재-식품 제형화 및 상품화

- ① 시제품 4가지 : ①동결건조 묵은지, ② 동결건조 묵은지분말, ③ 묵은지 다시다, ④묵은지 조미료
- ② 홍보교육 : JTBC(2012. 4) 묵은지(차별적이고 우수한 전통발효 제조 방법) MBN(2012. 5) 묵은지(차별적이고 우수한 전통발효 제조 방법)
- ③ 국내는 물론, 미국, 중국, 동남아시아 buyer들에게 시식, 소개, 홍보를 시행하

였음, 우수성, 차별성, 맛, 다양한 용도 등을 입증

④ 기능성 소재·식품 제형화를 위한 시제품들의 관능검사결과

기능성 소재 및 식품 제형화를 위해 준비한 시제품 3가지를 각각의 설문지를 통해 관능검사를 실시하였다. 시제품 3가지는 각각 ① 동결건조 2년 묵은지 분말, ② 동결건조 2년 묵은지 분말 + 다시다, ③ 동결건조 2년 묵은지 분말 + 인증된 기능성 소재들로 구성하였다. 사용목적과 유사한 제품 성격을 가진 일반 다시다 분말을 대조군으로 사용하여 관능검사 설문 대상자들에게 3가지 시제품과 함께 제공하였다.

미각, 식감, 풍미, 시각 그리고 전체적인 조화도 등의 항목에서 대조군의 일반 다시다 분말 제품보다 더 좋다는 평가 결과를 받았다. 또한 한국적인 풍미, 건강의 이미지, 고급품으로서의 제품 가치가 보여진다는 평가를 받았다.

2. 연구개발 활용에 대한 건의

1) 신선김치와 차별화된 묵은지의 기본특성, 성분등이 규명됨.

- ① validation biomarker 도출 : 단백질 1종, 지질 3종, 지방산 4종 이상
- ② 표준매뉴얼(60년 전통 제조기술)-재료의 차별성

2) 묵은지 고유의 제조기술이 과학적 근거로 확립됨.

- ① Brand marker 확립 : 지방산 4종

3) 묵은지만의 기능성 및 우수성에 대한 심층적 연구성과 도출

- ① 묵은지의 기능성 미생물, 생물활성, 효소활성, 성분 등의 규명
 - 세포외 효소(6종) ; 우수한 활성능 및 안정성(묵은지 분말)
 - 유기산 함량비 : 숙성발효기간의 validation marker(초산/젖산)도출
 - 아미노산 생전환능(Arg→Orn)이 우수한 미생물 도출(5종)
 - 묵은지의 validation marker(Hyl)도출
 - IRS발현증진소재(II형당뇨병 관련) 2종 도출(Try, Cit)

② 항염증 기능으로 염증반응 억제완화기작으로 심층분석됨(IL-6억제)

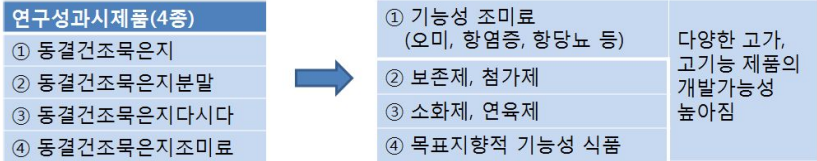
- IL-6, TNF- α , PLD 활성 억제

PLD는 고유의 신호전달계를 통해 생리활성물질을 발현시켜 염증반응이 일어나도록 매개하는 꼭지 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 PLD가 묵은지 처리에 의해 억제됨으로써, 생리활성물질의 발현을 억제시킬 수 있는 가능성을 발견하였다. 앞으로 보다 심도있는 연구를 통해서 묵은지가 PLD를 억제시킴으로써, 체내염증반응이 억제됨을 증명하고, 더 나아가 세계 최초로 PLD 신호전달계 제어 항염증 기능성 식품으로써, 묵은지의 효능을 알릴 수 있는 가능성을 제시한다.

③ 당뇨병예방 기능성 식품의 가능성 제시

목은지의 세포독성 실험으로 1mg/ml에서는 생존율에 영향을 미치지 않았다. 제2형 당뇨병 및 인슐린 세포신호전달체계에 필수적인 IRS-1, 2, 4 유전자중 IRS-1의 돌연변이 및 발현억제는 인슐린 저항성을 높여 제 2형 당뇨병 유발, 목은지 추출물 농도가 높을수록 IRS-1 유전자 발현이 증가됨.

4) 목은지 가공식품 및 다양한 고부가가치 제품의 원재 개발
(동결건조 목은지, 동결건조 분말의 상품화)



5) 기술적 연구성과는 학회발표, 논문게재, 특허출원, 산업화 성과항목에 활용되어, 당초 계획된 성과지표에 도달하는데 충분함
(학회발표 5편, 특허출원 4편, 상품화 4건을 도출하였음).

SUMMARY

(영문요약문)

I. Title

Discovery and Biofunctionality of Bioactive Compounds Originated from Old Matured Kimchi

II. Goal and Importance of the research

1. Goal of the research

This study was carried out to find out functional material and physiological activity of old matured Kimchi. As research of microbes, fermented products and enzymes in old matured Kimchi, this study will develop functional old matured Kimchi and health functional food using old matured Kimchi. Ultimately, in this study will contribute to globalization of Korean food and increase export of old matured Kimchi.

2. Importance of the research

Most of Kimchi studies have been focused on the freshly fermented-Kimchi till now. Old matured-Kimchi(OMK) is expected to be quite different from the freshly fermented-Kimchi in those of flavors, metabolites and microbes. To find out new biofunctionalities and resources of OMK, several factors(pH, DO, salinity) and, components(carbohydrate, protein, lipid) were investigated in 1month old matured-Kimchi(1m OMK), 1year old matured-Kimchi(1y OMK) and 2years old matured-Kimchi(2y OMK). Like this, OMK can vary significantly from recipe and keeping method. Therefore, a scientific basis of OMK is required for its industrialization and internationalization. Old matured kimchi will ultimately be a functional food that targets anti-inflammatory and metabolic disease related genes.

III. Research Contents and Scope

1. Characterization and biofunctionality upon functional resources originated from old-matured-Kimchi(OMK)

- 1) Characterization of new physiologicall bioactive resources from old-matured-Kimchi-extracts(OMKE)
- 2) Cytoimmunological analysis of old matured Kimchi
- 3) Anti-inflammatory response analysis of old-matured-Kimchi-extracts

2. Study of metabolic disease on old matured Kimchi

- 1) Cell death on liver cells using old matured Kimchi extracts (OMKE)
- 2) Morphological and cell death effect analysis using OMKE
- 3) Identifying of metabolic disease related marker genes using OMKE
- 4) Measurement of transcriptional activity of metabolic disease related genes
- 5) Identifying of metabolic pathway in liver cells using OMKE and insulin
- 6) Accomplishment of signaling pathway in liver cells using OMKE

3. Commercialization and formulatiom of functional resources and food

- 1) Development of functional old matured Kimchi (CODEX) for export
- 2) Development of unique old matured Kimchi fermented microbes and its products
- 3) Accomplishment of fermentation process system

IV. Results and their applications

1. Physiological research and identifying functional material of old-matured-Kimchi(OMK)

- 1) Characteristics of old-matured-Kimchi and its microbes.

The salinity is decreased 15.7% in 2y OMK compared with 1m OMK. 2y

OMK contains the lowest percentage of sugar contents such as fructose, sucrose and glucose. From the viewpoint of colony color and morphology on the selective media, *E.coli* and food poisoning bacteria were not detected in OMKs at all. On the basis of selective media, 184 bacterial strains were newly isolated in OMK for the purpose of analyzing the biofunctionalities and population dynamics. Interestingly, *B. subtilis* and *B. megaterium* in 1m OMK played a key role in amylose metabolism, on the other hand, *L. paraplantarum* in phosphate solubilizing activity.

2) Biofunctionalities and Metabolites of old-matured-Kimchi(OMK) Bacteria.

On the 184 strains isolated from old matured-Kimchi, biofunctionalities including proteolytic, lipolytic, amylolytic, cellulolytic activities and phosphate solubilizing(PS) activities were analyzed with the specific plates and enzyme assay. The 1month old matured-Kimchi(1m OMK) contains the high percentage(50%) of amylolytic bacteria, while 1year old matured-Kimchi(1y OMK) contains 65% of cellulolytic bacteria. 2years old matured-Kimchi(2y OMK) showed the similar contents of amylolytic(45%), cellulolytic(45%) and proteolytic(40%) bacteria. The 1m OMK comprises with 48.1ppm of citric acid uniquely. While the 1m OMK does not have oxalic acid, 1y OMK and 2y OMK contain the oxalic acid. In 2y OMK, the contents of lactic acid, Ca and P reached the highest value, on the contrary, Na contents showed the lowest. And also, OMK consists of various kinds of unsaturated fatty acid such as EPA, DHA, gadoleic acid, arachidonic acid, eicosatrienoic acid etc. 2y OMK contains the highest contents (1,445mg/100g) of total amino acid compared with 1m OMK and 1y OMK while 2y OMK comprises with lower contents of Arg, Asp and Tyr. Especially, the specific high molecular weight(100KD↑) of protein was produced uniquely in 2y OMK. This protein could be utilized as standard marker for the validation of OMK.

3) Old-matured Kimchi suppresses Expressions of LPS-induced TNF α , IL-1 β , and IL-6

It has been also reported that old-matured kimchi might have some effects to anti-cancer, anti-oxidation, and enhanced immune reaction. However, what kind of signaling mechanism is directly responsible for anti-inflammatory

effects has not been studied well. So, we investigated whether old-matured kimchi has effect on production of inflammatory cytokine. We checked the expression profiles of lipopolysaccharide (LPS)-induced cytokines in Raw264.7 cells, Among the cytokines, expression of Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α), Interleukin-1 β (IL-1 β), and Interleukin-6 (IL-6) are increased by LPS. Interestingly, we found that increased expression of LPS-induced cytokines (especially, TNF α) is suppressed by treatment of old-matured Kimchi.

2. Study of metabolic disease on old matured Kimchi

Insulin resistance is an important component of the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus (DM). It is intimately associated with a high glucose concentration in blood and is due to defects in either insulin secretion or insulin action. The purpose of present study was to test if old matured-Kimchi Extracts (OMKE) could improve insulin resistance at the cellular level and to determine which genes are involved in. Effects of OMKE in human liver cells were examined on the expression of genes which constitute the integral parts of the insulin signaling pathway. Employing RT-PCR and western blot, expression of the insulin receptor (IR), IR substrate (IRS-1, 2, 4), Estrogen receptor (ER) and metabolic disease related genes were assayed in HepG2 cells which were treated with OMKE. MTT and FACS analysis were also performed to investigate the general effects of OMKE on the cell. Indeed, OMKE activates IR, IRS-1, ER, AKT, mTOR and p70S6K gene expression. Furthermore, OMKE synergistically affected insulin sensitivity in a low concentration (1~10 nM) of insulin. These results suggest that the molecular mechanism for the effects of OMKE on insulin resistance in liver cells is via increased expression of metabolic related genes.

3. Commercialization and formulation of functional resources and food

- 1) Development of functional old matured Kimchi (CODEX) for export
- 2) Development of unique old matured Kimchi fermented microbes and its products
- 3) Accomplishment of fermentation process system

CONTENTS
(영 문 목 차)

Abstract -----	1
Summary -----	8
Chapter 1. Introduction -----	14
Chapter 2. Current state in domestic and foreign technology ----	17
Chapter 3. Research contents and results -----	18
1. Characterization and biofunctionality upon functional resources originated from old-matured-Kimchi(OMK)-----	18
2. Study of metabolic disease on old matured Kimchi-----	135
3. Commercialization and formulation of functional resources and food----	149
Chapter 4. Research object achievement -----	156
Chapter 5. Application -----	157
Chapter 6. Technical information of foreign countries -----	160
Chapter 7. References -----	162

목 차

요 약 문 -----	1
영문요약서-----	8
제 1장. 연구개발과제의 개요-----	14
제 2장. 국내외 기술개발 현황-----	17
제 3장. 연구개발수행 내용 및 결과-----	18
제 1절. 목은지의 기능성소재 발굴 및 생리활성 규명-----	18
제 2절. 목은지의 대사질환 및 암 관련 유전자에 작용하는 기능성물질 규명-----	135
제 3절. 기능성소재·식품 제형화 및 상품화-----	149
제 4장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도-----	156
제 5장. 연구개발 결과의 활용계획-----	157
제 6장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보-----	160
제 7장. 참고문헌-----	162

제 1장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발의 목적

본 연구는 목은지의 기능성 소재와 생물 기능성을 규명하고자한다. 목은지에 존재하는 미생물과 숙성발효 중 생성되는 발효산물 및 효소들의 기능성을 조사 분석 하므로써 “기능성” 목은지를 개발하고, 더 나아가 이들 기능성 소재를 활용한 건강기능성 제품들을 개발하며 상기 연구와 연계하여 목은지가 함유하고 있는 다양한 성분 중 항염 효과가 탁월한 특정 물질을 탐색, 동정하고 염증 매개반응의 폭지에 위치한 PLD 신호전달계에 대한 억제점을 규명함으로써, 목은지의 생체 기능성화합물의 존재를 과학적으로 증명하고 세계 최초로 PLD 신호전달계 제어 항염 기능성소재로 활용·개발하고자 한다. 또한 소화기 계통의 암세포와 대사질환 연구를 위한 간체장세포를 이용하여, 목은지의 항암 효과 및 대사질환 메카니즘을 분자 유전학적으로 규명하므로써 항암효과 및 대사증후군 치료 효과를 가지는 기능성 소재를 발굴한다. 이를 활용하여 강력하게 업그레이드된 항암 및 대사질환용 기능성 식품을 개발하고자 한다

궁극적으로, 목은지의 미생물, 발효대사산물, 효소, 무기물 등 기능성 소재들과 이들의 유전자 수준의 목표지향적 기능성 규명으로, 기능성 목은지, 보존제, 첨가제, 연육제, 소화제, 면역증강제, 항암·항염·대사질환 유전자를 표적으로하는 첨단기능성 식품을 개발하고자 한다.

제 2절 연구개발의 필요성

김치는 우리나라의 가장 대표적인 발효식품으로 식이섬유, 유산균, 비타민, 무기염류, 생리활성인자들을 고루 갖춘 건강의 보고이다.

이미 WHO(세계보건기구)에서는 항암 및 면역 체계 증진 효과에 있어 김치를 건강식품으로 인정하고 있다.

오래 전부터 목은 김치에 대한 또 다른 맛을 알고 있기 때문에 사람들은 일부러 목은지를 만들어 먹기도 한다. 이때 목은지를 만드는 방법이나 보관 방법에 따라 목은지의 품질이나 건강의 관점에서의 가치가 크게 달라질 수 있을 것이다.

특히 김치를 6개월 이상 숙성시킨 목은지는 유산균 및 갈슘, 무기질, 철분 함량이 높아 많은 영양소를 한꺼번에 얻을 수 있는 영양 식품이다.

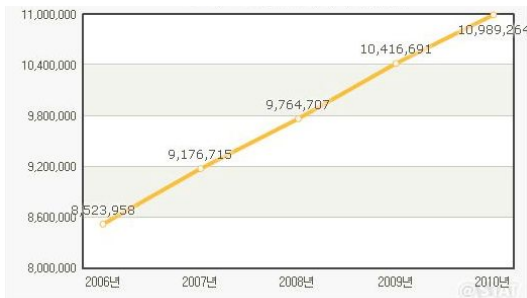
묵은지는 늦가을 가을배추와 월동배추를 이용, 겨울 김장철에 담구어 몇 해 동안 적정저온온도에 보관하여 자연발효 숙성시켜 해가 갈수록 깊고 구수한 맛이 우리나라의 전통 토속김치이다.

그리고 묵은지는 일반김장김치와 일반신선발효김치와는 김치부재료의 함량도 다르게 넣어 발효시킨다. 또한 숙성발효온도와 보관방법도 다른점이 특징이다. 즉, 묵은지는 일반신선김치를 단지 오랫동안 숙성발효 시킨 것과는 뚜렷이 차별화되어 있다.

묵은지는 수많은 유산균들에 의한 발효과정 중 생성된 대사산물과 효소들의 복합체로서 인체에 해로운 병원성세균, 식품부패균의 증식을 억제하여 장을 튼튼하게 향상시키며 장의 연동운동 증가, 소화흡수 증가, 면역기능 증강효과를 나타내는 것을 보고되어있다.

유산균이 사람의 장에 도달하여 생균제(probiotics)로써 효과를 나타내기 위해서는 인체 소화기관의 열악한 환경을 극복해야 함. 묵은지에서 발생하는 유산균들은 이러한 미생물의 생존 저해환경에서 내성을 갖는 내산성과 내담즙성에 효과가 뛰어난 것으로 알려져 있지만 묵은지를 이용한 인체 대사작용의 과학적인 접근방법은 전무하다.

현대사회에 만연한 대사질환은 고칼로리, 고염 음식 섭취에 의해 신체내 항상성 균형이 무너지는 것이 그 원인이 됨. 불균형한 대사과정은 당뇨병 및 고지혈증을 야기할 뿐만 아니라 뇌혈관질환과 심혈관질환등을 유발하는 것으로 알려져 있으며 대사증후군으로 발병되는 5대 질환의 환자수가 지난해 1,000만명을 넘어선 것으로 조사되어 있다 (그림 1).



* 출처 : 한나라당 원희목 의원 자료실

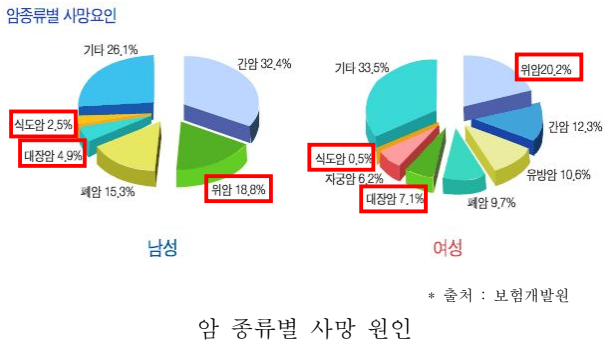
[2006~2010년] 대사증후군으로 발병된 5대 질환 환자 수

6개월 이상 숙성된 묵은지는 김치가 함유하는 수많은 유산균과 무기질 및 각종 영양소가 극대화 되어 소화기 계통 항암 연구를 위한 중요한 식품임에도 불구하고 그 가치를 인정받고 있지 못 한다.

저칼로리 식품인 묵은지는 식이섬유를 많이 함유하고 있어 인체의 소화기 계통질환을 막아주는데 탁월한 효능을 가진 것으로 알려져 있다.

묵은지에서 생성되는 유기산과 및 다종의 비타민들은 대장 및 소장에서 정장작용을 활발히 함으로써 이로운 균의 발육을 돕는 반면 해를 끼치는 균의 생육은 억제하는 것으로 밝혀졌다. 이를 바탕으로 위암 및 대장암 등의 소화기 계통의 항암 효과에 뛰어난 것으로 알려져 있으나 이를 뒷받침 할 수 있는 과학적인 근거는 매우 부족한 상황이다.

서구화되어가는 식습관에 의해 소화기 계통의 암은 세계적으로 두 번째 흔한 암으로 알려져 있으며 이로 인한 사망률도 두 번째로 높을 뿐 아니라 이의 치료법으로는 수술을 통한 외과적 방법과 항암제를 이용한 화학적 요법이 유일하다.



따라서 묵은지 속에 남아있는 미생물을 검증하고, 특정 미생물이 남아있다면 묵은지 제조과정에서의 그들의 역할과 최종 산물의 기능성을 조사하여 묵은지의 가치를 재조명해 볼 필요가 있다.

담그자 마자 소비하는 일반적인 김치에 비하여 묵은지가 지니는 생물기능성에 대해서 아직 깊이 연구된 바 없기 때문에, 일반적인 김치에서 수행해 본 모든 연구 내용을 적용하여 비교하므로써 묵은지에 숨어있는 중요한 생물학적·생리기능성 가치를 발굴하고자하는 본 연구는 매우 중요하다.

제 2장 국내외 기술개발 현황

일반적으로 많은 국내외 연구자들이 수행하는 김치관련 연구 분야는, 김치에 존재하는 유산균을 활용하여 고기능성 아미노산인 GABA, 오르니틴 생산을 높이는 연구, 김치발효의 효율성 및 기능성을 높이는 연구, 김치 종균개발 연구, 김치 저장기간 연장 과 식중독균과 같은 병원성 미생물에 대한 항균활성연구 및 생물학적 제어연구, 기능성 재료와 유산균을 이용한 기능성 김치제조에 관한 연구 등이 활발하다.

국외에서는 와인에 존재하는 유산균을 이용하여 고기능성 아미노산의 고생산성에 관련한 연구를 분자유전학적으로 활발히 접근하고 있다.

현재까지 보고된 김치관련 연구 및 자료는 1000여편에 이르고 있으나 6개월 이상의 숙성기간을 거친 묵은지에 대한 연구는 매우 미비하다. 특히 묵은지에 의한 대사질환 활성 및 염증반응 억제 신호전달체계에 대한 연구는 전무하다. 묵은지는 한국 전통 고유의 음식으로 해외에서 묵은지 자체 추출물을 이용한 연구는 전무하며, 그나마 국내에서도 묵은지의 기능에 대한 해석이 분분하다. 소수의 김치 연구자들에 의하면 묵은지는 일반김치보다 고염 음식으로서 대사활성에 도움을 주지 못한다고 말하고 있으나, 이는 일부 묵은지에 해당하는 결과일 뿐, 김치의 보관 상태나, 숙성 시키는 재료에 따라 대사작용 및 면역작용에 대한 결과는 전혀 다르게 나타날 것이라고 예상하고 있다.

본 연구팀은 묵은지의 보관 방법 및 숙성 과정을 일관화 하여 기존 묵은지의 문제점을 보완하였으며, 다양한 분자 세포 생물학적 실험을 통해 대사 활성 실험 및 면역작용에 대한 연구를 심도있게 진행하였다. 또한 본 연구의 결과는 한식의 세계화를 앞장서는데 묵은지가 대표할 것이라고 자부한다.

제 3장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 목은지의 기능성소재 발굴 및 생리활성 규명

1. 목은지와 발효숙성 미생물 및 효소의 신규 생리기능성 소재 발굴 연구

가. 연구내용 및 결과

1) 목은지 시료 준비

목은지를 전통적인 자연발효방법으로 생산하는 기업에서 제조한 목은지(6개월~2년 숙성)와 신선김치, 그리고 신선김치에 본 연구진이 개발·보유하고 있는 김치종균들을 접종하여 제조 될 목은지(15일~2개월)를 대상으로 하였다.

전통적인 자연발효방법과 관련한 60년 전통의 표준매뉴얼은 재료구성이 배추, 무, 참쌀, 멸치젓, 멸치액젓, 새우젓, 조기, 고춧가루, 양파, 마늘, 생강, 표고버섯, 대파, 생강, 잣, 백설탕 등으로 되어 있다. 이 기업의 표준매뉴얼에 있는 세척방법, 혼합방법, 발효숙성온도와 보관방법에 의거하여 목은지를 제조 하였다(각각의 부자재 조성은 대외비 내용입니다).

목은지 시료는 목은지용 1개월 신선김치, 1년 목은지, 2년 목은지와 이를 동결건조 후 분말화 시킨 목은지 분말을 시료로 사용하였으며 다른 기업에서 제조한 비교용 신선김치와 목은지를 비교 시료로 준비하였다(Fig 1).



Fig 1. 목은지 동결건조 시료

※ 묵은지 시료의 정의

시료	특징 및 정의
김치A	60년 전통의 표준 메뉴얼에 의한 전통발효 묵은지 제조방법으로 제조한 김치로서, 1개월 숙성발효시킨 김치 <묵은지용 1개월 신선김치>
김치B	60년 전통의 표준 메뉴얼에 의한 전통발효 묵은지 제조방법으로 제조한 김치로서, 1년 숙성발효시킨 김치 <1년묵은지>
김치C	60년 전통의 표준 메뉴얼에 의한 전통발효 묵은지 제조방법으로 제조한 김치로서, 2년 숙성발효시킨 김치 <2년묵은지>
김치D	비교용 1년 묵은지

※ 김치 A,B,C는 2년이상 묵은지를 제조·판매하는 기업에서 묵은지 전용으로 제조된 것 임.

※ 비교용 묵은지(김치D)는 다른기업에서 제조된 약 1년된 묵은지 임.

2) 묵은지 추출물 제조

상기 묵은지와 신선김치들을 blender로 분쇄한 후 곧바로 pH, DO, 산도, 염분도, 무기물, 미생물 분석, 유기산 분석, 효소활성분석, 효소근원연구 등을 수행하였다.

묵은지와 신선김치 분쇄시료(또는 동결건조 묵은지 분말 시료)를 에탄올, 메탄올, 디클로로메탄, 헥산, 클로로포름 등 유기용매로 추출 분획하여 용매별 묵은지 추출액 시료를 제조하였다.

여분의 시료는 적량씩 분주하여 급속냉동(-80℃) 보관하였다.

3) 묵은지 추출물의 일반성분 분석

가) 묵은지 일반성분 분석 방법

수분, 회분, 탄수화물, 식염, fructose, glucose, sucrose는 식품공전(2011) 방법으로, 지방은 chloroform-methanol 추출법으로, 단백질은 kjeldahl법으로 분석하였다. 포화지방은 AOAC Official method(963.22)로 수행하였다.

나) 묵은지 추출물의 일반성분 분석결과

(1) 자연발효 묵은지 추출물의 일반성분 분석결과

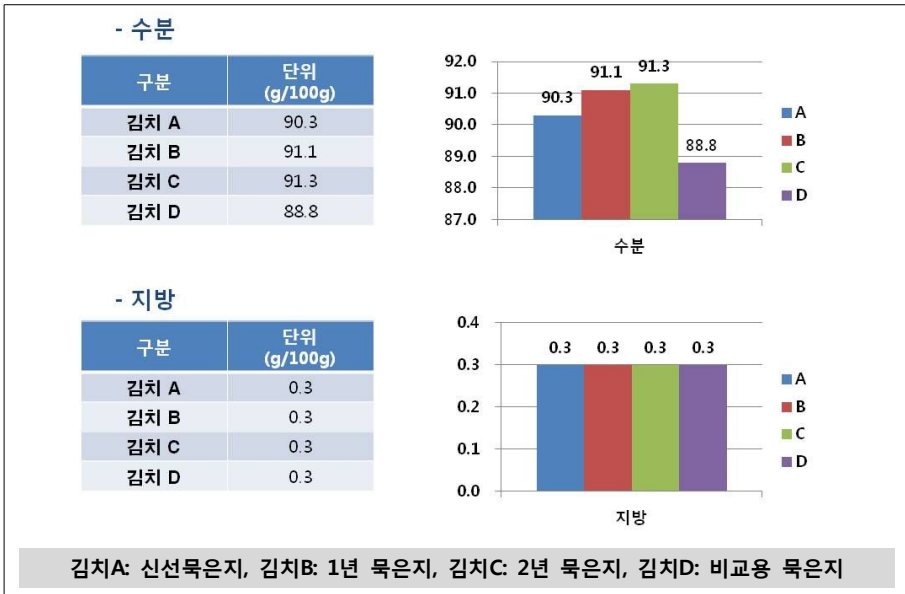
숙성발효 기간에 따른 자연발효 묵은지의 성분 분석은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. 자연발효 목은지 일반성분 분석 결과표

항목	분석결과				단위	시험방법
	A	B	C	D		
수분	90.3	91.1	91.3	88.8	g/100g	식품공전(2001) 상압가열건조법
지방	0.3	0.3	0.3	0.3	g/100g	Chloroform-methanol 추출법
단백질	1.7	1.9	2.0	2.0	g/100g	Kjeldahl법
회분	2.3	2.3	2.1	2.9	g/100g	식품공전(2001) 회분시험법
탄수화물	5.4	4.4	4.3	6.0	g/100g	식품공전(2001) 계산법
식염	1.9	1.7	1.6	2.3	g/100g	식품공전(2001) 식염시험법
Fructose	0.4	0.2	0.0	0.0	g/100g	식품공전(2001) 당질시험법
Glucose	1.1	0.2	0.1	0.1	g/100g	식품공전(2001) 당질시험법
Sucrose	0.1	0.0	0.0	0.0	g/100g	식품공전(2001) 당질시험법
포화지방	0.1	0.1	0.1	0.1	g/100g	AOAC Official Method 963.22
EPA	7.6	-	-	0.5	mg/100g	식품공전(2001) 지방산시험법
DHA	12.2	-	-	1.0	mg/100g	식품공전(2001) 지방산시험법

A : 신선목은지, B : 1년 목은지, C : 2년 목은지, D : 비교용 목은지

Table 2. 자연발효 목은지의 성분 분석결과 (수분, 지방)

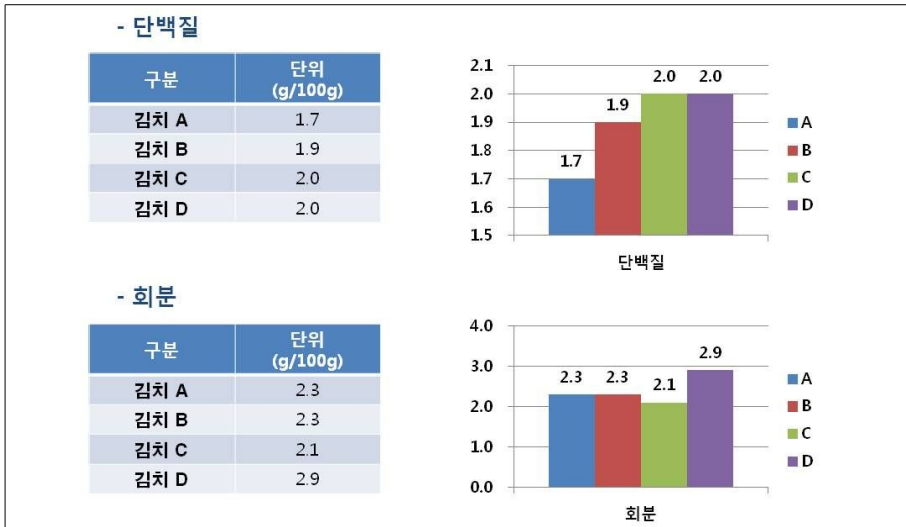


자연발효 목은지의 수분함량은 숙성발효기간이 길수록 (신선 1달 목은지 < 1년 목은지 < 2년 목은지) 높아져서, 2년 목은지에서는 1% 증가하였다.

지방함량의 경우 숙성 발효기간에 상관없이 0.3g/100g 수준을 유지하였다.

목은지와 김치 시료들의 지방성분에 관련하는 김치 부재료 함량이 일정함을 알 수 있다.

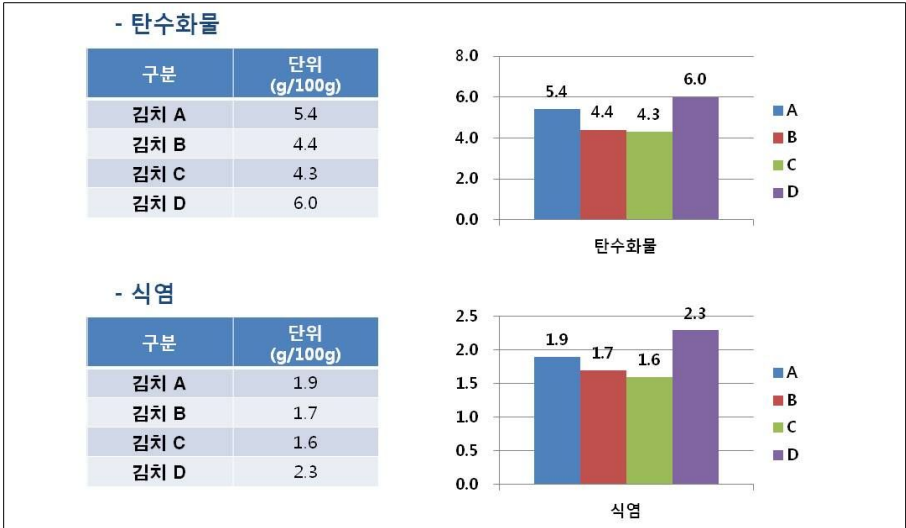
Table 3. 자연발효 목은지의 성분 분석결과 (단백질, 회분)



단백질 함량에 있어서 역시 숙성발효기간이 길어질수록 1.7g/100g → 1.9g/100g → 2.0g/100g 으로 높아졌다. 숙성발효기간 중에 발효미생물의 증식과 사멸이 반복되어, 김치재료들이 단백질로 생전환 됨으로써 축적된 단백질들과 관련이 있을 것으로 생각된다.

회분의 경우 2년 목은지에서 감소되는 현상은 2년 목은지에 포함된 높은 유기산 함량과 유기산 생성 미생물들과 관계가 있을 것으로 생각된다.

Table 4. 자연발효 목은지의 성분 분석결과 (탄수화물, 식염)



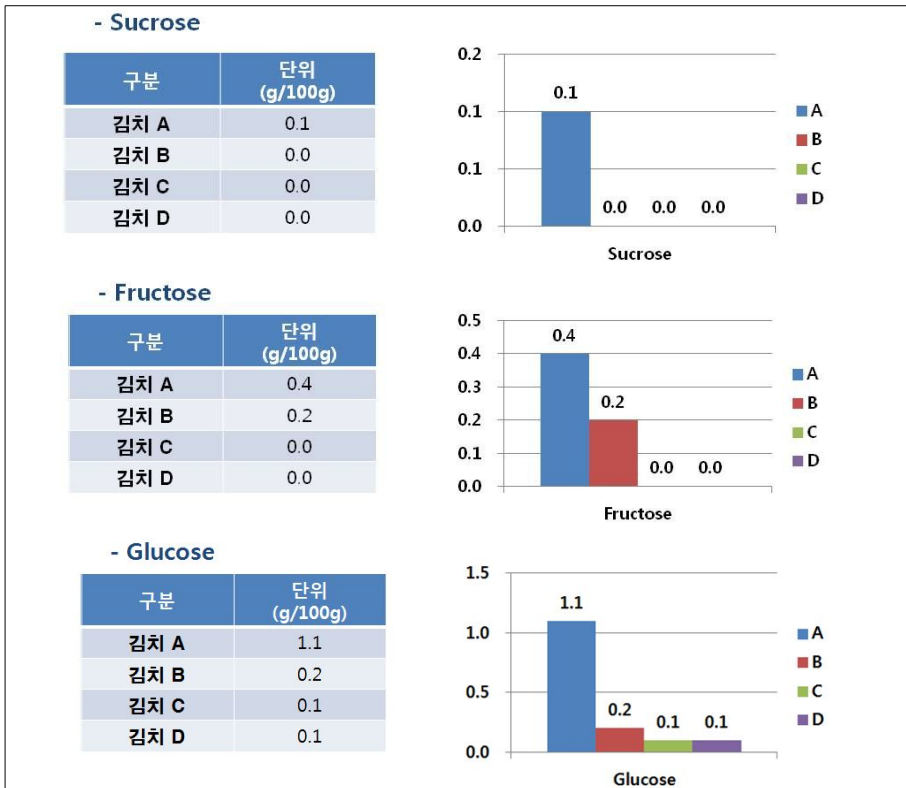
탄수화물의 함량도 숙성발효기간이 긴 2년목은지(김치C;4.3g/100g)와 1년 목은지(김치B;4.4g/100g)에서 신선목은지(김치A;5.4g/100g)에 비하여 감소되었다.

이와같은 탄수화물의 함량감소는 발효 미생물의 활성으로 아미노산, 유기산과 같은 발효산물로의 생전환과 관련이 있을 것으로 생각된다.

염분도 역시 숙성발효기간이 긴 2년목은지에서 1.6% 까지 낮아졌다.

비교용 목은지(김치D)는 탄수화물 함량(6.0%)과 염분도(2.3%)가 상대적으로 매우 높았다.

Table 5. 자연발효 목은지의 성분 분석결과 (과당, 설탕, 포도당)

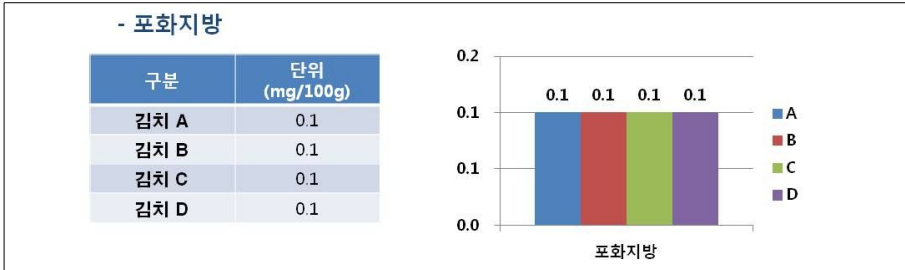


탄수화물 중 2당류인 설탕(Sucrose)은 숙성발효기간이 짧은 신선목은지에서만 0.1g/100g 의 함량으로 탐지되었고, 1년목은지(김치B)와 2년목은지(김치C)에서는 전혀 탐지되지 않았다. 따라서, 1년 이상된 목은지의 Validation 지표 중 하나로 Sucrose의 존재유무를 추천할 수 있을 것이다. 왜냐하면, 설탕은 대부분의 김치제조과정에 일반적으로 넣는 부재료 중 하나이기 때문이다.

특히 설탕(포도당+ 과당)이 일차적으로 분해되면 포도당과 과당으로 되는데, 이를 배제하더라도 포도당 함량의 변화는 숙성발효기간에 따라 확연히 감소되지만 숙성 발효기간 내내 탐지되는 성분으로 나타났다. 포도당 함량(0.2~0.1g/100g) 역시 목은지의 Validation 지표로 적합하다고 생각된다.

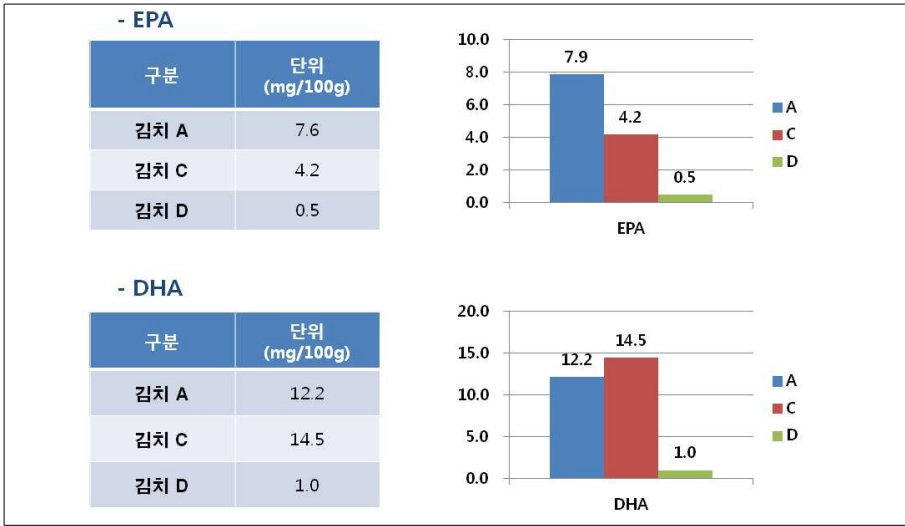
과당 역시 숙성발효기간이 긴 목은지들에서 감소되었다.

Table 6. 자연발효 목은지의 성분 분석결과 (포화지방)



포화지방은 김치시료군 모두 0.1g/100g 함량을 보였으며 숙성발효기간에 상관없이 일정하였다.

Table 7. 자연발효 목은지의 성분 분석결과 (EPA, DHA)



- 기능성 불포화 지방산의 일종인 EPA, DHA의 함량은 표준 메뉴얼에 의해 제조된 김치A(신선목은지), 김치C(2년목은지) 시료군에서 김치D(비교용목은지)에 비하여 8 ~ 15 배 매우 높게 나타났다.

4) 미생물 분석, 미생물 생리활성 및 동정 연구

가) 목은지의 미생물 군집 및 개체군 균체수 조사

(1) 목은지의 미생물 군집 및 개체군 균체수 방법

일반세균((Nutrient Agar medium Difco Co.), 방선균(Actinomycete Isolation Agar medium Difco Co.), 슈도모나스속(Pseudomonas Isolation Agar medium Difco Co.), 유산균류(Lactobacilli MRS Agar medium Difco Co), 곰팡이(Potato Dextrose Agar medium Difco Co.)등 선택배지를 이용하여 조사 분석·선별하였다.

(2) 목은지의 미생물 군집 및 개체군 균체수 결과

(가) 목은지의 미생물 군집 및 개체군 조사 결과는 Table 8. 과 같다.

표준매뉴얼에 의거하여 제조된 신선목은지, 1년 목은지, 2년 목은지의 일반 종속 영양세균(NA배지)의 분포는 8.23×10^7 , 8.8×10^4 , 1.57×10^5 CFU/g로 나타났다.

(나) 신선목은지에 비하여 1년 목은지, 2년 목은지에서 일반 종속영양세균은 각각 1/935, 1/524로 대폭 감소되었다.

(다) 유산균(MRS배지)의 미생물 군집 역시 2년 목은지에서 1.798×10^6 CFU/g 수준으로 감소되었다.

(라) 오랫동안 숙성발효된 2년 목은지에서 신선목은지에 비하여 미생물 균체수는 감소되었으나, 특기할만한 사실로 여러 가지 생리활성을 보이는 미생물 개체군들의 균체수는 오히려 더 증가되었다.

(마) 즉, 셀룰로오즈 분해세균(CA배지), 단백질분해세균(PA배지), 전분분해세균(AA배지) 군집들은 오히려 증가되었으며, 불용성 인산염 가용화 활성세균(Tri-Ca, Tri-Mg배지) 군집들도 유지되고 있었다.

(바) 또한, 신선목은지, 1년 목은지, 2년 목은지들을 동결건조시킨 후 분말화 한 시료들을 대상으로 미생물 개체수를 조사 분석하였을 때 재생되는 비율도 일반종속영양세균은 61%까지 높게 나타났다.

(사) 일반 동결건조 방식으로 동결건조된 목은지 분말들에서 세균의 생명복원이 높을 경우 이들을 활용하여 기능성소재로서 활용하고자 할 때 매우 중요하다.

(아) 이로서 동결건조 목은지 분말들은 생균제, 효소제 등의 기능성 소재로서 활용할 수 있다는 기초자료로 이용될 수 있다.

Table 8. 목은지 미생물 균집 및 개체군 균체수 조사 결과표

(단위 : 10³ CFU/ml, 10³ CFU/g)

	NA	MRS	PIA	Actino	LA	CA	PA	AA	Tri-Ca	Tri-Mg
신선목은지	82300	293300	203	34	0	348	303	71	8200	1019
목은지 1년	88	368900	933	0	0	204	353	214	1073	381
목은지 2년	157	1798	1727	1	0	382	962	360	1526	188
동결건조 신선목은지	41100	46900	0	23	0	25	7	24	324	76
동결건조 목은지 1년	54	25353	0	0	0	20	48	38	337	96
동결건조 목은지 2년	74	126	86	0	0	76	100	88	125	19
타사 신선김치	33500	93500	0	7	0	23	52	13	91000	1291
타사 목은지	26	27786	183	0	0	20	29	12	206	39

나) 목은지의 대장균, 식중독균 검출여부 조사

대장균(Eosin Methylene Blue Agar medium Difco Co), 식중독균(Salmonella Shigella Agar medium Difco Co, TCBS, Listeria Enrichment Agar medium Difco Co, Mannitol Salt Agar medium Difco Co)등 선택배지를 이용하여 조사 분석한 결과 콜로니 색, 모양등의 기준으로 볼 때 대장균 및 식중독균은 검출되지 않았다.



대장균 검출배지

리스테리아 검출배지

포도상구균 검출배지

살모넬라 검출배지

비브리오 검출배지

다) 목은지 미생물들의 생리활성 측정방법

(1) 고체배지상의 세포의 효소활성도 측정방법

고체배지에서 세포의 효소활성도는 다양한 기질이 첨가된 배지를 이용하여 paper disk 방법과 patching 방법으로 측정하였다. 본 연구에 이용된 배지는 다음과 같다.

