

119025-2

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)

맞춤형혁신 식품 및 천연안심소재기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003492-01

흑국균을 이용한 천연 흑(black) 식품색소 개발 및 상업화

2021.05.

주관연구기관 / (주)선그린

협동연구기관 / 경기대학교 산학협력단

세종대학교 산학협력단

2021

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

농림축산식품부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “흑국균을 이용한 천연 흑(black) 식품색소 개발 및 상업화”(개발기간 : 2019.05.20. ~ 2020.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021. 5. .

주관연구기관명 : (주)선그린

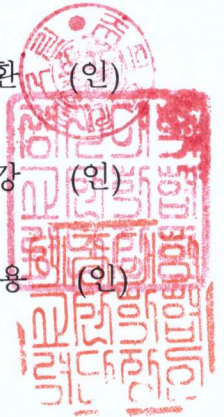
(대표자) 김 진 환 (인)

협동연구기관명 : 경기대학교 산학협력단

(대표자) 윤 여 강 (인)

협동연구기관명 : 세종대학교 산학협력단

(대표자) 이 수 용 (인)



주관연구책임자 : 김 진 환

협동연구책임자 : 김 현 석

협동연구책임자 : 신 학 동

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	119025-2	해당단계 연구기간	2019.05.20. - 2020.12.31.	단계구분	(총단계)
연구사업명	단위사업	농식품기술개발사업			
	사업명	미래형혁신식품기술개발사업			
연구과제명	대과제명	(해당 없음)			
	세부과제명	흑국균을 이용한 천연 흑(black) 시품색소 개발 및 상업화			
연구책임자	김진환	해당단계 참여연구원 수	총: 19명 내부: 4명 외부: 15명	해당단계 연구개발비	정부: 246,000천원 민간: 82,000천원 계: 328,000천원
		총연구기간 참여연구원 수	총: 38명 내부: 8명 외부: 30명	총연구개발비	정부: 418,000천원 민간: 139,400천원 계: 557,400천원
연구기관명 및 소속부서명	경기대학교 산학협력단(식품생물공학전공), 세종대학교 산학협력단(식품생명공학과)			참여기업명 (주)선그린	
국제공동연구	상대국명: (해당 없음)			상대국 연구기관명: (해당 없음)	
위탁연구	연구기관명: (해당 없음)			연구책임자: (해당 없음)	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의 4에 따라 일반과제로 분류
-------------------------	---

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호		Y									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약

본 연구개발은 흑국균(*black Aspergillus* sp.)을 이용한 천연 흑(black) 식품색소 생산기술 개발을 목표로 수행되었으며, 이는 수입산 타르계 및 오징어먹물 유래 흑 색소의 흑국 유래 천연 흑(black) 식품색소로 대체가 기대됨.

- 흑국균의 최적 배양 기술 확립 및 흑(black) 색소 생성 최적화를 수행하여, 식품가공부산물을 이용한 흑국균의 고체배양기술 및 경제적 흑국(black koji) 제조 기술을 개발하여 관련 내용을 특허 출원 완료하였음.
- 더불어 차세대염기서열 분석 기법을 활용한 유전체 분석 및 마우스 모델 기반 경구 투여 실험을 통하여 개발된 흑국 유래 천연 흑 색소의 안전성을 확인함.
- 흑국으로부터 흑(black) 색소의 추출·정제 공정 최적화 및 소재화 기술 개발을 수행하여 최종적으로 대량생산 공적 확립 및 제품화를 통한 매출을 달성함.
- 제빵, 제면과 아이스크림에 대한 흑국 유래 흑 색소 제품들(분말상과 농축액) 적용가능성을 확인하여 최소 사용 농도를 제시하였음.

보고서 면수

12-34쪽, 107쪽

12-34쪽, 60-94쪽

35-59쪽, 108쪽

95-106쪽

요 약 문

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p><연구의 목적></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 흑국균(black <i>Aspergillus</i> sp.)을 이용한 천연 흑(black) 식품색소 생산기술 개발 ▪ 수입산 타르계 및 오징어먹물 유래 흑 색소의 흑국 유래 천연 흑(black) 식품색소로 대체 ▪ 액상(농축액) 및 분말 제형의 천연 흑(black) 식품색소 제품화 및 상업화 <p><연구내용></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 흑국으로부터 흑(black) 색소의 추출·정제 공정 최적화 및 소재화 기술 개발 ▪ 흑국 유래 흑(black) 색소의 물리화학적 특성 및 안정성 평가 ▪ 흑국균의 최적 배양 기술 확립 및 흑(black) 색소 생성 최적화 ▪ 비지흑국으로부터 흑(black) 색소 대량생산 공정 구축 및 제품화 ▪ 개발된 흑(black) 색소의 가공식품 적용가능성 탐색을 통한 사용기준 설정 ▪ 식품가공부산물을 이용한 흑국균의 고체배양기술 및 경제적 흑국(black koji) 제조 기술 개발
<p>연구개발성과</p>	<p><연구개발결과></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 천연색소 및 흑 색소 시장현황 조사 완료 ▪ 흑 색소의 제품현화 조사를 통한 현재 시판 중인 오징어먹물색소의 한계점 파악 및 이를 보완하기 위한 흑국 기반 흑 색소 개발 필요성 규명 ▪ 상업화된 흑색 계연 색소 특성 분석을 통한 흑국 유래 흑 색소의 기준 설정 완료 ▪ 본 연구로 개발될 최종제품인 흑국 유래 흑 색소의 품질규격은 오징어먹물색소의 성분규격인 성상, 이물, 비소, 납의 항목의 기준을 준용하며, 색가의 기준은 “5 이상”의 완화 필요성 제시 ▪ ATCC 기탁번호가 부여된 흑국균 12종을 확보하고, 일반적인 배양 배지 조성 및 배양 조건을 설정함. ▪ 확보된 12종의 흑국균의 최적 배양 조건 확립 및 최적 흑 색소 생성 조건 최적화를 통한 우수 흑 색소 생성 흑국균으로 <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16513을 선별함. ▪ 최적 흑 색소 생성 배양 조건에서 pH, dextrose 함량, 온도, 기간, 배지의 양 및 배지 내 탄소원 등에 따른 최적 흑 색소 생성 조건을 한천배지 20 ml 기준으로 1% dextrose 함유의 yeast malt 배지에서 pH 7.0, 37°C에서 일주일 이상 배양으로 설정함. ▪ 산업에서의 활용도를 높이기 위하여 식품가공부산물인 비지(대두가공부산물)와 감자박을 활용한 경제적 배지 활용 가능성을 확인하여, 비지 대비 1배의 증류수를 첨가한 배양 조건에서 흑 색소 생성이 최적으로 진행되는 흑국 배양 기법을 구축함. ▪ 최종 흑 색소 생산 후보로 선정된 <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16513 균주에 대하여 차세대염기서열분석 기법을 적용하여, 전체 유전체 분석을 수행하여 최종 36.9 Mb의 유전체 염기서열 정보를 획득함. ▪ <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16513 균주에서 10,902 종의 유전자 정보를 확인하였으며, 이 중 포자의 흑 색소 생성에 영향을 미치는 4개의 주요 색소 대사 관련 유전자를 확인하고 특이적 요소를 확인함. ▪ <i>Aspergillus niger</i> genome database를 기반으로 <i>Aspergillus niger</i> 균주들의 genome 내 독소 생성 관련 유전자 존재 유무를 분석하여 본 균주가 독소 생성능이 없음을 유전체 수준에서 확인함. ▪ 흑 색소를 추출 및 제조에 있어 원료인 흑국은 분쇄하여 60 mesh 체망을 통과시킨 미분을 사용하는 것이 타당함을 확인함. ▪ 용매추출법을 이용하여 흑국 분말로부터 흑 색소를 추출 시 추출용매는 클로로포름을 사용하며, 흑국 분말과 클로로포름을 1:10의 중량비율로 혼합하여 상온에서 1시간 추출하는 최적 추출 조건을 확립함.

<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 추출된 흑 색소는 회전증발농축기로 클로로포름을 모두 제거하고 농축한 후 이를 다양한 건조법으로 건조하여도 분말상의 흑 색소 확보의 어려움을 확인하고, 농축액 확보 가능성을 확인함. ▪ 흑국색소의 원료인 흑국은 입도 조절, 분산, 효소반응, 여과, 열풍건조 및 분쇄 단계를 통하여 최종 25°Brix 이상으로 농축하여 흑국색소 농축물을 제조 기법을 구축함. ▪ 개발된 대량생산공정은 흑국 유래 흑 색소를 약 300%의 수율로 생산할 수 있으며, 이중 대부분이 액상(농축액) 흑국 유래 흑 색소임. ▪ 흑국을 이용하여 생산된 분말상 및 액상 흑국 유래 흑 색소는 품목제조보고를 통해 제품화를 달성하였고, 이중 액상 흑국 유래 흑 색소(흑국엑기스)의 매출을 발생함. ▪ 흑국으로부터 제조된 흑국 유래 흑 색소 성분조사를 수행하여 조단백질 함량 및 포도당 존재 등을 확인함. ▪ 수분용해지수는 캐러멜색소, 오징어먹물색소, 흑국색소의 순서로 증가하였으며, 수분흡수지수는 캐러멜색소는 유의적으로 측정되지 않았으며, 오징어먹물색소, 흑국색소의 순서로 증가하였고, 흑국색소는 수분흡수력이 가장 적음을 확인함. ▪ 용해도는 열처리에 의해 오징어먹물색소에서 증가하였지만 흑국색소에서는 미미한 증가만 확인되며, 색 특성은 흑국색소가 오징어먹물색소보다 더욱 강한 흑색을 나타냄을 확인함. ▪ 오징어먹물색소와 용액추출법에 의한 용액흑국색소는 광, 온도, 단순당류, pH 5-8 범위에서 안정함을 규명함. ▪ 효소정제법에 의한 효소흑국색소는 자외선과 다가금속이온에 안정하였으나 온도, 단순당류, 산도, 유기산에 대해 저장기간에 따라 감소함. ▪ 저장기간에 따른 안정성은 25℃와 50℃에서 2개월까지 저장한 경우 여전히 안정한 상태를 유지함. ▪ 효소정제법에 의한 흑국 유래 흑 색소와 시판되는 오징어먹물색소를 랫드에 14일간 반복 경구 투여한 결과 혈액과 간, 신장, 폐, 비장에서 시험물질 투여와 관련된 독성학적 변화는 관찰되지 않아, 본 과제에서 개발된 흑국 유래 흑 색소는 안전성을 확인함. ▪ 제빵, 제면, 제과와 아이스크림에 대한 흑국 유래 흑 색소 제품들(분말상과 농축액) 적용가능성을 확인하여 최소 사용 농도를 제시하였음. <p><연구개발성과></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 특허출원(국내) : 1건 / 기술이전 : 1건(기술료 : 20,000천원[VAT 별도]) ▪ 제품화 : 2건(흑국 엑기스, 흑국 건조분말/국내매출 : 2.5백만원) ▪ SCI논문 : 1편 심사중/ 비SCI 논문 : 2편 심사중/ 학술발표 : 8건 ▪ 고용창출 : 3명 ▪ 전문인력양성 : 3명
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 본 연구개발로부터 얻은 결과들은 추가적인 특허출원/등록, 논문발표 및 기술이전의 근거로 활용 ▪ 본 연구개발을 통해 타르계열 흑색소 및 오징어먹물 흑색소의 사용처를 대상으로 개발될 흑국 유래 천연 흑 식품색소로 대체 공급 ▪ 본 연구개발로 구축된 흑색소 생산 기법은 식품 제조 중 발생하는 부산물인 콩비지를 사용함으로써 환경문제 해결에 기여하고 폐기비용의 절감이 기대 ▪ 개발된 천연 흑 식품색소의 상업화로 국내의 블랙푸드 시장의 활성화 및 채식주의자용 블랙푸드 시장 창출 ▪ 본 연구과제에서 도출된 흑국 유래 천연 흑 식품색소의 안정성 평가 기술 및 흑 색소의 안정성에 대한 데이터베이스 구축으로 추후 다양한 농산물 및 식품 유해성분의 안전성 평가 기술로 활용 ▪ 국내의 천연 흑 식품색소 시장의 개척을 통해 천연 색소 산업의 활성화 기대 및 수입에 의존하는 오징어먹물 유래 흑 색소의 대체로 수입대체 효과 기대 ▪ 흑국 유래 천연 흑 식품색소를 국내에서 생산함으로써 흑 색소 사용업체에 안정적으로 천연 흑 식품색소를 공급 가능 및 가격경쟁력 확보 가능

	<ul style="list-style-type: none"> 안전성이 검증되었고 오랫동안 다양한 형태로 섭취하여 온 흑국균에 의한 흑국으로 부터 천연 흑 식품색소를 개발함으로써 소비자들의 천연 및 합성 색소에 대한 안전성에 대한 불안감 해소 				
국문핵심어 (5개 이내)	천연	식품색소	흑 색소	흑국균	식품착색
영문핵심어 (5개 이내)	Natural	Food colorant	Black colorant	Black <i>Apergillus</i> sp.	Food coloring

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

< 목 차 >

제1장. 연구개발과제의 개요	1
제2장. 연구수행 내용 및 결과	5
제3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	116
제4장. 연구결과의 활용 계획 등	121
붙임. 참고문헌	123
<별첨 1> 연구개발보고서 초록	
<별첨 2> 자체평가의견서	
<별첨 3> 연구성과 활용계획서	

제1장. 연구개발과제의 개요

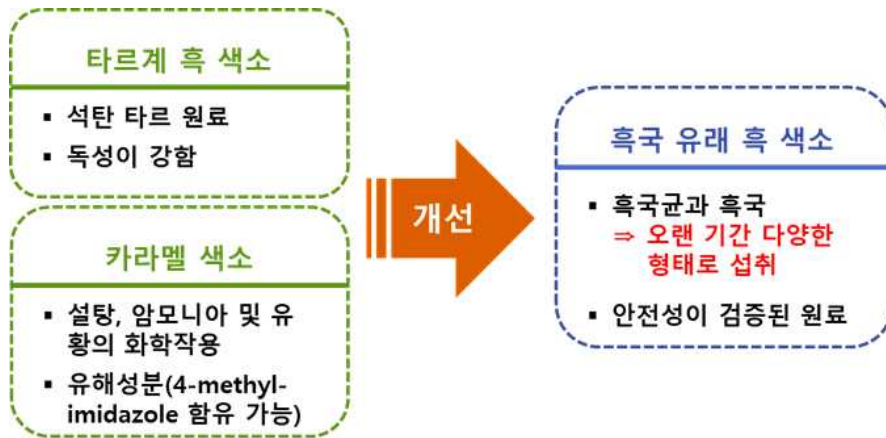
제1절. 연구개발 목적

- 흑국균(black Aspergillus sp.)을 이용한 천연 흑(black) 식품색소 생산기술 개발
- 수입산 타르계 및 오징어먹물 유래 흑 색소의 흑국 유래 천연 흑(black) 식품색소로 대체
- 액상(농축액) 및 분말 제형의 천연 흑(black) 식품색소 제품화 및 상업화

제2절. 연구개발의 필요성

- 가공식품에 있어서 착색이라 하면, 인간의 식욕 증진, 감퇴에 관련된 “외관”에 큰 영향을 주는 요소이며, 소비자의 구매의욕에 직접적으로 연관된 중요한 부분이고, 원료의 색의 분산을 보정하여, 균일한 제품의 제조를 위한 색조 조정은 가공식품에 필요하다.
- 세계 식용색소 시장 규모는 2016년 17억 9,000만 달러로 추산되며, 2025년까지 매년 연평균 5.9%이상 성장할 것으로 기대된다(Grand View Research, Food Colors Market Size, Share & Trend Analysis Report 2018).
- 식용색소의 활용범위도 넓어지고 있는 추세로 기존 식용색소가 많이 활용되어 온 음료제품 뿐만 아니라, 가정식 대체식품(home meal replacement, HMR)을 포함한 식품들의 전반적인 분야에 활용이 증대되고 있다.
- 세계적으로 미국을 비롯해 유럽, 호주, 일본에서는 웰빙 트렌드의 건강 지향적 제품이 대두되어 천연색소 수요가 지속적으로 증가하고 있으며 인공색소를 천연색소로 대체한 제품들이 지속적으로 출시되고 있다.
- 천연색소는 인공합성색소와 다르게 안전성이 높아 신뢰성이 있고 또 색조의 종류가 많아 다양하게 조합할 수 있으며 가식할 수 있는 식품의 성분이 대부분이기 때문에 모든 식품의 착색에 도움이 되고 있다.
- 그러나 천연색소는 식품적용에 대한 잠재력이 높고 식품분야 전반에 널리 활용되고 있지만, 천연색소는 온도, 가열, pH, 빛, 습기, 자외선 등 외부조건에 의해서 쉽게 변화되는 큰 단점이 있어 가공과정이나 유통과정 중에 안정성을 유지할 수 있는 기술들의 적용이 필요하다.
- 천연색소 시장 공략을 위해서는 다양한 천연색소 소재의 제형화 기술뿐만 아니라 안정화 기술이 요구되며 주로 국외에서 활발히 진행되고 있는 코팅기술의 접목과 개발이 절실히 필요한 실정이다.

- 국내에서도 건강한 식품에 대한 소비자들의 수요가 급격히 증가하며 이에 따라 천연색소의 국내 시장도 확대되고 있는 상황으로, 국내 천연 식용색소의 생산량은 2014년 5,070 MT에서 2017년 6,058 MT 수준으로 증가하며 연평균 4.6% 이상의 성장세를 보이고 있다.
- 최근 검은색을 띠는 식품들은 항산화 성분이 풍부하여 노화를 효과적으로 관리하고 혈관 노폐물을 제거해 신진대사를 활발하게 한다는 연구결과들의 지속적인 보고로 인해 소비자들의 블랙푸드(black food)에 대한 관심과 소비가 증대되고 있다.
- 국내에서 허가된 흑색 계열의 식용색소들은 타르계열의 합성색소들의 조합을 통해 제조된 흑 색소 혼합제제, 캐러멜 색소와 오징어먹물색소가 있으며, 국내에서는 허가되지 않았지만 일본 등에서 사용가능한 수증기부활법에 의한 식물탄말색소가 있다.
- 타르계 흑 색소는 석탄 타르로부터 합성된 인공색소로 독성이 강해 엄격한 기준규격에 따라 사용되며, 최근 건강지향 식품 트렌드와 소비자 선호도와 부합하지 않아 식품에 대한 사용이 제한되고 있다.
- 캐러멜 색소는 현재 국내에서 천연색소로 분류되고 있지만, 현장에서는 설탕, 암모니아 및 유허의 화학작용으로 생산되며 암모니아 첨가로 인해 발암물질인 4-methylimidazole이 생성되어 검출되는 등 최근 캐러멜 색소의 독성안전성에 대한 이슈가 존재하는 상황이다.
- 식용색소의 독성안정성으로부터 자유로우면서 식품을 검은색으로 착색할 수 있는 색소는 현재 국내에서 오징어먹물색소가 유일하다. 최근 오징어먹물색소를 이용하여 제과, 제빵 및 제면뿐만 아니라 아이스크림도 검은색으로 착색한 블랙푸드가 요식업체 및 가공식품업체를 중심으로 조리 및 생산되어 시판되고 있다.
- 오징어먹물색소는 국내생산보다는 주로 수입에 의존하고 있다. 2017년 기준으로 약 6 MT 국내 생산에 그쳤으며, 수입량은 2013년 기준으로 14,433 kg에서 2017년 기준으로 52,922 kg으로 연평균 38.4%의 증가 추세를 보이고 있다.
- 또한 오징어먹물색소는 가격이 높고, 비린내와 같은 특유의 이취가 존재하며, 어족자원 부족 시 안정적 생산 및 공급이 어려우며, 동물성으로 Vegan 제품에는 적용이 불가능한 한계점을 보유하고 있다.
- 본 연구에서는 지속적인 천연색소시장의 확대와 흑 색소 수요를 고려하여 예로부터 전통주 발효 등의 원료로 활용되어 왔던 흑국(black koji)로부터 흑 색소를 개발하여 앞에서 설명한 것과 같은 기존 타르계 흑색 혼합제제, 캐러멜 색소와 오징어먹물색소들의 문제점과 한계를 해결하고자 한다.



<기존 흑색 계열 색소의 안전성 이슈 해결방안>



<개발될 흑국 유래 천연 흑 색소의 오징어먹물색소의 대체가능성>

○ 개발될 흑국 유래 천연 흑 식품색소는 기존 타르계 흑 색소, 캐러멜 색소 및 오징어먹물 유래 흑 색소를 대체할 수 있으며, 기존 흑 색소 시장을 잠식할 수 있는 높은 잠재력을 보유한 천연색소이며, 향후 국내 흑 색소 시장을 선도할 천연 색소소재일 것으로 예상된다.

제3절. 연구개발 범위

1. 1차년도 연구개발 범위

- 흑국으로부터 흑(black) 색소의 추출·정제 공정 최적화 및 소재화 기술 개발
- 흑국 유래 흑(black) 색소의 물리화학적 특성 및 안정성 평가
- 흑국균의 최적 배양 기술 확립 및 흑(black) 색소 생성 최적화

2. 2차년도 연구개발 범위

- 비지흑국으로부터 흑(black) 색소 대량생산 공정 구축 및 제품화
- 개발된 흑(black) 색소의 가공식품 적용가능성 탐색을 통한 사용기준 설정
- 식품가공부산물을 이용한 흑국균의 고체배양기술 및 경제적 흑국(black koji) 제조 기술 개발

제2장. 연구수행 내용 및 결과

제1절. 식품용 흑 색소의 시장 및 제품 현황

1. 천연색소 및 흑 색소 시장 현황

- 세계 식용색소 시장 규모는 2016년 17억 9,000만 달러로 추산되며, 2025년까지 매년 연평균 5.9% 이상 성장하는 것으로 예측된다(Grand View Research, Food Colors Market Size, Share & Trend Analysis Report 2018).
- 국내에서도 건강한 식품에 대한 소비자들의 수요가 급격히 증가하며 이에 따라 천연색소의 국내 시장도 확대되고 있는 상황이다. 이에 국내 천연 식용색소의 생산량은 2014년 5,070 MT에서 2017년 6,058 MT 수준으로 증가하며 연평균 4.6% 이상의 성장세를 보이고 있다(표 1-1).

[표 1-1] 국내 천연색소 생산 실적(2013-2017) (식품의약품안전처 통계자료)

품 목 명	2013년			2014년			2015년			2016년			2017년		
	국내판매액	점유율	증가율	국내판매액	점유율	증가율	국내판매액	점유율	증가율	국내판매액	점유율	증가율	국내판매액	점유율	증가율
홍화황색소	1,180,320	0.09	0.05	1,030,250	0.08	-12.71	872,771	0.07	-15.29	1,465,629	0.12	67.93	1,087,998	0.08	-25.76
할성단	2,131,638	0.17	-6.14	1,963,240	0.16	-7.90	2,483,608	0.21	26.51	2,346,638	0.19	-5.51	2,237,014	0.16	-4.67
효모	6,601,392	0.52	-2.42	6,716,912	0.53	1.75	6,718,086	0.56	0.02	7,436,845	0.61	10.70	7,344,745	0.52	-1.23
효모추출물	1,684,992	0.13	-8.06	1,875,202	0.15	11.29	2,280,164	0.19	21.60	1,649,943	0.14	-27.64	1,788,514	0.13	8.39
향신료 올레오레진류	365,269	0.03	-19.67	376,282	0.03	3.02	198,893	0.02	-47.14	553,991	0.05	178.54	1,053,862	0.07	90.23
포스포리파아제	12,000	0.00	100.00	91,500	0.01	662.50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
로진	698,400	0.05	-64.20	198,135	0.02	-71.63	79,875	0.01	-59.69	18,400	0.00	-76.96	-	-	-100.00
오징어먹물색소	56,520	0.00	21.37	53,835	0.00	-4.75	126,111	0.01	134.25	159,687	0.01	26.62	319,964	0.02	100.36

- 하지만 국내 식용색소 생산의 80% 이상 비중은 캐러멜 색소에 치우쳐져 있으며, 그 이외 식용색소 생산 증가는 미비한 수준으로 천연색소 생산 원천기술 확보는 국내 천연 식용색소 생산 확대를 위해 절실히 필요한 시점이다(식품의약품안전처, 식품 및 식품첨가물 생산 실적 통계집, 2014~2017) (표 1-2).
- 국내에서 흑 색소로 활용 가능한 천연 흑 색소는 오징어먹물색소가 유일하며, 오징어먹물색소는 2017년 기준으로 약 6 MT 만이 국내에서 생산되었으며, 대부분의 흑 색소 수요는 수입에 의존하는 상황이다.

○ 오징어먹물 색소 수입량은 2013년 기준으로 14,433 kg에서 2017년 기준으로 52,922 kg으로 연평균 38.4%의 증가 추세를 보이고 있다(표 1-3). 오징어의 생산량에 따라 생산이 불안정한 오징어먹물 유래 흑 색소를 대체할 수 있는 천연 흑 색소 생산 기법의 개발은 빠르게 증가하는 천연 흑 색소 수입 비중을 국내 생산으로 전환할 수 있을 것으로 기대된다.

[표 1-2] 국내 천연색소의 생산량, 수출액, 판매액 및 증가율

품목명	2014				2015				2016				2017			
	생산량 (톤)	수출액 (\$)	판매액 (백만원)	증가율 (%)	생산량 (톤)	수출액 (\$)	판매액 (백만원)	증가율 (%)	생산량 (톤)	수출액 (\$)	판매액 (백만원)	증가율 (%)	생산량 (톤)	수출액 (\$)	판매액 (백만원)	증가율 (%)
고량색소	11	-	138	13.54	9	-	119	-13.42	10	-	147	22.86	9	-	248	68.9
락색소	85	-	1,266	-52.64	80	-	1,318	4.22	85	-	1,902	44.13	87	-	2,724	43.22
마리골드색소	0	-	5	-58.33	0	-	5	0.83	2	-	23	381.82	1	-	17	-26.88
베리류색소	20	-	771	-5.79	21	-	752	-2.45	21	1,067	740	-1.59	24	-	861	16.36
스피룰리나색소	7	45,661	756	-0.16	4	-	439	-41.8	5	-	536	22.29	4	-	469	-12.5
심황색소	11	-	363	17.27	10	485	348	-4.11	12	1,205	378	8.62	12	1,442	407	7.44
안나토색소	16	-	-	-	15	-	414	-	18	-	418	1.08	21	-	689	64.79
오징어먹물색소	2	-	54	-4.75	5	12,196	126	134.25	4	9,049	160	26.62	6	3,500	320	100.36
자주색고구마색소	7	-	333	19.48	5	26,981	202	-39.3	6	22,964	238	17.68	6	2,612	268	12.55
자주색옥수수색소	0	-	1	-33.33	0	-	2	115.18	0	-	4	167.17	0	-	13	199.23
적무색소	5	-	28	-21.45	1	-	50	78.84	1	-	45	-8.9	1	-	54	18.88
적양배추색소	8	-	255	-55.44	7	-	244	-4.34	7	-	247	1.4	5	-	180	-27.41
치자적색소	4	-	153	48.15	5	209	186	21.26	7	1,578	243	30.99	8	6,447	292	20.09
치자청색소	31	3,107	1,211	-17.53	46	9,261	1,409	16.37	31	76,493	983	-30.24	30	110,307	1,055	7.3
치자황색소	202	15,377	4,223	0.89	46	33,936	3,248	-23.08	206	84,696	3,791	16.7	239	124,887	4,537	19.67
카라멜색소	4,143	16,059	4,501	-36.89	4,895	19,225	7,451	65.54	4,973	16,299	8,216	10.26	5,011	5,515	8,341	1.52
카카오색소	27	1,208	827	-9.45	35	1,081	997	20.52	33	1,022	1,146	14.99	38	4,371	1,041	-9.21
코치닐추출색소	61	58,650	1,888	-13.67	56	67,081	1,518	-19.62	52	62,210	1,550	2.09	52	68,265	1,522	-1.79
토마토색소	3	-	394	-	-	-	-	-	6	12,926	635	-	11	16,510	1,045	64.61
파프리카추출색소	324	196,654	4,437	16.56	227	181,254	3,985	-10.21	360	262,076	7,285	82.83	401	196,381	9,883	35.66
포도과피추출색소	6	-	155	-53.85	5	-	94	-39.44	6	-	133	41.35	5	-	147	10.72
홍국적색소	76	102,683	985	11.62	68	77,768	987	0.16	68	101,948	961	-2.64	65	105,399	948	-1.25
홍국황색소	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
홍화황색소	21	138	1,030	-12.71	-	-	873	-15.29	38	77,935	1,466	67.93	22	73,005	1,088	-25.76

*출처: 식약처(식품 및 식품첨가물 생산실적 통계집, 2014~2017)

[표 1-3] 오징어먹물색소 수입 현황

2013		2014		2015		2016		2017	
수입량 (kg)	수입액 (\$)	수입량 (kg)	수입액 (\$)	수입량 (kg)	수입액 (\$)	수입량 (kg)	수입액 (\$)	수입량 (kg)	수입액 (\$)
14,433	422,091	20,845	511,837	25,534	590,326	51,433	1,090,780	52,922	928,836

*출처: 식약처(2014~2108년도 수입식품등검사연보)

[표 1-4] 오징어먹물색소 수입 업체 리스트

수입업체	제품명(한글)	제품명(영문)	제조(수입)업체	수출국가
(주)삼양사	오징어먹물 색소	CUTTLE FISH INK	VIVAMAR MILENIUM, S.L.	스페인
(주) 씨21	갑 오 징 어 먹 물 색소	N O R T I N D A L CUTTLEFISH INK	NORTINDAL SEA PRODUCTS, S.L.	스페인
에이티씨에이치(A.T.CH)	오징어먹물 색소	CUTTLE FISH INK	VIVAMAR MILENIUM, S.L.	스페인
(주)보라티알	오징어먹물 색소	SQUID INK	VIVAMAR MILENIUM, S.L.	스페인

*출처: 식품안전나라 품목제조보고서

- 국내에서 혼합제제 원료 및 완제품에 바로 사용되는 오징어먹물색소는 (주)삼양사를 포함한 4개 업체에서 수입하고 있으며, 스페인의 VIVAMAR MILENIUM, S.L. 및 NORTINDAL SEA PRODUCTS, S.L.을 통해 2017년 기준 약 52톤을 수입되었다.

2. 흑 색소의 제품 현황

- 현재 시판 중인 천연색소 중 흑(black) 색소는 국내의 경우에는 오징어먹물색소가 있으며, 일본의 경우 식물탄말색소와 오징어먹물색소가 있다. 오징어먹물색소는 오징어 등의 흑색 내용물을 세정, 건조, 분쇄하여 제조하고, 식물탄말색소는 식물을 수증기부활법으로 고온에서 가열하여 탄화시켜서 얻을 수 있다.
- 오징어먹물색소는 국내의 식품첨가물공전 상에서 식품첨가물로 인정되어 블랙푸드에 사용되고 있지만, 식물탄말색소는 국내의 식품첨가물공전 상에서 식품첨가물이나 혼합제제로 인정하고 있지 않아 사용이 불가능하다.
- 오징어먹물색소 이외에 국내에서 유통되는 흑 색소는 기존 타르계 청색, 적색, 황색 색소들을 혼합하여 흑색으로 제조한 색소제품들이 있으며, 다산에프엠(주)의 “블랙칼라 S”와 (주)두비산업의 “블랙칼라 에스원”이 대표적이다.
- 국내의 오징어먹물색소 공급업체와 제품리스트를 표 1-5에 제시하였다. 국내에서는 다산에프엠(주)를 포함하여 14개 업체에서 오징어먹물색소를 생산하고 있으며, 원료인 오징어먹물 색소는 거의 전량 스페인 등지에서 수입하고(표 1-4), 이를 다른 부형제들과 혼합한 혼합제제 형태나 색가를 조정한 형태의 제품들이 주를 이루고 있다.
- 표 1-5에 제시된 국내에서 제조 및 유통되는 오징어먹물색소들은 특유의 향(비린내)이 존재하여, 소비자들 및 주요 구매처들에서 풍미에 대한 claim을 받고 있기 때문에, 이를 개선하기 위해 다른 성분들을 첨가한 혼합제제 위주로 판매되고 있다.

[표 1-5] 국내 오징어먹물색소 생산업체 및 제품 리스트

기업명	품목유형	제품명
다산에프엠(주)	혼합제제	오징어먹물색소혼합제제
	오징어먹물색소	오징어먹물분말50
	오징어먹물색소	오징어먹물분말 40
	오징어먹물색소	오징어먹물분말 CB
	오징어먹물색소	오징어먹물분말 DS
	오징어먹물색소	오징어먹물색소 DS
대정산업(주)	혼합제제	오징어먹물혼합분말
(주)두비산업	오징어먹물색소	오징어먹물색소(1)
	혼합제제	오징어먹물혼합색소
	오징어먹물색소	오징어먹물색소-엘
	오징어먹물색소	오징어먹물색소
	오징어먹물색소	오징어먹물색소 CP
삼영화성공업(주)	오징어먹물색소	오징어먹물색소
	오징어먹물색소	오징어먹물색소 50P
(주)새롬비엔에프	혼합제제	오징어먹물색소 BF-2548
서도비엔아이(주)	오징어먹물색소	오징어먹물색소 SP-114
(주)에이원카프	오징어먹물색소	오징어먹물분말P
	오징어먹물색소	오징어먹물추출분말
	오징어먹물색소	AF오징어먹물색소
(주)제이스에프아이	오징어먹물색소	오징어먹물색소 N
	오징어먹물색소	오오징어먹물색소 JS-13331
(주)조은푸드텍	오징어먹물색소	오징어먹물색소 H-9378
주식회사 남영F&C	혼합제제	오징어먹물칼라 C-2601
주식회사 내츨러스	오징어먹물색소	오징어먹물색소 A
	혼합제제	오징어먹물 블랙
	오징어먹물색소	오징어먹물추출분말
주식회사 목경	혼합제제	오징어먹물색소
	혼합제제	오징어먹물색소
주식회사 에스디에프	오징어먹물색소	오징어 먹물색소
진향	혼합제제	천연오징어먹물색소

3. 상업화된 흑색 계열 색소 특성 분석을 통한 흑국 유래 흑(black) 색소의 기준 설정

○ 시중에서 유통되고 혼합제제의 형태가 아닌 액상 및 분말상의 캐러멜색소의 성분규격을 식품첨가물공전의 시험방법에 따라 분석하여 표 1-6에 제시하였고, 식품첨가물공전의 캐러멜 색소의 성분규격과 비교하였다.

[표 1-6] 액상 및 분말 카라멜 색소의 분석결과

시험항목	식품첨가물공전 성분규격	캐러멜색소	
		액상 유형	분말 유형
성상	암갈색-흑색 특이한 이미와 이취	적합	적합
이물	없음	적합	적합
색가	0.01~0.6	0.29*	0.14*
총질소	3.3%이하	1.6	1
암모니아성질소	0.6%이하	0	0.3
4-메틸이미다졸	250이하(mg/kg)	불검출	0.01
비소	1.3이하(ppm)	불검출	불검출
납	2이하(ppm)	0.1	불검출
총황	3.5이하(%)	0.3	3.2
수은	0.1이하(ppm)	불검출	불검출
카드뮴	1.0이하(ppm)	불검출	불검출

*0.1% 농도의 용액에 대해 610 nm에서 측정된 흡광도 이용.

○ 본 연구에서 분석한 캐러멜색소들은 식품첨가물공전에서 제시하고 있는 캐러멜색소 성분규격을 모두 충족하고 있었다. 액상 캐러멜색소의 색가(0.29)가 분말상 캐러멜색소의 색가(0.16)보다 높은 수준을 나타내었는데, 이는 액상 캐러멜색소를 분말화하면서 부형제가 첨가되었기 때문으로 판단된다.

- 부형제 등의 다른 첨가물을 함유하지 않은 오징어먹물색소의 성분규격을 식품첨가물공전의 시험방법에 따라 분석하여 표 1-7에 제시하였고, 식품첨가물공전의 오징어먹물색소의 성분규격과 비교하였다.

[표 1-7] 오징어 먹물색소 분석결과

시험항목	식품첨가물공전 성분규격	오징어먹물색소(분말)
성상	흑갈-흑색의 분말 또는 분산상의 액체로 특이한 냄새가 있음	적합
이물	없음	적합
납	10 mg/kg 이하	불검출
비소	4 mg/kg 이하	적합
색가	성분규격 없음	38.5*

*0.1% 농도의 용액에 대해 610 nm에서 측정된 흡광도 이용.

- 오징어먹물색소의 분석결과들은 식품첨가물공전의 성분규격에 모두 적합하였음. 식품첨가물공전 상에 오징어먹물색소의 성분규격 항목에 색가는 제시되지 않아, 캐러멜색소의 색가 측정법에 따라 오징어먹물색소의 색가를 측정하였을 때, 색가는 38.5이었음. 이 색가 수치는 기존 시판되는 오징어먹물색소 제품들에서 제시하고 있는 “36 이상”의 조건에 부합하였다.
- 캐러멜색소를 0.1-20%의 농도로 물에 용해시켰을 때, 가장 높은 20% 농도의 캐러멜색소 수용액은 어두운 갈색을 나타낼 뿐, 캐러멜색소 수용액의 색은 흑색을 나타내지 않았다. 따라서 개발하고자 하는 흑국 유래 흑 색소의 품질규격은 오징어먹물색소의 성분규격에 준하여 결정하는 것이 바람직하다고 판단하였다.
- 따라서 본 연구의 최종제품인 흑국 유래 흑 색소의 품질규격은 오징어먹물색소의 성분규격인 성상, 이물, 비소, 납의 항목의 기준을 준용하였다. 시판되는 오징어먹물색소의 색가가 38.5로 분석되고, 업체들에서 “36 이상”으로 제안하고 있지만, 흑국 유래 흑 색소의 다양한 제품화를 위해 색가의 기준을 “5 이상”으로 완화하여 품질규격을 설정하는 것이 타당하였다(표 1-8).

4. 요약

- 국내에서 천연색소를 생산하는 업체는 약 5개 업체 정도이며, 단일 품목으로 1-2개 정도 생산하고 있는 중소기업까지 포함시킨다고 해도 약 10개 업체에 불과한 것으로 추정되며, 2007년 기준 식품첨가물 국내 판매액(약 5,400억 원) 중 천연 식용색소의 매출액(약 136억 원) 비중이 약 2.5%인 것을 감안하면, 현재 천연 식용색소를 생산 및 판매하는 기업은 10년 전과 거의 유사한 수준일 것으로 판단된다. 따라서 천연 식용색소를 생산·판매하는 기업은 대부분 영세하기 때문에 규모의 경제에 따른 신규업체의 진입장벽은 없는 것으로 판단된다.

[표 1-8] 본 연구에서 개발하고자 하는 흑국 유래 흑 색소의 성분규격 제안

성분규격 항목	성분규격 제안
성상	흑갈-흑색의 분말 또는 분산상의 액체로 특이한 냄새가 있음
이물	없음
납	10 mg/kg 이하
비소	4 mg/kg 이하
색가*	5 이상

*0.1% 농도, 610 nm 흡광도.

제2절. 흑국균의 경제적 대량배양 기술 개발 및 흑국 제조

1. 연구방법

가. 재료

(1) ATCC 번호가 부여된 흑국균(*Aspergillus niger*) 12 종

- 흑국균의 흑 색소 및 흑국 생성을 위한 최적의 균주를 선별하기 위해 KCCM (한국미생물보존센터)으로부터 ATCC 번호가 부여된 *Aspergillus niger* 12 종을 확보하였다(표 2-1). 이 균주들은 이미 산업계에서 오랜기간동안 글루코아밀라아제(glucoamylase), 구연산, 글루콘산 등을 생산하는데 활용되고 있어, Generally Recognized As Safe (GRAS) 수준의 안전성이 보장되는 균주들이라 볼 수 있다. 표 2-1에서는 확보된 균주들이 기존 산업계에서 활용되고 있는 현황 및 배양 방법, 염기서열 분석 결과 등이 기존에 보고되어 있는지 파악하여 확보한 균주들의 기본 안전성 정보로 활용하였다.

[표 2-1] 확보된 12종의 *Aspergillus niger* 정보

균주명	ATCC	Medium	염기서열 분석	기존 활용도 및 특성
<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem	9029	YM agar/broth Malt extract agar Potato dextrose agar	○	<ul style="list-style-type: none"> Produces 4-nitrophenylphosphatase, D-xylulose dehydrogenase, L-malic acid, L-xylulose reductase, acid protease protease (acid), alpha-L-arabinofuranosidase A, alpha-L-arabinofuranosidase B, citric acid citrate, endo-arabinase, ferulic acid esterase, gluconic acid, glucono-delta-lactone, glucose oxidase, glucuronidase, beta beta-glucuronidase, lincomycin sulfoxides, urease urea amidolyase Produces citric acid from whey permeate Produces gluconic acid in the production of aldonic acid and aldonate compositions useful in cleaning solutions
<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem	13497	YM agar/broth Malt extract agar Potato dextrose agar	○	<ul style="list-style-type: none"> Produces glucoamylase
<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem	6275	Potato dextrose agar YM agar/broth		<ul style="list-style-type: none"> Produces carboxymethyl cellulase CM-celluase, citric acid citrate,

Tieghem		Emmons' modification of Sabouraud's agar		glucosidase, beta; acid Glucosidase; glucocerebrosidase, xylan endo-1,3-beta-xylosidase xylan hydrolase, xylanase <ul style="list-style-type: none"> ◆ Produces carboxymethyl cellulase, beta-glucosidase, and xylanase from oil palm wastes ◆ Produces extracellular lipases
<i>Aspergillus niger</i> var. <i>macrosporus</i> Koaze	16513	Czapek's agar		<ul style="list-style-type: none"> ◆ Produces acid protease protease (acid)
<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem	22343	Czapek's agar Malt extract agar Potato dextrose agar		<ul style="list-style-type: none"> ◆ Produces amylase, alpha 1A; salivary Amylase, salivary, alpha-1A ◆ Produces ethyl alcohol ethanol ◆ Produces glucamylase
<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem	11414	Potato dextrose agar	○	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Produces 6-phosphofructo-2-kinase, ATP citrate lyase, aconitic hydrase, carnitine acetyltransferase, citric acid citrate, polygalacturonase endopolygalacturonase, pectinase ◆ Produces citric acid from apple pomace
<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem	60363	Malt extract agar		<ul style="list-style-type: none"> ◆ Produces gluconic acid
<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem	16888	Malt extract agar Emmons' modification of Sabouraud's agar Potato dextrose agar	○	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Produces aniline, gluconic acid, glucose oxidase, glucosidase, beta; acid Glucosidase, beta, acid, glucocerebrosidase, kynureninase-type enzymes, pergolide sulfone, pergolide sulfoxide, pseudonigeron (1-3)-alpha-D-glucan ◆ Fermentation of tannin-gallic acid
<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem	9142	YM agar/broth Malt agar medium Potato dextrose agar		<ul style="list-style-type: none"> ◆ Produces 12-hydroxy-trans-nerolidol, 18-homo-19-norcortisone, 18-homo-19-norhydrocortisone, 9-hydroxyacronycine, L-malic acid, citric acid citrate, gluconic acid, grindelane dimers, hydroxygrindelanes, hydroxylated biphenyl compounds, hydroxylated steroids steroids, hydroxylated, lipase
<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem	10864	Czapek's agar Malt extract agar Potato dextrose agar	○	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Produces acetyl-xylan esterase, acylesterase acetyl esterase, alpha-glucosidase maltase, amylase,

				ethyl alcohol ethanol, glucoamylase, monoamine oxidase, saccharifying enzymes <ul style="list-style-type: none"> ◆ Produces large amounts of maltase and smaller amounts of alpha-amylase ◆ Produces ethanol from potato starch when cocultured with <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26603
<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem	13496	YM agar/broth Czapek's agar Potato dextrose agar	○	◆ Produces glucoamylase
<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem	10575	Malt extract agar		◆ Fungus resistance testing adhesives

[표 2-2] 흑국균(*Aspergillus niger* sp.) 배양을 위한 배지 조성

액체배지	액체배지 조성(1 L 기준)
Potato Dextrose Broth	Distilled water 1,000 ml, Infusion from Potatoes 7.0 g, Dextrose 20.0 g, Final pH 5.1±0.2 at 25 °C
Czapek Dox Broth	Distilled water 1,000 ml, Sucrose 30.0 g, Sodium nitrate 2.0 g, Potassium chloride 0.5 g, Magnesium sulfate 0.5 g, Di-Potassium phosphate 1.0 g, Ferrous Sulphate 0.01 g, Final pH 7.2±0.2 at 25 °C
Malt Extract Broth	Distilled water 1,000 ml, Malt extract 6.0 g, Maltose 1.8 g, Glucose 6.0 g, Yeast Extract 1.2 g Final pH 4.7±0.2 at 25 °C
Yeast Malt (YM) Broth	Distilled water 1,000 ml, Peptones 5.0 g, Yeast extract 3.0 g, Malt extract 3.0 g, Dextrose 10.0 g, Final pH 6.2±0.2 at 25 °C

나. 기 확보된 12종의 흑국균(ATCC 기탁균주)의 최적 배양 조건 확립 및 최적 흑 색소 생성 흑국균 선별

(1) 흑국균 배지 조성 최적화

- 흑국균으로부터 최적의 흑 색소 생성 배지 조건을 규명하기 위해 흑국균 배양에 일반적으로 사용되는 배지 4종류(Potato Dextrose, Czapek Dox, Malt Extract, 및 Yeast Malt)를 기반으로 기 확보된 12종의 흑국균(ATCC 기탁균주)을 25°C에서 일주일 이상 배양하였다. 배지 조성은 표 2-2에 제시하였다.

(2) 흑국균 배양 조건 최적화

(가) pH에 따른 흑국균 흑 색소 발현 정도 비교

- 흑국균 최적 배양을 위한 조건 확립을 위하여 배지의 초기 pH 조건을 조정하여 흑국균 흑 색소 발현 정도를 비교하였다. 앞서 확립된 최적 배지 Yeast Malt agar와 Malt Extract agar의 초기 pH를 5.5, 7.0, 8.5로 조정하여 흑국균을 25°C에서 일주일 이상 배양하였다.

(나) Dextrose 함량에 따른 흑국균 흑 색소 발현 정도 비교

- 흑국균 최적 배양을 위한 조건 확립을 위하여 배지의 Dextrose 함량을 조절하여 흑국균 흑 색소 발현 정도를 비교하였다. 앞서 확립된 최적 배지 Yeast Malt agar의 Dextrose 함량을 1%, 3%, 5%로 조절하여 흑국균을 25°C에서 일주일 이상 배양하였다.

(다) 배지의 양에 따른 흑국균 흑 색소 발현 정도 비교

- 흑국균 최적 배양을 위한 조건 확립을 위하여 플레이트 당 배지의 양을 조절하여 흑국균 흑 색소 발현 정도를 비교하였다. 앞서 확립된 최적 배지인 Yeast Malt agar를 플레이트 당 7 ml, 10 ml, 15 ml, 20 ml로 조절하여 흑국균을 25°C에서 일주일 이상 배양하였다.

(라) 온도에 따른 흑국균 흑 색소 발현 정도 비교

- 흑국균 최적 배양을 위한 조건 확립을 위하여 배양 온도를 다르게 하여 흑국균 흑 색소 발현 정도를 비교하였다. 앞서 확립된 최적 배지인 Yeast Malt agar에서 흑국균을 25°C, 30°C, 37°C, 42°C에서 일주일 이상 배양하였다.

(마) 탄수화물 종류에 따른 흑국균 흑 색소 발현 정도 비교

- 흑국균 최적 배양을 위한 조건 확립을 위하여 배지의 탄수화물 종류를 다르게 하여 흑국균 흑 색소 발현 정도를 비교하였다. 앞서 확립된 최적 배지인 Yeast Malt agar 조성을 기반으로 탄수화물을 Dextrose, Fructose, Maltose, Starch, Sucrose로 다르게 하여 흑국균을 37°C에서 일주일 이상 배양하였다.

다. 경제적 배지 제조

(1) 비지와 감자박을 주성분으로 한 배지 제조

- 기존 상용 배양배지에 비하여 경제적인 측면의 산업 활용도를 높이기 위해 식품부산물인 비지와 감자박을 주성분으로 하는 배지를 제조하였다. 두부를 만들고 나온 부산물인 비지와 식품부산물인 감자박에 증류수를 0.1~4배 부피로 첨가하고 121°C에서 15분간 멸균하여 반고형 형태로 만든 배지에 최적 흑 색소 생성 흑국균으로 선별된 *A. niger* ATCC 16513 균주를 10^8 cell/ml로 접종하여 37°C에서 190 rpm으로 현탁 배양을 4일~7일간 배양하였다.

(2) 흑국 에탄올 추출물의 자외선-가시광선 흡광도 분석

- 비지와 감자박을 주성분으로 한 배지에서의 증류수 첨가량 및 배양 기간에 따른 흑 색소 발현 정도를 비교하기 위하여 흑국 에탄올 추출물의 자외선-가시광선 흡광도를 분석하였다. 비지와 감자박에 증류수를 0.1~4배 부피로 첨가한 뒤, 멸균하여 반고형 형태로 만든 배지에 최적 흑 색소 생성 흑국균으로 선별된 *A. niger* ATCC 16513 균주를 10^8 cell/ml로 접종하여 37°C에서 190 rpm으로 현탁 배양을 7일간 진행하였다. 이를 통해 확보된 흑국에 100% 에탄올 20 ml을 첨가한 뒤 원심분리하여 얻어진 상층액을 10배 희석하여 흡광도 분석을 수행하였다. 이를 위해 주사 자외선-가시광선 흡광도기(Scanning UV-Vis spectrophotometer)를 이용하였다.

