

11-1543
000-002
282-01

발간등록번호

11-1543000-002282-01

기능대사체해석기반농식품미생물자원탐색최종보고서

2018

농림축산식품부

포스트게놈다부처유전체사업 R&D Report

기능대사체 해석기반 농식품 미생물자원 탐색 최종보고서

2018. 06. 20.

주관연구기관 /
건국대학교 산학협력단
위탁연구기관 /
이화여자대학교 산학협력단

농림축산식품부

2. 제출문

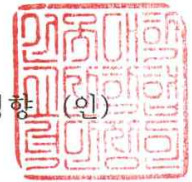
제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “기능대사체 해석 기반 농식품 미생물자원 탐색”(개발기간 : 2016. 02. 29 ~ 2018. 02.28)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 06. 20.

주관연구기관명 : 건국대학교 산학협력단 (대표자) 서정향 (인)



위탁연구기관명 : 이화여자대학교 산학협력단 (대표자) 이근주 (인)

참여기관명 : (대표자) (인)



주관연구책임자 : 이 충 환

위탁연구책임자 : 김 영 석

참여기관책임자 :

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

3. 보고서 요약서

보고서 요약서

과제고유번호	916005-2	해당 단계 연구 기간	2016.02.29 ~ 2018.02.28	단계 구분	(2)/(3)
연구사업명	단위사업	농식품기술개발사업			
	사업명	포스트게놈 다부처 유전체 사업			
연구과제명	대과제명	농림축산식품 미생물유전체전략연구사업단			
	세부 과제명	기능대사체 해석 기반 농식품 미생물자원 탐색			
연구책임자	이충환	해당단계 참여 연구원 수	총: 19 명 내부: 2 명 외부: 17 명	해당단계 연구개발비	정부:300,000천원 민간: 천원 계:300,000천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 19 명 내부: 2 명 외부: 17 명	총 연구개발비	정부:300,000천원 민간: 천원 계:300,000천원
연구기관명 및 소속부서명	건국대학교 산학협력단 / 건국대학교 KU융합과학기술원 시스템생명공학과			참여기업명	
위탁연구	연구기관명: 이화여자대학교 산학협력단			연구책임자: 김 영 석	
요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)				보고서 면수	

4. 국문 요약문

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 연구목적 <ul style="list-style-type: none"> - 농식품 미생물발효에서 1, 2차 대사체 및 향미 대사체를 포함한 meta-metabolomics(메타-메타볼로믹스) 통합해석 연구를 통해 미생물 자원 탐색을 위한 발효미생물-기능대사체 간의 상관관계 해석시스템을 개발/구축 하고자함 ○ 연구내용 <ul style="list-style-type: none"> ① 환경적 요인에 따른 다양한 균주의 meta-metabolome 프로파일링 ② 전통발효식품의 meta-metabolome 프로파일링 통한 식품 내 발효대사체 규명 ③ Meta-metabolome 프로파일링 통한 복합적 배양환경 조건의 선정된 균주 최적화 ④ 전통발효식품의 meta-metabolome 프로파일링 통한 발효최적화 시스템 확립 ⑤ 신규 농식품 발효시스템 최적화를 통한 산업화 지원 기술 구축 ⑥ 농식품 미생물 및 발효식품 별 대사체 In-house DB 구축 및 확장 					
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ① 논문 게재 8건 달성(분야별 상위 5% 이내 4건 포함) ② 특허 출원 2건 달성 ③ 기술이전 1건 달성(기술료: 10,000,000원) ④ 유용유전자원 발굴 6건 달성 ⑤ 사업화 1건 달성(시제품 개발) ⑥ 학술대회 발표 10건 달성 ⑦ 연구인력 양성 6건 달성 ⑧ 홍보실적 3건 달성(BRIC 농수식품 식품성과에서 우수 논문의 소개) 					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기술적 측면 <ul style="list-style-type: none"> ① 농식품 미생물 발효의 meta-metabolome(1차, 2차, 향미 발효대사체) 통합적 프로파일링을 통한 표준화 관련 지표물질 선정 및 주요성분 분석기술 등에 대한 지적 소유권 확보 ② 농식품 미생물자원의 표준화 기술 확립에 따른 공정 및 원료별 QC에 대한 핵심기술 확보 ○ 경제 및 산업적 측면 <ul style="list-style-type: none"> ① 다양한 농식품 미생물자원의 meta-metabolome(1차, 2차, 향미 발효대사체) 프로파일링 연구를 통한 기능대사체 소재화 ② 기술이전을 통한 관련 기업의 경제력 상승 ③ 신규 농식품 미생물자원의 고부가가치 소재 개발을 통한 산업화 지원 ④ 본 연구에서 얻어진 원천기술을 다양한 농식품 미생물자원에 적용 					
중심어 (5개 이내)	메타-메타볼로 믹스	아스퍼질러스	기능대사체	대사체 프로파일 링	농식품 미생물자원	

5. 영문 요약문

< SUMMARY >

		코드번호	D-02			
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> ○ Purpose <ul style="list-style-type: none"> - To construct the interpretation system between fermented microbes and functional metabolites in agrifood microbial resources, we performed meta-metabolomics approach for explanation of fermentation process ○ Contents <ul style="list-style-type: none"> ① Meta-metabolome profiling of various microbes according to environmental factors ② Investigation of traditional fermented foods through meta-metabolome profiling ③ Selected microbes optimization in complex fermented conditions ④ To establish the optimization fermented system by meta-metabolome profiling ⑤ To support the industrialization by optimization of new agrifood fermented system ⑥ In-house DB construction and expansion 					
Results	<ul style="list-style-type: none"> ① Comparison of metabolites produced by <i>Aspergillus oryzae</i> between solid- and liquid fermentation ② Identification of difference metabolites according to degree of milling of rice ③ Construction of metabolic pathway of koji between various substrates ④ Interpretation between microbes and metabolites during fermentation process by correlation analysis ⑤ Identification of biomarkers for quality control of fermented products by metabolite profiling 					
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ○ Meta-metabolomics evaluated the effects of using different microbial species and fermentation conditions in various fermented foods ○ Provides a foundation to produce specific metabolites by metabolite profiling for quality control ○ Provide a way to reveal the metabolite alterations in the complex fermentation process and understand the differences or changes between microbes and metabolites during fermentation 					
Keywords	Meta-metabolomics	<i>Aspergillus</i>	Functional metabolome	Metabolite profiling	Agrifood-microbial resources	

6. 영문목차

1. Summary of project	8
2. Current state of internal and external technical development	11
3. Contents and results	12
4. Understanding of material and level of contribution	75
5. Application plan	77
6. Information of oversea science during project	77
7. Security level	78
8. States of research facility and equipments	78
9. Performance results of safety measure	78
10. Representative record of a research	79
11. Other details	80
12. References	80

7. 본문목차

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	8
2. 국내외 기술개발 현황	11
3. 연구수행 내용 및 결과	12
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	75
5. 연구결과의 활용계획 등	77
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	77
7. 연구개발성과의 보안등급	78
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	78
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	78
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	79
11. 기타사항	80
12. 참고문헌	80

<별첨> 자체평가의견서

8. 뒷면지

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈 다부처 유전체사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈 다부처 유전체사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

1-1. 연구개발 목적

- 농식품 미생물발효에서 1, 2차 대사체 및 향미 대사체를 포함한 meta-metabolomics(메타-메타볼로믹스) 통합해석 연구를 통해 미생물 자원 탐색을 위한 발효미생물-기능대사체 간의 총체적인 상관관계 해석시스템을 개발/구축하고자함

1-2. 연구개발의 필요성

가. 기능대사체 해석 기반 농식품 미생물자원 연구 개발의 필요성

(1) 농식품 미생물자원 연구 개발의 필요성

- 농식품 미생물자원이란 미생물(microorganism) 뿐만 아니라 의약품, 식품, 농업, 환경, 자원 및 에너지 등의 다양한 산업분야에서 미생물로부터 얻어지는 생체 활성물질, 동식물용 생육 조절물질, 다양한 생화학물질 등의 자원을 총칭함
- 농식품 미생물자원 중 미생물 경우 현재 다양성 조사, 주요 균주의 활성 및 효소 측정, 그리고 미생물 생산 대사체 등에 의한 연구가 주로 되고 있음. 그러나 기능성물질 생산에 있어서 배양환경에 따라 유전자 발현 및 대사체 생산이 달라지는 산업적인 문제가 발생하고 있고 이러한 문제점을 해결하는 연구가 결여 되어 있음
- 다양한 유용 균주 중 발효식품에서 가장 많이 사용되는 균주로 *Aspergillus* 등이 대표적임. *Aspergillus*의 경우 mycotoxin이나 aflatoxin 등 독성물질을 생산할 수 있어 산업적으로 문제가 있으나, 일부 *A. oryzae*나 *A. niger* 같은 경우 일반적인 조건에서는 유해한 toxin을 발현하지 않아서 발효에 많이 사용되고 있음. 발효식품의 종류, 발효 공정 환경(온도, 시간 등)에 따라 균주가 생산하는 기능성물질이 달라 질 수 있음에도 불구하고 이에 대한 연구는 미흡한 실정임. 지금까지의 연구는 유전체, 전사체, 단백질체 및 대사체 등 각각의 분야에서 특정 배양조건에 따른 *Aspergillus* 대사체 차이를 다루는 단편적인 연구들이 이루어지고 있으나 배양환경에 따른 최적 *Aspergillus*의 선정을 위한 연구 및 실제 발효식품 산업공정에 맞춤 연구를 위해 특정 대사체 생산의 확인 또는 특정 효소의 발현정도의 차이를 비교가 아닌 다양한 오믹스 연계분석을 통한 과학적이고 체계적인 연구가 필요함
- 미생물 유래 기능성 물질 생산은 미생물의 종류도 중요하지만 기질의 종류(천연물 등) 또한 매우 중요함. 전통발효식품인 장류나 주류의 경우 원료 또는 공정 과정에 따라 미생물의 유전자 발현이나 효소활성이 변화하기 때문에 생산하는 기능성물질 또한 양이나 종류가 상이함. 발효식품의 산업공정이 복잡할수록 QC가 매우 어려워지며 이를 해결하기 위한 기술의 연구 및 확립의 중요성이 대두되고 있음
- 따라서 농식품 미생물 자원의 대사체/전사체/유전체에 대한 총체적인 연구는 미생물에 대한 이해 뿐 아니라 발효식품 제품 개선을 위한 기초적인 자료로 활용될 수 있으며, 산업적으로도 품질 관리에 유용한 정보로 제공될 수 있음

(2) 기능대사체 해석 기반 기술의 필요성

(가) 대사체학의 정의 및 적용분야

- 대사체학은 유전체학, 전사체학, 단백질체학과 더불어 오믹스의 한 분야로, 다양한 유전적, 생리적, 병리적, 환경적인 조건에서 변화하는 저분자 화합물(분자량 100-1,000)들을 분석함으로써, 대사 과정 및 대사적 특징과 관련된 바이오마커를 동정하여 그에 따른 매커니즘을 밝히는 중요한 연구 분야 중 하나임. 특히 미생물, 식물, 동물 등의 생물체를 대상으로 식품, 농업, 의약 및 환경에 이르기까지 다양한 분야에 적용이 될 수 있는 장점을 가지고 있음(그림 1-1)

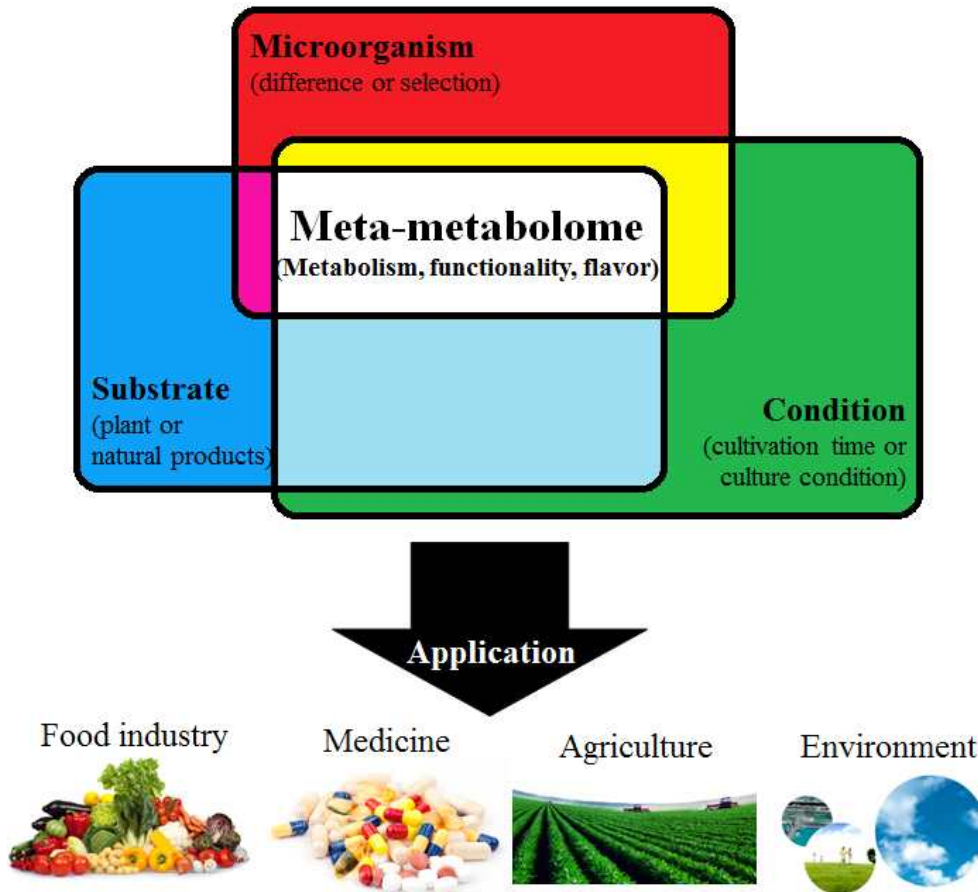


그림 1-1. Meta-metabolome 기반의 농식품 미생물자원연구 및 적용분야 모식도

(나) 기능대사체 기반의 농식품 미생물 발효 연구의 필요성

- 농식품 미생물자원의 다양한 문제점을 해결하기 위한 기술로 대사체학적 접근의 관심이 증대되고 있는 추세임. 다른 오믹스 분야와는 다르게 대사체학은 최종 대사산물인 대사체를 연구함에 따라, 미생물의 다양한 환경(ex. 기질, 시간, 온도, 스트레스)에서 오는 대사변화 및 기능성물질 생산 등을 대사체 프로파일링을 통하여 가장 잘 설명할 수 있음
- 전통발효식품(장류, 주류 등)의 경우 유익한 식품으로 세계 곳곳에서 관심이 높아지고 있지만, 특유의 맛과 향기로 인해 세계화에 걸림돌이 되고 있음. 이를 통해 식품 내 유익한 기능대사체를 연구하는 것도 중요하지만, 맛과 향기 또한 식품산업에서 소비자들의 선택에 있어서 중요한 지표중의 하나임을 알 수 있음. 이를 극복하기 위

하여, SPME 추출법을 통한 향미관련 발효대사체의 프로파일링과 1차 및 2차 대사체 프로파일링의 통합적 대사체분석(meta-metabolome)이 필요함. Meta-metabolome(1차, 2차, 향미 대사체)의 통합적 대사경로 네트워크 분석은 현재 전 세계적으로 연구가 미비한 상태이며, 이 연구를 통하여 연구역량강화 및 새로운 농식품 미생물자원 개발 등 국내 농식품 미생물 산업의 우수성 및 세계화를 도모할 수 있음

1-3. 연구개발 범위

가. 농식품 미생물 발효 시료의 전처리 및 추출법 표준화

- (1) 수분함량 및 점성을 고려한 동결건조기의 사용
- (2) 주성분 및 부성분이 효율적인 추출을 위해 극성도 또는 분자량에 따른 2차 추출, 분리 등의 전처리 과정

나. 농식품 유래 미생물 균주의 복합 배양 조건 확립

- (1) 배양환경조건(기질, 시간, 온도 등) 변화에 따른 *Aspergillus* 등 농식품 발효 균주의 화학적 분류 및 비교
- (2) 오믹스 연계분석을 통한 *Aspergillus* 균주의 최적 배양 조건 확립