(가) 지질 분해능(lipolytic enzyme)

Sierra의 방법을 변형한 것으로서 tween 80을 함유하는 고체배지(peptone 10g, CaCl₂ 0.1g, Bacto-agar, Tween 80 10ml/ℓ)에 균주를 접종하고 25℃에서 3일간 배양한 후, 균체 주위에 불투명한 결정체가 나타나면 지방 분해능이 있는 것으로 판정하였다(Sierra, 1957).

(나) 전분 분해능(amyase)

Soluble starch가 함유된 배지(starch 5g, peptone 10g, CaCl₂ 0.5g, MgCl₂ 5g, MgSO₄ 2g, KCl 1g, FeSO₄ 0.001g, Bacto-agar 20g/ℓ)에서 25℃로 3일간 배양한 후 균체에 Gram's Iodine 용액을 첨가하여 균체 주위에 clear zone을 형성하는지를 관찰하였다.

(다) 섬유소 분해능(cellulolytic enzyme)

Carboxymethylcellulose(CMC) 배지(CMC 5g, MgSO₄ 2g, CaCl₂ 0.5g, KCl 1.0g, FeSO₄ 0.001g, peptone 5g, Bacto-agar 20g/ℓ)에서 25℃로 5일간 배양 후 0.5% Congo-red 용액을 균체에 처리하여 clear zone을 형성하는지 관찰하였다.

(라) 단백질 분해능(proteolytic enzyme)

Gelatin이 첨가된 배지(gelatin 5g, beef extract 3g, peptone 5g, Bacto-agar 15g/ℓ)에서 성장한 균체에 1% tannic acid 수용액을 첨가하고 배지에서 희미한 결정체를 나타내는지를 측정하였다.

(마) β-Glucosidase 활성실험

Aesculin(6,7-dihydroxycoumarin 6-glucoside)가 함유된 배지[Aesculin 3g,

Czapek soln. (NaNO₃ 40g, KCl 10g, MgSO₄·7H₂O 200mg/ℓ) 50ml, 2% K₂HPO₄ 50 ml, 1% ZnSO₄·7H₂O 1ml, 0.5% CuSO₄·5H₂O 1ml, ferric citrate 0.2g, Bacto-agar 12g/ℓ]에서 25℃로 5일간 배양한 후 균체 주위에 Black zone이 형성 되는지를 관찰 하였다(Skerman, 1969).

(바) Ligninase 활성실험

Poly R-478 dye(Sigma)가 첨가된 배지[KH₂PO₄ 0.6g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, K₂HPO₄ 0.4g, (NH₄)₂ tartrate 0.22g, sorbose 4g, Poly R-478 0.2g, mineral soln.(CaCl₂·2H₂O 7.4g, ferric citrate 1.2g, ZnSO₄·7H₂O 0.7g, MnSO₄·5H₂O 0.5g, CoCl₂·6H₂O 0.1g, Thiamine HCl 10mg/ℓ) 10ml, Bacto-agar 15g, pH 4.5]에서 25℃로 5일간 배양한 후 균체 주위에 clear zone이 형성되는지를 관찰하였다(Glenn과 Gold, 1983).

(사), (아) 불용성 인산염 분해능(Tri-Mg, Tri-Ca)

불용성 인산염이 첨가된 배지[Glucose 10g, MgSO₄·7H₂O 0.2g, NaCl 1g, CaCl₂·2H₂O 0.2g NH₄NO₃ 1.5g yeast extract 0.5g Bacto-agar 15g에 불용성인산염 (Tri-Mg 4g 또는 Tri-Ca) 4g 첨가 / L]에서 25℃로 5일간 배양한 후 균체 주위에 clear zone이 형성되는지를 관찰하였다

(2) 목은지 미생물들의 생리활성 측정 결과

(가) NA, MRS등 다양한 배지를 통하여 1차적으로 선별 분리한 184균주를 대상으로 8가지의 생리활성 측정용 배지를 활용하여 세포의 효소 활성 및 가용화 등을 조사분석 하였다.

(나) 154균주에서 독특한 생리활성이 측정되었다.

(다) 184균주의 생리활성 스펙트럼 조사 결과는 다음과 같다.(Table 9.)

셀룰로오스 분해활성(CA), 전분분해활성(AA), 단백질 분해활성(PA)과 같이 여러 가지 유기물 분해 활성능이 강한 균주들은 KA6, KA7등을 예로 들 수 있는데, 이들은 *Bacillus subtilis*로 동정되었다.(Table 11.)

전분분해 활성(AA)만 유난히 강한 활성을 보이는 균주들인 KA15, KA18, KA19,

KA20, KA 21 등은 놀랍게도 모두 *Bacillus megaterium*으로 동정되었다.(Table 11.)

목은지에 존재하는 세포외 효소로서 cellulase, amylase, protease 효소의 근원은 *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*이 중심이 될 것으로 생각된다.

지질분해활성(LA)과 셀룰로오즈 분해활성(CA) 그리고 불용성염 가용화능(Tri-Ca, Mg)이 동시에 강한 균주 KA 118은 *Bacillus pumilus*로, KA 119는 *Bacillus safensis*로 동정되었다.

이처럼 세포외 효소 활성 및 불용성염 가용화능 등 8가지 생리활성을 동시에 측정 비교분석한 본연구결과는 김치와 목은지내 존재하는 미생물들의 생리활성 스펙트럼의 특이성과 광범위성을 규명하는데 매우 중요하다.

Table 9. 목은지 미생물들의 생리활성 측정 결과표

X : no growth, no activity

O : growth, weak activity

O(mm) : growth, strong activity

ex)

3(5) : 투명판-활성판직경 3cm=30mm

(콜로니 끝~활성판 가장자리 거리가 5mm)

Strains	CA	AA	PA	LA	Tri-Mg	Tri-Ca	Lig	β-G	기원
1 KA1	O	O	O	O	O 1.6(6)	O 0.9(2)	X	X	
2 KA2	X	O	X	X	X	X	X	X	
3 KA3	O 3(5)	O 4(3)	O 3.4(10)	O	O	O	X	X	신선 목은지
4 KA5	O	O	O 2.2(8)	O	O	O	X	X	/ NA
5 KA6	O 3.6(4)	O 4(5)	O 3.4(10)	O	O	O	X	X	
6 KA7	O 3(14)	O 3(11)	O 4.4(12)	O	O 1(1)	O	X	X	
7 KA8	X	X	X	X	X	X	X	X	
8 KA9	O	O	O	X	O 1.6(4)	O 1.6(6)	X	X	신선 목은지
9 KA11-2	O	O	O	X	X	X	X	X	/ MRS
10 KA13	O	O	O	X	O 0.8(4)	X	X	O	
11 KA15	O	O 3(10)	O	O	O	O	X	O	
12 KA18	O	O 3(6)	O	O	O	O	X	X	
13 KA19	O	O 2.8(8)	O	O	O	O	X	X	신선 목은지
14 KA20	O	O 3(10)	O	O	O	O	X	O	/ Tri-Ca
15 KA21	O	O 3(10)	O	O	O	O	X	X	
16 KA22	O	O 3(9)	O	O	O	O	X	O	
17 KA23	X	X	X	X	X	X	X	X	
18 KA24	O	O 3(10)	O	O	O	O	X	O	신선 목은지
19 KA25	O	O	O	O	O	O	X	X	/ Tri-Mg
20 KA26	O	O 3(8)	O	O	O	O	X	O	

Strains		CA	AA	PA	LA	Tri-Mg	Tri-Ca	Lig	β-G	기원
21	KA27	0	0 2.6(7)	0	0	0	0	0	0	
22	KA28-1	0	0	0	X	0	X	X	X	
23	KA28-2	0	X	0	0	0	X	X	X	신선
24	KA30	0 0.9(2)	0 3.4(13)	0	0	0	X	X	X	묵은지 / Tri-Mg
25	KA32-2	0	0	0	X	0	0 1.2(3)	0	0	
26	KA33	0	0	0	0	0	0 0.9(2)	0	0	
27	KA34	0	0	0	0	0	0	0	X	
28	KA35	0	0	0	0	0	0 1(3)	0	X	
29	KA36	0 2.4(9)	0 2.8(10)	0	0	0	0 1.2(1)	0	X	
30	KA37	0 1.8(7)	0	0	0	0	0 0.8(1)	X	X	
31	KA38	0	0	0	0	0 2(5)	0 0.8(1)	X	X	1년 묵은지 / NA
32	KA39	0 2(7)	0	0	0	0 1.8(6)	0 0.8(1)	X	X	
33	KA40	0 2.7(10)	0 3.2(11)	0	0	0 2.7(2)	0 1.2(1)	X	X	
34	KA41	0	0 3.4(13)	0	0	0	0 2.5(1)	X	X	
35	KA42	0 1.3(5)	0	0	0	0 2.2(5)	0 1(1)	X	X	
36	KA44	X	X	X	X	X	X	X	X	
37	KA46	X	X	X	X	X	X	X	X	1년 묵은지 / MRS
38	KA48	X	X	X	X	X	X	X	X	
39	KA49	X	X	X	X	X	X	X	X	1년
40	KA50	0 3.2(13)	0 3.2(10)	0	0	0	0 2.2(1)	0	X	묵은지 /Tri-Ca

Strains	CA	AA	PA	LA	Tri-Mg	Tri-Ca	Lig	β-G	기원
41	KA51	0 3.2(12)	0 3.2(12)	0	0	0	0	0	
42	KA52	0 1.5(5)	0	0	0 2(5)	0	0	X	
43	KA53	0 2.4(10)	0 2.4(9)	0	0	0	0	X	1년 묵은지
44	KA54	0 3(12)	0	0	0	0	0	X	/ Tri-Ca
45	KA55	0 2.2(8)	0	0	0 2.4(5)	0	0	X	
46	KA56	0 3.4(13)	0 3.5(11)	0	0 3(5)	0	0	X	
47	KA57	0 2.4(11)	0 2.6(10)	0	0	0	0	X	1년 묵은지 / Tri-Mg
48	KA58	X	0	0	X	X	X	X	
49	KA59	X	X	X	X	X	X	X	
50	KA60	0 3.6(15)	0 3.3(11)	0	0	0	0	X	2년
51	KA61	0 1.8(8)	0 2.6(8)	0 3(10)	0	0	0	X	묵은지 /NA
52	KA62	0	0	0	0	0	0	X	
53	KA63	0 2.3(8)	0 2.5(9)	0 4(12)	0	0	X	X	
54	KA64	0	0 1(2)	0	0 1(2)	X	X	X	
55	KA66	X	0	X	X	X	X	X	
56	KA67	X	X	X	X	X	X	X	
57	KA68	0 3.3(13)	0 3.4(10)	0 4(18)	0	0	0	X	2년 묵은지 / MRS
58	KA70	X	0	X	X	X	X	X	
59	KA71	X	X	X	X	X	X	X	
60	KA72	X	X	X	0	X	X	X	2년 묵은지 / Tri-Ca

Strains	CA	AA	PA	LA	Tri-Mg	Tri-Ca	Lig	β -G	기원
61	KA73	X	X	X	X	X	X	X	
62	KA74	0 3.2(12)	0 3(12)	0	0	0	X	X	
63	KA75	0 2.4(8)	0	0 3.6(13)	0	0	X	X	2년 묵은지
64	KA76	0 3.6(13)	0 3(11)	0 4(11)	0	0	0	X	/ Tri-Ca
65	KA77	0 3.4(13)	0 3(11)	0 3.8(7)	0	0	X	X	
66	KA78	0 3.5(13)	0	0 4.4(15)	0	X	X	X	
67	KA79	0	0 2.3(1)	0 4(10)	0	X	X	X	
68	KA80	0	0	0	0 1.3(3)	X	X	X	
69	KA81	0	0	0	X	X	X	X	
70	KA82	0	0 3(10)	0	0	0	0	X	
71	KA83	0 3(11)	0 3.4(12)	0	0	0	X	X	동결건조 신선 묵은지
72	KA84	0	0	0	0 1.4(6)	0	0	X	분말/NA
73	KA85	0 3(12)	0 3.4(8)	0	0	0	X	X	
74	KA86	0 3.3(13)	0 3.5(3)	0 5(18)	0	0	0	X	
75	KA87	0 1.3(4)	0	0	0 1.3(2)	0	X	X	
76	KA88	0 2(8)	X	X	X	X	X	X	
77	KA89	0	0	0	0 1.7(7)	0 1(1)	X	X	동결건조
78	KA91	0	0	0	0 3(13)	0 1.2(2)	X	X	신선 묵은지
79	KA94	0	0	0	0 1.5(5)	0 0.8(1)	0	X	분말/MRS
80	KA97	0 1(3)	0	0	X	0 0.8(2)	0	0	동결건조 신선 묵은지/Tri-Ca

Strains	CA	AA	PA	LA	Tri-Mg	Tri-Ca	Lig	β-G	기원	
81	KA98	0 2.6(8)	0 3(12)	0	0	0	0	0	X	
82	KA99	0 2.4(10)	0 3.2(13)	0	0	0	0	0	X	
83	KA100	0 3(12)	0 4(10)	0	0	0	0	0	동결건조 신선 목은지 분말/Tri-Ca	
84	KA101	0 3(12)	0 3.4(12)	0	0	0	0	0		
85	KA102	0 3.2(12)	0 3.2(12)	0	0	0	0	0		
86	KA103	0 2(6)	0 3.4(8)	0	0	0	0	0		
87	KA105	0 2.6(11)	0 2.8(10)	0	0	0	0	0		
88	KA107	0 3.2(3)	0 3.2(1)	0	0	0	0	0		X
89	KA108	0 3.8(14)	0 3.4(12)	0	0	0	0	0	동결건조 신선 목은지 분말/Tri-Mg	
90	KA109	0 1.8(6)	0	0	0	0	0	0		
91	KA110	0 2.6(11)	0 3.2(13)	0	0	0	X	X		
92	KA111	X	X	X	X	X	X	X		
93	KA112	0 3(11)	0 3(12)	0	0	0	0	0	X	
94	KA113	0 3.2(13)	0 3.2(12)	0	0	0	X	X		
95	KA114	0 2.4(8)	0	0	0 1.4(1)	0 1.7(2)	0	0	X	
96	KA115	0 1.8(7)	0 3(10)	0	0	0	0 1.6(1)	0	X	
97	KA116	0 3(12)	0 3.4(14)	0	0	0	0 1.4(1)	X	X	
98	KA117	0 2.3(8)	0	0	0 1.7(2)	0 1.1(1)	X	X	동결건조 1년 목은지 분말/NA	
99	KA118	0 2.2(9)	0	0	0 1.2(1)	0 1.2(1)	0 1.1(1)	X		X
100	KA119	0 1.8(6)	0	0	0 1.2(1)	0 1.3(1)	0 1.1(1)	X		X

Strains	CA	AA	PA	LA	Tri-Mg	Tri-Ca	Lig	β-G	기원	
101	KA121	0 1.5(5)	0	0	X	0 2(5)	0 0.8(1)	X	X	동결건조 1년 묵은지 분말/NA
102	KA122	0	0	0	X	0 2.2(6)	0 0.8(1)	X	X	
103	KA130	0 1.4(4)	0	0	X	0 1.8(3)	0 0.8(1)	X	X	동결건조 1년 묵은지 분말/Tri-Ca
104	KA131	0 1.3(4)	0	0	X	0 1.5(3)	0 0.8(1)	X	X	
105	KA132	0 2.2(9)	0	0	X	0 2.2(6)	0 0.8(1)	X	X	
106	KA133	0 2.4(8)	0 2.6(9)	0	X	0	0	X	X	
107	KA134	0 3(11)	0 3(11)	0	X	0	0 1.4(1)	X	X	
108	KA135	0 3(10)	0 3.4(13)	0	X	0 1(3)	0	X	X	
109	KA136	0 3(12)	0 3.2(10)	0	X	0	0	X	X	
110	KA137	0 4.2(18)	0 3(8)	0	X	0	0	X	X	
111	KA138	0 3(11)	0 4(15)	0	X	0	0	0	X	
112	KA139	0 1.8(7)	0	0	X	0 1.8(5)	0	0	X	
113	KA140	0 3(12)	0 3.4(12)	0	X	0	0	0	0	
114	KA141	0 3.4(12)	0 2.4(10)	0	X	0	0 1.1(1)	0	X	
115	KA142	0 3.2(13)	0 3(10)	0	X	0	0	X	X	
116	KA143	0 3(10)	0 3(11)	0	X	0	0	X	X	
117	KA144	0 3(10)	0 3(10)	0	X	0	0	X	X	
118	KA145	0 4(14)	0 2.8(10)	0	X	0	0	X	X	
119	KA146	0 3(13)	0 3(10)	0	X	0	0	X	X	
120	KA147	0	0 4(10)	0	X	0 2(3)	0	0	0	

Strains	CA	AA	PA	LA	Tri-Mg	Tri-Ca	Lig	β-G	기원
121	KA148	0 2.3(7)	0 2.6(8)	0	0	0	X	X	
122	KA149	0 2(3)	0 3.2(1)	0	0	0	X	X	동결건조 2년 묵은지
123	KA151	0 3(12)	0 3(8)	0	0	0	X	X	분말/NA
124	KA152	0 2(7)	0 3(10)	0	0	0	X	X	
125	KA153	0 2(7)	0 2.6(10)	0	0	0	X	X	
126	KA155	0 2.3(8)	0 2.4(7)	0	0	0	X	X	
127	KA156	0	0 4(13)	0	0	0 1.1(1)	X	0	
128	KA157	0 3.2(12)	0 2(5)	0	0	0	X	X	
129	KA158	0	0 2.6(7)	0	0	0	X	X	동결건조 2년 묵은지
130	KA159	0 2.8(10)	0 2.5(5)	0	0	0	X	X	분말/MRS
131	KA160	0 2.2(7)	0 2.6(9)	0	0	0	X	X	
132	KA161	0 3(12)	0 3(13)	0	0	0	X	X	
133	KA162	0 2.4(9)	0	0	0	0 1.3(3)	X	X	
134	KA163	0 3.2(10)	0 3.2(10)	0	0	0	X	X	
135	KA165	0 2.6(4)	0 3(1)	0	0	0	X	X	
136	KA166	0 2.6(10)	0 2.8(10)	0	0	0	X	X	
137	KA167	0 3(12)	0 3(10)	0	0	0 2(6)	X	X	동결건조 2년 묵은지
138	KA168	0 3.8(14)	0 3.2(12)	0	0	0	X	X	분말/Tri-Ca
139	KA169	0 3(10)	0 3(10)	0	0	0	X	X	
140	KA170	0 3(10)	0 3(10)	0	0	0	X	X	

Strains	CA	AA	PA	LA	Tri-Mg	Tri-Ca	Lig	β-G	기원
141	KA171	0 3(11)	0 2.6(14)	0	0	0	X	X	
142	KA172	0 3(11)	0 3(10)	0	0	0	X	X	
143	KA173	0 3(13)	0 2.6(10)	0	0	0	X	X	
144	KA174	0 3.8(13)	0 3(8)	0	0	0	X	X	동결건조 2년 묵은지 분말/Tri-Ca
145	KA175	0 3(10)	0 2.6(9)	0	0	0	0	X	
146	KA176	0 2.5(11)	0 2.4(9)	0	0	0	X	X	
147	KA177	0 2.3(8)	0 2.2(8)	0	0	0	0	X	
148	KA179	0	0 2.2(8)	0	0	0	X	X	
149	KA180	0 2(5)	0 2.6(6)	0	0	0	0	X	
150	KA181	0 2.9(11)	0 2.2(8)	0	0	0	0	X	
151	KA182	0 3.8(15)	0 3(10)	0	0	0	0	X	
152	KA183	0 3(9)	0 3.2(6)	0	0	0	0	X	비교용 신선 김치 /NA
153	KA184	0 3.8(15)	0 3.2(13)	0	0	0	X	0	
154	KA185	0 3(12)	0 3(11)	0	0	0 1.8(4)	0	0	
155	KA186	0 3(8)	0 2(5)	0	0 1.8(5)	0	0	0	
156	KA187	X	0	X	X	X	X	0	
157	KA188	0	0	0	0	0 3.5(13)	0 1.2(2)	0	
158	KA189	0	0	0	0	X	X	0	비교용 신선 김치 /MRS
159	KA190	0	0	0	0	0	0 1.8(6)	0	
160	KA191 -1	0	0	0	0	0	0 1.8(7)	0	

Strains	CA	AA	PA	LA	Tri-Mg	Tri-Ca	Lig	β-G	기원
161 KA191-2	0	0	0	0	0 3.4(15)	0 1.4(5)	0	0	비교용 신선 김치 MRS
162 KA194	0 2.4(11)	0 3.1(11)	0	0	0 3.4(15)	0	0	0	비교용 신선
163 KA195	0	0	0	0	0	0 1.1(3)	X	X	김치/Tri-Ca
164 KA196	0 3(12)	0 3(12)	0	0	0	0	X	X	
165 KA197	0 2(6)	0 2.6(10)	0	0	0	0	X	X	
166 KA198	0 1.3(4)	0	0	0	0	0	X	X	
167 KA199	0 2(6)	0	0	0	0	0	X	X	
168 KA200	0 3(9)	0 2.6(8)	0	0	0	0	X	X	비교용 묵은지
169 KA201	0 2.5(10)	0 2.8(100)	0	0	0	0	X	X	/NA
170 KA202	0	0	0	0	0	X	X	X	
171 KA203	0 3.1(10)	0 3(8)	0	0	0	0	0	0	
172 KA204	0 2.2(8)	0	0	0	0	0	X	X	
173 KA209	X	X	X	X	X	X	X	X	비교용 묵은지 /MRS
174 KA210	X	X	X	X	X	X	X	X	
175 KA215	0 3(12)	0 3.2(10)	0	0	0	0	0	X	
176 KA216	0 3.2(13)	0 3.4(12)	0	0	0	0	0	0	
177 KA217	0 1.2(2)	0	0	0	0	0 1.3(1)	X	X	비교용 묵은지
178 KA218	0 2.8(11)	0 3(10)	0	0	0	0	0	X	/Tri-Ca
179 KA219	0 2.6(10)	0 3(11)	0	0	0	0	0	0	
180 KA220	0 3(11)	0 3.2(12)	0	0	0	0	0	X	
181 KA221	0 3(12)	0 3.2(10)	0 5.4(20)	0	0	0	X	X	
182 KA222	0 1.8(1)	0 1.8(1)	0	0	0	0	X	X	
183 KA224	0 1(3)	0	0 4(10)	0	0 2.2(4)	0 1.2(1)	X	X	비교용 묵은지
184 KA225	X	X	0	X	X	X	X	X	/Tri-Mg

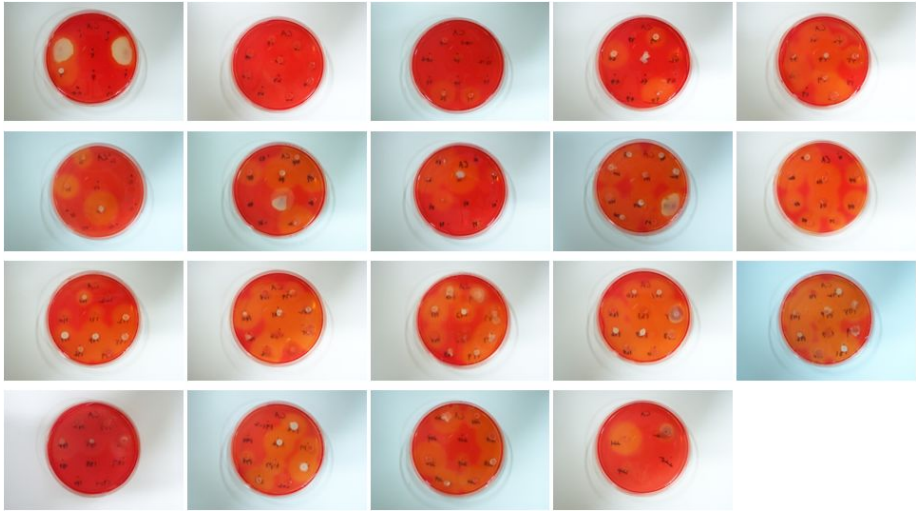


Fig 2. 셀룰로오즈 분해 활성(CA) 측정 결과 사진

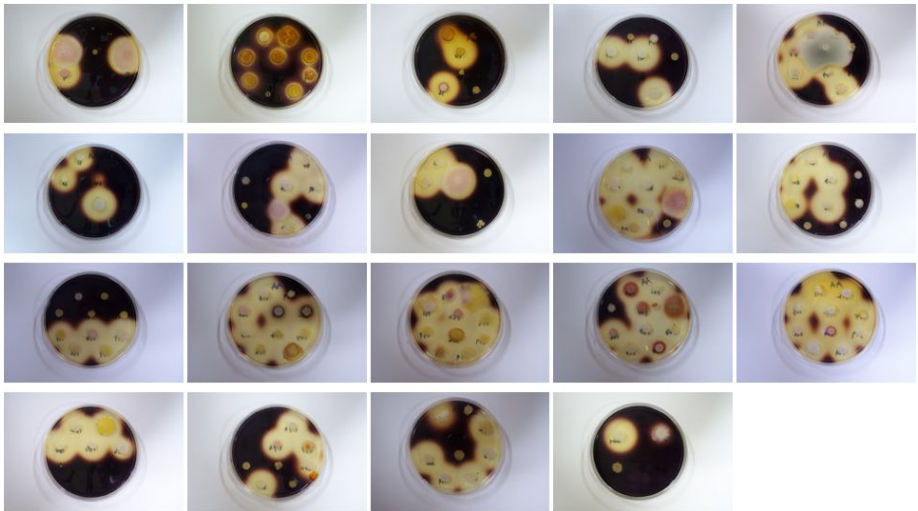


Fig 3. 전분 분해 활성(AA) 측정 결과 사진

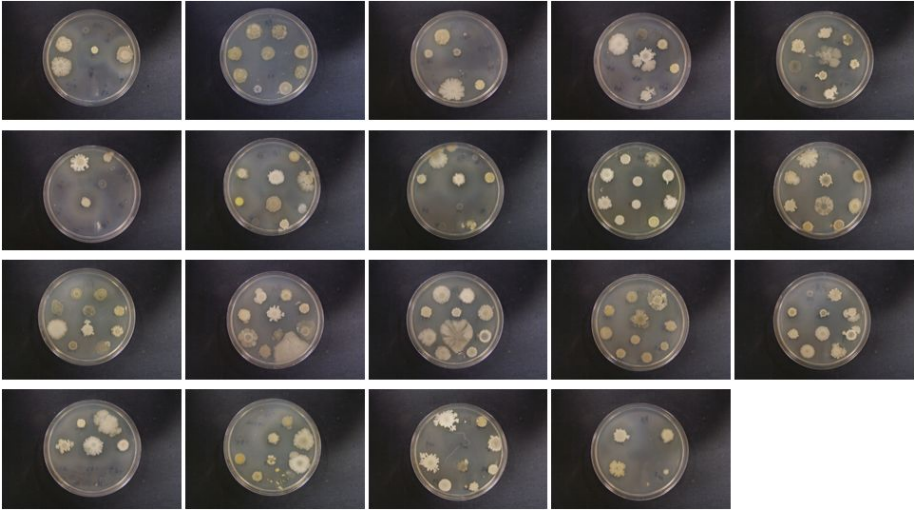


Fig 4. 단백질 분해 활성(PA) 측정 결과 사진

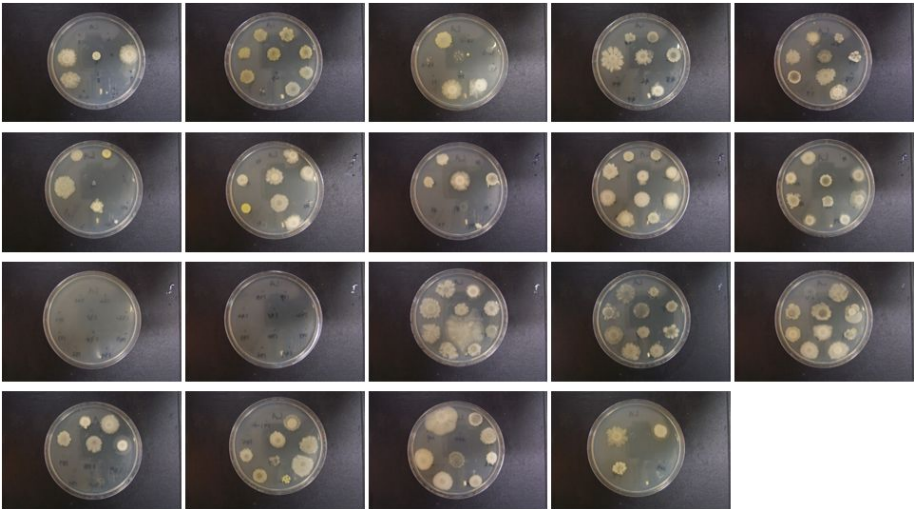


Fig 5. 지질 분해 활성(LA) 측정 결과 사진

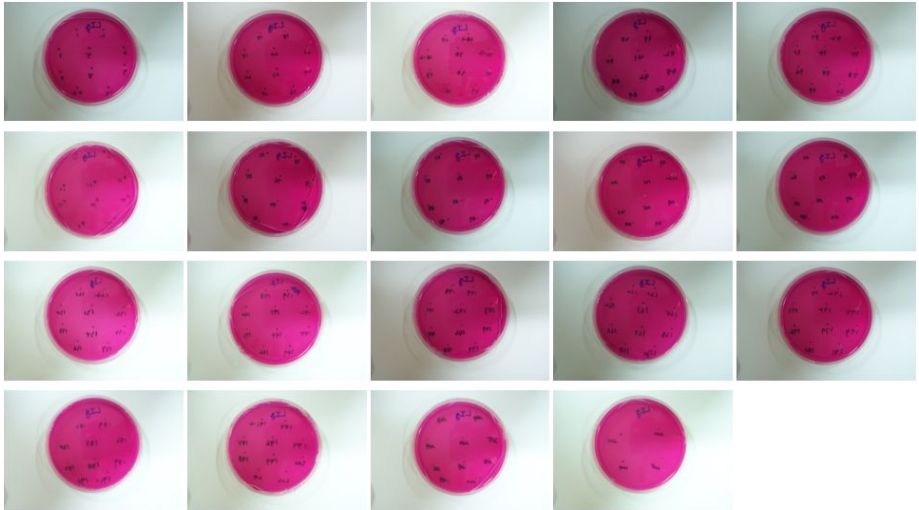


Fig 6. 리그닌 분해 활성(Lig) 측정 사진

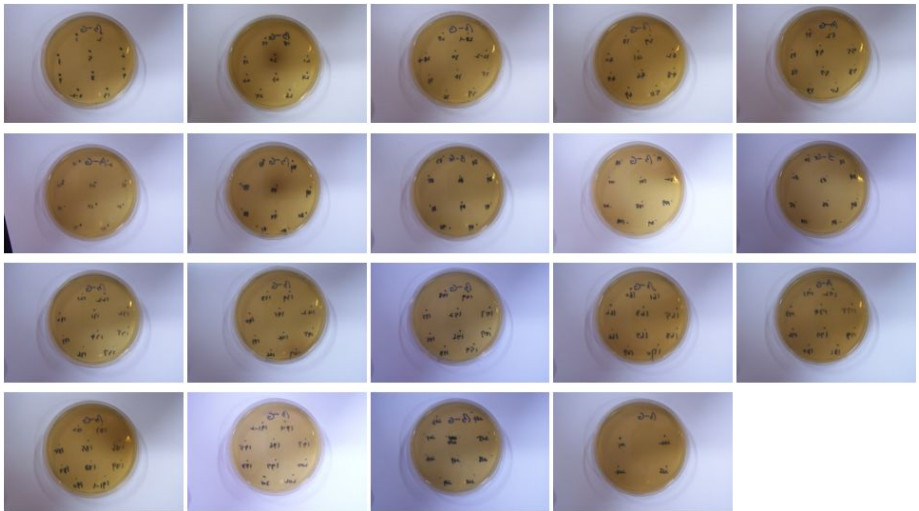


Fig 7. β -G 분해 활성(β -G) 측정 결과 사진

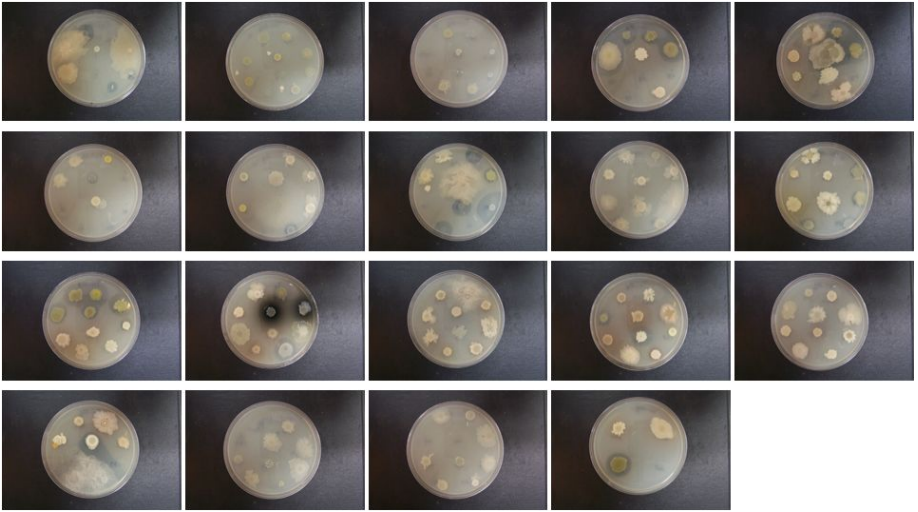


Fig 8. 불용성 마그네슘 인산 가용화 활성(Tri-Mg) 측정 결과 사진

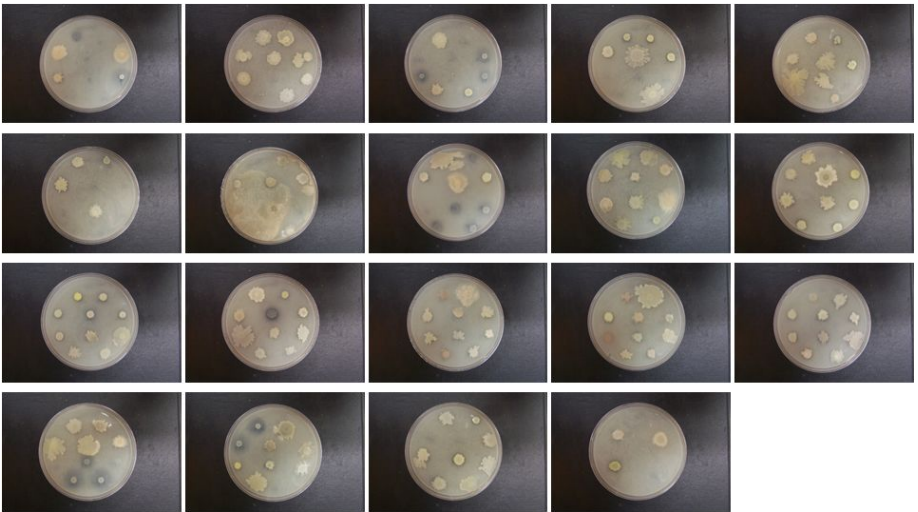


Fig 9. 불용성 칼슘 인산 가용화 활성(Tri-Ca) 측정 결과 사진

라) 목은지와 신선김치 미생물의 분류 및 동정

(1) 목은지와 신선김치 미생물의 분류 및 동정 방법

MRS, PES 배지 및 생리활성 기능 확인 배지 등에서 우수한 생리활성능을 보인 미생물들을 선별하여 16S rDNA 분석과 API kit 분석 등으로 분류동정함.

(가) Primer의 제작

MRS, PES 배지 및 생리활성 기능 확인 배지 등에서 우수한 생리활성능을 보인 미생물들의 16S rDNA 분석을 위하여 PCR primer를 제작하였다(Table 10).

Table 10. The bacterial strains and plasmids used in this study

Name	Phenotype
Plasmids	
pBluescript II	pBluescript II SK(+/-) phagemid, Amp ^r , lacZ gene, MCS Stratagen
<i>E. coli</i>	
DH5a	F ⁺ Φ80dJlacZΔ(lacZYA-argF)U160 endA1 recA1 hsdR17(r _K -m _K +) deoR thi-1 supE44 λ-gyrA96 relA1
Primer	
16s 63F	5'-CCCAAGCTTAACTGCAGCAGGCCTAACACATGCAAGTC-3'
16s 1406R	5'-CGGAATTCGGGATCCACGGWGTRCAAG-3'

(나) Genomic DNA 추출

분리한 미생물을 NB broth 5ml에 균주를 접종하여 37℃에서 12~16시간동안 배양한 후, NB broth 50ml에 배양된 균주를 다시 접종하여 12~16시간동안 배양하였다. 배양액을 4℃에서 13,000rpm으로 10min동안 원심분리한 후 상등액은 버리고 세포를 얻었다. 얻어진 세포에 TE buffer 567μl, 10% SDS 30μl, proteinase K(20mg/ml) 3μl를 첨가한 후 vortexing하여 균질화 하였고, 37℃에서 1시간동안 incubation하였다. 5M NaCl 100μl을 첨가 후 균질화 하고 CTAB/NaCl solution 80μl를 첨가 후 vortexing하여 65℃에서 10min동안 반응시켰다. 혼합액에 chloroform:isoamyl-alcohol (24:1)을 동량 첨가하고 vortexing한 후, 5min 동안 원심분리하여 상등액을 새 tube에 옮겼다. 상등액에 동량의 phenol:chloroform:isoamyl alcohol(25:24:1)을 첨가하고 vortexing한 다음 10min간 원심분리하여 상등액을 새 tube에 옮겼다. 얻어진 상등액에 0.6배 부피의 isopropanol을 첨가한 후 천천히 inverting하여 genomic DNA가 배출되게 하였다. 백색의 genomic DNA 가닥이 육안으로 보이면, 유리봉으로 건져내어 70% 에탄올 1ml을 첨가한 후 4℃, 13,000rpm으로 10min동안 원심분리하여 상등액을 버리고 건조하였다. RNase가 첨가된 멸균증류수로 현탁한 후 37℃에서 30min간 반응

하여 RNA를 제거한 후 -20℃에 보관하였다.

(다) PCR에 의한 유전자 증폭

균주에서 추출한 genomic DNA를 template DNA로 사용하였고, PCR 증폭은 Gene Cycle™(BIO-RAD Co.)을 사용하여 수행하였다. PCR 반응용액은 제작된 primer(10pmol)를 각각 3μl씩 첨가, template DNA(10ng Genomic DNA) 5μl, 멸균 증류수 39μl를 PCR Mixer (Bioneer Co. Korea)에 첨가하여 혼합한 후 mineral oil 을 첨가하였다. PCR 반응조건은 94℃ 4min간 denaturation을 1cycle, 94℃ 1min동안 denaturation, 60℃ 1min 간 annealing 72℃ 1min 30sec간 elongation과정을 30cycle 시행한 후, 72℃에서 10min 동안 final extension을 하였다. 증폭된 DNA는 0.8% agarose gel로 전기영동하여 확인하였다.

(라) Competent cell 제조

E. coli strain DH5α를 TYE 평판배지에 도말한 후 37℃에서 12~16시간 동안 배양하여 single colony를 얻었다. Single colony를 5ml SOB(2% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.058% NaCl, 0.019% KCl, pH 7.0)에 1/100 부피로 접종하고 A₆₀₀ 값이 0.4~0.6이 될 때까지(약 3시간)더 배양하였다. 배양액을 4℃에서 원심분리(4,000 rpm, 10분)한 후 10% glycerol을 첨가하여 3회 세척하였다. 이렇게 제조된 competent cell을 각각 80μl씩 분주하여 electroporation을 위해 -70℃에 보관하여 사용하였다. *EcoR* I으로 enzyme digestion된 pBluescript II KS vector를 self-ligation한 것과 pBluescript II vector 1μl을 각각 제조한 competent cell에 electroporator(BioRad)를 이용하여 전기충격으로 형질전환(transformation)을 수행하여 TYE-Amp 고체배지에서 형질전환율을 확인하였다.

(마) Cloning

DNA를 cloning은 증폭된 PCR product인 16S DNA를 *Bam*HI 과 *Hind*III로 double digestion하고 pBluescript II KS vector도 *Bam*HI 과 *Hind*III로 digestion하였다. 절단한 PCR 산물과 cloning vector를 혼합하여 T4 ligase(Elpis co.)로 ligation을 16℃에서 2시간 실행하였다. Ligation 반응액을 20-30분간 drop dialysis를 실행하여 salt를 제거한 후, cuvette에 *E. coli* DH5α와 ligation sample을 섞어 30분간 ice에 방치한 후 eletroporation을 실시하였다. SOC 1ml(SOB 980μl, 2M Mg²⁺ 10μl, 40% glucose 10μl)에 cuvette의 sample을 옮겨 담은 후 37℃의 shaking incubator에서 1~2시간 동안 배양하였다. 80μl의 X-gal (20mg/DMF 1ml)이 도말된 TYE Amp 고체배지에 SOC에 배양된 재조합체를 도말하여 37℃에서 16시간 동안 배양하여, Blue-White screen을 통해 선별된 colony를 PCR 산물의 vector내 삽입유무를 확인하기 위하여 배양하고 plasmid를 분리하였다. 분리한 plasmid는 *Bam*HI 과

SalI, *EcoRI* 과 *SalI* 가하여 37°C에서 2시간 동안 digestion한 다음 0.8% agarose gel에서 insert DNA를 확인하였다.

(바) Plasmid DNA 분리 및 sequencing

항생제(Amp)가 첨가된 TYE broth 배지 5ml에 선별된 균주를 접종하여 37°C에서 12~16시간동안 배양한 후, 4°C, 12,000rpm에서 5분간 원심분리하여 cell을 얻었다. 얻어진 cell에 100 μ l의 solution I (0.9% glucose, 10mM EDTA, 25mM Tris-HCl pH 8.0, 4mg/ml)을 넣고 혼합하여 균질화한 후, 200 μ l의 solution II (0.2N NaOH, 1% SDS)를 넣어 용해시켜 열음에 5분 동안 반응시켰다. 10분이 경과하지 않도록 주의하면서 150 μ l의 solution III (5M potassium acetate 60ml, glacial acetic acid 11.5ml, dH₂O 28.5ml)을 첨가한 후, 10분 동안 열음에서 반응시킨 후 4°C에서 10분 동안 원심분리하여 얻은 상등액을 새 tube에 옮기고 동량의 phenol: chloroform: isoamylalcohol(25:24:1)을 처리하여 혼탁 시킨 다음 5분 동안 상온에서 원심분리하였다. 얻어진 상등액을 새 tube에 옮긴 후 100% 에탄올 (-20°C) 1ml을 첨가하여 salt를 제거하고 4°C에서 5분 동안 원심분리하여 상등액을 버린다. 이어서 70% 에탄올 (-20°C) 1ml을 첨가하여 침전시킨 후 4°C에서 5분 동안 원심분리하여 상등액을 버리고 건조시킨 다음 멸균증류수로 녹이고 RNase (10mg/ml)로 RNA를 분해하여 -20°C에 보관하였다. 염기서열분석을 목적으로 하는 plasmid DNA 분리 시 Promega사의 plasmid purification kit를 사용하였다. 염기서열 결정은 코스모진텍에 의뢰하여 실험하였고, 상동성분석에는 NCBI의 BLAST research program을 사용하여 실시하였다.

(2) 목은지와 신선김치 미생물의 분류 및 동정 결과

목은지 시료에서 분리·선별된 184개 균주 중 170개 균주의 16S rDNA 염기서열이 결정되었다(Table 11).

시료별(숙성발효기간이 다른 신선 1달 목은지, 1년목은지, 2년 목은지, 비교용 목은지와 동결건조 목은지분말 등)로 분리동정하므로써, 균주가 분리된 시료의 기원과 연계해서 해석할 수 있으며, 특히 184개 균주들의 생리활성 스펙트럼과 연계해 볼 때 목은지 시료들의 미생물 특성과 효소활성 근원등을 잘 이해 할 수 있었다.