라. Ochratoxin 유전자 확인을 위한 PCR 진행

- Aspergillus niger*의 대표적인 독소인 ochratoxin의 유전자 존재여부를 확인하기 위해 specific primer를 이용한 PCR을 진행하였다. *A. niger* ATCC 16513을 25 ml의 Yeast malt broth가 들어있는 50 ml tube에 접종하고 37°C 에서 190 rpm으로 3일 동안 현탁 배양하였다. Genomic DNA는 제조업체의 프로토콜에 따라 plant/fungi DNA isolation kit (Norgen Biotek Corp, Ontario, Canada)를 사용하여 추출되었다. Ochratoxin 유전자의 존재를 확인하기 위해 Toxin A-F / R, Toxin B-F / R 및 ANPKS5 / ANPKS6 primer를 사용하였다. *Aspergillus* spp.와 *Aspergillus niger*의 특이적 유전자 부분을 증폭시키는 positive primer로는 Asp_gen_mtssu와 NIG를 사용하였다. Primer 정보는 표 2-3에 제시하였다. PCR은 10 ul의 Gold hot-start Taq PCR master mix (Bioneer, Daejeon, Korea), 각각 1 ul의 5 uM forward 및 reverse primer, 및 1 ul의 genomic DNA로 최종부피 25 ul에서 수행되었다. 다음과 같은 PCR 반응 하에서 수행되었다(95 for 1 min; 30 cycles at 95°C 30 s, 54°C ~ 63°C for 30 s. 72°C for 1 min; 추가 final extension cycle at 72°C for 3 min). 증폭된 DNA 조각을 확인하기 위하여 아가로스젤 전기영동을 진행하였다.

[표 2-3] PCR에 사용된 primer 정보

Pimers	Function	Sequence (5' to 3')	Reference
Asp_gen_mtssu_F Asp_gen_mtssu_R	<i>Aspergillus</i> spp. detection primer	GCCATATTACTCTTGAGGTGGAA CCGAAAGGCTGAACCAGTAA	Glaucia EO Midorikawa, et al., 2014
NIG_1 NIG_2	<i>Aspergillus niger</i> specific gene	GATTTTCGACAGCATT(CT/TC)CAGAA AAAGTCAATCACAATCCAGCCC	Susca, A., et al., 2007
Toxin A_F Toxin A_R	Ochratoxin detection primer	GGGTGTTAACTCAGACGACTA GCGATTTTCGCCCACGGAGTGTC	Simon G. EDWARDS, et al.2002
Toxin B_F ToxinB_R		GAGCAGATGGATCCCARCAGCG GGAGATRGCYCCCCSGCTTTRTC	
ANPKS5_F ANPKS6_R		ACGGTAAACGTCCTGGATGA TTCACCGAAGTTGTCGTGC	

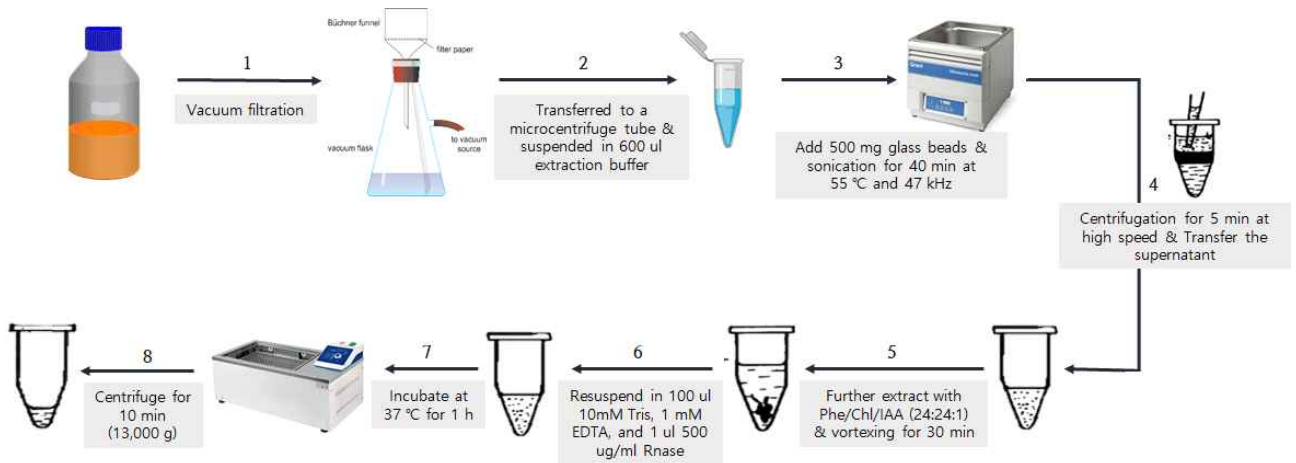
마. *Aspergillus niger* ATCC 16513 균주의 유전체 분석

(1) Sequencing을 위한 Genomic DNA 추출

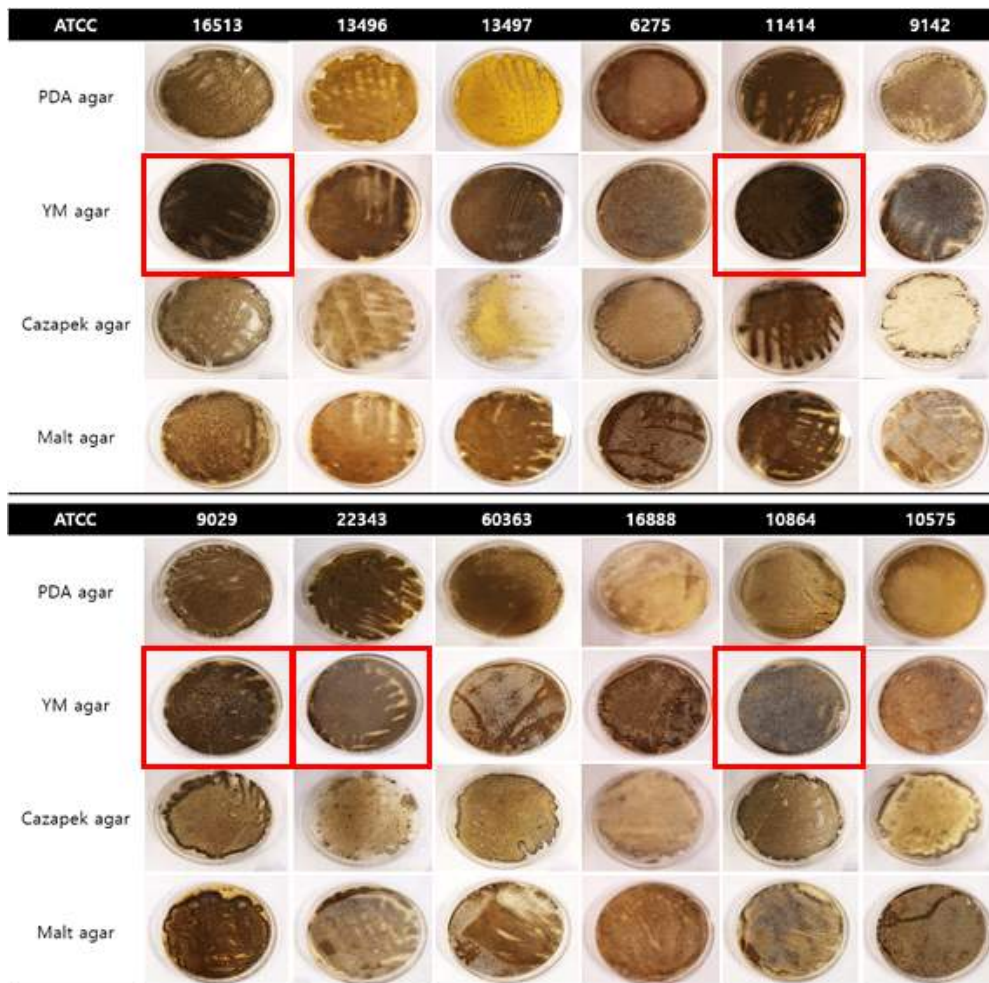
- 배양 최적 조건 실험 및 최적 흑 색소 형성 흑국균 선정 실험을 통하여 *A. niger* ATCC 16513 균주가 선정되었다. 본 균주의 경우 genome 정보가 아직 공개되어 있지 않아 색소관련 유전자 및 독성 유전자 유무를 위한 유전체 분석을 수행하였다. 먼저 NGS 수행이 가능한 본 균주의 고품질 genomic DNA 확보하기 위해 standard CTAB method를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 25 ml의 Yeast Malt broth에서 본 균주 100 ul를 접종한 후 37°C에서 190 rpm으로 3일간 현탁 배양하였다. 멸균 된 0.2 um 기공 크기의 일회용 필터를 통한 진공여과에 의해 균사체를 배양 상청액으로부터 분리한 후, 건조 될 때까지 연속 진공시켰다. 균사체를 멸균 spatula를 이용해 microcentrifuge tube에 옮기고 400 ul의 extraction buffer에 현탁시켰다. 균사체는 500 mg의 0.4-0.6 mm 직경의 유리비드와 400 ul의 페놀/클로로포름/이소아밀 알코올과 함께 30분 동안 연속적으로 볼텍싱을 실시하여 lysis를 수행하였다. 수성층을 제거하고 동일한 부피의 페놀/클로로포름/이소아밀 알코올로 두 번, 동일한 부피의 클로로포름/이소아밀 알코올로 한번 재추출하고 0.1 부피의 10 M 암모늄 아세테이트를 첨가하고 2.0 volume의 100% 에탄올을 넣어주어서 침전시켰다. 생성된 진균 DNA pellet을 100 ul 10 mM Tris, 1 mM EDTA 및 1 ul 500 ug/ml Rnase 에 재현탁시켰다. Digestion은 37도에서 한 시간 동안 배양되었다. 불순물을 제거하기 위해서 튜브를 microcentrifuge에서 10분 동안 고속으로(13,000rpm) 회전시키고 상청액을 새로운 튜브로 옮겼다(그림 2-1).

(2) *Aspergillus niger* ATCC 16513 균주의 유전체 분석

- 추출된 DNA는 DNALINK(서울, 한국)에서 Sequencing과 Assembly 분석이 진행되었다. 본 균주의 전장 유전체 확보를 위하여 Pacbio사의 Sequel 장비로 차세대염기서열분석을 수행하였다. Assembly는 Pacbio read를 이용하는 de novo assembly tool인 HGAP (Hierarchical genome assembly process) v4.0을 사용하여 수행되었다. 유전자 예측은 Maker를 사용하여 수행되었다. 모든 예측된 CDS 영역은 BLAST 및 Interproscan을 사용하여 주석을 달았다. 예측된 기능들은 기존 보고된 *A. niger* 색소 유전자와 비교하여 위치를 확인하였고 확인된 유전자들은 pfam을 통해 도메인을 얻었다. 이전에 유전체 분석이 완료된 *A. niger* ATCC 13496 균주에 존재하는 색소유전자와 본 연구에서 얻은 색소 유전자사이의 단백질 서열을 CLC genomic workbench (Qiagen)을 통해 비교하였다. *Aspergillus* genome database에서 보고된 *Aspergillus niger*의 독성 유전자를 통해 본 연구의 *A. niger* ATCC 16513 유전체에 독성 유전자가 존재하는지 확인하였다.



[그림 2-1] NGS를 수행을 위한 *Aspergillus niger* 의 고순도 genomic DNA 추출방법



[그림 2-2] 12종의 *Aspergillus niger* 균주들의 배지 별 배양물 및 흑 색소 생산 비교 실험 결과. 빨간색 박스는 흑 색소를 잘 생성한 흑국균을 의미한다. *Aspergillus niger* (ATCC 16513 / 11414 / 9029 / 22343 / 10864).

2. 연구결과

가. 기 확보된 12종의 흑국균(ATCC 기탁균주)의 최적 배양 조건 확립 및 최적 흑 색소 생성 흑국균 선별

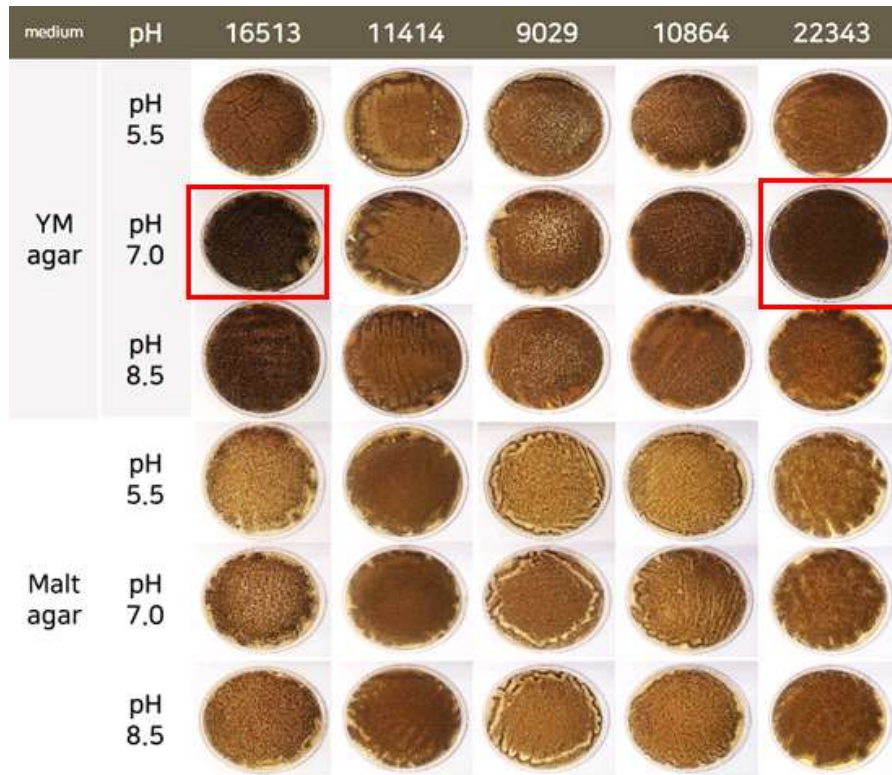
(1) 흑국균 배지 조성 최적화

- 흑국균 배양을 위한 배지 최적화를 위해 일반적으로 흑국균 배양에 사용되는 배지 조성을 확보하였다. 일반적으로 흑국균 배양에 사용되고 있는 배지로는 Potato Dextrose, Czapek Dox, Malt Extract, 및 Yeast Malt 가 있다. 기 확보한 흑국균 12종을 사전조사한 배지 조성에서 고체 또는 액체 배지를 기반으로 배양한 결과, 고체 배지에서 액체 배지 조건에서보다 일반적인 배양 시 더 효율적으로 흑 색소를 생성함을 확인하였다. 따라서 이후 배양 조건 최적화 과정에서는 고체 배지 배양을 기본적으로 활용하였다.
- 기 확보한 흑국균 12종을 Potato Dextrose, Czapek Dox, Malt Extract, 및 Yeast Malt 고체 배지에서 25°C 에서 접종 후 7일 동안 배양하며, 배양 속도 및 흑 색소 생성을 비교하였을 때, Yeast Malt agar에서 모든 흑국균이 잘 배양되었고, 그 다음으로 Malt Extract agar에서 흑국균이 잘 배양되는 경향을 보였다(그림 2-2). 또한 본 실험 결과를 기반으로, 12종의 균주 중 흑색을 가장 잘 표현하는 균주 5종을 선별하였다(그림 2-2). 본 균주들이 추후 활용 가능성이 가장 높은 후보균(*A. niger* ATCC 16513, ATCC 11414, ATCC 9029, ATCC 22343, ATCC 10864)으로 보고 후속 최적 배양 조건 및 흑 색소 형성 조건 실험을 진행하였다.

(2) 흑국균 배양 조건 최적화

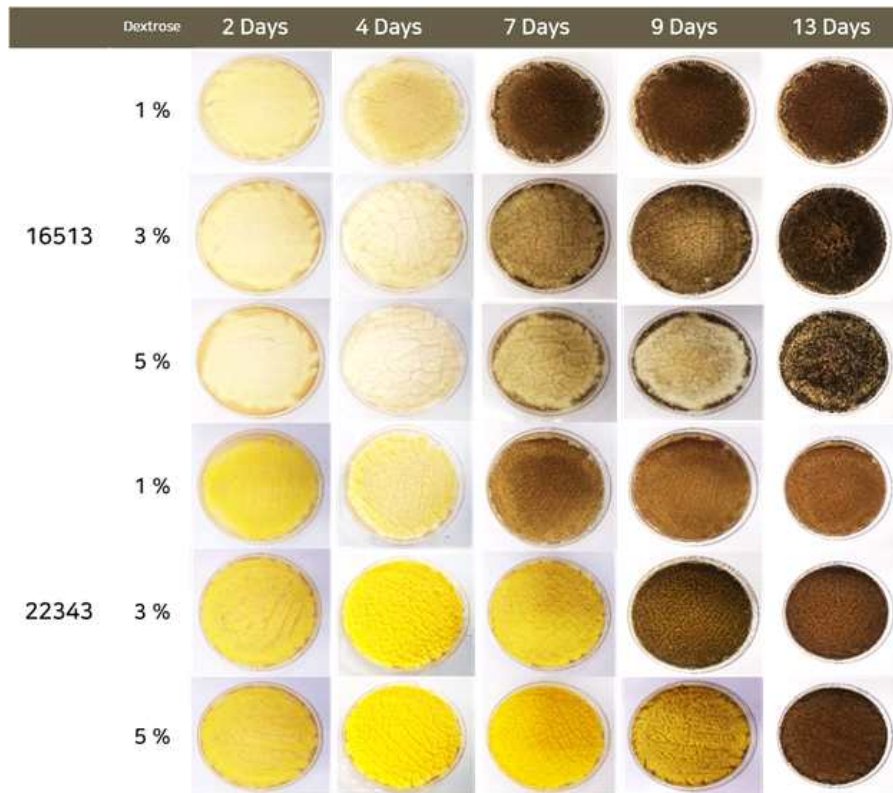
(가) pH에 따른 흑국균 흑 색소 발현 정도 비교

- 흑국균 최적 배양을 위해 Yeast Malt agar 및 Malt Extract agar에서 pH에 따른 배양 속도 및 흑 색소 생성을 비교 분석하였다. 초기 배지의 pH는 곰팡이의 성장에 영향을 미치기 때문에 선별된 5종의 흑국균을 pH 5.5, 7.0, 및 8.5로 조절 된 Yeast Malt agar와 Malt Extract agar에 접종 후 25°C 에서 7일 동안 배양하였다. 배양 결과를 육안으로 확인하였을 때, pH 7.0의 Yeast Malt agar에서 *A. niger* ATCC 16513 균이 가장 빠른 성장도를 보였으며, 그에 따라 가장 진한 흑 색소 생산을 보였다. 그 다음으로 *A. niger* ATCC 22343 균이 높은 성장도 및 진한 흑 색소 생산율을 보임을 확인하였다(그림 2-3).



[그림 2-3] pH 조건에 따른 선별된 *A. niger* 균주들의 배양물 및 흑 색소 생산 비교 실험 결과
(나) Dextrose 함량에 따른 흑국균 흑 색소 발현 정도 비교

- 앞선 pH 실험에서 가장 흑색 포자 생산 효율성이 좋았던 두 종을 Yeast malt agar에서 dextrose 함량을 1%, 3%, 및 5% 로 다르게 하여 접종 후 25°C에서 13일 동안 배양하였다. 배양 결과를 육안으로 확인하였을 때, *A. niger* ATCC 16513 균주가 여러 배양 조건 상에서 *A. niger* ATCC 22343 균주보다 더 빠른 배양 속도 및 진한 흑 색소 생성을 보였다. 본 *A. niger* ATCC 16513 균주는 7일 째에 1% dextrose를 함유한 배지에서 흑 색소를 생성하는 모습을 보였고 13일 뒤에는 3% dextrose를 함유한 배지에서 가장 진한 흑 색소를 생성하였다(그림 2-4). 추후 흑국 대량 생상을 위한 조건 설정으로는 비용적인 효율성 고려가 필요할 것으로 보이며, 다소 진한 흑 색소를 보이는 3% dextrose를 함유한 배지에서 13일 배양 조건보다는 1% dextrose를 함유한 배지에서 7일 배양 조건이 더 효율적일 것으로 예상된다.



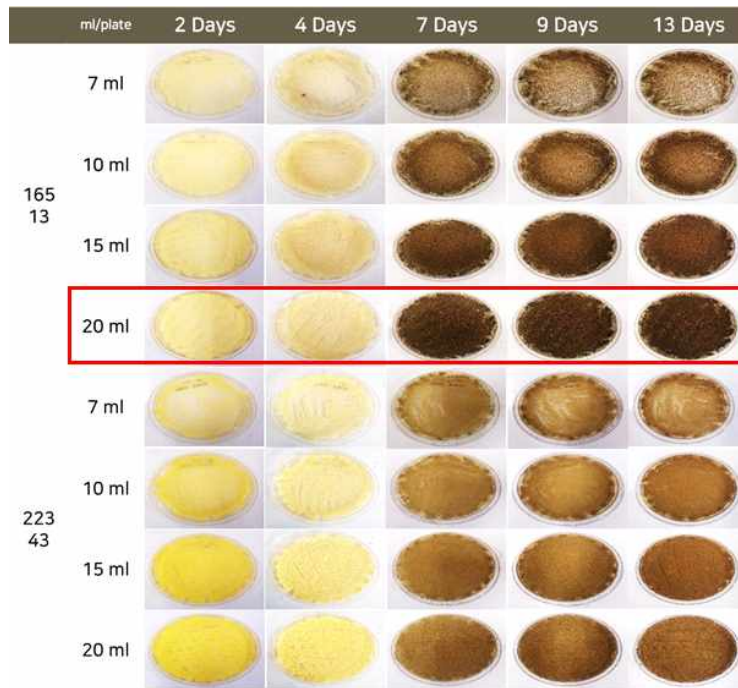
[그림 2-4] 선별된 *A. niger* 균주들의 배지 내 dextrose 함량에 따른 흑 색소 생산 비교 실험 결과

(다) 배지의 양에 따른 흑국균 흑 색소 발현 정도 비교

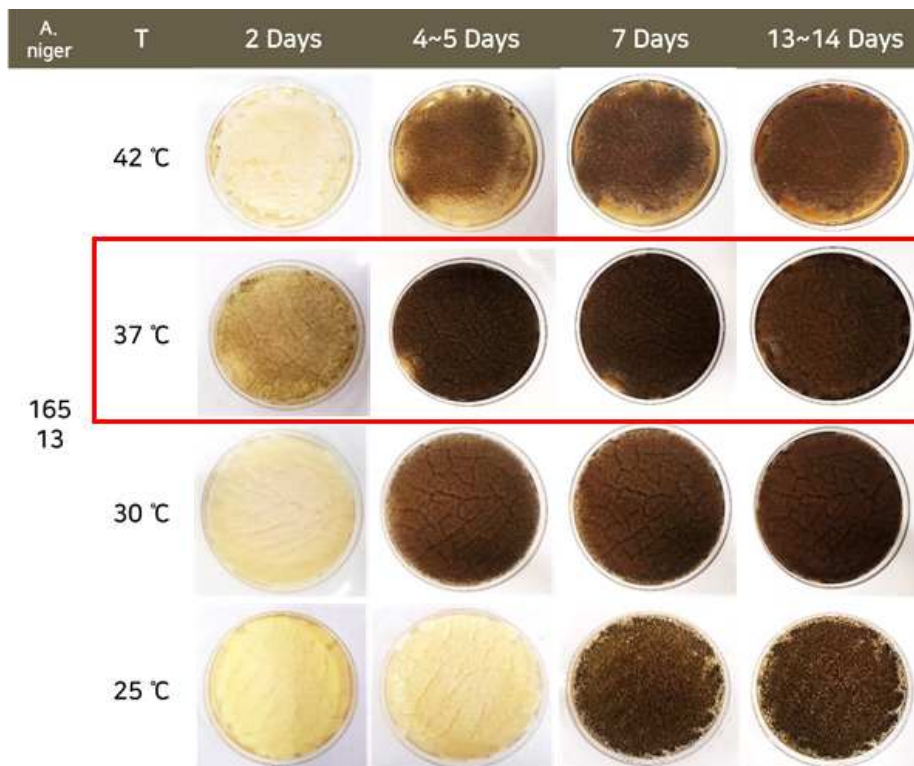
- 최적 배양 조건 설정을 위한 여러 배양 조건에서 흑 색소 생성 비교 실험을 수행하였다. 한 플레이트 당 배지의 양을 7 ml, 12 ml, 15 ml 및 20 ml로 다르게 하여 *A. niger* ATCC 16513 균주와 ATCC 22343 균주를 Yeast malt agar 배지에서 접종 후 25 °C에서 13일 동안 배양하였다. 배양 결과를 육안으로 확인하였을 때, 두 종의 균 모두 20 ml/plate에서 흑 색소를 가장 빠른 속도로 효율적으로 생성하였고, *A. niger* ATCC 16513 균주가 고농도의 흑 색소를 생성하였다. 따라서 최적 흑국균 배양 조건을 설정하기 위하여, 최종 후보균을 *A. niger* ATCC 16513 균주로 선정하였다(그림 2-5).

(라) 온도에 따른 흑국균 흑 색소 발현 정도 비교

- 최적 흑 색소 생성균을 *A. niger* ATCC 16513으로 선정하고 배양 온도 조건을 다르게 하여 실험을 진행하였다. 배양 온도는 25°C, 30°C, 37°C, 및 42°C로 설정하였다. 배양 결과를 육안으로 확인하였을 때, 37°C에서 배양 4일내에 높은 흑 색소 생성 효율성을 확인할 수 있었다(그림 2-6). 최종 적으로 *A. niger* ATCC 16513 균주를 한 플레이트 당 20 ml의 1%의 dextrose를 함유하는 pH 7.0의 Yeast malt agar에서 37°C로 배양하였을 때 높은 흑 색소 생성율을 보인다고 결론지었다.



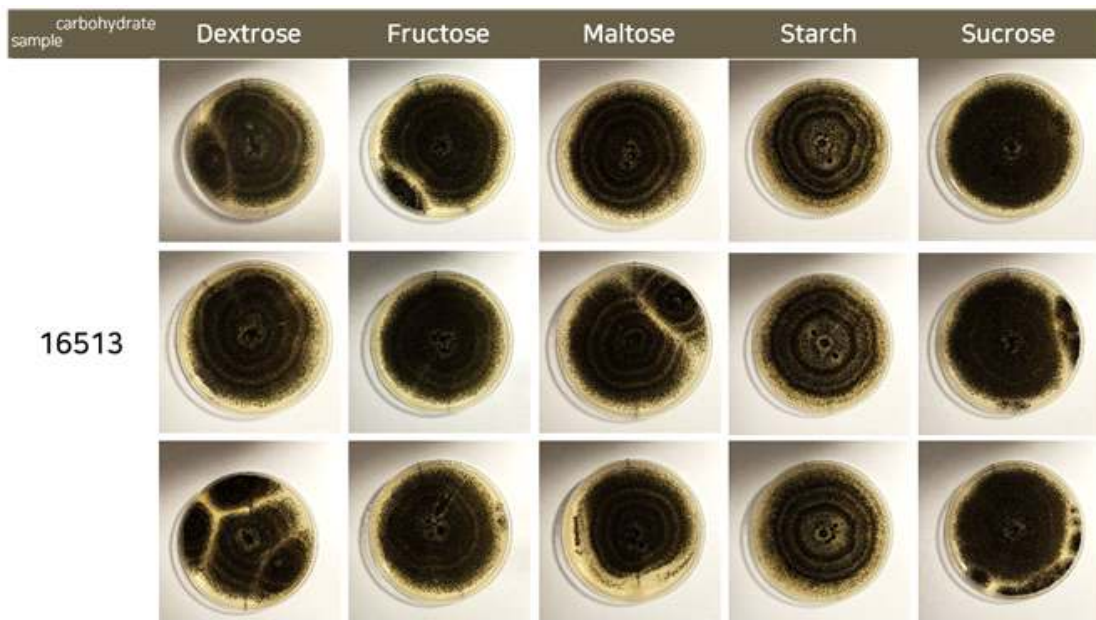
[그림 2-5] 선별된 *A. niger* 균주들의 배지량에 따른 흑 색소 생산 비교 실험 결과



[그림 2-6] 선별된 *A. niger* 균주들의 배양 온도에 따른 흑 색소 생산 비교 실험 결과

(마) 탄수화물 종류에 따른 흑국균 흑 색소 발현 정도 비교

- 최적의 흑 색소 생성균으로 선정된 *A. niger* ATCC 16513을 앞서 확립된 최적 배지인 Yeast Malt agar 조성을 기반으로 탄수화물을 Dextrose, Fructose, Maltose, Starch, Sucrose로 다르게 하여 37°C에서 일주일이상 배양하였다. 배양 결과를 육안으로 확인하였을 때, Fructose, Maltose 및 Sucrose를 배지성분 내 탄수화물로 이용하였을 때 높은 흑 색소 생성 효율성을 확인할 수 있었다. 하지만 다섯 개의 탄수화물들 사이에 눈에 띄는 차이는 확인할 수 없었으므로 배지 조성 내 탄수화물 종류가 흑 색소 생성 조건에 큰 영향을 끼치지 않는다고 결론지었다(그림 2-7).



[그림 2-7] 선택된 *A. niger* ATCC 16513 의 배지 내 탄수화물 종류에 따른 흑 색소 생산 비교 실험 결과

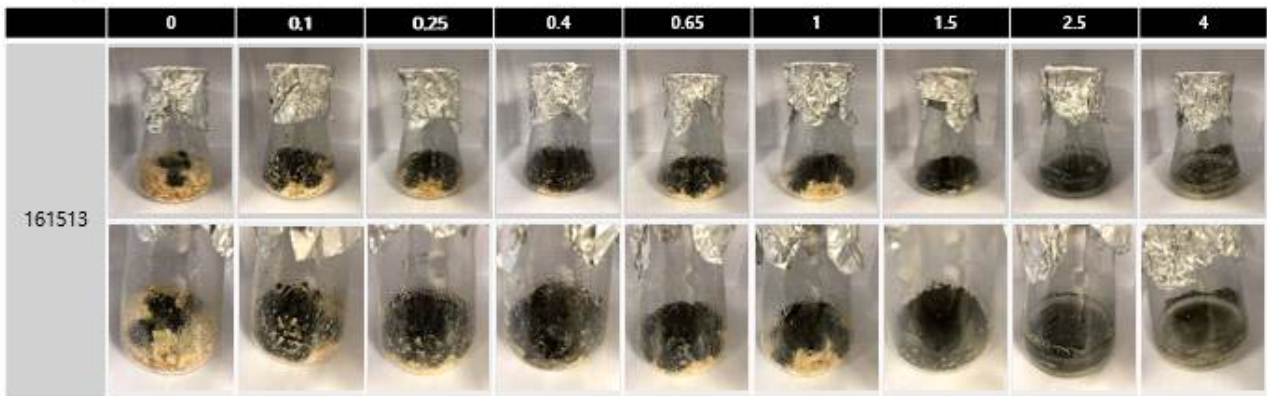
나. 경제적 배지 제조

(1) 비지를 주성분으로 하는 배지에서의 흑국균 흑 색소 발현 정도 비교

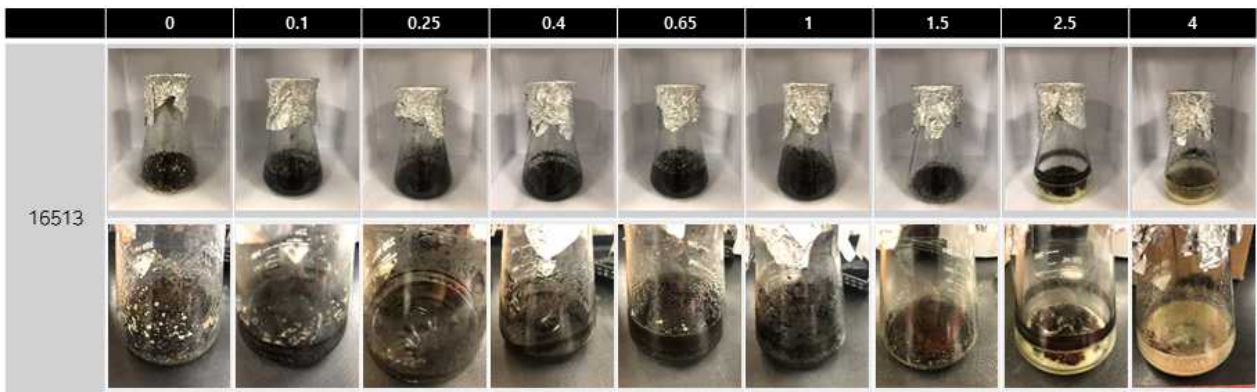
- 기존 상용 배양배지에 비하여 경제적인 측면의 산업 활용도를 높이기 위해 비지를 주성분으로 하는 배지 및 배양방법을 구축하고자 하였다. 배지 내 증류수 첨가량 및 배양 기간에 따른 흑색소 발현 정도를 비교한 결과, 37°C에서 190 rpm으로 7일간 배양하였을 때, 증류수를 비지 대비 1배 첨가한 배지 조건에서 가장 효과적으로 흑색소를 발현함을 확인하였고, 이 조건이 흑색 발현 목적의 흑국 생성에 적합함을 확인할 수 있었다(그림 2-8).

- 확보된 흑국에 100% 에탄올 20 ml을 첨가하고 원심분리한 후 상층액을 이용하여 흡광도 분석을 수행하였다. 육안으로 보았을 때 증류수 첨가량이 1, 0.65, 및 0.25배 일 때 흑국의 에탄올 추출물 색이 가장 뚜렷한 흑색을 띠고 있었다(그림 2-9). 이는 인지된 색상이 안료의 강도에 따라 달라짐을 나타낸다. 비지를 주성분으로 한 배지에서 확보된 흑국 에탄올 추출물의 흡광도값을 배지 내 증류수 첨가량에 따라 비교한 결과, 육안으로 봤을 때와 비슷하게 비지 대비 1배로 증류수를 첨가한 조건에서의 흑국 에탄올 추출물이 자외선-가시광선 파장 범위에 고르게 흡광도를 보임으로써 고른 흑색을 나타냄을 확인할 수 있었다. 또한, 400 nm에서도 가장 높은 흡광도 값을 보임으로써, 흑색 색소 목적의 흑국 배양에 대두가공부산물 대비 1배의 증류수 첨가 배양 조건이 가장 적합함을 확인할 수 있었다(그림 2-10). 이것은 1배의 증류수 첨가 시 흑국균의 비지에 있는 당의 효과적인 이용 때문일 수 있다.

4 Days



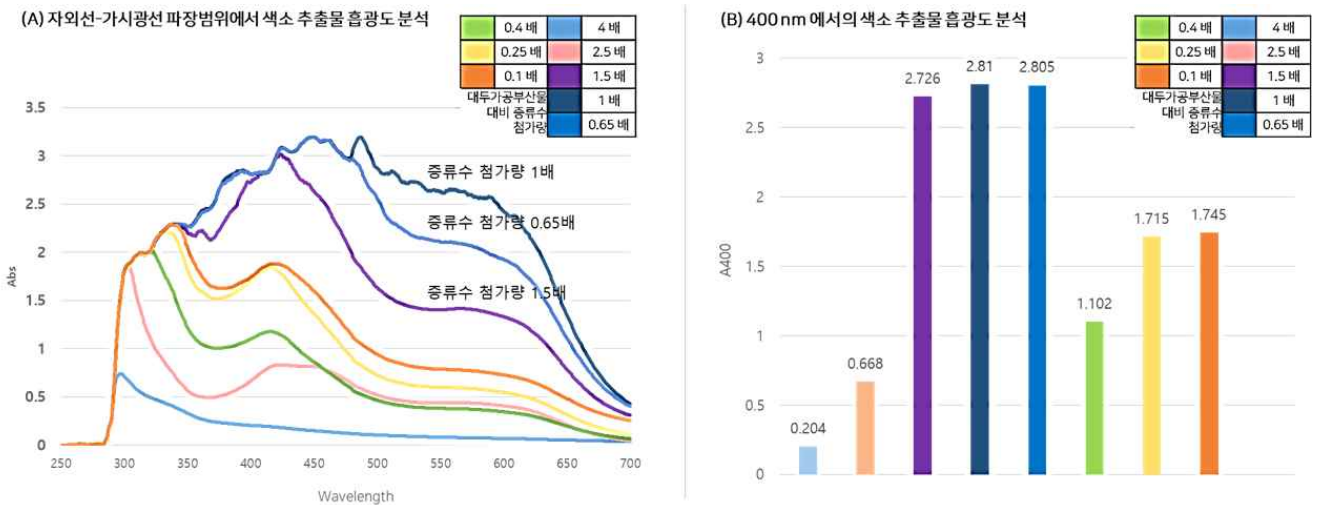
7 Days



[그림 2-8] 대두가공부산물인 비지 대비 증류수 첨가량에 따른 *A. niger* ATCC 16513의 배양률 및 흑 색소 생산 비교 결과



[그림 2-9] 대두가공부산물인 비지 대비 증류수 첨가량에 따른 *A. niger* ATCC 16513의 흑국에탄올 추출물

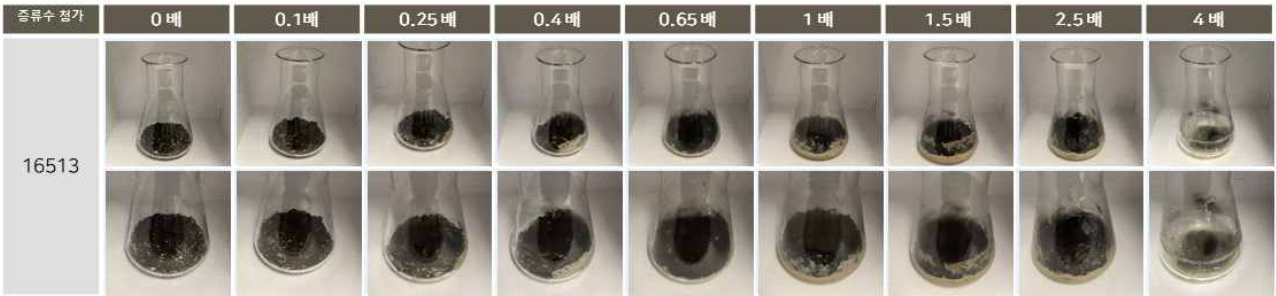


[그림 2-10] 대두가공부산물인 비지 대비 증류수 첨가량에 따른 *A. niger* ATCC 16513의 흑국에탄올 추출물 UV-VIS 흡광도 분석 결과

(2) 감자박을 주성분으로 하는 배지에서의 흑국균 흑 색소 발현 정도 비교

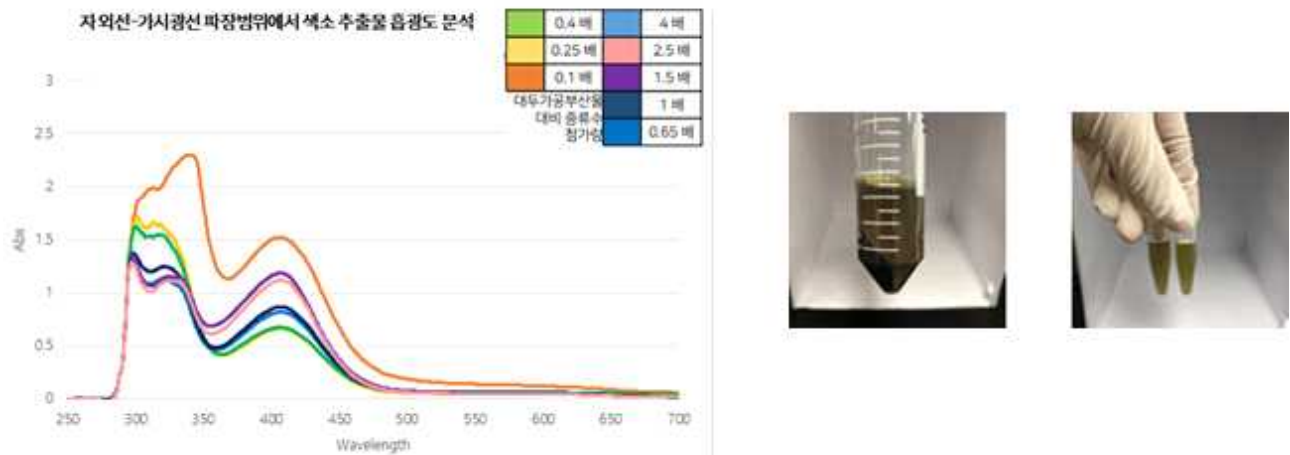
- 기존 상용 배양배지에 비하여 경제적인 측면의 산업 활용도를 높이기 위해 감자박을 주성분으로 하는 배지 및 배양방법을 구축하고자 하였다. 배지 내 증류수 첨가량 및 배양 기간에 따른 흑색소 발현 정도를 비교한 결과, 37°C에서 190 rpm으로 7일간 배양하였을 때, 감자박 대비 첨가한 증류수 양이 적을수록 효과적으로 흑색소를 발현함을 확인하였다(그림 2-11).

7일 배양

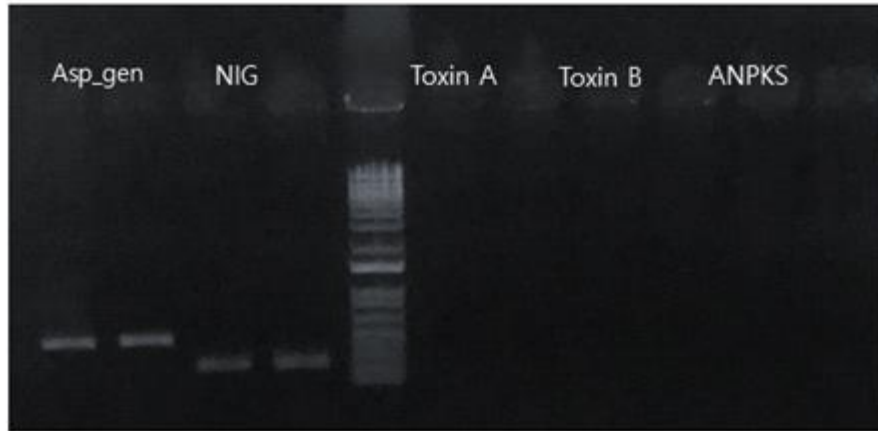


[그림 2-11] 감자박에 첨가된 증류수 양에 따른 흑국균 배양률 및 흑 색소 생산 비교 결과

- 확보된 흑국에 100% 에탄올 20 ml을 첨가하고 원심분리한 후 상층액을 이용하여 흡광도 분석을 수행하였다. 비지를 주성분으로 한 배지에서 확보된 흑국 에탄올 추출물의 흡광도값을 배지 내 증류수 첨가량에 따라 비교한 결과, 감자박 대비 0.1배로 증류수를 첨가한 조건에서의 흑국 에탄올 추출물이 가장 높은 흡광도를 보였지만 자외선-가시광선의 모든 파장범위에서 고르게 흡광도를 보이지 않고 350~400 nm 대의 파장에서 높은 흡광도를 보인 것으로 보아 올리브색에 가까운 것으로 보여진다(그림 2-12).



[그림 2-12] 감자박 대비 증류수 첨가량에 따른 *A. niger* ATCC 16513의 흑국 에탄올 추출물 UV-VIS 흡광도 분석 결과



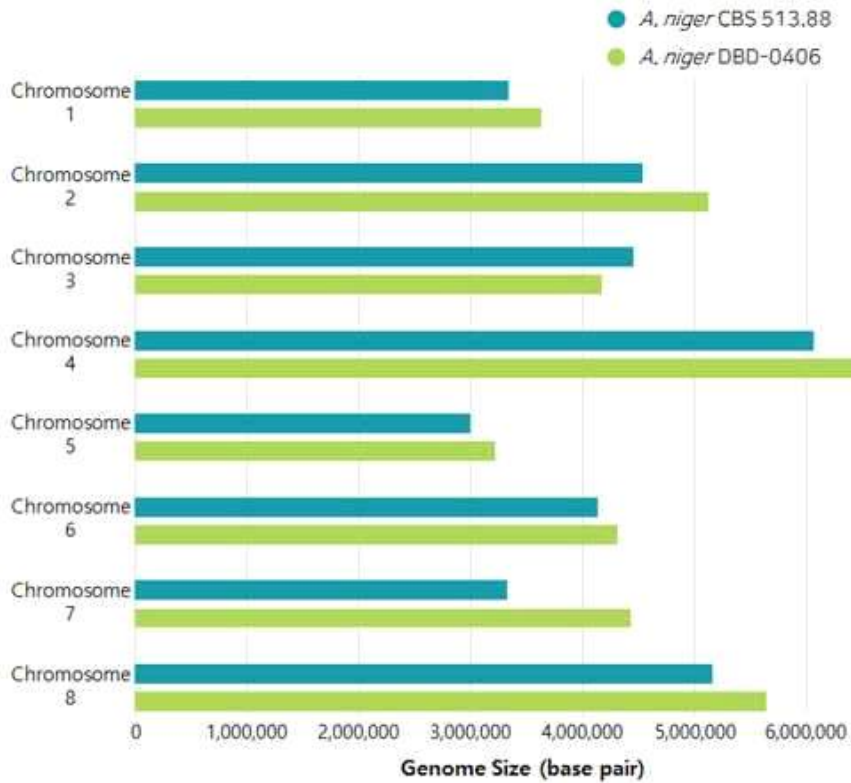
[그림 2-13] *A. niger* ATCC 16513 genomic DNA의 오크라톡신 유전자 검출을 위한 PCR 전기영동 결과. (1, 2) control; (lane 3, 4) control; (lane 5, 6) 1 kb ladder; (lane 7, 8) toxin A; lane 9, 10) toxin B; (lane 11, 12) ANPKS.

다. Ochratoxin 유전자 확인을 위한 PCR 진행

- *Aspergillus niger*의 대표적인 독소인 ochratoxin 유전자의 존재여부를 확인하기 위하여 specific primer를 이용하여 PCR을 진행하였다. Ochratoxin 유전자를 증폭시키는 toxin A, toxin B 및 ANPKS primer를 이용한 PCR결과 전기영동에서 유전자 조각 밴드가 뜨지 않음을 확인하였다(그림 2-13). 이를 통해 본 실험에서 선정된 *A. niger* ATCC 16513 균주의 ochratoxin에 대한 안전성을 확인하였다.

라 *Aspergillus niger* ATCC 16513 균주의 유전체 분석

- 본 균주의 전장 유전체 확보를 위하여 Pacbio사의 Sequel 장비로 차세대염기서열분석을 수행하였다. 유전체 분석 결과 총 크기가 36.9 Mb으로 14개의 contig가 얻어졌다. 기존 미국 국립생물공학정보센터(NCBI)에 등록된 표준 유전체(genome) 균주인 *Aspergillus niger* CBS 513.88은 총 8개의 크로모솜(chromosome)을 가지고 있는 것으로 보고되어있다. 본 실험에 사용된 *A. niger* ATCC 16513의 유전체 분석 결과 표준 유전체 균주(CBS 513.88)와 동일한 8개의 크로모솜을 규명하였으며, 기존 표준 균주보다 전체 유전체 크기가 더 커지는 것으로 파악되었다(그림 2-14).

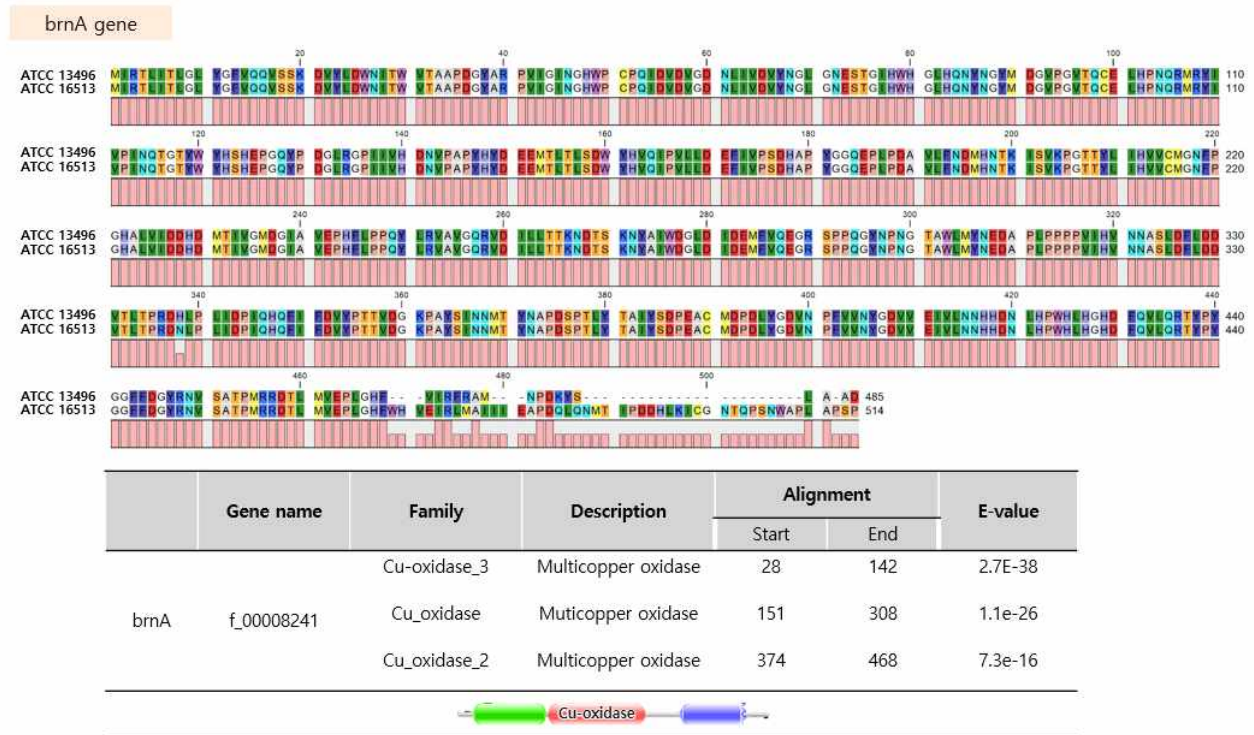


[그림 2-14] *A. niger* ATCC 16513 assembly를 통해 얻은 14개의 contig들은 NCBI에 기재된 *A. niger* CBS 513.88의 8개의 contig들과 일치함

- *A. niger* ATCC 16513의 상세 유전체 분석 결과 총 10902개의 유전자를 규명하였으며, *A. niger* 포자의 흑색에 관여하는 주요 색소 유전자 4개(fungi_00007690, fungi_00008240, fungi_00008241, fungi_00010067)를 규명하였고(표 2-4). 이들의 도메인을 확인하였다. fungi_00007690, fungi_00008240, fungi_00008241은 모두 같은 contig5상에 위치하였으며, fungi_00008240, fungi_00008241은 서로 매우 인접해 있었다. 이 4개의 유전자는 기존에 보고된 *A. niger* 색소 유전자 brnA, fwnA, olvA, pptA와 상동성을 이루었다. 실험에 사용되었지만 최적 흑색소를 생성하는 흑국균으로서 선별되지 않았던 *A. niger* ATCC 13496도 이 4개의 색소 유전자를 가지고 있었으며 *A. niger* ATCC 16513 균주와의 단백질 서열을 비교하였다.