다. 농식품 미생물 발효 내의 meta-metabolome 규명을 위한 정밀분석 기법 적용

- (1) UPLC-Q-TOF-MS, UHPLC-LTQ-OT-MS/MS, GC-TOF-MS, SPME-GC-MS 등 다양한 질량분석기 기반의 meta-metabolome 해석
- (2) GC-MS 분석을 통해 통식품 미생물 발효의 대사변화 추적
- (3) SPME 추출법 연계 MS 분석 기법을 이용해 향미 성분의 효율적 분석
- (4) 다중 MS 분석결과에 통합적 해석을 통해, 대사변화, 향미성분, 기능성 대사물질 생산에 대한 전반적인 대사경로를 예측하고자 함

라. 다변량 통계분석 및 네트워크 분석을 통한 알고리즘 구축

- (1) 다중 MS 분석결과로부터 얻어진 방대한 데이터를 다변량 통계분석을 통해 처리 가능한 형태로 변경함
- (2) Metalign으로부터 나온 excel 파일을 이용하여 다변량 통계분석이 가능함
- (3) 다변량 통계분석은 SIMCA 프로그램을 이용하여 실시함. 다변량 통계분석을 통하여 PCA 및 PLS-DA, OPLS-DA는 그룹 간의 차이를 시각화 해줌
- (4) 다변량 분석을 통해 복잡한 배양환경에 따른 지표물질 발굴
- (5) 발효 식품 내 기능 대사체와 효능 간 상관관계 분석 수행 및 효능 지표 제시
- (6) 네트워크 분석기법을 통한 meta-metabolome에 대한 전체적인 대사 메커니즘 규명

마. GC-TOF-MS, SPME-GC-MS 등의 기기 분석을 통한 향미 대사산물 프로파일링

- (1) GC-TOF-MS를 이용해 얻은 휘발성 대사산물과 SPME-GC-MS를 이용해 얻은 휘발성 향기성분을 동정 및 정량 분석

바. 다변량 통계분석을 통한 미생물 배양 조건별 발효유래 향미 성분 분석

- (1) 기기분석을 통해 얻어진 발효유래 향미성분의 균주별 차이를 확인하기 위해 다변량 통계기법을 확립

2. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

2-1. 국내 농식품 미생물자원 기술개발 및 시장현황

- 현재 최근 국내 농식품 미생물자원 관련 연구로는(최근 3년), 청국장 및 된장의 스타터 균주 변경을 통한 생리활성의 증진, 새로운 김치 유산균의 생리활성 측정, 다양한 종류의 콩 발효를 통한 된장의 생리활성 측정 및 다양한 농식품 미생물 자원에 이용되는 균주의 발굴 및 적용을 위한 연구가 진행되고 있음
- 그러나 현재 국내 농식품 미생물자원 관련 대사체학을 통한 연구범위는 주로 판별, 표적 대사체 분석 및 유용 대사물질 바이오마커 탐색을 위한 기술로만 운용이 되고 있음. 대학 및 연구소 규모의 산업화 보다는 응용 및 기초, 기반 연구에 중점을 두고 있음
- 농식품 미생물자원 중 국내 발효식품은 장류 및 식초, 김치, 젓갈, 주류 등의 발효 공정을 거친 제품으로 정의됨. 2013년 약 7조 5천억원의 국내 시장규모는 2017년까지 매년 10% 이상의 지속적 성장을 하고 있음

2-2. 국외 농식품 미생물자원 기술개발 및 시장현황

- 최근 국외 농식품 미생물자원 관련 연구로는(최근 3년), 지역 또는 재배시기에 따른 발효차의 미생물 변화 및 주요 대사체 함량 변화, 와인이나 맥주 등과 같은 발효주의 향미개선을 위한 미생물 배양법 등 원료가 되는 기질과 미생물 발효 과정의 통합 해석 및 quality control을 위한 다양한 연구가 진행되고 있음
- 한국농수산식품유통공사에 따르면, 주요 선진국의 경우 발효식품을 찾는 소비자가 매년 증가하는 추세이며, 2020년까지 연간 9% 이상의 높은 성장률을 보일 것으로 예상됨
- 농식품 미생물자원에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는 외국의 경우, 국가적으로 장기적인 지원 하에 관련센터 설립 및 체계적인 연구를 통하여 대사체 및 미생물 분석과 그에 따른 데이터 처리, DB 구축, 다양한 통계 분석으로 연구의 양적인 측면과 질적인 측면에서 큰 발전 중에 있음. 국내의 경우 현재 농식품 미생물자원의 중요성과 관련 연구의 관심이 증대되고 있는 추세이나, 전반적인 연구가 아닌 특정 대사체 및 미생물에 대한 단편적인 연구가 진행되고 있음

2-3. 본 연구기술의 기대효과

- 농식품 미생물자원의 기능대사체 규명을 위한 미생물 대사체 변화와 발효조건 등과의 상관관계 규명에 따른 최적발효조건 확립은 산업적 이용을 위한 품질 관리에 필수적인 요소임. 특히, 전통 발효식품의 품질은 기능대사체 뿐 아니라 향미와 매우 밀접한 연관이 있으며, 이들에 대한 과학적인 우수성 입증은 매우 중요함
- 1차 대사체 분석을 통한 미생물자원의 대사 및 향미성분, 2차 대사체 연구를 통한 제품의 기능성 성분을 규명하는 meta-metabolome적 통합적 연구를 통해 국내 농식품 미생물 자원 연구의 역량강화, 산업화 지원 시스템 구축 및 선도 기술 기반 세계화가 가능할 것임

3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

<제 1세부(건국대학교): 기능대사체 해석 기반 농식품 미생물자원 탐색>

3-1 연구개발의 내용 및 연구 결과

가. 연구개발 내용 및 결과

(1) 농식품 미생물 발효 시료의 기기분석법 확립

(가) MS 기기 분석법 확립

- ① GC-TOF-MS는 주로 1차 대사산물을 분석하는 용도로 사용됨. 아미노산, 당, 지방산, 유기산 등의 분석이 가능하며, 이동상으로 가스를 이용하기 때문에 시료에 유도체화가 필수적임(그림 3-1A)
- ② UHPLC-LTQ-IT-MS/MS는 주로 생리활성과 관계된 2차 대사산물이 분석됨. 이동상으로는 액체를 사용하며, MS fragment의 정보를 얻을 수 있는 장점이 있음(그림 3-1B)
- ③ UPLC-Q-TOF-MS도 마찬가지로 생리활성과 관계된 2차 대사산물이 분석되며, 이동상으로 액체가 사용됨. 분리된 대사체들의 소수점 4자리까지의 정보를 제공하여 molecular formular를 제공함(그림 3-1C)
- ④ LC-Triple Q-MS는 액체크로마토그래피로써, 주로 시료의 정량 및 추적에 사용됨(그림 3-1D)

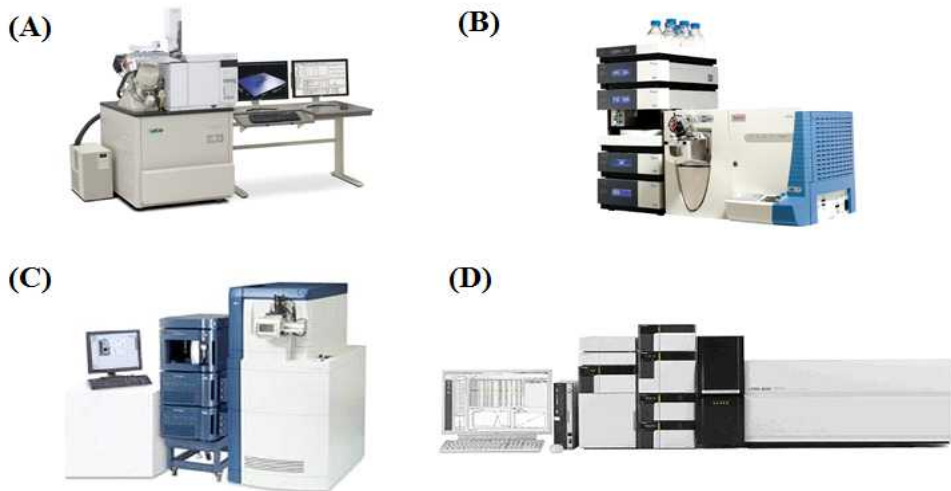


그림 3-1. 실험실 보유 MS 기기. GC-TOF-MS(A), UHPLC-LTQ-IT-MS/MS(B), UPLC-Q-TOF-MS(C), LC-Triple Q-MS(D)

(나) MS data의 프로세싱 및 다변량 통계분석

- ① GC-MS 및 LC-MS로부터 나온 raw data를 실험자가 다룰 수 있는 형태로의 변환이 필요함. 각각의 raw 파일을 cdf 파일로 변환 후, Metalign 프로그램을 이용하여 peak alignment를 실시함

- ② Metalign으로부터 나온 excel 파일을 이용하여 다변량 통계분석이 가능함. 다변량 통계분석은 SIMCA 프로그램을 이용하여 실시함. 다변량 통계분석을 통하여 Principal component analysis(PCA), Partial least squares-Discriminant Analysis(PLS-DA), Orthogonal partial least squares-Discriminant Analysis(OPLS-DA), Variable importance projection(VIP) 등의 결과를 얻을 수 있음. PCA 및 PLS-DA, OPLS-DA는 그룹 간의 차이를 시각화 하여 보여주며, VIP value의 경우 각각의 대사체가 그룹 간의 차이를 보여주는 변수임
- ③ Retention time, m/z , λ max, molecular formula, MS/MS fragment 등의 정보를 이용하여 대사체의 동정을 실시함. 이러한 정보를 이용하여 구축된 In-house library, Dictionary of natural product, 문헌등과 비교하여 동정을 실시하게 됨. 동정된 대사체들을 그룹간의 차이나도록 보여주도록 시각화 하는 작업이 필요함. 이는 STATISTICA, MeV, SPSS등의 다양한 통계 프로그램으로 가능함

(2) 환경적 요인에 따른 다양한 균주의 meta-metabolome 프로파일링

① *Aspergillus oryzae* KCCM 12698의 고체 및 액체 배양 비교

- *A. oryzae*는 식품산업에서 널리 이용되는 곰팡이로 고추장, 된장 등 발효식품에 이용되는 균주로 알려져 있음. 전통발효에서 미생물은 발효 공정에 따라 고체 혹은 액체 상태로 발효가 진행됨. 배양환경에 따라 유용 발효 대사체 및 효소의 생산이 달라짐. 따라서, 유용 균주를 환경 별 배양조건에 따라 대사체의 차이를 확인 하고자 실험을 진행함. *A. oryzae* 균주를 고체 배양과 액체배양에 각각 접종하여 16일 간 4일 간격으로 샘플링 후 추출한 뒤 기기분석을 진행함(그림 3-2)

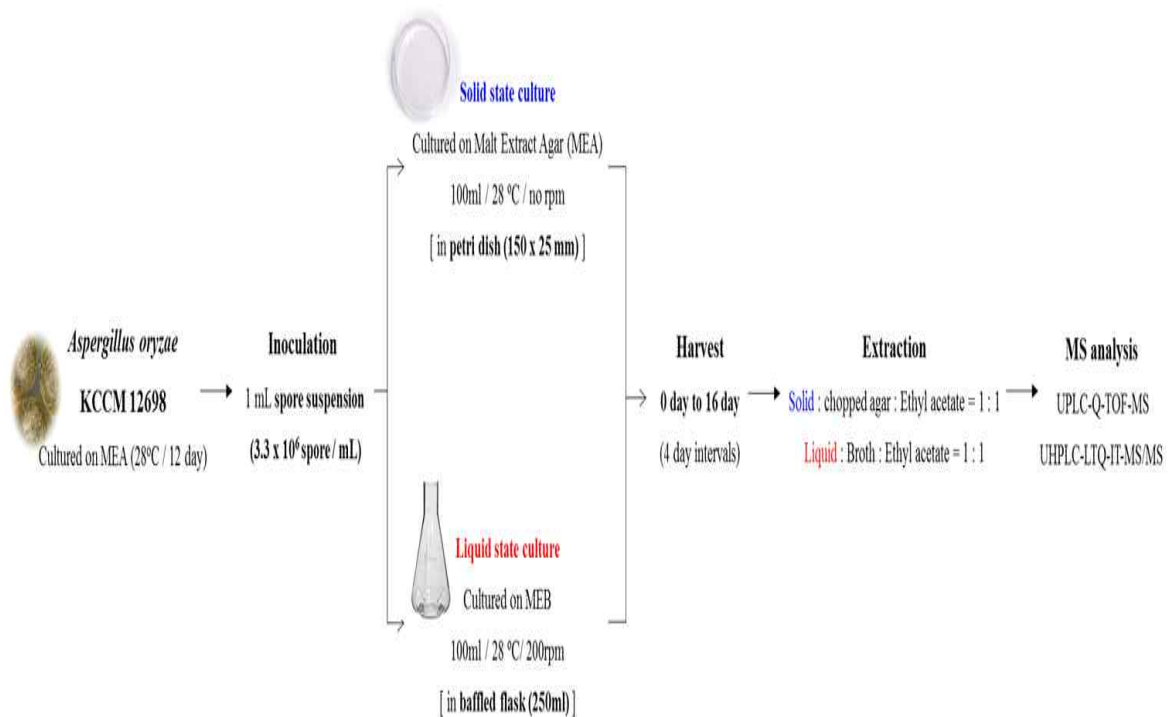


그림 3-2. *A. oryzae* KCCM 12698 균주의 실험진행 Scheme

○ 환경 별 배양차이를 확인하고자 growth curve와 pH 측정 결과, growth curve는 비증식속도(specific growth curve) 계산식을 통해 고체배양(5.04일)이 액체배양(9.79일)에 비해 상대적으로 증식속도가 빠른 것을 확인함. pH는 고체배양과 액체배양 모두 감소하는 경향을 보임. 위 결과를 통해서 두 가지 배양 모두 원활하게 진행됨을 확인함(그림 3-3). 또한 *A. oryzae* KCCM 12698의 항세균 및 항곰팡이 활성 비교 결과, 대부분 고체 발효에서 높은 항균 활성을 보임(그림 3-4). 배양 시간에 따라 항균 활성의 증진이 확인 가능하며, 추후 향미생물 활성에 관여하는 대사체를 동정하고자 함