Table 11. 16S DNA 분석을 통한 미생물 동정 결과

Strains		Scientific Name	기원
1	KA 1	<i>Enterococcus faecalis</i>	
2	KA 2	<i>Bacillus subtilis</i>	
3	KA 3	<i>Escherichia coli</i>	신선
4	KA 5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	목은지
5	KA 6	<i>Bacillus subtilis</i>	/NA
6	KA 7	<i>Bacillus subtilis</i>	
7	KA 8	<i>Lactobacillus sakei</i>	
8	KA 9	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	신선
9	KA 11-2	<i>Lactobacillus sakei</i> strain	목은지
10	KA 13	<i>Escherichia coli</i>	/MRS
11	KA 15	<i>Bacillus megaterium</i>	
12	KA 18	<i>Bacillus megaterium</i>	
13	KA 19	<i>Bacillus megaterium</i>	신선
14	KA 20	<i>Bacillus megaterium</i>	목은지
15	KA 21	<i>Bacillus megaterium</i>	/Tri-Ca
16	KA 22	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	
17	KA 24	<i>Bacillus megaterium</i>	
18	KA 25	<i>Staphylococcus</i> sps.	
19	KA 26	<i>Bacillus megaterium</i>	
20	KA 27	<i>Bacillus flexus</i>	신선
21	KA 28-2	<i>Bacillus asahii</i>	목은지
22	KA 30	<i>Escherichia coli</i>	/Tri-Mg
23	KA 32-2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
24	KA 33	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
25	KA 34	<i>Staphylococcus</i> sps.	
26	KA 35	<i>Lactobacillus casei</i>	
27	KA 36	<i>Bacillus tequilensis</i>	
28	KA 37	<i>Bacillus pumilus</i>	
29	KA 38	<i>Bacillus subtilis</i>	목은지
30	KA 39	<i>Bacillus pumilus</i>	1년
31	KA 40	<i>Bacillus subtilis</i>	/NA
32	KA 41	<i>Bacillus subtilis</i>	
33	KA 42	<i>Escherichia coli</i>	
34	KA 44	<i>Lactobacillus malefermentans</i>	1년 목은지/MRS
35	KA 50	<i>Bacillus subtilis</i>	
36	KA 51	<i>Bacillus subtilis</i>	
37	KA 52	<i>Bacillus pumilus</i>	
38	KS 53	<i>Bacillus subtilis</i>	1년 목은지
39	KA 54	<i>Bacillus subtilis</i>	/Tri-Ca
40	KA 55	<i>Escherichia coli</i>	

Strains		Scientific Name	기원
41	KA 56	<i>Bacillus sp.</i>	1년 목은지/Tri-Ca
42	KA 57	<i>Bacillus sp.</i>	1년 목은지/Tri-Mg
43	KA 60	<i>Bacillus subtilis</i>	
44	KA 62	<i>Bacillus subtilis</i>	
45	KA 63	<i>Bacillus sp.</i>	2년 목은지 /NA
46	KA 64	<i>Paenibacillus sp.</i>	
47	KA 68	<i>Bacillus subtilis</i>	
48	KA 71	<i>Pediococcus inopinatus</i>	2년 목은지/MRS
49	KA 74	<i>Bacillus subtilis</i>	
50	KA 75	<i>Bacillus safensis</i>	
51	KA 76	<i>Bacillus subtilis</i>	2년 목은지 /Tri-Ca
52	KA 77	<i>Bacillus subtilis</i>	
53	KA 78	<i>Micrococcus luteus</i>	
54	KA 79	<i>Bacillus licheniformis</i>	2년 목은지/Tri-Mg
55	KA 80	<i>Staphylococcus</i>	
56	KA 81	<i>Enterococcus faecium</i>	
57	KA 82	<i>Bacillus subtilis</i>	
58	KA 84	<i>Enterococcus faecium</i>	
59	KA 85	<i>Escherichia coli</i>	동결건조 신선목은지 분말/NA
60	KA 86	<i>Bacillus licheniformis</i>	
61	KA 87	<i>Bacillus pumilus</i>	
62	KA 88	<i>Microbacterium oxydans</i>	
63	KA 89	<i>Enterococcus lactis partial</i>	
64	KA 91	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	동결건조 신선목은지 분말/MRS
65	KA 94	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	
66	KA 98	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	
67	KA 97	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
68	KA 99	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	
69	KA 100	<i>Bacillus subtilis</i>	동결건조 신선 목은지 분말/Tri-Ca
70	KA 101	<i>Bacillus subtilis</i>	
71	KA 102	<i>Bacillus subtilis</i>	
72	KA 103	<i>Bacillus tequilensis</i>	
73	KA 105	<i>Bacillus subtilis</i>	
74	KA 107	<i>Bacillus licheniformis</i>	
75	KA 108	<i>Bacillus subtilis</i>	동결건조 신선 목은지 분말/Tri-Mg
76	KA 109	<i>Bacillus pumilus</i>	
77	KA 110	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	
78	KA 111	<i>Pseudomonas fragi</i>	
79	KA 112	<i>Bacillus subtilis</i>	동결건조 1년 목은지 분말/NA
80	KA 113	<i>Bacillus subtilis</i>	

Strains		Scientific Name	기원
81	KA 114	<i>Bacillus safensis</i>	
82	KA 115	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	
83	KA 116	<i>Bacillus subtilis</i>	
84	KA 117	<i>Bacillus aryabhattai</i>	동결건조 1년 묵은지 분말/NA
85	KA 118	<i>Bacillus pumilus</i>	
86	KA 119	<i>Bacillus safensis</i>	
87	KA 121	<i>Bacillus safensis</i>	
88	KA 122	<i>Bacillus pumilus</i>	
89	KA 130	<i>Bacillus pumilus</i>	
90	KA 131	<i>Bacillus pumilus</i>	
91	KA 132	<i>Bacillus pumilus</i>	
92	KA 133	<i>Bacillus vallismortis</i>	
93	KA 134	<i>Bacillus tequilensis</i>	
94	KA 135	<i>Bacillus subtilis</i>	
95	KA 136	<i>Bacillus subtilis</i>	동결건조 1년 묵은지 분말/Tri-Ca
96	KA 137	<i>Bacillus tequilensis</i>	
97	KA 138	<i>Bacillus subtilis</i>	
98	KA 139	<i>Bacillus safensis</i>	
99	KA 140	<i>Bacillus subtilis</i>	
100	KA 141	<i>Bacillus subtilis</i>	
101	KA 142	<i>Bacillus licheniformis</i>	
102	KA 143	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	
103	KA 144	<i>Bacillus subtilis</i>	
104	KA 145	<i>Bacillus subtilis</i>	
105	KA 146	<i>Bacillus tequilensis</i>	
106	KA 147	<i>Bacillus cereus</i>	동결건조 2년 묵은지 분말/NA
107	KA 148	<i>Bacillus subtilis</i>	
108	KA 149	<i>Bacillus licheniformis</i>	
109	KA 151	<i>Bacillus subtilis</i>	
110	KA 152	<i>Bacillus subtilis</i>	
111	KA 153	<i>Bacillus subtilis</i>	
112	KA 155	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	
113	KA 156	<i>Bacillus sp.</i>	
114	KA 157	<i>Bacillus subtilis</i>	
115	KA 158	<i>Bacillus subtilis</i>	동결건조 2년 묵은지 분말/MRS
116	KA 159	<i>Bacillus tequilensis</i>	
117	KA 160	<i>Bacillus subtilis</i>	
118	KA 161	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	
119	KA 162	<i>Bacillus safensis</i>	
120	KA 163	<i>Bacillus subtilis</i>	

Strains		Scientific Name	기원
121	KA 165	<i>Bacillus licheniformis</i>	
122	KA 166	<i>Bacillus subtilis</i>	
123	KA 167	<i>Bacillus subtilis</i>	
124	KA 168	<i>Bacillus subtilis</i>	
125	KA 169	<i>Bacillus subtilis</i>	
126	KA 170	<i>Bacillus subtilis</i>	
127	KA 171	<i>Paenibacillus jamilae</i>	동결건조 2년묵은지
128	KA 172	<i>Bacillus subtilis</i>	분말/Tri-Ca
129	KA 173	<i>Bacillus subtilis</i>	
130	KA 174	<i>Bacillus tequilensis</i>	
131	KA 175	<i>Bacillus subtilis</i>	
132	KA 176	<i>Bacillus subtilis</i>	
133	KA 177	<i>Bacillus subtilis</i>	
134	KA 179	<i>Bacillus subtilis</i>	
135	KA 180	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	
136	KA 181	<i>Bacillus subtilis</i>	
137	KA 182	<i>Bacillus subtilis</i>	
138	KA 183	<i>Bacillus subtilis</i>	비교용 신선 김치
139	KA 184	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	/NA
140	KA 185	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	
141	KA 186	<i>Bacillus licheniformis</i>	
142	KA 187	<i>Micrococcus sp</i>	
143	KA 188	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
144	KA 189	<i>Lactobacillus curvatus</i>	
145	KA 190	<i>Lactobacillus plantarum</i>	비교용 신선 김치
146	KA191-1	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	/MRS
147	KA191-2	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	
148	KA 194	<i>Bacillus subtilis</i>	비교용신선김치/Tri-Ca
149	KA 195	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	비교용 신선김치/Tri-Mg
150	KA 196	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	
151	KA 197	<i>Bacillus subtilis</i>	
152	KA 198	<i>Bacillus safensis</i>	
153	KA 199	<i>Bacillus pumilus</i>	
154	KA 200	<i>Bacillus subtilis</i>	비교용 묵은지
155	KA 201	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	/NA
156	KA 202	<i>Micrococcus luteus</i>	
157	KA 203	<i>Bacillus subtilis</i>	
158	KA 204	<i>Bacillus pumilus</i>	
159	KA 209	<i>Bacillus subtilis</i>	비교용 묵은지/MRS
160	KA 210	<i>Bacillus axarquiensis</i>	비교용 묵은지/Tri-Ca

Strains		Scientific Name	기원
161	KA 215	<i>Bacillus subtilis</i>	
162	KA 216	<i>Bacillus subtilis</i>	
163	KA 217	<i>Bacillus pumilus</i>	
164	KA 218	<i>Bacillus subtilis</i>	비교용 목은지/Tri-Ca
165	KA 219	<i>Bacillus subtilis</i>	
166	KA 220	<i>Bacillus subtilis</i>	
167	KA 221	<i>Bacillus subtilis</i>	
168	KA 222	<i>Bacillus licheniformis</i>	
169	KA 224	<i>Bacillus pumilus</i>	비교용/목은지 /Tri-Mg
170	KA 225	<i>Paracoccus yeei</i>	

4) 동결건조 목은지 분말내 세포의 효소 활성도 분석

가) 동결건조 목은지 분말내 세포의 효소 활성도 분석 방법

동결건조 목은지 분말을 이용한 분쇄액으로부터 다양한 효소들의 활성도를 분석하였다.

목은지 분쇄액 자체의 세포의 효소 전체 활성도 측정을 배지에서 직접 조사분석하는 실험을 수행 하였다. 동결건조 목은지 분말(1g)을 멸균증류수(9ml)를 넣은 후 vortexing한 후 원심분리하였다. 상등액을 취하여 0.8, 0.45, 0.2 μ m membrane filter 로 filtration하여 시료 준비 후, 고체배지에서 세포의 효소활성도는 다양한 기질이 첨가된 배지[지질 분해능(lipolytic enzyme), 전분 분해능(amyase), 섬유소 분해능(cellulolytic enzyme), 단백질 분해능(proteolytic enzyme), β -Glucosidase 활성실험, Ligninase 활성실험, 불용성 인산염 분해능(Tri-Mg, Tri-Ca)]를 이용하여 paper disk 방법 또는 홀 확산 방법으로 시료를 loading하였다. 28 $^{\circ}$ C에서 3일간 incubation 후 적절한 발색시약과 투명한 확인시약을 처리하여 관찰 하였다.

나) 동결건조 목은지 분말내 세포의 효소 활성도 분석 결과

본 실험은 동결건조 목은지 분말의 효소 및 유기산등의 상품화와 기능성소재로서 응용화를 위한 실험으로서, 동결건조 목은지 분말들에서 미생물들을 여과·제거하므로써 순수 추출액내의 cell free 상태의 세포의 효소와 유기산 등의 생물·생화학적 활성을 측정하는 것이다.

지질분해효소(Lipolytic enzyme, lipase)활성은 동결건조 신선목은지 분말에서 유일하게 측정되었다.(Fig 10.)

전분분해효소(Amyolytic enzyme, amyase)의 활성은 동결건조 신선목은지(Fig 11-1, 4)에서 매우 강하게 나온 반면에 동결건조 2년 목은지 분말에서 활성이 검출되지 않았다. 종균접종 목은지 분말시료에서도 매우 강한 amyase 활성을 볼 수 있었다.(Fig11)

셀룰로오즈 분해효소(Cellulolytic enzyme, cellulase)는 동결건조 목은지 분말시료들 모두에서 활성이 나타나서, 숙성 발효기간과 환경요인에 관계없이 충분히 안정된 구조의 효소임을 알 수 있다.(Fig12)

단백질 분해효소(proteolytic enzyme, protease)의 경우 동결건조 신선목은지 분

말과 동결건조 2년 목은지 분말에서 비교적 강한 활성을 보였다.(Fig13)

β -glycosidase 활성은 동결건조 신선목은지 분말에서만 강한 활성을 나타내었다.(Fig14)

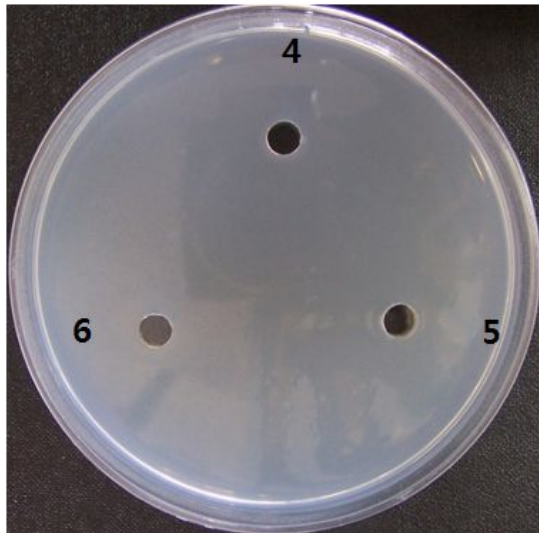
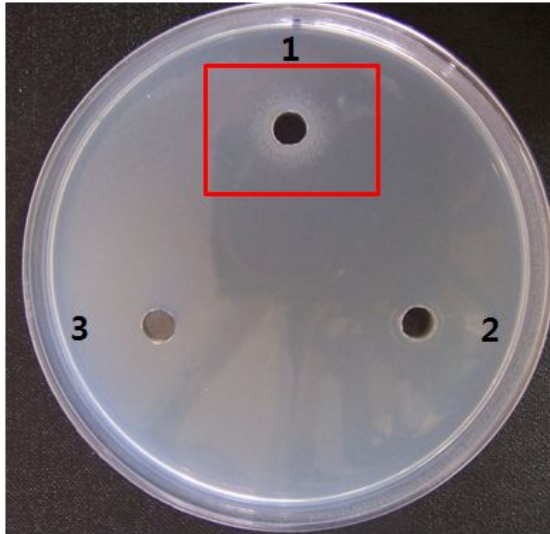
Ligninase 활성은 동결건조 목은지 분말에서 모두 약한 활성을 보였다.(Fig15)

특기할 만한 연구 결과로 동결건조 2년 목은지 분말에서 불용성 마그네슘 인산염 ($Mg_3(PO_4)_2$)의 가용화 활성이 나타났다. 이는 효소의 활성도에 의한것보다는 동결건조 2년 목은지 분말에 존재하는 유기산에 의한 가용화 작용으로 생각된다.(Fig16)

Table 12. 목은지내 세포의 효소 활성도 분석 결과 표

단위 : mm/투명환

Strains	CA	AA	PA	LA	Tri-Mg	Tri-Ca	Lig	β -G
1 동결 신선 목은지	0 (12)	0 (24)	0 (9)	0 (17)	X	X	0 (10)	0 (25)
2 동결 목은지 1년	0 (11)	0 (21)	X	X	X	X	0 (8)	X
3 동결 목은지 2년	0 (11)	X	0 (10)	X	0 (11)	X	0 (8)	X
4 동결 비 접종 목은지 (2°C)	0 (11)	X	0 (8)	X	X	X	0 (7)	X
5 동결 접종 목은지 (28°C 2day후 2°C)	0 (11)	X	0 (9)	X	X	X	0 (7)	X
6 동결 접종 목은지 (2°C)	0 (11)	X	0 (8)	X	X	X	0 (7)	X



**Fig 10. 동결건조 목은지분말내 세포의 효소의 지질 분해능(lipolytic enzyme)
활성 스펙트럼 결과**

1 : 동결건조 신선목은지 분말, 2 : 동결건조 1년 목은지 분말, 3 : 동결건조 2년 목은지 분말, 4 : 동결건조 종균비접종 목은지 분말(2℃ 냉장), 5 : 동결건조 종균접종 목은지 분말(28℃ 2day 후 2℃ 냉장), 6 : 동결건조 종균접종 목은지분말(2℃ 냉장)

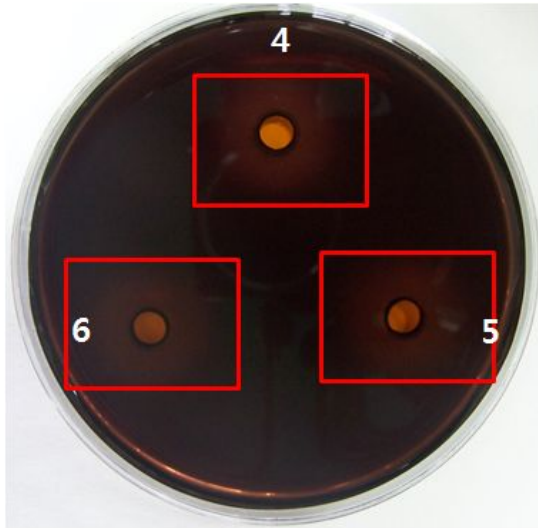
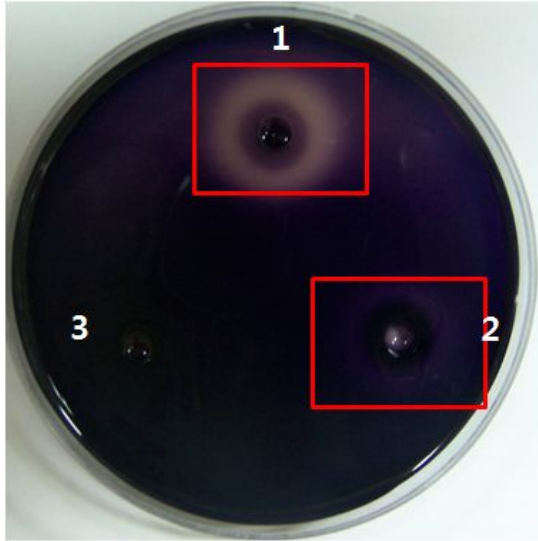


Fig 11. 동결건조 목은지 분말내 세포의 효소의 전분 분해능(amylose)

활성 스펙트럼 결과

- 1 : 동결건조 신선목은지 분말, 2 : 동결건조 1년 목은지 분말, 3 : 동결건조 2년 목은지 분말, 4 : 동결건조 종균비접종 목은지 분말(2℃ 냉장), 5 : 동결건조 종균접종 목은지 분말(28℃ 2day 후 2℃ 냉장), 6 : 동결건조 종균접종 목은지분말(2℃ 냉장)

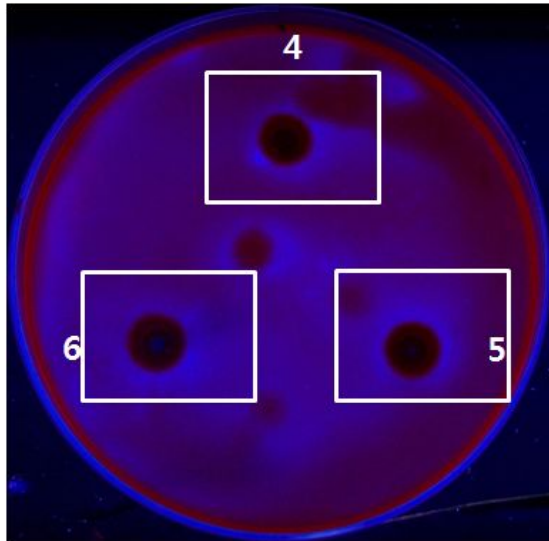
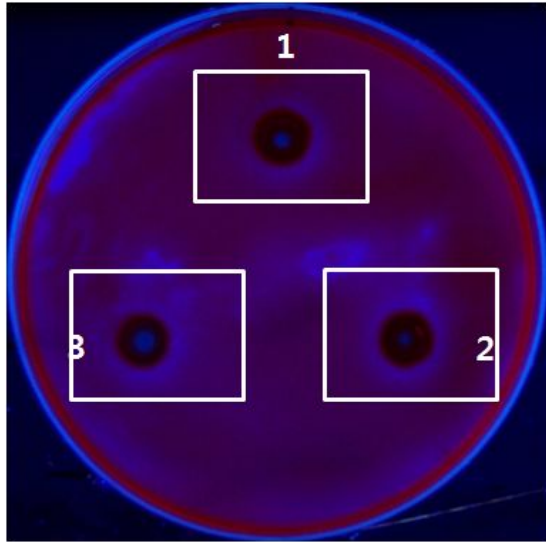


Fig 12. 동결건조 목은지 분말내 세포의 효소의 섬유소 분해능(cellulolytic enzyme) 활성 스펙트럼 결과(UV관찰)

1 : 동결건조 신선목은지 분말, 2 : 동결건조 1년 목은지 분말, 3 : 동결건조 2년 목은지 분말, 4 : 동결건조 종균비접종 목은지 분말(2℃ 냉장), 5 : 동결건조 종균접종 목은지 분말(28℃ 2day 후 2℃냉장), 6 : 동결건조 종균접종 목은지분말(2℃ 냉장)

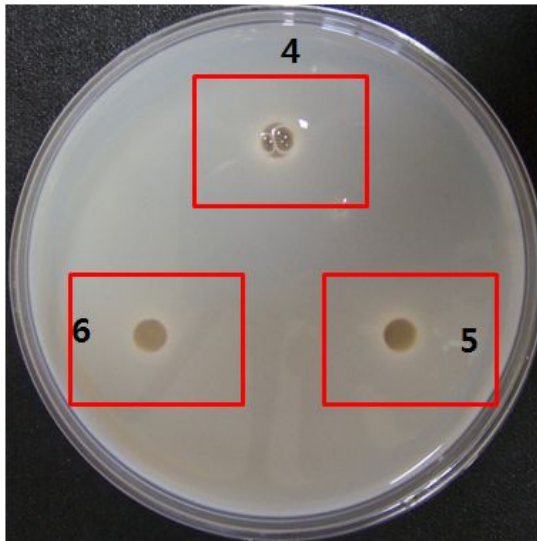
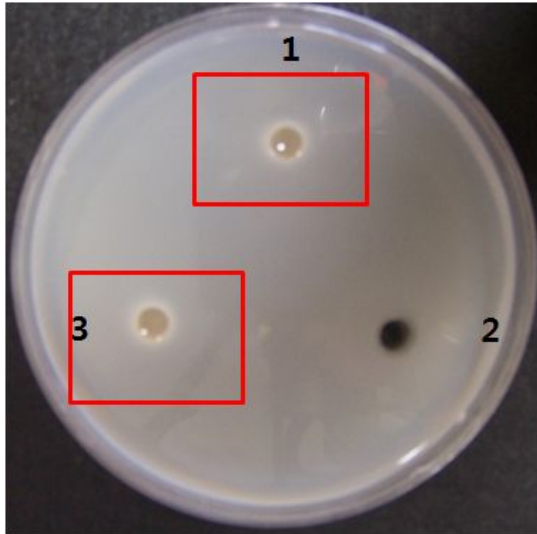


Fig 13. 동결건조 목은지분말 내 세포의 효소의 단백질분해능(proteolytic enzyme) 활성 스펙트럼 결과

1 : 동결건조 신선목은지 분말, 2 : 동결건조 1년 목은지 분말, 3 : 동결건조 2년 목은지 분말, 4 : 동결건조 중균비접종 목은지 분말(2℃ 냉장), 5 : 동결건조 중균접종 목은지 분말(28℃ 2day 후 2℃ 냉장), 6 : 동결건조 중균접종 목은지분말(2℃ 냉장)

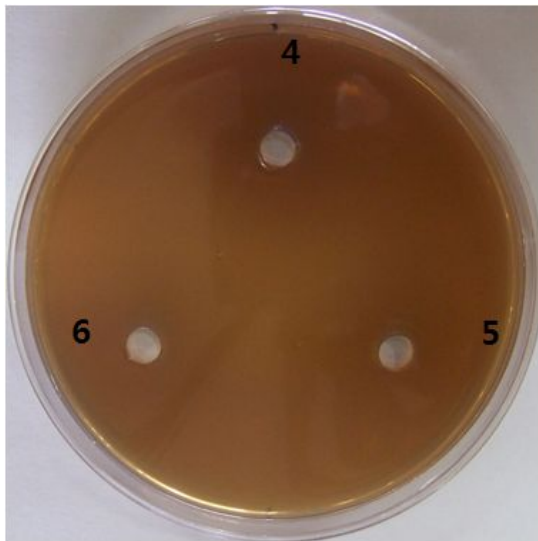
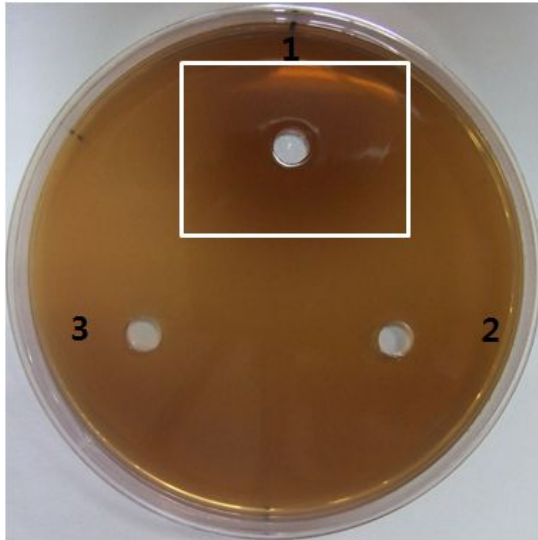


Fig 14. 동결건조 목은지 분말내 세포의 효소의 β -Glucosidase 활성 스펙트럼 결과

1 : 동결건조 신선목은지 분말, 2 : 동결건조 1년 목은지 분말, 3 : 동결건조 2년 목은지 분말, 4 : 동결건조 종균비접종 목은지 분말(2℃ 냉장), 5 : 동결건조 종균접종 목은지 분말(28℃ 2day 후 2℃ 냉장), 6 : 동결건조 종균접종 목은지분말(2℃ 냉장)

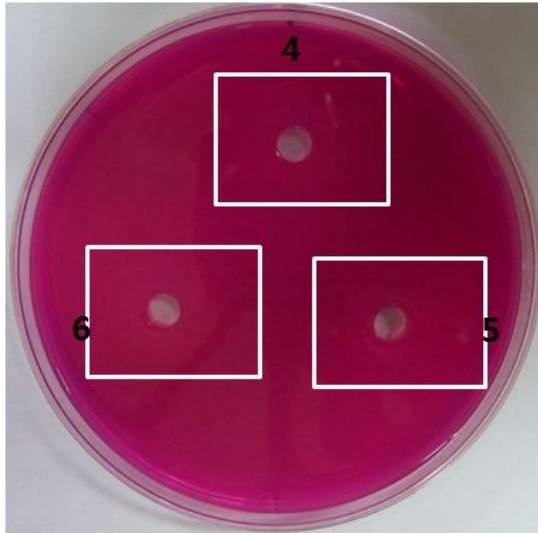
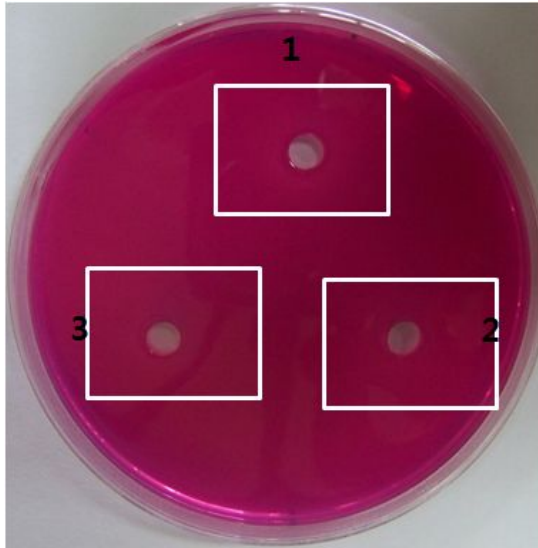


Fig 15. 동결건조 목은지분말내 세포의 효소의 Ligninase 활성 스펙트럼 결과

1 : 동결건조 신선목은지 분말, 2 : 동결건조 1년 목은지 분말, 3 : 동결건조 2년 목은지 분말, 4 : 동결건조 종균비접종 목은지 분말(2℃ 냉장), 5 : 동결건조 종균접종 목은지 분말(28℃ 2day 후 2℃ 냉장), 6 : 동결건조 종균접종 목은지분말(2℃ 냉장)

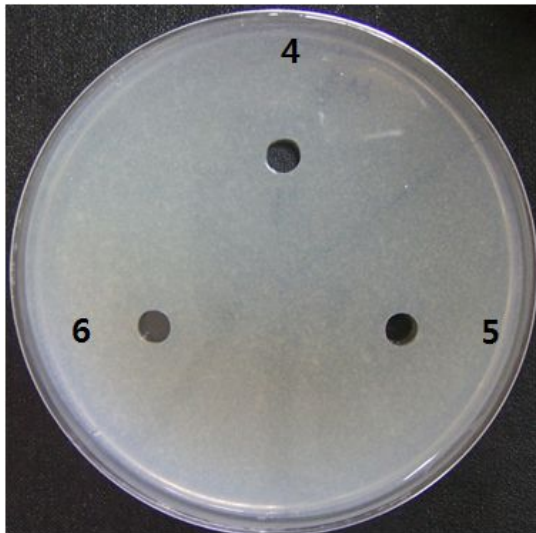
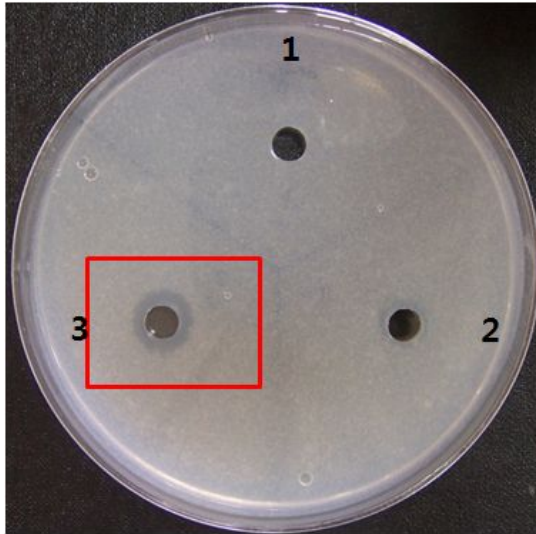


Fig 16. 동결건조 목은지 분말내 세포의 효소의 마그네슘 인산염 가용화(Tri-Mg) 활성 측정 결과

1 : 동결건조 신선목은지 분말, 2 : 동결건조 1년 목은지 분말, 3 : 동결건조 2년 목은지 분말, 4 : 동결건조 종균비접종 목은지 분말(2℃ 냉장), 5 : 동결건조 종균접종 목은지 분말(28℃ 2day 후 2℃ 냉장), 6 : 동결건조 종균접종 목은지분말(2℃ 냉장)

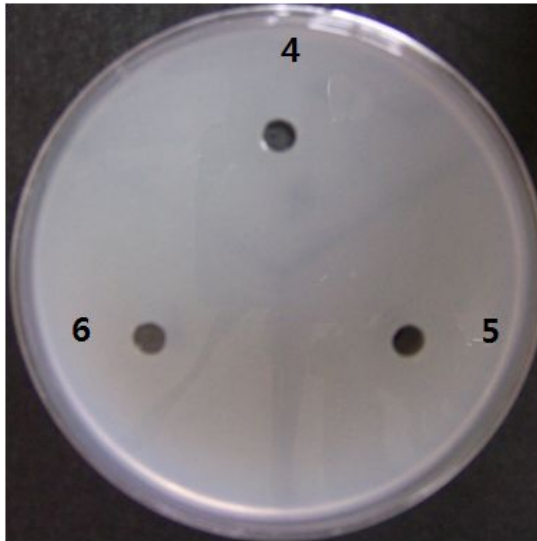
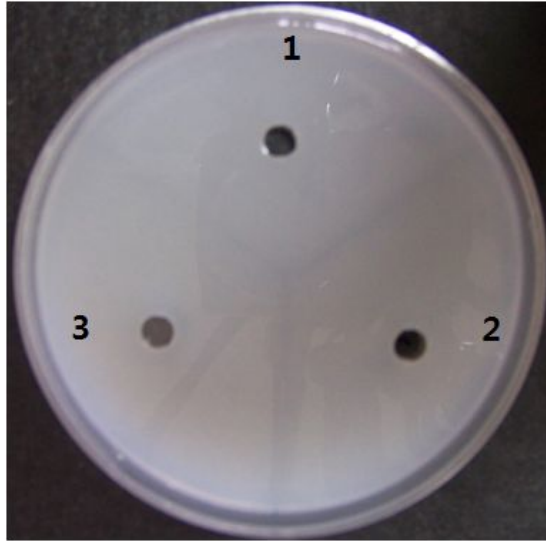


Fig 17. 동결건조 목은지 분말내 세포의 효소의 불용성 칼슘 인산염 가용화(Tri-Ca) 활성 측정 결과

1 : 동결건조 신선목은지 분말, 2 : 동결건조 1년 목은지 분말, 3 : 동결건조 2년 목은지 분말, 4 : 동결건조 종균비접종 목은지 분말(2℃ 냉장), 5 : 동결건조 종균접종 목은지 분말(28℃ 2day 후 2℃ 냉장), 6 : 동결건조 종균접종 목은지분말(2℃ 냉장)

5) 목은지 추출액의 기능성소재들의 profile 및 특성

유기산 및 아미노산들의 profile을 TLC, HPLC, LC-MS 등을 이용하여 분석 조사하였으며 무기물 분석은 ICP-MS, AAS 등을 이용하여 분석 조사하였다.

가) 목은지내 유기산 분석

(1) 목은지내 유기산 분석 방법

목은지 시료 내 유기산은 HPLC를 이용하여 분석 : 컬럼-Aminex 87H column 기기-Ultimater 3000 (Dionex, USA), 이동상- 0.01N H2SO4, Detector-RI (Shodex RI-101)

(2) 목은지내 유기산 분석 결과

- Citric acid는 김치 A(신선 1달 목은지)에서만 48.1ppm 농도로 함유되어있다. Oxalic acid는 citric acid와는 달리 숙성발효기간이 긴 김치 B, C(1년 목은지, 2년 목은지, 비교용 목은지)에서 3ppm 수준의 농도로 존재하였다. Acetic acid 2년 목은지에서 최저농도(177ppm)로 존재하였다. Lactic acid의 경우, 숙성발효기간이 길수록 함량이 비례적으로 높아져서 2년 목은지(김치C)는 신선 목은지(김치 A)에 비해 약 2.7배 농도록 존재하였다.(Fig18-1~2, Table13)

Table 13. 유기산 분석 결과표

(단위 : ppm)

구분	Citric acid	Oxalic acid	Lactic acid	Acetic acid
김치 A	48.076	0	473.143	230.637
김치 B	0	3.948	1182.378	287.529
김치 C	0	3.013	1331.950	177.318
김치 D	0	3.375	883.550	343.491

A : 신선목은지, B : 1년 목은지, C : 2년 목은지, D : 비교용 목은지

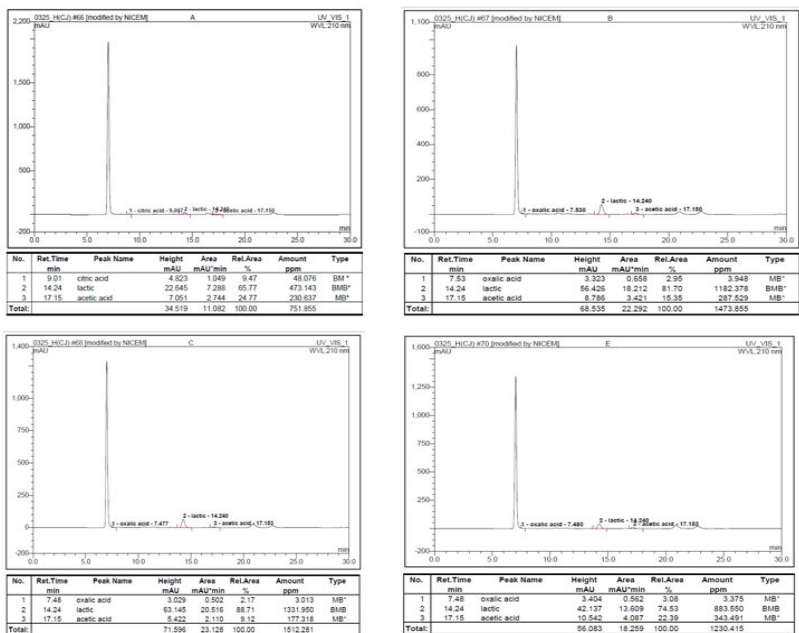


Fig 18-1. 유기산 분석 스펙트럼 사진

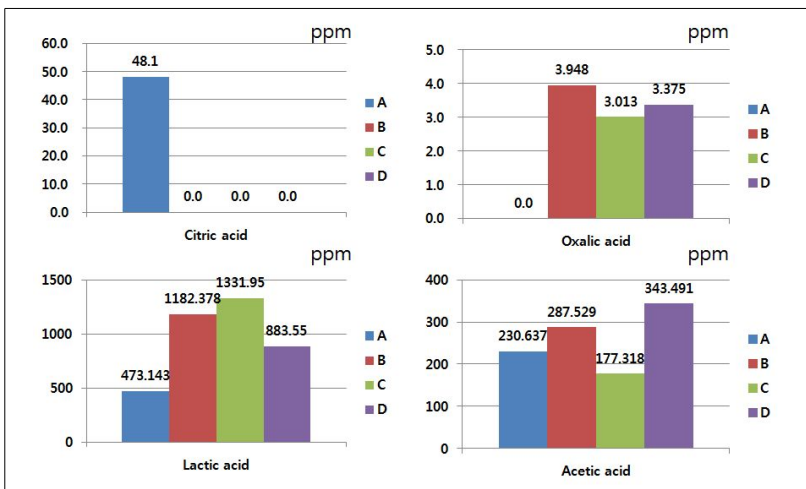


Fig 18-2. 유기산 분석결과 그래프

A : 신선목은지, B : 1년 목은지, C : 2년 목은지, D : 비교용 목은지

(3) 목은지내 유기산 농도 비율(초산/젖산)의 중요성

Acetic acid / Lactic acid의 농도비율을 숙성발효기간에 따른 김치A(1달 신선목은지), 김치B(1년 목은지), 김치C(2년 목은지)에서 구해보면 김치A는 0.49, 김치B는 0.24, 김치C는 0.13의 값을 보인다. 따라서 숙성발효기간에 정확히 반비례 관계를 보이고 있어, 초산/젖산의 농도비율을 숙성발효기간에 대한 validation marker로 적용할 수 있을 것으로 사료된다.(Fig19)

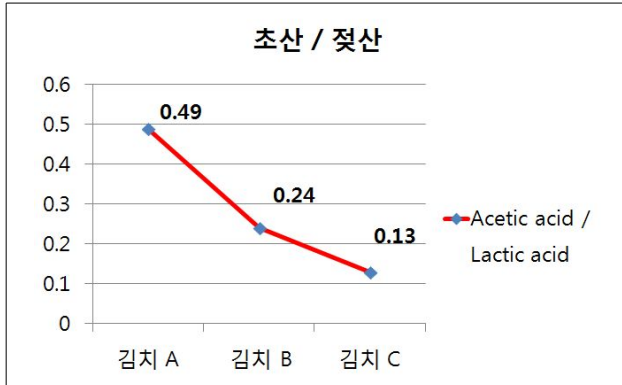


Fig19. 김치A, B, C내 초산/젖산의 농도 비율

나) 목은지내 무기물 분석

(1) 목은지내 무기물 분석 방법

무기물 분석은 ICP-AES측정법으로 분석하였다.

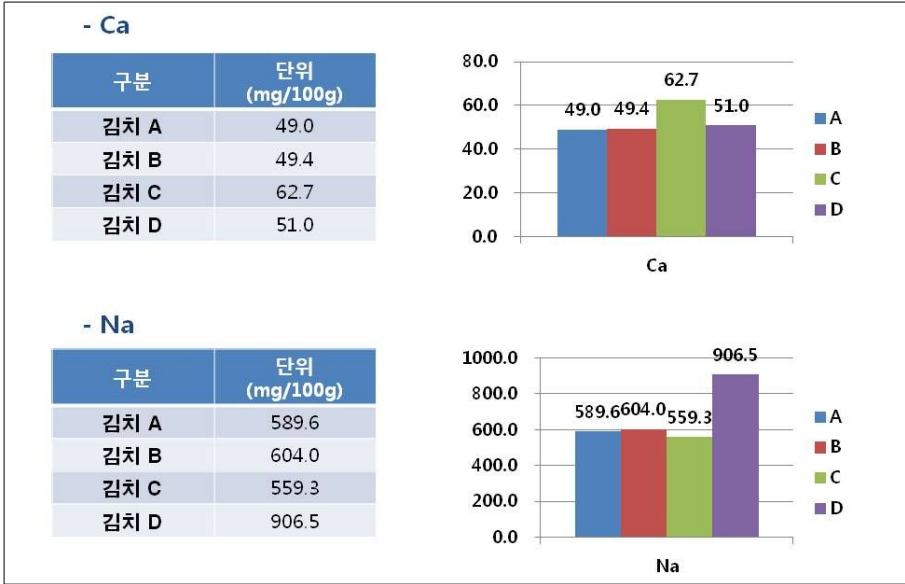
(2) 목은지내 무기물 분석 결과

Table 14. 자연발효 목은지의 무기물 분석결과표

항목	분석결과				단위	시험방법
	A	B	C	D		
Ca	49.0	49.4	62.7	51.0	mg/100g	ICP-AES 측정법
Na	589.6	6040	559.3	906.5	mg/100g	ICP-AES 측정법
P	56.5	70.6	73.5	60.9	mg/100g	ICP-AES 측정법
Zn	0.3	0.3	0.3	0.2	mg/100g	ICP-AES 측정법
Fe	0.5	0.4	0.4	0.4	mg/100g	ICP-AES 측정법
Mg	16.0	15.8	18.9	23.1	mg/100g	ICP-AES 측정법
Se	-	-	0.1	0.1	mg/kg	ICP-MS 측정법
Ge	-	-	불검출	불검출	mg/kg	ICP-MS 측정법

A : 신선목은지, B : 목은지 1년, C: 목은지 2년, D : 비교용 목은지

Table 15. 자연발효 목은지의 성분 분석결과 (칼슘, 나트륨)

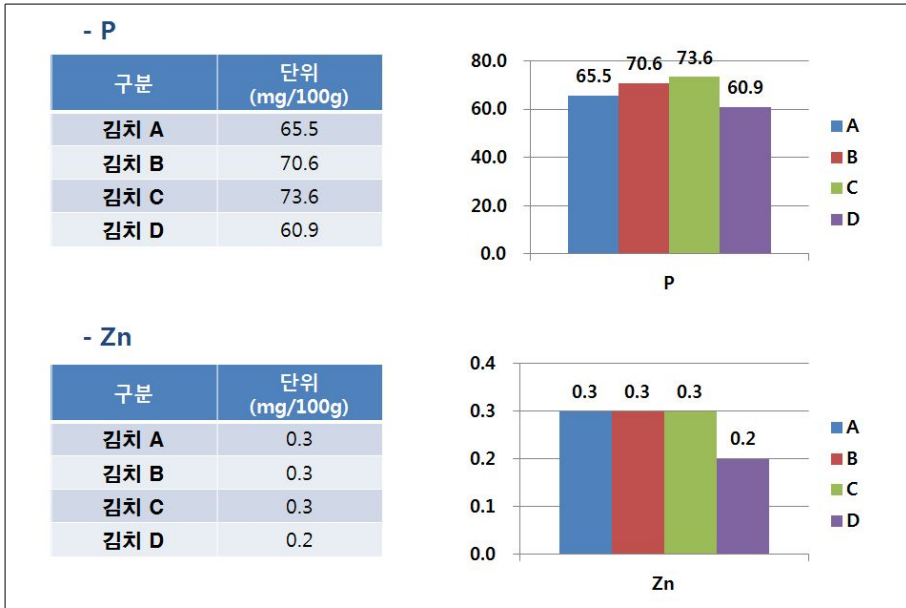


칼슘의 경우 2년목은지(김치C) 시료에서 월등히 높게 나타났다. 이는 김치제조 재료 중 멸치젓, 멸치액젓, 조기 등에서 기원하는 뼈 성분인 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 과 같은 불용성 인산염 화합물을 가용화 시킬 수 있는 유기산이나 이들 유기산을 생성하는 미생물 개체군의 영향과 강력히 연관지어 볼 수 있다.