[표 2-4] *A. niger* ATCC 16513 유전체에 존재하는 색소 유전자 목록

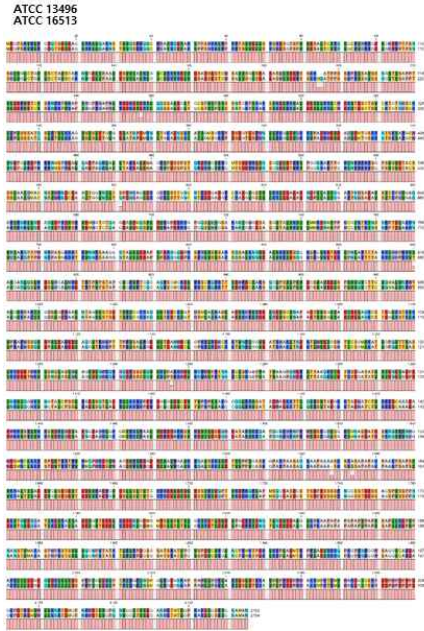
Contig	Gene name	Function
000005F	fungi_00007690	conidial yellow pigment biosynthesis polyketide synthase
000005F	fungi_00008240	pigment biosynthesis protein Ayg1
000005F	fungi_00008241	laccase
000008F	fungi_00010067	4'-phosphopantetheinyl transferase



[그림 2-15] *A. niger* ATCC 13496과 *A. niger* ATCC 16513 사이의 brnA 단백질 서열 비교. 위 쪽 서열은 *A. niger* ATCC 13496이고, 아래 서열은 ATCC 16513 이다. brnA 유전자와 상동성인 f_00008241 유전자의 도메인 정보

- f_00008241 유전자의 경우 brnA 유전자와 상동성을 이루었고 3개의 Cu-oxidase의 도메인을 가졌다. *A. niger* ATCC 13496의 BrnA 단백질 서열과 비교했을 때 더 많은 서열정보를 가지고 있었다(그림 2-15).
- f_00007690 유전자의 경우 fwnA 유전자와 상동성을 이루었고 7개의 도메인을 가졌다. *A. niger* ATCC 13496의 FwnA 단백질 서열과 비교했을 때 서열 길이가 매우 길었지만 오직 6개의 서열만이 서로 차이를 보였다(그림 2-16).

fwnA gene

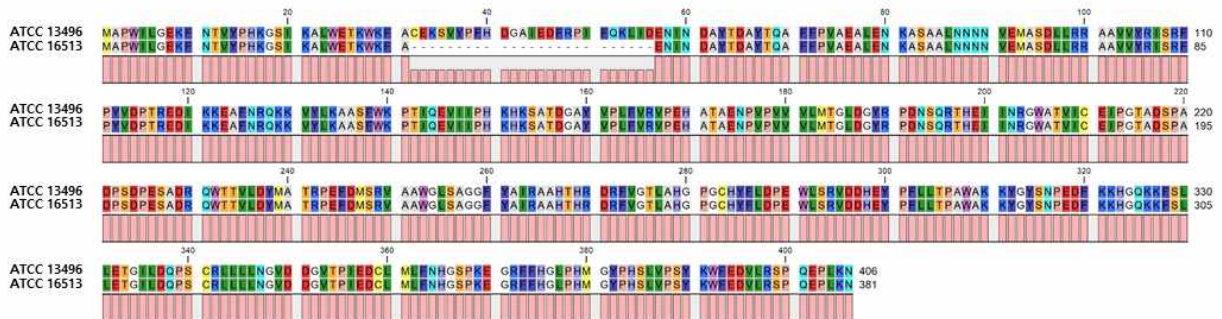


Gene name	Family	Description	Alignment		E-value
			Start	End	
	SAT	Starter unit:ACP transacylase in aflatoxin biosynthesis	8	246	1.0E-82
	Ketoacyl-synt	Beta-ketoacyl synthase, N-terminal domain	378	627	3.3E-80
	Acyl_transf_1	Acyl transferase domain	914	1234	9.3E-39
fwnA	f_00007690	Ketoacyl-synt_C	635	754	6.3E-36
	PP-binding	Phosphopantetheine attachment site	1654	1717	1.1E-09
	PP-binding	Phosphopantetheine attachment site	1773	1837	6.5E-13
	Thioesterase	Thioesterase domain	1900	2002	2.5E-14

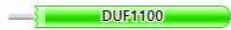


[그림 2=16] *A. niger* ATCC 13496과 *A. niger* ATCC 16513 사이의 fwnA 단백질 서열 비교. 위 쪽 서열은 *A. niger* ATCC 13496이고, 아래 서열은 ATCC 16513 이다. fwnA 유전자와 상동성인 f_00007690 유전자의 도메인 정보

olvA gene

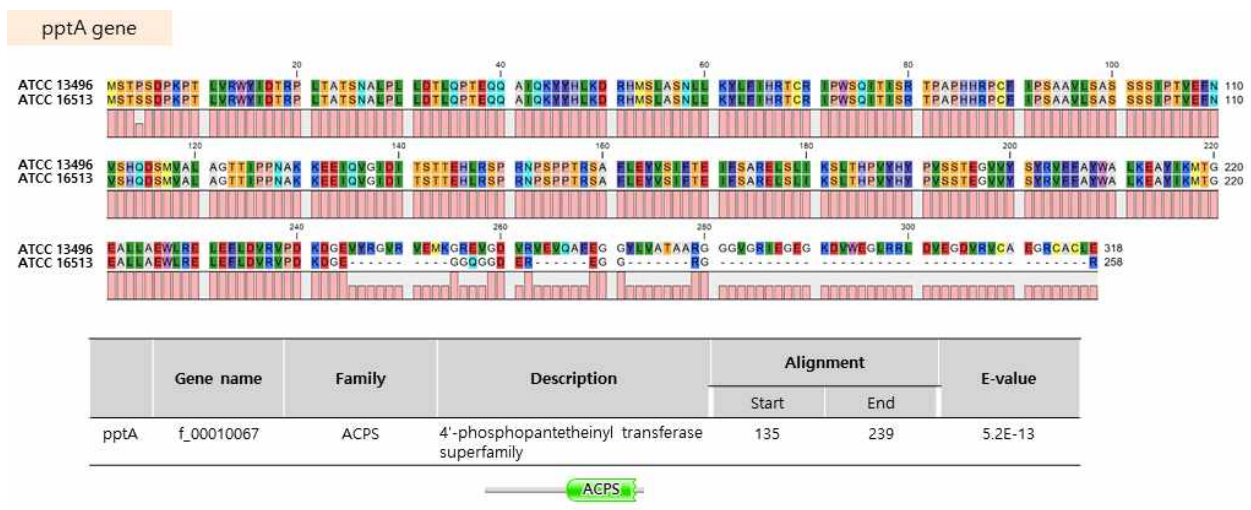


Gene name	Family	Description	Alignment		E-value
			Start	End	
olvA	f_00008240	Alpha/beta hydrolase of unknown function (DUF1100)	63	372	1.3E-11



[그림 2-17] *A. niger* ATCC 13496과 *A. niger* ATCC 16513 사이의 olvA 단백질 서열 비교. 위 쪽 서열은 *A. niger* ATCC 13496이고, 아래 서열은 ATCC 16513 이다. olvA 유전자와 상동성인 f_00008240 유전자의 도메인 정보

- f_00008240 유전자의 경우 *olvA* 유전자와 상동성을 이루었고 1개의 Alpha/beta hydrolase 기능을 가지는 도메인을 가졌다. *A. niger* ATCC 13496의 *Olva* 단백질 서열과 비교했을 때 더 짧은 서열정보를 가지고 있었다(그림 2-17).
- f_00010067 유전자의 경우 *pptA* 유전자와 상동성을 이루었다. 이 *pptA* 유전자에 돌연변이가 발생 시 하얀색 포자를 생성하게 되므로 포자 색에 가장 중요한 유전자라고 할 수 있다. f_00010067 유전자는 1개의 4'-phosphopantetheinyl transferase superfamily 기능을 가지는 도메인을 가졌다. *A. niger* ATCC 13496의 *PptA* 단백질 서열과 비교했을 때 더 짧은 서열정보를 가지고 있었다(그림 2-18).



[그림 2-18] *A. niger* ATCC 13496과 *A. niger* ATCC 16513 사이의 *pptA* 단백질 서열 비교. 위 쪽 서열은 *A. niger* ATCC 13496이고, 아래 서열은 ATCC 16513 이다. *pptA* 유전자와 상동성인 f_00010067 유전자의 도메인 정보

- 기존 흑국균(*Aspergillus niger*) 균주가 가질 수 있는 것으로 보고된 독소 관련 요소(글리오톡신(Gliotoxin), 나프토-감마-피론(naphtho- γ -pyrone), 트라이코센(Trichothecene), 오크라톡신(ochratoxin), 스테리그마토시스틴/아플라톡신(Sterigmatocystin/ Aflatoxin), 맥각 알칼로이드(ergot alkaloid)가 있다. *Aspergillus niger* genome database를 기반으로 독성 유전자들 목록을 정리하고 본 연구에 사용된 *A. niger* ATCC 16513 유전체와 비교해보았다(표 2-5). 각 독성물질의 생합성 경로는 매우 복잡하고 많은 효소를 필요로 한다. 아플라톡신 생합성의 경우 적어도 23 개의 효소 반응을 포함하는 것으로 제안되었다. 하지만 본 균주는 보고된 생합성 경로의 전체 유전자들이 검출되지 않았으므로 독성물질을 합성하기에는 어려움이 있다고 판단하였다. *A. niger* ATCC 16513은 이미 발효산물 생성을 위해 산업적으로 활용중인 균주로써, 안전한 균주임을 유전체 수준에서 확인하였다.

[표 2-5] aspDB에 존재하는 *Aspergillus niger* 독성 관련 유전자 목록

Toxin	Reference	주요 관여 Gene	Gene Product Description
Mycotoxin	Kristian Fog Nielsen et al. (2009),	An01g07960, An03g05220, An05g01710, An06g00900, An06g02120, An11g07050, An16g07720	Mycotoxin biosynthetic process
Gliotoxin	Daniel H, Scharf et al. (2012)	An10g00070, An01g01280, An09g00560	Flavin adenine dinucleotide binding, flavin-linked sulfhydryl oxidase activity and role in cellular response to mycotoxin, gliotoxin biosynthetic process, mycotoxin biosynthetic process, oxidation-reduction process
Ochratoxin A	Abarca et al. (1994)	An15g07920	Polyketide synthase (PKS), encoded in a predicted secondary metabolite gene cluster; required for ochratoxin A biosynthesis
Trichothecene	R.H. Proctor et al. (2020)	An03g00590, An17g00450, An09g02610	Trichodiene synthase activity and role in sesquiterpenoid biosynthetic process
Sterigmatocystin/Aflatoxin	Glinsukon et al., 1979	An01g05920, An02g10940, An03g05460, An06g02670, An08g02850, An08g09230, An09g01950, An11g05440, An12g02080, An12g09560, An13g01810, An14g05070	versicolorin reductase activity and role in positive regulation of sterigmatocystin biosynthetic process, sterigmatocystin biosynthetic process, catalytic activity and role in sterigmatocystin biosynthetic process, monooxygenase activity and role in sterigmatocystin biosynthetic process
Ergot alkaloid	Nina Gerhards et al. (2014)	An05g02370, An07g08760, An08g09330, An11g05060, An12g05630, An16g08610, An18g01540	Alkaloid biosynthetic process, chanoclavine-I biosynthetic process, emericellamide A biosynthetic process, emericellamide biosynthetic and ergot alkaloid biosynthetic process, have NADPH dehydrogenase activity, hormone binding, steroid binding activity and role in ergot alkaloid biosynthetic process, steroid metabolic process

3. 요약 및 결론

- 기확보된 *Aspergillus niger* 균주들에 대한 최적 배양 조건 및 흑 색소 생성 조건 최적화 실험을 통하여, 최종적으로 *A. niger* ATCC 16513 균주를 최적 흑색소 및 흑국 생성 균주로 선정하였으며, 플레이트 당 20 ml의 1%의 dextrose를 함유하는 pH 7.0의 Yeast malt agar에서 37°C로 배양하였을 때 가장 높은 흑 색소 생성율을 보임을 확인하였다.
- 산업에서의 활용도를 높이기 위하여 식품부산물인 비지와 감자박을 이용한 경제적 배지 연구를 수행하였다. 흑색은 모든 가시광선 파장을 흡수하기 때문에 흑국 에탄올 추출물의 흡광도값 결과 모든 파장대에서 고른 흡광도를 보인 비지(대두가공부산물) 대비 1배의 증류수 첨가 배양 조건이 흑색 색소 목적의 흑국 배양에 가장 적합함을 확인할 수 있었다.
- 최종적으로 선정된 후보 *A. niger* ATCC 16513 균주의 전체 유전체 정보를 차세대염기서열 분석 방법을 이용하여 확보하였으며, 전체 유전체 길이는 36.9 Mb으로 14개의 contig를 규명하였다. 총 8개의 크로모솜(chromosome)으로 정리할 수 있었으며, 추가적인 유전자 규명 분석을 수행하여 총 10,902 종의 유전자 정보를 확인함. 이 중 포자의 흑 색소 생성에 영향을 미치는 4개의 주요 색소 대사 관련 유전자를 확인하고 특이적 요소를 확인하였다.
- *Aspergillus niger* genome database를 기반으로 *Aspergillus niger* 균주들의 genome 내 독소 유전자 존재 유무를 확인하였으며, 이미 발효산물 생성을 위해 산업적으로 활용중인 균주로써, profile 확보된 독성 관련 유전자 존재를 확인할 수 없었다. 따라서 기본적인 발효산물 생성을 위해 활용중인 *Aspergillus niger* 균주들은 독소 생성능이 없음을 유전체 수준에서 확인하였다.

제3절. 흑국 유래 흑 색소 제조 공정 설계 및 생산

1. 연구방법

가. 재료

(1) 흑국(black koji)

- 흑 색소의 추출조건을 탐색하기 위해 원료로 쌀을 배지로 사용하여 *Aspergillus niger* 균을 배양한 후 건조하여 제조된 흑국을 수원종국(수원발효식품연구소, 성남, 경기도)에서 구입하였다.

(2) 카라멜색소와 오징어먹물색소

- 흑 색소의 품질기준을 설정하기 위해 대조군들은 시판중인 카라멜색소와 오징어먹물색소로 하였다. 카라멜색소는 (주)보락(화성시, 경기도)에서, 오징어먹물색소는 다산에프엠(주)에서 해외에서 수입한 제품을 구입하였다.

(3) 효소

- 흑국으로부터 흑 색소를 효소정제법에 의해 생산하기 위해 본 연구에서 사용된 효소제들은 Novozyme 사에서 공급하는 효소제들을 대종상사(서울)로부터 구입하여 사용하였다. 사용된 효소제들의 구성효소, 최적 pH와 온도 등의 정보는 표 3-1에 제시하였다.

[표 3-1] 효소정제법 개발에 사용된 효소제들의 특성

Enzyme product	Main enzymes	Density (g/mL)	Optimal condition	
			pH	Temperature (°C)
Ceremix 6X MG	Protease, Xylanase, α -amylase, β -amylase, cellulase	-	5.0~6.0	55~60
Liquozyme Supra 2.2X	α -amylase	1.25	5.0~5.6	50~75
Termamyl 2X	α -amylase	1.00	5.0~5.6	37~110
Viscozyme-L	β -glucanase, xylanase, cellulase, hemicelluase	1.20	3.3~5.5	25~55
BAN 480L	α -amylase	1.21	5.5~7.5	70~80
Ondea PRO	pullulanase, α -amylase, cellulase, xylanase, protease, lipase	1.21	5.0~5.5	55~60

(4) 시약 및 용매

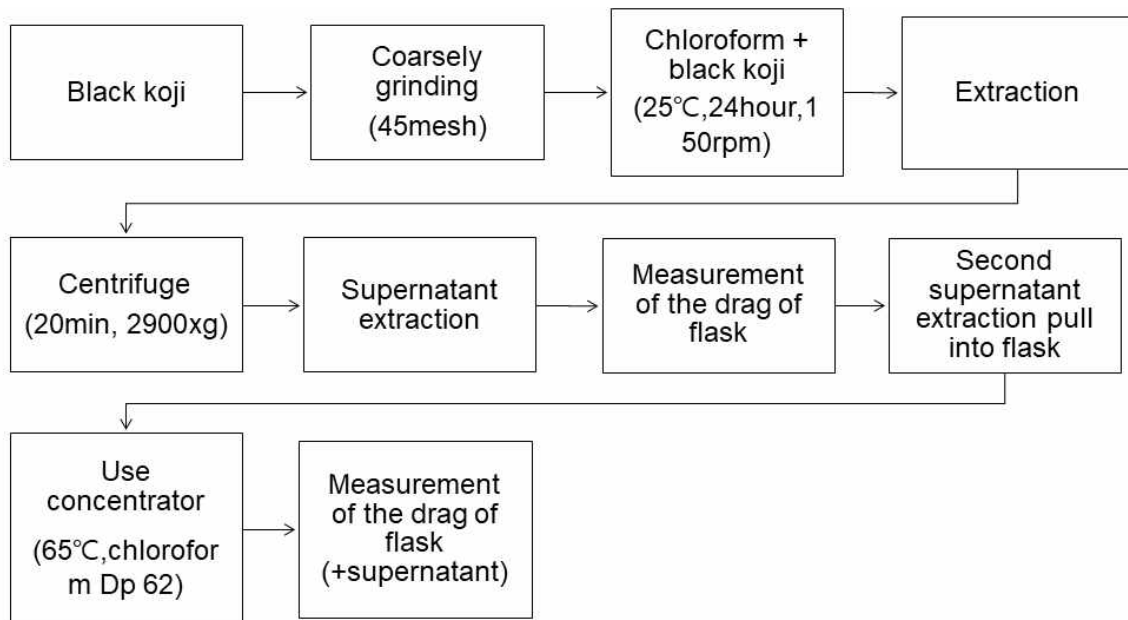
- 흑국으로부터 흑 색소 추출시험에 사용된 유기용매들은 ACS 등급 이상의 것을 사용하였으며, 흑국의 탄수화물과 단백질 분해에 사용된 효소들은 식품첨가물등급의 것을 사용하였다. 또한 이외의 분석에 사용된 시약 및 용매들은 ACS 등급 이상의 것이었다.

나. 흑국으로부터 흑 색소 추출

(1) 용매추출법에 의한 흑 색소 제조

- 흑국으로부터 흑 색소를 추출할 수 있는 추출용매를 탐색하기 위해 흑국과 유기용매를 1:10의 중량비율로 혼합하고 상온에서 1시간 동안 진탕한 후 원심분리하여 상층액의 흡광도를 490 nm, 515 nm, 610 nm에서 측정하였다. 선발된 유기용매를 이용하여 흑국과 유기용매의 혼합비율, 추출시간, 추출온도, 추출회수 등을 요인으로 하여 흑국으로부터 흑 색소의 최적 추출조건을 확립하였다. 흑국과 유기용매를 혼합한 후 진탕 또는 교반한 후 원심분리하여 상층액을 취하여 미리 항량을 측정된 평플라스크로 옮기고 회전증발농축기를 이용하여 흑 색소 추출물로부터 추출용매를 제거하였다(그림 3-1). 흑 색소 추출물은 105℃의 열풍건조기에서 항량을 결정하고, 다음의 계산식에 의해 흑 색소 수율을 결정하였다.

$$\text{흑 색소 수율(\%)} = \frac{\text{추출된 흑 색소의 항량(g)}}{\text{흑국 중량(g)}} \times 100$$

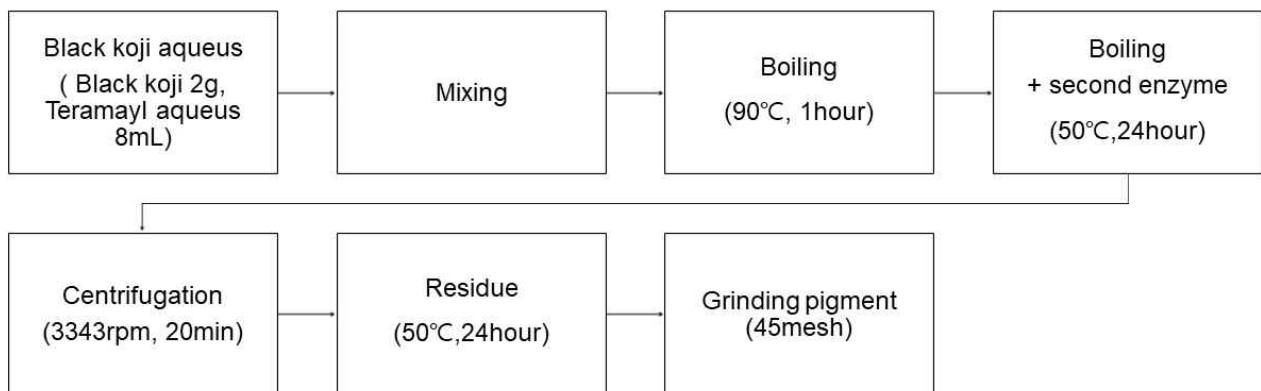


[그림 3-24] 용매추출법에 의한 흑국 유래 색소 제조 공정 흐름도

(2) 효소정제법에 의한 흑국 유래 흑 색소 제조

- 효소정제법에 의해 흑국으로부터 정제된 흑국 유래 흑 색소는 1차 효소처리와 2차 효소처리를 통해 제조되었다. 효소용액은 1차 효소처리를 위해 thermostable α -amylase (Teramyl 2X)를 흑국 건량기준의 0.5%가 되도록 증류수와 혼합하여 희석하였다. 흑국 2 g에 제조된 효소액 8 mL을 가한 후 90°C에서 1시간 동안 가열한 후 50°C로 온도를 낮추고 2차 효소처리를 위한 효소들(표 3-1)을 각각 초기 흑국 사용량의 0.5%가 되도록 가하여 50°C에서 24시간 동안 반응시켰다. 반응이 종료된 후 원심분리(3,000×g, 20 min)하여 상층액을 제거하고 침전물을 80°C에서 24시간 동안 건조하였다. 건조된 흑국색소는 분쇄하여 45 mesh 체망을 통과시켜 상온에서 보관하며 사용하였다(그림 3-2). 효소처리가 완료된 후 원심분리하여 흑 색소 층을 회수하여 105°C의 열풍건조기에서 함량을 결정하여 다음의 식에 의해 흑 색소 수율을 결정하였다. 효소정제법에 의한 흑국 유래 흑 색소는 효소흑국색소로 명명하였다.

$$\text{흑 색소 수율(\%)} = \frac{\text{회수된 흑 색소의 함량}(g)}{\text{흑국 중량}(g)} \times 100$$



[그림 3-25] 효소추출법에 의한 흑국 유래 흑 색소 제조 공정 흐름도

다. 추출·정제된 흑국 유래 흑 색소의 평가

(1) 흡광도 측정

- 흑국으로부터 용매추출법에 의한 흑 색소의 생산에 적합한 유기용매를 탐색하기 위해, 추출된 흑 색소 용액을 10배 희석하여 490, 514, 620 nm으로 측정하였다.

(2) 총당 측정

- 효소정제법에 의한 흑국으로부터 흑 색소의 정제가 적절한지를 확인하기 위해 효소제 처리 후 $3,000 \times g$ 에서 20분간 원심분리하여 상층액을 100배 희석하여 총당 분석용 시료를 제조하였다. 제조된 분석용 시료 1 mL에 5% (w/v) aqueous phenol 용액 1 mL와 진한 황산 5 mL를 순차적으로 가한 후 30분간 상온에서 방치하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 상층액의 총당 함량은 포도당을 표준품으로 하여 0.005~0.05 mg/mL의 농도 범위에서 작성된 표준곡선으로부터 결정하였다.

(3) 색 특성

- 흑국색소의 색 특성을 분석하기 위해 오징어먹물색소 및 흑국색소들을 분체용 페트리디쉬에 1 cm 두께로 넣은 후 색차계(JR-801, Minolta, Osaka, Japan)를 이용하여 Hunter's color system에 의해 명도(L, Lightness), 적색도(a, redness)와 황색도(b, yellowness)을 분석하였다. 표준백판의 L, a와 b 값은 각각 98.717, 0.085와 -0.621 이었다. 오징어먹물색소와 색 특성에 서의 차이는 총 색 차이(ΔE)를 계산하여 비교하였다.

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$$

$$\Delta L = L_1 - L_2, \Delta a = a_1 - a_2, \Delta b = b_1 - b_2$$

(4) 색가

- 흑국색소의 색가를 측정하는 흡광도가 0.3~0.7의 범위가 되도록 정밀히 달아 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 가하여 100 mL로 정용한 것을 시험용액으로 하였고, 이를 원심분리 ($3,000 \times g$, 20 min)하여 얻은 상층액을 이용하여 색가를 측정하였다. 준비된 시험용액은 DMSO를 대조액으로 하여 액층 1 cm, 파장 500 nm 부근의 극대흡수파장에서 최대흡광도(A)를 측정하여 다음 계산식에 따라 색가를 계산하였다. 오징어먹물색소를 대조군으로 하였다.

$$\text{색가}(E_{1cm}^{10\%}) = \frac{A \times 10}{\text{검체의 채취량}(g, d.b)}$$

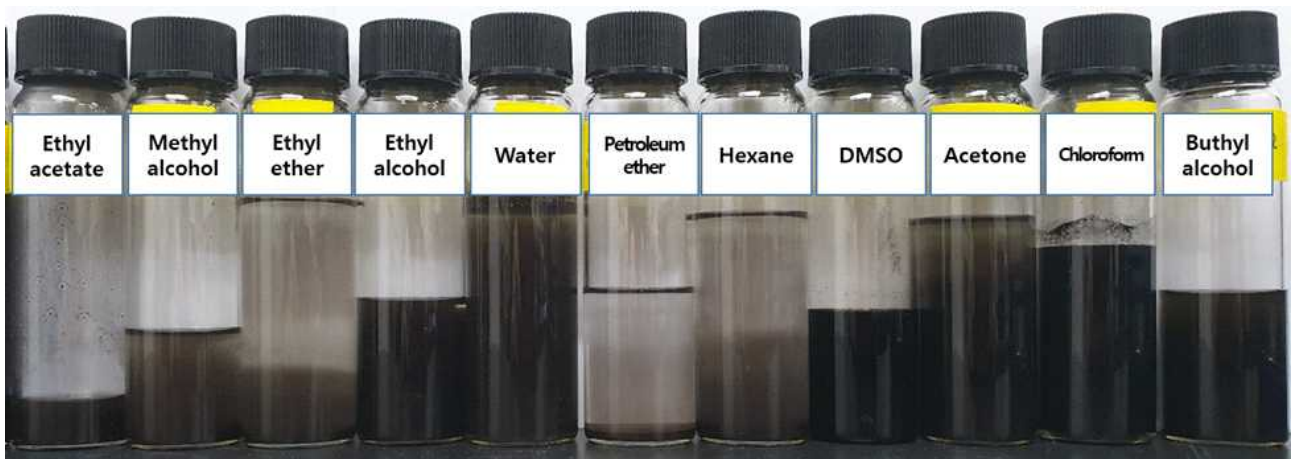
라. 흑국 유래 흑 색소의 대량생산 공정 구축 및 시제품 생산

- 흑국 유래 흑 색소의 대량생산 공정은 효소정제법을 기본으로 하여 구축하였다. 대량생산 공정 검증 및 시제품 생산은 힐링숲농장영농조합법인(영덕군, 경북)의 생산시설을 이용하였다.

2. 연구결과

가. 용매추출법에 의한 흑국 유래 흑 색소 제조

- 흑국으로부터 흑 색소를 추출하기에 적합한 추출용매를 선정하기 위해 물, 메틸알코올, 에틸알코올, 부틸알코올, 에틸아세테이트, 아세톤, 에틸에테르, 석유에테르, 디메틸설폭시드(DMSO), 클로로포름, 헥세인을 추출용매로 하여 흑 색소를 추출하였다.



[그림 3-3] 추출용매별 흑국으로부터 흑 색소 추출 양상

- 그림 3-3에 제시된 것처럼 추출용매에 따라 흑국으로부터 흑 색소의 추출 양상은 다양하였다. 클로로포름과 디메틸설폭시드의 추출효율이 가장 좋았으며, 물, 부틸알코올, 아세톤은 중간정도 수준으로 추출할 수 있었다. 그러나 비극성도가 높은 헥세인, 에틸에테르, 석유에테르 등은 흑국으로부터 흑 색소를 추출하지 못하였다.
- 추출용매에 따른 흑국으로부터 흑 색소의 추출 정도를 판단하기 위해 원심분리 후 상층액을 취하여 490 nm와 610 nm에서 흡광도를 측정하였다(표 3-2). 상층액의 흡광도 결과에 의하면 클로로포름과 디메틸설폭시드가 흑국으로부터 흑 색소를 완벽히 추출한 것을 알 수 있었다. 또한 물을 추출용매로 사용하여도 상당량의 흑 색소들이 흑국으로부터 추출되는 것을 알 수 있었다.

[표 3-2] 추출용매별 흑 색소 함유 상층액의 흡광도

추출용매	흡광도	
	490 nm	610 nm
물	1.958	1.951
메틸알코올	0.618	0.260
에틸알코올	0.305	0.204
디메틸설폭시드	3.000	3.000
아세톤	0.585	0.388
에틸아세테이트	0.172	0.173
부틸알코올	0.078	0.030
에틸에테르	0.343	0.342
클로로포름	3.000	3.000
석유에테르	0.015	0.000
헥세인	0.000	0.000

*1% 분산물, 25℃, 1시간 교반.

- 클로로포름과 디메틸설폭시드를 이용하여 추출한 것들의 경우 침전물(쌀배지)에서 흑색이 전혀 관찰되지 않았으나, 물의 경우 침전물이 흑색으로 착색되어 있는 것을 알 수 있었다. 따라서 흑국으로부터 흑 색소를 추출할 때, 모든 흑 색소를 추출하기 위해서 추출용매로 클로로포름을 사용하는 것이 적합할 것으로 판단되었다. 디메틸설폭시드도 클로로포름과 같이 모든 흑 색소를 추출할 수 있었으나 흑 색소 추출물로부터 디메틸설폭시드를 완벽히 제거하는데 어려움이 있어 추출용매로 적합하지 않았다.
- 클로로포름을 추출용매로 하여 흑국으로부터 흑 색소를 추출하는 조건을 탐색하고자 하였음. 예비실험에 있어 흑 색소 수율의 변동성이 컸다. 이것은 원료로 사용한 흑국이 대부분 입도가 큰 분말로 존재하였지만 쌀알 크기의 입자들도 존재하는 등 흑국의 입도가 균일하지 않은 것 때문이었다. 그래서 흑국 원료를 40 mesh 체를 통과시켜 쌀알 크기의 흑국을 제거한 후 추출시험을 수행하였다. 예비실험보다 흑 색소 수율의 변동성은 작아졌으나 여전히 높은 변동성을 나타내었다. 결과적으로 흑국을 분쇄하여 60 mesh 체망을 통과할 수 있는 미분(그림 3-4)으로 제조한 후 추출조건 탐색을 위한 실험을 수행하였다.

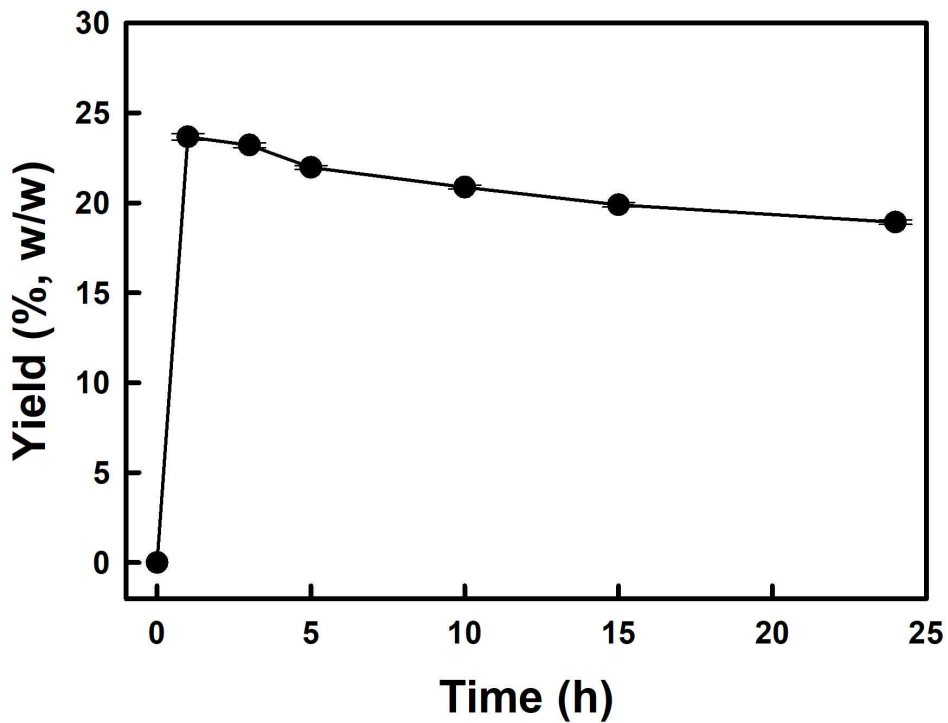


흑국 원료
(40 mesh 통과)

흑국 분말
(분쇄 후 60 mesh 통과)

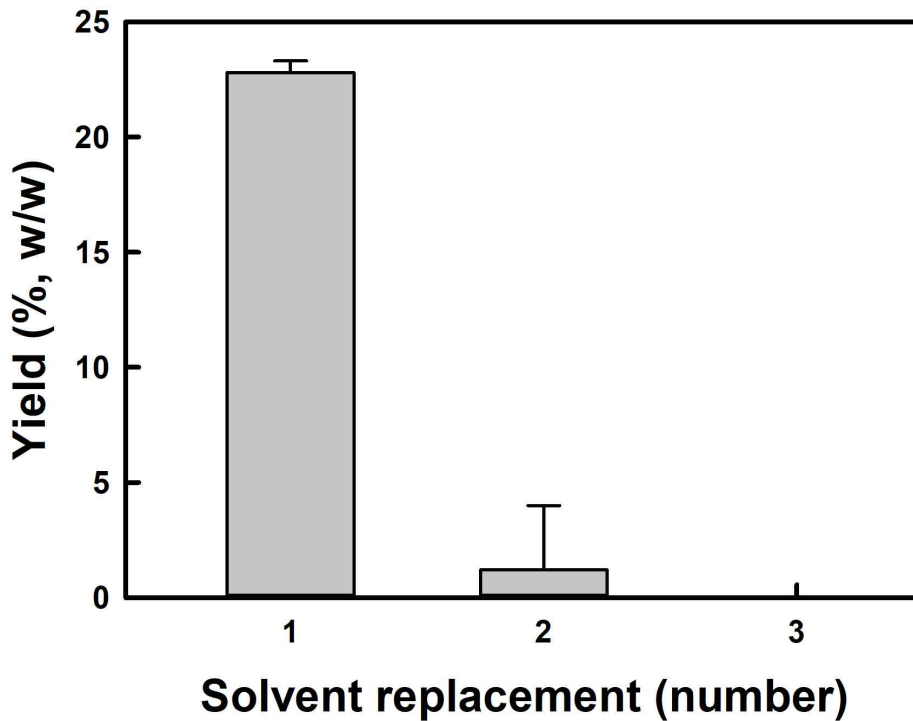
[그림 3-4] 40 mesh 통과 흑국 원료와 분쇄하여 60 mesh 통과시킨 흑국 분말

- 그림 3-4에서 제시된 것처럼 흑국을 분쇄하여 60 mesh 체망을 통과시킨 흑국 분말은 이것 자체로도 식품에 흑 색을 부여할 수 있을 것으로 판단되며, 향후 흑국 분말 자체를 흑 색소로 활용하는 방안에 대한 검토할 필요가 있다.



[그림 3-5] 흑국 분말로부터 흑 색소 추출에 대한 추출시간의 영향

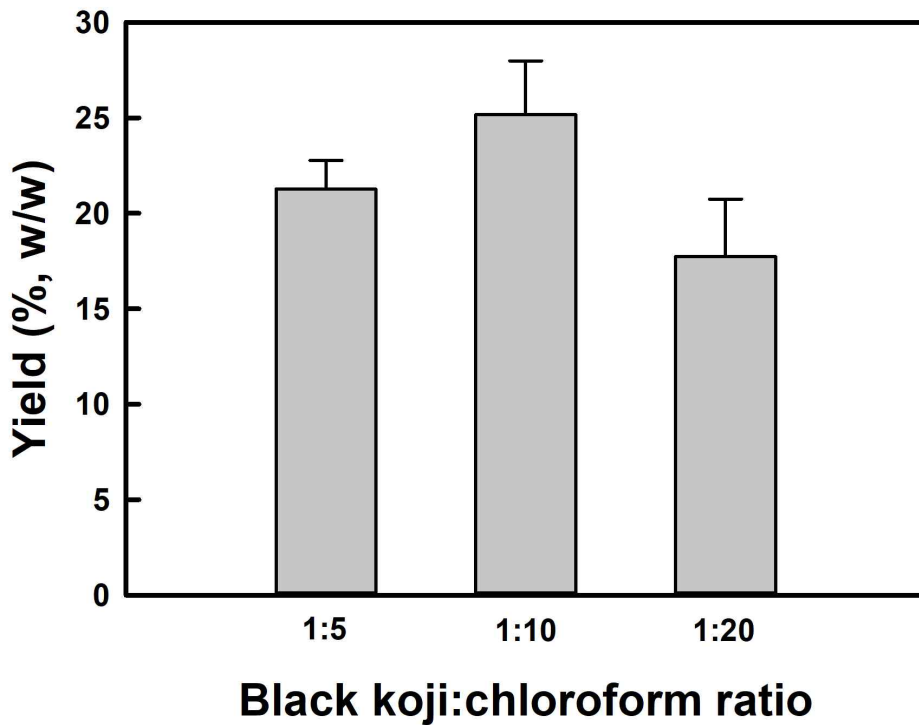
- 클로로포름을 추출용매로 하여 흑국 분말과 10:1의 중량비율로 혼합하여 상온에서 1-24 h 동안 교반하여 흑 색소를 추출하고, 연구방법에 기술한 것과 같이 흑 색소 추출수율을 측정하여 그림 3-5에 나타내었다. 추출시간 1시간에서 23.7%의 가장 높은 추출수율을 나타내었으며, 추출시간이 연장될수록 추출수율은 지속적으로 감소하였다.



[그림 3-6] 흑국으로부터 흑 색소 추출에 대한 반복추출의 영향

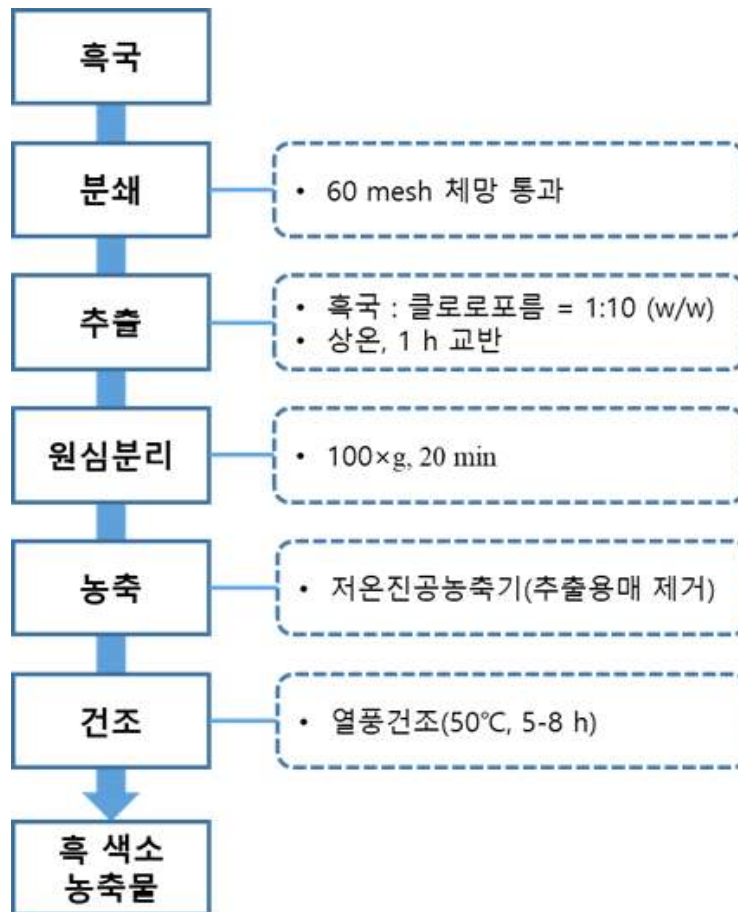
- 추출시간을 1시간으로 결정하고 신선한 추출용매를 이용하여 반복추출에 대한 흑 색소 추출수율을 조사하였다. 클로로포름과 흑국분말을 10:1의 중량비율로 혼합하고 상온에서 1시간 추출한 후 원심분리하여 상층액을 회수하고, 잔사에 초기와 동량의 클로로포름을 가하여 다시 1시간 추출하였다. 이를 총 3회 반복하였다. 그림 3-6에서 제시된 것과 같이 1회 추출 시 흑 색소의 수율은 22.8%를 나타내었고, 잔사를 이용하여 재추출 시 흑 색소의 추출수율은 1.2%이었고, 3회 추출 시에는 추출되는 것이 없었다. 또한 2회 추출 시 추출수율의 표준편차는 2.8%로 평균값보다 높아 실제적으로는 추출되는 것이 없는 것 같다.

- 추출시간을 1시간으로 결정하고 신선한 추출용매를 이용하여 1회만 상온에서 추출하는 것으로 결정하고, 흑국 분말과 추출용매의 비율을 1:5, 1:10, 1:20으로 변화하여 추출하였을 때의 추출수율을 조사하여 그림 3-7에 나타내었다. 흑국 분말과 추출용매 비율을 1:5, 1:10, 1:20으로 증가시켰을 때, 흑 색소 추출수율은 각각 21.3%, 25.2%, 17.7%이었고, 흑국 분말과 추출용매의 비율이 1:10인 경우가 가장 높은 추출수율을 나타내었다.



[그림 3-7] 흑국으로부터 흑 색소 추출에 대한 흑국과 클로로포름 비율의 영향

- 이상의 결과로부터 용매추출법을 이용하여 흑국으로부터 흑 색소를 추출할 경우, 흑국은 분쇄하여 미분으로 사용하여야 하며, 클로로포름을 추출용매로 하여 흑국 분말과 1:10의 중량 비율로 혼합하고, 상온에서 1시간 동안 교반하여 추출하는 것이 가장 높은 수율의 흑국 유래 흑 색소를 얻을 수 있었다. 용매추출법에 의한 흑 색소 생산 공정은 그림 3-8에 제시하였다.

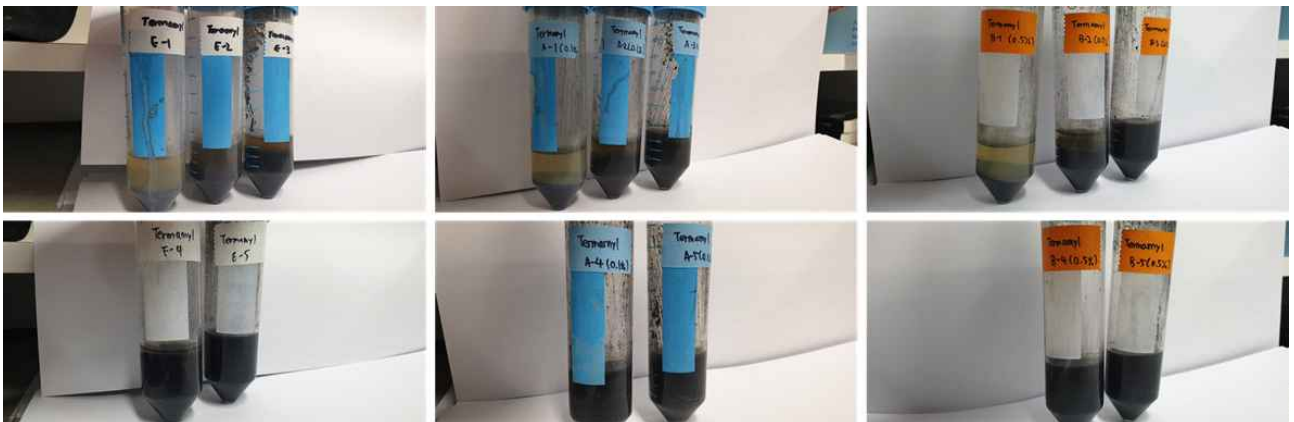


[그림 3-8] 용매추출법에 의한 흑 색소 추출조건 및 제조공정

- 설정된 최적 용매추출조건을 이용하여 흑국 분말로부터 흑 색소를 대량 추출하여 회전증발 농축기를 이용하여 추출용매를 제거하였을 때, 흑 색소 추출물은 끈적끈적한 점질물과 같은 제형을 나타내었다. 흑 색소 농축액이 분말상으로 제조할 수 있는 건조법을 찾기 위해 진공 동결건조법, 열풍건조법(50°C), 진공건조법을 적용하였다. 모든 건조법에 의해 흑 색소 농축액을 건조하였을 때, 흑 색소 농축액은 카라멜과 같이 끈적끈적한 유동체의 형상이 만들어져 분말상으로 제조하는 것이 불가능한 것으로 판단된다. 따라서 용매추출법을 이용하여 제조된 흑국 유래 흑 색소는 오징어먹물색소농축액과 같이 20~65°Brix의 고점성의 농축액의 형태로 생산하는 것이 적절한 것 같다.

나. 효소정제법에 의한 흑국 유래 흑 색소 제조

- 흑국을 정제하여 흑 색소를 제조하는 효소정제법은 thermostable α -amylase를 주성분으로 하는 Termamyl 2.2X를 이용한 1단계 효소처리법과 1단계 효소처리 후 Ceremix 6X MG, Liquozyme Supra 2.2X, Termamyl 2X, Viscozyme-L, BAN 480L, Ondea PRO 들을 각각 추가로 처리하는 2단계 효소처리법을 적용하였다.
- Termamyl 2.2X를 이용한 1단계 효소처리에 의한 흑국으로부터 흑 색소를 정제하는 경우에 있어, 흑국 분산물의 농도를 10%에서 50%로 하였을 때, 10%와 20%는 효소가 적절하게 반응하여 흑 색소들이 흑국으로부터 분리되었고, 20%에서 흑색소의 분리가 가장 잘 되었다. 그러나 30%부터는 분산물의 농도가 너무 높아 효소의 작용이 적절하지 않았다. 다음으로 효소의 농도를 흑국의 건조중량 대비 0.1%, 0.3%와 0.5%로 증가시키며 흑국으로부터 흑 색소의 분리 효율을 검증하였을 때, 효소의 농도가 증가하면서 흑국으로부터 흑 색소의 분리가 더욱 용이해진 것을 확인하였다(그림 3-9). 따라서 1단계 효소처리는 thermostable α -amylase가 주성분인 Termamyl 2.2X를 이용하여 흑국 분산물 농도 20%에서 흑국 건조중량 대비 효소가 0.5%가 되도록 가하여 효소반응시키는 것이 적절한 것으로 판단되었다.



[그림 3-9] Termamyl 2.2X (thermostable α -amylase)를 이용한 1단계 효소처리 조건 탐색

E: 흑국 분산물에 효소를 가한 후 90°C 에서 1시간 효소반응

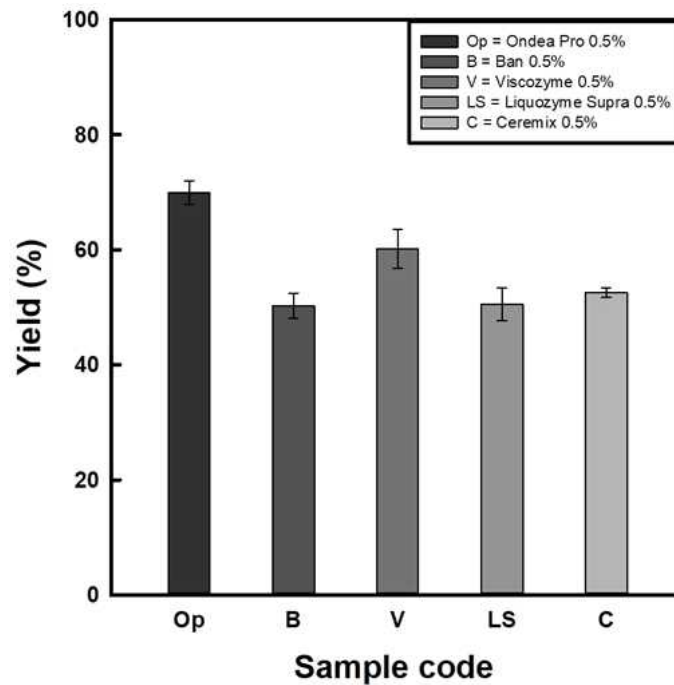
A: 흑국 분산물을 90°C 에서 30분간 가열한 후 효소를 0.1% 가하여 90°C 에서 1시간 효소반응

B: 흑국 분산물을 90°C 에서 30분간 가열한 후 효소를 0.5% 가하여 90°C 에서 1시간 효소반응

1, 2, 3, 4 및 5: 흑국 분산물의 농도가 10%, 20%, 30%, 40% 및 50%

- 결정된 1단계 효소처리 후 105°C 에서 24시간 동안 건조하여 분쇄하고 40 mesh 체망을 통과 시켜 제조된 흑국 유래 흑 색소의 수율은 $83.65 \pm 0.01\%$ 이었다. 색가는 43.1 ± 0.03 로 오징어 먹물색소분말의 색가(38.5)보다 높은 수준을 나타내었다. 또한 흑국 유래 흑 색소의 명도는 20.31 ± 0.09 , 적색도는 5.83 ± 0.28 , 황색도는 4.84 ± 0.16 을 나타내었으며, 오징어먹물색소의 색 특성을 대조군으로 하여 계산한 총 색 차이는 8.66 ± 0.01 이었다.