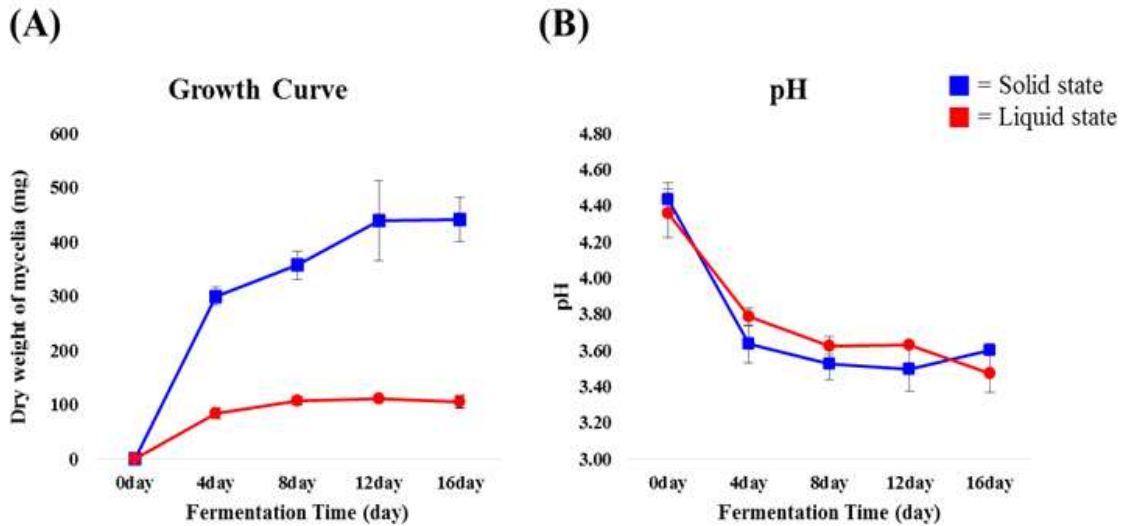


그림 3-3. *A. oryzae* KCCM 12698 균주의 (A) Growth curve 와 (B) pH

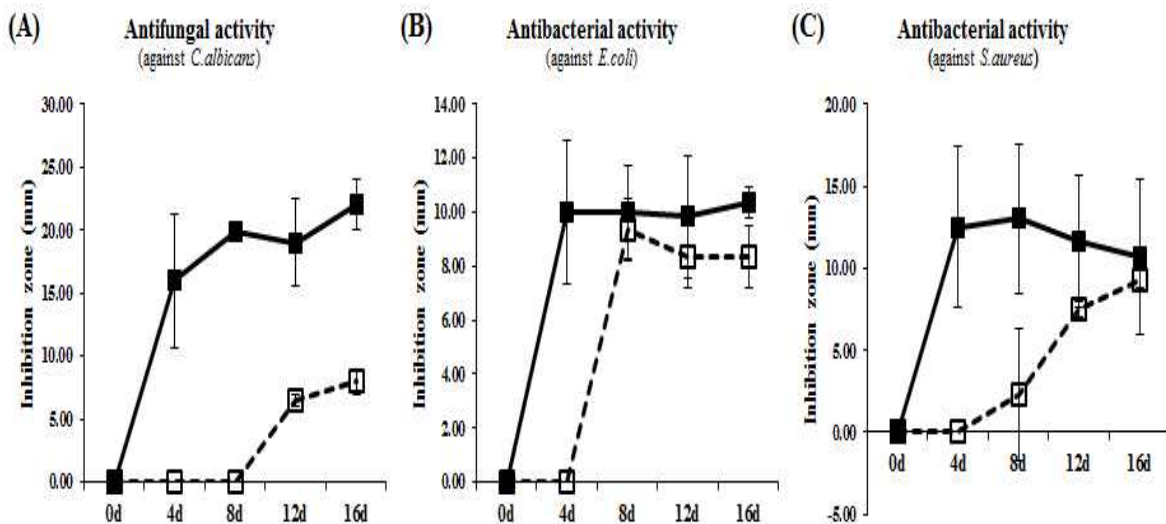


그림 3-4. 배양환경 별 *A. oryzae* KCCM12698의 항균 활성 비교

○ 환경 별 배양의 PCA와 PLS-DA 분석결과, PCA에서는 PC1(21.15%), PC2(13.89%)에 의해, PLS-DA에서도 마찬가지로 PLS1(20.68%), PLS2(13.88%)에 의해 발효시간에 따라 변화하며 고체배양과 액체배양이 구분되는 경향을 확인함 (그림 3-5)

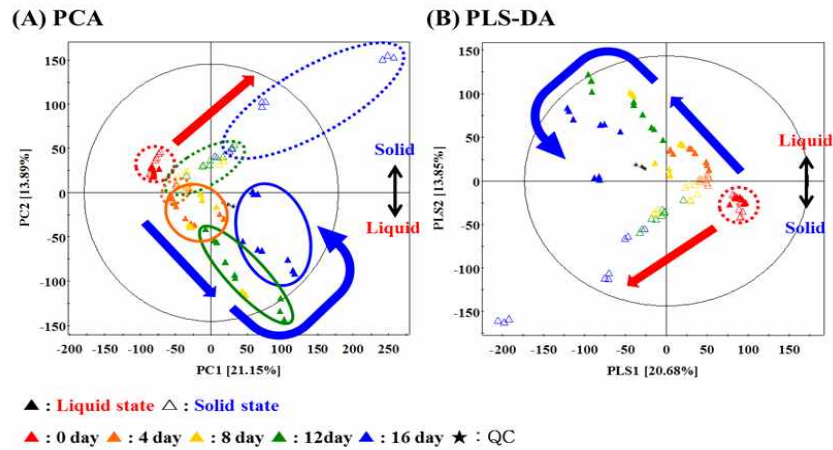


그림 3-5. *A. oryzae* KCCM 12698 균주의 배양환경에 따른 PCA (A) PLS-DA (B) score plot

○ UPLC-Q-TOF-MS 분석을 통해 고체배양과 액체배양의 2차 대사산물을 동정함. 고체배양에서는 총 25개의 대사체를 동정하였으며, 25개의 대사체로는 4개의 퀴논 계열(Anthraquinone derivatives, asterriquinone, aspoquinolone, vesicolorin), 2개 펩타이드 계열(Phenylalanine dianhydride, tetraproline peptide), 3개 지방산 계열 (TriHOE, heptadectrienoate, phytoshingosine), 2개 알칼로이드 계열 (hydroxypaspalinine, cyclopiazonic acid), 5개의 기타(Asperaculin A, kotanin, aspergillus acid A, macrolide, sch 725674, hydroxydiisophorone), 9개 non-identification로 확인 됨(표 3-1)

표 3-1. UPLC-Q-TOF-MS를 통한 *A. oryzae* 고체 배양 환경의 2차 대사산물

No.	Tentative metabolite	Ret	Posi	Nega	MW	Elemental composition	i-FIT (Norm)	mDa	PPM
Quinone 계열									
2	Anthraquinone derivatives	4.640	451.1526	449.1347	450	C29H21O5	2.142	1.4	3.1
3	Asterriquinone	4.837	439.1644	437.1552	438	C27H23N2O4	3.053	-1.2	-2.7
9	Aspoquinolone	5.820	466.3128	464.2993	465	C26H42NO6	0.024	-3.8	-8.2
10	Vesicolorin A	6.008	339.0499	337.0345	338	C18H9O7	3.508	-0.3	-0.9
Peptide 계열									
4	Phenylalanine dianhydride	5.113	295.1457	-	-	C18H19N2O2	0.387	-0.3	-1
14	Tetraproline peptides	6.554	513.2517	489.2453	490	-	-	-	-
Fatty acid 계열									
11	Trihydroxy-octadecenoic acid (TriHOE)	6.051	353.2309	329.2337	330	C18H33O5	0.284	-0.3	-0.9
17	Heptadectrienoate	6.975	277.2168	275.2026	276	C18H27O2	1.158	2.2	8.0
18	Phytoshingosine	7.236	318.2990	362.2381	317	C18H40NO3	0.000	-1.1	-3.5
Alkaloid 계열									
16	14-Hydroxypaspalinine	6.787	450.3207	448.3092	449	C26H42NO5	0.005	1.0	2.2
21	α -Cyclopiazonic acid	7.604	337.1531	335.1424	336	C20H21N2O3	0.276	-1.2	-3.6
기타 계열									
1	Asperaculin A	4.242	281.1406	279.1216	280	C15H19O5	0.251	-0.1	-0.4
5	Macrolide, Sch 725674	5.298	351.2144	327.2194	328	C18H31O5	0.679	-0.4	-1.2
6	Hydroxydiisophorone	5.298	293.2124	291.1951	292	C18H29O3	0	1.9	6.5
13	Aspergillus acid A	6.510	409.3134	407.2789	408	C24H39O5	0.034	-1.8	-4.4
23	Kotanin	8.290	439.3856	437.2216	438	C23H33O8	1.556	4.1	9.4
Non-identification									
7	N.I. (1)	5.399	369.1455	367.0588	368	C20H21N2O5	0.425	1.1	3.0
8	N.I. (2)	5.512	351.2132	349.1118	350	-	-	-	-
12	N.I. (3)	6.323	355.1521	399.1768	354	C21H23O5	0.339	-1.5	-4.2
15	N.I. (4)	6.738	279.0844	277.2177	278	-	-	-	-
19	N.I. (5)	7.300	745.4326	721.4329	722	-	-	-	-
20	N.I. (6)	7.427	453.3414	451.3345	452	C29H43N2O2	0.778	2.0	4.4
22	N.I. (7)	7.858	457.3887	-	-	-	-	-	-
24	N.I. (8)	8.591	703.2633	701.2554	702	C46H37O7	2.050	5.3	7.6
25	N.I. (9)	9.030	500.3893	-	-	-	-	-	-

- 액체배양에서는 총 15개의 2차 대사산물이 동정 됨. 15개의 대사체로는 2개의 퀴논(Aspoquinolone, vericolorin A), 6개 기타(Asperaculin A, dioctylamine, dihydrocanadensolide, aspergillus acid A, hydroxypaspalinine, dihydroxy-octadecadienoic acid), 7개의 미동정 대사체임(표 3-2). 고체배양에서 액체배양에 비해 상대적으로 더 많은 대사체들이 동정 되었고, 더 많은 계열들이 동정된 것을 확인함

표 3-2. UPLC-Q-TOF-MS를 통한 *A. oryzae* 액체 배양 환경의 2차 대사산물

UPLC-Q-TOF-MS									
No.	Tentative metabolite	Ret	Posi	Nega	MW	Elemental composition	i-FIT (Norm)	mDa	PPM
Quinone 계열									
32	Aspoquinolone	5.820	466.3128	464.2993	465	C26H42NO6	0.024	-3.8	-8.2
33	Vericolorin A	6.008	339.0499	337.0345	338	C18H9O7	3.508	-0.3	-0.9
기타 계열									
26	Asperaculin A	4.242	281.1406	279.1216	280	C15H19O5	0.251	-0.1	-0.4
34	Dioctylamine	6.024	242.2848	286.0128	241	C16H36N	0.001	0.8	3.3
35	Dihydrocanadensolide	6.258	213.1114	211.0890	212	C11H17O4	0.143	0.7	3.3
37	Aspergillus acid A	6.510	409.3134	407.2789	408	C24H39O5	0.034	-1.8	-4.4
38	14-Hydroxypaspalinine	6.787	450.3207	448.3092	449	C26H42NO5	0.005	1.0	2.2
39	Dihydroxy-octadecadienoic acid	6.962	311.2161	355.2191	312	C18H31O4	0.723	-2.1	-6.7
Non-identification									
27	N.I. (10)	4.997	289.0338	287.0164	288	C14H7O7	0.003	-1.3	-4.5
28	N.I. (11)	5.058	309.0880	307.0719	308	C17H11N2O4	1.007	-0.9	-2.9
29	N.I. (12)	5.387	464.3022	462.2838	463	-	-	-	-
30	N.I. (13)	5.399	369.1455	367.0588	368	C20H21N2O5	0.425	1.1	3.0
31	N.I. (14)	5.733	525.2736	523.2546	524	C28H35N4O6	0.639	0.6	1.1
36	N.I. (15)	6.398	210.0775	208.059	209	C10H10NO4	0.086	-1.3	-6.2
40	N.I. (16)	9.516	538.3774	536.3558	537	C30H51NO7	2.211	-1.8	-3.4

- 배양 환경별 대사체 함량비교 결과, coumarin 계열 2개, terpenoid 계열 4개, unsaturated fatty acid 계열 7개, 기타 13개가 *A. oryzae* KCCM 12698의 배양 환경에 따라 차이 나는 대사체로 동정 됨(그림 3-6). Coumarin 계열 및 unsaturated fatty acids는 대체로 고체 배양 환경에서 많은 함량을 보이며(그림 3-6A), asperaculin A 및 기타 2가지 대사체는 액체배양 환경에서 많은 함량을 보임

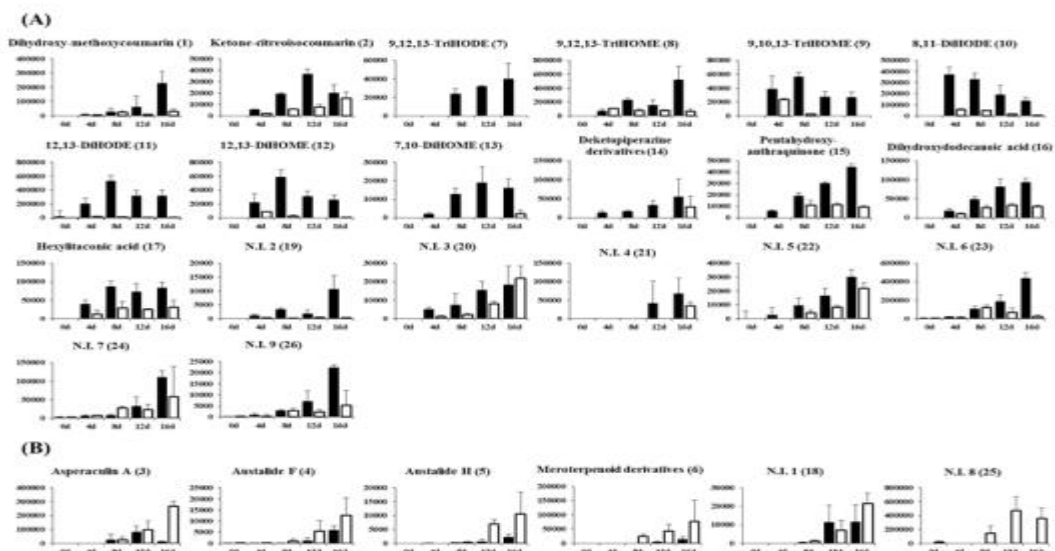


그림 3-6. 배양 환경 별 *A. oryzae* KCCM 12698의 차이 나는 대사체

- 항 미생물 활성이 가장 높은 고체 배양 8일의 *A. oryzae* 추출물을 Prep-HPLC를 통해 물질을 분리하고 항 미생물 활성을 측정함. 항 미생물 활성 측정 결과 20-22분, 24-28분, 30-31분, 37-39분의 fraction에서 활성이 나타남. 항 미생물 활성을 보이는 구간의 LC-MS 분석 결과, 7개의 unsaturated fatty acids, 2개의 지방산, 1개의 coumarin, 2개의 기타 대사체가 확인됨(그림 3-7)

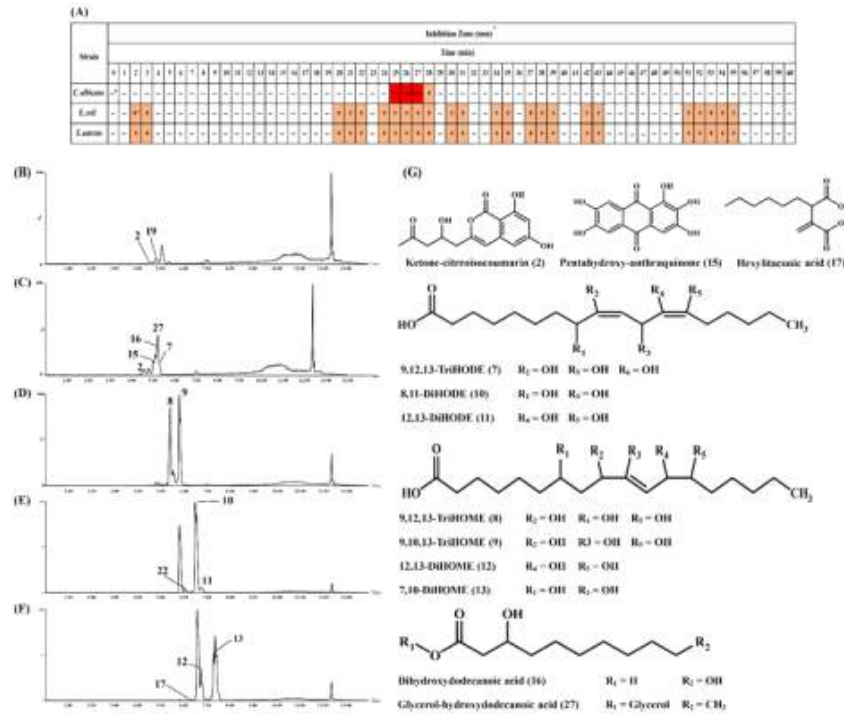


그림 3-7. 항 미생물 활성 물질 분리 및 동정 결과

- ② 고체 및 액체 배양환경에 따른 *A. oryzae* KCCM 12968 균주의 세포 내 대사체 프로파일링
 - *A. oryzae* KCCM 12968 균주의 세포 내 대사과정을 확인하기 위해 세포 내 대사체 프로파일링을 실시함. 균주의 세포 내 대사체 추출법은 아래 그림 3-8과 같음