(본 연구에서 일치되는 결과를 뒤에서 볼 수 있음)

나트륨의 경우 2년목은지(김치C;559.3mg/100g)에서 가장 낮은 함량을 보였을 뿐만 아니라 비교용목은지(김치D;906.5mg/100g)에 비하여 무려 1.6배 이상 낮은 값을 나타내었다. 김치A, B, C 시료군은 모두 김치D에 비하여 나트륨 함량이 낮게 나타났다.

Table 16. 자연발효 목은지의 성분 분석결과 (인, 아연)



P(인)의 함량 역시 2년 목은지(김치C)에서 가장 높은 함량을 보이는데 이는 Ca 함량의 동태와 유의한 관련이 있을 것으로 생각된다. 즉, 목은지내 불용성인산염화합물의 연속적인 가용화작용이 일어났음을 알 수 있었다. 이는 숙성발효과정의 미생물 군집 변화에 따른 생물 활성능 변화와 관련이 있을 것으로 사료된다.

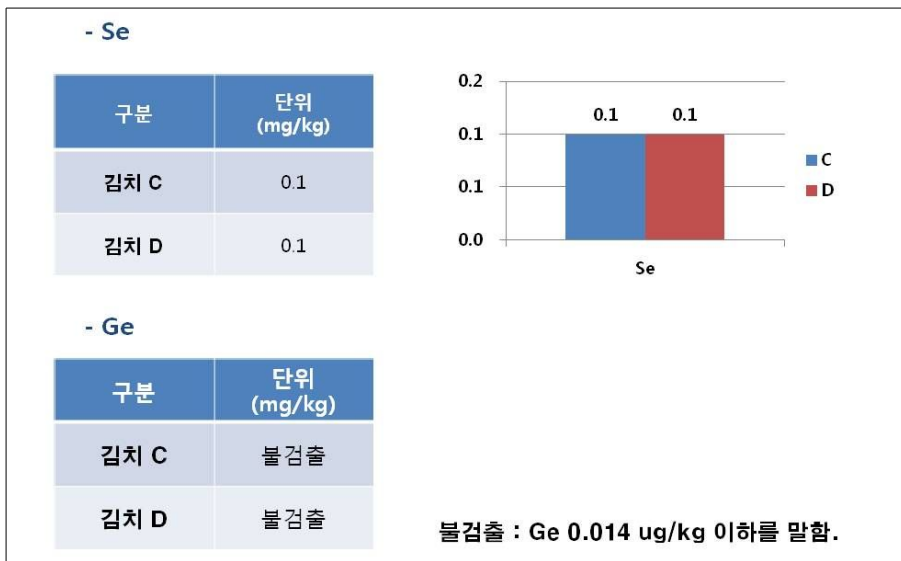
Zn(아연)의 함량은 숙성발효기간에 관계없이 모두 일정한 값을 보였다.

Table 17. 자연발효 묵은지의 성분 분석결과 (철, 마그네슘)



철 함량은 김치A, 1년 묵은지(김치B), 2년 묵은지(김치C) 시료군에서 비교용 묵은지(김치D)에 비하여 2배이상 높게 나타났다. Mg 함량은 비교용 묵은지에서 높게 나타났다.

Table 18. 자연발효 묵은지의 성분 분석결과 (셀레늄, 게르마늄)



셀레늄(Se)은 2년묵은지(김치C)와 비교용묵은지(김치D)에서 0.1mg/100g 수준으로 특이하게 탐지되었다.

게르마늄(Ge)은 검출되지 않았다.

다) 목은지내 지방산 분석

지방산(포화지방산, 불포화지방산)은 AOAC Official method(963.22)로 분석하였다.

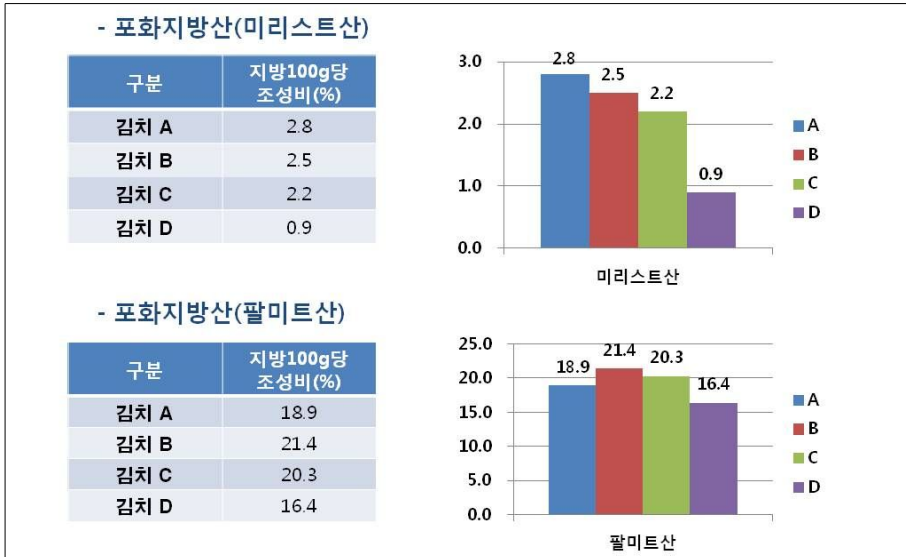
(1) 자연발효 목은지 지방산 분석 결과

Table 19. 자연발효 목은지 지방산 분석 결과 표

구분	화학식	지방산(일반명)	지방 100g 당 조성비(%)				시험방법
			A	B	C	D	
포화 지방산	C14:0	미리스트산(Myristic acid)	2.8	2.5	2.2	0.9	AOAC Official Method 963.22
	C16:0	팔미트산(Palmitic acid)	18.9	21.4	20.3	16.4	
	C18:0	스테아르산(Stearic acid)	3.0	3.4	3.1	2.4	
	C20:0	아라키드산(Arachidic acid)	0.5	0.5	0.5	0.4	
		포화지방산 합계	25.2	27.8	26.1	20.1	
불포화 지방산	C14:1	미리스톨레산(Myristoleic acid)	0.1	0.1	0.1	0.1	
	C16:1	팔미톨레산(Palmitoleic acid)	3.7	2.1	1.8	0.7	
	C18:1	올레산(Oleic acid)	12.4	12.1	13.3	11.3	
	C18:2	리놀레산(Linoleic acid)	32.7	34.2	36.6	52.6	
	C18:3	리놀레산(Linoleic acid)	12.9	11.1	11.3	14.0	
	C20:1	가드올레산(Gadoleic acid)	1.2	1.2	1.2	0.2	
	C20:2	에이코사디에노산 (Eicosadienoic acid)	0.1	0.1	0.1	0.1	
	C20:3	에이코사트리에노산 (Eicosatrienoic acid)	0.1	0.1	0.1		
	C20:4	아라키돈산(Arachidonic acid)	0.3	0.4	0.3		
	C20:5	EPA	4.0	3.0	2.4	0.5	
	C22:6	DHA	4.2	5.3	4.1	0.3	
	불포화지방산 합계	71.7	69.7	71.3	79.8		
	Unknown	3.1	2.5	2.6	0.1		
	합계	100.0	100.0	100.0	100.0		

A : 신선목은지, B : 목은지 1년, C: 목은지 2년, D : 비교용 목은지

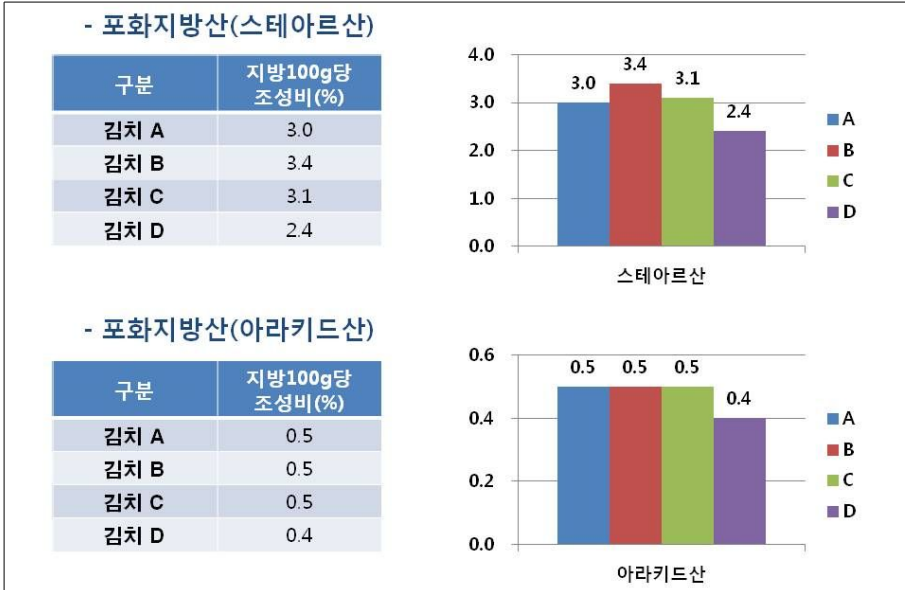
Table 20. 자연발효 묵은지의 성분 분석결과 (미리스트산, 팔미트산)



포화지방산 계열인 미리스트산은 김치 A,B,C 시료군에서 비교용 김치 D에 비하여 2.4배 ~ 3.1배 높게 검출되었다.

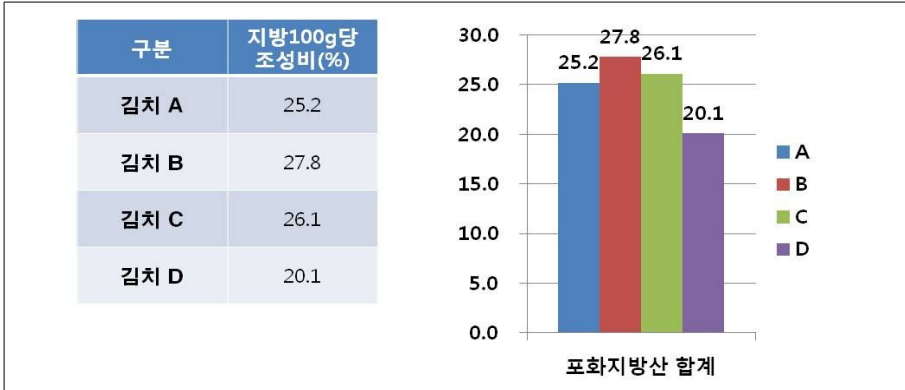
팔미트산 역시 비교용김치 D에 비하여 1.2 ~ 1.3배 높게 나타났다.

Table 21 . 자연발효 묵은지의 성분 분석결과 (스테아르산, 아라키드산)



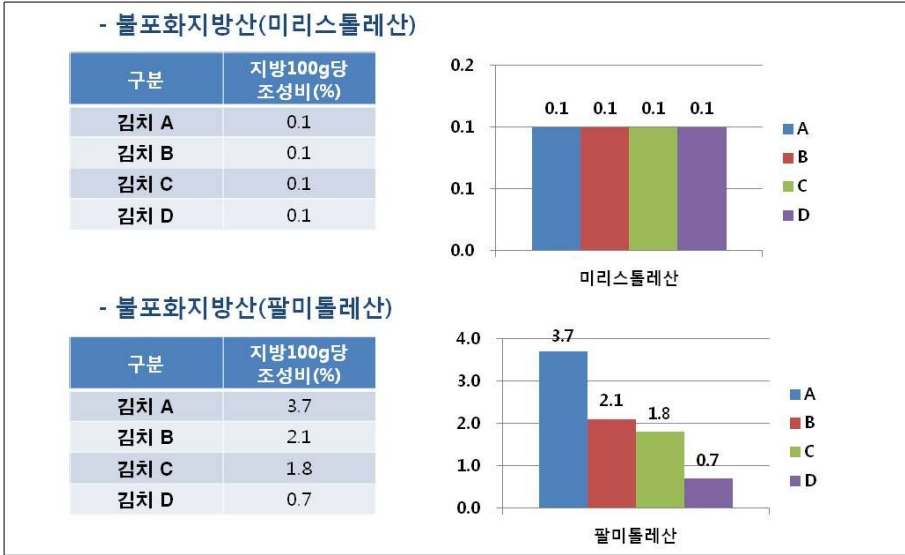
- 포화지방산에 속하는 스테아르산과 아라키드산 모두 김치 A, B, C 시료군이 비교용 김치 D에 비해 높게 검출되었다.

Table 22. 자연발효 목은지의 성분 분석결과 (포화지방산 합계)



포화지방산 총 함량은 김치 A,B,C 시료가 비교용김치 D에 비하여 1.3 ~ 1.4배 높게 나타났다. 포화지방산 함량의 차이점은 김치 A,B,C 시료군이 비교용 김치 D와는 김치 재료와 발효미생물군의 조성이 확연히 다를 수 있다.

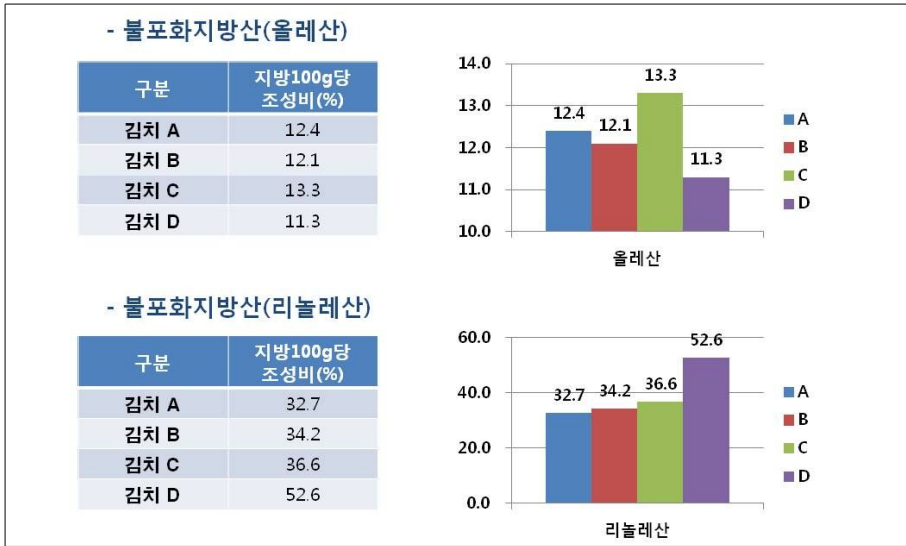
Table 23. 자연발효 묵은지의 성분 분석결과 (미리스톨레산, 팔미톨레산)



불포화 지방산 중 미리스톨레산 함량은 모든 묵은지 김치 시료(A,B,C,D)에서 모두 똑같이 낮은 값으로 검출되었다.

팔미톨레산의 경우 숙성발효기간이 길수록 비례적으로 감소하였다. 따라서, 표준매뉴얼에 의해 일정하게 제조되는 묵은지(김치 A,B,C)의 경우 팔미톨레산의 함량값을 묵은지의 숙성도 Validation Marker로 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

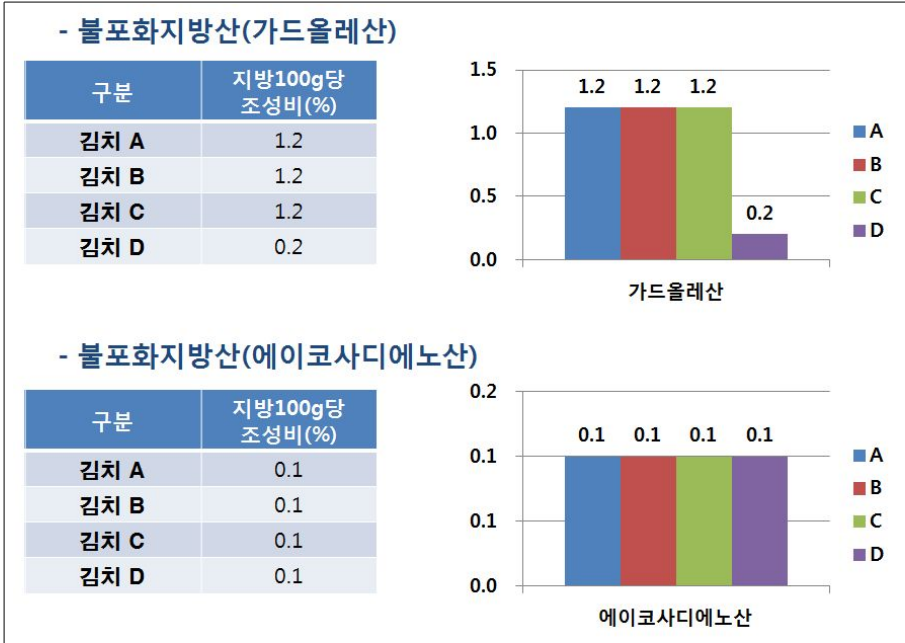
Table 24. 자연발효 묵은지의 성분 분석결과 (올레산, 리놀레산)



올레산의 경우 모든 김치 시료군에서 비교적 비슷한 함량(11.3 ~ 13.3%)을 나타냈다.

리놀레산의 경우 김치D(비교용묵은지)가 김치 A,B,C 시료에 비하여 월등히 높은 함량을 나타냈다.

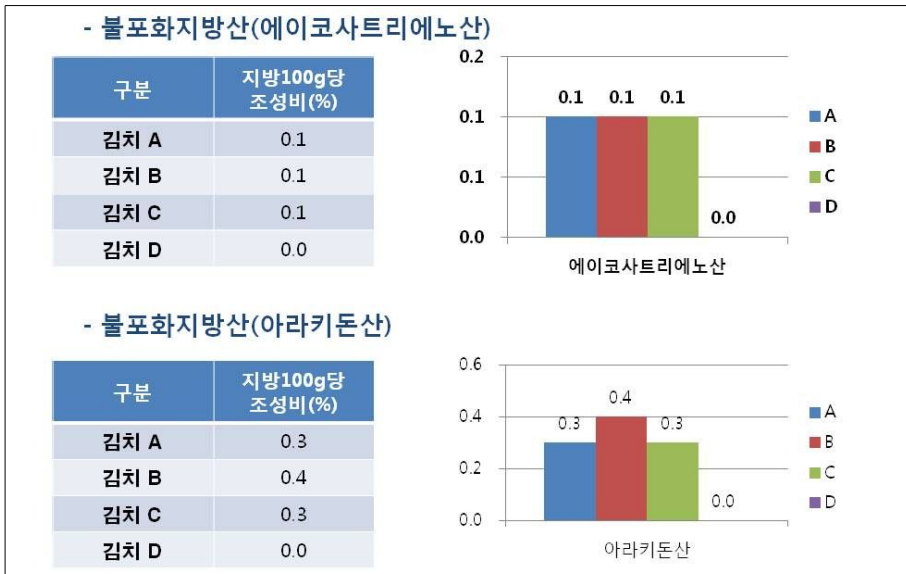
Table 25. 자연발효 묵은지의 성분 분석결과 (가드올레산, 에이코사디에노산)



가드올레산의 경우 표준매뉴얼에 의해 제조된 묵은지 시료군(김치A,B,C)에서 모두 동일한 함량을 보여 숙성발효기간에 의하여 좌우되지 않는 성분임을 알 수 있었다.

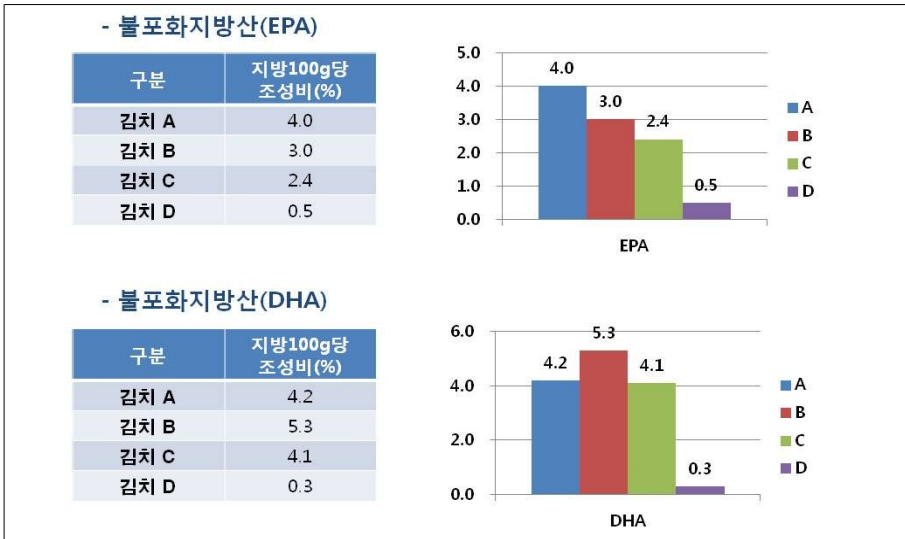
에이코사디에노산의 경우는 모든 시료군에서 미량의 동일한 함량(0.1%)으로 검출되었다.

Table 26. 자연발효 묵은지의 성분 분석결과 (에이코사트리에노산, 아라키돈산)



에이코사트리에노산과 아라키돈산은 특이하게도 김치 A,B,C 시료군에서 소량씩 검출되었다. 이들 불포화지방산은 표준매뉴얼에 의해 제조된 브랜드 묵은지 제품의 독립성을 나타내는 브랜드 마커(Brand Marker)로 활용될 수 있을 것이다.

Table 27. 자연발효 묵은지의 성분 분석결과 (EPA, DHA)



표준매뉴얼에 의해 제조된 오모가리 묵은지(김치 A,B,C)는 비교용묵은지(김치D)에 비하여 EPA, DHA 뿐만 아니라 가드올레산, 아라키돈산, 에이코사트리에노산 등 기능성 불포화 지방산이 다양하게 나타났다.

Table 28. 자연발효 묵은지의 성분 분석결과 (불포화지방산 합계)



불포화지방산의 총 함량은 표준매뉴얼에 의해 제조된 묵은지(김치 A,B,C)가 비교용묵은지(김치D)에 비해 비록 낮은 값을 보였으나, 상기한 바와 같이 EPA, DHA등과 같은 기능성 불포화지방산이 존재하므로 건강증진 등 생리활성 작용에 이로울 것으로 생각되어진다. 비교용 묵은지가 불포화지방산 총 함량이 높은 까닭은 과도하게 많은 리놀레산 때문으로 생각된다.

라) 목은지내 총 구성아미노산 분석

(1) 아미노산 분석 방법

구성아미노산(16종)은 Derived ninhydrin HPLC analytical method로 분석 함.

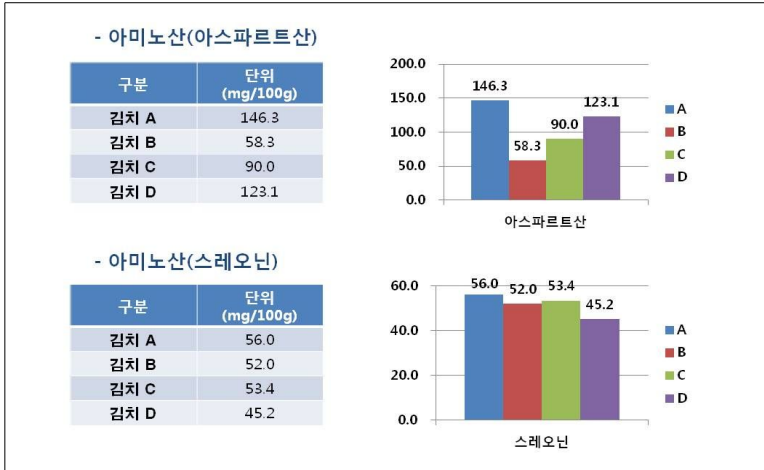
(2) 자연발효 목은지 아미노산 분석 결과(총 구성아미노산)

Table 29. 자연발효 목은지 총 구성아미노산 분석 결과 표 (단위:mg/100g)

구성아미노산	분석결과				시험방법
	A	B	C	D	
아스파르트산(Aspartic acid)	146.3	58.3	90.0	123.1	Derived by ninhydrin HPLC analytical method
스레오닌(Threonine)	56.0	52.0	53.4	45.2	
세린(Serine)	60.0	59.8	67.5	49.1	
글루탐산(Glutamic acid)	301.9	351.5	446.1	515.1	
프롤린(Proline)	58.3	132.4	73.6	63.5	
글리신(Glycine)	66.4	69.4	74.1	70.6	
알라닌(Alanine)	104.7	198.8	192.4	131.1	
발린(Valine)	61.6	68.9	66.3	60.7	
메치오닌(Methionine)	14.2	18.5	21.3	17.4	
이소로이신(Isoleucine)	48.4	55.7	58.3	48.9	
로이신(Leucine)	94.3	97.9	100.2	87.7	
티로신(Tyrosine)	22.4	11.9	15.1	18.4	
페닐알라신(Phenylalanine)	48.4	50.7	53.7	50.8	
리신(Lysine)	92.5	73.9	86.8	69.4	
히스티딘(Histidine)	27.2	26.9	27.4	21.4	
알기닌(Arginine)	32.8	18.4	19.0	32.5	
Total	1,235.4	1,345.0	1,445.2	1,404.9	

A : 신선목은지, B : 목은지 1년, C: 목은지 2년, D : 비교용 목은지

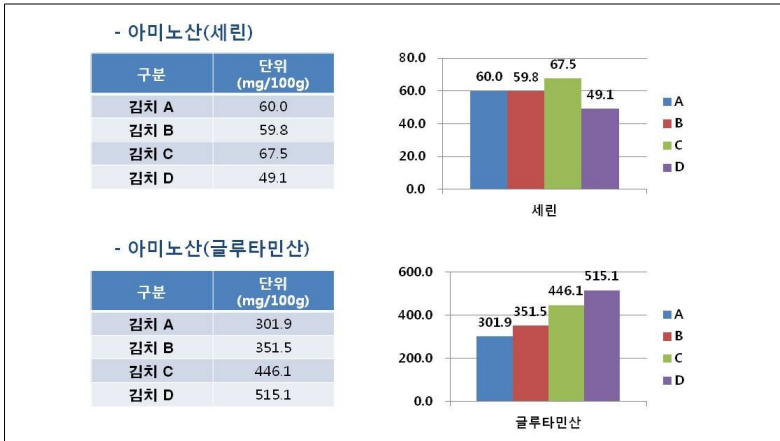
Table 30. 자연발효 묵은지의 성분 분석결과(총 구성아미노산 중 : 아스파르트산, 스테오닌)



아스파르트산은 숙성발효기간에 따라 함량 변동이 심하게 나타나 발효미생물개체군 변화와 관련있을 것으로 예측할 수 있다.

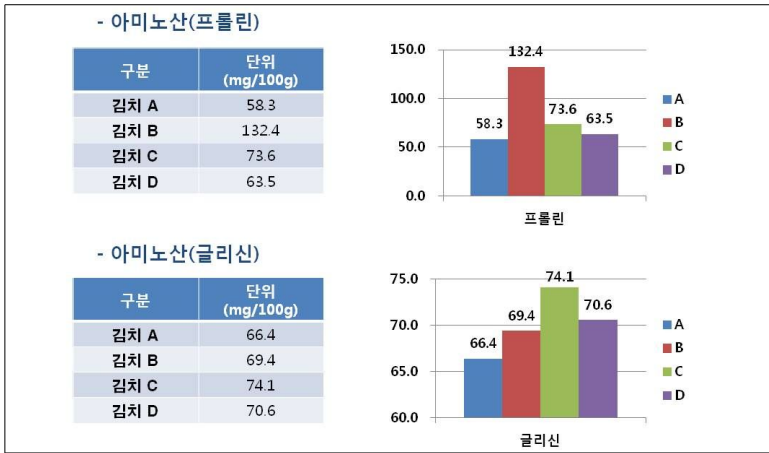
스테오닌의 경우 숙성발효기간에 상관없이 일정한 함량을 나타낸다.

Table 31. 자연발효 묵은지의 성분 분석결과(총 구성아미노산 중 : 세린, 글루타민산)



세린과 특히 글루타민산은 김치 A,B,C 시료군에서처럼 숙성발효기간이 오래 될 수록 높은 함량을 나타내었다.

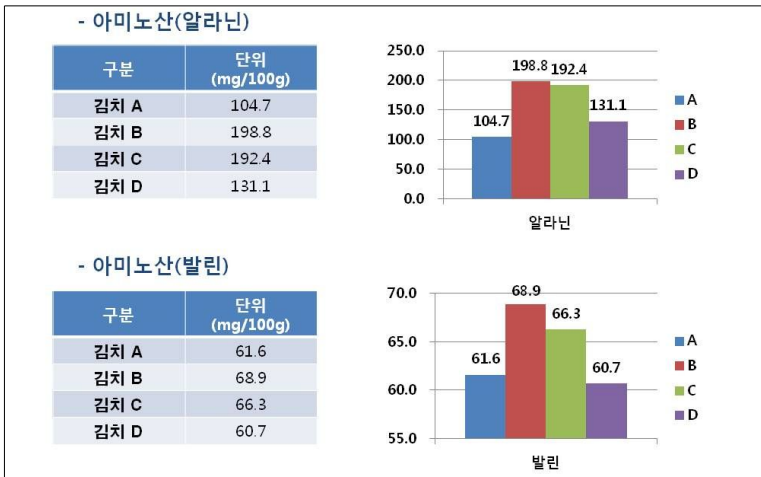
Table 32. 자연발효 묵은지의 성분 분석결과 (총 구성아미노산 중 : 프롤린, 글리신)



프롤린은 숙성발효기간에 따라 함량 변동이 심하였다.

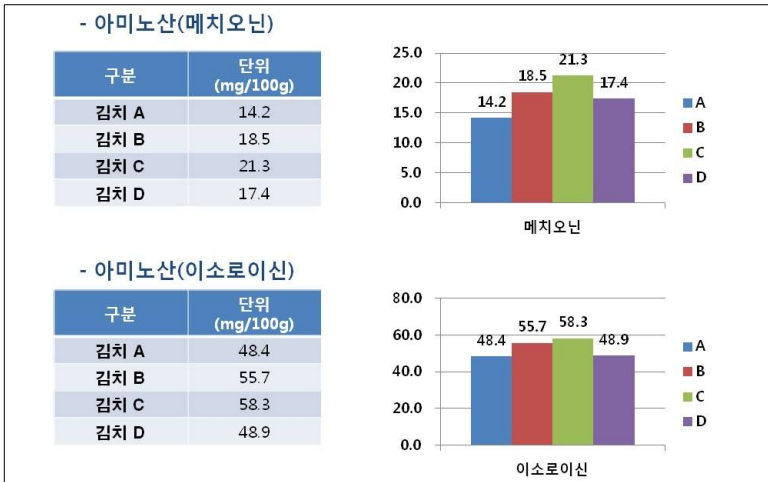
글리신은 글루타민산처럼 숙성발효기간이 긴 2년 묵은지(김치C)에서 가장 높은 함량을 나타내었다.

Table 33. 자연발효 묵은지의 성분 분석결과 (총 구성아미노산 중 : 알라닌, 발린)



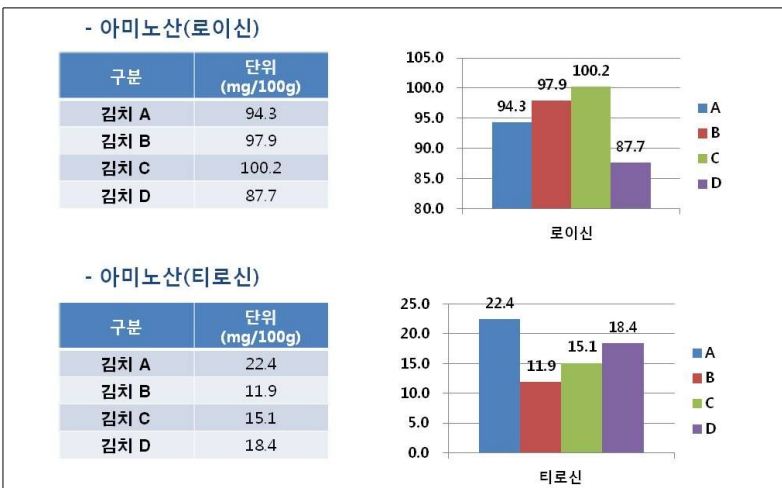
알라닌, 발린은 숙성발효 시기가 1년 이상 된 김치 B,C 에서 높은 함량을 나타냈다.

Table 34. 자연발효 묵은지의 성분 분석결과 (총 구성아미노산 중 : 메치오닌, 이소로이신)



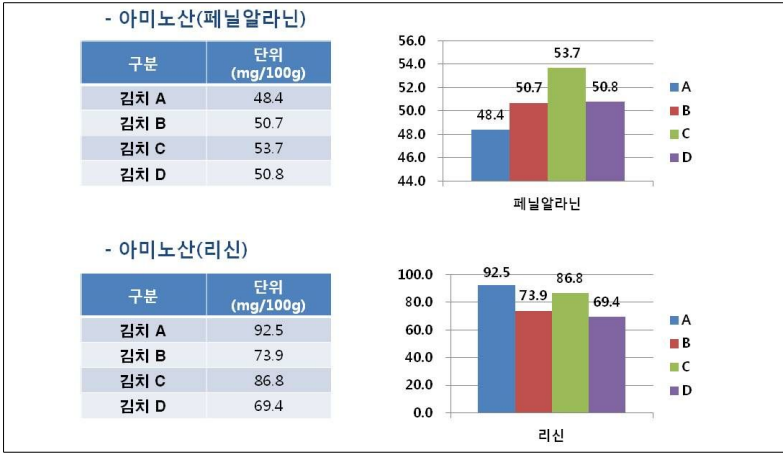
메치오닌과 이소로이신의 경우 숙성발효기간이 길수록 증가되는 아미노산이었다.

Table 35. 자연발효 묵은지의 성분 분석결과 (총 구성아미노산 중 : 로이신, 티로신)



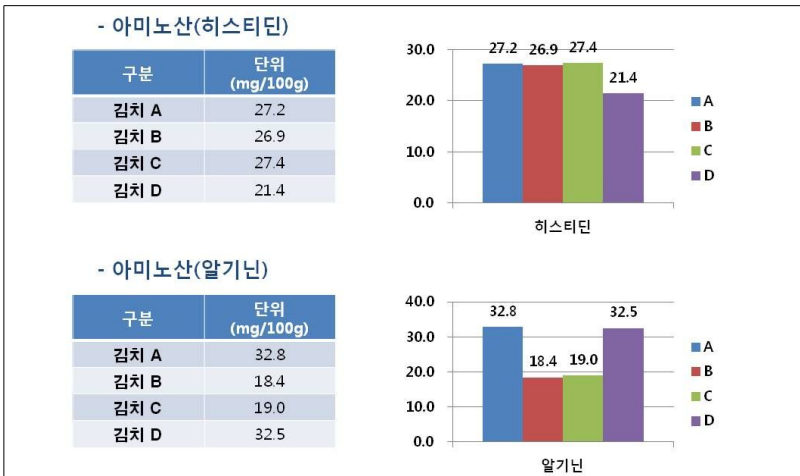
로이신 역시 숙성발효기간이 길수록 미세하지만 증가되었으나, 티로신의 경우 감소되었다가, 다시 증가하는 경향을 나타내었다.

Table 36. 자연발효 목은지의 성분 분석결과 (총 구성아미노산 중 : 페닐알라닌, 리신)



페닐알라닌의 경우 함량 변동의 폭이 크진 않지만 계속 증가되었다.
 리신은 숙성발효기간에 따라 등락되는 양상을 나타내었다.

Table 37. 자연발효 목은지의 성분 분석결과 (총 구성아미노산 중 : 히스티딘, 알기닌)



히스티딘은 숙성발효기간에 관계없이 항상 일정한 함량을 유지하였다.
 알기닌은 발효기간이 짧은 김치A에서 높은 함량(32.8mg/100g)을 보였으나, 1년이상 숙성발효된 목은지(김치B,C)의 경우 일정한 함량(18.4~19.0mg/100g)을 나타내었다.

Table 38. 자연발효 목은지의 성분 분석결과 (총 구성아미노산 합계)



아미노산의 총 함량은 숙성발효기간이 길수록 비례적으로 높아지는 양상을 보여, 2년 목은지(김치C)에서 최대 함량(1445.2mg/100g)을 나타내었다.

2년 목은지의 구성성분 특징을 뚜렷하게 보여주는 대표적인 결과 중 하나라고 하겠다.

* 총 아미노산 함량은 2년된 목은지에서 1,445mg으로 가장 높았으며 알기닌(Arg), 아스파르트산(Asp), 티로신(Tyr) 함량은 목은지(1, 2년)에서 낮은 함량을 나타냈다.

마) Validation biomarker 및 기능성 소재 탐색

(1) protein 계열의 marker 탐색

묵은지 추출액 단백질 분석 100KDa 이상의 고분자 단백질이 특이하게 2년 묵은지에서 검출되었다. 100KDa 이상의 고분자 단백질은 2년 묵은지의 validation을 위한 biomarker로서 강력한 후보물질 소재임에 틀림없다. 현재 N-terminal sequence를 분석하였는데 R-P-P-P(E)-P-D(Q)-I-P(T)-D(Q)-G로 조사되었다. Pro 반복서열이 나타나 부분적 cyclic peptide form일 가능성이 높았다.

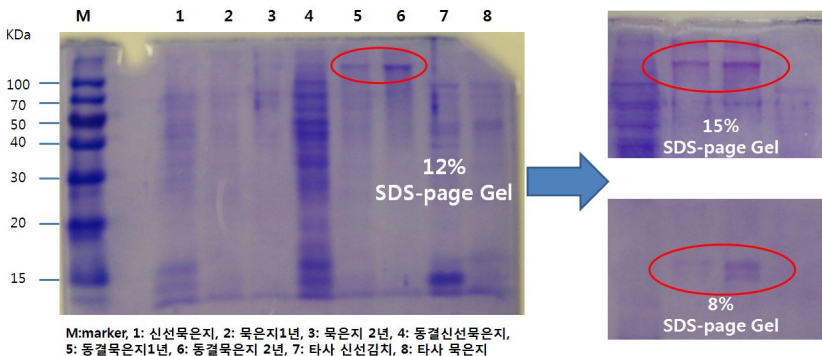


Fig 20. Validation biomarker 탐색을 위한 묵은지 추출액 단백질 분석 gel 사진

(2) Validation marker용 지질계통 화합물의 탐색

(가) 묵은지내의 지질계통 화합물의 분석

동결건조 묵은지 시료(신선 묵은지, 묵은지 1년, 묵은지 2년)를 Campbell and Lueking(1983)이 행한 Bligh and Dyer(1959)의 방법에 따라 지질을 추출하였다.

즉, 분쇄된 동결건조 묵은지 시료 5g에 methanol 20ml을 가하여 vortex mixer로 30초간 혼합시킨 후, chloroform 20ml을 가하여 40초간 vortex mixer로 잘 섞었다. 그 후 원심분리(3000rpm, 5분)하여 상등액(35ml)을 취하여 40℃에서 진공건조시켰다. 건조된 시료에 chloroform 3ml을 가하여 지질 분리를 위한 TLC용 시료로 사용하였다. TLC plate는 silica gel on aluminum(20X20cm, w/UV indicator, SIGMA Co.)을 110℃에서 1시간 활성화 시킨 후 사용하였으며, 전개용매는 chloroform : methanol : DW(65 : 25 : 4)을 사용하여 전개시켰다. 전개 후 실온에서 건조시킨 다음 지질의 발색을 위하여 5% Sulfuric acid(in ethanol)를 분무하고

110℃에서 5~10분간 반응 시켰다.

그 결과, 목은지내 지질화합물의 TLC분석을 통해서 2년 목은지에서만 나타나는 3개의 band를 확인하였다. 3개 band를 validation merker로 활용할 가치가 매우 크다.

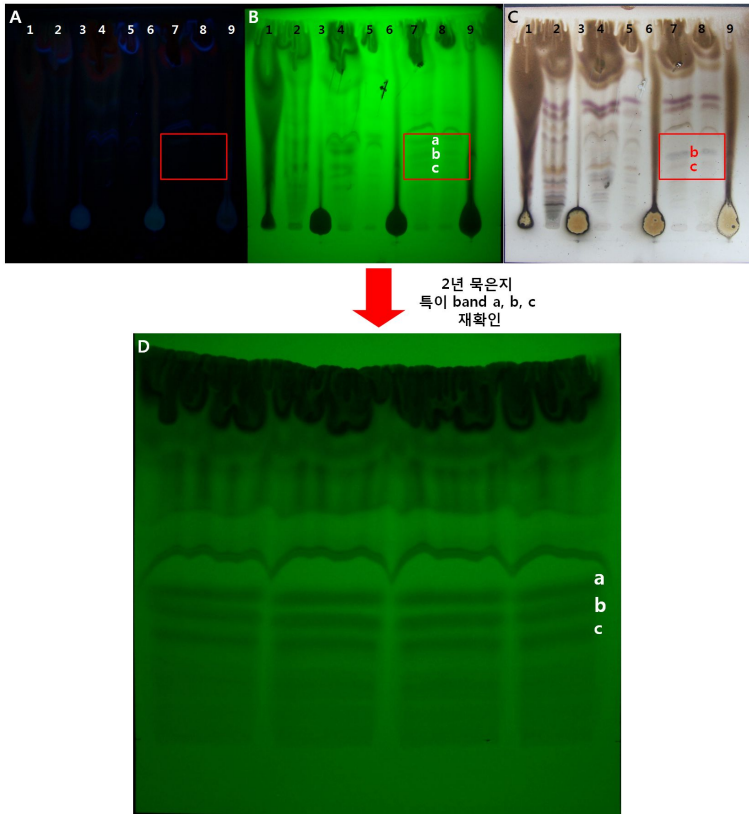


Fig 21. 동결건조 목은지내 지질 분석을 위한 TLC 결과 사진

A : 전개 후 UV(366nm)관찰 사진, B : 전개 후 UV(254nm)관찰 사진, C : 전개 후 발색사진, D : 동결건조 2년 목은지 특이 band 재확인 사진

1 : 동결건조 신선 목은지(chloroform/methanol 추출 농축액), 2 : 동결건조 신선 목은지(chloroform 재추출 농축액), 3 : 동결건조 신선 목은지(methanol 재추출 농축액), 4 : 동결건조 1년 목은지(chloroform/methanol 추출 농축액), 5 : 동결건조 1년 목은지(chloroform 재추출 농축액), 6 : 동결건조 1년 목은지(methanol 재추출 농축액), 7 : 동결건조 2년 목은지(chloroform/methanol 추출 농축액), 8 : 동결건조 2년 목은지(chloroform 재추출 농축액), 9 : 동결건조 2년 목은지(methanol 재추출 농축액), a~c : 2년 차 특이 band(Rf 값 : a : 0.43, b : 0.33, c : 0.28)

(3) 유리 아미노산의 validation marker 및 biomarker로서의 역할

- 목은지내 존재하는 유리 아미노산의 함량을 TLC방법과 HPLC방법을 통하여 조사 분석한 후, validation 및 biomaker로서의 역할을 조명하고자 한다.