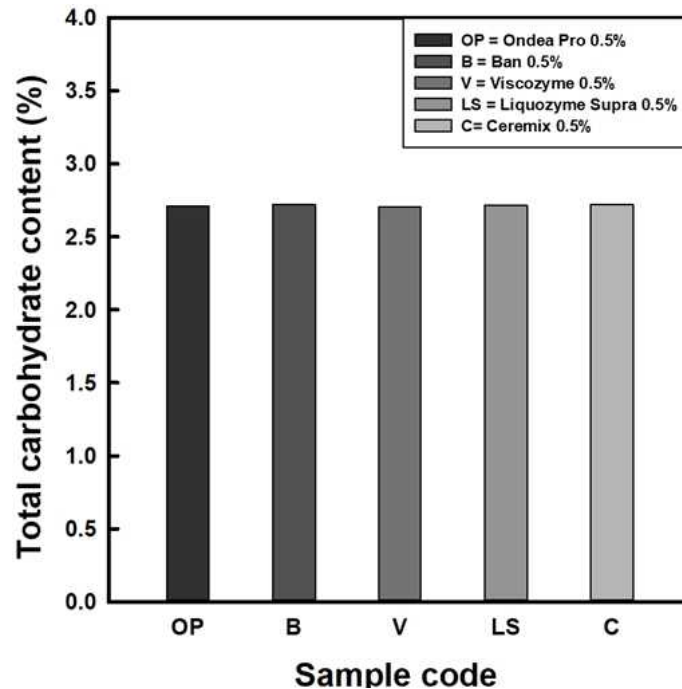
- 흑 색소의 원료로 사용된 흑국에는 전분, 단백질, 세포벽 같은 기타 성분들이 다량 존재하고, 1단계 효소처리는 주로 흑국의 전분질 성분들을 가수분해하였다. 그래서 추가적으로 상대적으로 고분자성의 전분가수분해물(덱스트린), 단백질, 세포벽 성분들을 가수분해하여 흑 색소의 순도 및 색가를 향상시키기 위하여 1단계 효소처리 후 2단계 효소처리를 수행하였다. 2단계 효소처리는 표 3-1에 제시된 Ceremix 6X MG, Liquozyme Supra 2.2X, Viscozyme-L, BAN 480L, Ondea PRO의 효소제들을 사용하여 수행하였다. 이 중 Ceremix 6X, Viscozyme-L, Ondea PRO는 amylase류, cellulase류, protease류 효소들이 혼합되어 있는 enzyme cocktail 제품들이었다.
- 흑국을 20% 농도로 증류수와 분산물을 제조한 후 90℃에서 30분간 열처리하여 흑국 페이스트로 제조한 후 초기 흑국사용량의 0.5%에 해당하는 Termamyl 2.2X 효소제를 가하여 90℃에서 1시간 동안 반응시키고 50℃로 온도를 낮춰 2단계 효소제들을 초기 흑국 사용량의 0.5%에 상당하도록 가하여 효소반응시켜 흑국 유래 흑 색소를 제조하였다. 2단계 효소처리에 의해 제조된 흑국 유래 흑 색소의 수율을 그림 3-10에 제시하였다.



[그림 3-10] 2단계 효소처리에 의해 제조된 흑국 유래 흑 색소의 수율에 대한 효소제의 영향

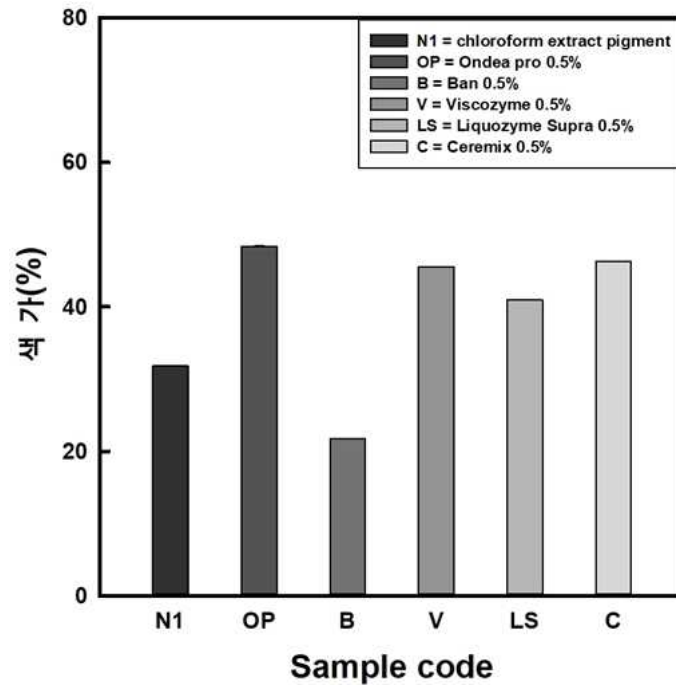
- 2단계 효소처리에 의한 흑국 유래 흑 색소의 수율은 48~68%의 범위를 나타내었고, Ondea PRO가 가장 높았으며, Ban 480L가 가장 낮은 수율을 나타내었다(그림 3-10). 2단계 효소처리에 의한 흑국 유래 흑 색소의 수율은 1단계 효소처리만 한 것에 비해 모두 유의적으로 낮은 수준을 나타내었다. 이것은 흑국의 흑 색소 이외의 성분들이 2단계 효소제들에 의해 가수분해되어 색소 회수 과정에서 손실되었기 때문이다.

- 흑국의 주요성분인 탄수화물들의 가수분해가 2단계 효소처리의 효소제들에 의해 적절히 일어난 것인지를 판단하기 위해 제조과정 중 회수한 상층액의 총당 함량을 측정하여 그림 3-11에 제시하였다. 2단계 효소처리에서 사용된 효소제들에 의해 발생된 총당함량은 2.6~2.8%의 범위로 매우 유사하였으며, 효소제들 사이에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 따라서 본 연구에서 사용된 2단계 효소처리를 위한 효소제들은 1단계 효소처리 후에도 흑국 가수분해물의 추가적인 가수분해를 진행시키는 것으로 판단된다.



[그림 3-11] 2단계 효소처리에 의해 제조과정 중 회수된 상층액의 총당 함량

- 2단계 효소처리에 의해 제조된 흑국 유래 흑 색소의 분말들을 이용하여 색가를 측정하여 그림 3-12에 제시하였다. 흑국 유래 흑 색소의 색가는 21.5~48.3의 범위를 나타내었으며, Ondea PRO > Viscozyme-L ≈ Ceremix 6X MG > Liquozyme Supra > Ban 480L의 순서로 증가하였다. Ban 480L에 의한 흑국색소를 제외하고 모든 흑국색소들은 용매추출법에 의한 흑국색소에 비해 높은 색가를 나타내었다. 또한 Ondea PRO, Viscozyme-L, Ceremix 6X에 의한 흑국색소들은 1단계 효소처리만을 적용한 흑구색소에 비해 유의적으로 높은 색가를 나타내었다.



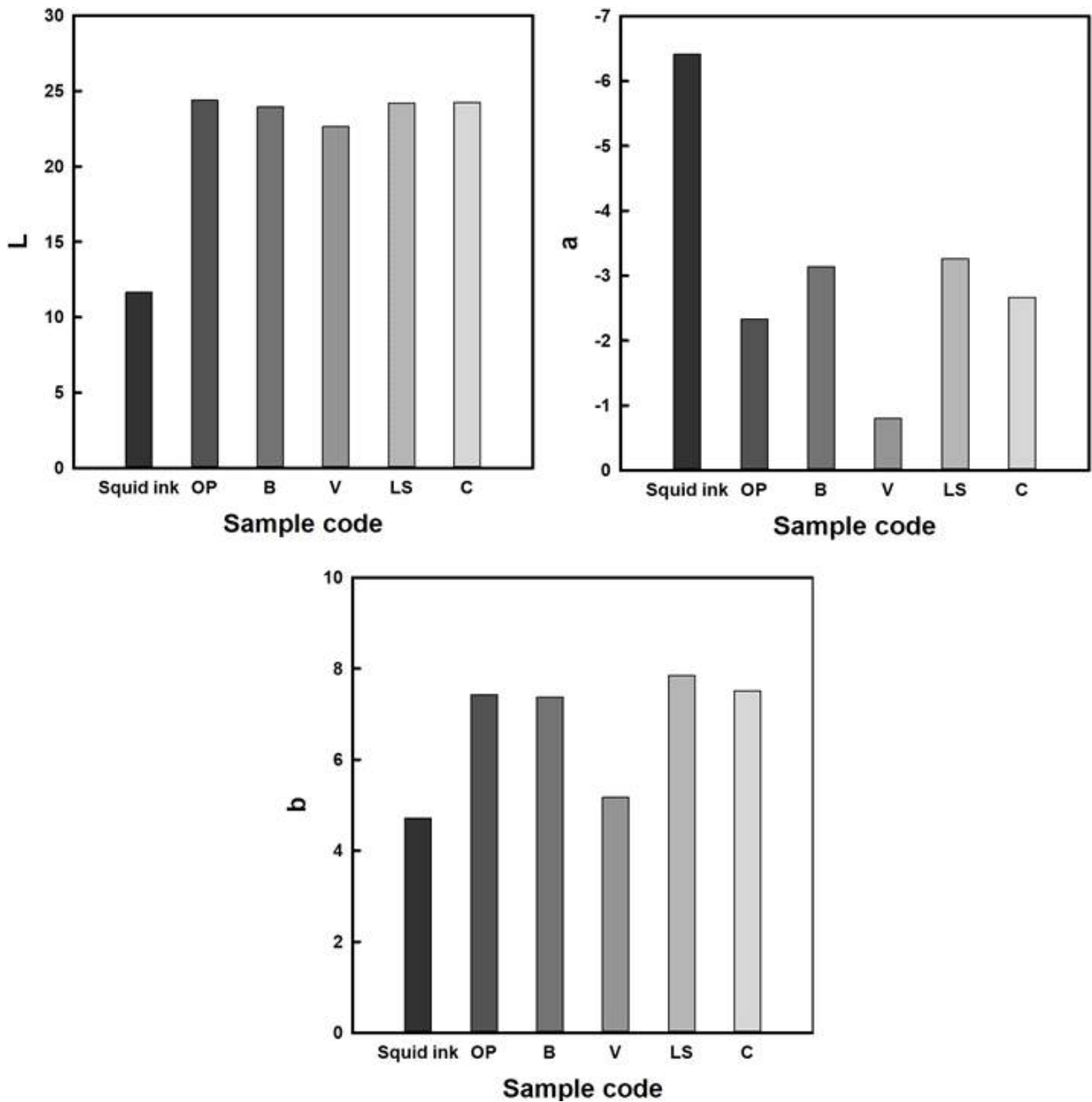
[그림 3-12] 2단계 효소처리에 의해 제조된 흑국 유래 흑 색소의 색가

- 2단계 효소처리에 의해 제조된 흑국색소의 색 특성을 측정하여 그림 3-13에 제시하였다. 대조군으로 오징어먹물색소 분말제품을 사용하였다. 흑국색소들의 명도는 22.33~24.39의 범위에, 적색도는 -3.26~-0.80의 범위에, 황색도는 5.17~7.51의 범위에 있었다. 흑국색소들의 명도, 적색도와 황색도는 오징어먹물색소 분말제품의 것들(L=11.66, a=-6.41, b=4.72)보다 모두 높은 수준을 나타내었다.

[표 3-3] 2단계 효소처리에 의한 흑국 유래 흑 색소의 총 색 차이

Enzyme product	ΔE
Ondea Pro	13.47 ± 0.17
Ban 480L	12.99 ± 0.01
Viscozyme	12.33 ± 0.00
Liquozyme Supra	13.31 ± 0.01
Ceremix 6X MG	13.41 ± 0.01

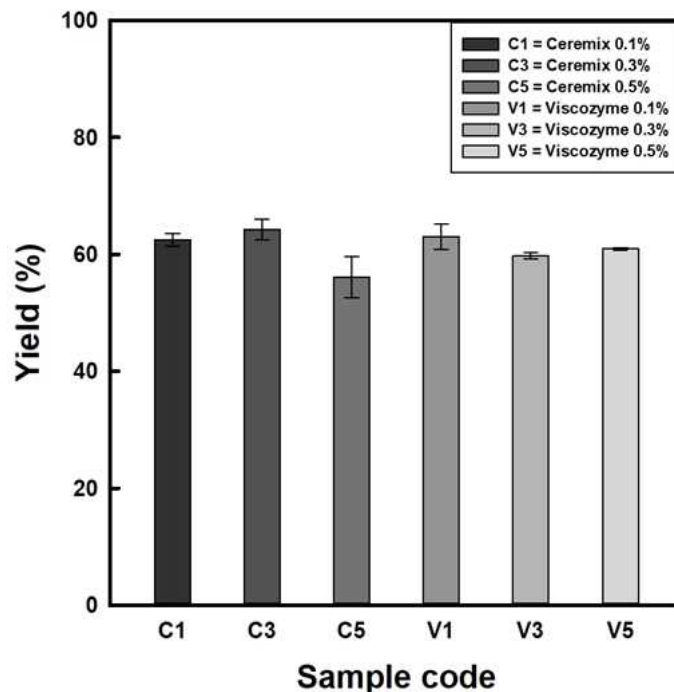
- 오징어먹물색소의 색 특성을 대조군으로 하여 흑국색소와의 총 색 차이를 계산한 결과를 표 3-3에 제시하였다. 흑국색소의 총 색 차이는 12.33~13.47의 범위에 있었으며, 흑국색소들 사이에서 큰 차이를 보이지 않았다. 흑국색소의 색가는 오징어먹물색소보다 높은 수준이었으나 색 특성에 있어서는 오징어먹물색소보다 전체적으로 밝은 수준이었다. 그럼에도 흑국색소는 여전히 강한 검은색을 나타내었다.



[그림 3-13] 2단계 효소처리에 의한 흑국 유래 흑 색소의 색 특성

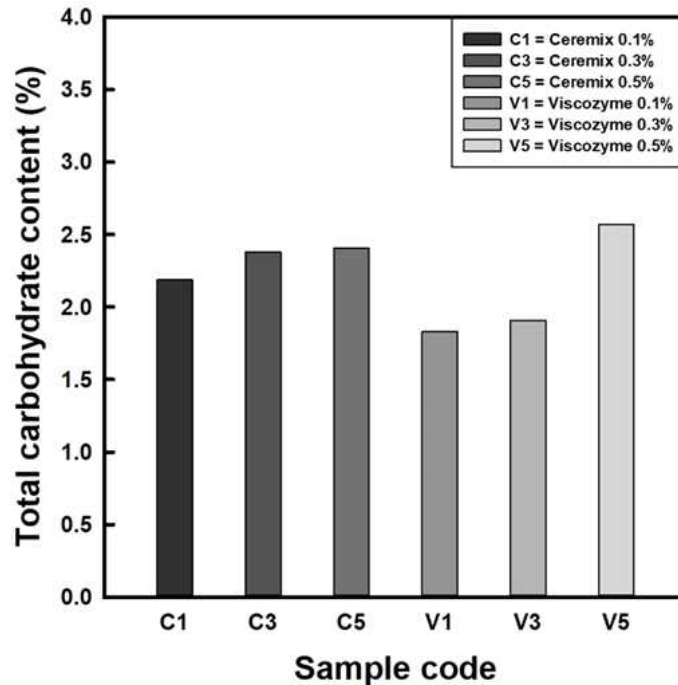
(OP: Ondea PRO, B: BAN 480L, LS: Liquozyme Supra 2.2X, C: Ceremix 6X MG, V: Viscozyme-L)

- 이상의 결과에 기초할 때, 1단계 효소처리만을 수행하였을 때 비해 2단계 효소처리까지 수행하는 것은 흑국 유래 흑 색소의 생산수율은 낮추지만 색가를 향상시키고 색 특성을 개선하는 것을 알 수 있었다. 한편 2단계 효소처리에 사용되는 효소들의 사용량을 결정하기 위해 흑국색소에 높은 색가를 부여할 수 있으며 수율이 유사한 Viscozyme-L과 Ceremix 6X MG를 선택하여 효소제 사용량에 대한 실험을 수행하였다. 색가와 수율이 가장 높은 흑국색소를 생산하는 Ondea PRO를 제외한 것은 흑국색소에 발효취를 강하게 발생시켜 추후 가공식품에 적용 시 가공식품의 관능특성을 저하시킬 것으로 생각되었기 때문이다.
- 흑국에 대한 1단계 효소처리 후 Viscozyme-L과 Ceremix 6X MG를 초기 흑국 사용량의 각각 0.1%, 0.3%, 0.5%로 가하여 흑국색소를 제조하였고, 그 수율을 그림 3-14에 제시하였다. 효소제 사용량이 증가할수록 흑국색소의 수율이 소폭 감소하는 경향을 나타내었다. Ceremix의 경우 0.1%와 0.3%를 사용한 경우는 수율에 있어 큰 차이를 보이지 않았으나 0.5% 사용한 경우는 다른 농도들과는 달리 유의적으로 낮은 수율을 보였다. Viscozyme의 경우 0.1%를 사용하였을 때 가장 높은 수율을 나타내었고, 0.3%와 0.5%의 사용 시에는 0.1% 사용한 것보다 수율은 낮아졌지만 큰 차이를 보이지 않았다.



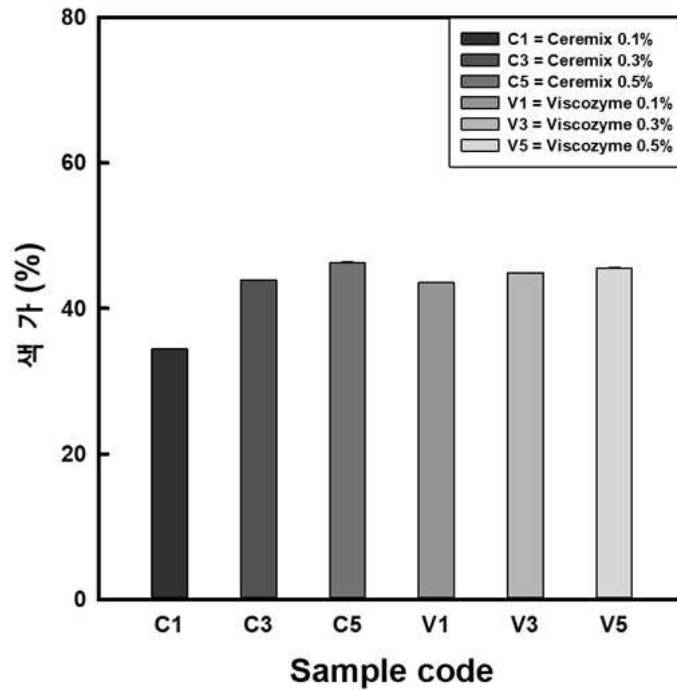
[그림 3-14] 흑국 유래 흑 색소의 생산수율에 대한 2단계 효소처리 효소제 사용량의 영향

- 흑국색소의 생산수율에 대한 차이가 효소제의 가수분해 정도의 차이인지를 확인하기 위해 제조과정 중 회수된 상층액의 총당 함량을 측정하여 그림 3-15에 제시하였다. 예상했던 바와 같이 효소제의 사용량이 증가할수록 흑국의 탄수화물성분들의 가수분해가 더욱 많이 증가된 것을 확인할 수 있었고, 이로 인해 흑국색소의 수율이 효소제 사용량 증가와 함께 감소한 것으로 판단된다.



[그림 3-15] 선발된 효소에 의한 2단계 효소처리에 의해 제조과정 중 회수된 상층액의 총당 함량에 대한 효소 사용량의 영향

- 흑국색소의 색가에 대한 효소제 사용량의 영향을 조사하여 그림 3-16에 제시하였다. 두 효소제 모두 효소 사용량이 증가할수록 흑국색소의 색가를 상승시켰다. Ceremix의 경우 효소 사용량이 증가하면서 색가의 급격한 증가를 나타내었으나, 0.3%와 0.5%의 사용한 경우에 있어서는 큰 차이를 보이지 않았다. 반면 Viscozyme의 경우에는 0.1~0.5%의 사이에서 효소 사용량에 따른 유의적인 차이를 보이지 않았다.



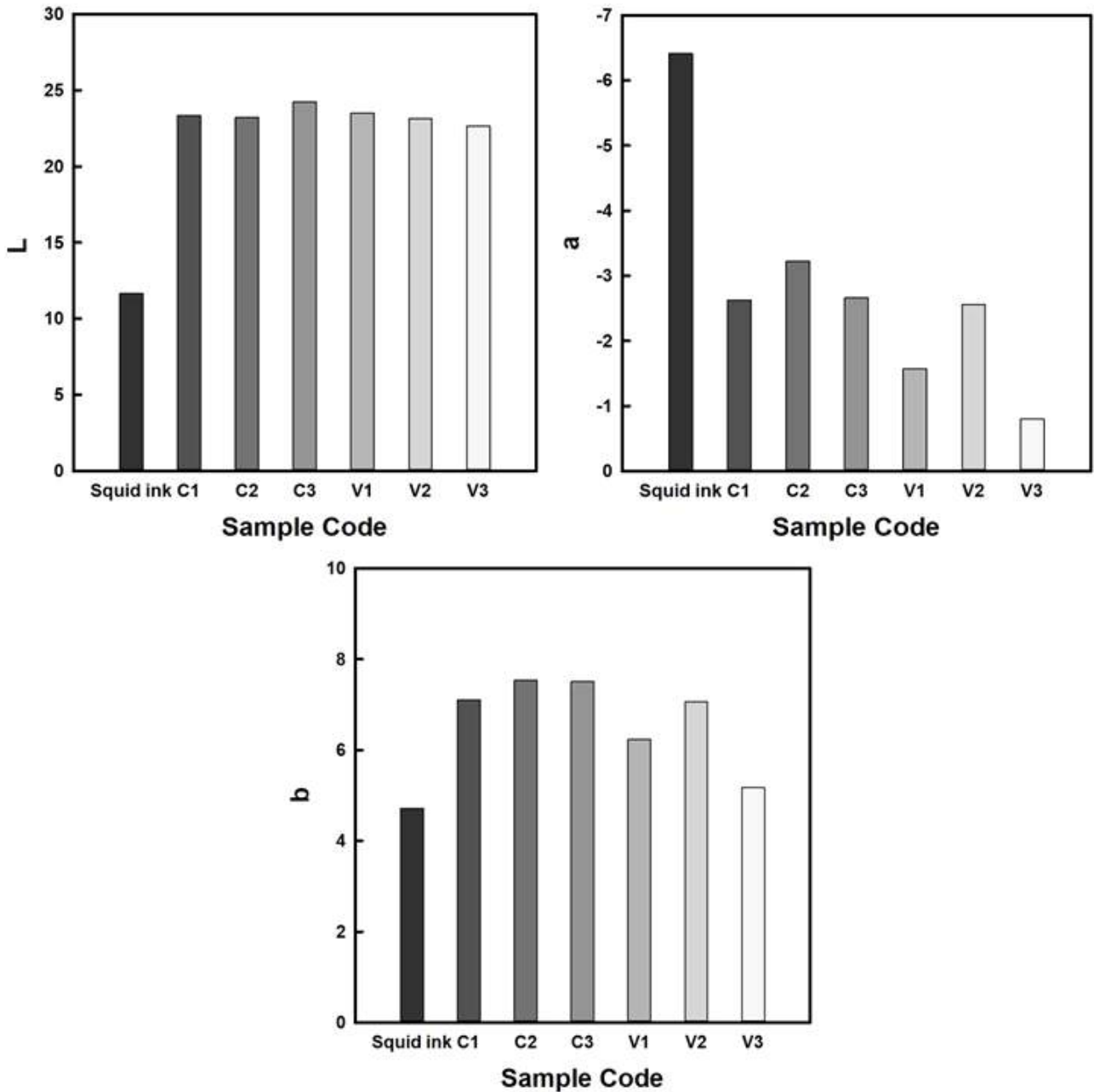
[그림 3-16] 흑국 유래 흑 색소의 색가에 대한 선발된 효소제 사용량의 영향

- 흑국색소의 색 특성에 대한 효소 사용량의 영향을 조사하여 그림 3-17에 제시하였다. Ceremix를 사용한 경우에 있어 흑국색소의 명도는 효소 사용량 증가와 함께 소폭 상승하는 경향을 나타내었다. 적색도는 0.3% 사용군이 가장 낮은 수준을, 0.1%와 0.5% 사용군들은 차이를 보이지 않았다. 황색도는 명도와 같이 효소 사용량 증가와 함께 증가하는 경향을 나타내었다. 반면 Viscozyme을 사용한 경우에 있어 흑국색소의 명도는 효소 사용량 증가와 함께 소폭 감소하는 경향을, 적색도는 소폭 증가하는 양상을 보였다. 그러나 황색도의 경우 0.3% 사용군 > 0.1% 사용군 > 0.5% 사용군의 순서로 낮아졌다.

[표 3-4] 흑국 유래 흑 색소의 총 색 차이에 대한 효소 사용량의 영향

Enzyme product	Concentration (%)	ΔE
Ceremix 6X MG	0.1	12.49±0.01
	0.3	12.30±0.00
	0.5	13.41±0.01
Viscozyme	0.1	12.88±0.00
	0.3	12.32±0.05
	0.5	12.33±0.00

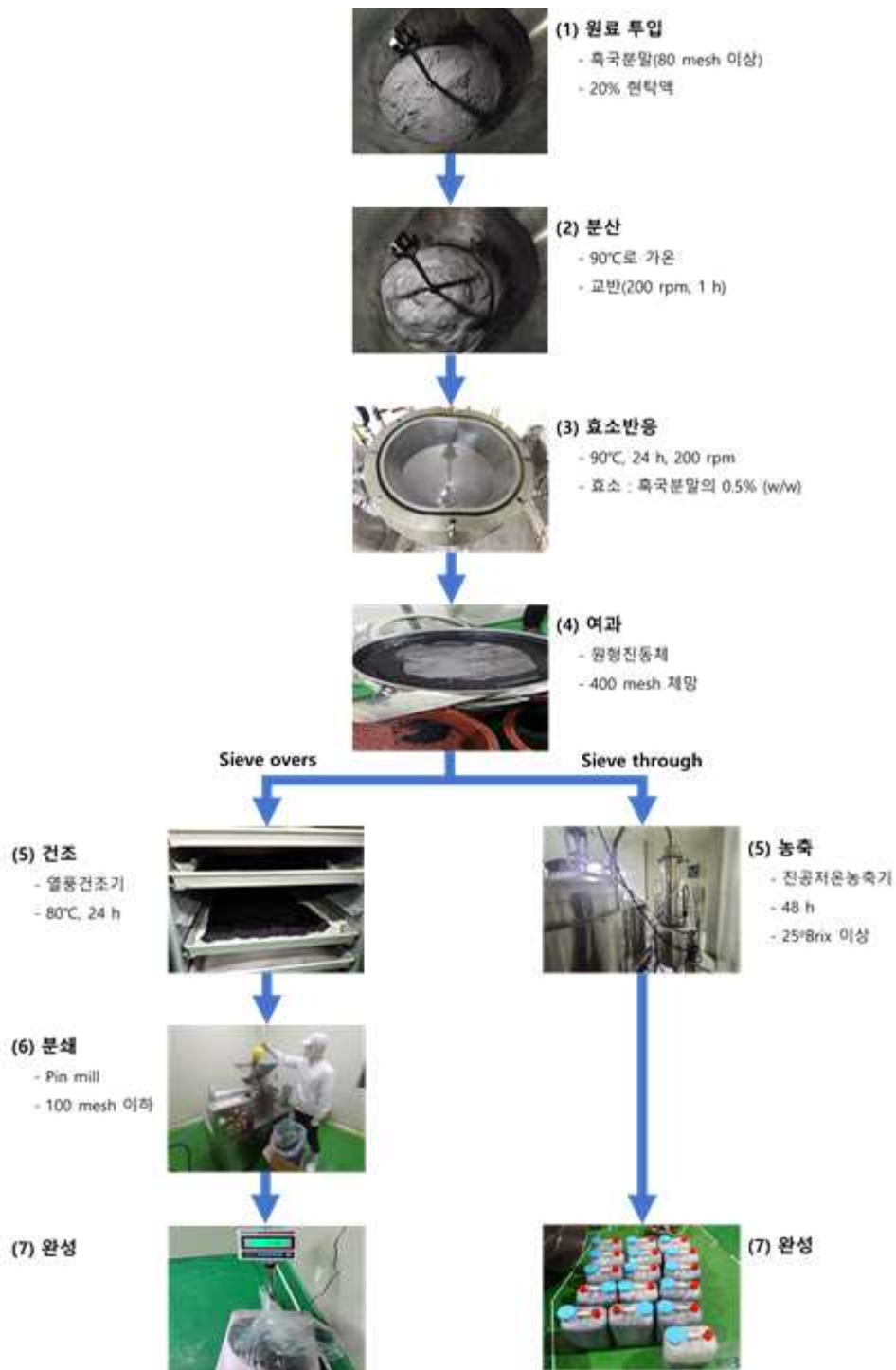
- 오징어먹물색소의 색 특성을 대조군으로 하여 흑국색소와의 총 색 차이를 계산한 결과를 표 3-4에 제시하였다. Ceremix의 경우 12.49~13.41의 범위에 있었으며, 효소 사용량에 대한 특이 경향은 관찰되지 않았다. Viscozyme의 경우 12.32~12.88의 범위에 있었으며, 효소 사용량이 증가하면서 소폭 감소하는 경향을 나타내었다. 선행된 연구에서와 마찬가지로 흑국색소의 색가는 오징어먹물색소보다 높은 수준이었으나 색 특성에 있어서는 오징어먹물색소보다 전체적으로 밝은 수준이었다. 그럼에도 흑국색소는 여전히 강한 검은색을 나타내었다.



[그림 3-17] 흑국 유래 흑 색소의 색 특성에 대한 선발된 효소제 사용량의 영향
(C: Ceremix 6X MG, V: Viscozyme-L, 1: 0.1%, 2: 0.3%, 3: 0.5%)

다. 흑국 유래 흑 색소의 대량생산 공정 설계 및 시제품 생산

- 선행된 연구에서 용매추출법과 효소정제법에 의한 흑국으로부터 흑 색소를 제조하는 방법에 대해 조사하였다. 용매추출법의 경우 클로로포름을 사용하는 것이 흑국으로부터 모든 흑국색소를 회수할 수 있었지만, 클로로포름은 가공용제로 식품첨가물공전상에서 인정되어 있지 않고, 클로로포름을 사용 시 폐기물의 처리에 대한 문제점이 있어 흑국으로부터 흑 색소의 대량생산 공정 설계 시 용매추출법은 제외하였다.
- 한편 효소정제법에 사용된 효소들은 모두 식품첨가물공전에서 식품첨가물로 인정되고 있는 것들로 사용에 제한이 없고, 생산 후 반응폐액 등의 처리에도 큰 문제가 없어 흑국 유래 흑 색소의 대량생산 공정은 개발된 효소정제법을 기준으로 설계하였고, 현장실증실험을 통해 대량생산공정을 확립하였다.
- 선행된 연구에서 결정된 효소정제법은 흑국을 20% 농도가 되도록 증류수에 분산시키고 90°C에서 30분간 가열하여 흑국 페이스트로 만들고, 여기에 초기 흑국 사용량의 0.5%에 해당하는 thermostable α -amylase를 가하여 1시간 동안 효소반응 후 50°C로 낮추어 Viscozyme-L을 초기 흑국 사용량의 0.1%가 되도록 가하여 24시간 동안 2단계에 걸쳐 효소 반응시키는 것이었다.
- 그러나 흑국 유래 흑 색소를 생산하기 위해 개발된 효소정제법은 두 종류의 효소를 사용하며, 공정도 복잡하고, 수율도 낮은 등 경제성에 있어 애로사항이 존재하였다. 반면 1단계 효소처리만을 사용하는 것은 흑국색소의 수율도 높고 흑국색소의 색가도 2단계 효소처리에 의한 흑국색소와 큰 차이를 보이지 않으며 공정도 단순하였다. 또한 오징어먹물색소와의 색가도 큰 차이를 보이지 않았다. 따라서 흑국 유래 흑 색소 생산을 위한 대량생산 공정의 설계 및 현장실증시험은 1단계 효소처리에 의한 방법만을 적용하여 개발하였다.
- 흑국 유래 흑 색소 대량생산 공정에 대한 현장실증실험은 경상북도 영덕군에 위치한 힐링습농장영농조합법인의 500 L 규모의 반응기를 이용하여 수행하였다. 수차례의 현장실증시험을 통해 결정된 흑국 유래 흑 색소 대량생산 공정도는 그림 3-18에 제시하였다. 흑국색소의 원료인 흑국은 먼저 80 mesh 이상으로 분쇄하여 입도를 조절하고, 흑국 분산물의 농도가 20%가 되도록 하여 반응기에 정제수와 함께 넣어 90°C에서 교반하면서 분산시켰다. 이후 흑국 분산물의 온도가 90°C에 도달하였을 때, thermostable α -amylase인 Termamyl 2.2X를 흑국 사용량의 0.5%가 되도록 가한 후 90~100°C의 온도 범위에서 24시간 동안 교반하며 효소반응시켰다. 이때 효소반응 온도는 90°C 미만으로 낮아지지 않도록 온도를 조절하였다. 효소반응이 종료된 후 400 mesh 체망이 설치된 원형진동체를 이용하여 흑국 효소반응물을 여과하여 체망 위의 잔류물과 여액을 회수하였다. 체망 위의 잔류물은 열풍건조기를 이용하여 80°C에서 24시간 건조한 후 100 mesh 이하로 분쇄하여 흑국색소 분말제품으로 하였으며, 여액은 진공저온농축기를 이용하여 25°Brix 이상으로 농축하여 흑국색소 농축물을 제조하였다.



[그림 3-18] 효소정제법에 의한 흑국 유래 흑 색소 대량생산 공정 흐름도

- 확립된 대량생산 공정을 적용하여 흑국 100 kg을 투입하여 흑국 유래 흑 색소를 생산하였을 때, 흑국색소 분말은 4.48 kg이, 흑국색소 농축액은 310 kg이 생산되어, 최종 생산수율은 314.48%를 달성하였다.

■ 생산된 흑국 유래 흑 색소의 분말 제품과 농축액 제품의 특성

○ 건조분말 제품

- 입도 : 80 mesh 체망 통과율 90% 이상
※ 식품첨가물공전 분말제품 입도 시험법에 의함
- 색가 : 41.5
※ 식품첨가물공전 천연색소의 색가 시험법에 의함



○ 액상(농축액) 제품

- 가용성 고형분 : 26.5 °Brix
※ 식품첨가물공전 액상색소 가용성 고형분 시험법에 의함
- 색가 : 26.7
※ 식품첨가물공전 천연색소의 색가 시험법에 의함
- 점성 : 100-120 Cp
※ 회전점도계 이용하여 측정(SC41 spindle, 5 rpm, 25°C)



- 분말상 및 액상 흑국 유래 흑 색소 제품들은 각각 흑국건조분말과 흑국엑기스의 제품명으로 품목제조보고를 승인받아 제품화하였다. 이중 액상 흑국 유래 흑 색소 제품(흑국엑기스)는 2021년 최초로 판매하여 매출을 발생시켰다. 분말상 및 액상 흑국 유래 흑 색소 제품들의 품목제조보고 등을 그림 3-19와 그림 3-20에 제시하였다.
- 제조된 흑국 유래 흑색소의 생산원가는 27,000원으로 산출되었으며, 현재 40,000원의 판매가로 판매하고 있음. 수입되는 오징어먹물색소의 생산원가는 수입제품의 평균마진을 40%를 고려할 때 46,000의 생산원가가 산출되면, 현재 국내 판매가는 60,000~70,000원 수준임. 따라서 개발된 흑국 유래 흑 색소는 경제성이 매우 높은 소재임.

제품명	흑국건조분말
식품유형	중국
제 조 원	(주)선그린 031-604-2700 경기도 성남시 중원구 갈마치로 244번길 31, 현대아이밸리 403호
제 조 일자	2020년 월 일
내 용 량	20 kg
원 재 료 명	중국, 아말라아제
용기·포장재질	내장-PE/외장-종이
품목보고번호	20160275016-57
보관방법	직사광선을 피하고, 실온보관 (1~35℃)
※본 제품은 계란, 땅콩, 돼지고기, 꿀, 닭고기, 새우, 우유, 고등어, 토마토, 밀, 쇠고기, 아황산류를 사용한 제품과 같은 제조시설에서 제조 되고 있습니다.	
부정, 불량 식품 신고는 국번없이 1399	



발급번호 : MAMA-BMDA-TCWQ-PMDG-QELF

식품·식품첨가물 품목제조보고서

보고인	성명	김진환	생년월일	1973년 01월 12일
	주소	경기도 성남시 중원구 갈마치로244번길 31(403호)	전화번호	0316042700
영업소	명칭(상호)	(주)선그린	영업등록번호	20160275016
	소재지	경기도 성남시 중원구 갈마치로244번길 31(403호) 현대원동, 현대(밸리)		
제품정보	식품의 유형	중국	품목제조보고번호	2016027501657
	제품명	흑국 건조분말		
	유형기호			
	용량유지기한	해당없음.		
	판매표명 또는 성분명 및 배합비율	맛장애 기재		
	표도 용법	맛장애 기재		
	보관방법 및 포장재질	맛장애 기재		
	오염방지 및 오염단위	맛장애 기재		
	성상	특갈색의 분말로서, 특이한 냄새를 가지며 미려, 이취가 있어 한다.		
	품목의 특성	■ 고열량·저영양 식품 해당 여부 []에 []아니오 [0]해당 없음 ■ 알, 유아용 성취대상으로 표시 판매하는 식품 해당 여부 []에 [0]아니오 []해당없음 ■ 실근·말근 제품의 해당 여부 []비실근 [0]실근 []말근		
기타	[]제품명 : 원료(흑국건조분말) /경상북도 영덕군 울진면 주왕산로 3121(분재) 후 호소면길 경향로에 남한 관여를 열람건조. 「식품위생법」 제37조 제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조 제1항에 따라 식품 (식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.			

2020년 12월 22일
보고인 김진환

경기도 성남시장 귀하

품목보고번호 : 2016027501657

처리부서	환경보건과 위생정책과	처리자성명	원세희	처리일자	2020년 12월 22일
------	-------------	-------	-----	------	---------------

[그림 3-19] 흑국건조분말 표시사항, 제품사진과 품목제조보고서

제품명	흑국액기스
제 조 원	(주)선그린 031-604-2700 경기도 성남시 중원구 갈매치로 244번길 31현대아이밸리 403호
제 조 일 자	2020년 월 일
내 용 량	20 kg
원 재 료 명	중국, 아말라아제
용기·포장재질	HDPE
품목보고번호	20160275016-56
보 관 방 법	직사광선을 피하고, 실온보관 (1~35℃)
※본 제품은 계란, 땅콩, 돼지고기, 굴, 닭고기, 새우, 우유, 고등어, 토마토, 밀, 쇠고기, 아황산류를 사용한 제품과 같은 제조시설에서 제조 되고 있습니다.	
부정, 불량 식품 신고는 국번없이 1399	



발급번호 : MAMA-BMMH-ARZD-XWDZ-RDNW

식품·식품첨가물 품목제조보고서

보고인	성명	김전환	생년월일	1973년 01월 12일
	주소	경기도 성남시 중원구 갈매치로244번길 31(403호)	전화번호	0316042700
영업소	명칭(상호)	(주)선그린	영업등록번호	20160275016
	소재지	경기도 성남시 중원구 갈매치로244번길 31(403호 현대영동, 현대(밸리))		
제품정보	식품의 유형	종국	품목제조보고번호	2016027501656
	제품명	흑국 액기스		
	유통기한	해당 없음		
	품질유지기한			
	원재료명 또는 성분명 및 복합비율	맛장애 기재		
	용도 용법	맛장애 기재		
	보관방법 및 포장재질	맛장애 기재		
	포장방법 및 포장단위	맛장애 기재		
	성상	촉감적의 특성으로서, 특이한 냄새를 가지며 이취, 이취가 없으며 한다.		
	품목의 특성	<ul style="list-style-type: none"> ■ 고알칼리·저열량 식품 해당 여부 []에 []아니오 []해당 없음 ■ 영, 유아를 섭취대상으로 표시 []에 []아니오 []해당없음 ■ 알레르기 유발 식품 해당 여부 []에 []아니오 []해당없음 		

기타 []에 []아니오 []해당없음
 「식품위생법」 제37조 제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조 제1항에 따라 식품 (식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2020년 12월22일
 보고인 김전환

경기도 성남시장 귀하

품목보고번호 : 2016027501656

처리부서	환경보건국 위생정책과	처리자성명	원세희	처리일자	2020년 12월 22일
------	-------------	-------	-----	------	---------------



[그림 3-20] 흑국액기스 표시사항, 제품사진과 품목제조보고서

3. 요약 및 결론

- 국내 천연 색소(흑 색소 포함)는 시장현황은 예년에 비해 큰 변동이 없으며, 타르게 색소를 혼합한 흑 색소 제품이 오징어먹물색소와 함께 유통되고 있음. 오징어먹물색소는 국내 약 14개 업체에서 생산하고 있음.
- 개발될 흑국 유래 흑 색소의 품질규격은 식품첨가물공전의 오징어먹물색소에 준하여 설정하는 것이 적절할 것이며, 이에 색가를 추가하여 개발될 흑국 유래 흑 색소의 색가를 5.0 이상으로 설정하는 것이 다양한 제품의 출시를 위해 타당할 것으로 판단됨.

- 흑 색소를 추출 및 제조에 있어 원료인 흑국은 분쇄하여 60 mesh 체망을 통과시킨 미분을 사용하는 것이 타당함.
- 용매추출법을 이용하여 흑국 분말로부터 흑 색소를 추출 시 추출용매는 클로로포름을 사용하며, 흑국 분말과 클로로포름을 1:10의 중량비율로 혼합하여 상온에서 1시간 추출하는 것이 가장 높은 수율로 흑 색소를 추출할 수 있음.
- 추출된 흑 색소는 회전증발농축기로 클로로포름을 모두 제거하고 농축한 후 이를 다양한 건조법으로 건조하여도 분말상의 흑 색소를 얻을 수 없었음. 끈적끈적한 농축물만이 얻어졌음.
- 선행된 연구에서 결정된 효소정제법은 흑국을 20% 농도가 되도록 증류수에 분산시키고 90℃에서 30분간 가열하여 흑국 페이스트로 만들고, 여기에 초기 흑국 사용량의 0.5%에 해당하는 thermostable α -amylase를 가하여 1시간 동안 효소반응 후 50℃로 낮추어 Viscozyme-L을 초기 흑국 사용량의 0.1%가 되도록 가하여 24시간 동안 2단계에 걸쳐 효소 반응시키는 것이었다.
- 흑국색소의 원료인 흑국은 먼저 80 mesh 이상으로 분쇄하여 입도를 조절하고, 흑국 분산물의 농도가 20%가 되도록 하여 반응기에 정제수와 함께 넣어 90℃에서 교반하면서 분산시켰다. 이후 흑국 분산물의 온도가 90℃에 도달하였을 때, thermostable α -amylase인 Termamyl 2.2X를 흑국 사용량의 0.5%가 되도록 가한 후 90~100℃의 온도 범위에서 24시간 동안 교반하며 효소반응시켰다. 이때 효소반응 온도는 90℃ 미만으로 낮아지지 않도록 온도를 조절하였다. 효소반응이 종료된 후 400 mesh 체망이 설치된 원형진동체를 이용하여 흑국 효소반응물을 여과하여 체망 위의 잔류물과 여액을 회수하였다. 체망 위의 잔류물은 열풍건조기를 이용하여 80℃에서 24시간 건조한 후 100 mesh 이하로 분쇄하여 흑국색소 분말 제품으로 하였으며, 여액은 진공저온농축기를 이용하여 25°Brix 이상으로 농축하여 흑국색소 농축물을 제조하였다.
- 개발된 대량생산공정은 흑국 유래 흑 색소를 약 300%의 수율로 생산할 수 있으며, 이중 대부분이 액상(농축액) 흑국 유래 흑 색소이다.
- 흑국을 이용하여 생산된 분말상 및 액상 흑국 유래 흑 색소는 품목제조보고를 통해 제품화를 달성하였고, 이중 액상 흑국 유래 흑 색소(흑국엑기스)의 매출을 발생시켰다.

제4절. 흑국 유래 흑 색소의 물리화학적 특성, 안정성 및 안전성 평가

1. 연구방법

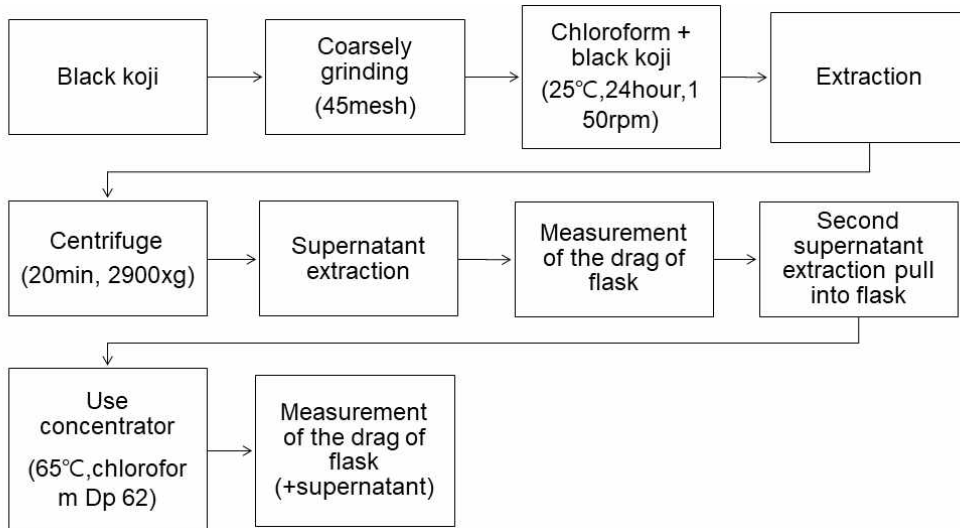
가. 재료 및 시약

- 흑 색소 제조를 위한 원료로 식품첨가물인 흑국 조제종국을 수원종국(수원발효식품연구소, 성남, 경기도)에서 구입하였다. 흑국 조제종국은 쌀을 배지로 하여 제조된 것이었다. 카라멜 색소와 오징어먹물색소 분말제품들을 주관연구기관인 (주)선그린에서 제공받아 흑국 유래 흑 색소의 대조군으로 사용하였다. Termamyl 2X와 Viscozyme-L은 대종상사(서울)에서 구입하여 사용하였다. 흑 색소 제조 및 분석에 사용된 시약과 용매들은 ACS 등급 이상의 것을 사용하였다.

나. 흑국 유래 흑 색소(이하 흑국색소) 제조

(1) 용매추출법

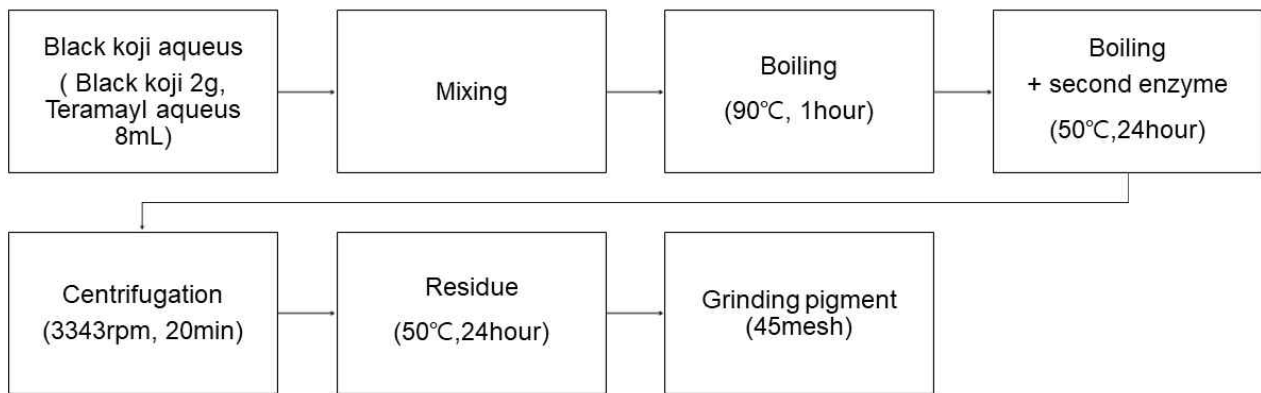
- 주관연구기관에서 제공된 흑국 조제종국의 전처리 방법과 추출용매를 이용하여 제조하였다. 흑국 조제종국은 가정용 믹서기로 분쇄한 후 60 mesh 표준체망을 통과시켜 흑국분말로 제조하고, desiccator에 넣어 상온에서 보관하면 사용하였다. 흑국분말(500 g)은 chloroform (1,500 g)과 혼합한 후 상온에서 24 h 동안 교반하여 흑국분말로부터 흑 색소를 추출하였다. 추출조작이 완료된 후 감압여과하여 흑 색소를 포함하는 여액을 회수하였다. 회수된 여액은 증발회전농축기를 이용하여 chloroform을 제거하고 50°C에서 48 h 동안 열풍건조하여 점질 상의 흑 색소를 제조하였다. 제조된 흑 색소는 desiccator에 넣어 상온에서 보관하면서 안정성 평가에 사용하였다(그림 4-1). 용매법에 의한 흑국 유래 흑 색소는 용매흑국색소로 명명하였다.