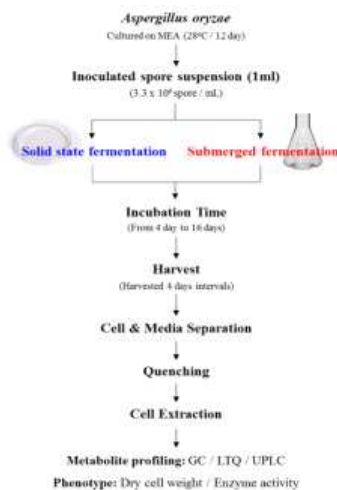


그림 3-8. *A. oryzae* KCCM12698의 세포 내 대사체 추출 과정

- 대사경로 분석을 통하여 *A. oryzae* KCCM12698의 세포 내 대사과정을 확인함(그림 3-10). 녹색 부분인 당계열의 경우 고체 환경에서 더 많이 축적됨이 확인가능하며, 아미노산 및 아민 계열은 액체 배양에서 배양시간에 따라 점진적으로 증가됨. 그밖에도 많은 지방산의 경우, 두 배양환경에서 모두 감소하는 경향성을 보임

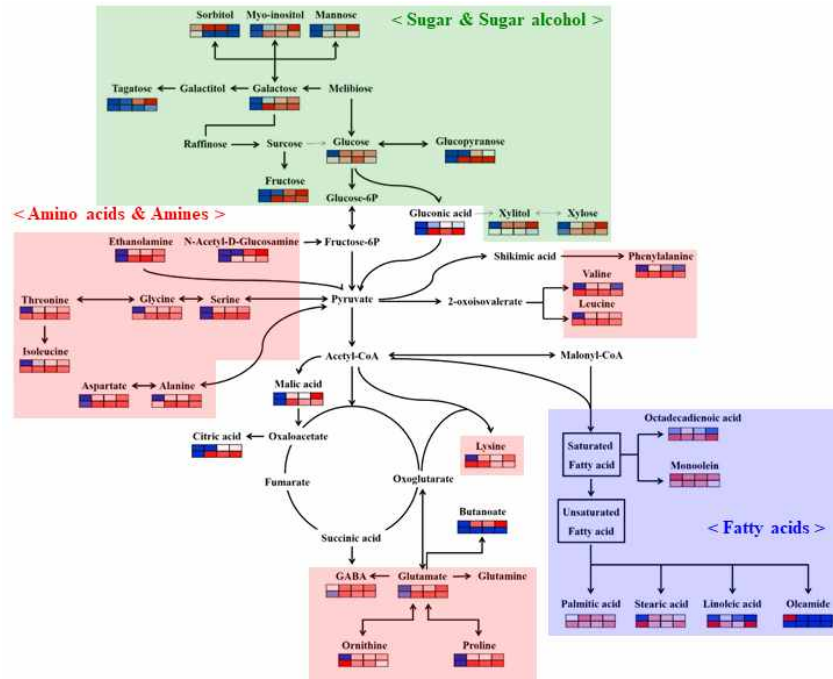


그림 3-10. *A. oryzae* KCCM12698의 세포 내 대사경로 분석 결과

(3) 전통발효식품의 발효 원물 및 환경에 따른 대사체 및 생리활성 차이 규명

① 전통발효식품(곡자) 시료

- 쌀은 가장 겉 왕겨를 벗겨내면 얇은 쌀겨라는 껍질로 덮여 있고, 쌀겨는 쌀눈과 내배유로 이루어져 있음. 배유는 대부분 탄수화물, 단백질, 지방으로 이루어져 있으며, 주로 쌀눈에 대부분의 영양분이 존재함. 쌀겨에는 섬유질, 식물성 지방이 많이 함유되어 있음. 백미는 도정 과정에서 쌀겨가 대부분 제거 되어 배유만을 가짐. 큰눈영양쌀은 백미와 유사 도정 과정을 거치나, 유전자 조작을 통해 embryo의 크기를 약 3배정도 키움. 현미는 쌀의 왕겨만 벗겨낸 상태임(배유, 쌀눈). 3종의 쌀을 *A. oryzae* 균주를 이용하여 36시간 동안 발효를 진행하여 12시간 간격으로 샘플링을 하였음(그림 3-11)

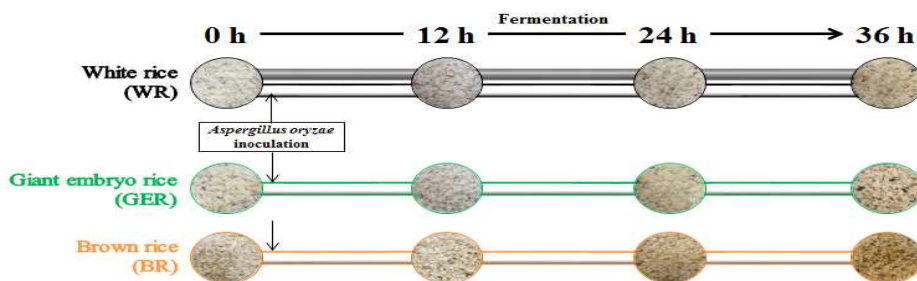


그림 3-11. 쌀 원료 별 곡자 시료 제조

② 전통발효식품(곡자)의 발효 원물에 따른 비교

- 쌀곡자 시료의 PCA 분석 결과, GC-TOF-MS 분석에서는 score plot PC1(59.4%), PC2(6.1%)에 의해, UPLC-Q-TOF-MS에서는 PC1(45.5%), PC2(5.1%)에 의해 발효시간에 따라 변화하여 곡자별로 구분되는 경향을 보임(그림 3-12)

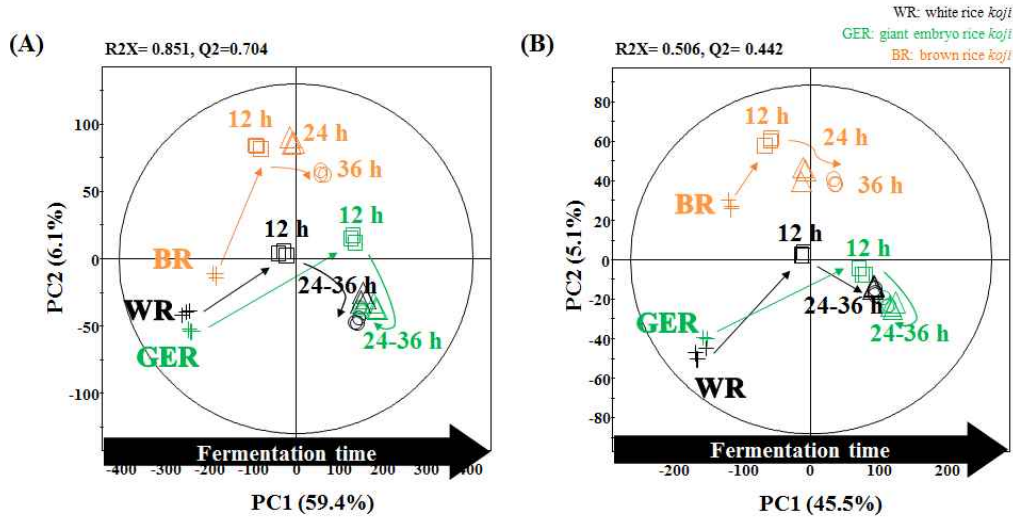


그림 3-12. 원료별 곡자의 PCA score plot. GC-TOF-MS(A), UPLC-Q-TOF-MS(B)

- 곡자의 다변량 통계 분석 결과, 곡자의 발효 패턴을 구분 짓는 1차 대사산물로 45개가 동정 됨(표 3-4). 표 3-4에서는 동정된 대사체를 각 원료의 함량을 기준으로 증가 혹은 감소하였는지, heatmap으로 표현하였음. 이는 VIP values(VIP > 0.7)로 선정되었음. 발효 패턴 차이에 기여하는 대사체로는 12개의 당(erythritol, arabinose, arabitol, glycerol, sorbitol, penitol, inositol, glucose, maltose, xylitol, fructose, sucrose), 10개의 유기산(kojic acid, oxalic acid, citric acid, succinic acid, fumaric acid, glycerolphosphoric acid, glyceric acid, malic acid, gluconic acid, lactic acid), 2개의 페놀(4-hydroxybenzoic acid, ferulic acid), 15개의 아미노산(methionine, ornithine, isoleucine, phenylalanine, valine, threonine, proline, serine, tryptophan, aspartic acid, GABA, alanine, pyroglutamic acid, glutamic acid, glycine), 5개의 지방산(stearic acid, oleic acid, palmitic acid, linolenic acid, linoleic acid), 1개의 vitamin(nicotinic acid)임
- 당의 경우, 시간에 따라 대부분의 대사체가 증가하는 양상을 보이며, 그 중 큰눈 영양쌀이 쌀과, 현미보다 발효에 따라 높게 증가하는 경향을 보임
- 유기산의 경우 백미와 현미에서 큰눈영양쌀보다 대사체 변화의 폭이 큰 경향을 보임. Ferulic acid는 oryzanol이 분해될 때 생성되는 대사체로써, 쌀겨에 많이 분포되었다고 알려져 있음. 아미노산은 백미에서 발효에 의해 크게 변화하는 경향을 보임

표 3-5. UPLC-Q-TOF-MS분석에 의해 동정된 곡자 시료의 secondary metabolites

LTQ-IT-MS/MS															
Peak Nr.	Tentative identification ^a	RT ^b	Mass	WR				GER				BR			
				0 h	12 h	24 h	36 h	0 h	12 h	24 h	36 h	0 h	12 h	24 h	36 h
Flavonoids															
46	Tricin-O-glucoside	8.48	493	-	-	-	-	1.00	1.12	1.15	1.14	-	-	-	-
47	Tricin	0.84	331	1.00	1.09	1.15	1.13	1.00	1.09	1.12	1.13	1.00	1.01	1.04	1.03
48	Tricin-7-O-rutinoside	8.12	639	-	-	-	-	1.00	1.04	1.06	1.06	1.00	1.02	1.04	1.04
49	Luteoline	9.87	287	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00	1.04	1.05	1.06
Lipids															
50	Trihydroxy octadecanoic acid	10.76	333	1.00	1.06	1.11	1.10	1.00	1.15	1.18	1.21	1.00	1.05	1.09	1.08
51	Trihydroxy octadecenoic acid	10.92	353	1.00	1.15	1.23	1.23	1.00	1.15	1.16	1.18	1.00	1.06	1.09	1.11
52	LysoPC16:0	15.65	496	1.00	1.08	1.14	1.13	1.00	1.13	1.15	1.13	1.00	1.05	1.08	1.09
53	LysoPE16:0	15.22	454	1.00	0.92	1.07	1.08	1.00	1.11	1.12	1.13	1.00	0.89	0.99	1.06
54	LysoPC18:1	16.26	522	1.00	1.07	1.13	1.12	1.00	1.13	1.14	1.12	1.00	1.05	1.07	1.09
55	LysoPC18:2	14.85	520	1.00	1.07	1.13	1.11	1.00	1.12	1.13	1.11	1.00	1.04	1.07	1.08
56	LysoPC14:0	13.75	468	1.00	1.05	1.10	1.09	1.00	1.09	1.10	1.09	1.00	1.04	1.07	1.07
57	Hydroxy-oxo-octadecenoic acid	12.09	335	1.00	1.00	1.05	1.05	1.00	1.04	1.09	1.08	1.00	1.00	1.02	1.02
58	LysoPE18:2	14.52	478	1.00	0.98	1.08	1.09	1.00	1.06	1.06	1.07	1.00	0.89	0.97	1.02
59	LysoPC18:3	13.94	518	1.00	1.02	1.06	1.05	1.00	1.06	1.06	1.05	1.00	1.04	1.06	1.04
60	LysoPC16:1	14.27	494	1.00	0.99	1.02	1.00	1.00	1.05	1.05	1.04	1.00	1.04	1.05	1.03
61	LysoPE14:0	13.49	426	1.00	0.90	1.01	1.04	1.00	1.00	1.05	1.03	1.00	0.84	0.94	0.98

○ 곡자의 발효 원물에 따른 활성차이를 알아보기 위해 β -glucosidase, protease, 항산화 활성 종류인 ABTS를 실시하였음(그림 3-13). β -glucosidase 활성의 경우 큰눈영양쌀에서 쌀과 현미보다 높은 활성을 보임. Protease의 활성은 쌀과 큰눈영양쌀에서 증가하는 양상을 보임. 항산화 활성은 발효가 진행됨에 따라 모두 증가하나 큰눈영양쌀에서 가장 큰 증가 폭을 보였음

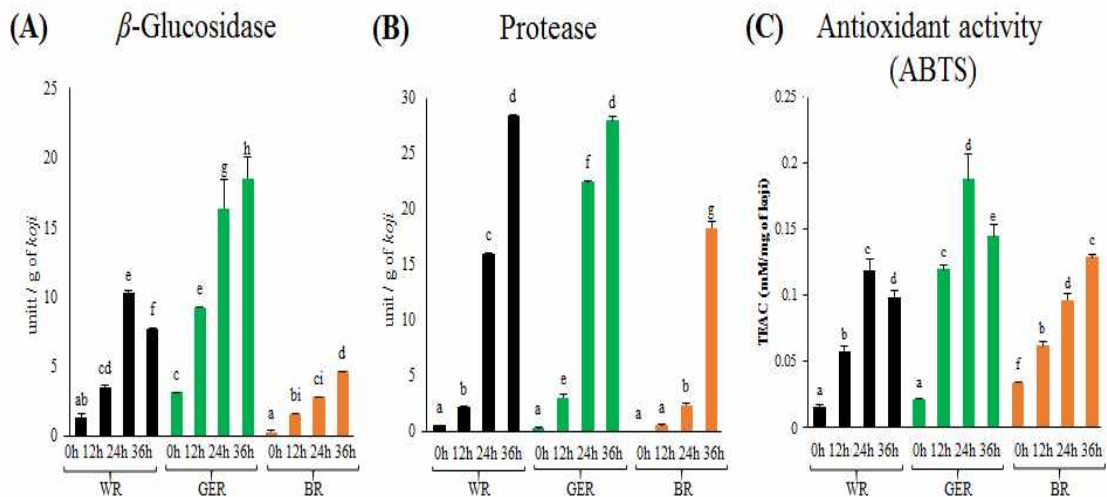


그림 3-13. 원료별 곡자의 효소 및 항산화 활성 테스트 결과.
 β -glucosidase(A), protease(B), ABTS(C)

- 원료별 곡자의 원료(0시간) 시료의 PLS-DA 및 loading plot의 통합적인 분석 결과, 백미에서는 lysophospholipids, 큰눈영양쌀에서는 쌀눈에 많다고 알려진 플라보노이드 배당체가 상대적으로 많이 존재하였으며, 그 외의 아미노산, 당, 지방산, 비타민, 페놀산 등은 쌀겨와 배유가 풍부했던 현미의 원료에서 기인함을 확인할 수 있었음(그림 3-14)

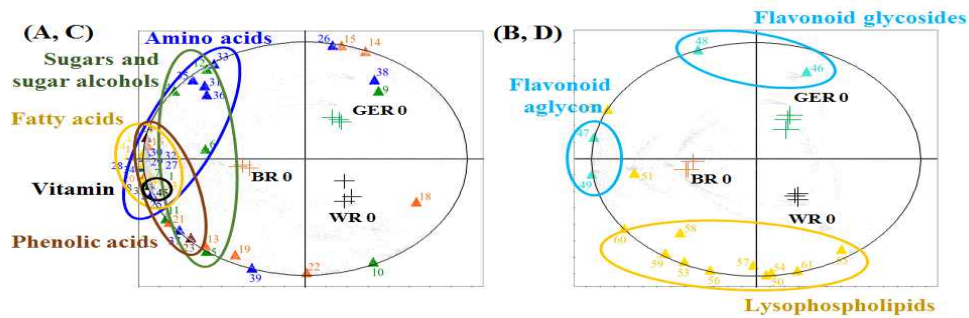


그림 3-14. 원료별 곡자의 원료(0시간)에서의 PLS-DA score plot, loading plot. GC-TOF-MS(A,C), UPLC-Q-TOF-MS(B,D)