(가) 유리 아미노산 분석 방법

① TLC 방법 : 동결건조 김치분말(신선목은지, 1년 목은지, 2년 목은지)들을 5g씩 취하여 유리 아미노산 추출용액(methanol : chloroform : D.W = 12 : 5 : 3) 50ml를 첨가한 후 voltex mixer로 잘 섞었다.

그 후 원심분리한 다음 상등액을 취하여 아미노산 분석용 TLC plate(Silica G)에 100 μ l씩 점적한 후 전개용매(1-butanol : acetic acid : D.W = 80 : 20 : 20)을 이용하여 전개하였다. 전개 후 실온에서 건조시킨 다음, 아미노산의 발색을 위하여 1% ninhydrin / ethanol 용액을 분무한 후 아미노산의 발색을 위하여 110 $^{\circ}$ C에서 5~10분간 반응시켰다.

② HPLC 방법 : 유리아미노산 추출용액에서 준비된 시료를 다음과 같은 조건에서 분석하였다.

□ 유리아미노산 분석

1. 전처리방법

- (1) 시료 약 1ml을 URIPREP 1ml에 희석 후 5분간 방치
- (2) 13,000rpm 10분간 원심분리 후 0.2 μ m PVDF syringe filter로 여과
- (3) Lithium diluent를 사용하여 10배 희석
※ URIPREP 및 Lithium diluent : Pickering(제조사), www.pickeringslabs.com

2. 분석방법

- (1) 사용기기 : Agilent 1100 Series(Maker : Agilent)
- (2) Column : Cation exchange 8 μ m, 3 \times 250mm(Maker : Pickering)
- (3) Column Temp. : 40 $^{\circ}$ C (4) Reactor : PININACLE PCX (Maker : Pickering)
- (5) Reactor temp. : 130 $^{\circ}$ C (6) 분석조건 : 1) Flow rate : 0.3ml/min 2) Mobile phase

③ TLC와 HPLC 병합실험 : TLC 결과 형성된 band를 긁어서 모은 다음 이를 다시 추출한 후 HPLC에 적용하였다. 그 방법은 다음과 같다.

□ 유리아미노산 분석

1. 전처리방법

- (1) 각각의 시료(신선 1 ~ 6) 전량을 URIPREP 1ml에 원탁 후 15분간 초음파 추출
- (2) 13,000rpm 10분간 원심분리 후 0.2 μ m PVDF syringe filter로 여과 후 분석
※ URIPREP : Pickering(제조사), www.pickeringslabs.com

2. 분석방법

- (1) 사용기기 : Agilent 1100 Series (Maker : Agilent)
- (2) Column : Cation exchange 8 μ m, 3 \times 250mm(Maker : Pickering)
- (3) Column Temp. : 40 $^{\circ}$ C (4) Reactor : PININACLE PCX (Maker : Pickering)
- (5) Reactor temp. : 130 $^{\circ}$ C
- (6) 분석조건 : 1) Flow rate : 0.3ml/min 2) Mobile phase

R.W	No	화합물명	1	2	3	4	5	6	테.고
108.1	1	Hydroxyserine	-	-	-	0.16	-	-	-
106.1	2	Serine	-	-	0.71	-	-	-	-
132.1	3	Asparagine	-	0.34	-	-	-	-	-
147.1	4	Glutamic acid	-	-	0.98	0.38	-	-	-
115.1	5	Proline	-	-	1.44	-	-	-	-
76.09	6	Glycine	-	-	0.35	-	-	-	-
101.09	7	Alanine	-	-	0.33	2.81	-	-	-
175.2	8	Citrulline	-	-	0.20	-	-	-	-
117.2	9	Valine	-	-	-	-	1.66	-	-
146.2	10	Methionine	-	-	-	-	0.35	-	-
131.2	11	Isoleucine	-	-	-	-	-	2.88	-
131.2	12	Leucine	-	-	-	-	-	2.02	-
101.2	13	Tyrosine	-	-	-	-	-	0.55	-
106.2	14	Phenylalanine	-	-	-	-	-	1.02	-
103.1	15	Gaba	-	-	-	-	1.11	-	-
162.2	16	Hydroxylysine	0.23	0.35	0.74	0.61	0.79	0.45	-
132.2	17	Ornithine	1.01	-	-	0.01	-	-	-
146.2	18	Lysine	1.33	-	-	-	-	-	-
166.2	19	Histidine	0.76	-	-	-	-	-	-
147.2	20	α -Amino- β -alanine/diisocitric acid	0.69	0.07	0.09	0.06	0.09	0.09	×
계			3.41	0.76	4.05	4.02	3.98	7.00	

(나) 유리 아미노산 분석결과

① TLC 분석결과

- 우선 단백질 구성아미노산들과 기능성 아미노산으로 알려진 GABA, ornithine, citrulline 등 약 17가지 아미노산에 대한 표준 Rf를 구하기 위해 TLC 하였다.(Fig 22.)
- 신선목은지(김치A), 1년 묵은지(김치B), 2년 묵은지(김치C)에 존재하는 유리 아미노산을 TLC방법으로 분석한 결과, 약 6~7 band로 조사되었다.(Fig 23.)

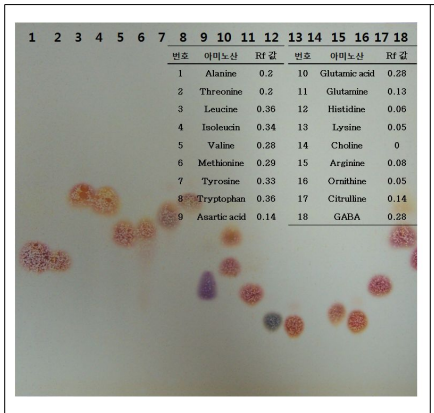


Fig 22. 표준 아미노산들의 TLC

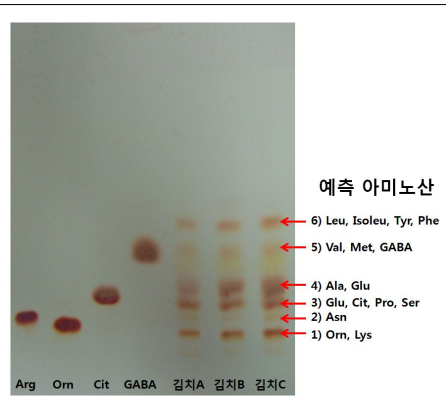


Fig 23. 김치의 유리아미노산에 대한 TLC분석

② HPLC 결과

- 신선목은지, 1년 묵은지, 2년 묵은지내 존재하는 유리아미노산의 총 함량과 조성을 분석한 결과는 다음과 같다(Fig 24, Table 39.)

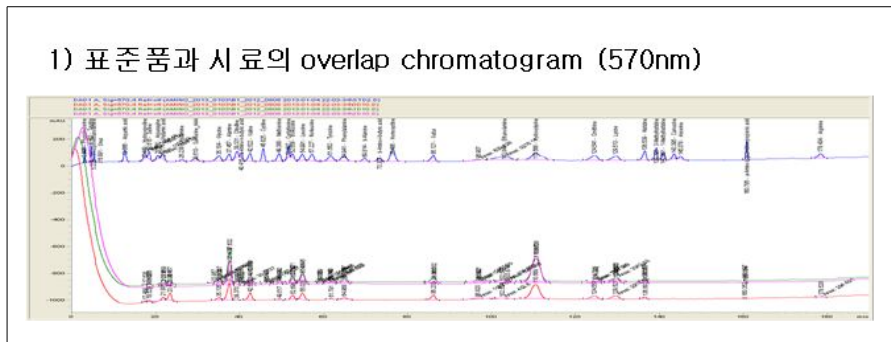


Fig 24. 표준품과 시료의 HPLC chromatograms

Table 39. 유리아미노산 HPLC 분석결과표(신선:김치A, 1년:김치B, 2년:김치C)

M.W.	No	화합물명	신선	1년	2년	비 고
131	1	Hydroxyproline	6.13	3.48	-	
105.1	2	Serine	7.53	6.48	2.88	
147.1	3	Glutamic acid	29.14	45.53	36.82	
115.1	4	Proline	42.89	131.46	61.84	
75.07	5	Glycine	7.44	7.78	7.64	
89.09	6	Alanine	61.39	110.73	87.06	
175.2	7	Citrulline	3.64	2.30	3.57	
103.1	8	α -amino-n-butyric acid	-	3.22	0.62	
117.2	9	Valine	26.86	35.16	28.19	
240.3	10	Cystine	-	0.24	0.17	×
149.2	11	Methionine	3.96	9.53	8.93	
131.2	12	Isoleucine	59.37	77.74	77.73	
131.2	13	Leucine	34.90	51.85	50.02	
181.2	14	Tyrosine	7.89	6.10	12.26	
165.2	15	Phenylalanine	17.19	28.60	26.33	
103.1	16	Gaba	20.10	25.56	11.27	
61.08	17	Ethanolamine	1.66	1.93	1.96	×
162.2	18	Hydroxylysine	74.68	118.58	141.41	△
132.2	19	Ornithine	19.62	0.97	9.76	
146.2	20	Lysine	26.50	30.40	35.21	
155.2	21	Histidine	8.27	11.11	12.17	
147.2	22	α -Amino- β -guanidinopropionic acid	1.09	1.23	1.22	×
174.2	23	arginine	4.13	-	-	
계			464.36	709.99	555.20	

- 유리아미노산의 총량은 역시 신선목은지에 비하여 1년 목은지, 2년 목은지에서 함량이 높았다.
- 유리아미노산의 성분은 1년 목은지, 2년 목은지에서는 hydroxylysine, proline, alanine, isoleucine, leucine, glutamic acid 등의 순으로 존재하였다.
- 유리아미노산의 조성(함량)변화에 있어, 숙성발효기간이 길수록, 즉 신선 1개월 목은지→2년 목은지로 갈수록 함량이 증가하는 아미노산은 hydroxylysine, leucine, histidine으로 나타났다.
- Tyrosine은 신선, 1년 목은지에 비하여 2년 목은지에서 제일 높은 함량(12.26mg/100g)을 나타내었다.
- 이와는 반대로 숙성발효기간이 길수록 함량이 감소하는 아미노산은 hydroxy proline, serine, arginine으로 나타났다.

- 여러가지 기능성이 있는 것으로 알려진 citrulline은 숙성발효기간에 관계없이 비교적 일정한 함량(2.30~3.64mg/100g)을 유지하였다.
Ornithine과 GABA의 경우, 신선목은지에서 각각 19.62mg/100g, 20.10mg/100g의 높은 함량을 보인 반면, 2년 목은지에서는 거의 절반 수준의 함량(9.76mg/100g, 11.27mg/100g)을 나타내었다.
- 특기할 만한 사실로 arginine의 함량은 신선목은지에서만 4.13mg/100g을 보였을 뿐, 1년 목은지와 2년 목은지에서는 검출되지 않았다.
- 신선목은지에 비해 1년 이상된 목은지에서 안정되게 높은 함량을 나타내는 아미노산은 isoleucine, leucine, methionine등 이다.

③ 참고적으로, 유리아미노산들의 기능 및 특징을 요약하면 다음과 같다.

◎유리아미노산의 기능 및 특징

- Hydroxy proline (히드록시 프롤린 ; Hyp)

- 콜라겐에 다량 함유되어 있으며, Hydroxylysine(Hyl)과 함께 콜라겐 대사의 지표 및 단백질 분해의 지표로 이용된다.
- 동물 조직에서 나타나는 총아미노산의 4%를 차지한다.
- Proline이 Prolyl-hydroxylase에 의해 수산화가 되어 (posttranslational modification 되므로서) 콜라겐 fiber의 구조가 안정화된다.
- Hyp이 많은 당단백질들이 식물세포벽에서도 많이 나타난다.

- Proline

- 필수 아미노산이 아니다. glutamic acid로부터 생합성된다.
- 당 고갈시 ATP를 공급하는 에너지원으로 작용할 수 있다.

- Serine(Ser, S)

- 물에는 녹지만, 알코올과 에테르에는 녹지 않는다.
- 명주의 세리신 단백질과 목화 피브로인 단백질에 많이 존재한다.
- 산업적으로 L-Serine은 발효에 의하여 생산되어 진다. (100t ~ 1,000t/yr)
- 세균에서는 glycine, Cysteine과 Tryptophan 등 여러 아미노산과 Sphingolipid, 염산 등의 전구물질로 작용한다. 푸린, 피리미딘 생합성에도 중요한 역할을 한다.
- 많은 protease의 활성부위에 존재한다. 또한 인산화가 이루어지는 단백질 부위의 아미노산이기도 하다.

- Glutamic acid(Glu, E ; 글루탐산)

- 글루탐산은 비 필수 아미노산이다.
- 글루탐산은 뇌과학분야에서 신경전달 물질이며, 학습과 기억과 같은 인지기능에 중요한 역할을 한다.
- 음식의 풍미에 중요한 공헌을 하고 있다.
- MSG(monosodium glutamate)와 같은 염 형태로 식품 첨가제 및 풍미 강화제로 사용되기도 한다.
- 글루탐산으로부터 GAD(Glutamic acid decarboxylase)에 의하여 GABA가 만들어진다.

- Glycine(Gly, G)

- Glycine은 무색의 단맛을 띠고 있다.
- 공업적으로 chloroacetic acid에 암모니아(2NH₃)를 처리하므로서 생산한다. (1,500만 kg/yr)
- 신경전달물질로서 취침전에 3g으로 수면의 질을 향상시킨다.
- 동물 사료의 첨가제로, 사람에게는 단맛 증강제로서 팔리고 있다.
- 의약품 제형화에 첨가하므로서 약물의 장관 흡수를 증진시킨다.
- 또한 화장품, 제산제, 진통제, пам억제제 등에서 완충제(buffering agent)로서 사용되고 있다.
- 2009년에는 외계의 Glycine 존재가 밝혀져, “생명의 씨앗은 우주에 널리 존재한다.”는 “Panspermia 이론”을 지지하는 바탕이 되었다.

- Alanine(Ala, A)

- 알라닌은 많은 단백질 내 아미노산 구성비 측면에서 7.8%를 차지하여 2번째로 많이 나타난다.
- 알라닌은 피루브산의 환원적 아민화 과정을 통해서 일반적으로 생산된다.
- 따라서 해당과정, 포도당 신생, 구연산 회로 등 물질대사 경로에 밀접하게 연관되어 있다.
- 간세포에 ALT(Alanine aminotransferase)에 의해 Alanine과 d-Ketoglutarate가 Glutamic acid와 Pyruvate로 전환되어 Pyruvate는 Glucose로 재생되어 근육으로 되돌리게 된다.
- ALT의 활성수준이 높아지면, II형 당뇨병의 위험이 증가된다.

- Valine(Val, V)

- 필수 아미노산이며 비극성이다. 단백질 구성분 형태로 섭취되어 진다.
- 식물에서 피루브산으로부터 시작하여 여러단계를 거쳐 합성된다.

- Citrulline

- 시트룰린은 라틴어의 수박의 의미를 지닌 Citrullus에서 기원되었다.
- 포유류가 암모니아를 배설하는 경로인 Urea cycle에서 주된 중간 대사 물질이다.
- 시트룰린은 Urea cycle의 중심 반응 중 하나인 Ornithine과 Carbamoyl phosphate로부터 만들어지기도 하고, NOS(Nitrogen Oxide Synthetase) family에 의해 촉매되어진 반응의 부산물로서 Arginine으로부터 만들어지기도 한다.
- 사람에서, 시트룰린의 농도는 장의 기능성 Bio-marker로 사용되고 있다.
- 또한 시트룰린은 혈관을 이완시키는 것으로 알려지고 있다.

- Methionine(Met, M)

- 메티오닌은 Cystein, Carnitine, Taurine, Lecithin, phosphatidylcholine과 다른 여러 인지질들의 생합성 과정에서 중간 대사 산물로 작용한다.
- 사람은 생합성할 수 없는 필수 아미노산이기 때문에, 메티오닌 또는 메티오닌이 함유된 단백질을 섭취하여야만 한다.
- 식물과 미생물에서 메티오닌은 Aspartic acid와 Cysteine을 둘다 사용하는 경로를 통하여 합성되어진다.
- 메티오닌은 달걀, 깨, 견과류, 생선, 고기, 식물의 씨 등에 풍부하게 존재한다.
- 반면에 과일과 채소는 메티오닌 함량이 매우 적다.

- Leucine(Leu, L)

- 필수 아미노산이다.
- 식물과 미생물에서 여러 가지 효소들에 의해 피루브산으로부터 합성된다.
- Leucine은 간, 지방조직, 근육조직에서 이용된다.
- 지방조직과 근육조직에서 Leucine은 Sterol 합성에 사용된다.
- Leu:lle:Val을 2:1:1의 비율로 한 제품은 근육성장의 촉매로서 각광받고 있다.
- Leucine을 쥐의 뇌에 주입시키면, mTOR 경로의 활성을 통하여 음식섭취와 체중이 감소된다는 보고도 있다.

- Phenylalanine(Phe, F)

- 비극성이며 필수 아미노산이다.
- Phenylalanine은 생물학적으로 Tylosine → L-DOPA → Dopamine → Norepinephrine (noradrenaline) → Epinephrine(adrenaline) 등으로 전환되어 진다. Dopamine, Norepinephrine, Epinephrine 들은 Catecholamine으로 잘 알려져 있다.
- 식물에서 페닐알라닌(Phe)은 flavonoid 생합성 과정의 시작 물질이기도 하다.

- Ornithine(Orn)

- 오르니틴의 피로회복 기능은 에너지 소비를 효율적으로 하고 암모니아의 배출을 증진시키기 때문이다.
- 스트레스를 완화시키고, 간경화에 오르니틴과 아스파르트산의 염 형태(LOLA)로 활용된다.
- 성장호르몬 수준을 높이므로 육체미선수, 역도선수가 자주 이용한다.
- 칼슘 흡수

- r-Aminobutyric acid(GABA)

- 신경전달물질로서, GABA는 척추동물의 경우 원형질막에 있는 특이적 transmembrane receptor에 결합하므로써 뇌에 있는 억제 시냅스에 작용한다.
- 이러한 결합으로 인해서, 음전하를 띤 Cl⁻ 이온을 세포안으로 유입되게 하거나 양전하를 띤 K⁺ 이온을 세포 밖으로 내보내게 하는 ion channel을 열도록 만든다.
- 이러한 작용에 의하여 transmembrane potential(막전위차)에 있어 고극화(Hyperpolarization) 현상이 나타나게 된다.
- GABA receptor는 일반적으로 두가지 부류가 알려져 있다.
GABA_A receptor는 Ligand gated ion channel 복합체의 일부이며, GABA_B receptor는 G-protein에 의해 ion channel이 열리거나 닫히는 metabotropic receptor(Gprotein-coupled receptor)이다.

- Isoleucine(Ile, I)

- 동물에서 합성되지 못하는 필수 아미노산이다.
- 식물과 미생물에서 피루브산과 d-Ketoglutarate로부터 시작되어 여러단계를 거쳐 합성된다.
- 동물에서 합성이 안된다 할지라도, 동물은 고탄량으로 가지고 있다. 따라서 이소류이신(Ile)은 달걀, 콩 단백질, 해조류, 닭, 치즈, 생선 등에 많이 존재한다.

- Lysine(Lys, K)

- 필수 아미노산이다.
- 많은 단백질의 Lysine 잔기에 Methylation, Acetylation, Ubiquitination 등 번역 후 변형 과정에 관련되고 있으며, 특히 콜라겐에서 Lysylhydroxylase에 의해 Lysine이 Hydroxylysine 상태로 존재하기도 한다.
- 식물과 미생물에서는 aspartic acid로부터 합성되어진다.
- 성인은 몸무게 기준 30mg/kg 수준으로 하루에 섭취하는 것을 권장하고 있다.
- 영아(3~4개월)는 103mg/kg, 유아(2년)는 64mg/kg이 하루 필요량이다.
- Lysine은 동물사료에 중요하여 700,000t 규모의 시장을 형성한다.
- Lysine은 산업적으로 미생물 발효를 통하여 생산되고 있다.

- Histidine(His, H)

- 필수 아미노산이며 효소들의 촉매부위에 중요한 역할을 한다.
- Histidine이 히스타민으로의 전환은 Histidine decarboxylase에 의해 이루어진다.
- 방선균류, 사상진균류에서 히스티딘은 항산화제인 ergothioneine으로 전환될 수 있다.
- 히스티딘은 아연(Zn) 배출 속도를 3~6배 빠르게 촉진한다.

- Arginine(Arg, R)

- 반 필수 아미노산으로 발생단계나 건강상태에 따라 필수, 비필수적이다
- ND 합성을 유지하는 데 시트룰린이 알기닌을 대신 할 수 있다.
- 알기닌은 세포분열, 상처치유, 암모니아 제거, 면역기능, 호르몬 방출 등에 중요하다.

- Hydroxylysine(Hyl)

- 히드록시라이신은 단백질 분해의 지표이다.
- 프롤린과 라이신에 수산기(-OH)를 붙이는 과정에 비타민C가 필요하다.
- 척추동물에서는 히드록시프롤린과 함께 콜라겐 등에서 나타나며, 세균류에서도 나타난다.
- 수산화된 라이신과 프롤린을 통해 교차결합되므로 안정된 콜라겐이 만들어진다.
- Adiponectin 호르몬의 콜라겐성 부위에 있는 4개의 Lysine에 수산화, 당화과정이 일어나면, Adiponectin의 insulin-sensitizing 능력이 높아지게 된다. (Y. Wang et al.2002)

- Tyrosine(Tyr, T)

- 티로신은 갑상선에 존재하고, 페닐알라닌으로부터 생체 내에서 생성되며 산화적 분해는 2가지 경로가 있다.
- 하나는 푸마르산 및 아세트 아세트산으로 분해되고, 다른 한 경로는 티로시나제에 의해 도파가 되고 그 후 아드레날린을 생성하는 경로로 분해된다.
- 티로신이 부족하면 체온이 떨어지고 혈압이 떨어지며, 심한 경우 다리가 떨리고 식은 땀을 흘린다.
- 티로신은 뇌의 기능을 도와 우울증 상태를 완화시키기도 한다.
- 티로신은 신경호르몬의 양을 증가시키고, 파킨슨씨 병에도 이용되며, 피부와 머리카락에 중요한 멜라토닌 색소 역시 티로신의 영향을 받는다.
- 참고로 캐나다 건강식품 쇼핑몰의 L-Tyrosine(250mg) 제품도 있다.
- 효능으로 항우울작용, 무관심·무기력·나른함 과 같은 우울증이나 흥분, 긴장 증세에 트립토판과 같이 병용하면 효과가 있다. 갑상선 호르몬 생성, 갑상선 기능 저하증 치료, 식욕저하작용, 체지방 감소작용, 저혈압·저체온증 치료에 효과가 있다.

④ TLC와 HPLC 병합실험 결과

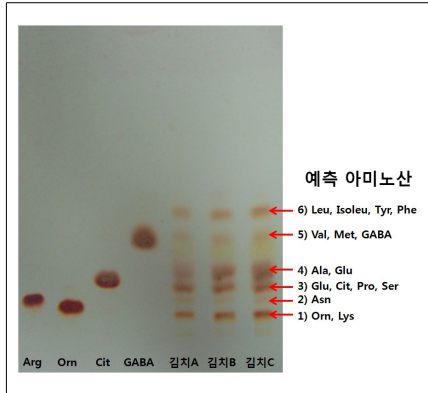


Fig 25. 김치의 유리아미노산에 대한 TLC분석

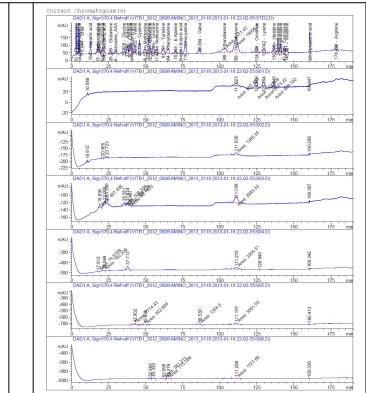


Fig 26. HPLC chromatogram

Table 40. HPLC 분석결과

M.W.	No	화합물명	1	2	3	4	5	6	비고
131	1	Hydroxyproline	-	-	-	0.16	-	-	
105.1	2	Serine	-	-	0.71	-	-	-	
132.1	3	Asparagine	-	0.34	-	-	-	-	
147.1	4	Glutamic acid	-	-	0.98	0.38	-	-	
115.1	5	Proline	-	-	1.44	-	-	-	
75.07	6	Glycine	-	-	0.35	-	-	-	
89.09	7	Alanine	-	-	0.33	2.81	-	-	
175.2	8	Citrulline	-	-	0.20	-	-	-	
117.2	9	Valine	-	-	-	-	1.66	-	
149.2	10	Methionine	-	-	-	-	0.35	-	
131.2	11	Isoleucine	-	-	-	-	-	2.88	
131.2	12	Leucine	-	-	-	-	-	2.02	
181.2	13	Tyrosine	-	-	-	-	-	0.55	
165.2	14	Phenylalanine	-	-	-	-	-	1.02	
103.1	15	Gaba	-	-	-	-	1.11	-	
162.2	16	Hydroxylysine	0.23	0.35	0.74	0.61	0.79	0.45	
132.2	17	Ornithine	1.01	-	-	0.01	-	-	
146.2	18	Lysine	1.33	-	-	-	-	-	
155.2	19	Histidine	0.76	-	-	-	-	-	
147.2	20	α -Amino- β -guanidinopropionic acid	0.09	0.07	0.09	0.06	0.09	0.08	×
		계	3.43	0.76	4.85	4.02	3.99	7.00	

(다) 유리아미노산의 biomaker 도출 및 활용 방안

- TLC 결과와 HPLC결과 및 병합실험 결과 그리고 유리아미노산의 기능 및 특징을 토대로 정리해 보면,
- 본 연구결과는 여러 가지 validation biomarker를 도출 할 수 있었다.

① 첫째, hydroxylysine의 함량이 신선목은지, 1년 목은지, 2년 목은지로 갈수록 높은 함량을 보인 점에서 단백질분해지표로 사용되는 hydroxylysine 함량을 목은김치의 validation marker로 활용할 수 있을 것으로 판단할 수 있었다.

② 둘째, 여러가지 생리활성을 보이는 아미노산 중 tyrosine 함량 역시 2년 목은지에 많이 존재하므로, 2년 목은지의 다양한 생물기능성에 tyrosine의 역할이 기대되어, II형 당뇨병과 관련한 IRS(Insulin Receptor Substrate)유전자의 발현등과 연계한 실험을 진행하였다.(제2세부과제와 연계하여 수행하였음)

그 결과 놀랍게도 tyrosine은 IRS 발현을 매우 강하게 유도하며 II형 당뇨병의 insulin resistance 현상을 insulin에 sensitive하게 반응하도록 도와주는 결과를 나타냈다.

이로써 tyrosine의 기능성을 IRS 발현증진소재로서 처음 제시할 수 있었다.

③ 셋째, 다양한 기능을 지니고 있는 ornithine과 GABA도 IRS와 연계하여 조사실험하였는데 IRS 발현증진효과에있어 오르니틴은 전혀 영향을 미치지 않았고 GABA는 매우 미미하였다.

④ 넷째, 본 연구에 사용된 신선, 1년, 2년 목은지에서 citrulline 함량은 비교적 소량 존재하였으나, citrulline의 다양한 기능성을 감안하여 IRS 발현증진과 관련한 실험을 진행한 결과 tyrosine과 비슷한 수준으로 IRS 발현증진 효과를 보였다.

이로써 citrulline의 기능성도 IRS 발현증진소재로서 새롭게 규명되었다. 이는 여러 가지 기초연구분야에도 커다란 기여를 할 것이다.

⑤ 다섯째, arginine 함량은 신선목은지에서만 미량(4.13mg/100g) 존재하고 1년 이상된 목은지에서는 전혀 검출되지 않았다.

이는 1년 이상 목은지에서 Arg→Orn, Cit으로 생전환하는 능력이 높은 미생물들에 의한 것으로 예측되어, arginine 함량 역시 목은지의 validation 지표로서 활용 할 수 있다고 생각된다.

⑥ 여섯째, 유리아미노산 중 비교적 높은 함량을 보이고, 물질대사고정에 폭 넓게 관여하는 proline, alanine, leucine, isoleucine, valine, phenylalanine, lysine 등은 모두 1년 이상 목은지에서 더 많은 함량을 보이므로서 목은지는 유리 아미노산의 보고라 할 수 있겠다.

이들 아미노산의 기본적 기능과 특징을 고려해 볼 때 목은지는 건강유지, 질병회복 등에 큰 도움을 줄 것으로 생각된다.

바) 기능성물질(ornithine, citrulline, GABA 등)의 bioconversion연구

(1) 기능성물질(ornithine, citrulline, GABA 등)의 bioconversion에 대한 연구 방법

기능성물질(ornithine, citrulline, GABA)의 bioconversion에 대한 연구는 TLC(Thin Layer Chromatography)에 적용하여 분석연구 하였다.

TLC에 적용하기 위하여 선택된 각각의 미생물을 1차적으로 MRS(*Lactobacillus* 속), TYE(*Bacillus* 속) 액상 배지에 2day 동안 전 배양 후 다음과 같이 준비된 실험용 조건배지에 100 μ l씩 접종 후 28 $^{\circ}$ C에서 50h 배양하여 TLC분석용 시료를 준비하였다.

Table 41. 기본 복합배지 및 최소배지 조성

액체배지	조성 / L (단, 고체배지는 agar 20g/L 첨가)			
MRS	Proteose Peptone No.3	10.0g	Ammonium Citrate	2.0g
	Beef Extract	10.0g	Sodium Acetate	5.0g
	Yeast Extract	5.0g	Magnesium Sulfate	0.1g
	Dextrose	20.0g	Manganese Sultrate	0.05g
	Polysorbate 80	1.0g	Dipotassium Phosphate	2.0g
TYE	Tryptone	15.0g	Sodium chloride	8.0g
	Yeast Extract	5.0g		
Minimal Medium (M)	Glucose	15.0g	MgSO ₄	0.25g
	KH ₂ PO ₄	0.25g	KCl	0.12g
	Ca(NO ₃) ₂	1.0g	FeCl ₃	trace

Table 42. TLC 분석용 시료를 위한 균주별 본 배양 조건(실험용 조건배지 및 배양조건)

접종 균주	배지 구성	비고
젖산균류	- MRS, MRS+ Arg(0.1%), MRS+ Glu(0.1%)	28 $^{\circ}$ C/50h 배양 Arg : Arginine Glu : Glutamic acid MRS : 젖산균용 복합배지 TYE : <i>Bacillus</i> 속 등 일반균주용 복합배지
	- M, M+ Arg(0.1%), M+ Glu(0.1%)	
<i>Bacillus</i> 속	- TYE, TYE+ Arg(0.1%), TYE+ Glu(0.1%)	M : 최소배지 (Minimal medium)
	- M, M+ Arg(0.1%), M+ Glu(0.1%)	

상기와 같은 실험용 조건배지에서 배양되어진 본 배양액(sup+ cell / 500ul)자체와 배양액(500ul)을 원심분리하여 상등액(sup), 세포(cell)로 시료를 준비한 후 각각의 배양액(sup+ cell), 상등액(sup), 세포(cell) 시료에 유리아미노산 추출용 용매조성비(methanol : chloroform : D.W = 12 : 5 : 3)가 되도록 5ml을 처리하였다. 시료를 vortex mixer로 잘 섞었다. 그 후 원심분리(3000rpm 5분)하여 상등액을 취하여 아미노산분석용 TLC plate(silica G)에 100ul씩 점적 한 후 전개용매(1-butanol : acetic acid : D.W = 80 : 20 : 20)를 이용하여 전개 하였다. 전개 후 실온에서 건조시킨 다음, 아미노산의 발색을 위하여 1% ninhydrin/ethanol 용액을 조제하여 분무 후 110℃에서 5~10분간 반응 시켰다

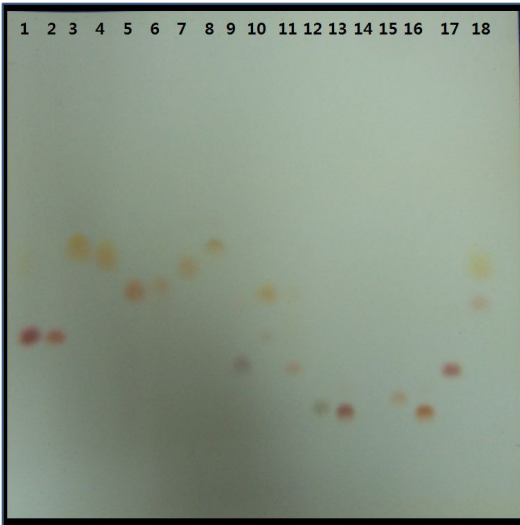
(2) Ornithine, citrulline, GABA 생물전환(bioconversion) 실험

실험에 사용된 균주들은 총 16균주인데, 실험실에서 보유한 균주들(LKS 2, LKS LKS 42, LKS 49, LKS 26, LKS 28)과 본 연구에서 새롭게 분리동정된 균주들 11종(KA 5, KA 8, KA 9, KA 11-2, KA 35, KA 71, KA 94, KA 15, KA 20, KA 21, KA 24)들이다.(Table 43)

Table 43. ornithine, citurulline, GABA 생성능 확인실험에 사용된 균주 목록

Strains	Scientific Name	Strains	Scientific Name
LKS 2	<i>Weissella kimchii</i>	KA 71	<i>Pediococcus inopinatus</i>
LKS 42	<i>Weissella koreensis</i>	KA 94	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
LKS 49	<i>Lactococcus lactis</i> sub sp.	LKS 26	<i>Bacillus methylotrophicus</i>
KA 5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	LKS 28	<i>Bacillus aryabhatai</i>
KA 8	<i>Lactobacillus sakei</i>	KA 15	<i>Bacillus megaterium</i>
KA 9	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	KA 20	<i>Bacillus megaterium</i>
KA 11-2	<i>Lactobacillus sakei</i>	KA 21	<i>Bacillus megaterium</i>
KA 35	<i>Lactobacillus casei</i>	KA 24	<i>Bacillus megaterium</i>

TLC 실험에 참고자료가 되는 표준공시 아미노산의 종류와 Rf값은 다음과 같다.(Fig 27.)



번호	아미노산	Rf 값
1	Alanine	0.2
2	Threonine	0.2
3	Leucine	0.36
4	Isoleucin	0.34
5	Valine	0.28
6	Methionine	0.29
7	Tyrosine	0.33
8	Tryptophan	0.36
9	Asartic acid	0.14
10	Glutamic acid	0.28
11	Glutamine	0.13
12	Histidine	0.06
13	Lysine	0.05
14	Choline	0
15	Arginine	0.08
16	Ornithine	0.05
17	Citrulline	0.14
18	GABA	0.28

Fig 27, 18종 표준 아미노산 TLC 결과(2 μ g 점적)

(3) 균주별 biococonversion능 확인 실험 결과

(가) 균주 LKS 49(*Lactococcus lactis* sub. sp.)를 MRS(lane1), MRS+ Arg(lane2), MRS+ Glu(lane3)와 같은 복합배지에 선발된 균주(*Lactococcus lactis* LKS49)를 접종 배양했을 때, lane4(MRS), lane5(MRS+ Arg)와 lane6(MRS+ Glu)에서 보듯이 첨가된 아르기닌(Arg)이 100% 오르니틴(Orn)으로 bioconversion(lane5)되는 것을 확인할 수 있었다.(Fig 28-A)

특기할 만한 일로 생전환된 Orn을 세포밖 배양액으로 방출하는지, 세포내에 축적하는지도 조사하였다.

Lane7(MRS에 LKS 49 균주 접종 배양 상등액), lane8(MRS+ Arg 첨가 배지에 LKS 49균주 접종 배양액 상등액), lane9(MRS+ Glu 첨가배지에 LKS49 균주 접종배양 상등액)에서 보듯이 배양액으로 생전환된 오르니틴을 일부 방출(lane8)하였다. 그리고 lane10(MRS에 배양 후 침전시킨 LKS49 균주 세포), lane11(MRS+ Arg 배지에서 배양 후 침전시킨 LKS49균주 세포), lane12(MRS+ Glu 첨가배지에서 배양 후 침전시킨

LKS49균주세포)에서 보듯이 세포내에서도 과량 축적되는 것을 알 수 있었다.(Fig 28-A)

* 최소배지에서 수행한 생전환 실험 경우, lane1~12(B : a, b, c, d)들의 시료들은 공히 복합배지 대신 최소배지를 사용한 것만 다르다. 그 결과 최소배지에서도 100% 생물전환(Arg → Orn)이 이루어지는 것(lane5)을 알 수 있었다.(Fig 28-B)

(나) 균주 KA94 *Pediococcus pentosaceus*의 경우, MRS(lane1), MRS+ Arg(lane2), MRS+ Glu(lane3)와 같은 복합배지에 선발된 균주(*Pediococcus pentosaceus* KA94)를 접종 배양했을 때, lane4(MRS), lane5(MRS+ Arg)와 lane6(MRS+ Glu)에서 보듯이 첨가된 Arg이 생물전환(Arg→Orn)이 일어나고 있음을 알 수 있었다(A-lane5).

특기할 만한 일로 생전환된 Orn을 세포밖 배양액으로 방출하는지, 세포내에 축적하는지를 조사하였다.

Lane7(MRS에 KA 94 균주 접종 배양 상등액), lane8(MRS+ Arg 첨가 배지에 KA 94균주 접종 배양액 상등액), lane9(MRS+ Glu 첨가배지에 KA 94 균주 접종배양 상등액)에서 보듯이 배양액으로 생전환된 오르니틴을 일부방출(A-lane8)되는 것보다 lane10(MRS에 배양 후 침전시킨 KA94 균주 세포), lane11(MRS+ Arg 배지에서 배양 후 침전시킨 KA94균주 세포), lane12(MRS+ Glu 첨가배지에서 배양 후 침전시킨 KA94균주세포)에서 보듯이 세포내에 보다 많이 축적(A-lane11)됨을 알 수 있었다. 복합배지뿐만 아니라, 최소배지에서도 생물전환이 거의 100% 일어남을 알 수 있다.(B-lane5)(Fig 29).

(다) 균주 LKS28 *Bacillus aryabhatai*의 경우 Fig 25에서 보여 주듯이 TYE(lane1), TYE+ Arg(lane2), TYE+ Glu(lane3)와 같은 복합배지에 선발된 균주(*Bacillus aryabhatai* LKS28)를 접종 후 50h 배양했을 때, lane4(TYE), lane5(TYE+ Arg)와 lane6(TYE+ Glu)에서 나타난 바와 같이 복합배지에서는 생물전환이 관찰이 미약하였으나(A-lane5), 매우 특이하게 최소배지에서 생물전환이 매우 잘 일어남을 알 수 있었다.(B-lane5)(Fig 30)

(라) 균주 KA 21 *Bacillus megaterium* 과 KA24 *Bacillus megaterium*의 경우 Fig26, Fig27에서 보여 주듯이 TYE(lane1), TYE+ Arg(lane2), TYE+ Glu(lane3)와 같은 복합배지에 선발된 균주(*Bacillus megaterium* KA21/24)를 접종 배양했을 때, lane4(TYE), lane5(TYE+ Arg)와 lane6(TYE+ Glu)에서 보듯이 복합배지에서는 세포에 축적(A-lane11)되고 최소배지에서 생물전환(80%이상)이 활발하게 진행(B-lane5)되는 것을 볼 수 있었다(Fig 31, 32).

이러한 생전환능 확인 실험 결과는 획기적인 성과로서

① 아르기닌(Arg)→오르니틴(Orn)으로의 생전환용 배지를 복합배지 대신 저비용 최소배지(100배 이상 저렴)로 제조할 수 있다.

② 또한 생전환(Arg→Orn) 효율도 복합배지 못지않게, LKS 49와 KA 94균주의 경우 최소배지에서도 100% 생전환 효율을 보이므로서 저비용·고생산 공정을 제공하였다.

③ 따라서 균주(*Lactococcus lactis* LKS49, *Pediococcus pentosaceus* KA94, *Bacillus aryabhattai* LKS28 *Bacillus megaterium* KA 21/KA 24)들 자체 특성이 생전환능(Arg→Orn), 불용성염가용화능, 항균활성능 등 다양한 기능을 가지므로서 다양한 방면(사료, 미생물제제, 생물비료, 생균제, 화장품, 식품, 의약품, 환경보전제 등)에서 활용될 수 있다는 점이 매우 중요하다.

즉, 이 균주들을 실제 저비용·고효율적 생전환(Arg→Orn)공정을 위해 저비용·최소배지에서 적용했을 때 매우 탁월한 고생산성·고효율성을 나타낸 점 역시 응용측면에서 매우 중요하였다.

④ 뿐만 아니라 최소배지에서 생전환(Arg→Orn)이 100% 이루어 지므로서, 최종 목표 생전환 산물인 고가의 기능성 오르니틴(Orn)을 매우 쉽게 분리·수확·정제할 수 있다는 점이다.

시간적, 경제적 측면뿐 아니라 기술적으로도 최종산물을 쉽게 획득할 수 있음은 본 연구의 또 다른 장점이다.