[그림 4-1] 용매추출법에 의한 흑국 유래 흑 색소 제조과정 흐름도

(2) 효소정제법

- 주관연구기관에서 제공한 효소정제법에 따라 흑국 유래 흑 색소를 제조하였다. 효소정제법에 의한 흑국 유래 흑 색소는 1차 효소처리와 2차 효소처리를 통해 제조되었다. 효소용액은 1차 효소처리를 위해 thermostable α -amylase (Teramyl 2X)를 흑국 건량기준의 0.5%가 되도록 증류수와 혼합하여 희석하였다. 흑국 2 g에 제조된 효소액 8 mL을 가한 후 90°C에서 1시간 동안 가열한 후 50°C로 온도를 낮추고 2차 효소처리를 위한 cellulase cocktail (Viscozyme-L)을 초기 흑국 사용량의 0.5%가 되도록 가하여 50°C에서 24시간 동안 반응시켰다. 반응이 종료된 후 원심분리(3,000×g, 20 min)하여 상층액을 제거하고 침전물을 80°C에서 24시간 동안 건조하였다. 건조된 흑국색소는 분쇄하여 45 mesh 체망을 통과시켜 상온에서 보관하며 사용하였다. 효소정제법에 의한 흑국 유래 흑 색소는 효소흑국색소로 명명하였다(그림 4-2).



[그림 4-2] 효소정제법에 의한 흑국 유래 흑 색소 제조공정 흐름도

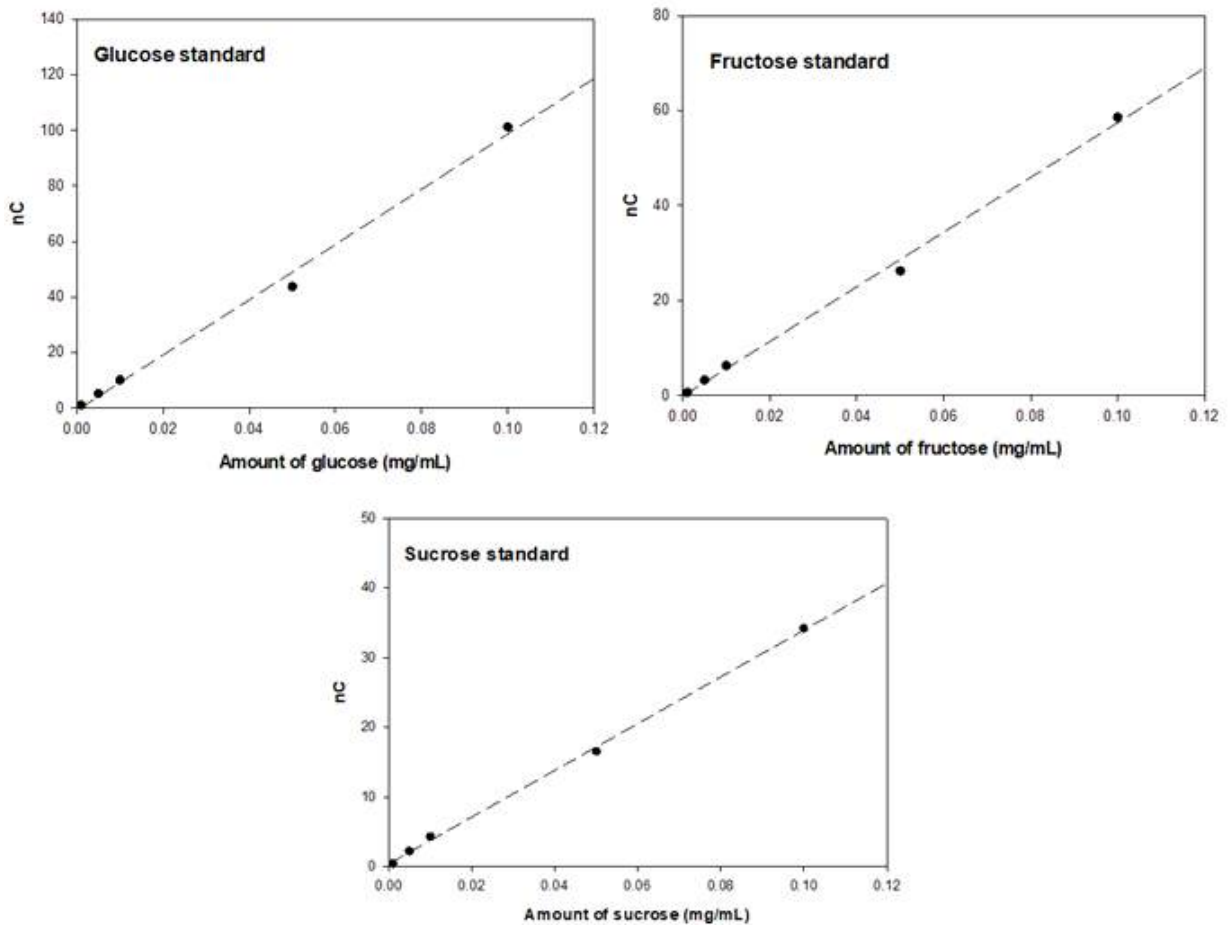
다. 흑국 유래 흑 색소(흑국색소)의 물리화학적 특성

(1) 일반성분

- 캐러멜색소, 오징어먹물색소, 및 흑국색소들의 일반성분은 AOAC법에 준하여 분석하였다. 수분은 105°C에서 상압가열건조법을, 조단백질은 Kjeldahl법을, 조지방은 Soxhlet법을, 조회분은 건식회화법을 이용하여 분석하였다.

(2) 유리당

- 오징어먹물색소와 흑국색소는 각각 증류수와 10 mg/mL (w/v)가 되도록 혼합한 후 상온에서 24시간 동안 진탕하였다. 24시간 후 시료들은 원심분리(3,000×g, 20 min)하여 상층액을 취하여 분석에 사용하였다. 시료들의 유리당 조성은 고성능 음이온 교환크로마토그래피 (high-performance anion-exchange chromatography, HPAEC)를 이용하여 분석하였다. 회수된 상층액은 시린지 필터로 여과한 후 20 mM NaOH 용액으로 10배 희석하여 PA-1 컬럼에 10 μL를 주입하였다. 초기 분석 10분 동안은 120 mM sodium acetate를 포함하는 100 mM NaOH를 흘려주었으며, 이후 10분 동안은 200 mM NaOH 용액을 0.5 mL/min의 유속으로 흘려주었다. 시료들로부터 용출된 유리당들 중 유의적인 수준을 나타내는 glucose, fructose와 sucrose에 대해 검정곡선(그림 4-3)을 작성하여 HPAEC 크로마토그램으로부터 시료들의 유리당 함량을 결정하였다.



[그림 4-3] HPAEC 분석을 위한 glucose, fructose와 sucrose의 검정곡선

(3) 유기산

- 오징어먹물색소와 흑국색소는 건조중량의 10배에 해당하는 탈이온수를 가하여 24시간 동안 상온에서 진탕한 후 감압여과하여 여액을 얻었다. 여액은 추가로 원심분리(3,000×g, 20 min, 25°C)하여 상층액을 취하였다. 상층액은 -45°C에서 72시간 동안 동결한 후 동결진공건조기를 이용하여 3일간 건조하여 농축하고, 이를 유기산 분석을 위한 시료로 하였다. 동결 건조된 추출물에 존재하는 유기산을 정량하기 위해 추출물 시료를 황산/메탄올을 이용한 methyl ester화하고 가스크로마토그래피(GC)를 이용하여 분석하였다. 표준물질은 oxalic acid, malonic acid, malic acid, fumaric acid, succinic acid, citric acid를 사용하였다. GC 분석조건은 상기 표 4-1과 같다.

[표 4-1] 흑국 및 흑국 유래 색소의 유기산 정량을 위한 GC 분석조건

Item	Conditions
Column	Supelcowax 10 fused silica capillary (0.25 mm id×30 m, 0.25 μm)
Carrier gas	N2 1 mL/min (split ratio = 30:1)
Oven temperature	230°C isotherm
Detector	FID
Injection volume	1.0 μL
GC equipment	Hewlett-Packard 5890

(4) 수분용해지수(WSD) 및 수분흡수지수(WAI)

- 오징어먹물색소와 흑국색소를 각각 0.5 g (d.b; S)씩을 50 mL conical centrifuge tube 안에 직접 칭량하고 증류수 25 g을 가하여 vortexing mixer로 분산시켰다. 분산용액을 포함하는 conical centrifuge tube는 wrist-action shaker를 이용하여 상온에서 30분간 진탕시킨 후 원심분리(3,000×g, 20 min, 25°C)하였다. 여액은 미리 항량을 측정된 알루미늄 디쉬에 옮겨 105°C에서 항량(W₁)에 도달할 때까지 건조하였고, 침전물은 무게(W₂)를 측정하였다. 수분용해지수와 수분흡수지수는 아래 식에 의해 계산되었다.

$$WSD(\%) = \frac{W_1}{S} \times 100 \quad WAI(g/g) = \frac{W_2}{S \times (1 - \frac{WAI}{100})}$$

(5) 용해도

- 오징어먹물색소와 흑국색소를 각각 0.5 g (d.b)씩 50 mL conical centrifuge tube 안에 직접 칭량하고 증류수 25 g을 가하여 vortexing mixer로 분산시켜 85°C의 수욕조에서 30분간 가열한 후 찬물 수욕조에서 20분간 냉각하였다. 이를 원심분리(2,500×g, 20분)하여 상층액을 제거하고 conical centrifuge tube를 뒤집어 10분간 잔여액을 제거하고 105°C에서 항량이 될 때까지 건조하였다. 용해도는 아래의 식에 의해 계산되었다.

$$\text{용해도}(\%) = \frac{\text{초기 시료량}(g) - \text{침전물의 항량}(g)}{\text{초기 시료량}(g)} \times 100$$

- 오징어먹물색소와 흑국색소를 각각 0.1 g (d.b)씩 50 mL conical centrifuge tube 안에 직접 칭량하고 대두유 40 g을 가하여 vortexing mixer로 분산시켜 85°C의 수욕조에서 30분간 가열한 후 찬물 수욕조에서 20분간 냉각하였다. 이를 원심분리(2,500×g, 20분)하여 상층유를 회수하였고, 610 nm에서 신선한 대두유를 대조군으로 하여 흡광도를 측정하였다. 또한 시료 0.1 g은 DMSO 40 g에 용해시켜 원심분리한 후 상층액을 회수하여 610 nm에서 DMSO를 대조군으로 흡광도를 측정하였다. 유지상 용해도는 아래의 식에 의해 추정하였다.

$$\text{유지상 용해도}(\%) = \frac{\text{대두유에 용해된 흑 색소의 Abs}}{\text{DMSO에 용해된 흑 색소의 Abs}} \times 100$$

(6) 색 특성

- 오징어먹물색소와 흑국색소는 0.1% 농도가 되도록 DMSO에 용해시킨 후 흑 색소 용액의 색 특성을 색차계(CR-300D, Minolta Co. Ltd., Osaka, Japan)를 사용하여 Hunter's color system 하에서 측정하였다. 각 색의 값은 명도(L; lightness/darkness), 적색도(a; redness/greenness) 및 황색도(b, yellowness/blueness)로 나타내었다. 이때 사용한 색차계의 표준백판의 값은 L 98.07, a -0.18, b 1.57이었다.

라. 흑국 유래 흑색소의 외부환경요인에 대한 안정성

- 오징어먹물색소와 흑국색소를 DMSO에 가하여 0.1% 농도의 용액으로 제조한 후 각각의 외부환경요인에 노출시켰다. 외부환경요인들에 노출시키기 전 원심분리(3,000×g, 20분)하여 상층액의 흡광도를 610 nm에서 측정하여 처리 전 흡광도로 하였다. 외부환경요인들에 노출이 완료된 후 원심분리하여 상층액의 흡광도를 610 nm에서 측정하여 처리 후 흡광도로 하고 아래의 식에 의해 안정성을 평가하였다.

$$\text{외부환경 요인에 대한 안정성}(\%) = \frac{\text{처리 후 } A_{610} - \text{처리 전 } A_{610}}{\text{처리 전 } A_{610}} \times 100$$

(1) 광(light)

- 오징어먹물색소와 흑국색소들은 각각 50 mL씩 석영패트리디쉬에 담아 UV-A, UV-B, UV-C 램프가 장착된 자외선조사처리 장치에 넣고 48 h 동안 자외선조사 처리하였다. 모든 자외선램프의 출력에너지는 4 W이었다.

(2) pH

- 오징어먹물색소와 흑국색소들은 각각 1 mL씩 15 mL conical centrifuge tube에 넣고 pH 3, 4, 5, 6, 7과 8의 표준완충용액을 4 mL를 가하여 밀봉한 후 상온의 암소에서 48 h 동안 방치하였다.

(3) 온도

- 오징어먹물색소와 흑국색소는 각각 5 mL씩 15 mL conical centrifuge tube에 넣어 밀봉하고 25, 40, 55, 70, 85 및 100°C의 항온기 또는 열풍건조기에 48 h 동안 방치하였다.

(4) 유기산

- 오징어먹물색소와 흑국색소는 각각 5 mL씩 15 mL conical centrifuge tube에 넣고, 호박산과 구연산이 1% (w/v) 농도가 되도록 가한 후 vortexing 하여 용해시켜 밀봉하고 상온의 암소에서 48 h 동안 방치하였다.

(5) 금속이온

- 오징어먹물색소와 흑국색소는 각각 5 mL씩 15 mL conical centrifuge tube에 넣고, 100 mM CaCl₂, MgCl₂, CuSO₄·5H₂O 용액을 각각 1 mL를 가하여 밀봉한 후 상온의 암소에서 48 h 동안 방치하였다.

(6) 당류

- 오징어먹물색소와 흑국색소는 각각 5 mL씩 15 mL conical centrifuge tube에 넣고, glucose, fructose와 sucrose가 각각 1% (w/v) 농도가 되도록 가한 후 vortexing 하여 용해시켜 밀봉하고 상온의 암소에서 48 h 동안 방치하였다.

마. 흑국 유래 흑색소의 가공공정 및 저장기간에 대한 안정성

- 박력밀가루 100 g, 흑 색소(오징어먹물색소, 흑국색소) 5 g, 물 60 g을 키친에이드 반죽기를 이용하여 반죽을 형성하였다. 형성된 반죽은 제면기를 이용하여 5 mm 두께의 면대를 형성한 후 지름 2 cm의 원형틀로 찍어 원관형으로 성형하였다.

- 원판형의 반죽은 끓는 물에 넣어 5분간 열처리(삶기), 180℃의 컨벡션오븐에 넣어 20분간 열처리(굽기), 180℃의 유조에 넣어 1분간 열처리 후 반죽을 뒤집어 1분간 총 2분간 열처리(유탕처리)하였다. 가공처리가 완료된 시료들은 상온으로 시켜 시료로 사용하였다.
- 가공처리 전 시료와 모든 가공처리된 시료들은 진공동결건조하고 분쇄하여 60 mesh 체망을 통과시켰다. 제조된 시료 분말들은 색차계를 이용하여 색 특성치들을 측정하고 총 색 차이를 계산하여 흑 색소의 안정성을 추정하였다.

$$\Delta E = \sqrt{(L_0 - L)^2 + (a_0 - a)^2 + (b_0 - b)^2}$$

- 오징어먹물색소와 흑국색소는 DMSO를 이용하여 0.1% (w/v) 용액으로 제조한 후 25℃와 50℃의 항온기에 넣어 저장하면서 1달 간격으로 610 nm에서 흡광도를 측정하여 안정성 평가에서 사용된 계산식을 이용하여 저장에 따른 안정성을 분석하였다.

바. 흑국 유래 흑색소의 독성 안전성

(1) 실험동물

- 효소정제법에 의한 흑국 유래 흑 색소의 14일 반복 경구독성 연구를 위하여 6주령 암컷 SD (Sprague-Dawley) 랫드를 코아텍(주)으로부터 공급받아 1주일간 순화시킨 뒤 실험에 사용하였으며 사료와 물은 1주일간 자유롭게 공급하였다. 사육환경은 일정 온도(20 ± 2℃)와 습도(60 ± 10%) 및 조명시간(12시간)을 유지하도록 하였으며 본 동물실험은 경기대학교 동물 실험윤리심의위원회의 승인을 거쳐 수행하였다. 대조군으로 현재 시판중인 오징어먹물색소(분말)를 사용하였다.

(2) 시료 및 시료처리

- 14일 반복 경구독성 연구를 위한 시료는 오징어먹물색소(분말)와 효소정제법(Termamyl 이용)에 의한 흑국 유래 흑 색소(분말)를 사용하였다. 오징어먹물색소와 흑국 유래 흑 색소는 물에 대한 용해도가 낮아 1% carboxymethylcellulose (CMC) 용액에 균일하게 분산시켜 경구 투여용 시료로 하였고, 대조군으로 1% CMC 용액을 사용하였다.



[그림 4-4] 흑국 유래 흑 색소 제품의 14일 반복투여 경구독성 시험 절차

(3) 14일 반복 투여에 의한 관찰

- SD 랫드 암컷에 대조군과 2종의 흑 색소를 각각 1,000 mg/kg의 용량으로 14일 반복 경구 투여하였다. 투여기간 동안 물질 투여에 의한 이상 징후, 행동변화를 관찰하였고 몸무게, 사료 및 물 섭취량 변화를 기록하였다. 14일 반복투여 종료 후 CO₂ 안락사하여 장기(brain, heart, kidney, large intestine, liver, lung, ovary, small intestine, spleen, stomach)를 적출 뒤 육안검사를 실시하여 이상여부를 확인하고 적출한 조직의 무게(g)를 동물의 몸무게(g)로 나눈 organ index (%)를 산출하여 14일 반복투여에 의한 흑 색소들의 경구독성을 판단하였다 (그림 4-4).

(4) 14일 반복 투여에 의한 혈청생화학적, 혈액학적 및 조직병리검사

- SD 랫드 암컷에 반복 경구투여 후 혈액을 채취하여 혈액학적 및 혈청생화학적 분석을 통해 독성지표에 대한 영향을 분석하였는데, 혈액학적 지표 분석에 의하여 혈액독성 및 면역학적 독성을 판단하고 혈청생화학적 지표 분석을 통해 잠재적 표적장기에 대한 독성을 예측하였다. 또한 주요 장기(kidney, liver, lung, spleen)를 적출하여 병리학적 검사를 수행함으로써 조직병리학적 관점에서 이상 유무 판단을 통해 종합적인 독성영향 및 안전성에 대한 자료를 확보하였다. 혈액학적, 혈청생화학적 분석 및 조직병리학적 검사는 GLP 기관인 한국화학융합시험연구원에 의뢰하여 수행하였다(그림 4-4).

(5) 오징어먹물색소와 흑국 유래 흑 색소의 안전성 비교 분석

- 오징어먹물색소와 흑국 유래 흑 색소의 독성영향에 대한 비교를 통해 개발된 흑국 유래 흑 색소의 독성 및 안전성을 비교 분석하였다. 또한 본 연구과제를 통하여 기존 시판되는 오징어먹물색소와 흑국 유래 흑 색소의 확보된 경구독성 자료를 바탕으로 종합적인 비교 분석을 통해 안전성을 판단하였다.

사. 통계처리

- 모든 시료들은 적어도 3회 반복하여 처리조건별로 처리하였으며, 처리군들의 특성은 처리군당 적어도 3회 반복 측정하였다. 측정된 특성치들은 one-way ANOVA 분석을 수행하여, 평균±표준편차로 나타내었으며, 평균값들 사이의 통계적 유의성은 95% 신뢰수준에서 Tukey' s HSD test를 이용하여 분석하였다. 모든 통계적 계산과 분석은 Minitab 16 (Minitab Inc., State College, PA, USA)에 의해 수행되었다.

2. 연구결과

가. 국내의 상업화된 흑 색소 확보 및 흑국 유래 흑 색소 제조

- 상업화된 분말상의 캐러멜색소와 오징어먹물색소는 주관연구기관인 (주)선그린으로부터 제공받아 확보하였다. 제공받은 캐러멜색소와 오징어먹물색소는 다른 성분들을 혼합되지 않은 것들이었다. 캐러멜색소와 오징어먹물색소는 데시케이터에 넣어 암소에서 저장하면서 연구에 사용하였고, 캐러멜색소와 오징어먹물색소에 대한 주관연구기관의 분석 결과를 제공받아 연구에 참고하였다.
- 주관연구기관에서 흑국 조제종국으로부터 흑 색소가 chloroform과 DMSO에 잘 용해된다는 정보와 추출 시 흑국 조제종국을 분쇄하여 사용해야 한다는 정보를 제공받았다. 이를 기초로 하여 “2. 연구방법-나. 흑국으로부터 흑 색소 제조”에 제시된 절차에 따라 흑국 유래 흑 색소를 제조하였고, 제조된 흑 색소가 분말상으로 제조되지 않아 농축물 상태로 연구에 사용하였다. 제시된 방법에 따라 2회 반복하여 제조된 흑국색소농축물(이하 용매흑국색소)은 총 195 g 이었다.
- 주관연구기관에서 제공받은 효소정제법에 의한 흑국 유래 흑 색소의 제조방법에 따라 “2. 연구방법-나. 흑국으로부터 흑 색소 제조”에 제시된 절차에 따라 흑국 유래 흑 색소를 제조하였고, 제시된 방법에 따라 2회 반복하여 제조된 흑국색소(이하 효소흑국색소)은 총 500 g 이었다.

나. 기존 상업화된 흑 색소 및 흑국 유래 흑 색소의 물리화학적 특성 분석

- 캐러멜색소, 오징어먹물색소와 흑국색소의 일반성분(수분, 조단백, 조지방, 조회분, 총 탄수화물)을 분석하여 표 4-2에 제시하였다. 수분함량은 6.0-9.0%, 조단백질은 30.4-35.3%, 조지방은 0.1-0.3%, 조회분은 0.7-2.8%, 총 탄수화물은 54.6-57.6%의 범위에 있었다. 특히 조단백질 함량이 흑국색소 > 캐러멜색소 > 오징어먹물색소 순으로 증가하였는데, 이는 대부분 흑색을 띠는 eumelanin이나 melanin에 함유되어 있는 질소에 의한 것으로 판단된다. 또한 오징어먹물색소가 조회분 함량이 다른 색소들에 비해 유의적으로 높은 수준을 나타낸 것은 오징어먹물색소는 오징어의 먹물주머니를 회수하여 이로부터 정제과정을 거쳐 제조되기 때문인 것으로 생각된다.

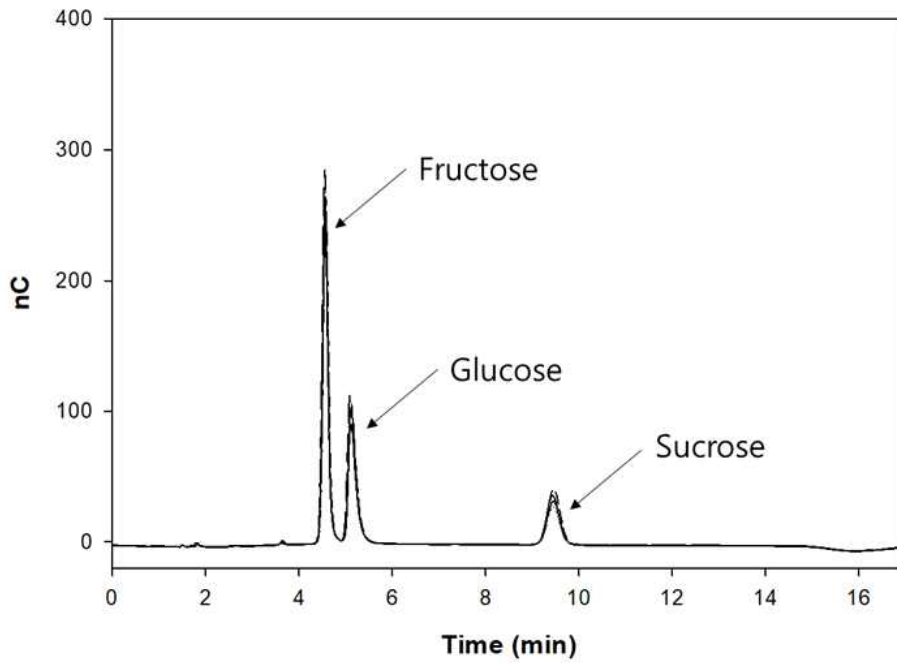
[표 4-2] 캐러멜색소, 오징어먹물색소와 흑국색소의 일반성분

Colorant	Moisture (%, w.b)	Crude protein (%, w.b)	Crude fat (%, w.b)	Crude ash (%, w.b)	Carbohydrate ¹ (%, w.b)
Caramel	7.0±0.0 ^b	35.3±0.2 ^b	0.3±0.1 ^a	0.7±0.3 ^b	56.7±0.5 ^{ab}
Squid	9.0±1.1 ^a	30.4±0.1 ^c	0.2±0.2 ^a	2.8±0.0 ^a	57.6±0.3 ^a
Black koji	6.0±0.0 ^c	38.5±0.1 ^a	0.1±0.1 ^a	0.8±0.0 ^b	54.6±0.1 ^b

¹100-(crude protein + crude fat + crude ash)

The same lowercase letters within columns are not significantly different at $p < 0.05$.

- 캐러멜색소, 오징어먹물색소와 흑국색소의 유리당 함량을 분석하여 그림 4-5와 표 4-3에 제시하였다. 오징어먹물색소와 흑국색소에서 다른 유리당들도 분석되었지만 미량이고 피크들이 유의적이지 않아 제시하지 않았다. 캐러멜색소에서 glucose, fructose, sucrose 함량이 다른 색소들에 비해 유의적으로 높은 수준을 나타내었으며, 오징어먹물색소와 흑국색소들은 유사한 수준이었고 매우 적은 양의 유리당이 존재하였다. 이것은 색소를 제조하면서 오징어먹물색소는 정제과정에서, 흑국색소는 추출용매로 chloroform을 사용하여 유리당들이 회수되지 않았기 때문으로 판단된다.



[그림 4-5] 캐러멜색소, 오징어먹물색소와 흑국색소 유리당들의 HPAEC 크로마토그램

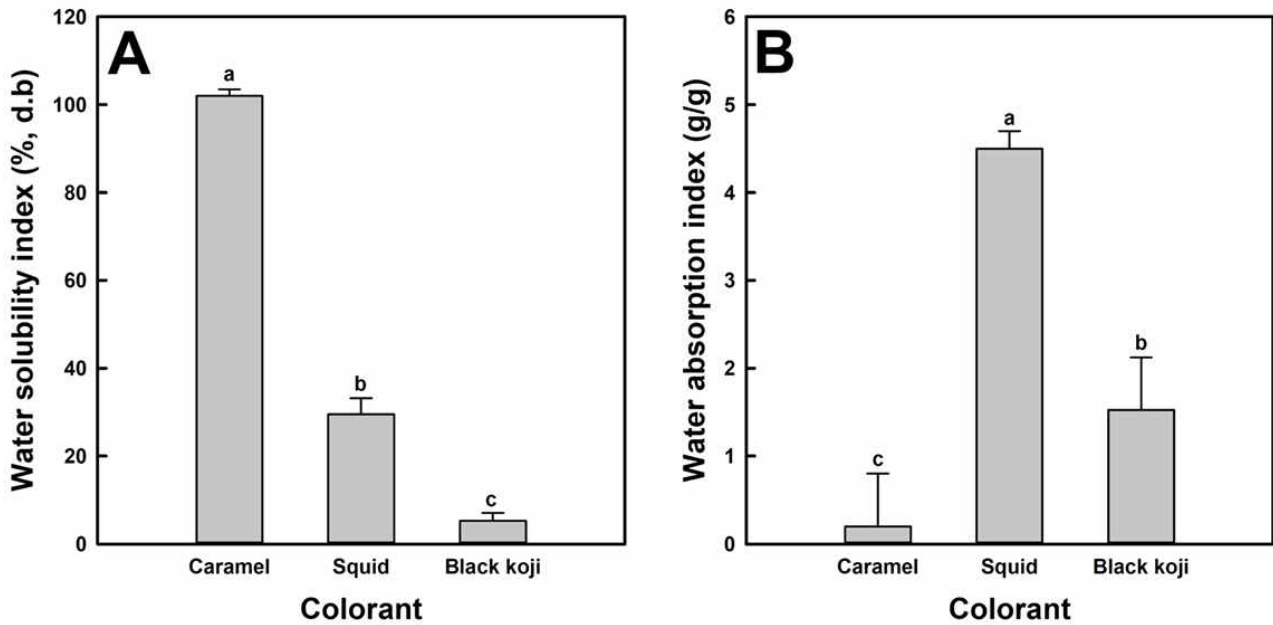
[표 4-3] 캐러멜색소, 오징어먹물색소와 흑국색소의 유리당 함량

Colorant	Glucose ($\mu\text{g/mL}$)	Fructose ($\mu\text{g/mL}$)	Sucrose ($\mu\text{g/mL}$)
Caramel	18.6 ± 0.4^a	17.6 ± 0.2^a	19.3 ± 0.1^a
Squid	1.9 ± 0.1^b	1.8 ± 0.1^b	1.5 ± 0.0^c
Black koji	1.8 ± 0.1^b	1.6 ± 0.1^b	1.8 ± 0.1^b

¹⁾100-(crude protein + crude fat + crude ash)

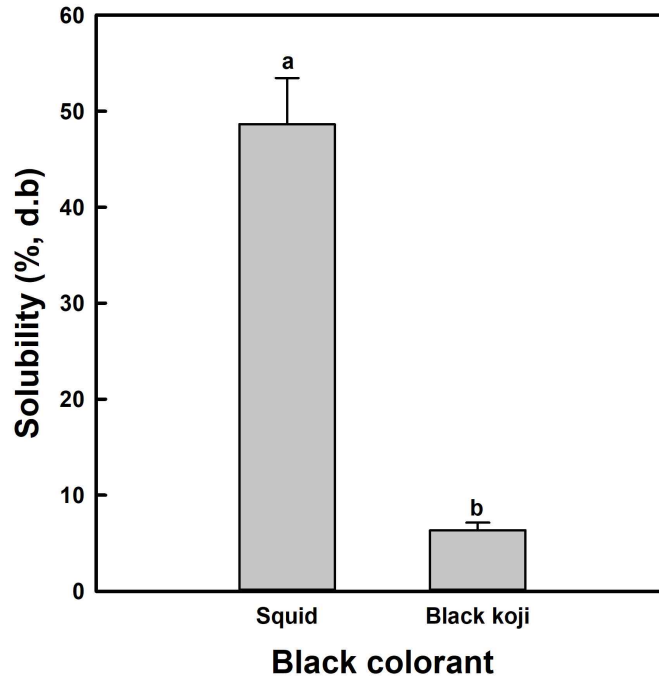
The same lowercase letters within columns are not significantly different at $p < 0.05$.

- 캐러멜색소, 오징어먹물색소와 흑국색소의 유기산 함량의 분석을 수행하였다. 그러나 이들로 부터 유기산 분석을 위해 제조된 분석시료들은 유기산 표준물질들과 다른 머무름 시간 (retention time)에서 유의적이지 않은 피크를 형성하지도 못하였다. 따라서 캐러멜색소, 오징어먹물색소와 흑국색소의 유기산은 존재하지 않는 것으로 결론지었다.



[그림 4-6] 캐러멜색소, 오징어먹물색소와 흑국색소의 수분용해지수와 수분흡수지수

- 캐러멜색소, 오징어먹물색소와 흑국색소의 수분용해지수와 수분흡수지수를 분석하여 그림 4-6에 제시하였다. 수분용해지수는 캐러멜색소 > 오징어먹물색소 > 흑국색소의 순서로 증가하였으며, 캐러멜색소의 경우 수분용해지수가 102.0%를 나타내어 물에 잘 용해되었다. 그러나 오징어먹물색소와 흑국색소는 물에 용해되는 성분이 적었으며, 특히 흑국색소의 수분용해지수는 5.2% 정도로 매우 적었다. 수분흡수지수는 캐러멜색소는 물에서 대부분이 용해되어 매우 낮은 수분흡수지수를 측정하는 것이 적절치 않았다. 오징어먹물색소의 수분흡수지수는 4.5 g/g으로 상당량의 물을 흡수하는 것으로 생각되지만, 흑국색소는 1.5 g/g으로 거의 물을 흡수하지 못하는 것으로 판단된다. 이는 흑국의 흑 색소들이 chloroform에 잘 용해되는 것으로 볼 때, 흑국의 흑 색소들은 소수성을 나타내는 것으로 판단된다.
- 오징어먹물색소와 흑국색소의 물에서의 용해도를 85°C에서 분석하여 그림 4-7에 제시하였다. 캐러멜색소는 상온의 물에 100% 용해되기 되기 때문에 용해도 분석에서 제외하였다. 오징어먹물색소의 경우 수분용해지수(그림 4-6A)에 비해 85°C에서 용해도가 비약적으로 증가한 것을 알 수 있었다. 그러나 흑국색소는 85°C에서 가열하여도 용해도(6.3%)가 수분용해지수(5.2%)에 비해 소폭 증가하였다. 따라서 흑국색소는 주로 소수성 특성을 보유하고 있는 것으로 판단된다.
- 식품가공에서 널리 사용되는 대두유에 대한 오징어먹물색소와 흑국색소의 용해도를 측정하고자 하였다. 대두유에 대한 용해도의 분석은 침전물에 포함되어 있는 대두유를 제거할 수 없어 물에서의 용해도와 같은 방법으로 측정할 수 없었다. 그래서 흑국색소가 대두유에 용해되어 대두유의 흡광도를 변화시켰을 때 그 차이를 통해 추정하고자 하였지만, 오징어먹물색소와 흑국색소는 85°C로 가열된 대두유에서 용해되지 않아 분석을 진행할 수 없었다.



[그림 4-7] 오징어먹물색소와 흑국색소농축물의 용해도

- 오징어먹물색소와 흑국색소의 색 특성을 분석하여 표 4-4에 제시하였다. 흑국색소를 분말상으로 취급할 수 없어 오징어먹물색소와 흑국색소를 모두 용해시키는 DMSO에 용해시켜 색 특성을 분석하였다. 캐러멜색소도 DMSO에 용해되지만 캐러멜색소는 진하고 강한 고동색을 나타낼 뿐 흑색을 나타내지 않아 제외하였다. 오징어먹물색소에 비해 흑국색소는 명도가 유의적으로 감소하였고, 적색도는 통계적으로 유의적이거나 큰 차이를 보이지 않았으며, 황색도는 유의적으로 감소하였다. 전반적으로 오징어먹물색소에 비해 흑국색소가 더욱 진한 흑색을 나타내는 것으로 판단된다.

[표 4-4] 오징어먹물색소와 흑국색소 용액의 색 특성

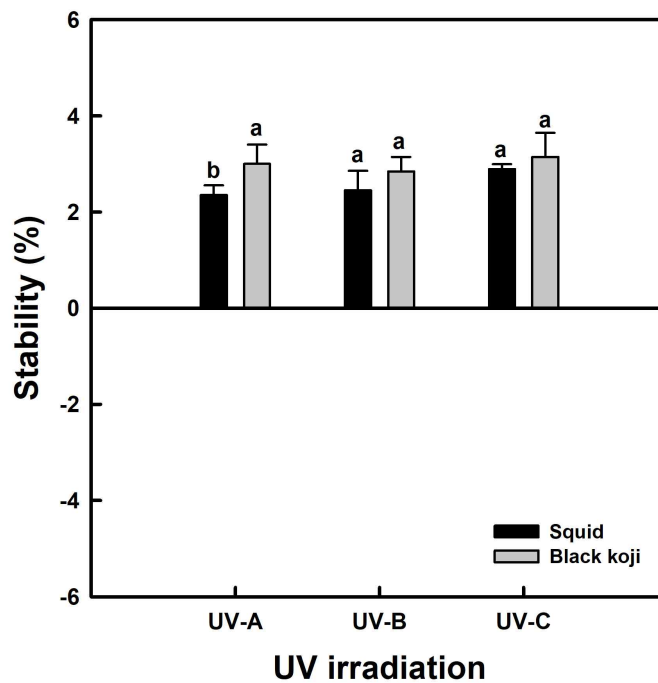
Black colorant	L	a	b
Squid	15.3±0.1 ^a	3.4±0.0 ^a	6.9±0.1 ^a
Black koji	12.9±0.2 ^b	3.1±0.0 ^b	0.8±0.0 ^b

¹The black colorant was dissolved in DMSO, and adjusted to the final concentration of 0.1% (w/v). The same lowercase letters within columns are not significantly different at $p < 0.05$.

- 흑국 유래 흑 색소의 물리화학적 특성분석에 있어 무기질, 폴리페놀함량, 제타전위차 등은 현재 분석을 진행하였으나, 측정 시 DMSO가 용매로 적절하지 않아 측정이 불가능하였다.

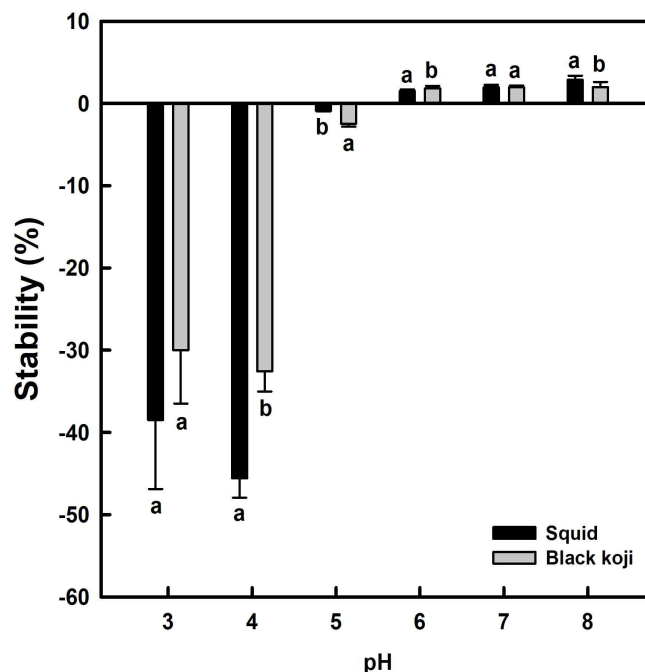
다. 용매추출법에 의한 흑국 유래 흑 색소(용액흑국색소)의 안정성

- 외부환경요인과 가공공정에 대한 흑 색소의 안정성 탐색에 있어 오징어먹물색소와 용액흑국색소에 대해서만 연구를 진행하였다. 앞에서 언급한 것처럼 캐러멜색소는 진하고 강한 고동색을 나타낼 뿐 흑색을 나타내지 않고, 수분용해지수와 수분흡수지수, 용해도 등의 물리화학적 특성이 오징어먹물색소와 용매흑국색소와 상이하며, 본 연구의 최종 개발대상은 흑국 유래 흑 색소로 오징어먹물색소를 대체하기 위한 것이기 때문에 캐러멜색소와 비교한다면 본 연구의 최종산물의 우수성을 낮추는 결과를 초래할 수 있어 캐러멜색소는 제외하였다.
- 오징어먹물색소와 용액흑국색소의 광(light) 안정성 평가 있어 일광(햇빛)은 제외하였다. 일광은 날씨에 따라 조사량이 상이하고 저녁시간에서는 조사하기 어려울 뿐만 아니라 천연색소의 탈색은 일광의 자외선에 의한 산화반응의 유발 때문이기 때문에 실험조건을 통제할 수 있는 UV-A, UV-B, UV-C 자외선램프를 이용하여 자외선에 대한 안정성을 조사하였다.

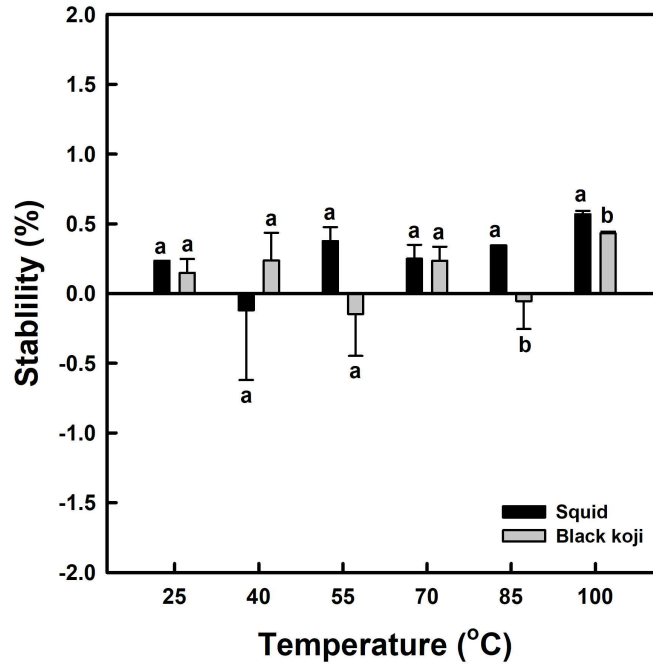


[그림 4-8] 오징어먹물색소와 용액흑국색소의 UV 조사에 대한 안정성

- 자외선조사에 대한 오징어먹물색소와 용액흑국색소의 안정성을 그림 4-8에 제시하였다. 그림 4-8에서 안정성 값이 “0” 일 경우는 처리전후의 흡광도가 동일하다는 것을 의미하며 “-” 값을 나타내는 경우는 안정성이 낮아진다는 것을 의미하고, “+” 값을 나타낼 때는 안정성이 증가한다는 것을 나타낸다. 자외선조사에 대한 흑 색소들의 안정성은 자외선 종류에 관계없이 증가하였으며, UV-A 처리군을 제외하고 오징어먹물색소와 용액흑국색소 사이의 광 안정성에 대한 차이는 존재하지 않았다. UV-A 처리군에 있어서도 통계적으로는 유의적인 차이를 보이지만 그 차이가 크지 않아 거의 같은 수준이라 할 수 있다. 황색 및 적색의 천연색소들은 자외선조사 시 조사시간에 따라 갈색으로 갈변되거나 탈색이 진행된다. 그러나 흑 색소들은 주로 갈변물질의 최종단계인 melanin 계통의 화학성분들에서 유발되기 때문에 자외선조사에 의해 탈색이 일어나지 않는다. 또한 melanin 성분들은 자외선을 차단하는 효과가 있는 것으로 알려져 있다.
- 오징어먹물색소와 용액흑국색소의 pH에 대한 안정성을 조사하여 그림 4-9에 제시하였다. pH 3과 4의 표준완충용액을 가하여 처리한 오징어먹물색소와 용액흑국색소의 안정성은 매우 낮은 수준을 나타내었다. 이것은 pH 3과 4의 처리군들에서 많은 양의 검은색 침전이 발생하였다. 따라서 이와 같이 낮은 수준의 안정성을 나타낸 것은 이들의 흑 색소가 파괴되거나 탈색되어 일어난 현상은 아니며, 단지 분석방법상의 문제인 것으로 생각된다. 일정시간 방치 후 흡광도를 측정하기 전 원심분리를 하고 상층액을 취해 흡광도를 측정하기 때문에 상층액에 색소의 양이 상대적으로 적었기 때문으로 판단된다. 한편 pH 5의 완충용액으로 처리한 시료들도 “-” 값을 나타내었지만 그 정도가 낮아 안정성이 크게 문제되지 않는 것으로 판단된다. pH 6-8의 범위에서는 오징어먹물색소와 용액흑국색소의 pH에 대한 안정성은 양호하였다.

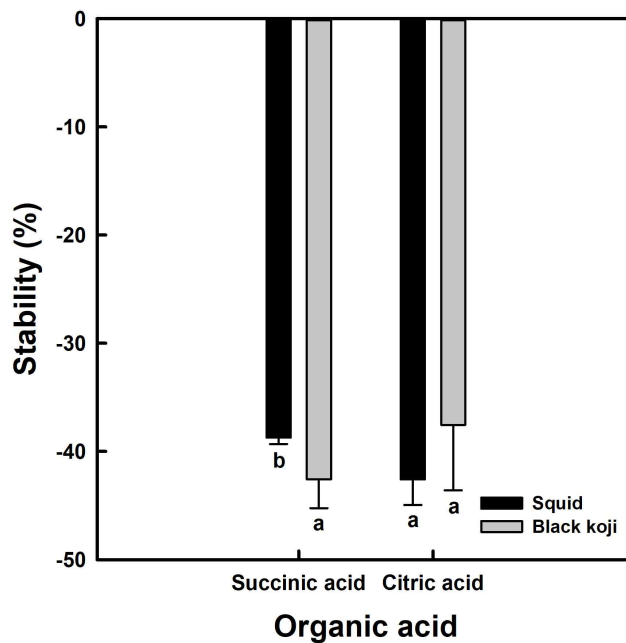


[그림 4-9] 오징어먹물색소와 용액흑국색소의 pH에 대한 안정성



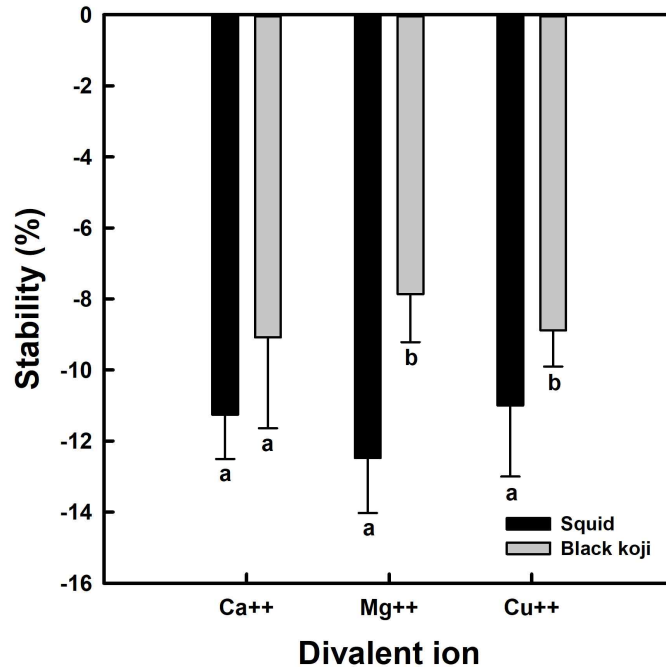
[그림 4-10] 오징어먹물색소와 용액흑국색소의 온도에 대한 안정성

- 오징어먹물색소와 용액흑국색소의 DMSO 용액을 25-100°C의 온도에 노출시켜 열처리하여 열 안정성을 평가하였다(그림 4-10). 40°C의 오징어먹물색소와 55°C와 85°C의 용액흑국색소들이 “-” 안정성 값을 나타내었지만, 이는 흡광도의 측정 상에 있어 오차인 것으로 판단된다. 오징어먹물색소와 용액흑국색소들의 흡광도는 “0”에 근접하고 있어 열 안정성이 대단히 높은 것으로 판단된다.



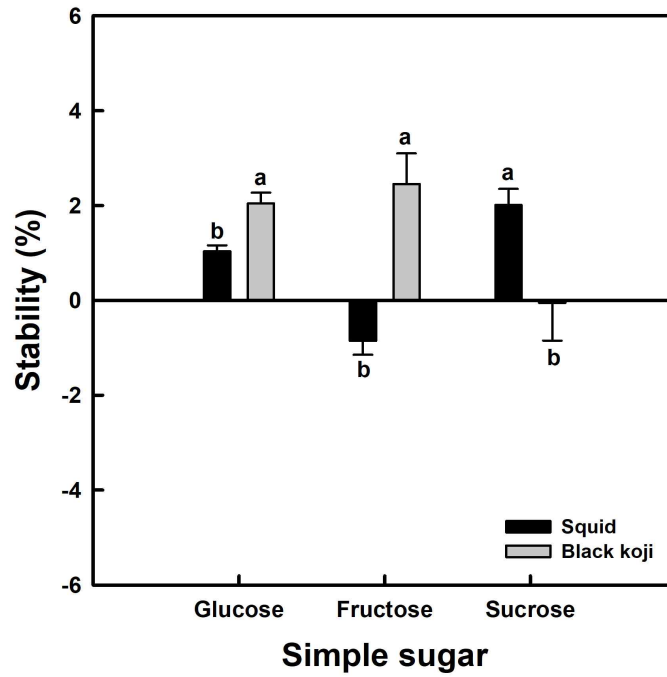
[그림 4-11] 오징어먹물색소와 용액흑국색소의 유기산에 대한 안정성

- 오징어먹물색소와 용액흑국색소의 유기산에 대한 안정성은 호박산과 구연산을 흑 색소-DMSO 용액에 직접 용해시킨 후 평가하였다(그림 4-11). 오징어먹물색소와 용액흑국색소들의 pH 3과 4에서의 낮은 안정성과 유사하였다. 이는 1% 호박산과 구연산 용액들의 pH가 3 부근에서 형성되기 때문인 것으로 판단된다. 또한 오징어먹물색소와 용액흑국색소들은 유기산의 존재에 있어 흑색의 침전물들을 형성하고 있었기 때문에 탈색이 진행된 결과로는 판단할 수 없는 것 같다.