- 원료가 다른 곡자의 발효에 따른 배양조건을 확립하기 위해 최종산물(36시간) 시료의 PLS-DA 및 loading plot 통합적 해석 결과, 아미노산과 lysophospholipid 계열이 백미와 관련된 대사체로 발견되었음. 이는 발효 과정에서 백미의 *Aspergillus*가 protease효소를 더 많이 생산하여 그에 대한 결과로 상대적인 결과로 추정됨(그림 3-15)
- 당과 플라보노이드 계열은 큰눈영양쌀에서 높은 양상을 보이는 데, 이는 쌀눈에 많았던 플라보노이드 배당체뿐만 아니라, glucosidase에 의해 당이 떨어지면서 플라보노이드 아글리콘과 당 계열이 상대적으로 증가한 양상을 보이는 것으로 해석됨. 또한 이 결과가 항산화 활성에도 영향을 주었다고 사료됨. 또한 현미에서는 페놀산, 지방산, 비타민 계열이 높은 함량을 보이는 데, 기존에 원료에서보다 큰 변화를 보이지 않는 이유는 현미의 두꺼운 껍질 때문에 *Aspergillus*가 발효 기질을 이용하는 데 어려움이 있어 conversion이 되지 않은 것으로 사료됨

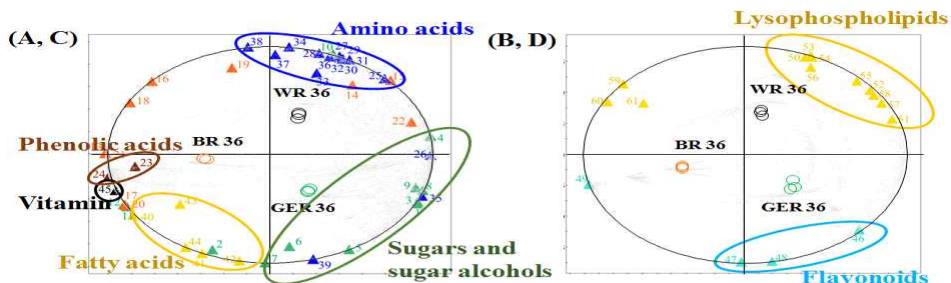


그림 3-15. 원료별 곡자의 최종산물(36시간)에서의 PLS-DA score plot, loading plot. GC-TOF-MS(A,C), UPLC-Q-TOF-MS(B,D)

③ 전통발효식품(곡자)의 균주에 따른 비교

- 발효 기질로 백미(WR)를 사용하였으며 균주에 따른 발효의 차이를 보고자 실험을 진행함. 곡자 발효에 가장 많이 사용되는 *A. oryzae*와 다른 전통 발효 식품에서 일반적으로 사용되는 균주 중 하나인 *B. amyloliquefaciens*를 이용하여 36시간 동안 발효를 진행하여 12시간 간격으로 샘플링을 하였음(그림 3-16)

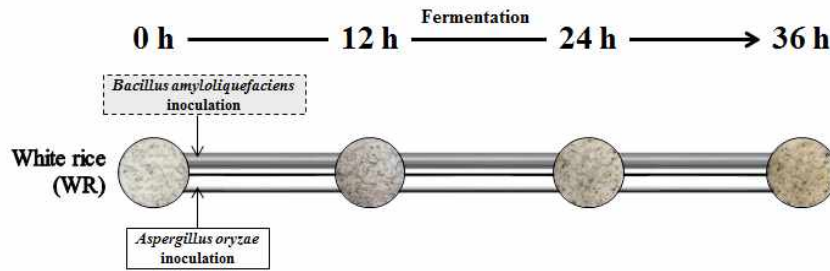


그림 3-16. 쌀 균주 별 곡자 시료 제조

- 쌀곡자 시료의 PCA 분석 결과, GC-TOF-MS 분석에서는 score plot PC1(46.9%), PC2(16.4%)에 의해, UHPLC-LTQ-IT-MS/MS에서는 PC1(33.0%), PC2(15.0%)에 의해 발효시간에 따라 변화하여 균주별로 구분되는 경향을 보임(그림 3-17)

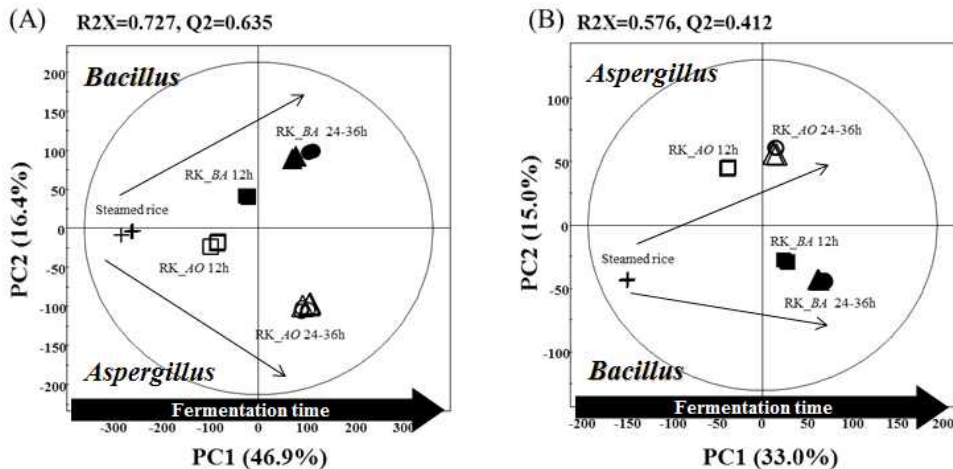


그림 3-17. 균주별 곡자의 PCA score plot, GC-TOF-MS(A), UHPLC-LTQ-IT-MS/MS(B)

- 곡자의 다변량 분석 결과, 곡자의 발효 패턴을 구분 짓는 primary metabolite로 47개가 동정됨(표 3-6). 표 3-6에서는 동정된 대사체의 함량을 glycine 기준으로 환산하여 나타냄
- 47개의 primay metabolites는 VIP-values(VIP > 0.7)로 선정되었음. 발효 패턴 차이에 기여하는 대사체로는 10개의 당(glycerol, erythritol, penitol, xylose, xylitol, fructose, glucose, sorbitol, inositol, maltose), 10개의 유기산(lactic acid, oxalic acid, malomic acid, succinic acid, glyceric acid, fumaric acid, malic acid, kojic acid, shikimic acid, citric acid, gluconic acid), 2개의 페놀(4-hydroxybenzoic acid, ferulic acid), 18개의 아미노산(alanine, valine, leucine, isoleucine, proline,

표 3-7. UHPLC-LTQ-IT-MS/MS 분석에 의해 동정된 곡자 시료의 secondary metabolites

Peak No.	Tentative identification ^{a, b}	RT (min) ^c	Measured mass [M-H] ⁻	MS ^e fragment ions	UV (nm)	Relative contents (peak area [log ₁₀]) ^d							
						Steamed rice	RK_AO 12 h	RK_AO 24 h	RK_AO 36 h	RK_BA 12 h	RK_BA 24 h	RK_BA 36 h	
Flavonoids													
48	Apigenin-C-glucosyl-C-arabinoside	6.7	565	565>547>499	272, 334	3.72 ± 0.01	ND ^e	ND	ND	4.81 ± 0.01	4.91 ± 0.01	4.93 ± 0.01	
49	Isovitexin-O-glucoside	7.1	595	595>577>529	309	3.30 ± 0.03	ND	ND	ND	4.51 ± 0.04	4.71 ± 0.03	4.71 ± 0.01	
50	Chrysoeriol-hexoside	7.8	463	-	322	2.98 ± 0.02	ND	ND	ND	4.37 ± 0.01	4.56 ± 0.02	4.61 ± 0.01	
51	Chrysoeriol-rutinoside	8.1	609	-	246, 322	3.30 ± 0.02	ND	ND	ND	4.08 ± 0.04	4.28 ± 0.03	4.40 ± 0.03	
52	Tricin-7-O-rutinoside	8.1	639	639>493>331	340	ND	ND	ND	ND	4.52 ± 0.01	4.65 ± 0.02	4.67 ± 0.01	
53	Tricin-O-glucoside	8.5	493	493>331	330	3.00 ± 0.04	ND	ND	ND	4.11 ± 0.04	4.27 ± 0.02	4.27 ± 0.02	
54	Tricin	10.8	331	-	-	3.98 ± 0.02	4.31 ± 0.01	4.53 ± 0.01	4.45 ± 0.03	4.52 ± 0.02	4.59 ± 0.02	4.56 ± 0.02	
Fatty acids													
55	Pinellitic acid	10.9	353 ^f	-	217, 302	4.37 ± 0.01	5.00 ± 0.02	5.34 ± 0.01	5.34 ± 0.04	5.03 ± 0.03	5.23 ± 0.04	5.26 ± 0.00	
56	Hydroxy-oxo-octadecenoic acid	13.1	313	313>297>279	221, 273	4.78 ± 0.03	4.74 ± 0.02	4.98 ± 0.01	4.98 ± 0.02	4.64 ± 0.04	4.68 ± 0.05	4.69 ± 0.06	
Lyso-phospholipids													
57	LysoPE14:0	13.5	426	426>408>365	220	4.63 ± 0.15	4.20 ± 0.02	4.76 ± 0.02	4.90 ± 0.02	5.00 ± 0.05	5.40 ± 0.03	5.44 ± 0.01	
58	LysoPC14:0	13.7	468	468>450	220	5.85 ± 0.03	5.87 ± 0.77	6.41 ± 0.11	6.45 ± 0.04	6.42 ± 0.05	6.63 ± 0.04	6.62 ± 0.09	
59	LysoPC18:3	13.9	518	518>500	221	5.27 ± 0.08	4.83 ± 0.27	5.43 ± 0.06	5.11 ± 0.51	5.52 ± 0.09	5.74 ± 0.02	5.78 ± 0.03	
60	LysoPC16:1	14.3	494	494>476	220	4.67 ± 0.08	4.19 ± 0.21	4.80 ± 0.07	4.71 ± 0.09	4.86 ± 0.08	4.89 ± 0.10	4.98 ± 0.03	
61	LysoPE18:2	14.5	478	478>460>263	-	5.26 ± 0.03	5.09 ± 0.05	5.67 ± 0.02	5.80 ± 0.02	5.83 ± 0.04	6.30 ± 0.03	6.40 ± 0.01	
62	LysoPC18:2	14.9	520	520>502	301	5.74 ± 0.15	5.97 ± 0.20	6.40 ± 0.13	6.38 ± 0.07	6.27 ± 0.05	6.41 ± 0.06	6.50 ± 0.04	
63	LysoPE16:0	15.2	454	454>436>393	223	5.21 ± 0.02	4.96 ± 0.08	5.56 ± 0.01	5.64 ± 0.03	5.58 ± 0.04	6.03 ± 0.05	6.10 ± 0.02	
64	LysoPC16:0	15.7	496	496>478, 184	224	5.75 ± 0.17	6.22 ± 0.10	6.56 ± 0.07	6.39 ± 0.10	6.41 ± 0.08	6.59 ± 0.15	6.57 ± 0.10	
65	LysoPC18:1	16.3	522	522>504	223, 277	5.00 ± 0.16	5.28 ± 0.06	5.40 ± 0.65	5.41 ± 0.20	5.60 ± 0.17	5.69 ± 0.11	5.79 ± 0.13	
Siderophores													
66	Bacillibactin	9.5	883	883>860>672	209, 247, 313	ND	ND	ND	ND	5.16 ± 0.04	5.91 ± 0.02	6.16 ± 0.02	
Unknown													
67	NI1	1.5	294	294>276>258	225, 261, 364	4.57 ± 0.02	6.32 ± 0.02	6.91 ± 0.01	6.81 ± 0.01	5.65 ± 0.01	5.44 ± 0.01	5.53 ± 0.01	
68	NI2	7.0	480	480>462>396	270	ND	4.56 ± 0.02	5.78 ± 0.01	5.30 ± 0.01	ND	ND	ND	
69	NI3	9.4	420	420>402>384	-	ND	ND	ND	ND	5.35 ± 0.03	5.65 ± 0.04	5.70 ± 0.03	
70	NI4	10.8	333	333>297>279	214, 344	4.39 ± 0.03	4.64 ± 0.03	4.87 ± 0.02	4.81 ± 0.03	4.40 ± 0.03	4.28 ± 0.05	4.34 ± 0.02	
71	NI5	11.7	402	402>384>366	218, 300	ND	ND	ND	ND	5.75 ± 0.05	5.96 ± 0.04	6.00 ± 0.03	
72	NI6	13.0	588	588>570>552	221, 272	5.08 ± 0.03	5.25 ± 0.01	5.34 ± 0.02	5.43 ± 0.02	5.02 ± 0.04	4.29 ± 0.04	ND	
73	NI7	13.2	698	698>620>602	221, 271	4.70 ± 0.03	4.86 ± 0.01	4.97 ± 0.01	5.07 ± 0.01	4.62 ± 0.03	ND	ND	
74	NI8	14.0	640	640>622>604	366	5.64 ± 0.01	6.16 ± 0.03	6.37 ± 0.03	6.07 ± 0.67	6.02 ± 0.04	5.26 ± 0.02	5.20 ± 0.09	

○ 발효 균주 별 곡자의 시간에 따른 활성의 변화를 확인하기 위해, 세 가지 효소 활성(α -amylase, β -glucosidase, protease)과 ABTS를 이용한 항산화 활성 및 총 플라보노이드/페놀 함량 측정을 실시하였음(그림 3-18). 그 결과, α -amylase 활성과 총 페놀 함량은 *Aspergillus*로 발효된 쌀곡자에서 상대적으로 높았고, 두 개의 효소 활성 β -glucosidase, protease와 항산화 활성, 총 플라보노이드 함량은 발효된 쌀 곡자에서 상대적으로 높음

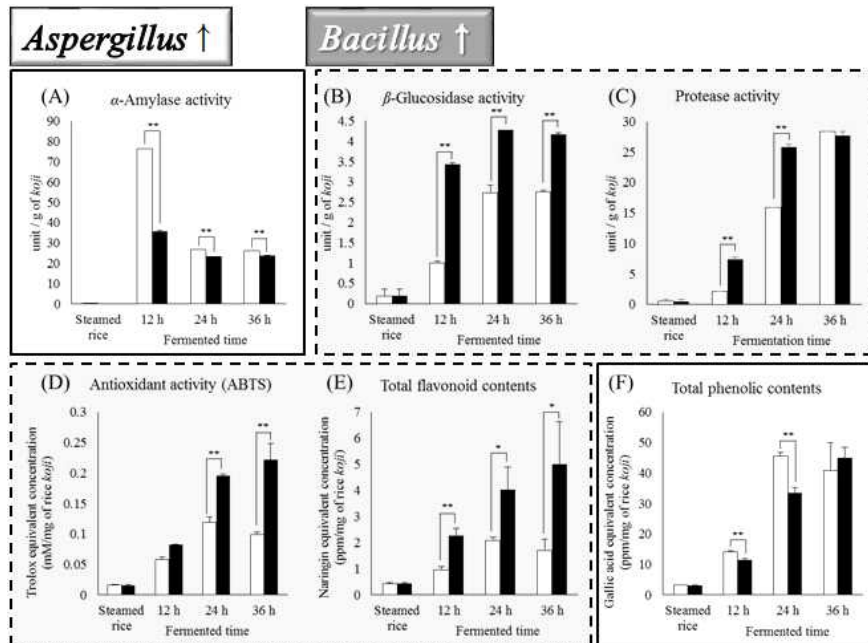


그림 3-18. 쌀 곡자의 균주 별 발효 시간에 따른 효소 활성 및 항산화 활성 변화

- 발효 균주에 따른 대사체 차이를 명확하게 구분 짓기 위해서 *Aspergillus*로 발효된 쌀곡자 12시간-36시간 샘플(RK_AO)과 발효된 쌀곡자 12-36시간 샘플(RK_BA)를 각각 그룹으로서 OPLS-DA를 시행함(그림 3-19)
- *Aspergillus*로 발효된 쌀곡자에서 당 계열, 유기산 계열, 페놀산과 지방산 계열의 함량이 상대적으로 높았고, 발효된 쌀곡자에서는 아미노산 계열, 플라보노이드, 라이소인지질 계열과 세균 특이적인 사이드로포어의 함량이 상대적으로 높은 것을 확인함