Table 44. Fig 23, 24의 설명표(유리아미노산 분석용 TLC시료 배양조건)

도면	Lane No.	배지조성	배양조건	비고
A	Lane 1	MRS 배지	접종 전	배지원액
	Lane 2	MRS+ Arg(0.1%) 첨가배지		
	Lane 3	MRS+ Glu(0.1%) 첨가배지		
	Lane 4	MRS 배지	접종 후 (균주 LKS 49 또는KA 94를 28℃에서 50h 배양)	sup(배양상등액) + Cell(세포)
	Lane 5	MRS+ Arg(0.1%) 첨가배지		
	Lane 6	MRS+ Glu(0.1%) 첨가배지		
	Lane 7	MRS 배지	접종 후 (균주 LKS 49 또는KA 94를 28℃에서 50h 배양)	sup(배양상등액)
	Lane 8	MRS+ Arg(0.1%) 첨가배지		
	Lane 9	MRS+ Glu(0.1%) 첨가배지		
	Lane 10	MRS 배지	접종 후 (균주 LKS 49 또는KA 94를 28℃에서 50h 배양)	cell(세포)
	Lane 11	MRS+ Arg(0.1%) 첨가배지		
	Lane 12	MRS+ Glu(0.1%) 첨가배지		
B	Lane 1	M 배지	접종 전	배지원액
	Lane 2	M+ Arg(0.1%) 첨가배지		
	Lane 3	M+ Glu(0.1%) 첨가배지		
	Lane 4	M 배지	접종 후 (균주 LKS 49 또는KA 94를 28℃에서 50h 배양)	sup(배양상등액) + Cell(세포)
	Lane 5	M+ Arg(0.1%) 첨가배지		
	Lane 6	M+ Glu(0.1%) 첨가배지		
	Lane 7	M 배지	접종 후 (균주 LKS 49 또는KA 94를 28℃에서 50h 배양)	sup(배양상등액)
	Lane 8	M+ Arg(0.1%) 첨가배지		
	Lane 9	M+ Glu(0.1%) 첨가배지		
	Lane 10	M 배지	접종 후 (균주 LKS 49 또는KA 94를 28℃에서 50h 배양)	cell(세포)
	Lane 11	M+ Arg(0.1%) 첨가배지		
	Lane 12	M+ Glu(0.1%) 첨가배지		

<LKS 49 *Lactococcus lactis* sub sp.의 bioconversion>

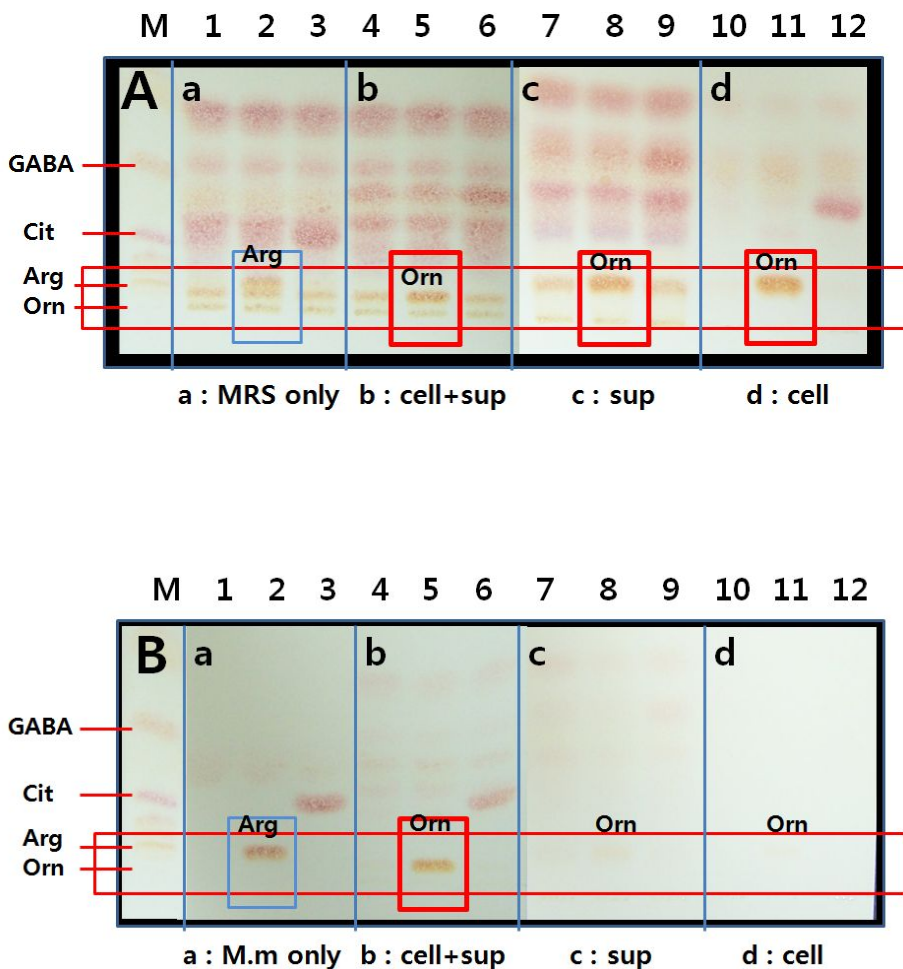


Fig 28. TLC chromatograms of amino acid profiles

A: on complex medium, B: on minimal medium

<KA 94 *Pediococcus pentosaceus*의 bioconversion>

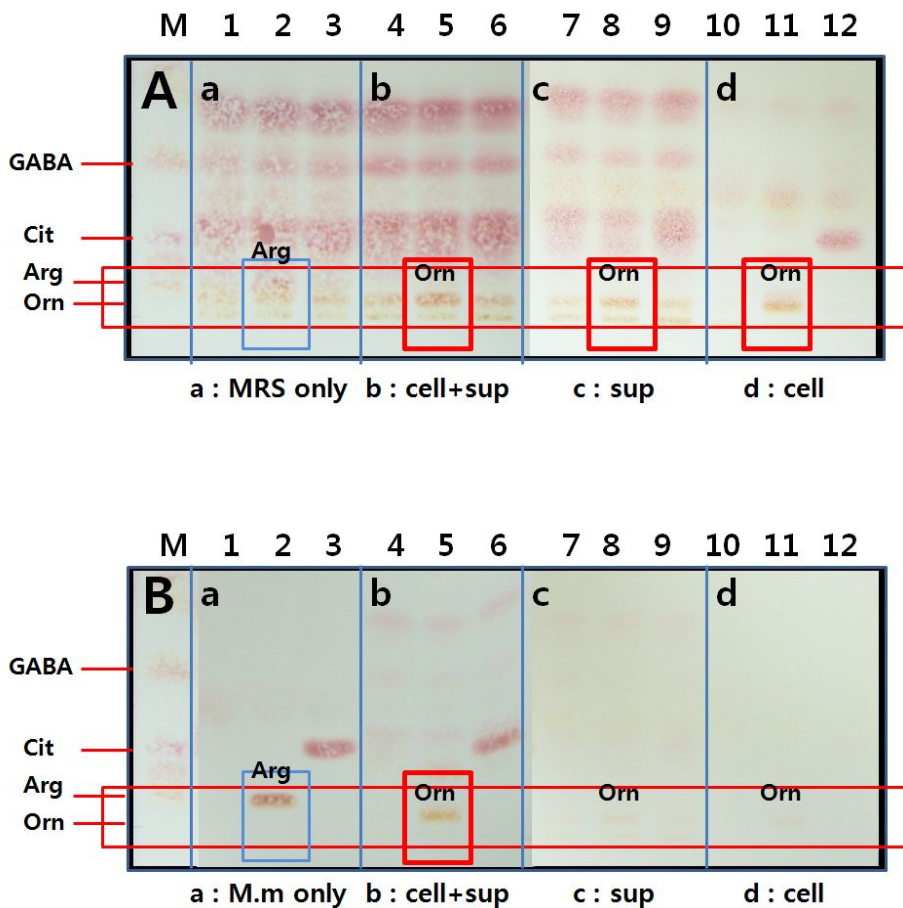


Fig 29. TLC chromatograms of amino acid profiles

A: on complex medium, B: on minimal medium

Table 45. Fig 25, 26, 27의 설명표(유리아미노산 분석용 TLC시료 배양조건)

도면	Lane No.	배지조성	배양조건	비고
A	Lane 1	TYE 배지	접종 전	배지원액
	Lane 2	TYE+ Arg(0.1%) 첨가배지		
	Lane 3	TYE+ Glu(0.1%) 첨가배지		
	Lane 4	TYE 배지	접종 후 (균주 LKS 28 또는 KA21/24을 28℃에서 50h 배양)	sup(배양상등액) + Cell(세포)
	Lane 5	TYE+ Arg(0.1%) 첨가배지		
	Lane 6	TYE+ Glu(0.1%) 첨가배지		
	Lane 7	TYE 배지	접종 후 (균주 LKS 28 또는 KA21/24을 28℃에서 50h 배양)	sup(배양상등액)
	Lane 8	TYE+ Arg(0.1%) 첨가배지		
	Lane 9	TYE+ Glu(0.1%) 첨가배지		
	Lane 10	TYE 배지	접종 후 (균주 LKS 28 또는 KA21/24을 28℃에서 50h 배양)	cell(세포)
	Lane 11	TYE+ Arg(0.1%) 첨가배지		
	Lane 12	TYE+ Glu(0.1%) 첨가배지		
B	Lane 1	M 배지	접종 전	배지원액
	Lane 2	M+ Arg(0.1%) 첨가배지		
	Lane 3	M+ Glu(0.1%) 첨가배지		
	Lane 4	M 배지	접종 후 (균주 LKS 28 또는 KA21/24을 28℃에서 50h 배양)	sup(배양상등액) + Cell(세포)
	Lane 5	M+ Arg(0.1%) 첨가배지		
	Lane 6	M+ Glu(0.1%) 첨가배지		
	Lane 7	M 배지	접종 후 (균주 LKS 28 또는 KA21/24을 28℃에서 50h 배양)	sup(배양상등액)
	Lane 8	M+ Arg(0.1%) 첨가배지		
	Lane 9	M+ Glu(0.1%) 첨가배지		
	Lane 10	M 배지	접종 후 (균주 LKS 28 또는 KA21/24을 28℃에서 50h 배양)	cell(세포)
	Lane 11	M+ Arg(0.1%) 첨가배지		
	Lane 12	M+ Glu(0.1%) 첨가배지		

<LKS 28 *Bacillus aryabhatai* bioconversion>

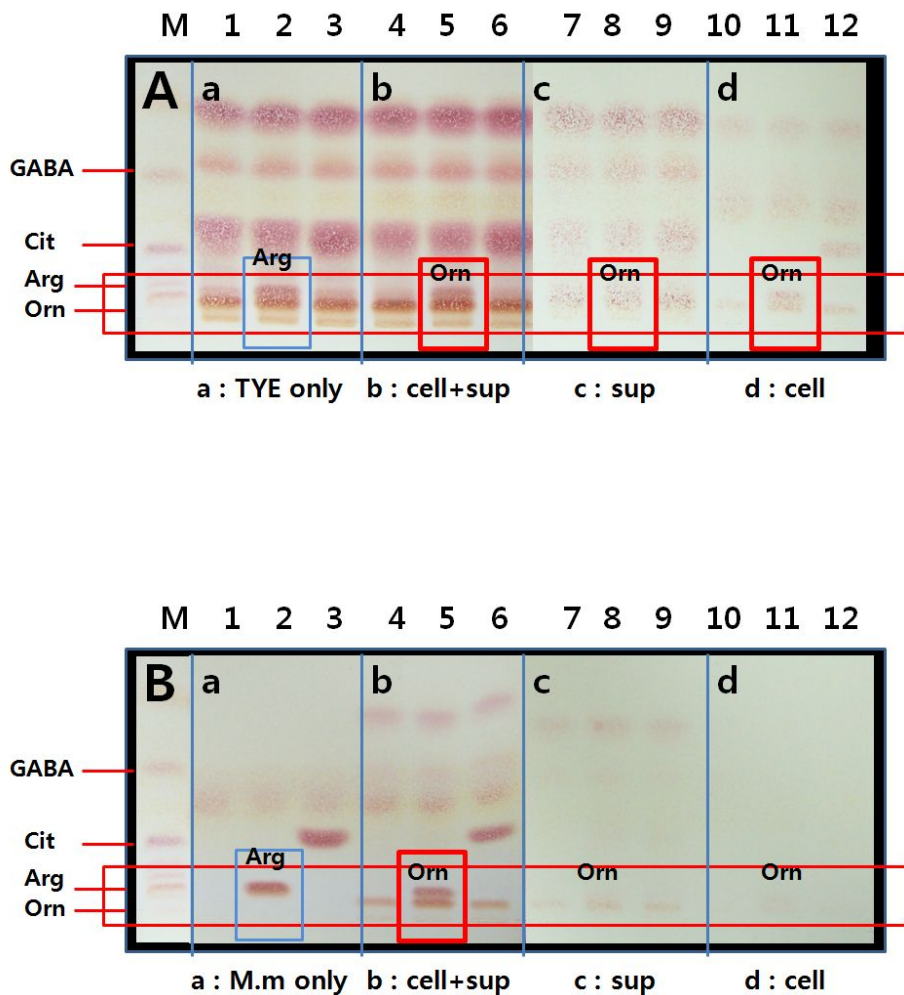


Fig 30. TLC chromatograms of amino acid profiles

A: on complex medium, B: on minimal medium

<KA 21 *Bacillus megaterium* bioconversion>

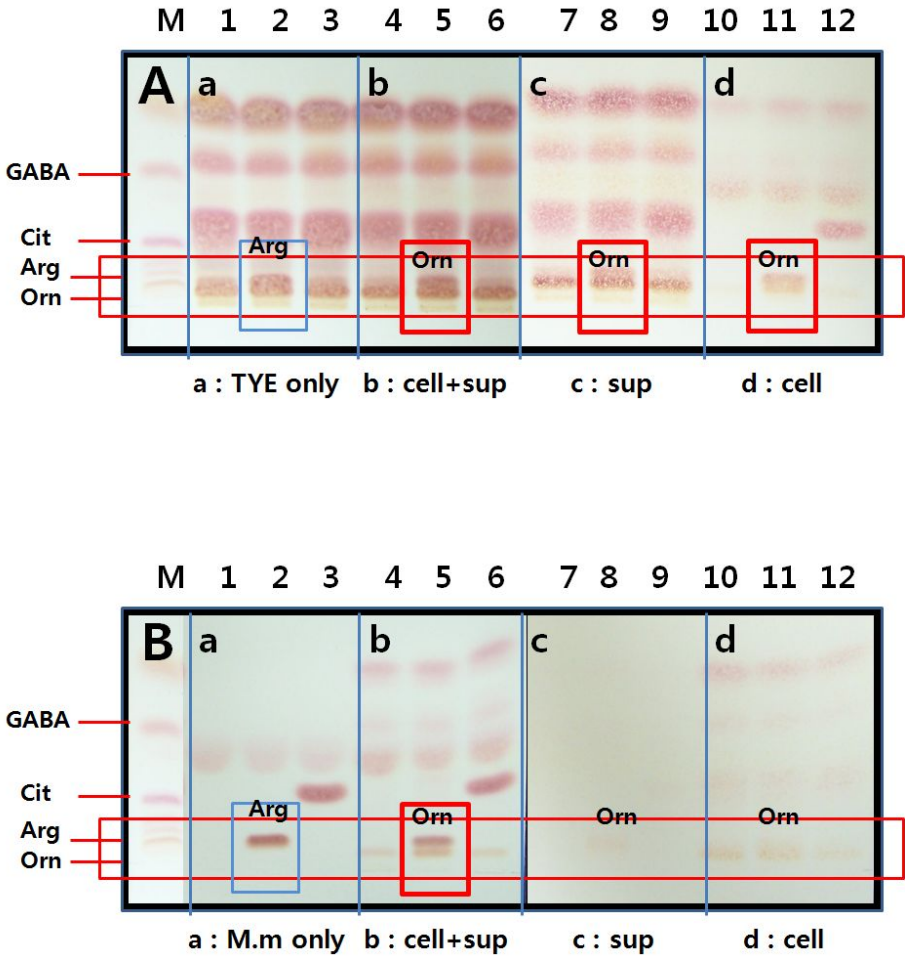


Fig 31. TLC chromatograms of amino acid profiles

A: on complex medium, B: on minimal medium

<KA 24 *Bacillus megaterium*의 bioconversion>

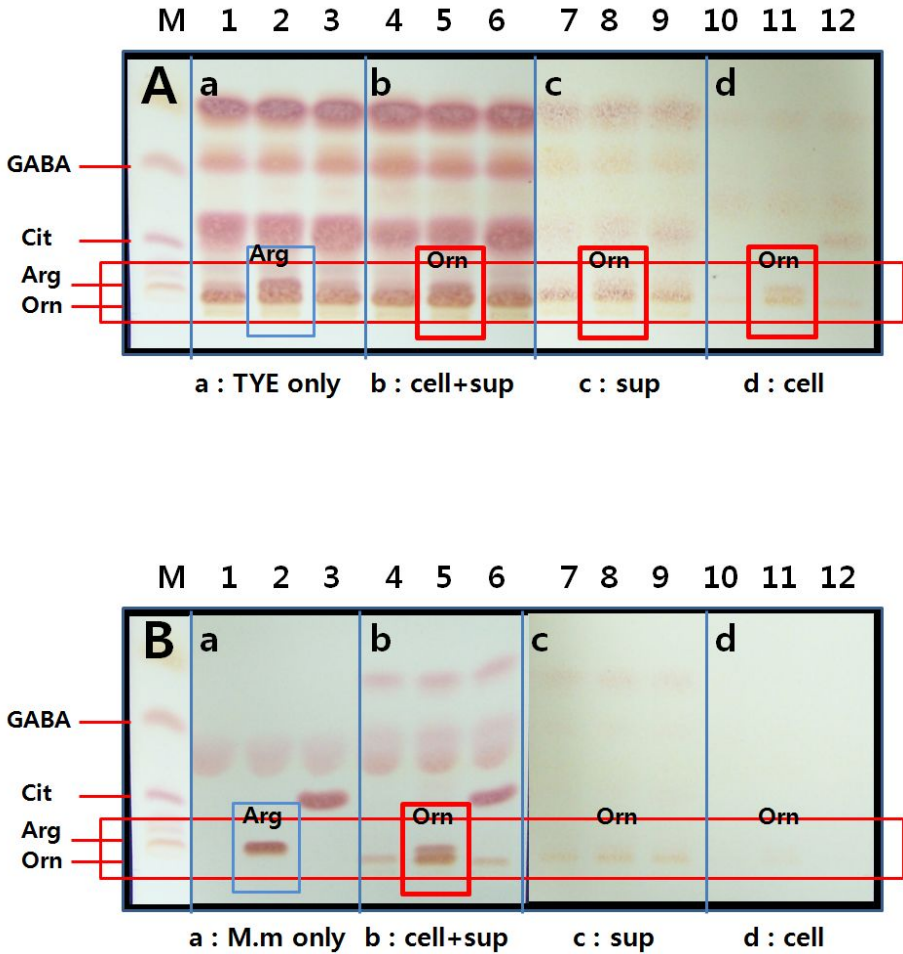


Fig 32. TLC chromatograms of amino acid profiles

A: on complex medium, B: on minimal medium

6) 항균 물질 분석

김치 유산균 가운데에는 유산 그 자체를 비롯하여 박테리오신, 루테린 등 중요한 항균물질을 분비하는 유산균들이 많다. 연구실에서 보유하고 있는 수백종의 세균 및 진균에 대해 목은지가 이들에 대한 항균활성능 보유 여부를 파악하고, 새로운 항균물질의 탐색을 수행한다.

본연구진의 연구실에서 이미 진행되어 왔다. 항진균활성 미생물과 항세균 활성미생물에 대한 연구를 통하여 수행했던 결과에서 많은 항균물질의 특성과 구조등을 밝힌바 있으며, 김치연구를 통해서 항균활성을 보유한 미생물들을 다수 확보하고 특히 출원·등록균주가 다수 있다. 본 연구를 통해 확보된 항균활성 미생물들이 기확보되거나 특허등록 균주들과 겹치기 때문에 이항목의 연구는 기본 스크리닝 연구로 대신하였다.

7) 장내 세균총의 변화 연구

가) 장내세균총 분석방법

유산균을 섭취하게 되면 일반적으로 장내 세균총에 큰 변화를 초래한다. 장내 세균총의 변화가 비만과 관련있다는 보도도 있었으며, 본 연구실에서도 기초 연구를 수행한 바 있다. 유산균이 늘어나고 장이 안정되면 소화 흡수율이 좋아지기 때문에 적게 먹게 되기도 하며 숙변을 제거하고 배변이 잘 되기 때문에 몸이 가벼워지게 된다. 상대적으로 부패와 관련된 미생물들이 늘어나게 되면 자연히 비만이 유도되는 것도 같은 맥락에서 이해할 수 있다. 이 또한 data base가 충분히 마련되어야 하겠지만, 일반적인 수준에서 장내 세균총의 변화는 역시 pyrosequencing 기술을 적용하여 분석하였다. Pyrosequencing 방법의 특성은 다음과 같다.

Mouse 분변의 Genomic DNA extraction, PCR (Barcode tagging PCR), Purification, Quantification, **Pyrosequencing**

Pyrosequencing은 1996년 개발되었으며, dideoxynucleotide의 chain termination을 이용하는 Sanger sequencing과 다르게 새로운 DNA사슬에 nucleotide가 결합될 때 떨어져 나오는 pyrophosphate를 인지하여 염기서열을 분석한다. Roche 454 Life science에 의한 pyrosequencing platform을 이용하였다.

Pyrosequencing은 4가지 효소인 DNA polymerase, sulfurylase, luciferase, apyrase 등의 enzyme cascade를 이용한 방법이다. Double stranded DNA는 질소가스의 압력에 의해 fragmentation되어 진다. 잘려진 fragment의 양쪽 끝에 amplification 및 sequencing을 도와주는 adaptor A,B를 붙인다. 다음 이 DNA library에 DNA capture bead를 섞어준다. DNA capture bead 상에는 adaptor의 일부서열과 상보적인 primer가 결합되어 있으므로 DNA fragment는 bead에 결합하게 된다. 그 후 emPCR을 통해 amplification 후, plate의 각 well당 한 개씩의 bead가 위 4가지 효소와 함께 들어가게 된다.

나) 장내세균총 분석 및 항비만 효능을 위한 동물 실험

(1) 장내세균총 분석 및 항비만 효능 분석을 위한 생쥐 실험군

- 장내세균총 분석을 위한 분변채취와 항비만 효능을 조사하기 위해 다음과 같이 5가지(G1~G5)실험군으로 나누어 사용하였다.



Fig 33. 장내세균총 분석 및 항비만 효능 분석을 위한 생쥐 실험군

G1: Standard diet, G2: High Fat Diet, (HFD: standard diet w/ lard),

G3: 2마리는 신선목은지 경구투여, 3마리는 HFD+ 신선목은지,

G4: 2마리는 1년목은지, 3마리는 HFD+ 1년목은지, G5: 2마리는 2년목은지, 3마리는 HFD+ 2년 목은지

(2) 항비만 효능 실험 결과

- 식이조건에 따른 5개 실험군에서 식이조건별 비만여부를 비교한 결과, 목은지를 섭취한 실험군(G3, G4, G5)들은 정상사료만 먹인 실험군(G1)과 유사한 수준을 유지한 반면, 목은지를 섭취하지 않은 실험군(G2)에서는 고도 비만상태 이었다.

이로써 고지방을 먹더라도 목은지를 동시에 섭취(G3, 4, 5)할 경우 항비만 효과가 확연히 나타났다.

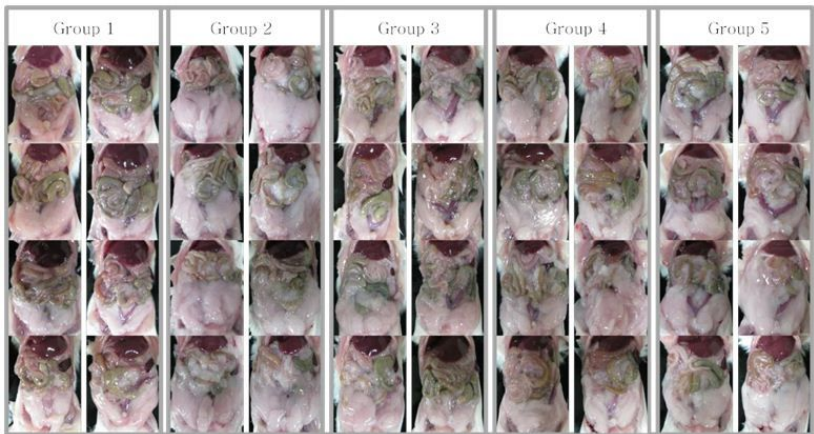


Fig 34. 식이조건에 따른 5개 실험군의 항비만 효능 실험 결과

다) 장내세균총의 분포 분석실험(pyrosequencing)

(1) 생쥐 분변의 Genomic DNA extraction

생쥐의 분변은 day 57에 그룹별로 구분하여 채취하였다. 채취한 분변은 실험에 사용할 때까지 -80°C 에 보관하였다. 분변은 멸균한 1X PBS (pH7.2)에 풀어서 역시 멸균한 1X PBS (pH 7.2)를 사용하여 OD_{600} :0.8~1.0으로 희석하였고, G-spinTM genomic DNA extraction kit for bacteria (Intron, Korea)를 사용하여 genomic DNA를 추출하였다. 분변에서 추출한 DNA sample을 pyrosequencing을 위한 아래의 준비과정에 사용하였다.

(2) Polymerase Chain Reaction (PCR)

Day 57 분변 sample에서 추출한 genomic DNA는 pyrosequencing을 위한 준비작업인 barcode tagging PCR을 더 효율적으로 실행하기 위해 먼저 test PCR을 수행하였다. 분변에 포함되어 있는 수많은 미생물들의 16S RNA V3 region gene을 증폭하기 위해서 27f, 518r primer (Bioneer, Korea)를 사용하였다. Primer의 염기서열은 다음과 같다.

27f GAGTTTGATCMTGGCTCAG

518r WTTACCGCGGCTGCTGG

PCR mixture의 조성은 다음과 같다. $0.25\mu\text{l}$ I-Taq polymerase $5\text{U}/\mu\text{l}$ (Intron, Korea), $5\mu\text{l}$ 10X PCR buffer with MgCl_2 (Inton, Korea), $1\mu\text{l}$ 10mM dNTPs (2.5mM each, Intron, Korea), $1\mu\text{l}$ 50pM 27f primer, $1\mu\text{l}$ 50pM 518r primer, $2\mu\text{l}$ template DNA를 첨가하고 멸균한 TDW로 전체 혼합물을 $50\mu\text{l}$ 가 되게 맞추었다. Thermocycle은 94°C 에서 5분간 pre-denaturation하고, 94°C 에서 30초간 denaturation, 55°C 에서 45초간 annealing, 72°C 에서 1분 30초간 extension을 20회 반복, 72°C 에서 7분간 final extension하였다. PCR products는 1% agarose gel (Seakem GTG agarose, FMC bioproducts, Rockland, ME USA)과 1X TAE buffer를 이용하여 전기영동 (100V, 30분) 한 후, 20분간 EtBr로 염색하고 3분간 세척하여 band를 관찰하였다.

(가) 10X TAE buffer

TAE buffer는 아래의 조성으로 만들어 가압 증기 멸균(121℃, 1.2기압, 15분) 하여 사용하였다. TAE buffer는 10X로 만들어 사용할 때마다 TDW를 이용하여 1X로 희석하여 사용하였다.

Tris base	48.4g
Glacial acetic acid	11.4ml
0.5M EDTA (pH 8.0)	20ml
TDW	1L

(나) TE buffer

TE buffer는 아래의 조성으로 만들어 가압 증기 멸균(121℃, 1.2기압, 15분) 하여 사용하였다. TE buffer는 primer를 희석할 때 사용하였다.

1M Tris-HCl (pH7.6)	1ml
0.5M EDTA	20 μ l
D.W	100ml

(다) 5X Native sample loading buffer

5X Native sample loading buffer는 아래의 조성으로 10ml을 만들어 사용하였다. Bromophenol blue는 1ml 1X PBS에 0.1g을 잘 녹여 첨가하였고, 최종농도는 60mM Tris-HCl(pH6.8), 25% Glycerol, 2% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 0.1% Bromophenol blue가 되도록 만들어 PCR을 수행한 DNA sample을 1% agarose gel에서 전기영동 할 때 사용하였다.

1M Tris-HCl (pH6.8)	0.6ml
50% Glycerol	5ml
10% SDS	2ml
β -mercaptoethanol	0.5ml
Bromophenol blue	1ml

(3) Sequencing을 위한 시료의 준비

(가) Barcode tagging PCR

Barcode tagging PCR은 기존의 27f, 518r primer 대신 27f, 518r primer sequence 앞에 6개의 nucleotide로 이루어진 barcode sequence와 2개의 nucleotide로 이루어진 adapter link sequence를 붙여주어 만든 barcode tagged primer를 사용하여 진행했다(Table 2). Barcode tagging PCR은 생쥐의 분변에서 추출한 template DNA의 pyrosequencing을 진행하기 위한 준비과정으로, sequencing의 결과를 그룹별로 구분할 수 있게 해주어 염기 서열 자료의 분석을 편리하게 해준다. Barcode tagging PCR에서 사용하는 primer에 첨가하는 adapter link sequence는 bacterial 16S RNA V3 region gene sequence와 최대한 다른 염기로 이루어져 있어야 하며 sequencing 후 barcode와 target gene의 sequence를 구별할 수 있게 해주는 역할을 한다. 이번 염기 서열 분석에는 adenine (A) 과 cytosine (C) 염기를 이용하였다.

Barcode tagging PCR mixture의 조성은 다음과 같다. 0.25 μ l I-Taq polymerase 5U/ μ l (Intron, Korea), 5 μ l 10X PCR buffer with MgCl₂ (Intron, Korea), 1 μ l 10mM dNTPs(2.5mM each, Intron, Korea), 1 μ l 50pM 27f barcode tagged primer, 1 μ l 50pM 518r barcode tagged primer, 2 μ l template DNA를 첨가하고 멸균한 TDW로 전체 혼합물을 50 μ l가 되게 맞추었다. Thermocycle은 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 pre-denaturation하고, 94 $^{\circ}$ C에서 30초간 denaturation, 55 $^{\circ}$ C에서 45초간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 30초간 extension을 20회 반복, 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 final extension하였다. PCR products는 1% agarose gel (Seakem GTG agarose, FMC bioproducts, Rockland, ME USA)과 1X TAE buffer를 이용하여 전기영동 (100V, 30분) 한 후, 20분간 EtBr로 염색하고 3분간 세척하여 band를 관찰하였다.

Table 46. List of PCR primers for pyrosequencing with barcode

Barcode	27f/518r
TCATCG	TCATCGACGAGTTTGATCMTGGCTCAG TCATCGACWTTACCGCGGCTGCTGG
GAGTAC	GAGTACACGAGTTTGATCMTGGCTCAG GAGTACACWTTACCGCGGCTGCTGG
TAGCAC	TAGCACACGAGTTTGATCMTGGCTCAG TAGCACACWTTACCGCGGCTGCTGG
ACAGTG	ACAGTGACGAGTTTGATCMTGGCTCAG ACAGTGACWTTACCGCGGCTGCTGG
CACATG	CACATGACGAGTTTGATCMTGGCTCAG CACATGACWTTACCGCGGCTGCTGG

(나) Purification

PCR product는 PCR quick-spin™ PCR product purification kit (Intron, Korea)을 이용하여 정제 및 농축하였다. 1% agarose gel (Seakem GTG agarose, FMC bioproducts Rockland, ME USA)과 1X TAE buffer를 이용하여 전기영동 (100V, 30분) 한 후 , 20분간 EtBr로 염색하여 band를 관찰하였다.

(다) Quantification

정제한 PCR product의 정량은 fluorometer (TBS-38, Turner Biosystems, USA)를 이용하여 흡광도로서 정량하였고, 사용한 dye는 picogreen (PicoGreen dsDNA Quantitation kit (MOP-P-11496))이다. 정량 후 각 sample의 DNA양을 250ng으로 동일하게 맞춘 뒤, 서울대학교 농생명과학공동기기원 (NICEM)에 의뢰하여 Roche 454_GS_FLX (Roche, Germany)로 sequencing을 수행하였다.

라) 장내세균총 분석결과

분변에서 추출한 bacterial 16s rRNA 유전자의 염기서열 분석을 통한 fecal microbiome 분포의 변화를 분석한 결과, standard diet만 제공한 그룹이나 high fat diet만 제공한 그룹에 비해 목은지를 경구 투여한 그룹에서 분석된 sequence의 수가 더 많았다.

Sequence data를 phylum level로 분석한 결과 high fat diet를 제공한 group2는 standard diet를 먹인 group1에 비해 fecal microbiome에서 Bacteroidetes가 차지하는 비율은 감소하였고 Firmicutes의 비율은 증가했다는 것을 확인하였다. 이에 반해 목은지를 먹인 group3, 4, 5는 group2에 비해 Bacteroidetes는 급증하고 Firmicutes는 감소하였다.

High fat diet 섭취에 의해 유도된 비만의 결과 bacteroidetes는 감소하고 Firmicutes는 증가함이 밝혀져 있는데 (Turnbaugh et al, 2006), 목은지는 high fat diet에 의해 유도된 비만에 의한 fecal microbiome 분포의 부정적인 변화를 정상상태로 회복시킨다는 것을 확인하였다.

Table 47. Summary of reads from pyrosequencing for exploring microbial community structures in the mouse fecal samples after sequence trimming and assembly.

	group1	group2	group3	group4	group5
number of sequences	6638	6475	7153	8658	9406
number of contigs	4933	4237	4018	6568	7104

Table 48. The number of identified phyla from the fecal microbiome

Name of phyla	Group1	Group2	Group3	Group4	Group5
Firmicutes	4142	4713	4294	5044	5990
Bacteroidetes	2152	1511	2531	2881	3235
Verrucomicrobia	190	73	17	259	23
Tenericutes	29	56	109	233	11
Proteobacteria	76	35	50	82	76
Bacteria_unclassified	23	20	66	68	14
Actinobacteria	19	55	44	43	25
TM7*	6	1	38	38	9
Cyanobacteria	0	0	0	3	11
Acidobacteria	1	6	1	4	2
Deferribacteres	0	1	0	0	10
Chloroflexi	0	2	1	1	0
Lentisphaerae	0	0	0	2	0
Planctomycetes	0	0	2	0	0
TM6*	0	1	0	0	0
Nitrospirae	0	1	0	0	0

*TM6 and 7 is belonged to Candidatus_uncultured.

Table 49. The percentage of identified phyla from the fecal microbiome

Name of phyla	Group1	Group2	Group3	Group4	Group5
Firmicutes	62.40	72.79	60.03	58.26	63.68
Bacteroidetes	32.42	23.34	35.38	33.28	34.39
Verrucomicrobia	2.86	1.13	0.24	2.99	0.24
Tenericutes	0.44	0.86	1.52	2.69	0.12
Proteobacteria	1.14	0.54	0.70	0.95	0.81
Bacteria_unclassified	0.35	0.31	0.92	0.79	0.15
Actinobacteria	0.29	0.85	0.62	0.50	0.27
TM7*	0.09	0.02	0.53	0.44	0.10
Cyanobacteria	0.00	0.00	0.00	0.03	0.12
Acidobacteria	0.02	0.09	0.01	0.05	0.02
Deferribacteres	0.00	0.02	0.00	0.00	0.11
Chloroflexi	0.00	0.03	0.01	0.01	0.00
Lentisphaerae	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00
Planctomycetes	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00
TM6*	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
Nitrospirae	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00

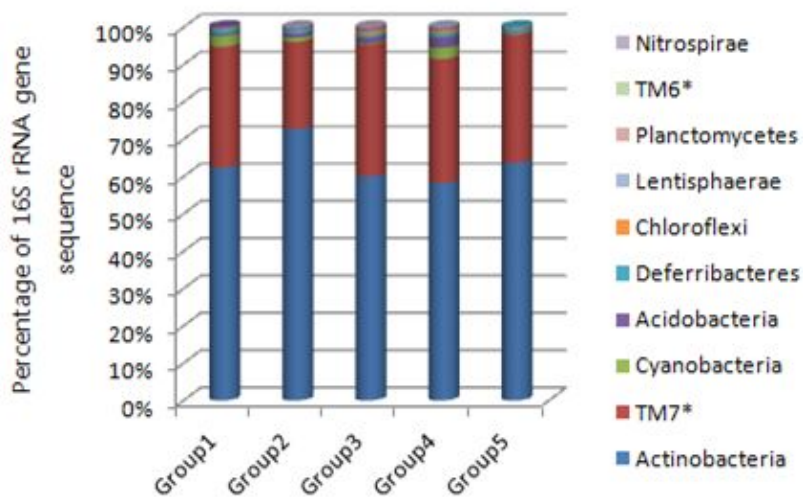
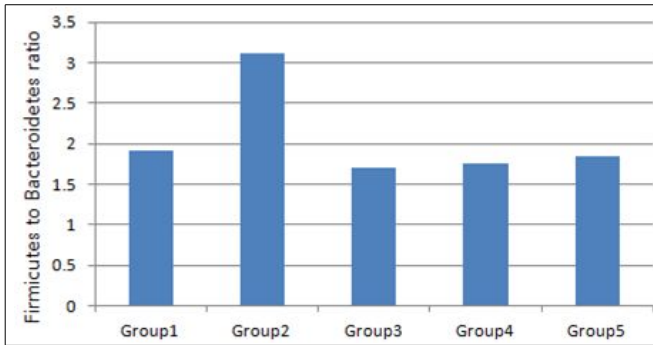


Table 50. The percentage of most abundant identified phyla and its ratio

	Group1	Group2	Group3	Group4	Group5
	STD	HFD	HFD with 신선	HFDwith 1년	HFDwith 2년
Firmicutes (%)	62.40	72.79	60.03	58.26	63.68
Bacteroidetes (%)	32.42	23.34	35.38	33.28	34.39
Firmicutes /Bacteroidetes	1.92	3.12	1.70	1.75	1.85



8) 목은지 제조 공정개선 및 품질관리 규격

가) 1세부의 기능성 소재 발굴 및 생물기능성 규명연구로부터 신선김치와 목은지의 차이점, 목은지 제조공정 및 보관방법(유효성분 품질관리규격)등이 제안 될 수 있으며 특히 기업이 담당하는 3세부과제에서 기존의 자연발효제조(knowhow)와는 다른 제조공정(종균발효)도 제안됨

제안될 품질 Biomarker

단백질수준의 품질 Biomarker

지질 수준의 품질 Biomarker

유기산 함량 및 함량비

당도, 염분도의 기준

아미노산, 무기물, 당류등의 구성비등을 품질규격에 활용예정

나) 종균발효제조 공정을 위한 기초자료 확립

종균발효제조 과정을 위한 기초자료로 활용하기 위해 실험·조사·분석한 자료는 다음과 같다. 이들 기초 분석자료는 제조과정의 효율성을 높이는데 참고자료로 이용될 것이다(Table 51~54, Fig 35~39).

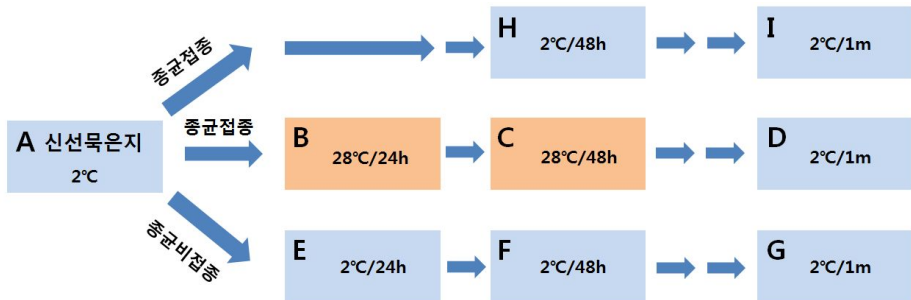


Fig 35. 종균접종 과정의 도식화

(1) 종균접종 일반성분 분석

Table 51. 종균접종 목은지 일반성분 분석 결과표

항목	분석결과									단위	시험방법
	A	B	C	D	E	F	G	H	I		
수분	87.3	87.9	88.1	88.8	87.9	88.2	89.4	87.9	87.9	g/100g	식품공전(2001) 상압가열건조법
지방	0.5	0.3	0.4	0.5	0.4	0.4	0.4	0.5	0.5	g/100g	Chloroform-methanol 추출법
단백질	1.9	1.8	1.8	1.8	1.6	1.7	1.7	1.7	1.7	g/100g	Kjeldahl법
회분	2.7	3.1	3.2	3.2	3.2	2.7	3.2	2.8	2.8	g/100g	식품공전(2001) 회분시험법
탄수화물	7.6	6.9	6.5	5.7	6.9	7.0	5.3	7.1	7.1	g/100g	식품공전(2001) 계산법
식염	2.1	2.7	2.2	2.4	2.5	2.3	2.5	2.3	2.2	g/100g	식품공전(2001) 식염시험법
Fructose	0.4	0.1	0.1	0.0	0.1	0.2	0.0	0.4	0.1	g/100g	식품공전(2001) 당질시험법
Glucose	1.3	1.2	1.3	0.0	1.1	1.1	0.0	1.2	0.3	g/100g	식품공전(2001) 당질시험법
Maltose	0.8	0.6	0.6	0.2	0.7	0.5	0.2	0.7	0.4	g/100g	식품공전(2001) 당질시험법
포화지방	-	-	-	0.1	-	-	0.1	-	0.1	g/100g	AOAC Official Method 963.22
EPA	-	-	-	0.2	-	-	0.2	-	0.2	mg/100g	식품공전(2001) 지방산시험법
DHA	-	-	-	0.2	-	-	0.1	-	0.2	mg/100g	식품공전(2001) 지방산시험법

A : 신선목은지(2℃), B : 접종 후 24h(28℃), C : 접종 후 48h(28℃), D : 접종 후 1m(48h 후 2℃), E : 신선목은지 24h(2℃), F : 신선목은지 48h(2℃), G : 신선목은지 1m(2℃), H : 접종 후 48h(2℃), I : 접종 후 1m(2℃)

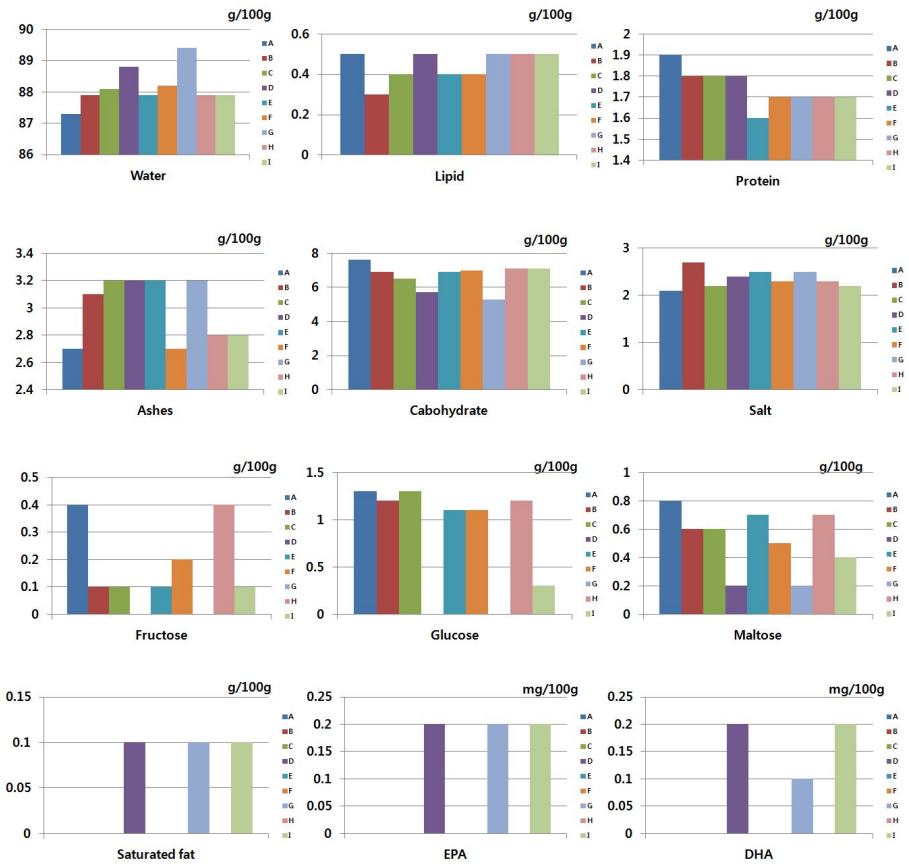


Fig 36. 종균접종 목은지 일반성분 분석 결과 그래프

A : 신선목은지(2°C), B : 접종 후 24h(28°C), C : 접종 후 48h(28°C), D : 접종 후 1m(2°C), E : 신선목은지 24h(2°C), F : 신선목은지 48h(2°C), G : 신선목은지 1m(2°C), H : 접종 후 48h(2°C), I : 접종 후 1m(2°C)

(2) 중금속농도 목은지 무기물 분석 결과

Table 52. 중금속농도 목은지 무기물 분석결과 표

(단위 : mg/100g)

항목	분석결과									시험방법
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	
Ca	32.1	34.9	34.5	32.6	38.3	34.4	37.0	35.9	33.7	ICP-AES 측정법
Na	735.2	804.9	814.4	803.1	941.7	785.1	886.7	797.2	781.5	ICP-AES 측정법
P	50.6	49.9	49.3	49.0	44.6	45.1	44.7	44.7	43.1	ICP-AES 측정법
Zn	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.4	0.3	0.3	0.3	ICP-AES 측정법
Fe	0.7	0.6	0.7	0.5	0.7	0.9	0.6	0.6	0.6	ICP-AES 측정법
Mg	19.3	20.3	20.8	20.3	20.8	19.7	20.6	18.7	18.7	ICP-AES 측정법

A : 신선목은지(2℃), B : 접종 후 24h(28℃), C : 접종 후 48h(28℃), D : 접종 후 1m(2℃), E : 신선목은지 24h(2℃), F : 신선목은지 48h(2℃), G : 신선목은지 1m(2℃), H : 접종 후 48h(2℃), I : 접종 후 1m(2℃)

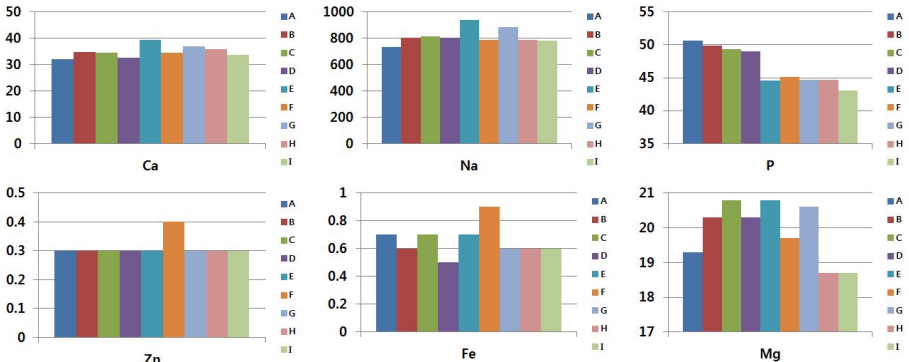


Fig 37. 접종목은지 무기물 분석결과 그래프.