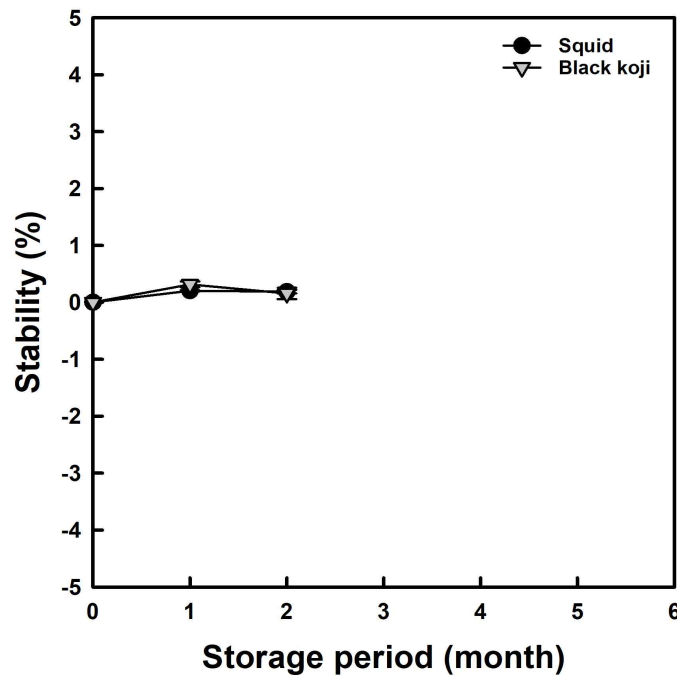
[그림 4-12] 오징어먹물색소와 용액흑국색소의 금속이온(다가양이온)에 대한 안정성

- 오징어먹물색소와 용액흑국색소의 DMSO 용액과 금속이온 용액을 혼합하여 오징어먹물색소와 용액흑국색소의 금속이온에 대한 안정성을 평가하여 그림 4-12에 제시하였다. 안정성이 모두 “-” 값을 나타내어 낮은 안정성을 나타내었으나, 유기산에 비해 안정성은 높은 수준이었다. 이와 같은 결과도 유기산에서 관찰된 것처럼 다량의 흑색 침전물이 발생하였다. 이는 eumelanin이나 melanin 분자의 음이온성 작용기들과 다가금속이온들 사이의 이온성 가교결합 형성으로 흑색의 응집체가 형성된 것으로 판단된다.



[그림 4-13] 오징어먹물색소와 용액흑국색소의 단순당에 대한 안정성

- 오징어먹물색소와 용액흑국색소의 안정성에 대한 단순당의 영향을 조사하기 위해 흑 색소 DMSO 용액에 glucose, fructose와 sucrose를 직접 용해시켜 조사하였다. 그림 4-13에 의하면 적용된 단순당이 오징어먹물색소와 용액흑국색소의 색 탈색에 영향을 미치지 않는 것으로 조사되었다.



[그림 4-14] 오징어먹물색소와 흑국색소농축물의 저장기간에 따른 안정성(25℃)

- 오징어먹물색소와 용액흑국색소의 저장기간에 따른 안정성을 평가하기 위해 이들을 DMSO에 용해시킨 후 25℃와 50℃의 항온기에 넣어 저장하면서 흡광도를 측정하여 안정성 계산식을 이용하여 조사하였다(그림 4-14). 25℃ 미만의 온도를 적용하지 않은 것은 DMSO가 19℃ 이하에서 얼어 고체상으로 존재하기 때문이며, 고체로 변한 DMSO를 용해시키기 위해 열을 가하게 되면 동일한 조건에서 측정이 불가능하기 때문이다.
- 가공공정에 따른 오징어먹물색소와 용액흑국색소의 안정성 평가를 위해 각 색소를 밀가루와 혼합하여 반죽을 형성한 후 이 반죽을 일정한 모양으로 성형한 후 삶기, 굽기, 유탕처리를 하여 최종산물의 색 특성을 반죽의 색 특성과 비교하여 가공공정에 대한 안정성을 추정하였다. 그러나 흑국색소농축물이 분말상이 아니라 끈적끈적한 덩어리로 이루어져 있기 때문에 반죽에 균일하게 분포하지 않았기 때문에 용액흑국색소에 대해서는 적용을 하지 못하였다. 그래서 오징어먹물색소에 대한 결과만 표 4-5에 제시하였다. 총 색 차이는 가공처리 후 반죽에 비해 증가하는 결과를 나타내었으며, 이는 오징어먹물색소가 가공처리 후에도 탈색이나 변색 없이 유지된다는 것을 암시한다. 총 색 차이는 유탕처리 > 굽기 > 삶기 순서로 증가하였다.

[표 4-5] 오징어먹물색소를 함유한 반죽의 가공처리 시 색 특성

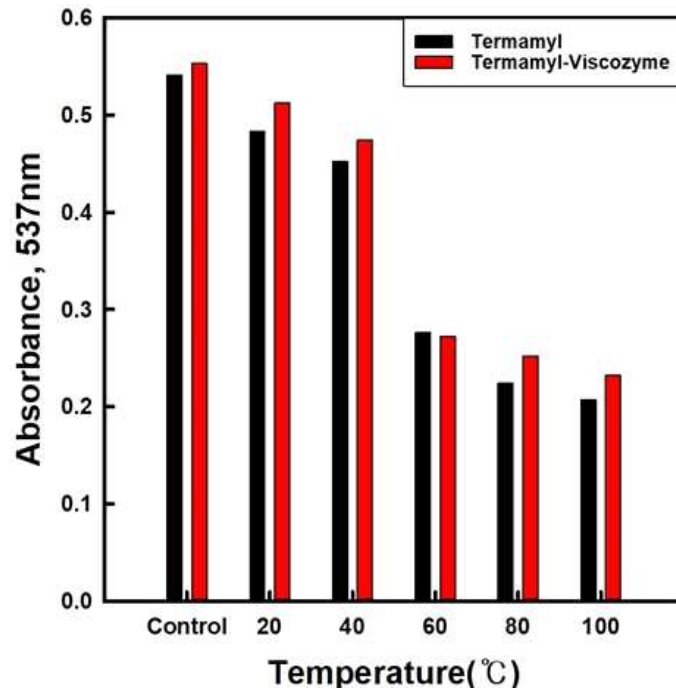
Processing	L	a	b	ΔE
Control (dough)	40.2±0.1 ^c	0.2±0.0 ^c	-0.8±0.2 ^c	-
Boiling	41.3±0.0 ^b	-0.1±0.1 ^c	-1.4±0.1 ^d	1.3
Baking	39.5±0.1 ^d	1.0±0.1 ^b	6.5±0.0 ^b	7.4
Deep-fat frying	41.9±0.2 ^a	2.0±0.0 ^a	9.5±0.0 ^a	10.6

The same lowercase letters within columns are not significantly different at $p < 0.05$.

라. 효소정제법에 의한 흑국 유래 흑 색소(효소흑국색소)의 안정성

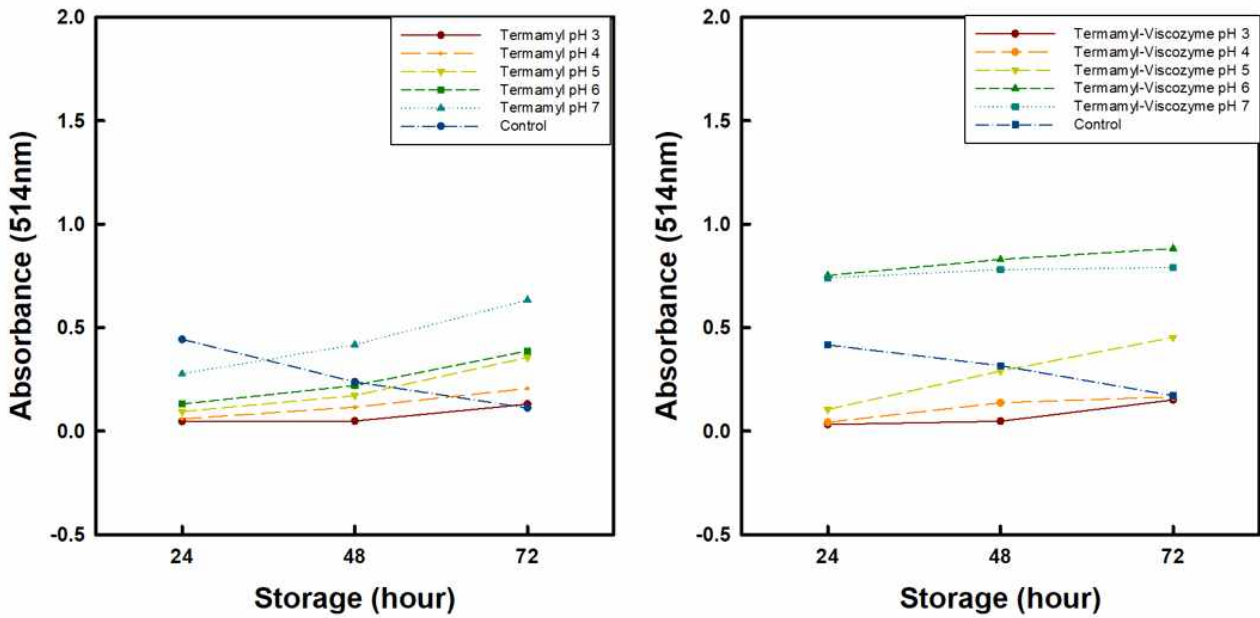
- 주관연구기관에서 확립된 효소정제법에 의해 제조된 흑국 유래 흑 색소(효소흑국색소) 분말을 이용하여 외부환경요인에 의한 효소흑국색소의 안정성을 평가하였다. 효소흑국색소는 1단계 효소처리만 적용하여 제조된 효소흑국색소(Termamyl, T-효소흑국색소)과 2단계 효소처리까지 적용하여 제조된 효소흑국색소(Termamyl-Viscozyme, TV-효소흑국색소)의 2종에 대해 평가하였다.

- 효소흑국색소의 온도에 대한 안정성을 조사하여 그림 4-15에 제시하였다. T-효소흑국색소와 TV-효소흑국색소는 주어진 온도에서 유사한 안정성을 나타내었으나 TV-효소흑국색소가 T-효소흑국색소보다 더 안정한 것으로 판단된다. 한편 온도가 높아질수록 2종의 효소흑국색소들의 안정성은 감소하는 경향을 나타내었으며, 유사한 정도로 감소하였다. 따라서 효소흑국색소는 상온 또는 상온 이하의 온도에서 저장 및 유통하는 것이 색가의 유지를 위해 좋을 것으로 판단된다.



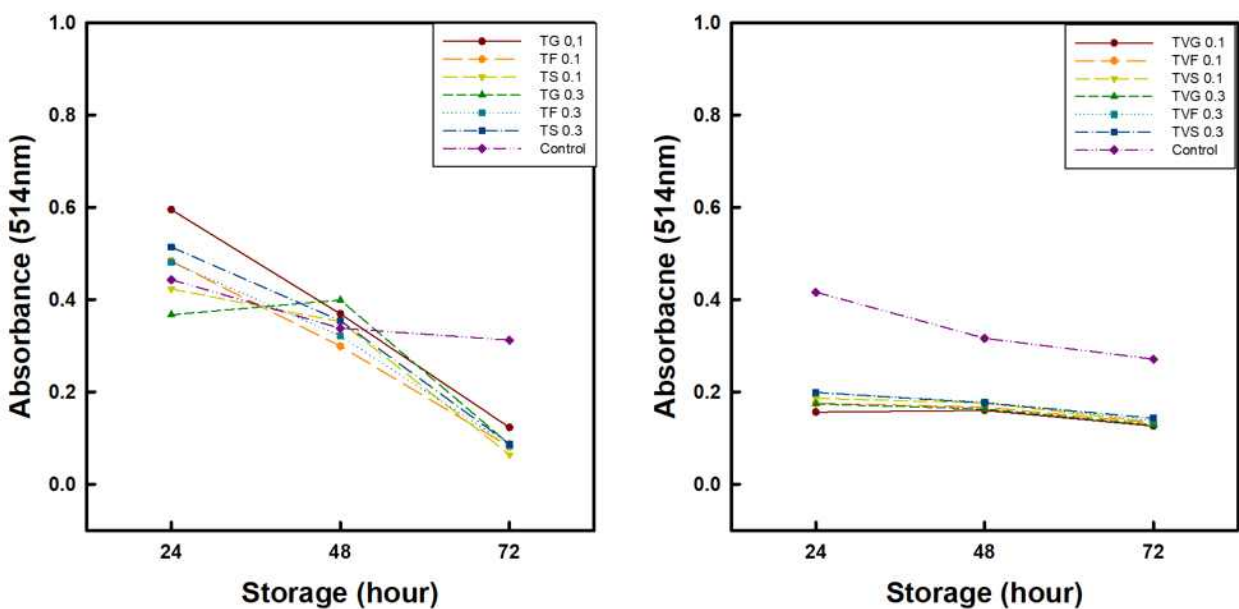
[그림 4-15] 효소흑국색소의 온도에 대한 안정성

- 2종의 효소흑국색소들의 저장 중 안정성에 대한 pH의 영향을 조사하여 그림 4-16에 제시하였다. 저장 1일 경과 후 pH 3~6까지의 흡광도가 pH를 조정하지 않은 시료보다 흡광도가 낮았고, pH가 높을수록 흡광도가 증가하는 경향을 나타내었다. 이와 같은 결과로 pH가 증가할수록 효소흑국색소들은 안정하지 않은 것으로 생각된다. TV-효소흑국색소는 pH 6~7일 때, T-효소흑국색소에 비해 흡광도 값이 높음을 알 수 있는데 이는 TV-효소흑국색소가 pH6~7일 때 색소의 안정성이 떨어짐을 의미하였다. 이후 모든 안정성평가의 시료의 pH는 5로 고정하여 수행하였다.



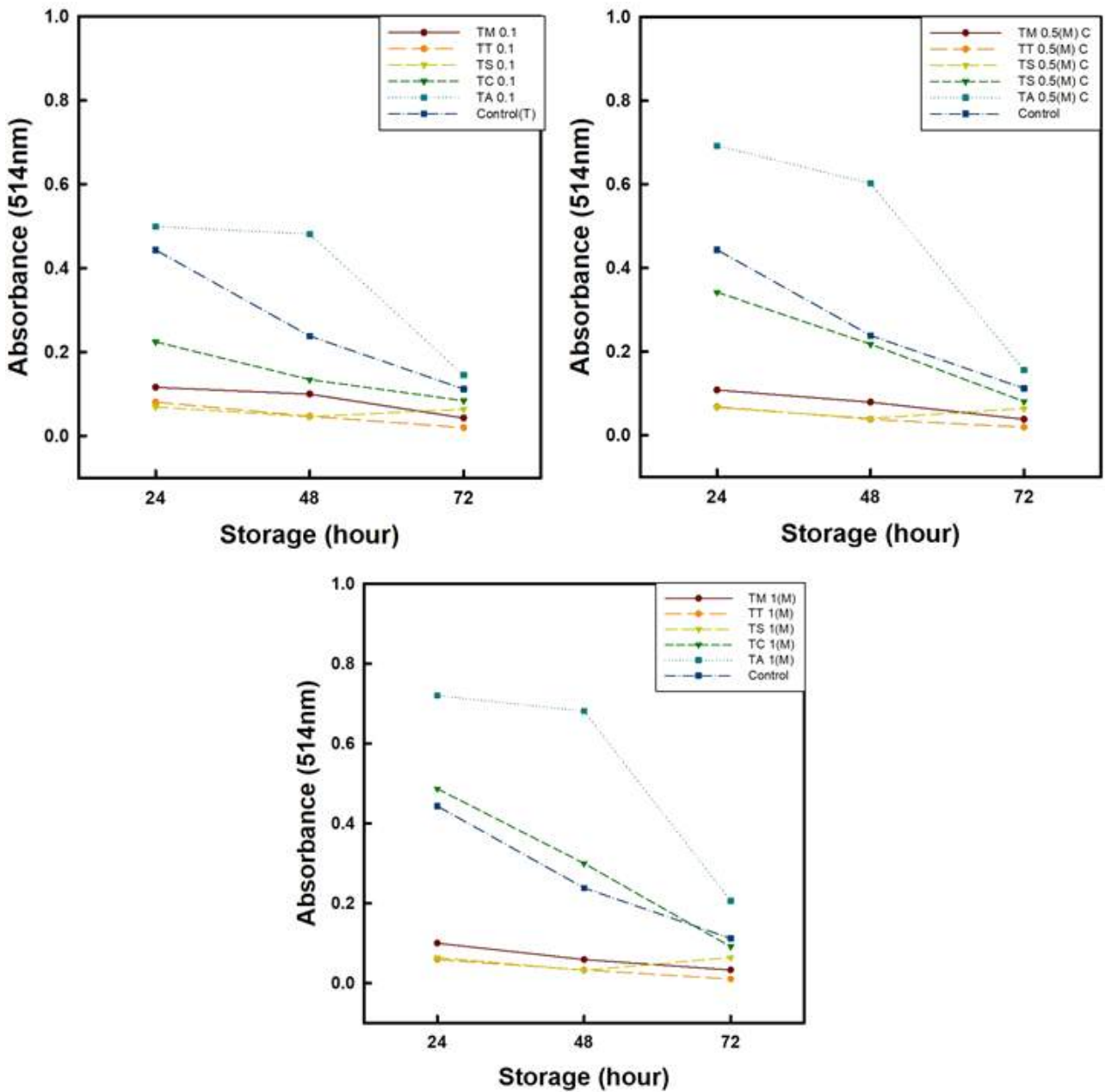
[그림 4-16] 효소흑국색소의 저장중 안정성에 대한 pH의 영향

- 효소흑국색소 용액에 glucose, fructose, sucrose를 각각 0.15 M과 0.3 M을 가하여 저장기간에 따른 효소흑국색소의 안정성을 조사하여 그림 4-17에 제시하였다. 0.3 M의 당 첨가 시 T-효소흑국색소는 대조군에 비해 안정성에 있어 약간의 변화가 있었으나, 저장기간에 따른 변화는 TV-효소흑국색소보다 더 큰 것을 알 수 있었다. 대부분 0.3 M 당을 첨가한 TV-효소흑국색소는 대조군에 비해 안정성이 급격히 저하되나 저장기간에 따른 변화는 거의 없었다. 0.3 M의 당 첨가 시 0.15 M에 비해서 안정성이 더 크게 저하함을 알 수 있었다.

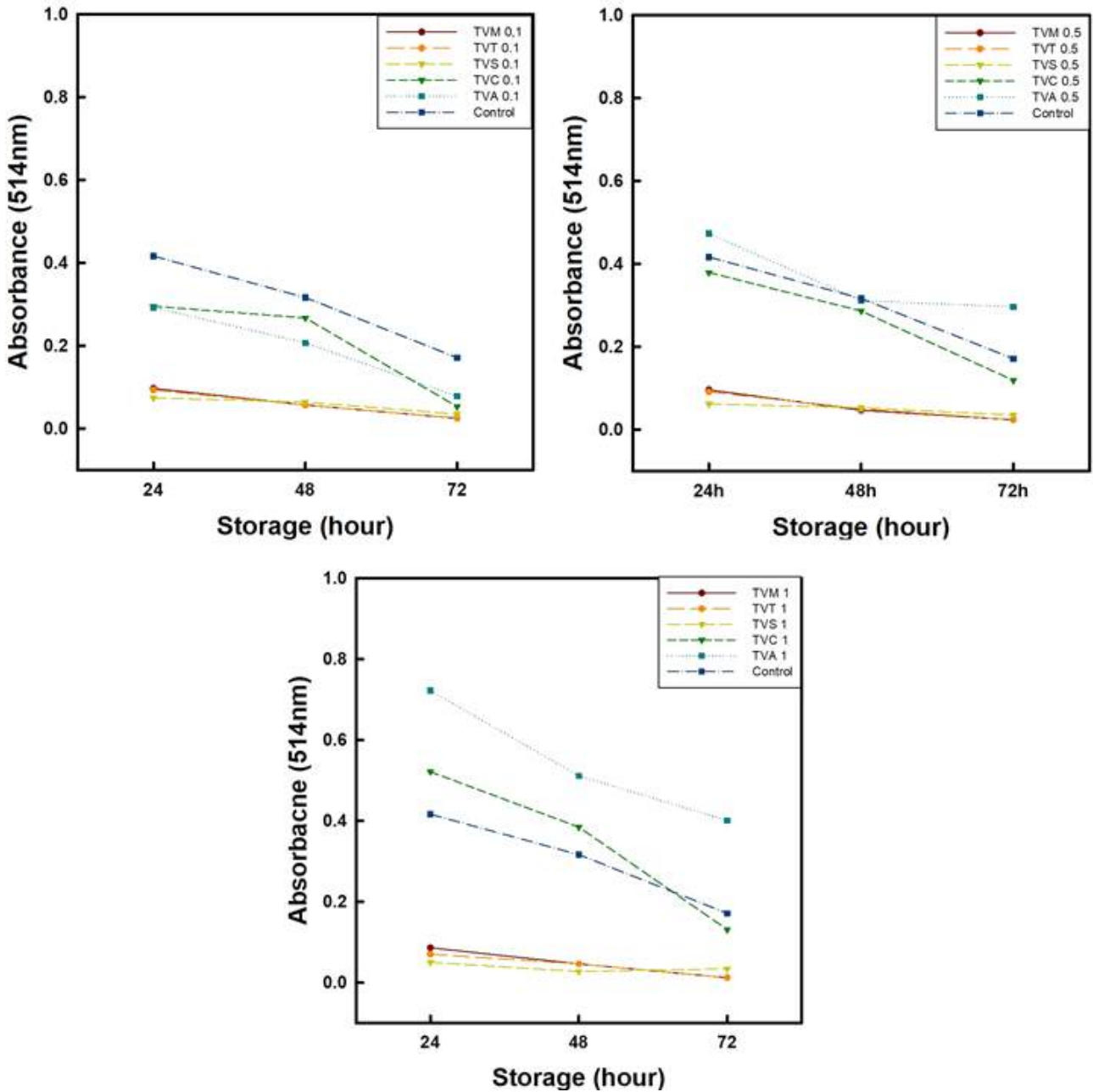


[그림 4-17] 효소흑국색소의 저장 중 안정성에 대한 당류의 영향

- 5종의 유기산(acetic acid, citric acid, malic acid, tartaric acid, Succinic acid)을 0.1, 0.5, 1 M 농도로 효소흑국색소에 첨가하여 저장기간에 따른 안정성을 조사하여 그림 4-18과 그림 4-19에 제시하였다. 초기에는 대부분 대조군보다 흡광도 수치가 낮았고 Acetic acid만 흡광도가 높은 것을 볼 수 있었다. 그러나 시간이 지남에 따라 대조군에 근접한 값을 보이는 것을 확인할 수 있다. Malic acid와 succinic acid, tartaric acid는 농도와 별 관계없이 상관없이 없음을 알 수 있었다. 최종적으로 유기산의 농도와 상관없이 acetic acid의 첨가로 인한 효소흑국색소 안정성이 떨어지는 것을 알 수 있었다.

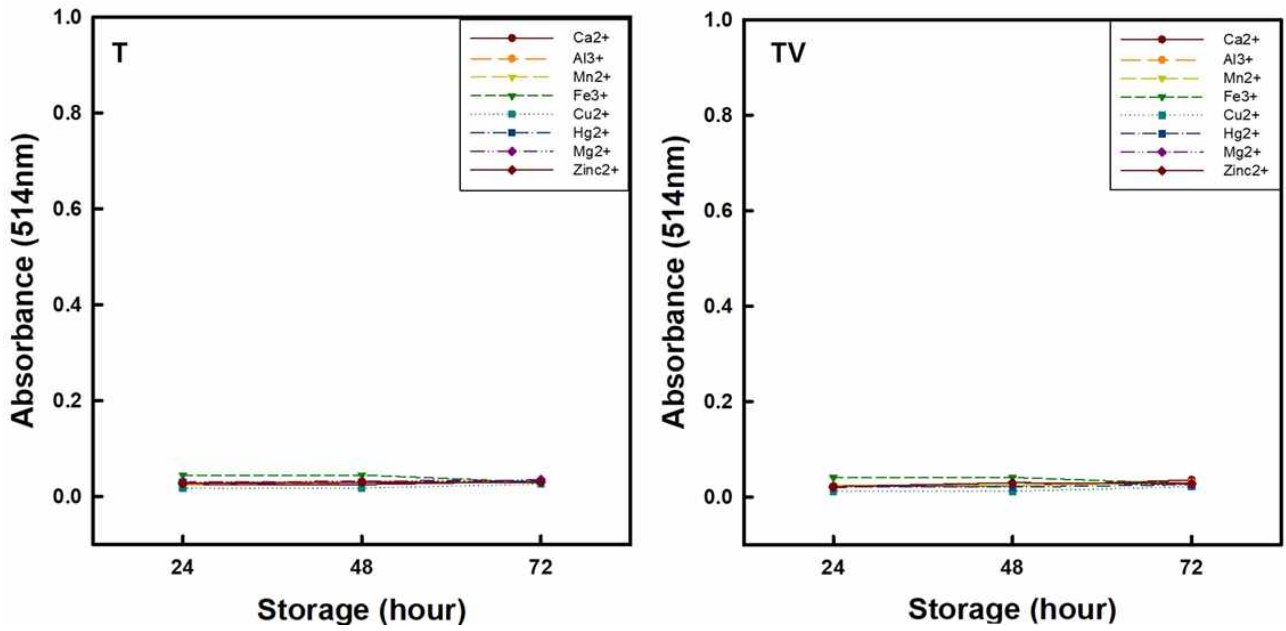


[그림 4-18] T-효소흑국색소의 안정성에 대한 유기산의 영향(M: maleic acid, T: tartaric acid, S: succinic acid, A: acetic acid, C: citric acid, 0.1: 0.1 M, 0.5: 0.5 M, 1: 1 M).

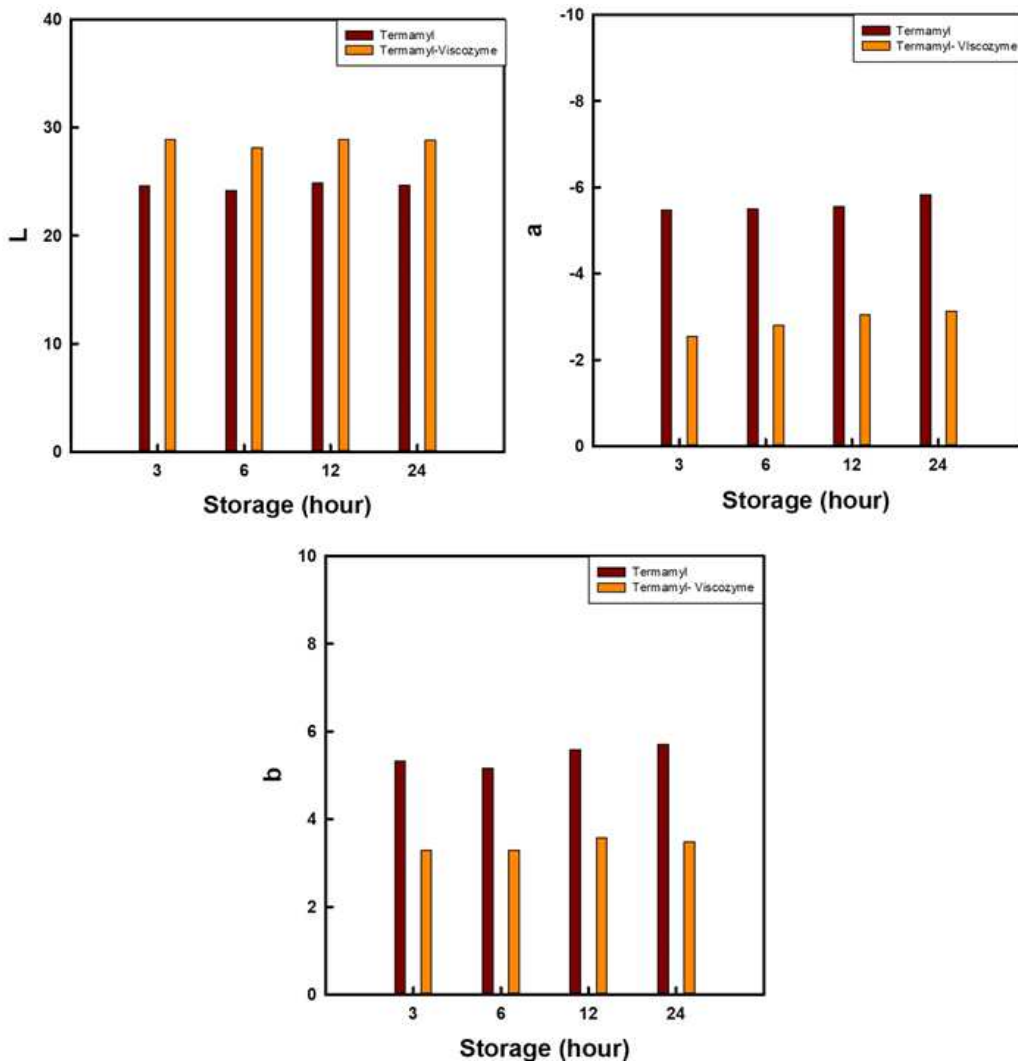


[그림 4-19] TV-효소흑국색소의 안정성에 대한 유기산의 영향(M: maleic acid, T: tartaric acid, S: succinic acid, A: acetic acid, C: citric acid, 0.1: 0.1 M, 0.5: 0.5 M, 1: 1 M).

- 효소흑국색소의 안정성에 대한 금속이온들의 영향을 조사하여 그림 4-20에 제시하였다. 금속이온들은 100 ppm의 농도로 pH 5로 조정된 효소흑국색소 분산물에 첨가하여 3일간 저장하였다. 그림 4-20에서 보여지는 바와 같이 대조군과 비교하여 금속이온을 첨가한 것의 흡광도는 거의 변화가 없었다. 따라서 효소흑국색소의 안정성에 대한 금속이온들의 영향은 거의 없는 것 같다.



[그림 4-20] 효소흑국색소의 안정성에 대한 금속이온의 영향



[그림 4-21] 효소흑국색소의 안정성에 대한 자외선(UV-C)의 영향

- 효소흑국색소의 자외선(UV-C)에 대한 영향을 조사하여 그림 4-21에 제시하였다. 자외선처리장치의 구성 상 효소흑국색소 분말을 일정기간동안 자외선램프에 노출시킨 후 효소흑국색소 분말의 색 특성을 분석하여 효소흑국색소의 안정성을 평가하였다. 그림 4-21에서 보는 바와 같이 자외선 조사는 효소흑국색소의 안정성에 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있다.

마. 흑국 유래 흑 색소의 독성 안전성

- 주관연구기관에서 설정한 대량생산 공정은 1단계 효소처리, 즉 thermostable α -amylase (Termamyl 2.2X)를 사용하여 흑국 유래 흑 색소를 생산하는 것으로 결정되었다. 따라서 흑국 유래 흑 색소의 독성 안전성 평가는 효소정제법에 의한 흑국색소만을 이용하여 진행하였다. 흑국색소의 대조군으로 시판중인 오징어먹물색소를 사용하였다. 오징어먹물색소와 흑국색소는 물에 용해되지 않아 carboxymethylcellulose (CMC) 1% 용액에 분산시켜 쥐에 경구투여하였다. 이대 대조군은 1% CMC 용액을 경구투여한 쥐, 시험군은 오징어먹물색소와 흑국색소를 경구투여한 군으로 하였다. 그림 4-22에 시험군을 투여시 제조한 흑 색소 분산물의 사진을 제시하였다. 그림 4-22에서 볼 수 있는 바와 같이 오징어먹물색소와 흑국색소들 모두 안정적으로 분산된 것을 확인하여 투여를 진행하였다.

	Day 0 (2020. 11. 13. 금)	Day 1 (2020. 11. 14. 토)	Day 2 (2020. 11. 15. 일)	Day 3 (2020. 11. 16. 월)	Day 4 (2020. 11. 17. 화)	Day 5 (2020. 11. 18. 수)	Day 6 (2020. 11. 19. 목)	Day 7 (2020. 11. 20. 금)	Day 8 (2020. 11. 21. 토)	Day 9 (2020. 11. 22. 일)	Day 10 (2020. 11. 23. 월)	Day 11 (2020. 11. 24. 화)	Day 12 (2020. 11. 25. 수)	Day 13 (2020. 11. 26. 목)
Termamyl 처리 흑색소														
선그린 오징어 먹물색소														

[그림 4-22] 14일 반복 경구투여를 위한 시료들의 분산정도 확인







- 대조군과 시험군을 14일간 경구투여하면서 쥐들의 행동이상을 관찰한 결과를 그림 4-23에 제시하였다. 14일의 경구투여 기간 동안 시험군이 투여된 쥐들에게서 이상행동 반응은 관찰되지 않았다.

날짜	Day 0 (2020. 11. 13. 금)	Day 1 (2020. 11. 14. 토)	Day 2 (2020. 11. 15. 일)
관찰 내용	특이 관찰사항 없음.	특이 관찰사항 없음.	특이 관찰사항 없음.
Termamyl 처리 흑색소			
선그린 오징어 먹물색소			
1% CMC (Control)			
날짜	Day 3 (2020. 11. 16. 월)	Day 4 (2020. 11. 17. 화)	Day 5 (2020. 11. 18. 수)
관찰 내용	특이 관찰사항 없음.	특이 관찰사항 없음.	특이 관찰사항 없음.
Termamyl 처리 흑색소			
선그린 오징어 먹물색소			
1% CMC			

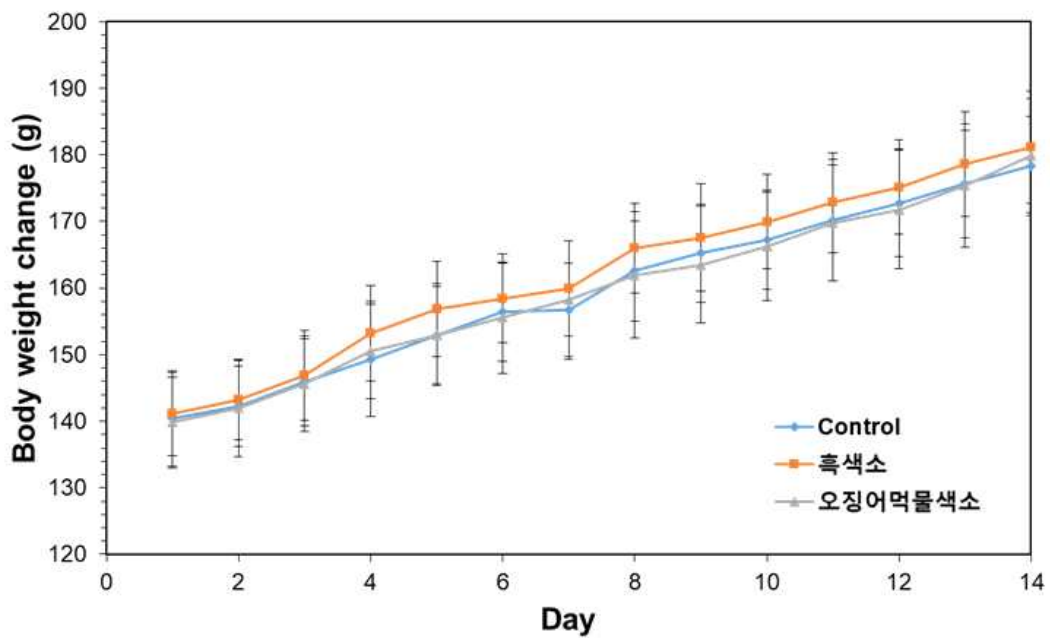
[그림 4-23] 오징어먹물색소와 흑국 유래 흑색소의 경구투여하는 동안 쥐들의 행동이상 관찰

날짜	Day 6 (2020. 11. 19. 목)	Day 7 (2020. 11. 20. 금)	Day 8 (2020. 11. 21. 토)
관찰 내용	특이 관찰사항 없음.	특이 관찰사항 없음.	특이 관찰사항 없음.
Termamyl 처리 흑색소			
선그린 오징어먹물색소			
1% CMC (Control)			
날짜	Day 9 (2020. 11. 22. 일)	Day 10 (2020. 11. 23. 월)	Day 11 (2020. 11. 24. 화)
관찰 내용	특이 관찰사항 없음.	특이 관찰사항 없음.	특이 관찰사항 없음.
Termamyl 처리 흑색소			
선그린 오징어먹물색소			
1% CMC (Control)			

[그림 4-23] (계속)

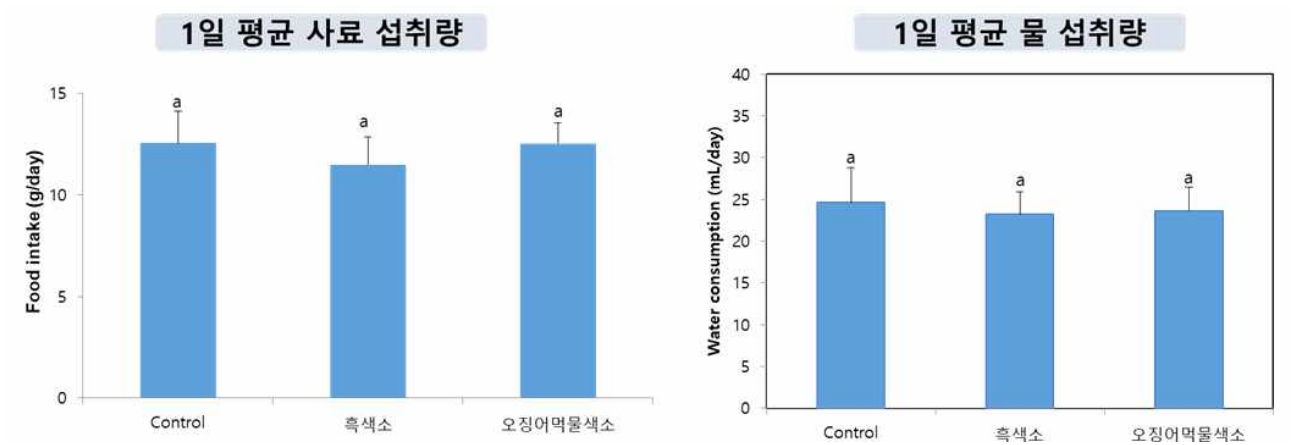
날짜	Day 12 (2020. 11. 25. 수)	Day 13 (2020. 11. 26. 목)
관찰 내용	특이 관찰사항 없음.	특이 관찰사항 없음.
Termamyl 처리 흑색소		
선그린 오징어 먹물색소		
1% CMC (Control)		

[그림 4-23] (계속)



[그림 4-24] 오징어먹물색소와 흑국 유래 흑색소의 경구투여하는 동안 쥐들의 몸무게 변화

- 대조군과 시험군을 14일간 경구투여하면서 쥐들의 몸무게 변화를 추적하여 그림 4-24에 제시하였다. 14일의 경구투여 기간 동안 대조군과 시험군이 투여된 쥐들의 몸무게 변화는 그룹간 유의적인 차이가 없었다.



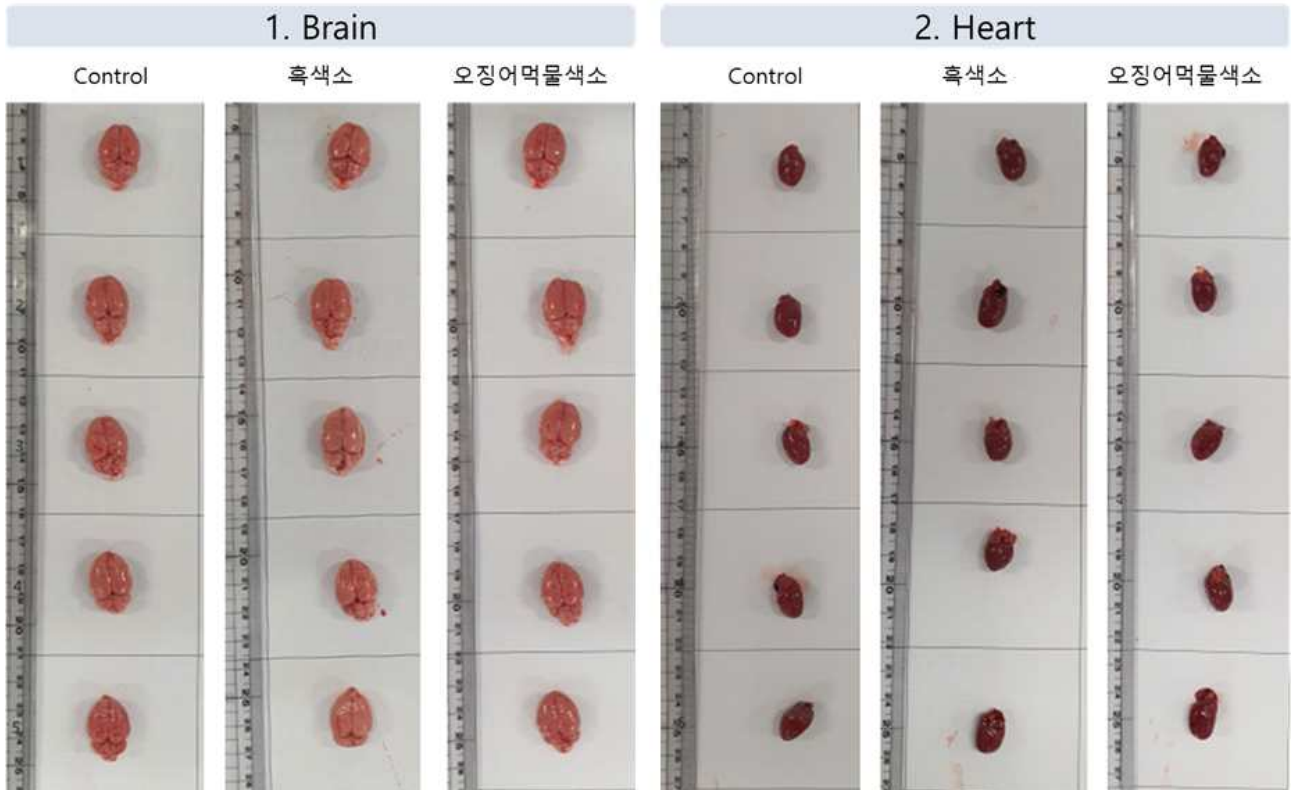
[그림 4-25] 오징어먹물색소와 흑국 유래 흑색소의 경구투여하는 동안 쥐들의 1일 평균 사료 섭취량과 1일 평균 물 섭취량

- 대조군과 시험군을 14일간 경구투여하면서 쥐들의 1일 평균 사료 섭취량과 1일 평균 물 섭취량을 추적하여 그림 4-25에 제시하였다. 14일의 경구투여 기간 동안 대조군과 시험군이 투여된 쥐들의 1일 평균 사료 섭취량과 1일 평균 물 섭취량의 차이는 유의적이지 않았다.

Organo-somatic index (%)				Organ weight (g)			
Organ	Control	시험군		Organ	Control	시험군	
		흑색소	오징어먹물색소			흑색소	오징어먹물색소
Brain	1.0±0.1 ^a	0.9±0.1 ^a	0.9±0.0 ^a	Brain	1.7±0.1 ^a	1.7±0.1 ^a	1.7±0.0 ^a
Heart	0.4±0.0 ^a	0.4±0.0 ^a	0.4±0.1 ^a	Heart	0.8±0.1 ^a	0.7±0.1 ^a	0.8±0.1 ^a
Kidney	0.9±0.0 ^a	0.8±0.1 ^a	0.9±0.1 ^a	Kidney	1.6±0.1 ^a	1.5±0.2 ^a	1.6±0.1 ^a
Liver	4.2±0.5 ^a	4.3±0.2 ^a	4.3±0.5 ^a	Liver	7.4±1.1 ^a	7.8±0.7 ^a	7.5±0.9 ^a
Lung	0.7±0.1 ^a	0.7±0.1 ^a	0.7±0.1 ^a	Lung	1.2±0.1 ^a	1.2±0.2 ^a	1.1±0.1 ^a
Ovary	0.1±0.0 ^a	0.1±0.0 ^a	0.1±0.0 ^a	Ovary	0.1±0.0 ^a	0.1±0.0 ^a	0.1±0.0 ^a
Spleen	0.4±0.0 ^a	0.3±0.0 ^{ab}	0.3±0.0 ^b	Spleen	0.6±0.1 ^a	0.5±0.1 ^a	0.6±0.0 ^a
Stomach	0.9±0.2 ^a	2.1±0.8 ^b	0.9±0.1 ^a	Stomach	1.7±0.4 ^a	3.8±1.3 ^b	1.5±0.2 ^a
Small intestine	3.7±0.3 ^a	5.0±0.6 ^b	3.3±0.3 ^a	Small intestine	6.5±0.8 ^a	9.0±1.6 ^b	5.7±0.5 ^a
Large intestine	1.3±0.2 ^a	1.7±0.4 ^a	1.4±0.1 ^a	Large intestine	2.4±0.5 ^a	3.1±0.9 ^a	2.4±0.4 ^a

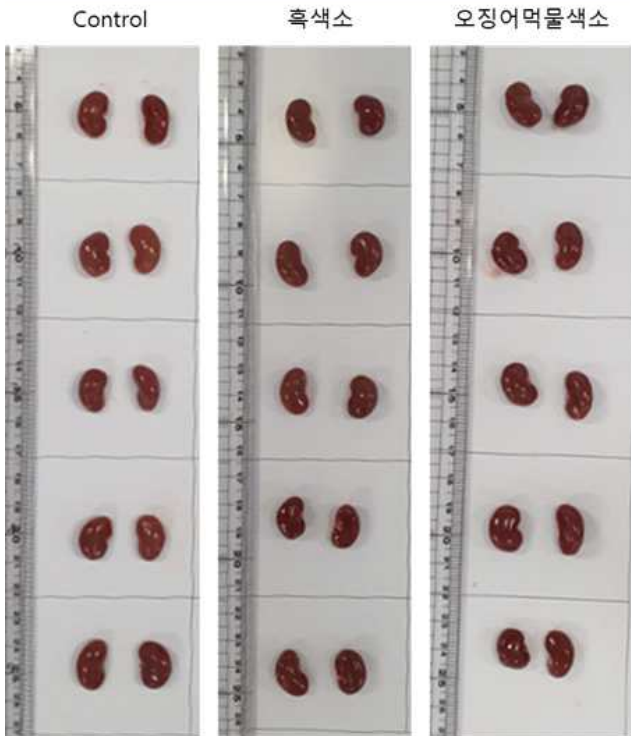
[그림 4-26] 오징어먹물색소와 흑국 유래 흑색소의 경구투여 후 organo-somatic index (%)와 organ weight

- 대조군과 시험군을 14일간 경구투여 후 쥐들의 organ index와 organ weight을 조사하여 그림 4-26에 제시하였다. 시험군에서 stomach와 small intestine이 대조군에 비해 증가한 것으로 나타났다. 위장관 관련 기관에 organ index와 organ weight에 유의적인 차이가 있으나, 흑국색소의 경우 특히 완전히 분산이 어려워 이로 인한 영향으로 보인다. Spleen의 경우 편차가 작아 통계처리 결과가 유의적인 차이를 나타내는 것으로 보이나, 독성학적인 의미는 없는 것으로 판단된다. 또한 쥐들의 주요 장기를 육안검사하였을 때 특이사항이 발견되지 않았다(그림 4-27).

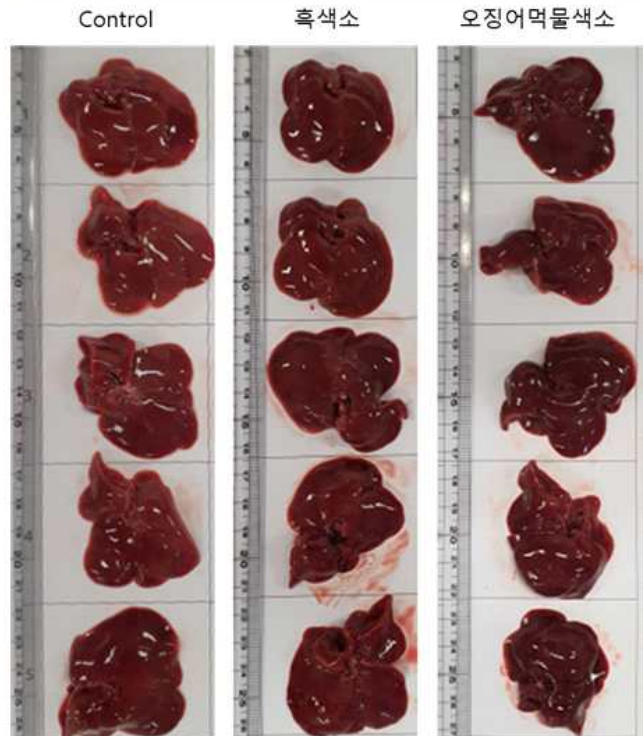


[그림 4-27] 오징어먹물색소와 흑국 유래 흑색소의 경구투여 후 주요 장기들의 육안검사

3. Kidney



4. Liver



5. Lung



6. Ovary

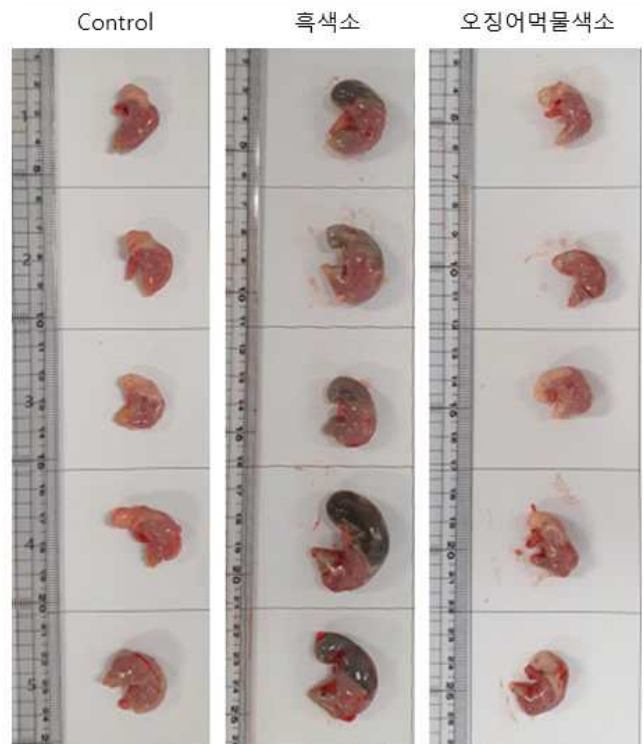


[그림 4-27] (계속)

7. Spleen



8. Stomach



7. Small intestine



8. Large Intestine



[그림 4-27] (계속)

- 대조군과 시험군을 14일간 경구투여 후 쥐들의 혈액학적 분석을 수행하여 표 4-6에 제시하였다. 흑국색소 투여군에서 mean cell hemoglobin concentration (MCHC)가 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으나 대조군과 오징어먹물색소와 그 차이가 미미하고, MCHC와 관련된 MCH의 수치가 정상적이고 다른 수치들은 모두 정상범위에 있으므로 독성학적 의미는 없는 것으로 판단된다. 따라서 모든 분석결과를 종합적으로 평가할 때 흑국색소의 독성영향은 관찰되지 않았다.