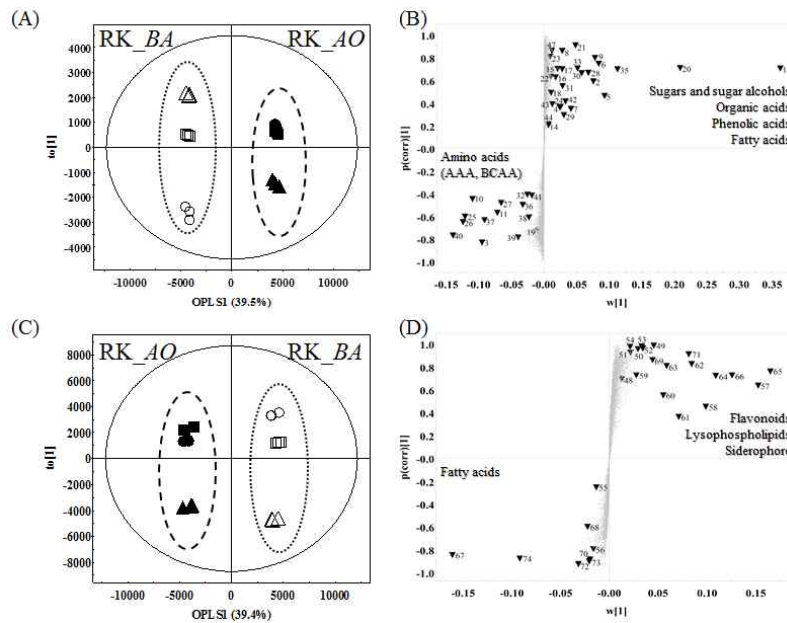


그림 3-19. 발효된 균주별 곡자(12시간 - 36시간)의 OPLS-DA score plot, loading plot. GC-TOF-MS(A, B), UHPLC-LTQ-IT-MS/MS(C, D)

- 균주에 따른 발효 대사 경로를 구분 짓고 그 알고리즘을 구축하기 위해서 다변량 통계분석으로 얻어진 대사체들을 이용하여 대사 경로를 도식화함(그림 3-20). 이를 통해 아래와 같은 발효 균주에 따른 발효 대사 경로의 차이에 대한 결과를 도출할 수 있었음. 당, 유기산, 페놀산 계열의 대사체 함량이 상대적으로 더 많이 증가하면서, carbohydrate metabolism이 *Aspergillus* 발효에서 활발하게 진행됨을 확인함. Amino acid metabolism은 전체적으로 발효에서 더 활발했지만, 세린 관련 metabolism과 연계된 아미노산과 GABA, proline은 *Aspergillus*에서, 방향족 아미노산과 분지사슬아미노산은 발효에서 더 높아지는 것과 같이 서로 다른 발효 경향을 나타냄. 플라보노이드의 경우, 발효가 진행됨에 따라 두 균주에서 모두 아글리콘이 증가하는 경향을 보였으며, 플라보노이드 배당체의 경우, 발효 시 상대적으로 크게 증가하는 현상을 나타냄. Lipids metabolism에서는 지방산은 *Aspergillus* 발효에서 상대적으로 높고, 라이소인지질은 발효에서 상대적으로 높은 경향을 보임

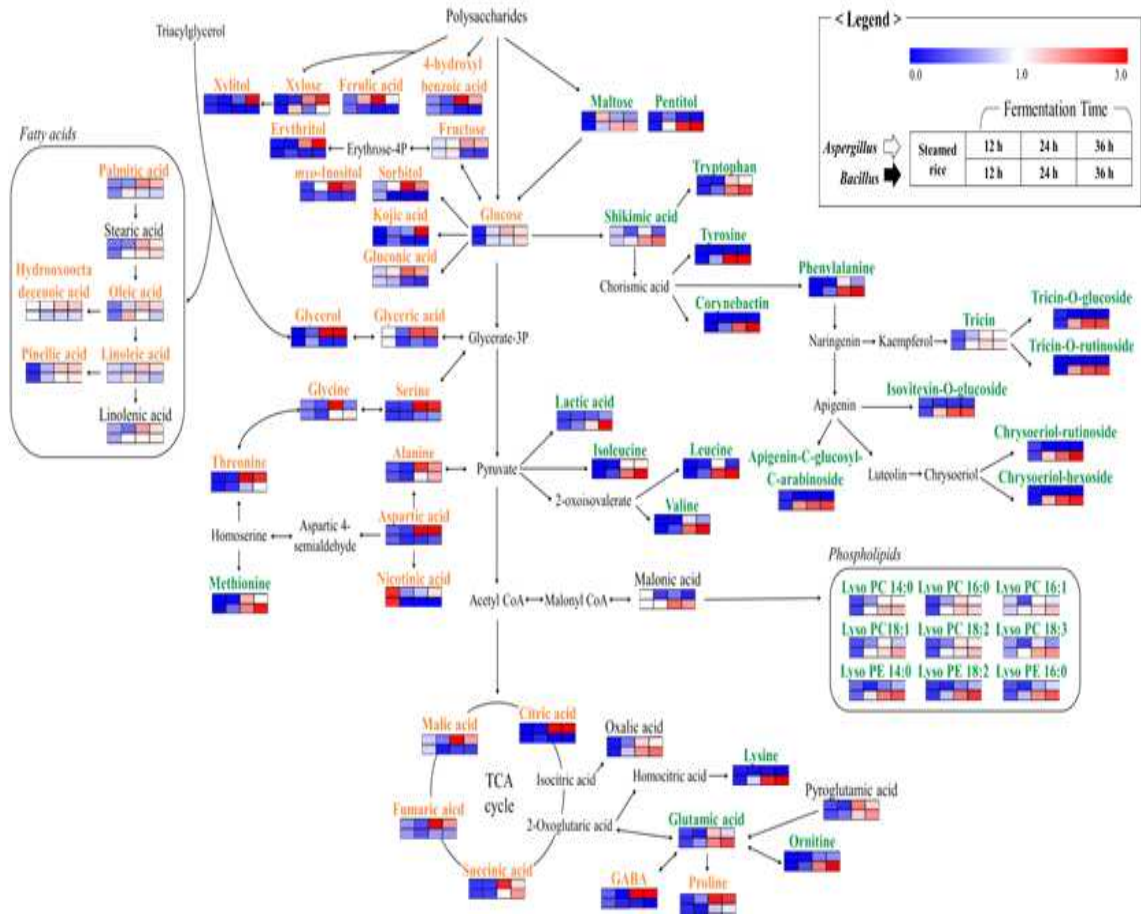


그림 3-20. 도식화된 *Aspergillus* 발효 곡자(RK_AO)와 *Bacillus* 발효 곡자(RK_BA)의 대사 경로

④ 쌀 도정도에 따른 *A. oryzae* 발효 환경 차이 규명

- 쌀은 도정도에 따라 쌀눈 및 겉껍질인 겨의 함량이 달라짐(표 3-8). 따라서 쌀의 도정도(발효 환경)에 따른 *Aspergillus oryzae*의 발효 패턴 및 대사체 차이를 규명하여 곡자 발효 최적화를 하고자 함

표 3-8. 쌀의 도정도에 따른 쌀눈 및 겨의 함량

Degree of milling (DOM)	Proportion of embryo bud and bran layer in rice (%)
0	100
5	50
7	30
9	15
11	5

- 도정도 별 쌀 시료에 *A. oryzae*를 접종하여 96시간 발효를 진행함. 발효 시간에 따른 대사체 프로파일링 결과, 각각의 도정도에 따라 다른 변화 양상을 보임(그림 3-21)

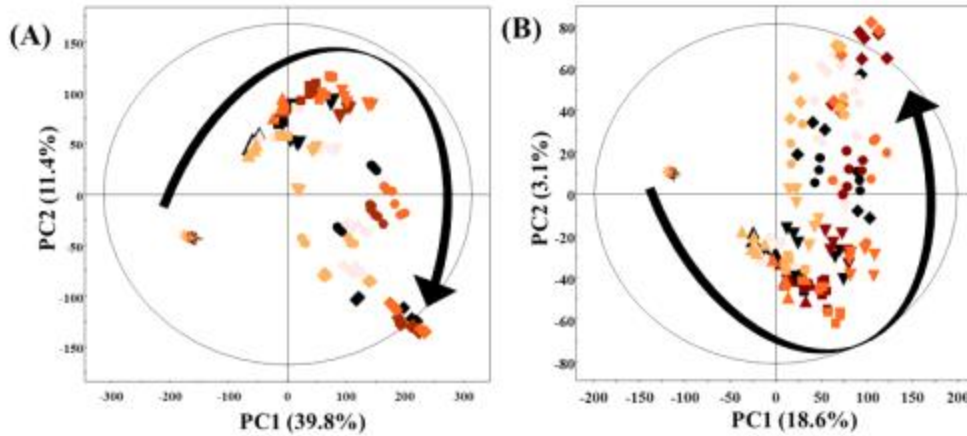


그림 3-21. 쌀 도정도에 따른 배양 시간 별 대사체 프로파일링 결과

- 쌀 도정도에 따른 배양 시간 별 효소 활성 결과는 아래 그림 3-22과 같음. Protease 활성의 경우, 5분도와 7분도에서 시간에 따라 높아지는 활성을 보이며 beta-glucosidase 활성도 비슷한 경향성이 확인됨. 따라서 추후 대사경로 분석을 통해 쌀 도정도에 따른 차이 나는 대사체 및 효소 활성과 관계된 대사 경로를 탐색하고자 함

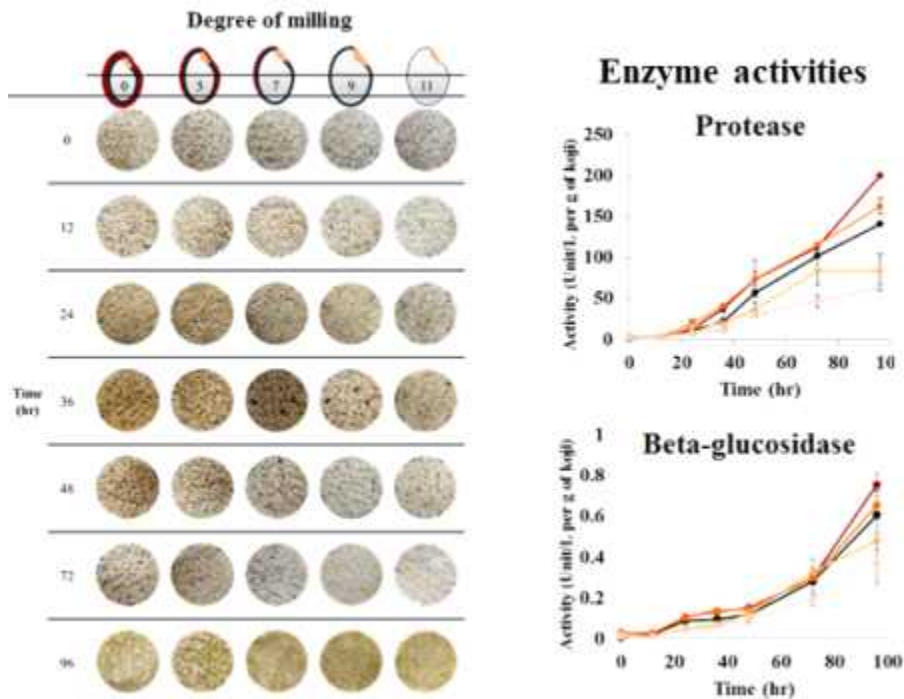


그림 3-22. 쌀 도정도에 따른 배양시간 별 효소 분석 결과

(4) 전통발효식품(된장)의 산업적 공정에 따른 미생물과 발효 대사체간 상호관계 규명

① 전통발효식품(된장) 시료

○ 된장은 두 가지 공정으로 아래 표 3-9와 같은 방법으로 준비하였음. 대두를 깨끗이 씻어 세척한 다음, 물과 함께 110 ℃에서 1시간동안 증자한 뒤 마쇄하였음. 성형틀을 이용하여 성형한 후 건조시킴. 성형된 메주를 발효실에서 산업공정(IP)에서는 14일/개량한 산업공정(MIP)에서는 3일간 발효를 진행하였음. MIP는 또한 건조 후 *Asperigllus oryzae*를 접종시켜 48시간 발효 후, *Bacillus velezensis*를 접종하여 24시간 세균발효 하였음. 총 92일간 염지시켜 된장을 제조하였음. 콩(0일), 증자(1일), 건조(2일), 메주 발효(14일, 3일), 냉각(5일), 염지(37일, 97일)의 시료를 분석을 진행하였음

표 3-9. 전통발효식품인 된장 시료 정보

I. Industrial process (Fermentation in fermentation room)				II. Modified industrial process (Fermentation under controlled microorganism)		
Day (s)	Condi tion	Symbol	Process	Symb ol	Condition (Inoculation)	Day (s)
0		+	Soybean	+		0
1		○	Steaming	○		1
2		●	Drying	●		2
3 (firstday)					<i>Aspergillus oryzae</i> *	3 (firstday)
4		▲	<i>Meju</i> fermentation	▲	<i>Bacillus velezensis</i>	4
5 (lastday)						5 (lastday)
17 (lastday)		▼	Cooling	▼		5
22					<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> *	
37		■	Brining (salt water 21-24%)	■	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	37
40						
51						
81		*	<i>Doenjang</i> aging	*		97
141						

- 된장 시료의 PCA 및 PLS-DA 분석 결과, 콩부터 건조과정, 메주 발효과정, 염지 과정 및 숙성과정을 거쳐 최종 된장으로 그룹 지어지는 경향을 보임. GC-TOF-MS 분석에서는 PC1(29.1%), PC2(13.6%)/ PLS1(29.0%), PLS2(13.5%)에 의해, LC-ESI-MS에서는 PC1(16.2%), PC2(12.6%) /PLS1(16.2%), PLS2(12.9%)에 의해 발효 공정에 따라 변화하여 공정별로 구분되는 경향을 보임 (그림 3-23)

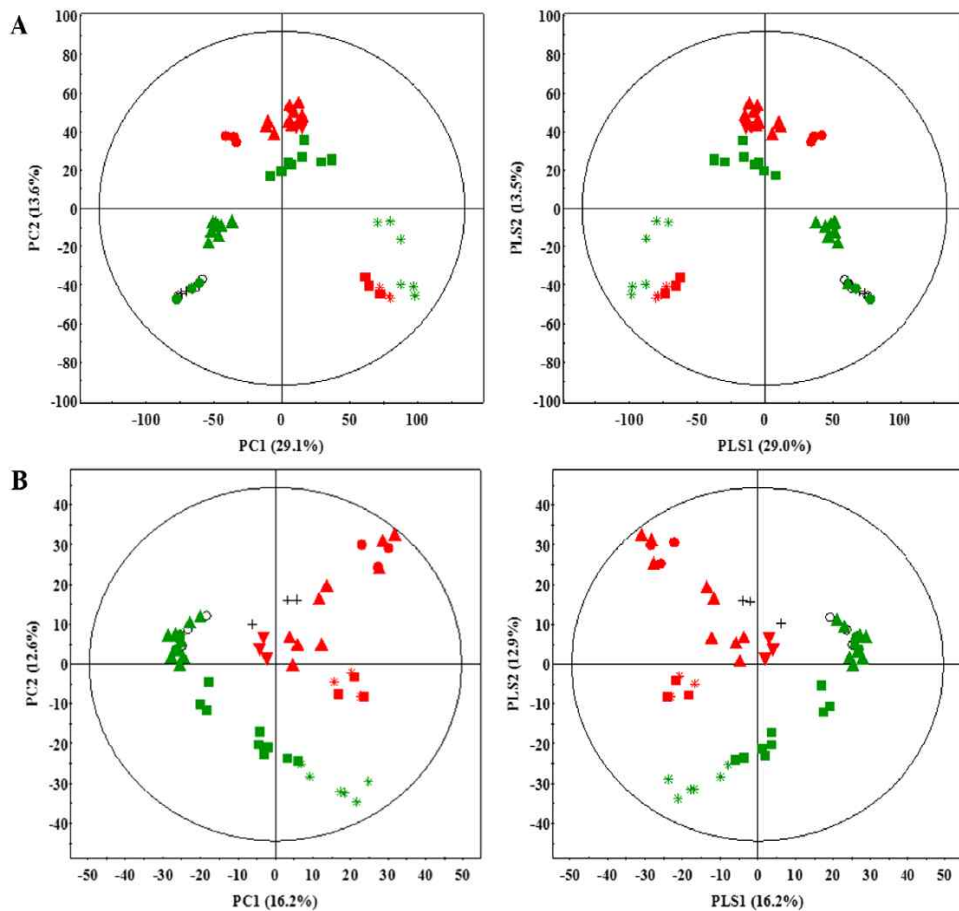


그림 3-23. 된장 공정별 PCA(왼쪽), PLS-DA(오른쪽) score plot.
GC-TOF-MS(A), LC-ESI-MS(B)