A : 신선목은지(2℃), B : 접종 후 24h(28℃), C : 접종 후 48h(28℃), D : 접종 후 1m(2℃), E : 신선목은지 24h(2℃), F : 신선목은지 48h(2℃), G : 신선목은지 1m(2℃), H : 접종 후 48h(2℃), I : 접종 후 1m(2℃)

(3) 평균접종 목은지 지방산 분석

Table 53. 평균접종 목은지 지방산 분석 결과 표

구분	화학식	지방산(일반명)	지방 100g 당조성비(%)			시험방법
			D	G	I	
포화 지방산	C12:0	라우르산(Lauric acid)	0.2	0.2	0.2	
	C14:0	미리스틴산(Myristic acid)	1.0	0.9	1.0	
	C16:0	팔미트산(Palmitic acid)	16.3	16.8	17.0	
	C18:0	스테아르산(Stearic acid)	2.4	2.4	2.5	
	C20:0	아라키드산(Arachidic acid)	0.4	0.4	0.4	
	C22:0	벤헨산(Behenic acid)	0.4	0.4	0.4	
	C24:0	리그노세르산(Lignoceric acid)	0.4	0.6	0.6	
		포화지방산 합계	21.1	21.7	22.1	
불포화 지방산	C14:1	미리스톨레산(Myristoleic acid)	0.1	0.1	0.1	AOAC Official Method 963.22
	C16:1	팔미톨레산(Palmitoleic acid)	0.6	0.6	0.6	
	C18:1	올레산(Oleic acid)	11.0	11.3	11.3	
	C18:2	리놀레산(Linoleic acid)	58.1	54.9	55.8	
	C18:3	리놀레산(Linoleic acid)	8.3	10.3	9.2	
	C20:1	가드올레산(Gadoleic acid)	0.1	0.1	0.1	
	C20:2	에이코사디에노산 (Eicosadienoic acid)	0.1	0.1	0.1	
	C22:6	EPA	0.1	0.1	0.1	
	C24:1	DHA	0.1	0.1	0.1	
	C24:1	테트라코세노산 (Tetracosaeonic acid)	0.3	0.4	0.4	
		불포화지방산 합계	78.8	78.0	77.8	
	Unknown	0.1	0.3	0.1		
	합계	100.0	100.0	100.0		

A : 신선목은지(2℃), B : 접종 후 24h(28℃), C : 접종 후 48h(28℃), D : 접종 후 1m(2℃), E : 신선목은지 24h(2℃), F : 신선목은지 48h(2℃), G : 신선목은지 1m(2℃), H : 접종 후 48h(2℃), I : 접종 후 1m(2℃)

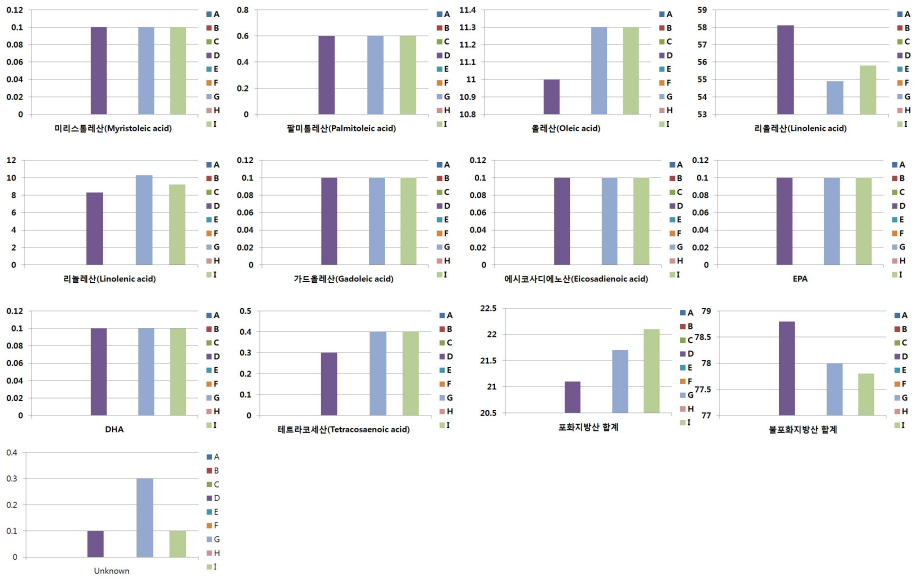


Fig 38. 종균접종 목은지 지방산 분석 결과

A : 신선목은지(2℃), B : 접종 후 24h(28℃), C : 접종 후 48h(28℃), D : 접종 후 1m(2℃), E : 신선목은지 24h(2℃), F : 신선목은지 48h(2℃), G : 신선목은지 1m(2℃), H : 접종 후 48h(2℃), I : 접종 후 1m(2℃)

(4) 평균접종 목은지 구성아미노산 분석표

Table 54. 평균접종 목은지 구성아미노산 분석표

구성아미노산	분석결과									시험방법
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	
Aspartic acid	161.7	148.1	154.1	141.6	139.2	141.0	126.2	152.6	144.3	Derived by ninhydrin HPLC analytical method
Threonine	51.3	46.2	49.3	46.2	43.3	45.0	40.1	47.9	44.4	
Serine	68.1	62.3	62.0	58.7	56.2	60.3	52.8	61.9	57.0	
Glutamin acid	408.9	415.4	395.6	370.9	361.9	399.3	343.6	391.1	371.2	
Proline	63.1	55.3	56.2	61.9	47.2	58.6	55.4	55.0	53.1	
Glycine	63.7	55.2	59.7	60.2	50.7	54.1	50.8	58.2	55.8	
Alanine	112.3	113.7	109.8	118.3	95.4	109.9	104.4	99.7	98.7	
Valine	62.8	58.3	63.4	60.9	51.8	54.7	50.4	59.1	56.8	
Methionine	16.1	13.4	17.5	14.2	12.5	11.5	9.3	12.8	13.2	
Isoleucine	43.2	41.1	44.8	42.6	34.8	37.3	33.5	41.4	38.8	
Leucine	87.5	73.7	80.4	73.1	64.5	71.2	60.1	77.8	71.5	
Tyrosine	21.3	17.8	17.3	18.4	15.2	16.0	14.7	17.2	14.7	
Phenyl alanine	50.8	43.3	46.7	45.6	38.5	41.3	38.3	45.2	42.9	
Lysine	88.5	79.5	81.6	73.2	71.3	78.9	67.1	80.5	73.8	
Histidine	22.6	20.1	20.7	18.8	16.8	18.4	15.8	19.9	18.1	
Arginine	37.8	30.6	32.5	32.3	26.8	28.6	25.3	34.2	29.9	
Total	1,359.7	1,274.0	1,291.6	1,236.9	1,126.1	1,226.1	1,087.8	1,254.5	1,184.2	

A : 신선목은지(2℃), B : 접종 후 24h(28℃), C: 접종 후 48h(28℃), D : 접종 후 1m(2℃), E : 신선목은지 24h(2℃), F : 신선목은지 48h(2℃), G : 신선목은지 1m(2℃), H : 접종 후 48h(2℃), I : 접종 후 1m(2℃)

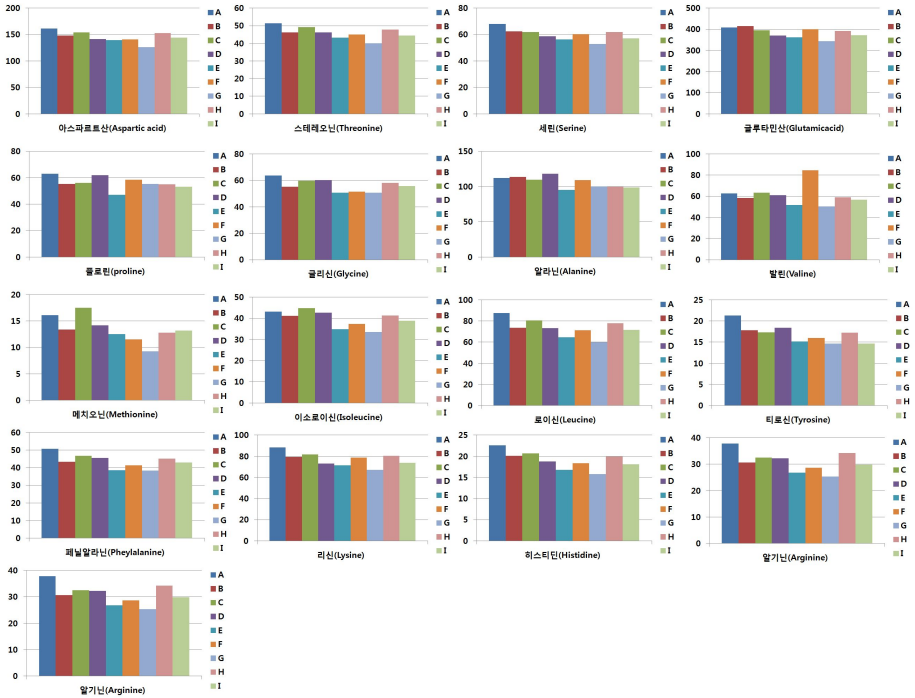


Fig 39. 중균접종 목은지 구성아미노산 분석 결과 그래프

A : 신선목은지(2°C), B : 접종 후 24h(28°C), C : 접종 후 48h(28°C), D : 접종 후 1m(2°C), E : 신선목은지 24h(2°C), F : 신선목은지 48h(2°C), G : 신선목은지 1m(2°C), H : 접종 후 48h(2°C), I : 접종 후 1m(2°C)

2. 목은지의 세포면역학적·항염지향적 생리활성 규명연구

가) 면역세포 준비 및 배양조건

- 실험에 사용한 면역세포인 Raw 264.7 세포주는 mouse macrophage cell로 DMEM에 10%의 FBS와 1%의 penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 U/ml)을 넣어서 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양되었다.

나) 목은지의 세포면역학적·항염지향적 생리활성 규명 실험 및 결과

- 상기조건으로 배양한 대식세포 Raw264.7 세포에 목은지를 종류별, 농도별, 전처리시간 및 LPS 첨가전·후 등 여러 가지 실험조건으로 나누어 항염지향적 생리활성 실험을 진행하였다.

(1) LPS에 의한 염증반응 유도에 대해 목은지의 5분 전처리 효과

- 목은지를 종류별(신선지, 목은지1년, 목은지2년), 농도별(10, 100, 1000µg/ml)로 5분 전처리한 후, LPS (1µg/ml)를 넣고 한시간 후에 harvest하며, mRNA를 extraction하여 cytokine들(TNFα, IL-1β, IL-6)에 대해 RT-PCR을 진행하였다.
- 10µg/ml, 100µg/ml, 1000µg/ml의 목은지 시료를 각각 처리하고 5분 후에 염증반응을 유발시키기 위해 LPS를 1시간동안 처리하여 harvest하였다. 이렇게 얻은 시료를 RT-PCR을 통해 cytokine의 발현을 확인한 결과, Fig 40에서 보는 바와 같이 control (LPS 처리군)에 비해 목은지 2년(1mg/ml)에서 IL-1β의 발현이 35% 감소한 반면, IL-6와 TNFα의 감소량은 미미하였다.

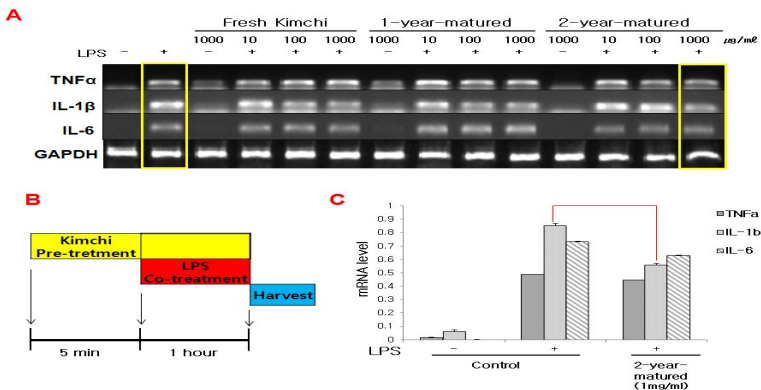


Fig 40. LPS에 의한 Cytokine 발현 증가에 대해, 목은지를 짧게 5분 전처리했을 때, 목은지 농도별 발현량 변화

(2) LPS에 의한 cytokine 발현 증가에 대해 묵은지의 1시간 전처리 효과

- 묵은지의 전처리 시간을 5분에서 1시간과 3시간으로, 전처리 농도를 1mg/ml과 5mg/ml로 증가시킨 후 LPS를 1시간 처리하고 mRNA를 추출하여 상기 cytokine들에 대해 RT-PCR을 진행하였다.
- 시료의 농도와 처리시간을 증가시켰을 때, TNF α , IL-1 β , IL-6의 발현량을 확인하였다. 농도에 따른 변화를 보기 위해 1mg/ml과 5mg/ml의 묵은지를 각각 처리하였고, 전처리 시간별 변화를 보기 위해 이전에 5분 처리하였던 것을 1시간과 3시간으로 구분하여 처리하였다. Fig 41에서 보는 바와 같이, 묵은지의 전처리 농도나 시간이 증가해도 cytokine의 발현량이 감소하는 모습을 보이지 않았고, 오히려 IL-1 β 의 경우에는 묵은지 처리에 의해 발현량이 증가하는 경향성을 보였다. 하지만 1mg/ml의 농도로 1시간동안 묵은지를 전처리하였을 때, IL-6의 발현량은 묵은지 1년, 묵은지 2년 처리에서 각각 87%와 97%로 현격하게 감소하였다. 반면에, IL-1 β 의 발현량은 5분 전처리했을 때 보였던 결과와는 반대로 오히려 묵은지 처리에 의해 발현량이 증가하는 것을 확인할 수 있었는데, 이는 이전 보고(Papanicolaou, et al. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2012 Jan 1;17(1):e56-62)와 일치하는 내용이다.

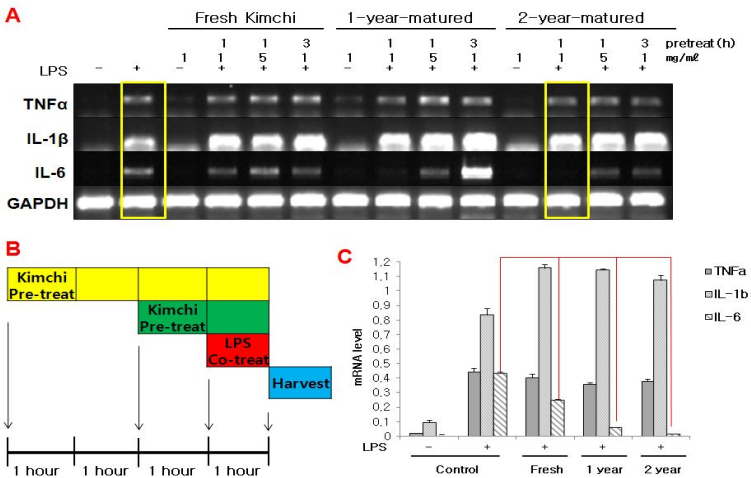


Fig 41. LPS에 의한 Cytokine 발현 증가에 대해 묵은지의 전처리 시간과 농도를 증가시켰을 때, 발현량 변화

(3) LPS를 6시간 장시간 처리했을 때, 묵은지에 의한 cytokine 발현 억제 효과

- LPS에 의한 염증반응 자극 시간을 증가시켰을 때, TNF α , IL-1 β , IL-6의 발현량 변화를 확인하였다. 1mg/ml의 묵은지 시료를 1시간동안 전처리한 후에, LPS를 각각 1시간, 3시간, 6시간 처리하여 harvest하고, 그 시료를 가지고 RT-PCR을 통해 cytokine의 발현을 확인하였다.
- Fig 42에서와 같이 LPS를 6시간 처리하였을 때, 가장 좋은 감소효과를 보였으며, LPS를 6시간 처리한 시료들을 비교하였을 때, TNF α 의 발현량은 신선묵은지를 전처리하였을 때 약 50%로 가장 좋은 염증억제효과가 나타난 반면, IL-6나 IL-1 β 에서는 그 변화가 미미하였다.

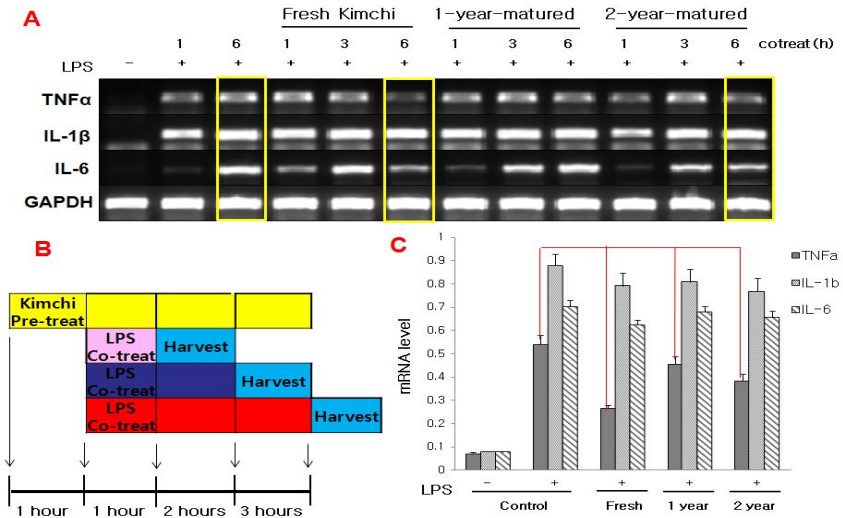


Fig 42. LPS를 장시간 처리하였을 때의 묵은지 처리에 따른 cytokine 변화

(4) LPS에 의한 cytokine 생성 증가에 대해 묵은지의 억제 효과

- 앞선 실험들을 통해 묵은지 시료를 1mg/ml의 농도로 1시간 전처리한 후, LPS를 6시간동안 처리하여 harvest할 때, 가장 뚜렷한 항염 효과가 나타남을 알게 되었다. 따라서 이러한 조건으로 ELISA를 통해 10가지 cytokine (TNF α , IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, IFN γ , GM-CSF)의 생성여부를 screening하였다.
- Fig 43와 같이, LPS에 의한 TNF α 분비가 묵은지 시료 처리에 의해 거의 절반 수준으로 감소하는 것을 확인할 수 있는 한편, IL-1 β 의 분비는 묵은지 처리에 의해 큰 변화가 없는 것처럼 보였다.

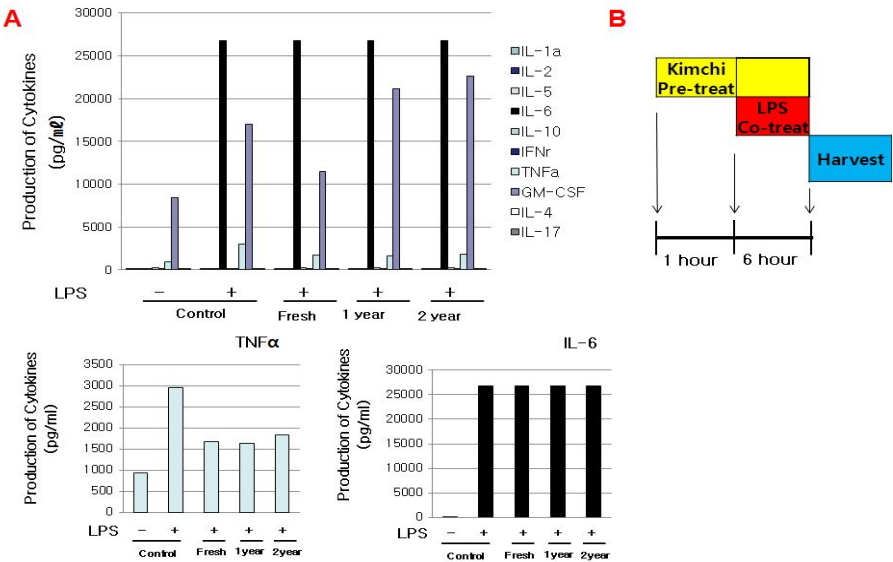


Fig 43. 묵은지 처리에 따른 cytokine 생성량 변화 screening

(5) LPS 자극에 따른 PLD활성 증가와 묵은지 처리에 의한 PLD 활성 변화

- 염증매개 반응의 꼭지에 위치한 것으로 알려져 있는 PLD와 묵은지의 cytokine 발현 억제효과가 관련있는지 확인하기 위하여 PLD 활성을 측정하였다.
- 그 결과 LPS에 의해 증가되었던 PLD 활성이 감소하였으며 묵은지 2년 전처리 군에서는 거의 basal level로 감소함을 볼 수 있었다.
- PLD는 고유의 신호전달계를 통해 cytokine을 발현시켜 염증반응이 일어나도록 매개하는 꼭지 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 PLD가 묵은지 처리에 의해 억제됨으로써, 염증관련 생리활성물질의 발현을 억제시킬 수 있는 가능성을 발견하였다.
- 앞으로 보다 심도있는 연구를 통해서 묵은지가 PLD를 억제시킴으로써, 체내염증반응이 억제됨을 증명하고, 더 나아가 세계 최초로 PLD 신호전달계 제어 항염증 기능성 식품으로써, 묵은지의 효능을 알릴 수 있는 가능성을 제시한다.

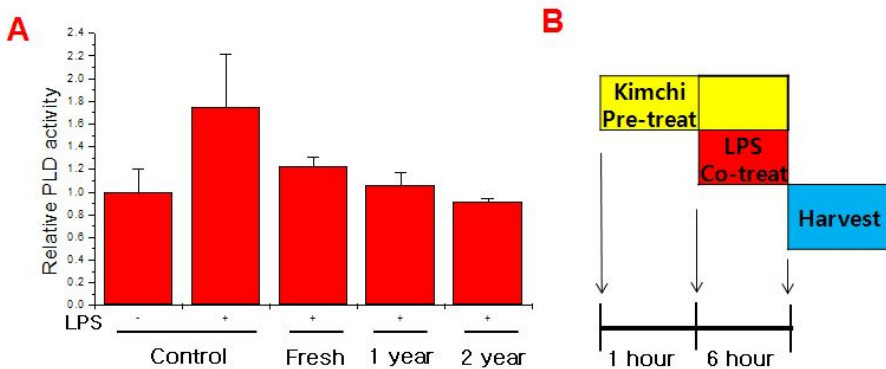


Fig 44. LPS에 의한 PLD 활성 증가에 대한 묵은지의 효과

(6) 2년 묵은지에서만 특이적으로 나타나는 지질 처리에 의한 항염효과

- 목은지를 추출하여 지질분석용 TLC를 진행하였을 때, 2년 묵은지에서만 특이적으로 lipid band가 3개 나타났고, 각각을 끊어모았다.
- 이를 DMSO로 희석시켜서 Raw264.7 cell에 1mg/ml로 1시간 전처리한 후, 3 시간동안 LPS를 처리하여 염증반응을 유도하였다.
- 이것을 RT-PCR을 통해 각각의 cytokine의 발현양상을 조사하였다. 그 결과 항염효과에 대한 유의한 결과를 얻을 수 없었다. 이러한 결과가 농도 때문이라 판단되어 추출샘플을 고농도로 처리하여 실험을 진행하고 있다.

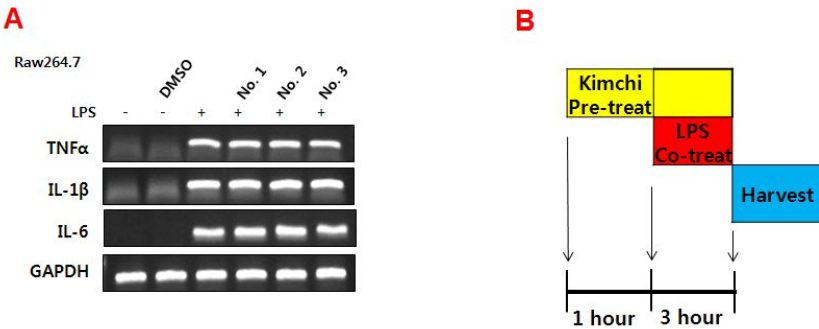


Fig 45. LPS에 의한 cytokine 발현에 2년 묵은지에서만 나타난 lipid를 처리하였을 때의 영향

(7) 2년 묵은지내 존재하는 오르니틴, 시트룰린, GABA 처리에 의한 항염효과

- 2년 묵은지에 함유되어 있는 기능성 아미노산들인 L-Ornithine, L-Citrulline, GABA들이 cytokine 발현 억제효과의 원인 물질인지의 여부를 가리기 위해 Raw264.7 세포에 1mg/ml로 각각의 물질을 1시간 전처리한 후, 3시간 LPS 처리하여 염증반응을 유도하였다.
- 이를 RT-PCR로 확인한 결과, LPS에 의해 증가한 cytokine 발현이 TNF α , IL-1 β 에서는 L-Citrulline을 처리하였을 때, IL-6에서는 L-Ornithine을 처리하였을 때, 약간의 억제효과가 있는 것처럼 보였지만 그 정도는 미미하였다.

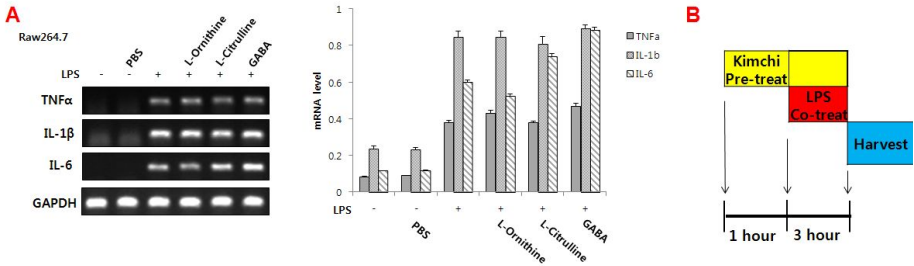


Fig 46. LPS에 의한 cytokine 발현에 L-Ornithine, L-Citrulline, GABA의 영향

제 2절 목은지로부터 대사질환 및 암 관련 유전자에 작용하는 기능 성물질 규명

1. 목은지 추출물을 이용한 세포독성 확인

배재대학교 이기성 교수님 실험실로부터 목은지 추출물 (1년, 2년) 및 신선지를 제공받음.

각종 대사증후군 관련 실험에 앞서 목은지 추출물에 대한 독성 실험은 필수임.

본 실험실(2세부과제)에서는 인간의 간 세포주 (HepG2)를 이용하여 독성실험 및 다양한 분자생물학적·세포생물학적 실험을 진행하였음.

세포독성 실험에 대표적으로 이용되는 MTT assay 실험방법을 이용하여 신선지 및 목은지(1년,2년) 추출물을 간 세포주에 24시간, 농도별로 처리하였음 (Fig 47.).

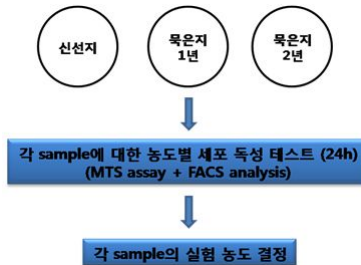


Fig 47. 세포독성 실험을 위한 실험 전략

MTT assay는 목은지 추출물을 처리한 농도에 따라 세포의 대사적 활성이 달라지기 때문에 세포 생존율 및 독성을 확인하는데 적절한 실험방법임.

신선지 및 목은지 추출물을 0.1g/ml의 농도로 보관하고 이를 1/10단위로 희석하여 실험을 수행함. 비록 각 추출물의 농도에 따라 세포독성의 약간의 차이는 보였으나, 모두 0.01mg~1mg/ml의 농도에서 세포가 생존해 있는 것으로 확인됨 (Fig 48).

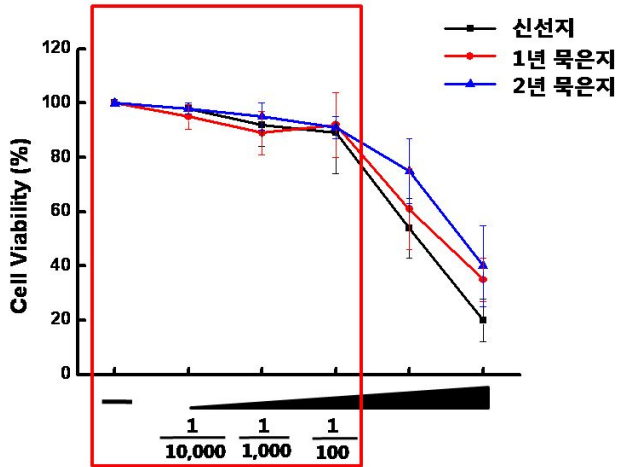


Fig 48. MTT assay를 이용한 세포 생존율 측정

이와 같은 결과는 신선지 및 묵은지 추출물을 이용한 다양한 분자·세포 생물학적 실험의 기초자료로 활용될 것이나, 보다 심도있는 세포 생존율을 비교 분석해야 할 필요가 있음.

2. 목은지 추출물을 이용한 세포의 형태학적 분석 및 세포 사멸 효과 비교 분석

앞선 결과를 바탕으로 목은지 추출물에 의한 인간의 간세포주의 세포 변화를 분석하기 위해 FACS(Fluorescence-activated cell sorting) 분석기를 이용하였으며, 그 수행방법은 Fig 47에서 나타내었음.

FACS 분석기는 레이저 광선을 세포에 조사할 때 발생하는 형광을 이용해 세포 주기(cell cycle)를 분석하여 세포 사멸 정도를 파악할 수 있음.

본 실험결과와 앞서 도출된 MTT assay와 같은 농도 범위에서 세포 생존율을 보였으며, 광학현미경을 이용한 세포의 형태 분석에서는 특이점을 찾지 못했음 (Fig 49).

또한 추출물 처리에 의한 세포주기가 변하지 않는 점에서 신선지와 목은지 추출물 자체가 세포의 성장과는 관련이 없는 것으로 추측 됨.

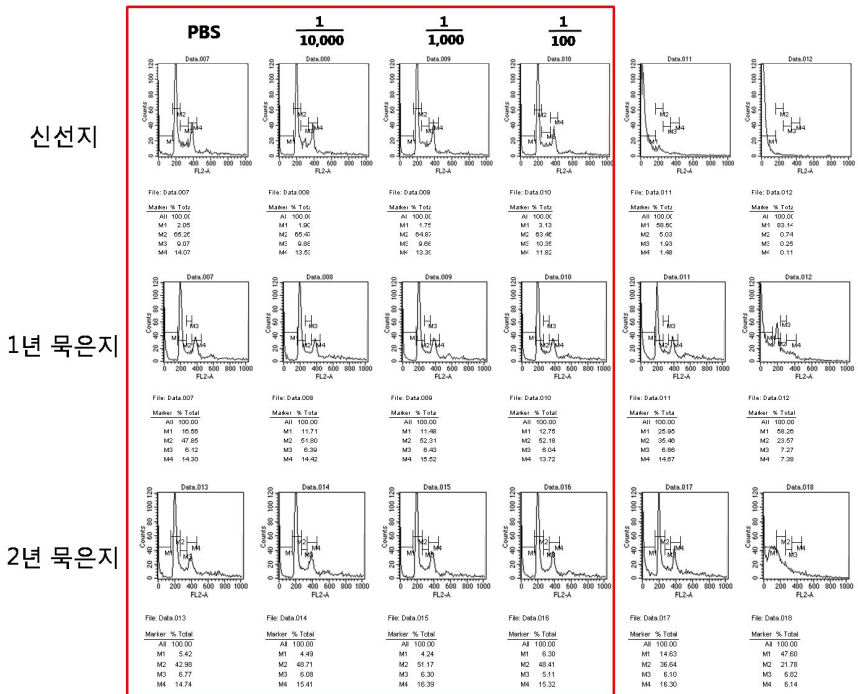


Fig 49. FACS 분석기를 이용한 세포 주기 분석

3. 추출물을 이용한 대사증후군 마커 유전자 확인

본 실험에 이용한 인간의 간 세포주 (HepG2)는 많은 연구자들에 의해 대사증후군 모델로 이용되는 간암 세포주임.

특히 제 2형 당뇨병 및 인슐린 세포신호전달 연구에 많이 이용되고 있으며, 그 밖의 대사질환 연구에도 이용하고 있음 (Fig 50).

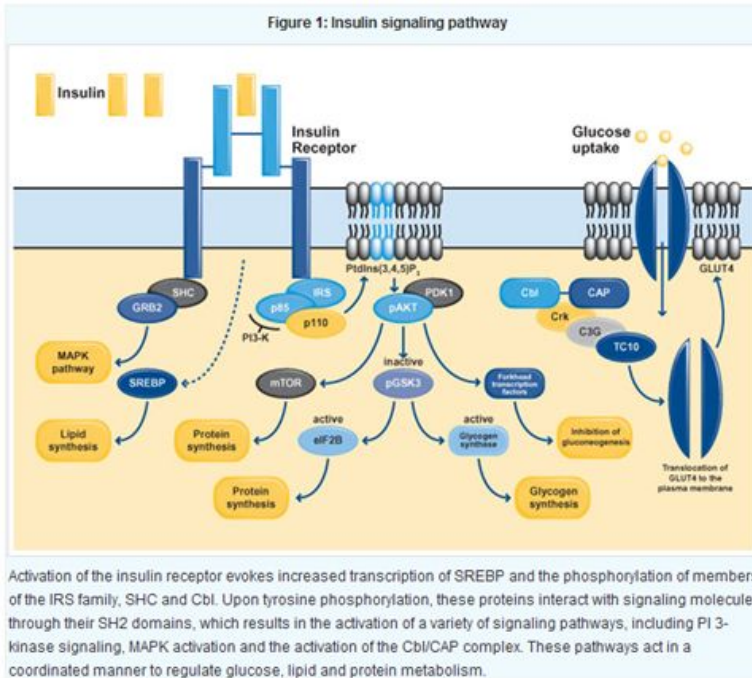


Fig 50. 세포내 인슐린 전달체계 모식도

IRS-1,2,4 유전자는 인슐린 세포신호전달 체계에 필수적인 유전자이며, 그중에서도 IRS-1의 돌연변이 및 발현억제는 심각한 인슐린 저항성을 높여 제 2형 당뇨병을 유발하는 것으로 알려져 있음.

앞선 연구결과로부터 도출된 신진지와 목은지 추출물의 적정 농도를 간세포에 처리함으로써 IRS-1,2,4의 발현양상을 mRNA 수준에서 확인하고자 하였음 (Fig 51).

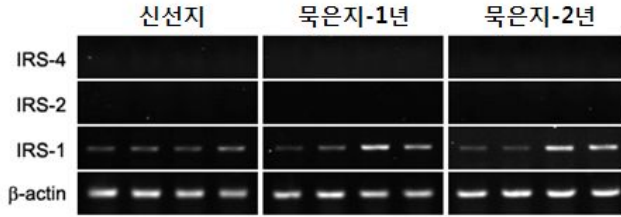


Fig 51. RT-PCR을 이용한 IRS family의 발현양상 비교

추출물의 농도가 증가함에 따라 묵은지 1년과 2년에서 IRS-1의 mRNA 양이 증가하는 것을 확인하였으나 신선지 추출물에서는 mRNA양이 변하지 않음.

단, IRS-2, 4는 간세포주(HepG2)에서 거의 발현하지 않음.

이와 같은 결과는 1년이상의 묵은지로부터 발효 또는 새로이 형성된 영양소가 세포내 인슐린 신호전달체계를 활성화 시킬수 있다는 기초적 자료로 이용될 수 있음.

본 실험실에서는 IRS-1과 묵은지와와의 상관관계를 보다 심층적으로 분석함으로써 인슐린 저항성으로부터 유도되는 당뇨병을 예방하기 위한 기능성 식품으로서의 가능성을 제시하고자 함.

4. 대사증후군 마커 유전자의 전사활성도 측정

LXR, HNF4, PPAR, Estrogen, beta-catenin 등은 대사과정에 중요한 마커 유전자로서 각 유전자의 돌연변이는 간병변, 당뇨병, 비만 및 간암등을 유발하는 것으로 알려져 있음.

본 실험실에서는 LXR, HNF4, PPAR, Estrogen, beta-catenin 유전자의 Luciferase-vector를 보유하고 있으며 신선지와 목은지 추출물과의 반응을 통해 전사활성을 측정하고자 하였음.

2년 목은지의 추출물 (1mg/ml)을 신선지의 대조군과 비교하였을 때, 에스트로겐 수용체에 대한 전사활성이 증가하는 것을 확인하였으며, 그 밖의 마커 유전자들의 전사활성은 변하지 않았음 (Fig 52).

사전 문헌조사에 따르면, 간세포에서의 에스트로겐의 역할은 인슐린에 대한 저항성을 억제시킬 뿐만 아니라 인슐린에 대한 민감도를 증가시켜 적은 양의 인슐린에도 반응을 빨리 할 수 있도록 도와주는 호르몬이라는 것이 밝혀져 있음.

이를 바탕으로 목은지 추출물에 의한 에스트로겐 수용체의 전사활성은 당뇨병 예방 효과 및 인슐린 민감성에 도움을 줄 수 있을것이라 사료됨.

다양한 분자생물학적 실험과 목은지 추출물을 섭취한 동물실험은 이와 같은 기초 자료를 뒷받침 하는데 필수적일 것이며, 앞으로 실험을 통해 증명해 나갈 것임.

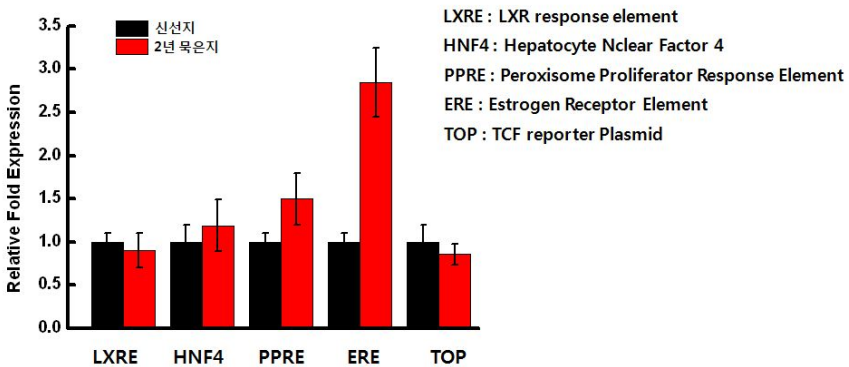


Fig 52. Luciferase assay를 통한 대사증후군 관련 마커 유전자의 전사활성 측정

5. 인슐린과 목은지 추출물을 이용한 간세포 에서의 대사과정 확인

인슐린은 췌장 베타세포에서 식후 분비되어 근육으로 포도당을 섭취하고, 간에서 포도당 생성을 억제하여 혈당을 조절함.

간과 지방조직에서 지방산분해를 억제하고 섭취된 포도당을 지방으로 저장하며 근육에서 단백질 분해도 억제하는 등 식후 섭취된 에너지를 저장하게 됨.

이러한 인슐린 작용 (Insulin sensitivity)이 생리적 인슐린 농도에서 정상보다 저하된 대사상태를 인슐린 저항성 (Insulin resistance)로 정의하고 있음.

제 2형 당뇨병은 대표적인 성인 대사질환으로서, 가장 밀접한 관계를 보이는 비만 및 고지방식이 대표적인 원인이라 할 수 있음.

잠재적인 제 2형 당뇨병 환자들은 고인슐린혈증(Hyperinsulinemia) 상태로 정상 혈당을 유지하지만 인슐린 분비능이 인슐린 저항성을 극복하지 못하면 당뇨병이 나타나게 됨.

인슐린저항성은 대사증후군의 구성요소 중 가장 흔히 발견되고 또 대부분의 다른 요소의 발생과 기전적으로 밀접한 상관관계를 보여 비만과 함께 대사증후군의 근본적인 원인으로 제시되고 있음.

간에서의 인슐린의 역할은 포도당 생성을 억제하는데 초점을 맞추고 있으며, 간에 저장된 포도당은 글루카곤에 의해 필요시 해당작용을 거쳐 대사됨.

인슐린에 의한 간세포의 활성화과정은 인슐린 수용체에 인슐린이 결합 한 후, IRS1, IRS2 의 인산화 과정을 거치게 됨. 그 후 PI3K 및 AKT 세포신호전달체계를 거쳐 포도당 생성을 억제하는 것으로 알려져 있음.

대표적인 인슐린 감수성 조직은 근육, 간 및 지방조직인데 인슐린작용에 의한 포도당 대사는 정량적인 면에서 주로 근육 및 간에서 일어남.

따라서 근육과 간의 포도당 대사의 직접적인 변화 없이는 대사작용을 설명할 수 없음.

본 연구에서는 대조군으로 신선지(FKE)를 이용하였으며, 목은지 1년(1

yr-OMKE)과 2년 추출물(2 yrs-OMKE)을 인슐린과의 상관관계에 대해 실험을 진행하였음.

먼저 대조군 실험으로, 간세포에 인슐린을 농도별 (1~100 nM)로 세포에 처리하여 인산화된 AKT 단백질의 양의 변화를 측정하였으며, 농도 의존적으로 증가됨을 확인하였음 (Fig 53).

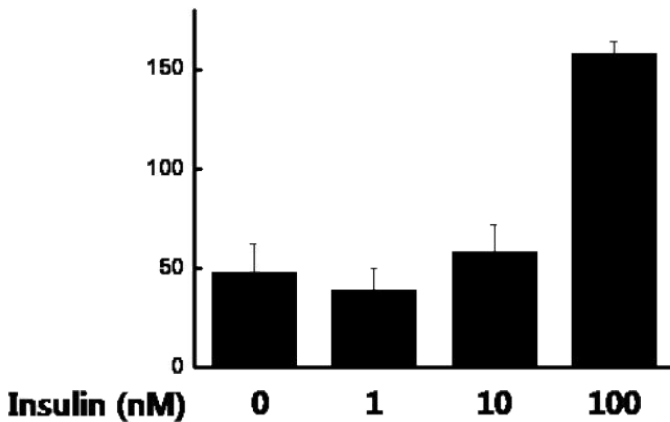


Fig 53. 인슐린 농도 증가에 따른 인산화 된 AKT 단백질의 변화량

신선지 및 묵은지를 간 세포에 처리하였으나 인산화 된 AKT의 단백질 변화는 신선지에서만 오차범위내에서 약간의 변화를 보였을 뿐, 묵은지에서는 변화를 보이지 않음.

하지만 인간의 대사과정은 포도당 유입 후, 인슐린 분비가 일어나는 것이기 때문에 김치 추출물을 전 처리 후, 인슐린을 처리함으로써 인산화 된 AKT의 단백질 변화를 관찰하였음 (Fig 54).

Fig 43의 대조군에서는 저농도의 인슐린에 의해 AKT의 변화가 보이지 않았으나, 묵은지 2년 추출물을 전 처리 후, 저농도의 인슐린을 후 처리 하였을 때, AKT 단백질의 양은 급격히 증가하였음.

비록 신선지에서도 AKT 단백질이 변화를 보였으나, 인슐린에 의한 간세포 대사

과정을 활성화 시키는 다른 마커 유전자(IRS1, mTOR, p70S6K) 단백질 양을 비교하였을 때, 2년 묵은지 추출물에게 더욱 활성화 되는 것을 확인할 수 있었음

또한 1년 묵은지 보다 2년 묵은지가 대사 작용을 활발할 수 있음을 예상할 수 있는 결과로서, 묵은지를 건강식품으로 이용할 시에는 최소 2년의 시간이 필요할 것으로 예측됨.