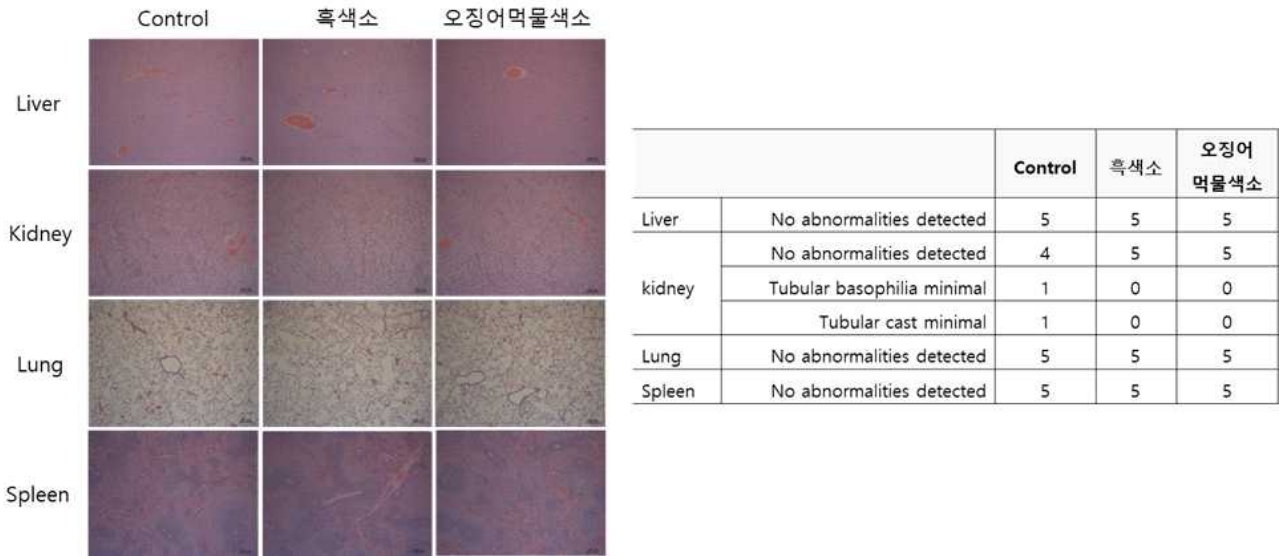
[표 4-6] 오징어먹물색소와 흑국 유래 흑색소의 경구투여 후 혈액학적 분석 결과

관련 인자	항목	Unit	Control	흑색소	오징어먹물색소
백혈구	Total leucocyte count (WBC)	(10 ³ /μL)	7.7±1.7	7.9±0.8	7.7±1.2
	WBC differential counting (%)	Neutrophils (NE)	12.5±3.7	10.7±2.4	10.5±4.4
		Lymphocytes (LY)	77.7±7.5	81.7±3.8	82.1±5.0
		Monocytes (MO)	2.5±1.1	2.1±0.6	2.0±0.7
		Eosinophils (EO)	4.0±4.6	1.7±0.8	1.4±0.4
	Basophils (BA)	2.1±0.6	2.1±0.7	2.3±0.8	
적혈구	Total erythrocyte count (RBC)	(10 ⁶ /μL)	7.4±0.4	7.3±0.22	7.4±0.1
	Hemoglobin concentration (Hb)	(g/dL)	14.8±0.7	14.1±0.6	14.3±0.3
	Hematocrit(Hct)	(%)	46.5 ± 2.1	47.0±1.5	46.3±1.1
	Mean cell volume (MCV)	(fL)	62.9±1.6	64.4±1.4	62.8±1.4
	Mean cell hemoglobin (MCH)	(pg)	19.9±0.7	19.2±0.4	19.4±0.4
	Mean cell hemoglobin Concentration (MCHC)	(g/dL)	31.7±0.9	29.9±0.8*	31.0±1.0
	Reticulocyte (RETIC)	(%)	3.14±0.3	3.8±0.9	3.7±0.5
혈소판	Platelet (PLT)	(10 ³ /μL)	1137±138	988± 24	1016±260
혈액응고	Prothrombin time (PT)	(sec)	11.8±2.1	10.9±0.2	12.1±0.4
	Activated partial thrombo- plastin time (APTT)	(sec)	40.7±9.8	40.4±6.5	48.9±6.5

[표 4-7] 오징어먹물색소와 흑국 유래 흑색소의 경구투여 후 혈청생화학적 분석 결과

관련 인자	항목	Unit	Control	흑색소	오징어먹물색소
단백질	Total protein (TP)	(g/dL)	6.6 ± 0.1	6.3 ± 0.1*	6.5 ± 0.2
	Albumin (ALB)	(g/dL)	4.7 ± 0.1	4.7 ± 0.1	4.7 ± 0.1
	A/G ratio(A/G)	-	2.5 ± 0.1	2.8 ± 0.2	2.6 ± 0.2
간 기능	Total bilirubin (T-BIL)	(mg/dL)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Alkaline phosphatase(ALP)	(U/L)	695 ± 150	1734 ± 441**	651 ± 203
	Aspartate aminotransferase(AST)	(U/L)	77 ± 6	77 ± 6	80 ± 7
	Alanine aminotransferase(ALT)	(U/L)	41 ± 4	51 ± 10	43 ± 8
신장 기능	Creatinine (CREA)	(mg/dL)	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0
	Blood urea nitrogen (BUN)	(mg/dL)	19.9 ± 1.0	17.3 ± 2.1	16.6 ± 1.5*
지방	Total cholesterol (CHOL)	(mg/dL)	144 ± 9	91 ± 10**	115 ± 7
	Triglycerides (TG)	(mg/dL)	56 ± 10	60 ± 17	79 ± 22
당	Glucose (GLU)	(mg/dL)	282 ± 47	266 ± 56	273 ± 32
전해질	Calcium (Ca)	(mg/dL)	12.8 ± 0.4	12.3 ± 0.4	12.4 ± 0.3
	Inorganic phosphorus (IP)	(mg/dL)	11.1 ± 0.4	11.0 ± 1.0	11.0 ± 0.3
	Sodium (Na ⁺)	(mmol/L)	146.3 ± 0.7	148.1 ± 0.6*	148.0 ± 0.9
	Potassium (K ⁺)	(mmol/L)	6.1 ± 0.2	6.0 ± 0.5	5.7 ± 0.2
	Chloride (Cl ⁻)	(mmol/L)	95.2 ± 1.8	97.4 ± 1.0*	96.5 ± 0.5
근육 손상	Creatine kinase (CK)	(IU/L)	226 ± 55	157 ± 21	216 ± 48

- 대조군과 시험군을 14일간 경구투여 후 쥐들의 혈청생화학적 분석을 수행하여 표 4-7에 제시하였다. 흑국색소 투여군에서 TP와 CHOL이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였고, ALP, Na 및 Cl이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다. 오징어먹물색소 투여군에서는 BUN이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다. TP, CHOL 및 ALP는 간기능, Na, Cl 및 BUN은 신장 기능과 관련된 인자로서 이들의 유의적인 증감은 조직병리학적 검사 결과를 고려할 때, 시험물질 투여에 의한 독성학적 영향으로 사료되지 않는다.



[그림 4-28] 오징어먹물색소와 흑국 유래 흑색소의 경구투여 후 조직병리학적 검사 결과

- 대조군과 시험군을 14일간 경구투여 후 쥐들의 조직병리학적 검사를 수행하여 그림 4-28에 제시하였다. 간, 신장, 폐, 비장의 조직병리학적 검사 결과, 대조군과 비교하여 시험군에서 시험물질 투여와 관련된 독성학적 변화는 관찰되지 않았다. 대조군의 신장에서 관찰된 세뇨관의 호염기화 및 세뇨관내 원주는 일반적인 반복시험에서 관찰 가능한 배경병변으로 판단된다. 결론적으로 흑국색소와 오징어먹물색소를 랫드에 14일간 반복 경구 투여한 결과 혈액과 간, 신장, 폐, 비장에서 시험물질 투여와 관련된 독성학적 변화는 관찰되지 않았다.

3. 요약 및 결론

- 흑국으로부터 제조된 흑국 유래 흑 색소는 조단백질 함량이 가장 높았는데, 이는 흑 색소를 구성하고 있는 질소성분 때문이다. 유리당은 포도당만 존재하였고, 오징어먹물색소와 흑국 색소에는 미량 함유되어 있었다. 유기산은 정량되지 않았다.
- 수분용해지수는 캐러멜색소가 대부분 용해되어 제일 높았으며, 오징어먹물색소, 흑국색소의 순서로 증가하였다. 수분흡수지수는 캐러멜색소는 유의적으로 측정되지 않았으며, 오징어먹물색소, 흑국색소의 순서로 증가하였고, 흑국색소는 수분흡수력이 가장 적었다.
- 용해도는 열처리에 의해 오징어먹물색소에서 증가하였지만 흑국색소에서는 미미한 증가를 나타내었다. 색 특성은 흑국색소가 오징어먹물색소보다 더욱 강한 흑색을 나타내었다.
- 오징어먹물색소와 용액추출법에 의한 용액흑국색소는 광, 온도, 단순당류, pH 5-8 범위에서 안정하였으나, pH 3-4 범위, 유기산(호박산, 구연산), 다가금속이온에 있어 불안정하였다. 그러나 이것은 이들 조건에서 침전물을 형성하였기 때문이며, 침전물의 색은 여전히 흑색을 나타내고 있어 이들이 흑색의 변색이나 탈색에 영향을 미친다고 말할 수는 없었다.
- 효소정제법에 의한 효소흑국색소는 자외선과 다가금속이온에 안정하였으나 온도, 단순당류, 산도, 유기산에 대해 저장기간에 따라 감소하였다.
- 저장기간에 따른 안정성은 25℃와 50℃에서 2개월까지 저장한 경우 여전히 안정한 상태를 유지하였다. 현재도 계속해서 측정하고 있는 중이다.
- 흑국색소는 밀가루에 균일하게 섞이지 않아 가공공정 처리에 대한 안정성 조사를 수행하지 못하였다. 오징어먹물색소는 삶기, 굽기, 유탕처리 공정을 거쳐도 탈색이나 변색이 일어나지 않았다.
- 효소정제법에 의한 흑국 유래 흑 색소와 시판되는 오징어먹물색소를 랫드에 14일간 반복 경구 투여한 결과 혈액과 간, 신장, 폐, 비장에서 시험물질 투여와 관련된 독성학적 변화는 관찰되지 않았다. 따라서 본 과제에서 개발된 흑국 유래 흑 색소는 안전하였다.

제5절. 흑국 유래 흑 색소의 가공식품 적용가능성 평가

1. 연구방법

가. 재료

(1) 흑국 유래 흑 색소

- 주관연구기관에서 대량생산하여 제품화한 흑국 유래 흑 색소의 분말제품과 액상(농축액)제품들을 공급받아 사용하였다. 흑국 유래 흑 색소는 분말제품을 분말흑국색소로, 액상(농축액)제품을 액상흑국색소로 명명하여 구분하였다. 대조군으로 오징어먹물색소를 사용하였다.

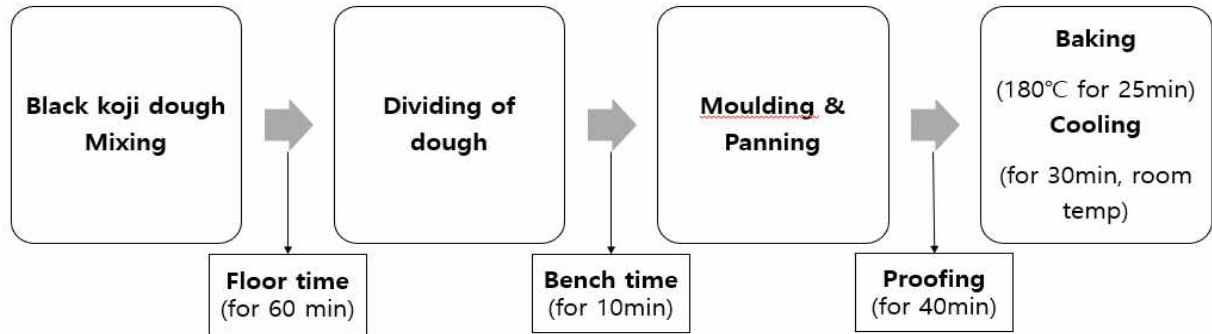
(2) 기타 재료

- 식품제조를 위한 원료들은 시중 마트에서 구입하여 사용하였으며, 이외의 분석에 사용된 시약 및 용매들은 ACS 등급 이상의 것을 사용하였다.

나. 식빵에 대한 흑국 유래 흑 색소의 적용

(1) 식빵의 제조

- 식빵의 제조는 Finny 등(1984)의 방법을 일부 변형하여 직접반죽법으로 제조하였다. 사용된 재료의 배합비율은 표 5-1에 제시하였고, 식빵의 제조 공정은 그림 5-1에 나타내었다. 흑국 색소와 다른 재료들을 버티컬 믹서(Spar mixer, EGS)를 이용하여 혼합하여 반죽을 형성하고 글루텐을 충분히 형성시킨 후 60분 동안 1차 발효를 하였다. 1차 발효 후 반죽을 150 g씩 분할하여 둥글리기하고 10분간 상온에서 중간 발효를 하였다. 중간발효가 끝난 후 가스빼기하여 성형하고, 빵틀에 넣어 40분간 2차 발효를 하였다. 2차 발효가 끝난 반죽은 윗불 200℃, 아랫불 180℃로 예열된 오븐(Electric deck oven, NSO-96)에서 25분간 굽고, 상온(25℃)에서 30분간 냉각시킨 후 시료로 사용하였다.



[그림 5-1] 흑색 식빵의 제조 공정 흐름도

[표 5-1] 흑색 식빵의 배합비

Ingredient	Formulation (g)					
	Control bread (squid ink)	BK1	BK3	BK5	BK7	BK9
Wheat flour	237.5	247.5	242.5	237.5	232.5	227.5
Colorant	12.5	2.5	7.5	12.5	17.5	22.5
Butter	35	35	35	35	35	35
Water	120	120	120	120	120	120
Sugar	25	25	25	25	25	25
Yeast	10	10	10	10	10	10
Salt	3	3	3	3	3	3
Egg	50	50	50	50	50	50
Total	493	493	493	493	493	493

(2) 식빵의 색도

- 제빵 후 실온에 30분간 냉각시키고 식빵의 중앙부분을 3 cm × 2 cm의 직사각형으로 성형하였다. 색도는 색차계를 이용하여 Hunter's color system에 따라 명도(L, lightness), 적색도(a, redness)와 황색도(b, yellowness)를 측정하였다. 표준백판의 명도, 적색도와 황색도는 각각 98.71, -0.621와 0.718이었다.

(3) 반죽의 팽창력

- 식빵 반죽의 발효 시 팽창력은 반죽 100 g을 취해 500 mL의 메스실린더에 담은 후 25℃, 상대습도 80±5%인 조건에서 15분 간격으로 120분까지 반죽의 부피변화를 측정하여 증가한 부피에서 초기 부피의 값을 뺀 값을 나타내었다.

(4) 비용적 및 굽기 손실 측정

- 흑국색소 첨가량에 따른 의 부피는 제빵 후 상온(25℃)에서 30분간 냉각한 뒤 종자치환법(AACC법 72-10 1983)을 이용하여 측정하고 비용적(mL/g)으로 나타내었다.
- 식빵의 굽기 손실 측정은 제빵 후 상온(25℃)에서 30분간 냉각 한 뒤 굽기 전의 중량과 구운 후의 중량 차이를 이용하여 굽기 손실률(%)을 계산하였다.

$$\text{팽창률}(\%, \leq \text{avening rate}) = \left(\frac{\text{굽기 전후의 실험군 식빵의 중량차}(g)}{\text{굽기 전후의 대조군 식빵의 중량차}(g)} \right) \times 100$$

$$\text{손실율}(\%, \text{loss rate}) = \frac{\text{굽기 전후의 식빵 한개의 중량차}(g)}{\text{굽기 전 반죽 한개의 중량}(g)} \times 100$$

(5) 식빵의 기계적 물성 측정

- 식빵의 조직감은 rheometer (Model. CR-100D, Sun Scientific Co., LTD. Japan)을 이용하여 경도(hardness), 응집성(cohesiveness), 탄력성(springiness), 점착성(gumminess), 및 부서짐성(brittleness)을 측정하였다.

[표 5-2] 텍스처 프로파일(Texture profile) 분석을 위한 측정조건

Sample height	10 mm
Sample size	3 x 3 x 2 cm
Table speed	30 cm/min
Compression rate	50% strain
Load head	2 kg _f
Hold space	10 mm
Test type	Mastication
Adapter type	Quadrangle
Adapter area	2.5cm

다. 제면에 대한 흑국 유래 흑 색소의 적용

(1) 흑국색소 제면

- 표준면의 제조는 밀가루 100 g에 소금 2 g (2%)을 녹인 물 40 mL를 가하고 실온에서 15분간 반죽하였다. 면대형성을 향상시키기 위하여 60분간 휴지시킨 후 수동식 제면기에 의하여 면대를 만들어 두께 1 mm, 너비 1.5 mm의 면선으로 절단하여 20℃에서 풍건하여 시료(control)로 하였다. 흑국색소를 적용한 면은 대조군과 동일한 원료에 흑국색소를 밀가루 무게의 1~9%함량이 되도록 첨가한 후 표준면과 같은 방법으로 시료를 제조하였다.

(2) 면의 조리실험

- 흑국색소면 25 g을 끓는 물(증류수) 600 mL에 넣고 표준면(S0)의 삶은 시간과 동일하게 삶은 후 면의 중량, 부피, 조리면의 함수율, 국물의 탁도 등을 측정하였다.

(가) 삶은 면의 중량

- 삶은 국수를 1분간 흐르는 물에 냉각시킨 후 철망에서 1분간 방치하여 중량을 측정하였다.

(나) 삶은 면의 부피

- 물을 뺀 국수를 일정량의 물을 채운 mess-cylinder에 담가 증가하는 물의 부피를 측정하여 국수의 부피로 하였다.

(다) 조리면의 함수율

$$\text{Water absorption}(\%) = \frac{\text{조리후의 국수의 중량}(W_1) - \text{건면의 중량}(W_0)}{\text{건면의 중량}(W_0)}$$

(라) 삶은 국물의 탁도

- 용출된 고형물의 정도를 나타내는 수치로서 면을 삶아낸 국물을 전체 1,000 mL로 하여 실온에서 냉각 한 후 spectrophotometer로 675nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

라. 아이스크림에 대한 흑국 유래 흑 색소의 적용

(1) 흑국색소 아이스크림 제조

- 흑국색소는 아이스크림 믹스 중량에 대해 1, 3, 5, 7, 9%를 첨가한 것을 실험군으로 하였고, 오징어먹물색소를 첨가한 아이스크림을 대조군으로 하였다. 먼저 계량된 아이스크림 믹스를 넣고 흑국색소의 미리 결정된 함량에 따라 가한 후 2분간 혼합하였다. 이후 아이스크림 믹스를 63℃에서 10분간 저온살균처리한 후 4℃가 되었을 때 핸드 블랜더로 다시 2분간 혼합한 뒤 아이스크림 제조기에 넣고 약 30분간 동결 교반하여 아이스크림 제조하였다.

(2) 아이스크림의 색 특성

- 제조된 아이스크림을 분체용 페트리디쉬에 2 cm 두께로 담아 색차계를 이용하여 Hunter's color system에 따라 명도(L, lightness), 적색도(a, redness)와 황색도(b, yellowness)를 측정하였다. 표준백판의 명도, 적색도와 황색도는 각각 98.71, -0.621와 0.718이었다.

(3) 아이스크림의 증량율(Over run) 측정

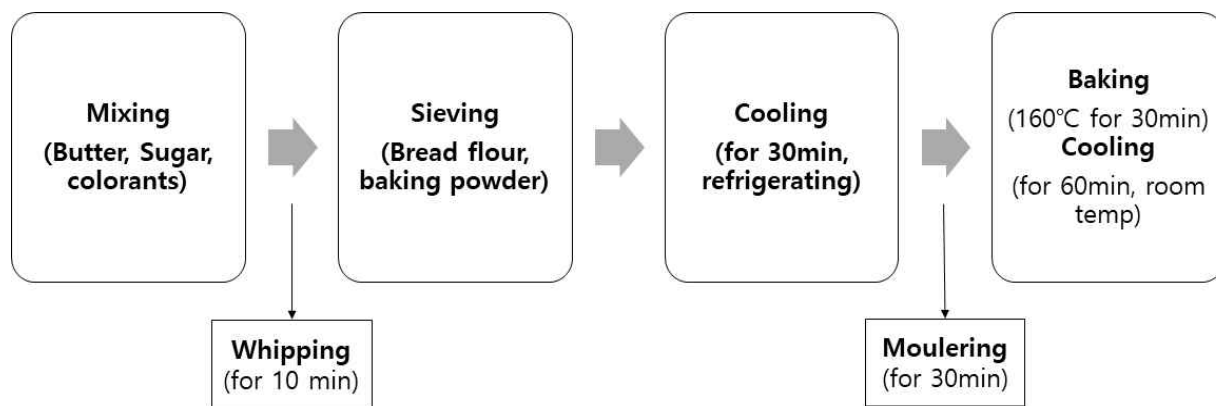
- 아이스크림 제조기를 30분간 작동하면서 5분 간격으로 제조기에서 꺼낸 후, 65 g 용량의 동일한 부피인 투명 컵에 담아 무게를 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{증량율(\%)} = \frac{\text{아이스크림 믹스의 무게} - \text{완성 아이스크림 무게}}{\text{완성 아이스크림의 무게}} \times 100$$

마. 제과에 대한 흑국 유래 흑 색소의 적용

(1) 흑국색소 쿠키 제조

- 쿠키의 반죽은 반죽기를 이용하여 실온에서 한 시간 정도 방치한 버터에 속도 3에서 서서히 30초간 풀어준 다음, 설탕을 넣어 6의 속도로 2분간 크림 상태로 믹싱 한 후 소금을 넣고 흑국색소 분말 혹은 농축액을 넣으면서 다시 6의 속도로 2 분간 반죽 하였다. 체질한 밀가루, 베이킹파우더를 넣어 반죽을 완성한 후, 30분 동안 냉장 휴지 후, 두께 0.5cm로 밀어 편 후 지름 3 cm 쿠키틀로 찍은 후 160에서 30분간 구워낸 후 상온에서 1시간 냉각 한다 (그림 5-2).



[그림 5-2] 흑국색소 쿠키 제조과정

[표 5-3] 흑국색소(분말) 쿠키 배합비

Ingredients	Control cookie (Squid ink)	BKS1	BKS2	BKS3	BKS4
Bread flour	90 g	95 g	90 g	85 g	80 g
Salt	2 g	2 g	2 g	2 g	2 g
colorants	10 g	5 g	10 g	15 g	20 g
Butter	50 g	50 g	50 g	50 g	50 g
Sugar	50 g	50 g	50 g	50 g	50 g
Baking powder	3 g	3 g	3 g	3 g	3 g
Total	205 g	205 g	205 g	205 g	205 g

[표 5-4] 흑국색소(농축액) 쿠키 배합비

Ingredients	Control cookie (Squid ink)	BKL1	BKL2	BKL3	BKL4
Bread flour	90 g	87.5 g	75 g	62.5 g	50 g
Salt	2 g	2 g	2 g	2 g	2 g
colorants	10 g	5 g	10 g	15 g	20 g
Butter	50 g	50 g	50 g	50 g	50 g
Sugar	50 g	50 g	50 g	50 g	50 g
Baking powder	3 g	3 g	3 g	3 g	3 g
Total	205 g	205 g	205 g	205 g	205 g

(2) 흑국색소쿠키 색도

- 흑국색소 쿠키의 색도는 색차계(CIE Lab color)를 이용하여 제빵 후 실온에 30분간 냉각시키고 원형 (cm x cm)으로 잘라 측정하였다. L(lightness), a(redness), b(yellowness) 값을 측정하였으며, 표준색판으로는 백판(L=98.71, a=0.178, b= -0.621)을 사용하였다.

(3) Rheometer에 의한 기계적 물성 측정

- 쿠키의 조직감은 rheometer(Model. CR-100D, Sun Scientific Co., LTD. Japan)로 측정하여 경도(hardness) 값을 나타내었다. Hardness는 그래프 중 최고 피크를 기준으로 하였으며 각 실험군별로 5회 반복하여 측정한 값의 평균값으로 나타내었다. 시료는 3.0 x 3.0 x 0.5 cm으로 측정하였다.

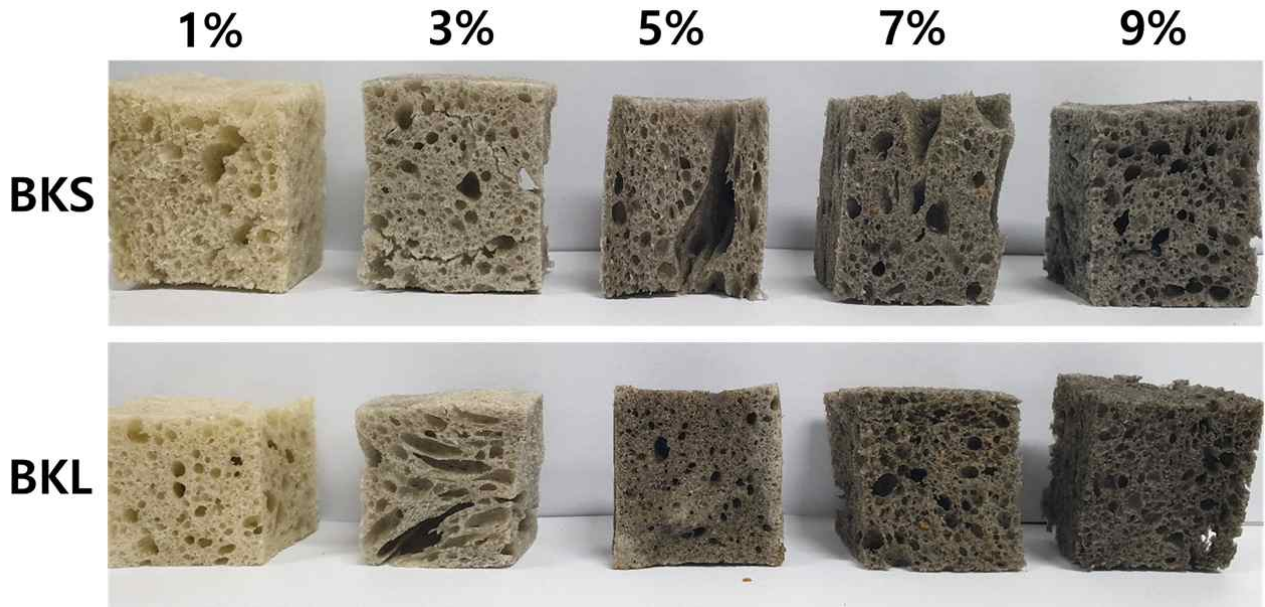
(4) 흑국색소쿠키 반죽의 pH

- pH는 반죽 5g에 증류수 45mL를 넣고, 충분히 교반시킨 후 pH meter로 상온에서 측정하였으며, 반죽의 밀도(g/mL)는 50mL 메스실린더에 물 40mL를 넣은 후 5g 반죽을 넣었을 때 늘어난 부피와 반죽의 무게로부터 구하였다.

2. 연구결과

가. 흑국색소의 식빵에 대한 적용가능성

- 흑국색소를 첨가한 식빵의 속의 색을 관찰하여 그림 5-3에 제시하였다. 흑국색소분말과 흑국색소농축액의 첨가량이 증가할수록 식빵 속의 검은색 강도는 증가하였다. 또한 흑국색소분말보다는 흑국색소농축액이 주어진 첨가량에서 식빵 속의 검은색 강도가 더욱 강하였다. 식빵의 경우 시판중인 오징어떡물 식빵의 속의 검은색과 유사해지기 위해서는 흑국색소분말 및 흑국색소농축액의 첨가량을 9% 이상으로 하여야 할 것으로 판단된다.
- 흑국색소 첨가한 식빵 반죽의 pH는 5.44~5.48의 범위를 나타내었고, 흑국색소분말과 흑국색소농축액 사이에는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 즉 흑국색소 첨가는 식빵 반죽의 pH에 영향을 미치지 않았고, 이는 효모의 발효에 영향을 미치지 않는다는 것을 의미한다.



[그림 5-3] 흑국색소분말(BKS)와 흑국색소농축액(BKL)을 첨가한 식빵 속의 색 특성

- 흑국색소 첨가한 식빵의 굽기손실률은 흑국색소분말의 첨가량이 증가할수록 감소하는 경향을 나타내었으나 흑국색소농축액의 첨가량이 증가하면서 증가하는 경향을 나타내었다(표 5-5). 또한 흑국색소농축액 첨가군이 흑국색소분말 첨가군보다 약 2배 이상 낮은 굽기손실률을 나타내었다. 식빵의 경도는 흑국색소분말과 흑국색소농축액의 첨가량이 증가할수록 증가하는 양상을 나타내었으나 흑국색소농축액 첨가군이 흑국색소분말보다 유의적으로 낮은 경도를 나타내었다(표 5-5).

[표 5-5] 흑국색소분말(BKS)와 흑국색소농축액(BKL)을 첨가한 식빵의 pH, 굽기손실률과 경도

Sample		pH	Baking loss (%)	Firmness (kN/m ²)
BKS	1%	5.45±0.01	33.95	10.42
	3%	5.47±0.01	23.13	10.40
	5%	5.46±0.01	26.13	46.07
	7%	5.48±0.01	20.67	60.83
	9%	5.45±0.01	22.81	76.58
BKL	1%	5.45±0.03	11.98	18.34
	3%	5.46±0.01	12.34	19.53
	5%	5.46±0.01	11.94	25.89
	7%	5.44±0.01	12.86	22.57
	9%	5.45±0.01	13.32	12.99

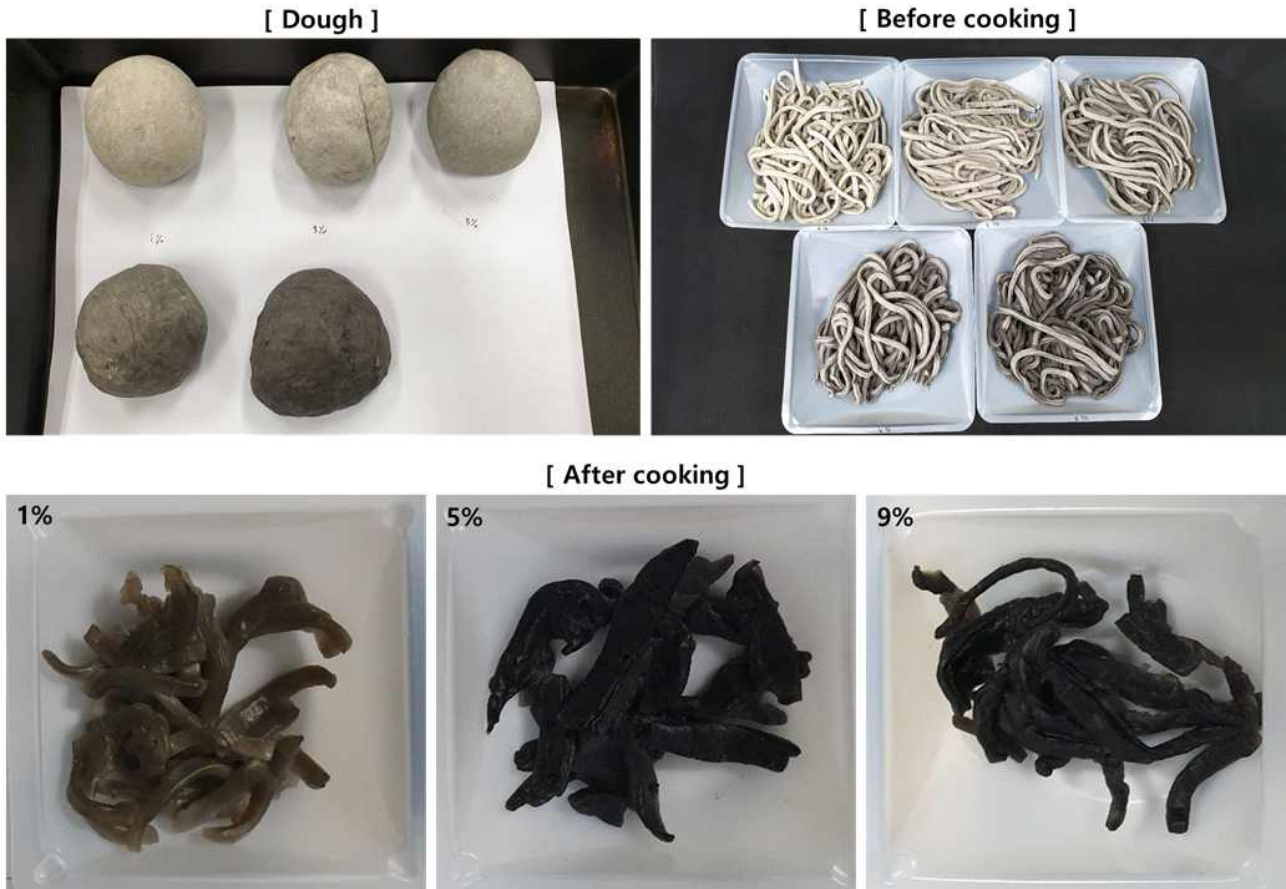
나. 흑국색소의 제면에 대한 적용가능성

- 흑국색소분말과 흑국색소농축액을 첨가하여 제조한 면 반죽과 조리전후의 면의 외관을 각각 그림 5-4와 그림 5-5에 제시하였다. 흑국색소분말을 첨가한 면의 경우(그림 5-4), 흑국색소분말의 첨가량이 증가할수록 반죽과 조리전 면의 검은색 강도가 증가하는 것을 볼 수 있었다. 그러나 조리전 면의 경우 검은색으로 착색된 것이 7% 첨가군인 것만 같이 보이지만, 이 면들을 조리하면 흑국색소분말 3% 첨가군부터 면의 색이 진한 검은색으로 착색된 것을 알 수 있다.



[그림 5-4] 흑국색소분말을 첨가하여 제면한 반죽과 조리전후의 면

- 흑국색소농축액을 첨가한 면 반죽과 제면 후 조리전후의 면의 외관은 그림 5-5에 제시하였다. 흑국색소분말을 첨가한 것과 같이 반죽의 검은색이 흑국색소농축액의 첨가량이 증가하면서 강해졌지만 제면한 조리 전 면은 마치 불완전하게 검은색으로 착색된 것처럼 보인다. 그러나 이 또한 조리 후에는 흑국색소농축액 5% 첨가군부터 면이 강한 검은색으로 착색된 것을 알 수 있었다.

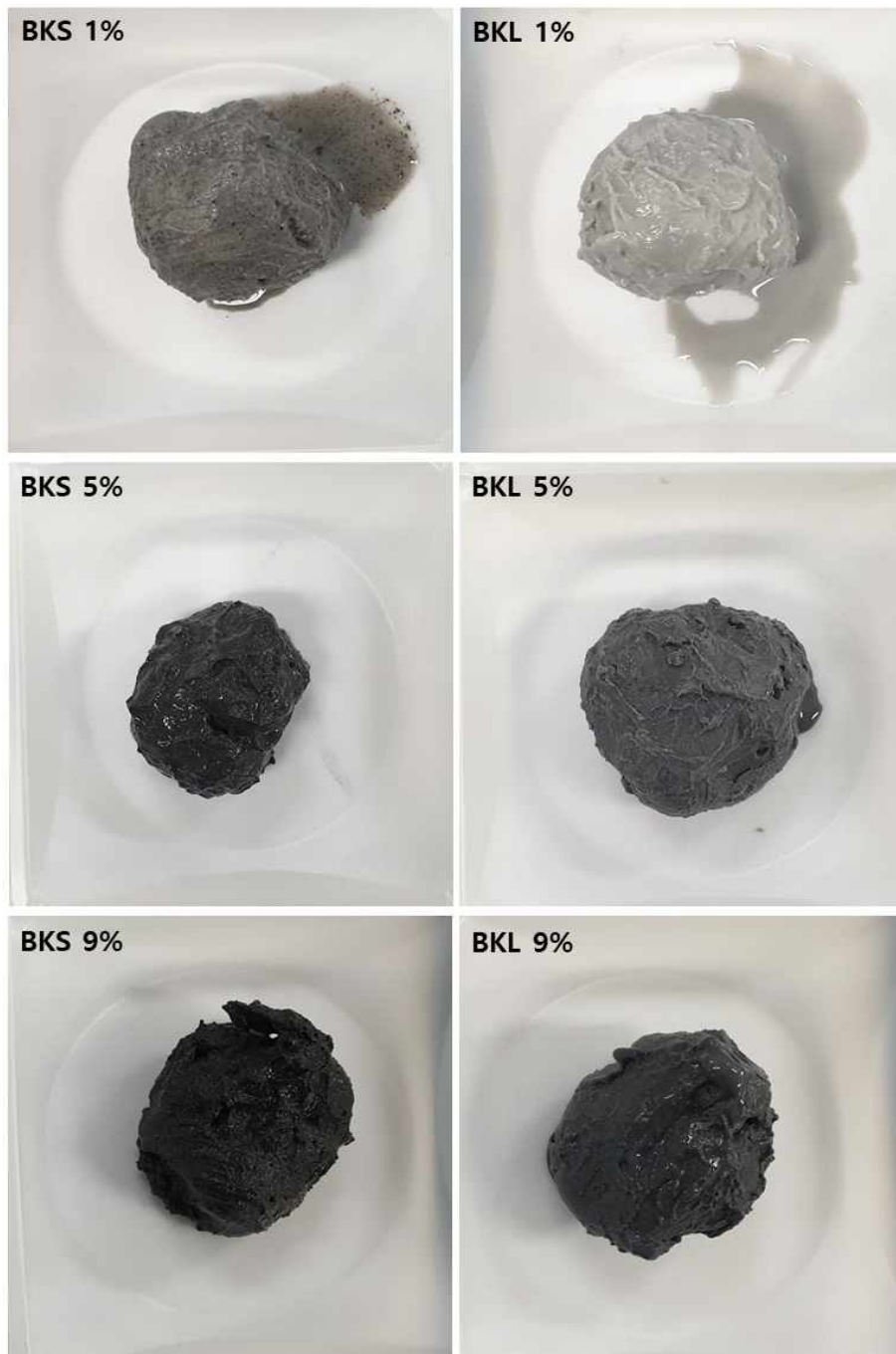


[그림 5-5] 흑국색소농축액을 첨가하여 제면한 반죽과 조리전후의 면

[표 5-6] 흑국색소분말(BKS)와 흑국색소농축액(BKL)을 첨가한 면의 함수율, 삶은 면의 부피와 국물의 탁도

Sample		Water absorption (%)	Volume after cooking (mL)	Turbidity
BKS	1%	84.20	39	0.212
	3%	84.19	40	0.261
	5%	69.99	38	0.349
	7%	58.22	35	0.439
	9%	54.81	34	0.789
BKL	1%	69.94	37	0.185
	3%	79.70	39	0.208
	5%	69.63	35	0.247
	7%	62.31	35	0.293
	9%	45.05	32	0.367

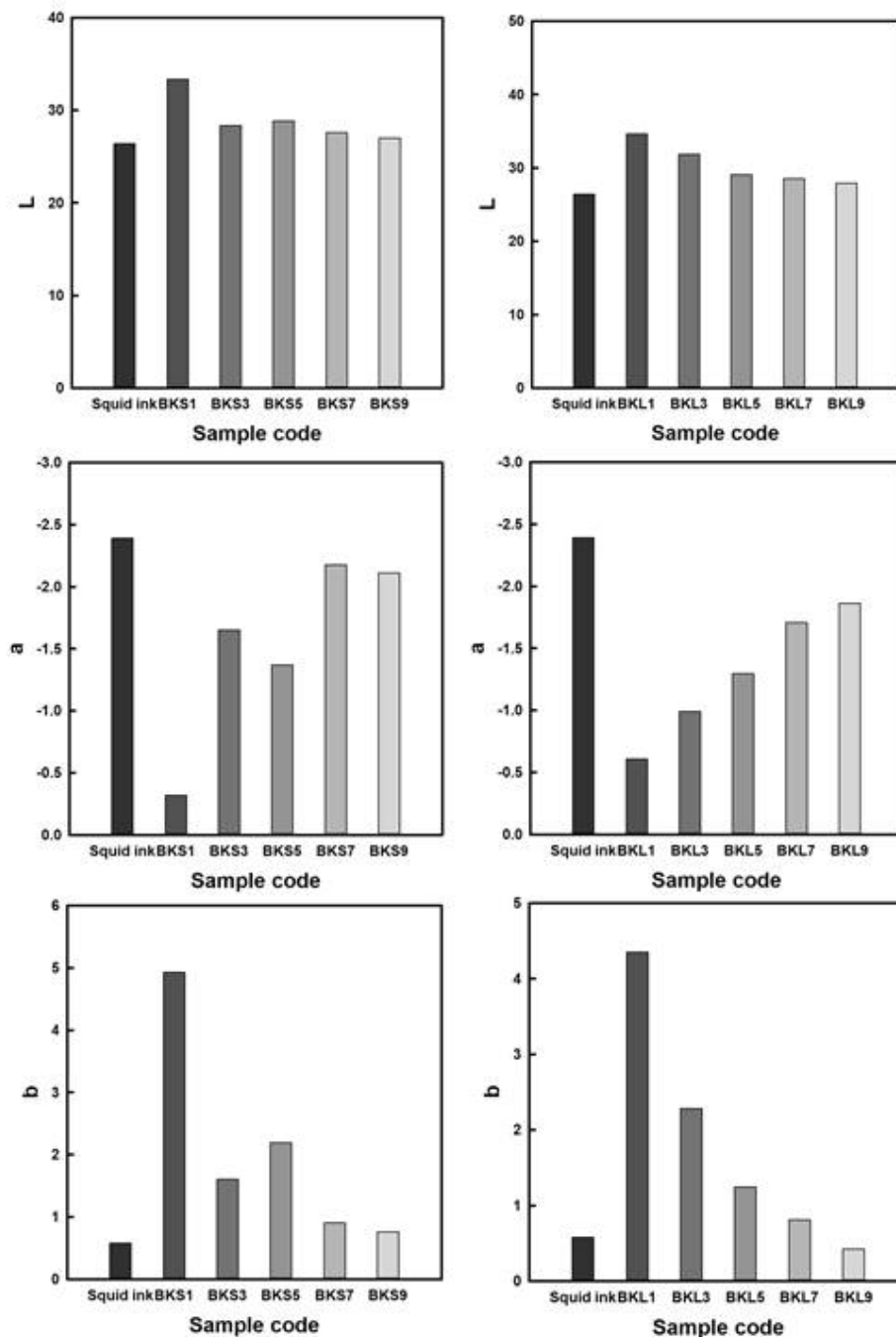
- 흑국색소분말과 흑국색소농축액을 첨가하여 제조한 면의 함수율, 삶은 면의 부피와 국물의 탁도를 표 5-6에 제시하였다. 흑국색소 첨가 면의 함수율은 흑국색소의 첨가량이 증가하면서 감소하였다. 함수율은 흑국색소분말과 흑국색소농축액 첨가군들 모두에서 동일한 경향을 나타내었다. 삶은 면의 부피는 흑국색소 첨가량이 증가하면서 감소하는 경향을 나타내었고, 흑국색소분말과 흑국색소농축액 첨가군들 모두에서 동일한 경향이 관찰되었다. 흑국색소 첨가 면의 조리 후 국물의 탁도는 흑국색소 첨가량이 증가할수록 탁도가 증가하였으며, 흑국색소분말을 첨가한 면에서 흑국색소농축액을 첨가한 것보다 더욱 진한 탁도를 나타내었다.



[그림 5-6] 흑국색소분말(BKS)과 흑국색소농축액(BKL)을 첨가한 아이스크림의 외관

다. 흑국색소의 아이스크림에 대한 적용가능성

- 흑국색소분말과 흑국색소농축액 제품들을 첨가하여 제조한 아이스크림의 외관을 그림 5-6에 제시하였다. 흑국색소의 첨가량 5%부터 아이스크림이 검은색을 나타내기 시작하였으며, 첨가량이 증가할수록 검은색의 강도가 증가하는 것을 알 수 있다. 또한 흑국색소분말을 첨가한 아이스크림이 흑국색소농축액을 첨가한 것보다 검은색의 강도가 높았다. 이는 흑국색소를 구성하는 색소의 함량 차이인 것으로 판단된다.



[그림 5-7] 흑국색소분말(BKS)와 흑국색소농축액(BKL) 첨가 아이스크림의 색 특성

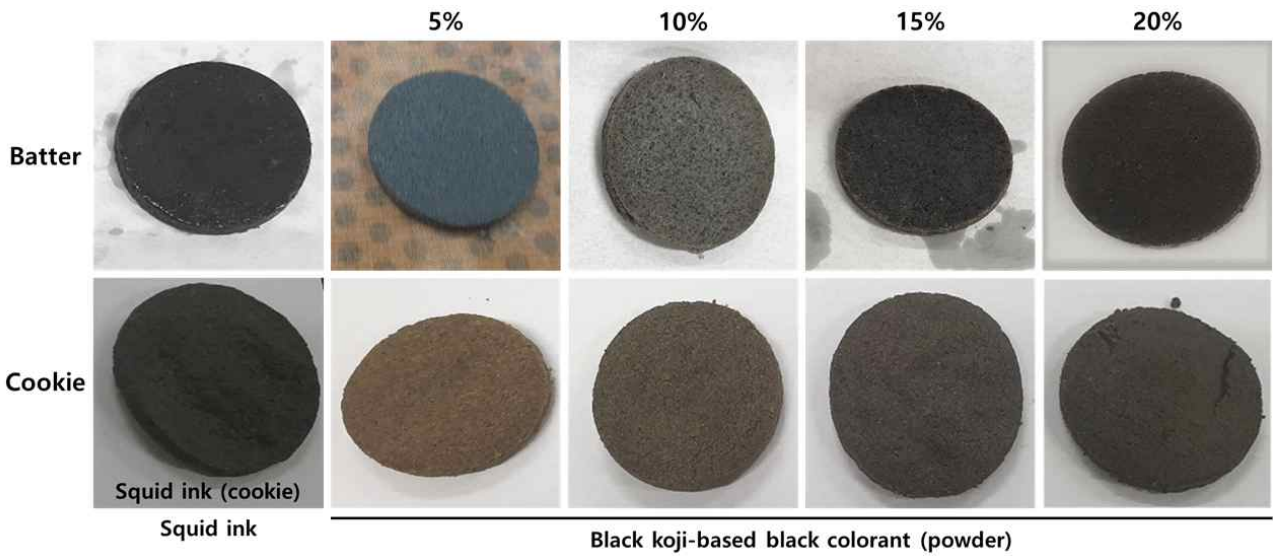
- 흑국색소를 아이스크림 믹스에 혼합하여 제조한 아이스크림의 색 특성을 그림 5-7에 제시하였다. 흑국색소의 첨가량이 증가할수록 아이스크림의 색은 점점 검은색으로 착색되었다. 아이스크림믹스 중량의 7%와 9%의 흑국색소를 첨가한 것이 오징어먹물색소 첨가 아이스크림과 유사한 색 특성을 나타내었다.
- 오징어먹물색소와 흑국색소를 첨가한 아이스크림의 증량률(overrun)을 측정하여 표 5-7에 제시하였다. 대조군인 오징어먹물색소를 첨가한 아이스크림의 증량률은 18.35% 이었다. 흑국색소를 첨가한 아이스크림의 증량률은 흑국색소의 첨가량이 증가할수록 증가하였고, 오징어먹물색소 아이스크림과 색이 유사한 흑국색소 5%와 9%를 첨가한 아이스크림의 증량률은 분말제품 첨가 시 각각 21.38%와 22.49%이었고, 농축액제품 첨가 시 22.89%와 23.06%이었다. 따라서 개발된 흑국색소 제품을 아이스크림에 첨가할 경우 아이스크림의 색을 흑색으로 착색하는 것 이외에도 아이스크림을 증량시키는 기능이 있는 것으로 판단된다.

[표 5-7] 흑국색소분말(BKS)와 흑국색소농축액(BKL) 첨가 아이스크림의 증량률

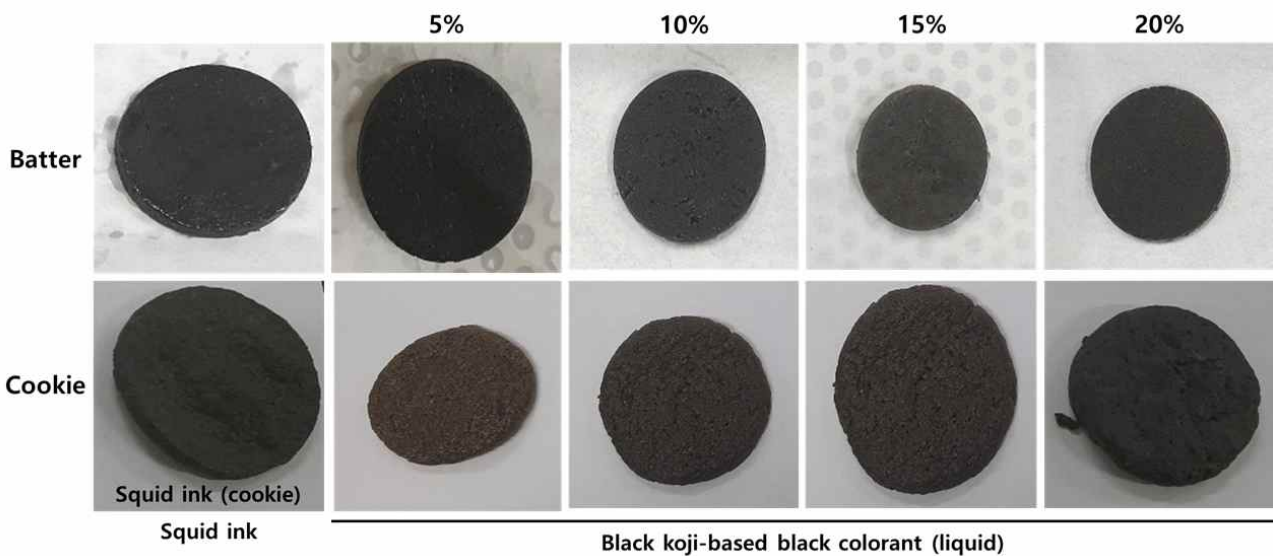
Sample	Overrun (%)	
	BKS	BKL
Squid ink	18.35	
Black koji colorant	1%	20.24
	5%	21.38
	9%	22.49
		22.89
		23.06

라. 흑국색소의 제과에 대한 적용가능성

- 흑국색소분말과 흑국색소농축액 제품들을 첨가하여 제조한 쿠키의 외관을 그림 5-8과 그림 5-9에 제시하였다. 흑국색소분말 첨가량 15%부터 쿠키는 검은색을 나타내기 시작하였으며, 20%에서 오징어먹물색소 쿠키와 유사한 검은색 강도를 나타내었다(그림 5-8). 반면 흑국색소농축액의 경우 10% 첨가량부터 검은색을 나타내기 시작하였으며, 첨가량이 증가할수록 검은색의 강도는 증가하였으며, 20% 첨가군에서 오징어먹물색소 쿠키와 동일한 외관을 관찰할 수 있었다. 이는 흑국색소를 구성하는 색소의 함량 차이인 것으로 판단된다.