- 된장의 다변량 통계 분석 결과, 된장의 공정별 발효 패턴을 구분 짓는 1차 대사산물로 32개가 동정 됨(표 3-10). 이는 VIP-values($VIP > 0.7$)로 선정되었음. 발효 패턴 차이에 기여하는 대사체로는 5개의 유기산(lactic acid, malonic acid, succinic acid, malic acid, citric acid), 14개의 아미노산(alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, glycine, serine, threonine, aspartic acid, pyroglutamic acid, glutamic acid, phenylalanine, glutamine, ornithine), 8개의 당(arabitol, fructose, glucose, mannitol, *myo*-inositol, maltose, melibiose, raffinose), 5개의 지방산(palmitic acid, linoleic acid, oleic acid, linolenic acid, stearic acid)임

표 3-10. GC-TOF-MS에 의해 공정별로 구분 지어지는 된장의 primary metabolite

No	Putative metabolites	RT (min)	Identified ion (m/z)	Derivatized	ID
<i>Organic acids</i>					
1	lactic acid	4.53	73, 147, 117, 219	TMS(× 2)	MS/STD
2	malonic acid	6.44	147, 73, 233	TMS(× 2)	MS/STD
3	succinic acid	7.74	147, 73, 75, 129, 247	TMS(× 2)	MS/STD
4	malic acid	9.73	73, 147, 101, 117, 233	TMS(× 3)	MS/STD
5	citric acid	12.93	73, 147, 273, 247	TMS(× 4)	MS/STD
<i>Amino acids</i>					
6	alanine	5.14	73, 116, 147, 190	TMS(× 2)	MS/STD
7	valine	6.60	73, 144, 218, 100, 86	TMS(× 2)	MS/STD
8	leucine	7.29	73, 158, 102, 232	TMS(× 2)	MS/STD
9	isoleucine	7.55	73, 158, 100, 218	TMS(× 2)	MS/STD
10	proline	7.59	73, 142, 100, 216	TMS(× 2)	MS/STD
11	glycine	7.70	73, 174, 147, 86, 100	TMS(× 3)	MS/STD
12	serine	8.34	73, 204, 100, 116, 278	TMS(× 3)	MS/STD
13	threonine	8.65	73, 101, 117, 147, 291	TMS(× 3)	MS/STD
14	aspartic acid	10.06	73, 232, 100, 147, 202	TMS(× 3)	MS/STD
15	pyroglutamic acid	10.08	73, 156, 147, 86, 100	TMS(× 3)	MS/STD
16	glutamic acid	11.03	73, 246, 128, 230	TMS(× 3)	MS/STD
17	phenylalanine	11.12	73, 218, 172, 100, 266	TMS(× 2)	MS/STD
18	glutamine	12.47	73, 116, 156, 245	TMS(× 2)	MS/STD
19	ornithine	12.87	73, 142, 174,200	TMS(× 2)	MS/STD
<i>Sugar and sugar derivatives</i>					
20	arabitol	12.08	73, 147, 217, 103, 307	TMS(× 5)	MS/STD
21	fructose	13.45	73, 103, 147, 217, 307	TMS(× 5)	MS/STD
22	glucose	13.68	73, 147, 205, 89, 319	TMS(× 5)	MS/STD
23	mannitol	13.94	73, 147, 205, 103, 319	TMS(× 6)	MS/STD
24	<i>myo</i> inositol	15.22	73, 147, 217, 103, 319	TMS(× 6)	MS/STD
25	maltose	19.70	73, 147, 103, 204, 243, 361	TMS(× 8)	MS/STD
26	melibiose	20.43	72, 103, 147, 204, 361	TMS(× 8)	MS/STD
27	raffinose	24.98	73, 103, 129, 217, 361, 437	TMS(× 11)	MS/STD
<i>Fatty acids</i>					
28	palmitic acid (16:0)	14.61	73, 75, 117, 129, 145, 313	TMS(× 1)	MS/STD
29	linoleic acid (18:2)	15.89	75, 73, 129, 95, 337	TMS(× 2)	MS/STD
30	oleic acid (18:1)	15.93	75, 73, 129, 117, 339	TMS(× 1)	MS/STD
31	linolenic acid (18:3)	15.95	75, 73, 129, 335	TMS(× 1)	MS/STD
32	stearic acid (18:0)	16.09	73, 117, 75, 145, 341	TMS(× 1)	MS/STD

○ 된장의 다변량 통계 분석 결과, 된장의 공정별 발효 패턴을 구분 짓는 2차 대사산물로 14개가 동정 됨(표 3-11). 이는 VIP-values(VIP > 0.7)로 선정되었음. 발효 패턴 차이에 기여하는 대사체로는 7개의 이소플라본(daidzin, glycitin, malonyldaidzin, genistin, malonylgenistin, daidzein, genistein), 7개의 사포닌계열(soyasaponin V, soyasaponin I, soyasaponin II, soyasaponin III, soyasaponin IV, soyasaponin γ a, soyasaponin γ g)임

표 3-11. LC-ESI-MS에 의해 공정별로 구분 지어지는 된장의 secondary metabolite

No.	Putative metabolites	RT (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	[M+H] ⁺ (m/z)	MW	[M-H]- MS ⁿ fragment ions (m/z)
<i>Isoflavones</i>						
1	daidzin	11.8	415	417	416	415, 295, 267, 252
2	glycitin	12.3	445	447	446	445/333, 275, 155
3	malonyldaidzin	13.5				457/253
4	genistin	13.8	431	433	432	431/268, 239, 210, 224, 195
5	malonylgenistin	15.3				473/269
6	daidzein	16.9	253	255	254	253/224, 195, 167
7	genistein	19.5	269	271	270	269/224, 195, 167, 139
<i>Soyasaponins</i>						
8	soyasaponin V	21.9	957	-	959	-
9	soyasaponin I	26.1	941	-	943	-
10	soyasaponin II	27.0	911	-	913	-
11	soyasaponin III	27.1	795	-	797	-
12	soyasaponin IV	27.6	765	-	767	-
13	soyasaponin γ g	29.7	921	-	922	-
14	soyasaponin γ a	29.7	891	-	892	-

○ 된장의 대사경로 및 알고리즘을 구축하기 위하여, 다변량 통계분석으로 얻어진 대사체들을 이용하여 대사경로를 구축하였음(그림 3-24). 대사경로를 통해, 이당류가 감소하고 단당류가 증가하는 경향으로 인한 풍미 및 아미노산의 증가로 향미의 변화를 추측할 수 있음

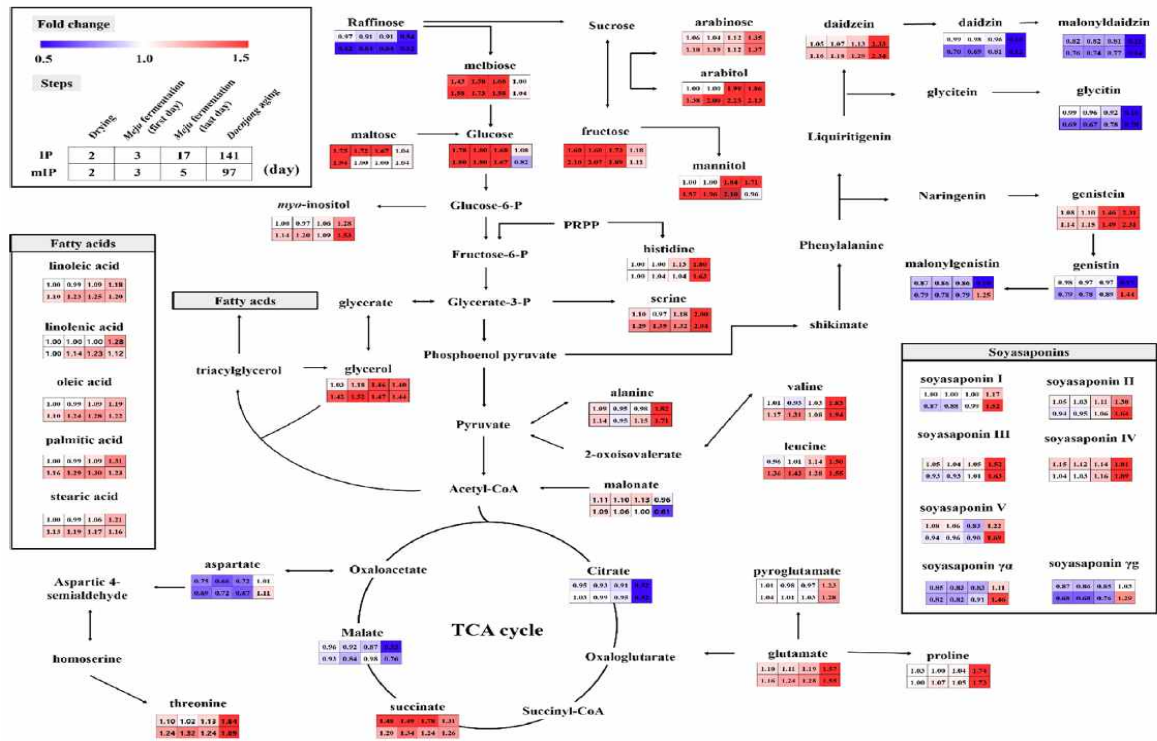


그림 3-24. 된장의 공정별 대사경로

○ 공정에 주로 기인하는 미생물을 찾기 위해, DGGE gel을 이용한 미생물 동정을 진행하였음(표 3-12). 박테리아의 경우, IP에서는 *Bacillus subtilis*가 발효 및 숙성 전체에 기여하는 것으로 확인되었고, MIP의 시료에서는 *B. amyloliquefaciens*가 발효전체에 관여하고, 숙성이 진행되면서 내염성 세균인 *Tetragenococcus halophilus*가 관여하는 것으로 확인되었음. 곰팡이의 경우, IP의 시료에서는 *A. oryzae*가 발효 및 숙성 전반에 관여하는 것으로 확인되며, MIP에서는 발효 초기까지는 *A. oryzae*가 관여하지만 염지(숙성) 단계에서 *Saccharomyces cerevisiae*가 관여하는 것으로 보임

표 3-12. 된장의 공정별 미생물 프로파일링

No.	Closest relative	NCBI accession no.	Preprocessing soy	Industrial process (IP)										Modified industrial process (MIP)							
				dry		meju fermentation			brining		aging			dry		meju fermentation			cool	brin	age
				0	1	2	3	4	1	2	4	5	8	14	2	3	4	5	5	3	9
Bacteria																					
B1	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	HF 562962	+																		
B2	<i>sonorensis</i>	JX986832.1		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+							+	+
B3	<i>licheniformis</i>	JN215522.1																			
B4	<i>subtilis</i>	JX993836.1			+	+	+	+	+	+	+	+	+							+	+
B5	<i>velezensis</i> ^a	-																		+	+
B6	<i>Weissella cibaria</i>	HF562960.1																		+	+
B7	<i>Enterococcus lactis</i>	HF562969.1																		+	
B8	<i>Carnobacterium</i>	JX860593.1																		+	

(5) 전통발효식품의 산업적 QC 지표 제공

① 전통발효식품(고추장) 시료

- 18종의 시판 고추장은 일반 마켓에서 구매하였으며, 시료 정보는 표 3-13와 같음. 18종의 시판 고추장은 3종의 밀 고추장, 5종의 현미 고추장, 9종의 백미 고추장으로 나뉨. 3종의 밀 고추장은 모두 태양초 고춧가루를 이용하였음. 5종의 현미 고추장 중 3종은 태양초 고춧가루, 2종은 청양 고춧가루를 이용함. 9종의 백미 고추장 중 6종은 태양초 고춧가루, 3종은 태국산 고춧가루를 이용하였음

표 3-13. 18종의 시판 고추장 정보

Sample No.	Type of cereal	Species of hot pepper	Abbreviation
1	Wheat gochujang (WG)	<i>Capsicum annuum</i>	WG-CA
2			
3			
4			
5	Brown rice gochujang (RbG)	<i>Capsicum annuum</i>	RbG-CA
6		<i>Capsicum annuum</i> cv.Chung-yang	RbG-CAY
7			
8			
9	White rice gochujang (RwG)	<i>Capsicum annuum</i>	RwG-CA
10			
11			
12			
13			
14			
15		<i>Capsicum frutescens</i>	RwG-CF
16			
17			
18			

- 일정량의 고추장을 50 mL falcon tube에 넣고, 80% Methanol(v/v)을 넣음. Sonication 15분 후, mixermill을 이용하여 30 Hz, 3분간 교반해줌. Speed vacuum을 이용하여 시료 농축 후, 다시 80% Methanol(v/v)을 이용하여 농도를 맞춰 녹여줌. 농도를 맞춘 시료를 GC-TOF-MS 및 UHPLC-LTQ-ESI-IT-MS/MS를 분석함
- 18종의 시판고추장의 다변량 통계분석 결과(그림 3-26), PCA 상에서 밀고추장과 쌀 고추장(현미, 백미)이 가장 크게 나뉘는 변수임을 확인함. 쌀 고추장 내에서도 현미 고추장과 백미 고추장이 서로 나뉘는 경향을 보임. 또한 고춧가루에 의해서도 나뉘는 경향을 보임

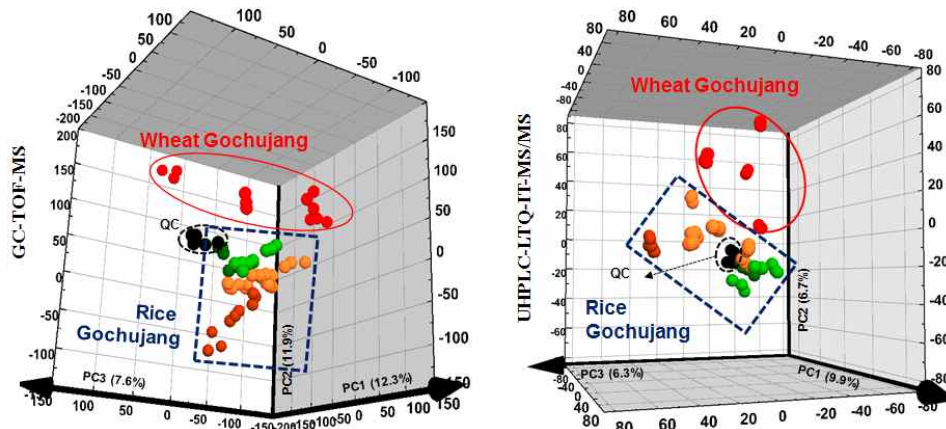


그림 3-26. 18종 시판 고추장의 다변량 통계분석 결과

- 18종의 시판고추장의 곡물에 따른 대사체 차이를 보기 위하여 PLS-DA 분석을 수행함(그림 3-27). PLS-DA 분석결과, 곡물에 따른 차이가 크게 남을 확인함. 따라서 Heat-map 분석을 통하여 곡물에 따른 대사체의 차이를 시각화하여 확인하고자 함(그림 3-28). 밀 고추장의 경우, 다양한 아미노산(*serine, phenylalanine, glycine, pyroglutamic acid, glutamic acid, isoleucine, leucine, proline, valine, threonine*)과 *apigenin-C-hexoside-C-pentoside, dihydrocapsolate, linoleic ethanolamide*가 많은 함량을 보임. 현미 고추장의 경우, 다양한 지질계열(*lysoPC 18:2, lysoPC 14:0, lysoPC 16:0, lysoPC 18:1, lysoPC 18:2*)과 2개의 지방산(*linoleic acid, oleic acid*), *sucrose, quercetin-O-rhamnoside, luteolin-C-hexoside*가 많은 함량을 보임. 백미 고추장에서는 *genistein-O-di-hexoside, maltose, palmitic acid, GABA, dihydrocapsaicin, glucose*가 상대적으로 많은 함량을 가지고 있음