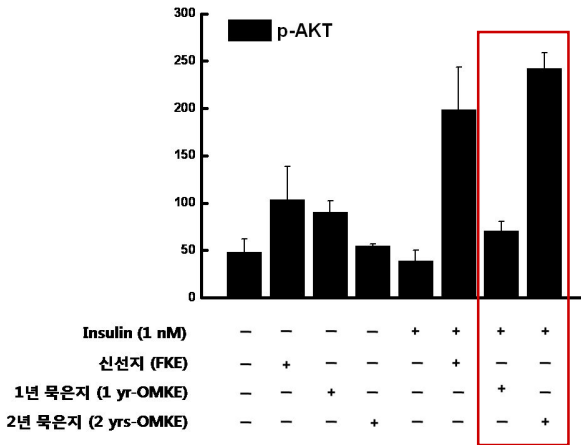


Fig 54. 인슐린과 김치 추출물을 이용한 AKT 단백질의 변화량

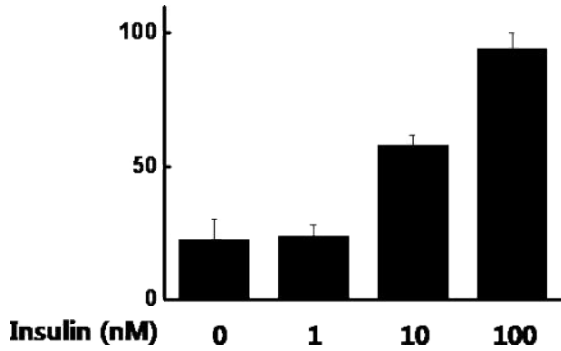


Fig 55. 인슐린 농도 증가에 따른 인산화 된 IRS 단백질의 변화량

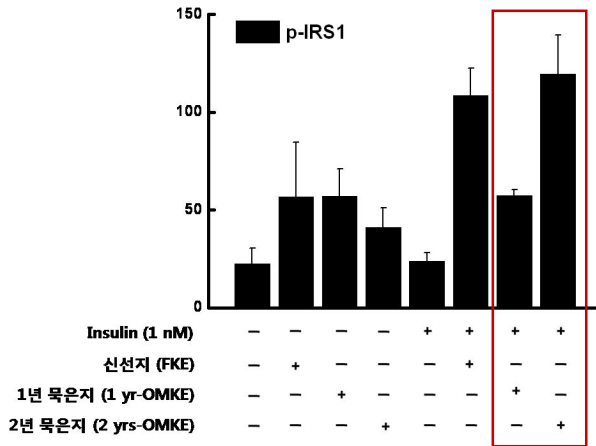


Fig 56. 인슐린과 김치 추출물을 이용한 IRS 단백질의 변화량

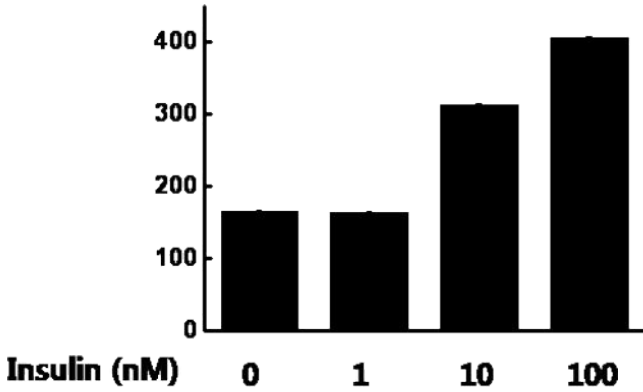


Fig 57. 인슐린 농도 증가에 따른 인산화 된 mTOR 단백질의 변화량

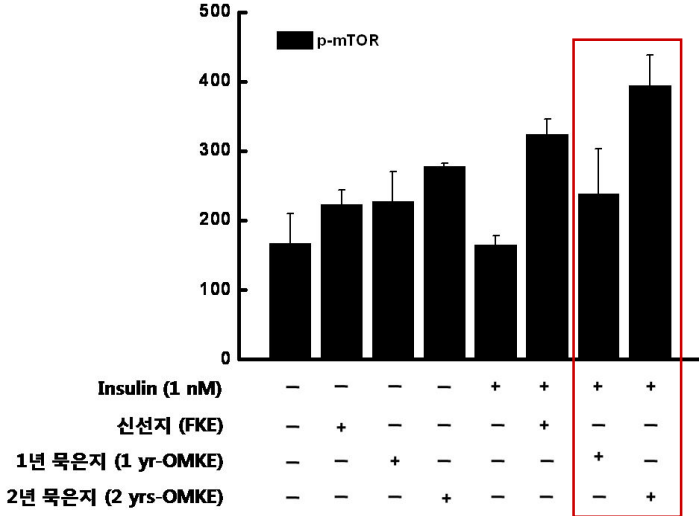


Fig 58. 인슐린과 김치 추출물을 이용한 mTOR 단백질의 변화량

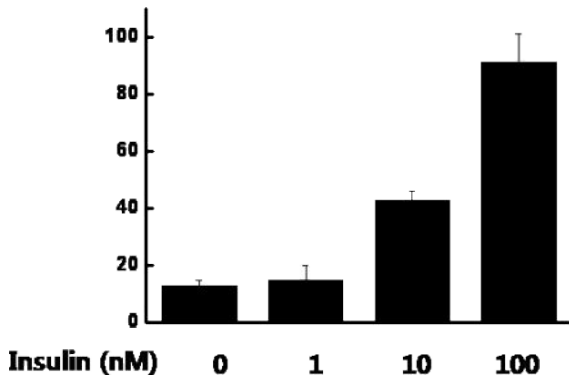


Fig 59. 인슐린 농도 증가에 따른 인산화 된 p70S6K 단백질의 변화량

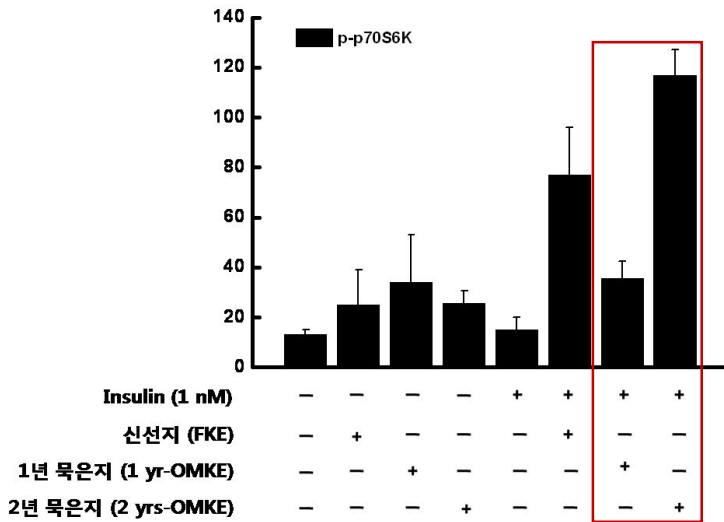


Fig 60. 인슐린과 김치 추출물을 이용한 p70S6K 단백질의 변화량

6. 목은지 추출물을 이용한 간 세포 신호 전달체계 완성

간 세포의 대사작용을 확인하기 위한 마커 유전자들로 10여종의 유전자를 이용하고 있음.

목은지 추출물을 인슐린과 함께 간 세포에 처리한 후, 앞선 결과를 바탕으로 그 래프화 하였을 때, GSK3, IGF1R, PTEN, TSC2 등의 단백질은 변화가 없는 반면 AKT, IRS, mTOR, p70S6K 등의 단백질은 2년된 목은지 추출물에서 유의성 있는 발현 결과를 보임

AKT, IRS, mTOR, p70S6K 유전자는 대표적인 Glycogenesis 신호 전달 체계의 조절자이며, 적절한 발현이 유도되지 못하면 각종 대사질환을 야기하는 것으로 알려져 있음

본 연구결과를 종합해 보면 저농도의 인슐린 (1 nM)은 간 대사활성에 영향을 줄 수 없지만 목은지 추출물을 전처리 한 후에는 저농도의 인슐린에서도 간 대사작용에 관여하는 유전자 들이 활성을 나타냄.

비록 단일물질로 분리한 것이 아닌 목은지 추출 혼합물을 이용한 연구결과이지만, 2년 된 목은지는 인슐린에 대한 간 세포내 민감성을 높여줄 수 있다는 결과를 얻었으며, 더 나아가 제 2형 당뇨병과 같은 대사질환 치료에 도움을 줄 수 있는 식품으로서의 가능성을 열어두었다는 점에서 연구의 의의가 있음.

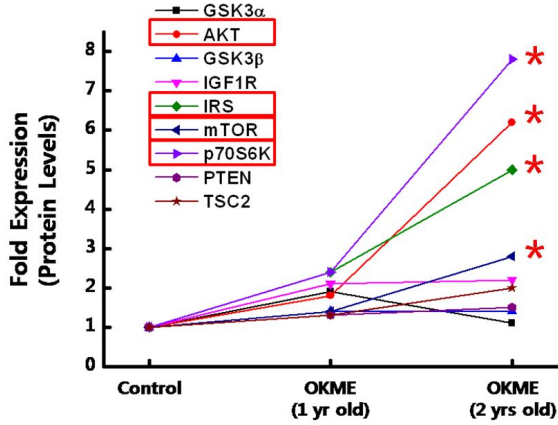


Fig 61. 대사과정과 관련된 마커 유전자들의 단백질 변화

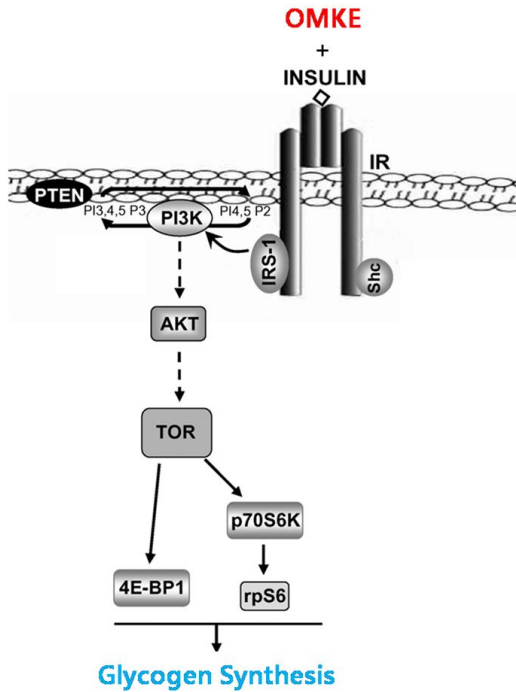


Fig 62. 목은지 추출물의 세포신호 전달 체계

7. 목은지 추출물에 존재하는 tyrosine, citrulline, ornithine, GABA처리에 따른 IRS 유전자 발현 양상

- 목은지에 존재하는 기능성 아미노산들 중 4종의 아미노산이 IRS유전자 발현에 미치는 영향을 조사하였다.
- 그 결과 특이하게도 tyrosine과 citrulline을 처리하였을 때 매우 강하게 IRS 발현을 증진시키는 효과를 보였다. 따라서 tyrosine과 citrulline은 IRS유전자 발현 증진소재로서 가능성이 있었다.

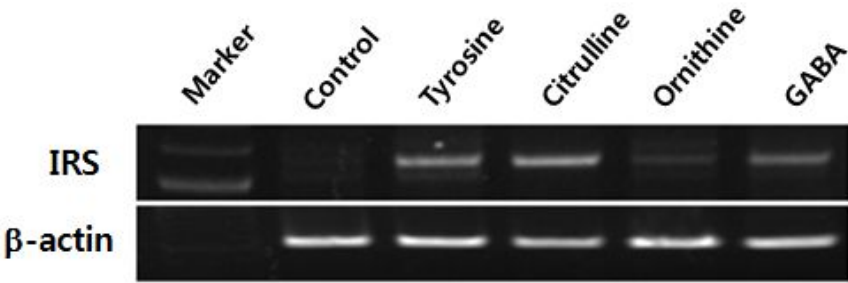


Fig 63. Tyrosine, citrulline, ornithine, GABA처리에 따른 IRS 유전자 발현 양상

제 3절 기능성소재·식품 제형화 및 상품화

1. 기능성소재·식품개발(제형화 및 상품화)

- 1) CODEX 기준, 수출용 기능성 목은지 개발<세계초일류제품>
- 2) 목은지 특이 발효 미생물 및 산물 활용 제품 개발 : (보존제, 첨가제)의 제형화
- 3) 목은지 특이효소활용 제품개발(연육제, 소화제)의 제형화
- 4) 발효공정 시스템 확립(자연발효, 종균발효)
- 5) 향암, 항염, 대사질환 유전자·목표지향적 기능성 식품개발(제형화, 상품화)의 근거확립

2. 시제품 4가지 : ①동결건조 목은지 ② 동결건조 목은지분말 ③ 목은지 분말 다시다 ④ 목은지 분말 조미료

3. 홍보교육 : JTBC(2012. 4) 목은지(차별적이고 우수한 전통발효 제조 방법) MBN(2012. 5) 목은지(차별적이고 우수한 전통발효 제조 방법)

4. 국내는 물론, 미국, 중국, 동남아시아 buyer들에게 시식, 소개, 홍보를 시행하였음, 우수성, 차별성, 맛, 다양한 용도 등을 입증

5. 기능성 소재·식품 제형화를 위한 관능검사결과

기능성 소재 및 식품 제형화를 위해 준비한 시제품 3가지를 각각의 설문지를 통해 관능검사를 실시하였다. 시제품 3가지는 각각 ① 동결건조 2년 목은지 분말, ② 동결건조 2년 목은지 분말 + 다시다, ③ 동결건조 2년 목은지 분말 + 인증된 기능성 소재들로 구성하였다. 사용목적과 유사한 제품 성격을 가진 일반 다시다 분말을 대조군으로 사용하여 관능검사 설문 대상자들에게 3가지 시제품과 함께 제공하였다.

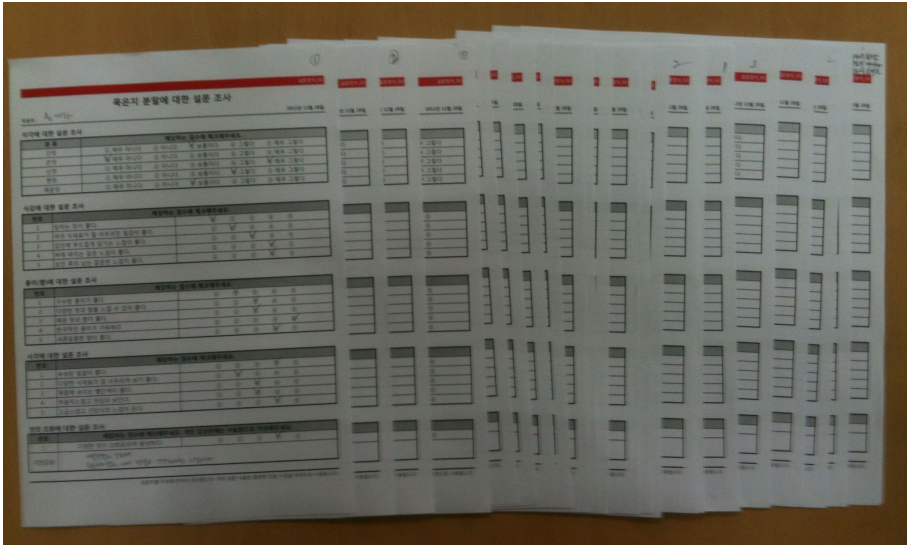
그 결과는 다음의 표에서 나타난 바와 같다. 미각, 식감, 풍미, 시각 그리고 전체적인 조화도 등의 항목에서 대조군의 일반 다시다 분말 제품보다 더 좋다는 평가 결과를 받았다. 또한 한국적인 풍미, 건강의 이미지, 고급품으로서의 제품 가치가 보여진다는 평가를 받았다.

- * 설문 대상은 총 23명(배재대학교 학생들과 외부 인사)을 참여시켜 통계처리 하였다.
- * 대조군인 일반 다시다의 기본 평점은 2점임을 전제 조건으로 제시하였다.



Fig 64. 본 연구를 통하여 개발된 시제품들

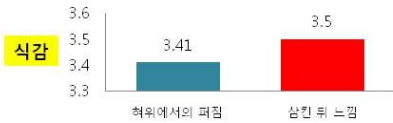
0 : 일반다시다, 1.동결건조 목은지 분말, 2. 동결건조 목은지 다시다, 3.동결건조 목은지 조미료



A : 목은지(2년) 분말에 대한 시식 평가 분석

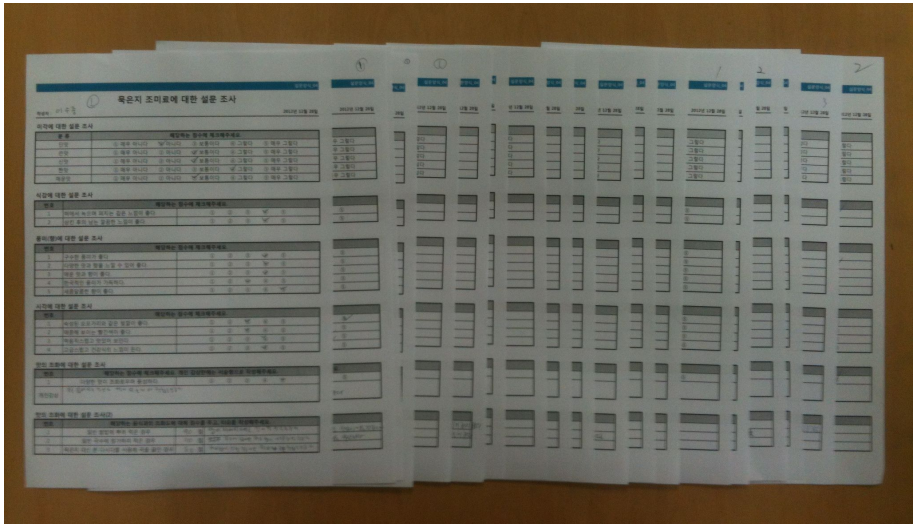
순수 목은지(2년)를 동결건조한 분말

* 각 항목 별 점수를 평균값으로 수치화 함



종합 의견

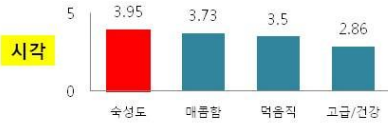
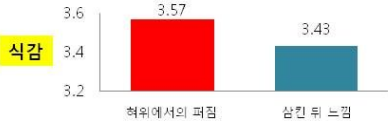
분말에 목은지 맛이 잘 담겨졌다.
 개운한 맛이다.
 정말 목은지 맛이 나서 상용성이 좋다.
 밥에 뿌려 먹는 용도라면 질감 개선이 필요하다.
 한국적인 맛이 강하다.
 건강해지는 느낌이다.



B : 목은지 다시다에 대한 시식 평가 분석

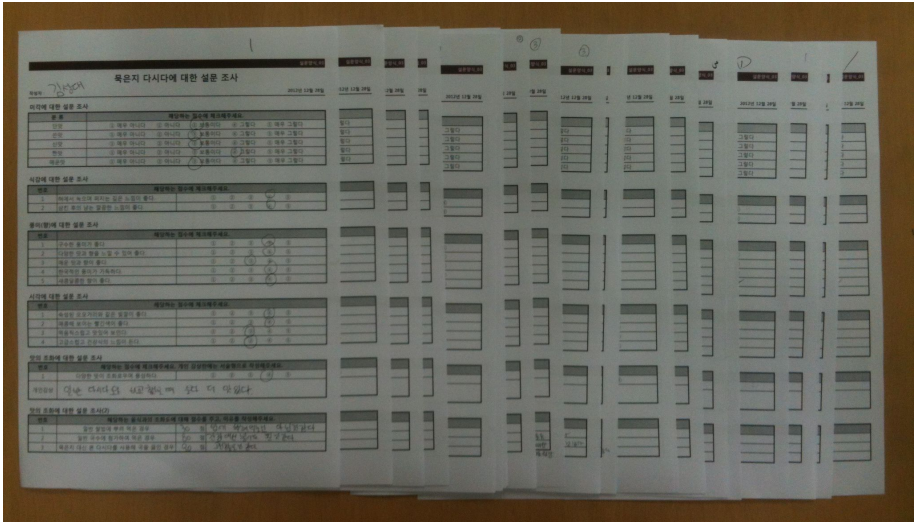
순수 목은지(2년)의 동결건조 분말 + 쇠고기 다시다

* 각 항목 별 점수를 평균값으로 수치화 함



종합 의견

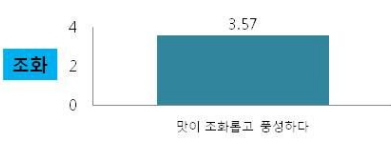
일반 다시다와 비교했을 때 더 맛있다.
씹는 맛 좀 더 좋아졌으면 좋겠다.



C : 목은지 조미료에 대한 시식 평가 분석

순수 목은지(2년)의 동결건조 분말 + 기능성이 인 증된 소재들

* 각 항목 별 점수를 평균값으로 수치화 함



종합 의견

후추향이 강했다.
 육류가 많이 들어간 음식에 적합할 듯하다.
 일반 조미료 보다 나은 것 같다.
 국이나 요리에 첨가하기 보다는 찍어먹는게 나을 듯.

대조군과 비교한 A, B, C 의 시식을 통한 관능검사 결과

1. 세가지 각각 중심이 되는 미각이 다르다는 것을 알 수 있다.
2. 삼킨 뒤의 깔끔한 맛이 순수 목은지 분말이 가장 높다.
3. 순수 목은지 분말이 한국적인 맛이 가장 강한 것으로 나타난다.
4. 순수 목은지 분말이 고급스러움과 건강함이 돋보인다.
5. 순수 목은지 분말이 맛의 조화와 균형도가 가장 높다.
6. 대조군인 일반 다시다보다 더 맛이 좋고, 한국적이라는 평이다.

제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

과제구분 (제목)	연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도
1세부과제 (목은지의 기능성소재 발굴 및 생리활성 규명)	1. 목은지와 발효숙성 미생물 및 효소의 신규 생리기능성 소재 발굴 연구	1) 목은지 시료 준비 2) 목은지 추출물 제조 3) 미생물 분석, 미생물 생리활성 및 동정 연구 4) 목은지내 세포외 효소 활성도 분석 5) 목은지 추출액의 기능성소재들의 profile 6) 항균 물질 분석 7) 장내 세균총의 변화 연구 8) 목은지 제조 공정개선 및 품질관리 규격	100%
	2. 목은지의 세포면역학적 생리활성 기능 분석	1) 면역세포에 미치는 영향 2) 면역세포 활성화 기작의 연구 3) 항암 작용 분석 4) 소염기능 분석 5) 항비만효능 분석	100%
	3. 목은지의 항염지향적 생리활성 규명연구	1) 목은지 종류별 항염 물질 탐색·선별 2) PLD 발현 및 활성화에 미치는 영향 연구 3) mTOR 신호전달계에 미치는 영향 연구 4) MAPK 신호전달계에 미치는 영향 연구 5) COX2 및 PGE2 생성에 미치는 영향 연구 6) NO 합성에 미치는 영향 연구	100%
2세부과제 (목은지로부터 대사질환 및 암 관련 유전자에 작용하는 기능성물질 규명)	4. 목은지의 대사질환 관련세포(간, 췌장, 소화기계통, 알세포(위, 대장, 결장)에 미치는 생리활성기능 규명	1) 천연 생리 활성 물질 분리 2) 목은지 추출물을 이용한 다양한 소화기 계통 암세포의 세포사멸 효과 분석 3) 목은지 추출물을 이용한 항암 유전자의 탐색 4) 목은지 추출물을 이용한 간세포와 췌장세포의 형태학적 분석 5) 목은지 추출물을 이용한 대사증후군 관련 유전자 탐색 및 기능성 식품으로의 응용 6) 탐색된 항암 유전자를 이용한 소화기 계통 항암 식품 개발로 응용	100%
3세부과제 (기능성소재 · 식품개발 · 식품 제형화 및 상품화)	5. 기능성소재 · 식품개발 (제형화 및 상품화)	1) CODEX 기준, 수출용 기능성 목은지 개발 <세계초일류제품> 2) 목은지 특이 발효 미생물 및 산물 활용 제품 개발 : (보존제, 첨가제)의 제형화 3) 목은지 특이효소활용 제품개발(연육제, 소화제)의 제형화 4) 발효공정 시스템 확립(자연발효, 종균발효) 5) 항암, 항염, 대사질환 유전자 · 목표지향적 기능성 식품 개발(제형화, 상품화)	100%

제 5장 연구개발결과의 활용계획

가. 기술적 연구 성과 기재(산업화, 특허, 논문)

- 1) 신선김치와 차별화된 목은지의 기본특성, 성분등이 규명됨.
 - ① validation biomarker 도출 : 단백질 1종, 지질 3종, 지방산 4종 이상
 - ② 표준매뉴얼(60년 전통 제조기술)-재료의 차별성

- 2) 목은지 고유의 제조기술이 과학적 근거로 확립됨.
 - ① Brand marker 확립 : 지방산 4종

- 3) 목은지만의 기능성 및 우수성에 대한 심층적 연구성과 도출
 - ① 목은지의 기능성 미생물, 생물활성, 효소활성, 성분 등의 규명
 - 세포외 효소(6종) ; 우수한 활성능 및 안정성(목은지 분말)
 - 유기산 함량비 : 숙성발효기간의 validation marker(초산/젖산)도출
 - 아미노산 생전환능(Arg→Orn)이 우수한 미생물 도출(5종)
 - 목은지의 validation marker(Hyl)도출
 - IRS발현증진소재(II형당뇨병 관련) 2종 도출(Tyr, Cit)
 - ② 항염증 기능으로 염증반응 억제완화기작으로 심층분석됨(IL-6억제)
 - IL-6, TNF- α , PLD 활성 억제

PLD는 고유의 신호전달계를 통해 생리활성물질들을 발현시켜 염증반응이 일어나도록 매개하는 꼭지 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 PLD가 목은지 처리에 의해 억제됨으로써, 생리활성물질의 발현을 억제시킬 수 있는 가능성을 발견하였다. 앞으로 보다 심도있는 연구를 통해서 목은지가 PLD를 억제시킴으로써, 체내염증반응이 억제됨을 증명하고, 더 나아가 세계 최초로 PLD 신호전달계 제어 항염증 기능성 식품으로써, 목은지의 효능을 알릴 수 있는 가능성을 제시한다.

③ 당뇨병예방 기능성 식품의 가능성 제시

목은지의 세포독성 실험으로 1mg/ml에서는 생존율에 영향을 미치지 않았다. 제2형 당뇨병 및 인슐린 세포신호전달체계에 필수적인 IRS-1, 2, 4 유전자중 IRS-1의 돌연변이 및 발현억제는 인슐린 저항성을 높여 제 2형 당뇨병 유발, 목은지 추출물 농도가 높을수록 IRS-1 유전자 발현이 증가됨.

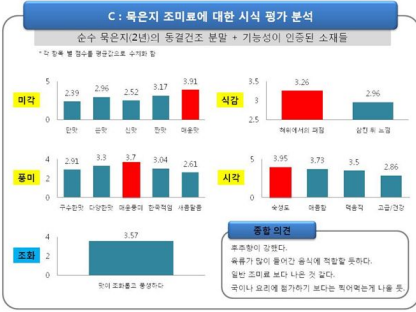
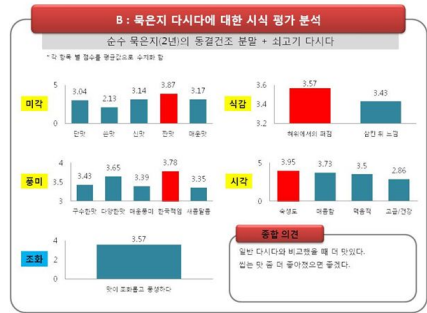
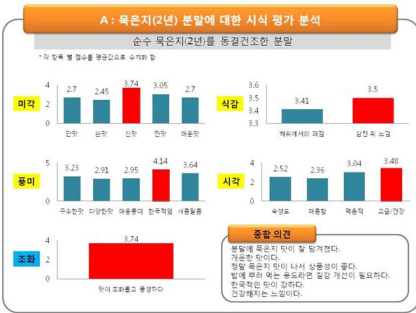
4) 목은지 가공식품 및 다양한 고부가가치 제품의 원재 개발

연구성과시제품(4종)		
① 동결건조목은지	➔	① 기능성 조미료 (오미, 항염증, 항당뇨 등)
② 동결건조목은지분말		② 보존제, 첨가제
③ 동결건조목은지다시다		③ 소화제, 연육제
④ 동결건조목은지조미료		④ 목표지향적 기능성 식품
		다양한 고가, 고기능 제품의 개발가능성 높아짐

- 5) 기술적 연구성과는 학회발표, 논문게재, 특허출원, 산업화 성과항목에 활용되어, 당초 계획된 성과지표에 도달하는데 충분함 (학회발표 5편, 특허출원 4편, 상품화 4건을 도출하였음).

나. 경제·사회적 연구 성과 기재(정책자료, 홍보, 교육지도 등)

- 1) 목은지의 기능성 소재 및 기능성 규명-첨단생명과학기술을 활용한 목표지향적 과학적 결과
- 2) 목은지의 차별성/우수성 홍보
- 3) 일본, 중국 등에서 도저히 못 따라오는 목은지 제조 기술 및 기능성 소재로서의 중요성
- 4) 이미 동결건조 분말 등 시제품을 국내는 물론, 미국, 중국, 동남아시아 buyer들에게 시식, 소개, 홍보를 시행하였음. 우수성, 차별성, 맛, 다양한 용도 등이 입증되었음.
- 5) 기술적, 경제·사회적 연구 성과내용은 정책자료, 홍보, 교육지도 등에 높이 활용될 수 있음.
- 6) 시제품 관능검사 결과를 홍보·정책 자료로 활용
- 7) 목은지 1Kg의 평균판매가격 약 5,000원, 각종 복합천연조미료 1Kg은 80,000~100,000원, 천연 조미료 분말(단품:마늘, 조개, 다시마 등)1kg은 각각 약 100,000원으로 조사되었다.
 목은지는 일반김치보다 1.5~2배가량 비싼가격에 팔수 있는 품목으로써 매출과동 등으로 인한 매출 가격폭락시 대량 구매하여 목은지 제조시 농가와 김치업체 모두 큰 수익을 얻을 수 있다.
 또한 목은지를 동결건조 분말 조미료를 만들어 관능검사 등을 통한 시장성 분석 결과 판매시 기존 제품 보다 1.5배 이상의 가격 경제성이 있을 것으로 판단된다.



- 대조군과 비교한 A, B, C 의 시식을 통한 관능검사 결과**
1. 세가지 각각 중심이 되는 미각이 다르다는 것을 알 수 있다.
 2. 삼킨 뒤의 깔끔한 맛이 순수 목은지 분말이 가장 높다.
 3. 순수 목은지 분말이 한국적인 맛이 가장 강한 것으로 나타났다.
 4. 순수 목은지 분말이 고급스러움과 건강함이 돋보인다.
 5. 순수 목은지 분말이 맛의 조화와 균형도가 가장 높다.
 6. 대조군인 일반 다시마보다 더 맛있고, 한국적이라는 평이다.

제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

PLD (Phospholipase D)는 세포막에 존재하는 글리세롤인지질 (glycerophospholipid)의 terminal diester 결합을 가수분해해서 phosphatidic acid (PA)와 결합되어 있던 head group을 분해하는 효소이다. PLD의 활성 산물인 PA는 Phospholipase A2 (PLA2)라는 효소에 의해 lyso-PA로 바뀌거나 PA phosphohydrolase에 의해 DAG로 전환되는데, 이러한 인자들은 세포 내 신호 네트워크에서 2차 전령자의 역할을 하면서 세포의 survival, proliferation, differentiation, inflammation 등 다양한 세포반응을 유도하며 세포 내에서 중요한 역할을 하고 있다.

최근에는 PLD와 관련하여 암에서 생존인자로서의 기능 연구, Neurite outgrowth 조절자로서의 기능 연구, 세포 형태변화에서의 기능 연구 등이 활발하게 이루어지고 있으며, 특히 inflammation과 관련해서도 PLD가 Nitric Oxide 합성이나 cytokine 발현 등을 통해 염증반응을 유발시키는 cascade의 상위에서 꼭지역할을 함이 잘 알려져 있고 활발한 연구가 진행 중이다. 또한 이렇게 PLD의 세포 내 다양한 기능이 알려지면서 PLD의 저해제 연구 개발 또한 중요하게 다루어지고 있지만 아직까지는 PLD 특이 억제제 개발이 전무한 현실이다.

김치가 좋은 식품으로 인정받는 이유는 발효과정에서 유산균과 미생물의 함량이 높아지기 때문이다. 특히 6개월 이상의 묵은지는 일반 김치보다 유기산이 풍부하여 감칠맛을 내기 때문에 국물을 내거나 볶음 요리 및 그 밖의 응용식품에 이용되고 있다. 많은 국내외 연구자들은 묵은지를 비롯한 각종 발효식품의 대사활성 작용의 이점을 밝혀내기 위하여 균주 분리 및 단일물질 분리에 힘쓰고 있다. 김치와 유사한 젖산 발효 식품인 서양의 pickle, sauerkraut, 그리고 숙성된 곡물 등은 일찍이 많은 연구가 진행되어 각종 대사질환에 유익한 정보를 제공하고 있다. 최근 Nutrition에 보고된 논문에 의하면 대사작용의 활성 인자로 이용되는 AKT 및 ACC 유전자가 발효된 콩에 의해 증가하는 것을 밝혀내었으며, 숙성된 Papaya는 제 2형 당뇨병을 억제하기 위한 기능성 식품으로 개발하는데 많은 노력을 기울이고 있다. 또한 Pickle 및 sauerkraut 등은 인체의 항상성 유지를 위한 대사 균형에 효과가 탁월한 것으로 알려져 있다.

제 2 세부결과에서는 묵은지가 인슐린에 대한 민감성을 향상시키고, 당뇨병을 개선하는 효능을 가질 것으로 예측하였다. 이와 같은 가설은 IRS-1, mTOR, Estrogen Receptor 및 AKT 등의 단백질 변화로 증명하였다. 본 유전자들은 이미 유수의 논문들에 의해 대사질환과 밀접한 관련 있으며, 각 유전자들을 발현하지 못하도록 knock out 마우스를 제작한 후, 고지방식 등의 식이요법 등으로 각종 질환을 유도하면, 정상

적인 마우스보다 10배 가까이 비만 및 당뇨병에 쉽게 노출된다. 목은지는 대사작용을 활성화 시키는 유전자들을 증가시킨다. 이러한 결과는 목은지가 대사질환을 개선시키는 기능성 식품으로 이용될 수 있을 것으로 예상할 수 있다.

제 7장 참고문헌

Shin-Young Park, Yong Hae Baik, Ju Hwan Cho, Sung Kim, Ki-Sung Lee, and Joong-Soo Han (2008) : Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthesis by nicotine through S6K1-p42/44 MAPK pathway and STAT3(Ser 727) phosphorylation in Raw 264.7 cells. Cytokine 44 : 126-134

Kyung-Ok Kim, Shin-Young Park, Chang-Woo Han, Hyun Kee Chung, Dae-Hyun Yoo and Joong-Soo Han (June 2008) : Effect of sildenafil citrate on interleukin-1 β -induced nitric oxide synthesis and iNOS expression in SW982 cells. EXPERIMENTAL and MOLECULAR MEDICINE, Vol. 40, No.3 : 286-293,

Shin-Young Park, Ju Hwan Cho, Weina Ma, Hye-Jin Choi, Joong-Soo Han (2010)
: Phospholipase D2 acts as an important regulator in LPS-induced nitric oxide synthesis in Raw 264.7 cells. Cellular Signalling 22(4) : 619-628

Quin Chen, Tsunaki Hongu, Taknobu Sato, Yi Zhang, Wahida Ali, Julie-Ann Cavallo, Adrianus van der Velden, Huasong Tian, Gilbert, Di, Paolo, Bernhard Nieswandt, Yasunori Konaho, Michael A. Frohman (2012) : Key roles for the lipid signaling enzyme Phospholipase D1 in the tumor microenvironment during tumor angiogenesis and metastasis. Science Signaling Vol5 Issue 249 : ra79

Choi HJ, Jung JH, HanJS (2012) : Phospholipase D1 is an important regulator of bFGF-induced neurotrophin-3 expression and neurite outgrowth in H19-7 cells. Molecular Neurobiology Volume 45, Issue 3 : Page 507-519

YoonSN, KimKS, ChoJH, MaW, ChoiHJ, KwonSJ, HanJS : PhospholipaseD1 mediates bFGF-induced Bcl-2 expression leading to neurite outgrowth in H19-7cells.

Park S, Kim da S, Kim JH, Kim JS, Kim HJ (2012) : Glyceollin-containing fermented soybeans improve glucose homeostasis in diabetic mice. Nutrition 28 : 204-211

Kahn SE (2003) : The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia* 46 : 3-19

Perseghin G, Caumo A, Arcelloni C, Benedini S, Lanzi R, Pagliato E, Sereni LP, Testolin G, Battezzati A, Comi G, Comola M, Luzi L (2003) : Contribution of abnormal insulin secretion and insulin resistance to the pathogenesis of type 2 diabetes in myotonic dystrophy. *Diabetes care* 26 : 2112-2118

Arruda Oliveira E, Gomes Cheim LM, Veloso RV, Arantes VC, Reis MA, Carneiro EM, Boschero AC, Latorraca MQ (2008) : Nutritional recovery with a soybean flour diet improves the insulin response to a glucose load without modifying glucose homeostasis. *Nutrition* 24 : 76-83

Fu Z, Liu D (2009) : Long-term exposure to genistein improves insulin secretory function of pancreatic beta-cells. *European journal of pharmacology* 616 : 321-327

Miller KC, Mack G, Knight KL (2009) : Electrolyte and plasma changes after ingestion of pickle juice, water, and a common carbohydrate-electrolyte solution. *Journal of athletic training* 44 : 454-461

Alzaid AA (1996) : Insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. A review. *Acta diabetologica* 33 : 87-99

White MF (1997) : The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 40 Suppl 2 : S2-17

White MF (1998) : The IRS-signalling system : a network of docking proteins that mediate insulin action. *Molecular and cellular biochemistry* 182 : 3-11

White MF (2002) : IRS proteins and the common path to diabetes. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 283 : E413-422

Mark O'brien, Rita R. Colwell (July 1987) : A Rapid Test for Chitinase Activity That Uses 4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl- β -D-Glucosaminide. *Applied And*

Environmental Microbiology. Vol. 53, No. 7 : 1718 - 1719

김혜영, 이태수 (2009) : *Bacillus amyloliquefaciens* IUB158-03이 생산하는 향진균 물질의 생화학적 특성 및 독성. *Journal of Life Science* 2009. Vol. 19, No. 11 : 1672 - 1678

Arne Tronsmo¹ and Gary E. Harman (1993) : Detection and Quantification of N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase, Chitobiosidasw, and Endochitinase in Solutions and on Gels. *Analytical Biochemistry* 208 : 74-79

S. J. Wirth and G. A. Wolf (1992) : Micro-Plate Colourimetric Assay for Endo-Acting Cellulase, Xylanase, Chitinase, 1, 3- β -Glucanase and Amylase Extracted from Forest Soil Horizons. *Soil Biol Biochem.* Vol 24, No. 6 : 511 - 519

Giovanna Ferro-Luzzi Ames, Catherine Prody, Sydney Kustu (1984) : Simple, Rapid, and Quantitative Release of Periplasmic Proteins by Chloroform. *Journal of Bacteriology.* Vol. 160, No. 3 : 1181 - 1183

유진주, 박형주, 김수곤, 오석홍 (2009) : 김치로부터 오르니틴 생성능을 갖는 *Weissella*속 균주의 분리, 동정 및 특성. *The Korean Journal of Microbiology*, Vol. 45, No. 4 : 339 - 345

김민정 (2010) : 가바와 오르니틴 생산능력이 있는 유산균을 이용한 김치의 제조, 김치의 특성 및 일부 효능 분석.

Yong Ju, Kwon (1976) : Studies on the Chemical Composition of Apples in Jeonju District. Determination of amino acid contents by TLC densitometry method.

Wan-Hee, Park (1982) : Chemical Components of Mushrooms. Survey of Amino Acids by TLC. *한국 생약학회지.* 13(1) : 43 - 46

Abdelouahid Maghnoouj, Tiago Franco de Sousa Cabral, Victor Stalon, Corinne Vander Wauven (1998) : The arcABDC Gene Cluster, Encoding the Arginine Deiminase Pathway of *Bacillus Licheniformis*, and Its Activation by the Arginine

Repressor ArgR. Journal of Bacteriology. 180(24) : 6468

M. E. Arena, F. M. Saguir, M. C. Manca de Nadra (1999) : Arginine, Citrulline and Ornithine Metabolism by Lactic Acid Bacteria from Wine. International Journal of Food Microbiology. 52 : 155 - 161

Mario Eduardo Arena, Maria Cristina Manca de Nadra, Rosario Munoz (2002) : The arginine deiminase pathway in the wine lactic acid bacterium *Lactobacillus hilgardii* X1B : Structural and Functional Study of the arcABC genes. GENE 301 : 61 - 66

Luciano Lepri, Alessandra Cincinelli (2010) : Amino Acids and Derivatives: TLC Analysis. Encyclopedia of Chromatography, Third Edition DOI : 10. 1081 : 57

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 목은지의 기능성소재 발굴 및 생물기능성 규명		
	(영문) Discovery and Biofunctionality of Bioactive Compounds Originated from Old Matured Kimchi		
연구 기관	배재대학교	연 책 임 자	(소속) 배재대학교
참 여 기 관	충남대학교		(성명) 이 기 성
	오모가리영농농림 주식회사		
연구 비	계 170,000 천원	총 연구 기간	2011년 12월 30일~ 2012년 12월 29일까지 (12개월)
참 여 연구 원	18명 (연구책임자: 1명, 책임연구원: 2명, 연구원: 5명, 연구보조원 5명, 보조원 5명)		
<p>○ 연구개발 목표 및 내용</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 목은지의 기능성소재 발굴 및 생리활성 규명 2. 목은지로부터 대사질환 및 암 관련 유전자에 작용하는 기능성물질 규명 3. 기능성소재 · 식품 제형화 및 상품화 <p>○ 연구결과</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 본 연구는 목은지의 기능성 소재와 생물 기능성을 규명하고자 하였다. 목은지에 존재하는 미생물과 숙성발효 중 생성되는 발효산물 및 효소들의 기능성을 조사 분석 하므로써 “기능성” 목은지를 개발하고, 더 나아가 이들 기능성 소재를 활용한 건강기능성 제품들을 개발하는 것이 목표임(validation marker, 우수한 생전환능 미생물과 기능성소재 확립). 상기 연구와 연계하여 목은지가 함유하고있는 다양한 성분 중 항염 효과가 탁월한 특정 물질을 탐색, 동정화 하고 염증 매개반응의 폭지에 위치한 PLD 신호전달계에 대한 억제점을 규명함으로써, 목은지의 생체 기능성 화합물의 존재를 과학적으로 증명하고 세계 최초로 PLD 신호전달계 제어 항염증기능성 식품으로 활용 · 개발하고자 함. (IL-6, IL-1b, PLD의 활성을 억제하여 항염기능성 식품으로의 가능성 규명) 2. 소화기 계통의 암세포와 대사질환 연구를 위한 간 · 췌장세포를 이용하여, 목은지의 항암효과 및 대사질환 메카니즘을 분자 유전학적으로 규명함으로써 항암효과 및 대사증후군 치료효과를 가지는 기능성 소재를 발굴 함. 이를 활용하여 강력하게 업그레이드된 항암 및 대사질환용 기능성 식품을 개발할 기초적 지식 마련함. (인슐린 관련 세포신호 전달 유전자의 활성 확인-IRS, AKT, mTOR, p70S6K 등) 3. 궁극적으로, 목은지의 미생물, 발효대사산물, 효소, 무기물 등 기능성 소재들과 이들의 유전자 수준의 목표 지향적 기능성 규명으로, 기능성 목은지, 보존제, 첨가제, 연육제, 소화제, 면역증강제, 항암 · 항염 · 대사 질환 유전자를 표적으로하는 첨단기능성 식품을 개발하고자 함. (목은지 가공식품을 이용한 고부가가치 제품의 생산 체계 구축)4종의 시제품 도출 <p>○ 연구성과 및 성과활용 계획</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 소화기 계통의 암세포와 대사질환 연구를 위한 간, 췌장 세포를 이용하여 목은지의 항암효능 및 대사질환 메카니즘을 과학적인 방법으로 밝혀낸다면 김치 시장의 경쟁관계에 있는 중국과 일본보다 효율적인 마케팅 전략이 될 수 있을 것임. 2. 목은지원료의 연구와 개량법을 통해 목은지를 항당뇨, 항염, 항암효과를 가지는 기능성 식품으로 업그레이드 할 수 있는 기틀을 마련할 수 있을 것으로 사료 됨. 			

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 한식세계화 용역연구사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 한식세계화 용역연구사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.