[그림 5-8] 흑국색소분말을 첨가하여 제조된 쿠키의 외관



[그림 5-9] 흑국색소농축액을 첨가하여 제조된 쿠키의 외관

- 흑국색소 첨가 쿠키의 색도측정결과는 표 5-8와 같다. L 값(명도)은 흑국색소 첨가량이 증가할수록 유의적으로 감소하여 검게 나타났으며, b 값(황색도)은 흑국색소 첨가에 따라 유의적으로 감소하였다. 쿠키의 명도는 흑국색소 자체의 색성분에 의해 감소하는 것으로 사료된다.

[표 5-8] 흑국색소 쿠키의 색 특성

Sample	L	a	b
Squid ink	26.59	-1.65	0.09
BKS	5%	29.00	-0.89
	10%	26.89	-2.02
	15%	27.07	-1.72
	20%	27.10	-1.97
BKL	5%	27.29	-1.51
	10%	27.47	-1.77
	15%	26.57	-1.92
	20%	26.39	-2.08

- 쿠키의 경도를 측정한 결과 표 5-9에 나타내었다. 쿠키의 경도는 대조구에 비해 흑국색소 첨가군들에서 낮은 경도값을 나타내었다. 오징어먹물색소 첨가구(6130.92) 및 흑국색소첨가구(5771.11, 5832.66)는 유의차는 보이지 않았으나, 10% 색소 분말 첨가구(5728.50)에서 낮은 경도값을 나타내었고 10% 흑국색소 농축 첨가구(5572.27)으로 가장 낮은 경도값을 나타내었다, 이후 15% (5771.11, 5832.66) 및 20% (5917.26, 5856.33)으로 흑국색소의 첨가량이 증가할수록 경도값이 유의적으로 증가하여 흑국색소 첨가가 쿠키를 단단하게 함을 알 수 있었다. 쿠키는 기본적으로 밀가루, 쇼트닝로 구성되며 쿠키 반죽의 특성과 쿠키 제품의 texture 특성은 이들 주재료의 이화학적 특성과 배합비율에 의해 영향을 받으며, 그중 설탕은 쿠키에서의 퍼짐성의 조절과 글루텐형성에 필요한 수분과 결합함으로써 결과적으로 글루텐의 형성을 억제하여 제품을 부드럽게 하는 연화제의 역할을 한다. 따라서 흑국색소 첨가 쿠키의 경도 상승은 흑국색소 첨가로 인한 당 함량의 감소로 인해 글루텐 형성이 줄어들었기로 사료된다.
- 흑국색소를 첨가한 쿠키반죽의 pH 결과는 표 5-9에서 나타내었다. 반죽의 pH는 대조군(Squid ink)이 5.56으로 가장 높았으며, 흑국분말의 첨가에 의해 pH는 유의적으로 감소하는 것으로 나타내었다. 이는 밀가루의 pH가 5.72인데 반해, 흑국색소 분말의 pH는 5.0으로 상대적으로 낮아 색소의 함량이 증가할수록 pH가 감소하는 것으로 나타내었다.

[표 5-9] 흑국색소 쿠키의 경도와 pH

Sample	Hardness (N/m ²)	pH
Squid ink	6130.92 ± 208.85	5.55 ± 0.01
BKS	5%	5728.50 ± 333.15
	10%	5771.11 ± 46.87
	15%	5922.61 ± 34.79
	20%	5946.28 ± 137.38
BKL	5%	5577.00 ± 78.94
	10%	5808.99 ± 50.55
	15%	5846.86 ± 125.08
	20%	5851.29 ± 92.77

3. 요약 및 결론

- 흑국색소를 식빵에 적용 시, 흑국색소분말보다는 흑국색소농축액을 첨가하는 것이 식빵의 색을 더욱 진하게 할 수 있었으며, 시판 중인 오징어먹물 식빵과 유사한 색을 나타내기 위해서는 흑국색소를 밀가루 중량 기준으로 9% 이상을 첨가하여야 할 것이다.
- 흑국색소를 제면에 적용 시, 흑국색소분말과 흑국색소농축액을 모두 사용할 수 있다. 흑국색소분말의 경우 밀가루 중량기준으로 3% 이상을 첨가하고, 흑국색소농축액의 경우 밀가루 중량기준으로 5% 이상을 첨가하는 것이 조리된 면의 색을 균일하고 강한 흑색으로 착색할 수 있었다.
- 흑국색소를 아이스크림에 적용 시, 흑국색소분말과 흑국색소농축액을 모두 사용할 수 있다. 흑국색소분말의 경우 아이스크림 믹스 중량기준으로 5% 이상을 첨가하고, 흑국색소농축액의 경우 아이스크림 믹스 중량기준으로 9% 이상을 첨가하는 것이 아이스크림의 색을 균일하고 강한 흑색으로 착색할 수 있었다.
- 흑국색소를 쿠키(제과류) 제품에 적용 시, 흑국색소분말과 흑국색소 농축액을 모두 사용할 수 있다. 흑국색소분말의 경우 밀가루 대비 20% 이상, 흑국농축액의 경우 밀가루 대비 10% 이상을 첨가하여야 오징어먹물 색소와 유사한 색 특성을 보였다.

- 한편 흑국색소분말은 오징어먹물색소 분말제품과 동일한 량을 사용하면 식품을 성공적으로 검은색으로 성공적으로 착색할 수 있다. 반면 흑국색소농축액은 오징어먹물색소의 가용성고형분량을 기준으로 첨가하는 것이 오징어먹물색소 첨가 제품과 동일하거나 더욱 강한 흑색을 달성할 수 있다. 또한 본 과제에서 조사된 제품들은 본 과제에서 제시한 최소 첨가농도로 사용하면 검은색으로의 착색을 성공적으로 달성할 수 있다.

제6절. 연구개발성과

1. 논문게재 성과

번호	논문명	저자명	학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	논문게재일	SCI여부
1	흑국으로부터 색소 성분의 분리 및 특성	조정환, 임송이, 김현석	산업식품공학	심사중	국내	-	비SCI
2	오징어먹물색소와 흑국 유래 흑 색소의 색 안정성에 대한 화학성분 및 가공조건의 영향	조정환, 임송이, 김현석	산업식품공학	심사중	국내	-	비SCI
3	Optimal growth conditions of <i>Aspergillus niger</i> producing black spores for natural black pigment	정운선, 김경천, 박권철, 신학동	Journal of Microbiology and Biotechnology	심사중	국외	-	SCIE

2. 특허성과

번호	특허명	출원인	출원번호	출원일	출원국
1	비지를 주성분으로 포함하는 흑국균 배양용 배지 및 이를 이용한 흑국 제조방법	세종대학교 산학협력단	10-2021-0013143	2021년 1월 29일	대한민국

3. 기술거래(이전) 성과

번호	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (2020)
1	노하우기술이전	흑국 유래 흑(black) 색소 분리·정제 및 소재화 기술	(주)선그린	2020년 12월 21일	22,000,000원 (VAT 포함)

4. 사업화성과 및 매출실적

○ 사업화 성과 : 제품화 2건(국내 매출액 : 2,520,000원)

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	2.5백만원
			향후 3년간 매출	억원
		관련제품	개발후 현재까지	억원
			향후 3년간 매출	억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		위

○ 제품화 증빙

발급번호 : MAMA-BMMH-ARZD-XWDZ-RDNW

식품·식품첨가물 품목제조보고서

보고인	성명	김진환	생년월일	1973년 01월 12일
	주소	경기도 성남시 중원구 갈매치로244번길 31(403호)	전화번호	0316042700
영양소	영양(상호)	(주)선그린	영양등록번호	20160275016
	소재지	경기도 성남시 중원구 갈매치로244번길 31(403호) 상대관동, 현대1빌딩		

식품의 유형	종류	품목제조보고번호	2016027501656
제품명	특급 엑기스		
유통기한	해당 없음		
품질유지기관	해당없음		
원재료명 또는 성분명 및 배합비율	맛장애 기재		
용도 용법	맛장애 기재		
보관방법 및 포장재질	맛장애 기재		
모양방법 및 포장단위	맛장애 기재		
상상	특급엑의 역삼으로서, 특이한 냄새를 가지며 이파, 이허가 없어야 한다.		
품목의 특성	<ul style="list-style-type: none"> ■ 고열량·저열량 식품 해당 여부 []에 []아니오 [O]해당 없음 ■ 영·유아를 섭취대상으로 표시 판매하는 식품 해당 여부 []에 [O]아니오 []해당없음 ■ 살균·멸균 제품의 해당 여부 []에 []아니오 []해당없음 		

기타: 품질중독예방조치(합법성/경쟁력)도 영적은 달산의 '주말산로 31217'분제 '후 조반음'간명 '후 이경단'작성 등록.

「식품위생법」 제37조 제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조 제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2020년 12월22일
보고인 김진환

경기도 성남시장 귀하

품목보고번호 : 2016027501656

처리부서	환경보건국 위생정책과	처리자성명	원세희	처리일자	2020년 12월 22일
------	-------------	-------	-----	------	---------------

발급번호 : MAMA-BMDA-TCWQ-FMDG-QELF

식품·식품첨가물 품목제조보고서

보고인	성명	김진환	생년월일	1973년 01월 12일
	주소	경기도 성남시 중원구 갈매치로244번길 31(403호)	전화번호	0316042700
영양소	영양(상호)	(주)선그린	영양등록번호	20160275016
	소재지	경기도 성남시 중원구 갈매치로244번길 31(403호) 상대관동, 현대1빌딩		

식품의 유형	종류	품목제조보고번호	2016027501657
제품명	특급 건조분말		
유통기한	해당없음		
품질유지기관	해당없음		
원재료명 또는 성분명 및 배합비율	맛장애 기재		
용도 용법	맛장애 기재		
보관방법 및 포장재질	맛장애 기재		
모양방법 및 포장단위	맛장애 기재		
상상	특급엑의 분말로서, 특이한 냄새를 가지며 이파, 이허가 없어야 한다.		
품목의 특성	<ul style="list-style-type: none"> ■ 고열량·저열량 식품 해당 여부 []에 []아니오 [O]해당 없음 ■ 영·유아를 섭취대상으로 표시 판매하는 식품 해당 여부 []에 [O]아니오 []해당없음 ■ 살균·멸균 제품의 해당 여부 []비살균 [O]살균 []멸균 		

기타: 품질중독예방조치(합법성/경쟁력)도 영적은 달산의 '주말산로 31217'분제 '후 조반음'간명 '후 이경단'작성 등록.

「식품위생법」 제37조 제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조 제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2020년 12월22일
보고인 김진환

경기도 성남시장 귀하

품목보고번호 : 2016027501657

처리부서	환경보건국 위생정책과	처리자성명	원세희	처리일자	2020년 12월 22일
------	-------------	-------	-----	------	---------------

5. 학술발표

번호	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	2019 Annual Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies (Optimization of Culture Conditions for the Black <i>Aspergillus niger</i>)	정윤선, 신학동	2019.10.25.	세종대학교 컨벤션센터	대한민국
2	2019 Annual Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies (Evaluation of a Real-Time Reverse Transcription PCR Assay for Detection of Male-specific Coliphage)	신상희, 신학동	2019.10.25.	세종대학교 컨벤션센터	대한민국
3	2019 KFN International Symposium and Annual Meeting (흑국 조계종국을 이용한 흑(black) 색소의 추출 및 영양학적 분석)	조정환, 최현우, 조민지, 정휘원, 김현석	2019.10.23.	제주국제컨벤션센터(제주)	대한민국
4	2020년 한국미생물·생명공학회 동계심포지엄 (Establishment of optimal culture conditions for the Black <i>Aspergillus niger</i>)	신윤선, 신학동	2020.01.14.	용평리조트 드래곤밸리호텔 그랜드볼룸	대한민국
5	2020 KoSFoST International Symposium and Annual Meeting (Development of black colorant from black koji by enzymatic hydrolysis)	조정환, 최현우, 조민지, 임송이, 기현석	2020.07.02.	김대중컨벤션센터	대한민국
6	2020 KoSFoST International Symposium and Annual Meeting (Production of natural black pigment from <i>Aspergillus niger</i>)	정윤선, 신학동	2020.07.02.	김대중컨벤션센터	대한민국
7	KMB 2020 47 th Annual Meeting & Symposium (Optimal growth conditions of <i>Aspergillus niger</i> producing black spores for natural black pigment)	정윤선, 신학동	2020.08.24.	e-Conference	대한민국
8	2020 KFN International Symposium and Annual Meeting (흑국균을 이용한 흑(black) 색소의 효소적 추출조건 확립)	조정환, 최현우, 김현석	2020.10.22.	제주국제컨벤션센터(제주)	대한민국

6. 연구인력양성 성과

번호	분류	기준 년도	현 황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	강서현	2020		1				1	1				
2	박권철	2020		1			1		1				
3	성수현	2020		1				1	1				

7. 고용창출

번호	고용인력	고용기관명	고용창출일	고용형태
1	장명은	(주)선그린	정규직	2018.09.17
2	임효진	(주)선그린	정규직	2018.11.01
3	이기정	(주)선그린	정규직	2019.06.01

제3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

제1절. 목표달성여부

1. 정성목표

구분	세부연구개발 목표	달성도
1차년도 (2019년)	▪ 흑국으로부터 흑(black) 색소의 추출·정제 공정 최적화 및 소재화 기술 개발	100%
	▪ 흑국 유래 흑(black) 색소의 물리화학적 특성 및 안정성 평가	100%
	▪ 흑국균의 최적 배양 기술 확립 및 흑(black) 색소 생성 최적화	100%
2차년도 (2020년)	▪ 비지흑국으로부터 흑(black) 색소 대량생산 공정 구축 및 제품화	100%
	▪ 개발된 흑(black) 색소의 가공식품 적용가능성 탐색을 통한 사용기준 설정	100%
	▪ 식품가공부산물을 이용한 흑국균의 고체배양기술 및 경제적 흑국(black koji) 제조 기술 개발	100%

2. 정량목표

성과 목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍 보		기 타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
												SCI	비 SCI						논 문 평 균 IF	
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	15%			15%	15%	15%	5%		5%				5%	15%		10%				
최종목표	1	1		2	15	2	32		2			1	2	0.7	7		2			
연구 기간 내	목표	1		2	15	2	2		2			1	2	0.7	7		2			
	실적	1		1	22	2	2.5		3			0	0	0	8		3			
연구 종료 후	목표		1				30													
	실적																			
최종	목표	1	1		2	15	2	32		2		1	2	0.7	7		2			
	실적	1	0		1	22	2	2.5		3		0	0	0	8		3			

제2절. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

- 2차년도에 계획되어 있던 “비지흑국으로부터 흑(black) 색소 대량생산 공정 구축 및 제품화” 와 관련된 연구를 완전히 달성하지 못하였다.
 - 비지흑국을 제조할 수 있는 균주와 발효조건은 완성하였다. 그러나 비지흑국을 대량생산할 수 있는 업체를 섭외하는데 있어 코로나19 상황과 맞물려 애로사항이 있어 비지흑국을 대량생산하지 못하였다.
 - 현재 흑국 유래 흑 색소의 대량생산 공정 구축과 제품을 제작한 경북 영덕군의 힐링숨농장 영농조합법인에서 비지흑국을 제조할 의사를 전달하였고, 기술이전 등과 발효설비 확충 등을 조율하고 있다.
 - 힐링숨농장 영농조합법인과 협의가 마무리되는데로 비지흑국 제조용 균주와 제조기술에 대한 기술이전을 시행하여 대량생산할 계획이다.

제3절. 관련분야 기여도

1. 기대성과

- 타르계열 흑 색소 및 오징어먹물 흑 색소의 사용처를 대상으로 개발될 흑국 유래 천연 흑 식품색소로 대체 공급
- 국내산 원료를 사용함으로써 식품의 안전성 확보 및 국내 농가 소득 증대에 기여
- 식품 제조 중 발생하는 부산물인 콩비지 및 감자박을 사용함으로써 이들의 폐기로 인한 환경문제 해결에 기여하고 폐기비용의 절감이 기대
- 최근 전 세계적 및 국내에서 건강 지향 경향인 vegan 제품 생산에 사용 가능한 색소로 공급 가능
- 흑국으로부터 천연 흑(black) 식품색소 생산공정 확립 및 제형화 기술 확보
- 개발될 천연 흑 식품색소의 상업화로 국내의 블랙푸드 시장의 활성화 및 채식주의자용 블랙푸드 시장 창출
- 국내 천연 색소 시장에 천연 흑 색소 시장의 창출과 시장 다각화가 기대
- 비지를 원료로 흑국을 제조하는 기술의 개발로 대두가공부산물인 비지의 활용도 증진 및 비지배출업체의 부가가치 창출이 가능

2. 파급효과

가. 기술적 측면

- 흑 색소를 다량 함유하는 흑국균의 종균 확보가 가능
- 농산가공부산물인 비지나 감자박으로부터 흑국을 제조하는 흑국균 배양 기술 확보
- 흑국으로부터 흑 색소의 고수율 및 고효율 추출기술과 대량공정 구축
- 흑국 유래 천연 흑 식품색소의 안정성 평가 기술 확보 및 개발될 흑 색소의 안정성에 대한 데이터베이스 구축
- 개발될 천연 흑 식품색소의 가공식품 적용기술 확보

나. 경제적·산업적 측면

- 국내의 천연 흑 식품색소 시장의 개척을 통해 천연 색소 산업의 활성화 기대
- 수입에 의존하는 오징어먹물 유래 흑 색소의 대체로 수입대체 효과 기대
- 흑국 유래 천연 흑 식품색소를 국내에서 생산함으로써 흑 색소 사용업체에 안정적으로 천연 흑 식품색소를 공급 가능
- 본 연구개발을 통해 흑 색소의 생산단가를 낮출 수 있어 기존 수입에 의존하는 흑 색소 제품들보다 가격경쟁력을 확보 가능(오징어먹물색소를 사용하는 제품에서 천연 흑 식품색소로 대체 시 약 82%의 원가 절감 효과를 볼 수 있어 제조 원가를 낮추고 생산량 증대를 기대할 수 있음)
- 흑국 유래 천연 흑 식품색소를 국내 vegan 제품에 활용할 수 있어 국내 식품 제조업체에서 다양한 제품 개발에 활용이 가능
- 비지를 원료로 흑국을 제조하는 기술의 개발 및 산업화로 비지의 산업적 활용도 증진에 기여 및 폐기되는 농산가공부산물로부터 부가가치 창출이 기대
- 식품색소 성장률을 고려하였을 때 수입 대체로 인한 비용절감과 수출액 감소를 통한 비용 환산에 따른 경제적 효과를 환산

다. 사회적 측면

- 안전성이 검증되었고 오랫동안 다양한 형태로 섭취하여 온 흑국균에 의한 흑국으로 부터 천연 흑 식품색소를 개발함으로써 소비자들의 천연 및 합성 색소에 대한 안전성에 대한 불안감 해소
- 새로운 흑색의 천연색소 개발로 국내 색소 시장의 국제 경쟁력 향상에 기여

제4장. 연구결과의 활용 계획 등

제1절. 연구결과 및 연구성과의 활용계획

1. 예상되는 활용분야 및 활용방안

- 본 연구로부터 얻어진 연구결과들은 특허출원 및 등록, SCI급 및 비SCI급 논문게재, 기술이전을 위한 자료로 활용
- 흑국으로부터 천연 흑(black) 식품색소의 양산시설 및 대량생산의 근거로 활용
- 흑국 유래 천연 흑 식품색소의 품질표준 및 가공식품 적용에 대한 근거로 활용될 수 있으며, 소비자 및 개발된 흑 색소 이용 식품업체의 클레임에 대한 대응 자료로 활용
- 기존 상업화된 카라멜 색소와 오징어먹물 유래 색소를 대체할 수 있는 천연 흑 색소로 사용이 가능
- 개발될 흑국 유래 천연 흑(black) 색소의 카라멜 색소 대체로 카라멜 색소의 유해성분에 대한 안전성 이슈의 해결이 가능하여 소비자들의 카라멜 색소의 독성 안전성에 불안감 해소에 활용

2. 사업화 등에 활용방안

- 타르계열 흑 색소 및 오징어먹물 흑 색소를 대체할 수 있는 국내에서 생산한 천연 식물성 흑국 유래 흑 색소로 식품산업 전반에 사용가능하며, 특히 수산물가공품, 제과-제빵 제품들, 면류(유당면 포함) 제품들에 즉각적으로 사용
 - 2017년 기준 수입산 오징어먹물 흑색소 시장은 3.2억 시장이며 연평균 43% 성장률을 보임, 흑색소로 시장을 약 10% 점유할 시 0.32억 이상의 시장창출이 가능할 것으로 판단됨
- 개발될 흑국 유래 천연 흑(black) 식품색소를 활용한 아이스크림류, 면류, 제과-제빵 제품류들에 있어 블랙푸드 개발 및 산업화에 활용
 - 오징어먹물색소를 사용하는 제품에서 천연 흑 식품색소로 대체 시 약 82%의 원가 절감 효과를 볼 수 있어 가격적 측면에서 유리하여 오징어먹물색소 대체제 사용으로 기대

- 개발될 흑국 유래 천연 흑(black) 식품색소의 오징어먹물 유래 흑 색소의 대체로 채식주의자들을 위한 블랙비건푸드(black vegan food)의 개발 및 산업화 가능
 - 2016년 미국 비(非)육류제품시장(채식주의자식품 시장과 제품군이 유사 하여 동일 시장으로 판단)은 10억 5,450만 달러(한화 약 1조 1,773억원), 2012~2016년간 연평균 약 5.1%의 성장률을 나타냄. 오징어먹물 유래 흑 색소를 흑국 유래 천연 흑(black) 식품색소로 대체 시 채식주의자 시장에 진입 가능 기대
- 개발될 흑국 유래 천연 흑(black) 식품색소의 개발 및 제품화로 수입에 의존하는 오징어먹물 유래 흑 색소를 대체할 수 있어 수입대체효과 창출이 가능
 - 흑 색소로 유일하게 활용이 가능한 천연 오징어먹물 색소는 2017년 기준으로 약 6 MT 국내 생산에 그쳤으며, 대부분의 흑 색소 수요는 수입에 의존하는 상황임.
 - 오징어먹물 색소 수입량은 2013년 기준으로 14,433 kg에서 2017년 기준으로 52,922 kg으로 연평균 38.4%의 증가 추세를 보이고 있음.
 - 흑국 유래 천연 흑(black) 식품색소가 오징어 먹물 색소를 대체할 경우 82% 수입원가 감소 효과를 기대.
- 흑국균을 활용한 비지흑국의 대량생산기술은 국(koji) 제조업체에 기술이전에 활용
- 개발될 흑국 유래 천연 흑(black) 식품색소의 안정성 평가 기술과 가공식품 적용기술들에 대한 협동연구기관으로부터 주관연구기관으로의 기술이전에 활용

제2절. 추가 연구의 필요성 및 계획

1. 추가 연구의 필요성

- 해당사항 없음

2. 추가 연구 계획

- 해당사항 없음

붙임. 참고문헌

- AACC. Approved methods of the AACC International. 10th ed: American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, USA (2000)
- Abban S, Brimer L, Abdelgadir WS, Jakobsen M, Thorsen L. Screening for *Bacillus subtilis* group isolates that degrade cyanogens at pH 4.5–5.0. *Int. J. Food Microbiol.* 161: 31–35 (2013)
- Baker SE. *Aspergillus niger* genomics: past, present and into the future. *Med Mycol.* 44 Suppl 1:S17–21 (2006)
- Balakrishnan B, Karki S, Chiu SH, Kim HJ, Suh JW, Nam B, Yoon YM, Chen CC, Kwon HJ. Genetic localization and *in vivo* characterization of a *Monascus azaphilone* pigment biosynthetic gene cluster. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97(14):6337–6345 (2013)
- Blumenthal CZ. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. *Regul Toxicol Pharmacol.* 39(2):214–228 (2004)
- Chang PK, Cary JW, Lebar MD. Biosynthesis of conidial and sclerotial pigments in *Aspergillus* species. *Appl Microbiol Biotechnol.* 104(6):2277–2286 (2020)
- Jørgensen TR, Park J, Arentshorst M, van Welzen AM, Lamers G, Vankuyk PA, Damveld RA, van den Hondel CA, Nielsen KF, Frisvad JC, Ram AF. The molecular and genetic basis of conidial pigmentation in *Aspergillus niger*. *Fungal Genet Biol.* 48(5):544–553 (2011)
- Mary AL, Oliveira S, Maria da Conceicao F Antonia TP Paula KSU *Aspergillus niger*: A hundred years of contribution to the natural products chemistry. *J Braz* 30(10):2029–2059 (2019)
- Pacelli C, Cassaro A, Maturilli A, Timperio AM, Gevi F, Cavalazzi B, Stefan M, Ghica D, Onofri S. Multidisciplinary characterization of melanin pigments from the black fungus *Cryomyces antarcticus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 104(14):6385–6395 (2020)
- Proctor RH, McCormick SP, Gutiérrez S. Genetic bases for variation in structure and biological activity of trichothecene toxins produced by diverse fungi. *Appl Microbiol Biotechnol.* 104(12):5185–5199 (2020)

- Ray AC, Eakin RE. Studies on the biosynthesis of aspergillin by *Aspergillus niger*. Appl Microbiol. 30(6):909-915 (1975)
- Yu J, Chang PK, Ehrlich KC, Cary JW, Bhatnagar D, Cleveland TE, Payne GA, Linz JE, Woloshuk CP, Bennett JW. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. Appl Environ Microbiol. 70(3):1253-1262 (2004)
- Zabala AO, Xu W, Chooi YH, Tang Y. Characterization of a silent azaphilone gene cluster from *Aspergillus niger* ATCC 1015 reveals a hydroxylation-mediated pyran-ring formation. Chem Biol. 19(8):1049-1059 (2012)

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 흑국균을 이용한 천연 흑(black) 식품색소 개발 및 상업화				
	(영문) Development and commercialization of a natural black food colorant derived from black <i>Aspergillus</i> sp.				
주 관 연구 기관	(주)선그린		주 관 연 구 자	(소속) 총무부/연구개발부	
참 여 기 업	(주)선그린		책 임 자	(성명) 김 진 환	
총연구개발비 (557,400천원)	계	557,400천원	총 연 구 기 간	2019.05.20. ~ 2020.12.31. (20개월)	
	정부출연 연구개발비	418,000천원	총 참 여 수	총 인 원	38명
	기업부담금	139,400천원		내부인원	8명
	연구기관부담금	-		외부인원	30명
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <p><연구개발 목표></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 흑국균(<i>black Aspergillus</i> sp.)을 이용한 천연 흑(black) 식품색소 생산기술 개발 ▪ 수입산 타르계 및 오징어먹물 유래 흑 색소의 흑국 유래 천연 흑(black) 식품색소로 대체 ▪ 액상(농축액) 및 분말 제형의 천연 흑(black) 식품색소 제품화 및 상업화 <p><연구개발성과></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 특허출원(국내) : 1건 / 기술이전 : 1건(기술료 : 20,000천원[VAT 별도]) ▪ 제품화 : 2건(흑국 액기스, 흑국 건조분말/국내매출 : 2.5백만원) ▪ SCI논문 : 1편 심사중/ 비SCI 논문 : 2편 심사중/ 학술발표 : 8건 ▪ 고용창출 : 3명 ▪ 전문인력양성 : 3명 <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 천연색소 및 흑 색소 시장현황 조사 완료 ▪ 흑 색소의 제품현화 조사를 통한 현재 시판 중인 오징어먹물색소의 한계점 파악 및 이를 보완하기 위한 흑국 기반 흑 색소 개발 필요성 규명 ▪ 상업화된 흑색 계연 색소 특성 분석을 통한 흑국 유래 흑 색소의 기준 설정 완료 ▪ 본 연구로 개발될 최종제품인 흑국 유래 흑 색소의 품질규격은 오징어 먹물색소의 성분규격인 정상, 이물, 비소, 납의 항목의 기준을 준용하며, 색가의 기준은 “5 이상”의 완화 필요성 제시 ▪ ATCC 기탁번호가 부여된 흑국균 12종을 확보하고, 일반적인 배양 배지 조성 및 배양 조건을 설정 함. ▪ 확보된 12종의 흑국균의 최적 배양 조건 확립 및 최적 흑 색소 생성 조건 최적화를 통한 우수 흑 색 소 생성 흑국균으로 <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16513을 선별함. ▪ 최적 흑 색소 생성 배양 조건에서 pH, dextrose 함량, 온도, 기간, 배지의 양 및 배지 내 탄소원 등에 따른 최적 흑 색소 생성 조건을 한천배지 20 ml 기준으로 1% dextrose 함유의 yeast malt 배지에서 pH 7.0, 37℃에서 일주일 이상 배양으로 설정함. ▪ 산업에서의 활용도를 높이기 위하여 식품가공부산물인 비지(대두가공부산물)와 감자박을 활용한 경 					

제적 배지 활용 가능성을 확인하여, 비지 대비 1배의 증류수를 첨가한 배양 조건에서 흑 색소 생성이 최적으로 진행되는 흑국 배양 기법을 구축함.

- 최종 흑 색소 생산 후보로 선정된 *Aspergillus niger* ATCC 16513 균주에 대하여 차세대염기서열분석 기법을 적용하여, 전체 유전체 분석을 수행하여 최종 36.9 Mb의 유전체 염기서열 정보를 획득함.
- *Aspergillus niger* ATCC 16513 균주에서 10,902 종의 유전자 정보를 확인하였으며, 이 중 포자의 흑 색소 생성에 영향을 미치는 4개의 주요 색소 대사 관련 유전자를 확인하고 특이적 요소를 확인함.
- *Aspergillus niger* genome database를 기반으로 *Aspergillus niger* 균주들의 genome 내 독소 생성 관련 유전자 존재 유무를 분석하여 본 균주가 독소 생성능이 없음을 유전체 수준에서 확인함.
- 흑 색소를 추출 및 제조에 있어 원료인 흑국은 분쇄하여 60 mesh 체망을 통과시킨 미분을 사용하는 것이 타당함을 확인함.
- 용매추출법을 이용하여 흑국 분말로부터 흑 색소를 추출 시 추출용매는 클로로포름을 사용하며, 흑국 분말과 클로로포름을 1:10의 중량비율로 혼합하여 상온에서 1시간 추출하는 최적 추출 조건을 확립함.
- 추출된 흑 색소는 회전증발농축기로 클로로포름을 모두 제거하고 농축한 후 이를 다양한 건조법으로 건조하여도 분말상의 흑 색소 확보의 어려움을 확인하고, 농축액 확보 가능성을 확인함.
- 흑국색소의 원료인 흑국은 입도 조절, 분산, 효소반응, 여과, 열풍건조 및 분쇄 단계를 통하여 최종 25oBrix 이상으로 농축하여 흑국색소 농축물을 제조 기법을 구축함.
- 개발된 대량생산공정은 흑국 유래 흑 색소를 약 300%의 수율로 생산할 수 있으며, 이중 대부분이 액상(농축액) 흑국 유래 흑 색소임.
- 흑국을 이용하여 생산된 분말상 및 액상 흑국 유래 흑 색소는 품목제조보고를 통해 제품화를 달성하였고, 이중 액상 흑국 유래 흑 색소(흑국엑기스)의 매출을 발생함.
- 흑국으로부터 제조된 흑국 유래 흑 색소 성분조사를 수행하여 조단백질 함량 및 포도당 존재 등을 확인함.
- 수분용해지수는 캐러멜색소, 오징어먹물색소, 흑국색소의 순서로 증가하였으며, 수분흡수지수는 캐러멜색소는 유의적으로 측정되지 않았으며, 오징어먹물색소, 흑국색소의 순서로 증가하였고, 흑국색소는 수분흡수력이 가장 적음을 확인함.
- 용해도는 열처리에 의해 오징어먹물색소에서 증가하였지만 흑국색소에서는 미미한 증가만 확인되며, 색 특성은 흑국색소가 오징어먹물색소보다 더욱 강한 흑색을 나타냄을 확인함.
- 오징어먹물색소와 용액추출법에 의한 용액흑국색소는 광, 온도, 단순당류, pH 5-8 범위에서 안정함을 규명함.
- 효소정제법에 의한 효소흑국색소는 자외선과 다가금속이온에 안정하였으나 온도, 단순당류, 산도, 유기산에 대해 저장기간에 따라 감소함.
- 저장기간에 따른 안정성은 25℃와 50℃에서 2개월까지 저장한 경우 여전히 안정한 상태를 유지함.
- 효소정제법에 의한 흑국 유래 흑 색소와 시판되는 오징어먹물색소를 랫드에 14일간 반복 경구 투여한 결과 혈액과 간, 신장, 폐, 비장에서 시험물질 투여와 관련된 독성학적 변화는 관찰되지 않아, 본 과제에서 개발된 흑국 유래 흑 색소는 안전성을 확인함.
- 제빵, 제면, 제과와 아이스크림에 대한 흑국 유래 흑 색소 제품들(분말상과 농축액) 적용가능성을 확인하여 최소 사용 농도를 제시하였음.

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 본 연구개발로부터 얻은 결과들은 추가적인 특허출원/등록, 논문발표 및 기술이전의 근거로 활용
- 본 연구개발을 통해 타르계열 흑색소 및 오징어먹물 흑색소의 사용처를 대상으로 개발될 흑국 유래 천연 흑 식품색소로 대체 공급
- 본 연구개발로 구축된 흑색소 생산 기법은 식품 제조 중 발생하는 부산물인 콩비지를 사용함으로써 환경문제 해결에 기여하고 폐기비용의 절감이 기대
- 개발된 천연 흑 식품색소의 상업화로 국내의 블랙푸드 시장의 활성화 및 채식주의자용 블랙푸드 시장 창출
- 본 연구과제에서 도출된 흑국 유래 천연 흑 식품색소의 안정성 평가 기술 및 흑 색소의 안정성에 대한 데이터베이스 구축으로 추후 다양한 농산물 및 식품 유해성분의 안전성 평가 기술로 활용
- 국내의 천연 흑 식품색소 시장의 개척을 통해 천연 색소 산업의 활성화 기대 및 수입에 의존하는 오징어먹물 유래 흑 색소의 대체로 수입대체 효과 기대
- 흑국 유래 천연 흑 식품색소를 국내에서 생산함으로써 흑 색소 사용업체에 안정적으로 천연 흑 식품

색소를 공급 가능 및 가격경쟁력 확보 가능

- 안전성이 검증되었고 오랫동안 다양한 형태로 섭취하여 온 흑국균에 의한 흑국으로 부터 천연 흑 식품색소를 개발함으로써 소비자들의 천연 및 합성 색소에 대한 안전성에 대한 불안감 해소

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		119025-2	
사업구분	미래형혁신식품기술개발사업				
연구분야	식품		과제구분	단위	
사업명	미래형혁신식품기술개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	흑국균을 이용한 천연 흑(black) 식품색소 개발 및 상업화		과제유형	개발	
연구기관	(주)선그린		연구책임자	김진환	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2019.05.~2019.12.	172,000	57,400	229,400
	2차연도	2020.01.~2020.12.	246,000	82,000	328,000
	3차연도				
	4차연도				
	5차연도				
	계	2019.05.~2020.12.	418,000	139,400	557,400
참여기업	(주)선그린				
상대국	-	상대국연구기관	-		

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2019.02.06.

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)선그린	대표	김진환

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약	김진환
----	-----

I. 연구개발실적

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구개발에서는 *Aspergillus niger*의 배양특성 규명을 통하여 최적 흑색소 생성 균주를 선별하고, 최적 배양조건 설정을 진행함. 더불어 산업적 활용도가 높은 식품부산물인 비지를 기반으로 경제적 배지 및 흑색소 최적 생성을 위한 배양조건 최적화를 수행함. 본 최적 흑색소 생성 경제적 배양 방법은 신규성을 인정받아 특허 출원이 진행됨. 더불어 차세대염기서열 분석 기법을 활용하여 선정된 최적 균주의 전체 유전체 정보를 분석하여, 흑색소 생성 관련 주요 유전자를 규명하였으며 독소 관련 대사과정이 검출되지 않아, 유전체 기반 안전성을 확인하였다. 본 유전체 분석 결과는 JMB 저널에 심사중임. 흑국으로부터 흑 색소를 생산하는 용매추출법과 효소정제법을 개발하였고 효소정제법을 이용한 흑국 유래 흑 색소 2종(분말상과 액상)을 개발하여 제품화하였음. 흑국 유래 흑 색소의 안정성과 독성 안전성을 검증하였음. 흑국 유래 흑 색소의 식품적용기술을 확립하였음.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구개발은 기존 먹물 기반 천연 흑색소를 대체할 수 있는 흑국 생성 방법을 구축하였음. 최근 천연 색소에 대한 시장이 확대되는 시점에서, 앞으로 식품에 흑색을 가미하는 주요 식품 소재로 활용가치가 매우 높다고 판단됨. 또한 Vegan 식품 시장에 진입이 가능할 것으로 판단됨.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구개발을 통하여, 활용하고자 하는 균주의 전체 유전체 정보를 확보하여 안정성 규명의 기초 정보로 활용하였음. 천연 흑색소에 대한 수요에 비하여 공급이 부족한 상황으로 본 연구에서 확보된 흑국 배양 기법의 활용도가 높을 것으로 기대됨. 또한 기존의 오징어먹물색소와 타르게 합성 흑색소를 대체할 수 있을 것으로 판단되며, 소비자들에게 안전성이 확보된 흑 색소가 적용된 식품을 공급할 수 있을 것으로 보임.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구개발계획서에 준하여 각 연구기관들은 연구개발을 성실히 수행하였으며, 정량적 및 정성적 연구성과들을 충실히 달성하였음. 다만 연구기간이 1년 9개월로 짧아 논문 발표 성과가 아직 달성되지 않았으나 현재 심사중으로 조만간 달성이 가능할 것으로 기대됨.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구개발을 통해 특허출원 1건, 기술이전 1건(기술료 22백만원), 제품화 2건(국내매출액 2.5백만원), 고용창출 3명, 학술발표 8건, 인력양성 3명을 달성하였으며, SCI급 및 비SCI급 논문들은 현재 투고되어 심사중에 있어 2021년에 게재가 될 것으로 예상됨.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
■ 흑국으로부터 흑(black) 색소의 추출·정제 공정 최적화 및 소재화 기술 개발	20	100	- 성실히 수행하여 달성되었음
■ 흑국 유래 흑(black) 색소의 물리·화학적 특성 및 안정성 평가	20	100	- 성실히 수행하여 달성되었음
■ 흑국균의 최적 배양 기술 확립 및 흑(black) 색소 생성 최적화	20	100	- 성실히 수행하여 달성되었음
■ 비지흑국으로부터 흑(black) 색소 대량생산 공정 구축 및 제품화	10	100	- 성실히 수행하여 대부분의 연구내용들이 달성되었으나, 비지흑국을 대량생산할 수 있는 업체를 섭외하지 못해 대량생산을 달성하지 못하였음 - 현재 업체가 섭외되어 기술이전을 협의하고 있고, 기술이전이 완료되면 2021년까지 대량생산이 가능할 것으로 예상됨
■ 개발된 흑(black) 색소의 가공식품 적용가능성 탐색을 통한 사용기준 설정	10	100	- 성실히 수행하여 달성되었음
■ 식품가공부산물을 이용한 흑국균의 고체배양기술 및 경제적 흑국(black koji) 제조 기술 개발	20	100	- 성실히 수행하여 달성되었음
합계	100%		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 고품량의 흑 색소를 함유한 흑국을 제조할 수 있는 균주가 확보되었으며, 관련 발효기술이 확보되었음. 또한 확보된 균주의 유전체 분석을 통해 안전성을 검증하였음.
- 흑국으로부터 흑 색소를 생산할 수 있는 효소정제법이 개발되어 현장실증실험을 통해 대량생산공정을 확립하였고, 이를 기반으로 흑국 유래 흑 색소의 2종(분말 및 액상) 제품이 제품화되었음.
- 흑국 유래 흑 색소의 독성 안전성을 검증하여 독성이 없다는 결과를 도출하였고, 흑 색소의 가공조건 및 외부환경에 대한 안정성을 확보하였음
- 경제적인 흑국 생산 기술을 확보하였으며, 개발된 흑국 유래 흑 색소의 식품적용의 타당성을 확보하였음.
- 본 연구개발에서 얻은 연구결과들을 기반으로 흑국 유래 흑 색소는 기존 오징어먹물색소와 타르게 합성 흑 색소를 대체할 수 있을 것으로 보이며, 최근 급 성장하는 Vegan 식품시장에 블랙푸드를 적용할 수 있을 것을 기대되어 당 사의 매출 증대에 크게 기여할 것으로 예상됨.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 비지흑국의 대량생산을 달성하지 못하였는 바, 이는 2020년 코로나19 사태로 인해 생산가능 업체와의 활발한 접촉이 어려웠다는 점을 고려하여 주실 것을 요청드립니다. 현재는 기술이전을 받아 비지흑국을 생산하려는 업체를 섭외하여 기술이전 협의 중에 있습니다.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 현재 개발된 흑국 유래 흑 색소의 품질규격서와 사용자 매뉴얼을 제작중에 있고, 이를 완성하면 본격적인 홍보를 통해 개발된 흑 색소 제품들의 매출 증대를 노력할 것임.
- 비지흑국 제조에 대한 기술이전을 완료하여 2021년 8월까지 비지흑국을 대량생산하여 제품화된 흑국 유래 흑 색소 제품들의 원가절감을 시도할 계획임
- 본 과제에서 제안한 가공식품들 이외에도 개발된 흑 색소 제품들의 적용가능성을 평가하여 개발된 흑 색소의 활용도를 증대시키고자 함.

IV. 보안성 검토

1. 연구책임자의 의견

보안성은 일반적으로 적합함.

2. 연구기관 자체의 검토결과

보안성은 일반적으로 적합함.

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	식품	
연구과제명	흑국균을 이용한 천연 흑(black) 식품색소 개발 및 상업화			
주관연구기관	(주)선그린	주관연구책임자	김진환	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	418,000,000원	139,400,000원	-	557,400,000원
연구개발기간	2019.05.20. ~ 2020.12.31.			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input checked="" type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(논문게재)			
	<input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 흑국으로부터 흑(black) 색소의 추출·정제 공정 최적화 및 소재화 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 용매추출법을 이용하여 흑국 분말로부터 흑 색소를 추출 시 추출용매는 클로로포름을 사용하며, 흑국 분말과 클로로포름을 1:10의 중량비율로 혼합하여 상온에서 1시간 추출하는 최적 추출 조건을 확립함. ▪ 추출된 흑 색소는 회전증발농축기로 클로로포름을 모두 제거하고 농축한 후 이를 다양한 건조법으로 건조하여도 분말상의 흑 색소 확보의 어려움을 확인하고, 농축액 확보 가능성을 확인함. ▪ 흑국색소의 원료인 흑국은 입도 조절, 분산, 효소반응, 여과, 열풍건조 및 분쇄 단계를 통하여 최종 25oBrix 이상으로 농축하여 흑국색소 농축물을 제조 기법을 구축함. ▪ 개발된 대량생산공정은 흑국 유래 흑 색소를 약 300%의 수율로 생산할 수 있으며, 이중 대부분이 액상(농축액) 흑국 유래 흑 색소임. ▪ 흑국을 이용하여 생산된 분말상 및 액상 흑국 유래 흑 색소는 품목제조보고를 통해 제품화를 달성하였고, 이중 액상 흑국 유래 흑 색소(흑국액기스)의 매출을 발생함.
② 흑국 유래 흑(black) 색소의 물리화학적 특성 및 안정성 평가	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 최종 흑 색소 생산 후보로 선정된 <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16513 균주에 대하여 차세대염기서열분석 기법을 적용하여, 전체 유전체 분석을 수행하여 최종 36.9 Mb의 유전체 염기서열 정보를 획득함. ▪ <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16513 균주에서 10,902

	<p>중의 유전자 정보를 확인하였으며, 이 중 포자의 흑 색소 생성에 영향을 미치는 4개의 주요 색소 대사 관련 유전자를 확인하고 특이적 요소를 확인함.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Aspergillus niger</i> genome database를 기반으로 <i>Aspergillus niger</i> 균주들의 genome 내 독소 생성 관련 유전자 존재 유무를 분석하여 본 균주가 독소 생성능이 없음을 유전체 수준에서 확인함. ▪ 흑국으로부터 제조된 흑국 유래 흑 색소 성분조사를 수행하여 조단백질 함량 및 포도당 존재 등을 확인함. ▪ 수분용해지수는 캐러멜색소, 오징어먹물색소, 흑국색소의 순서로 증가하였으며, 수분흡수지수는 캐러멜색소는 유의적으로 측정되지 않았으며, 오징어먹물색소, 흑국색소의 순서로 증가하였고, 흑국색소는 수분흡수력이 가장 적음을 확인함. ▪ 용해도는 열처리에 의해 오징어먹물색소에서 증가하였지만 흑국색소에서는 미미한 증가만 확인되며, 색 특성은 흑국색소가 오징어먹물색소보다 더욱 강한 흑색을 나타냄을 확인함.
<p>③ 흑국균의 최적 배양 기술 확립 및 흑(black) 색소 생성 최적화</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ATCC 기탁번호가 부여된 흑국균 12종을 확보하고, 일반적인 배양 배지 조성 및 배양 조건을 설정함. ▪ 확보된 12종의 흑국균의 최적 배양 조건 확립 및 최적 흑 색소 생성 조건 최적화를 통한 우수 흑 색소 생성 흑국균으로 <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16513을 선별함. ▪ 최적 흑 색소 생성 배양 조건에서 pH, dextrose 함량, 온도, 기간, 배지의 양 및 배지 내 탄소원 등에 따른 최적 흑 색소 생성 조건을 한천배지 20 ml 기준으로 1% dextrose 함유의 yeast malt 배지에서 pH 7.0, 37°C 에서 일주일 이상 배양으로 설정함.
<p>④ 비지흑국으로부터 흑(black) 색소 대량생산 공정 구축 및 제품화</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 산업에서의 활용도를 높이기 위하여 식품가공부산물인 비지(대두가공부산물)와 감자박을 활용한 경제적 배지 활용 가능성을 확인하여, 비지 대비 1배의 증류수를 첨가한 배양 조건에서 흑 색소 생성이 최적으로 진행되는 흑국 배양 기법을 구축함.
<p>⑤ 개발된 흑(black) 색소의 가공식품 적용가능성 탐색을 통한 사용기준 설정</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 제빵, 제면, 제과와 아이스크림에 대한 흑국 유래 흑 색소 제품들(분말상과 농축액) 적용가능성을 확인하여 최소 사용 농도를 제시하였음.
<p>⑥ 식품가공부산물을 이용한 흑국균의 고체배양기술 및 경제적 흑국(black koji) 제조 기술 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 산업에서의 활용도를 높이기 위하여 식품가공부산물인 비지(대두가공부산물)와 감자박을 활용한 경제적 배지 활용 가능성을 확인하여, 비지 대비 1배의 증류수를 첨가한 배양 조건에서 흑 색소 생성이 최적으로 진행되는 흑국 배양 기법을 구축함.

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
												SC I	비 SC I						논 문 평 균 IF	
단위	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	15%			15%	15%	15%	5%		5%				5%	15%		10%				
최종목표	1	1		2	15	2	2		2			1	2	0.7	7		2			
연구기간내 달성실적	1			1	22	2	2.5		3			0	0	0	8		3			
달성율(%)	100			50	100	100	100		100			0	0	0	100		100			

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	효소경제법에 의한 흑국 유래 흑 색소 생산기술
②	흑국의 흑 색소 고함량 발현시킬 수 있는 균주 확보 및 발효기술
③	흑국 유래 흑 색소의 식품적용 기술

5. 연구결과별 기술적 수준

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

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 흑국 유래 흑 색소의 분말제품과 액상(농축액)제품의 제품화 달성 ▪ 흑국 유래 흑 색소 제품들을 판매를 통한 매출 실적 계획 ▪ 오징어먹물색소를 대체할 수 있으며, 비건식품 시장에 진출이 가능
②의 기술	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 흑국 제조 업체에 기술이전이 가능 ▪ 제2협동연구기관에서 특허출원을 완료하였음. ▪ 기술이전 업체로부터 비지흑국 상업화 및 이를 이용한 흑국 유래 흑 색소의 원가 저감이 기대
③의 기술	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 개발되어 제품화된 흑국 유래 흑 색소 제품들의 활용법을 소비자 및 유관 업체에 제공함으로써 개발된 제품들의 매출 증대에 기여

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책 활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치	15%			15%	15%	15%	5%		5%				5%	15%		10%			
최종목표	1	1		2	15	2	2		2			1	2	0.7	7		2		4
연구기간내 달성실적	1			1	22	2	2.5		3			0	0	0	8		3		1
연구종료후 성과창출 계획		1					30					1	2	0.7					

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 맞춤형혁신 식품 및 천연안심소재기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 맞춤형혁신 식품 및 천연안심소재기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.