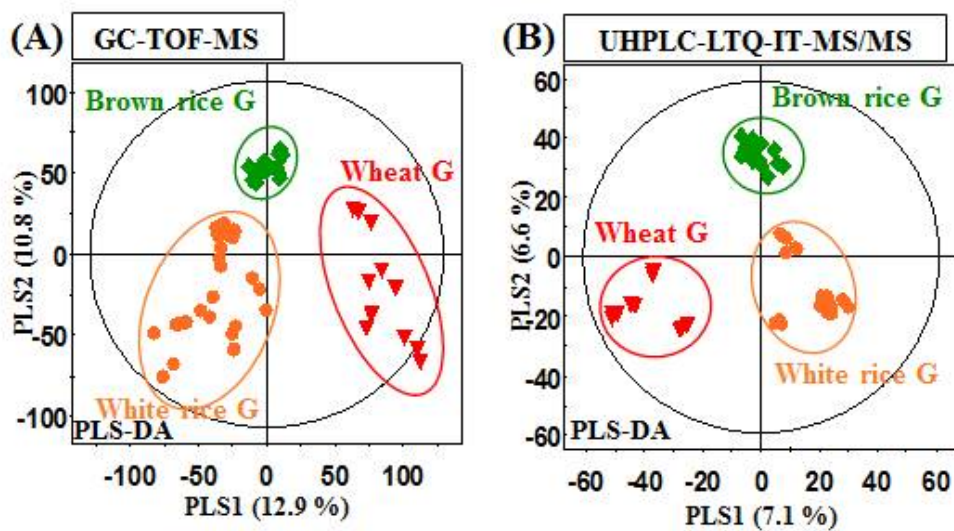


그림 3-27. 곡물에 따른 시판 고추장의 다변량 통계분석 결과

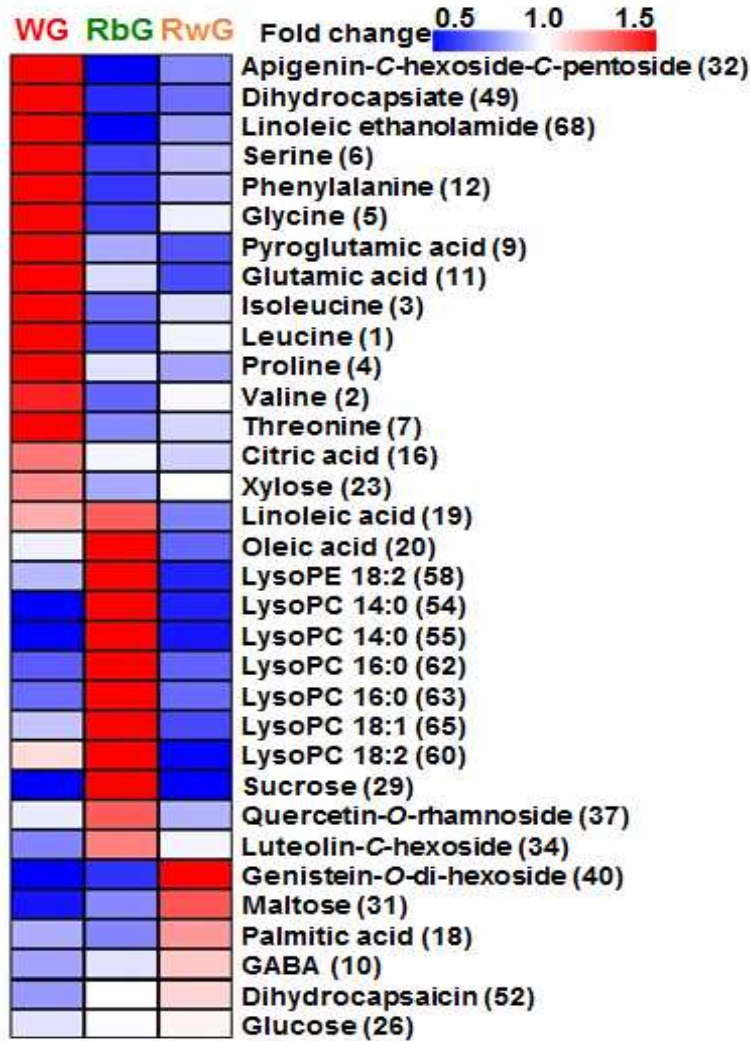


그림 3-28. 곡물에 따른 시판 고추장의 Heat-map 분석결과

- 밀 고추장에서 많은 다양한 아미노산의 경우, 전통발효식품에서 향과 맛을 결정하는 중요한 요소임. 또한, citric acid는 신 맛에 관여한다고 알려져 있음. 이렇게 다양한 산들이 많은 밀 고추장에서는 아미노태 질소와 산도가 상대적으로 다른 고추장들에 비하여 높은 경향성을 보임(그림 3-29)

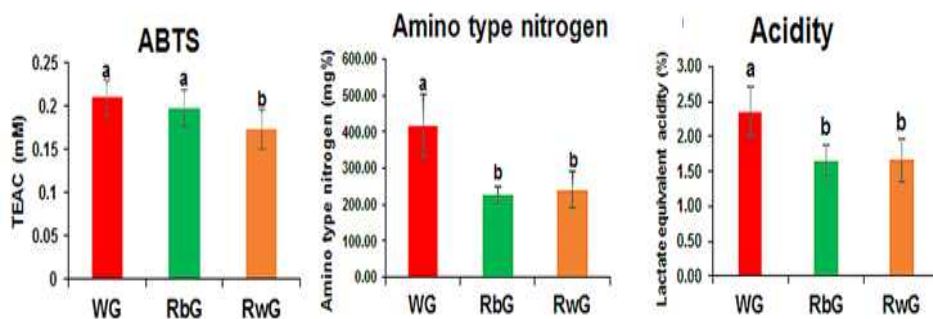


그림 3-29. 곡물에 따른 시판 고추장의 이화학적 실험 결과

- 현미 고추장에서는 다른 고추장에 비하여 지질 계열의 대사체들이 높은 함량을 보임. 이러한 지질 대사체들은 현미의 껍질에서 유래됨을 확인하였으며, 그에 따라 다양한 생리 활성화에 관여한다고 알려져 있음
- 백미 고추장의 경우, 다른 고추장에 비하여 maltose나 glucose의 함량이 높은 경향을 보임(그림 3-30). 이는 amylose hydrolysis 활성이 현미에 비하여 빠르게 일어나기 때문임을 확인함

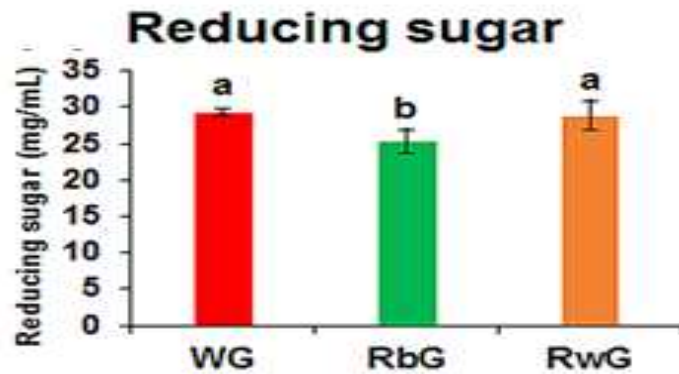


그림 3-30. 곡물에 따른 시판 고추장의 환원당 실험 결과

- 실험에서 사용된 고춧가루는 총 3 종류로, 태양초, 청양 고추, 베트남 고추로 구성됨. 18종의 전체 다변량 통계분석 결과, 고춧가루에 의한 차이를 보여 그에 따른 다변량 통계분석을 재 실시함(그림 3-31)

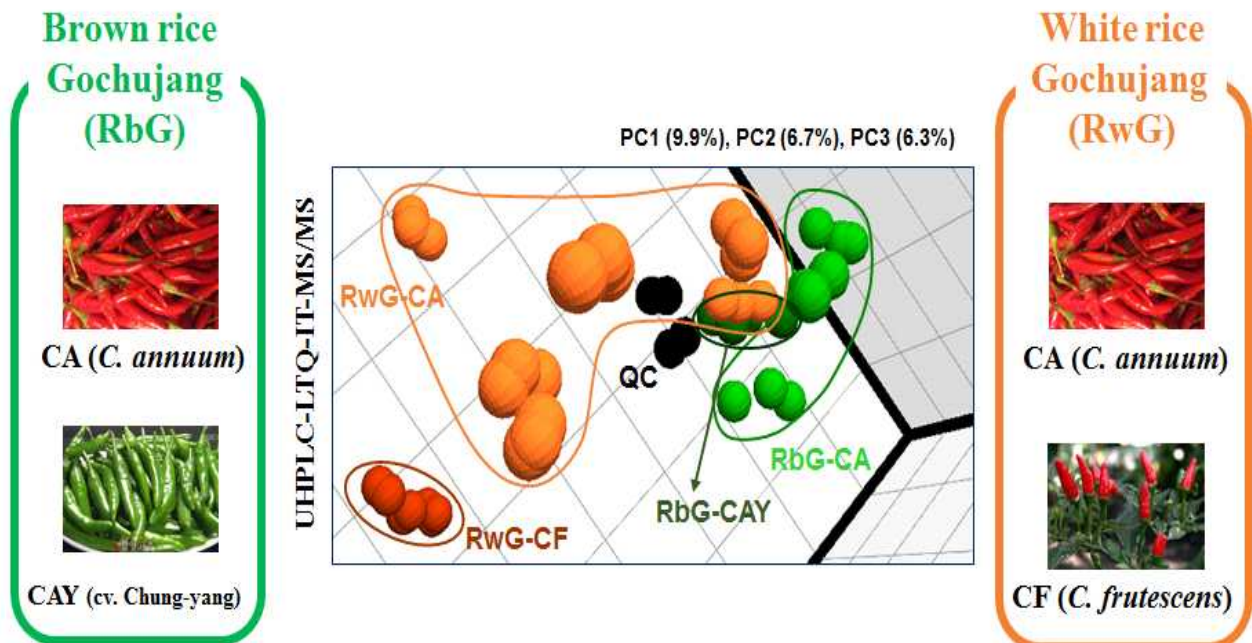


그림 3-31. 고춧가루에 따른 시판 고추장의 전체 PCA 결과

○ 현미 고추장에서는 태양초와 청양 고추로 만들어진 고춧가루가 사용됨. 따라서 태양초와 청양 고춧가루 두 그룹으로 나누어 OPLS-DA를 실시하였으며, 그에 따른 차이나는 대사체를 확인함(그림 3-32). OPLS-DA 결과, 태양초 고춧가루를 사용한 현미 고추장과 청양고추의 고춧가루를 사용한 현미 고추장이 구분됨을 확인함. VIP value 및 p value를 통해서 두 그룹간의 차이나는 대사체를 확인함(그림 3-33). 다양한 캡사이신 관련 대사체(dihydrocapsiate, nordihydrocapsaicin, capsaicin, dihydrocapsaicin)들이 태양초 고춧가루에 비하여 청양 고추에 많은 함량이 있고 통계적으로 유의함을 확인함. 이는 일반적으로 태양초에 비하여 청양 고추가 맵다고 알려져 있고, 캡사이신 관련 대사체들을 매운맛에 관여한다고 잘 알려져 있음. 그 밖에도 다양한 항산화 관련 실험 결과(그림 3-34), 캡사이신 관련 대사체가 많은 청양고추로 만든 현미 고추장이 태양초 고추보다 통계적으로 높음을 확인함.

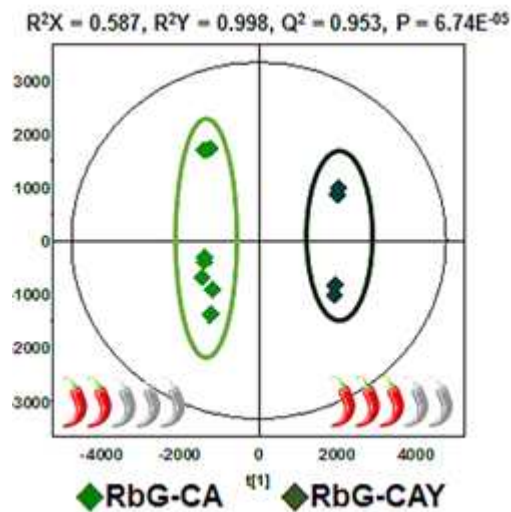


그림 3-32. 고춧가루에 따른 현미 고추장의 다변량 통계분석 결과

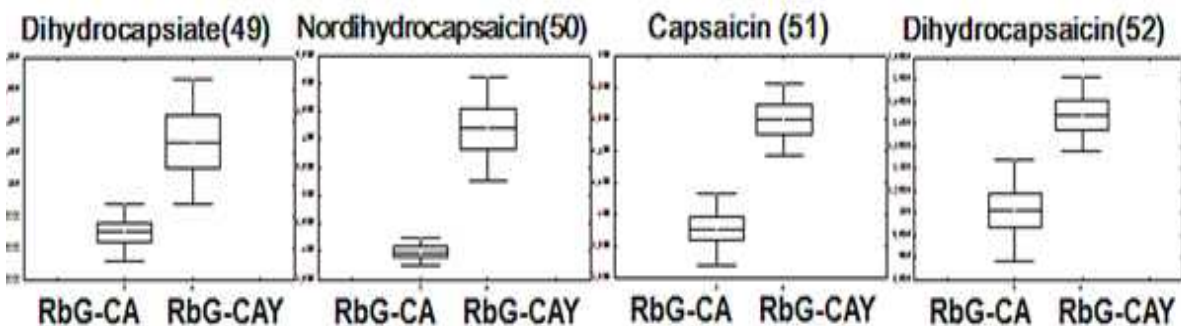


그림 3-33. 고춧가루에 따른 현미 고추장의 유의적 차이나는 대사체의 box-whisker plot

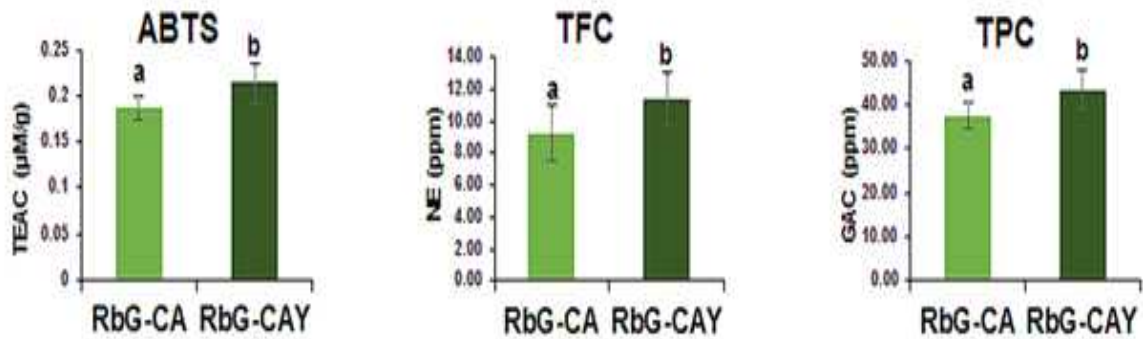


그림 3-34. 고춧가루에 따른 현미 고추장의 항산화 관련 실험 결과

○ 백미 고추장은 태양초와 베트남 고추로 만든 고춧가루가 이용됨. 두 그룹간의 차이를 보기 위하여 OPLS-DA를 실시함(그림 3-35). OPLS-DA 분석결과, 태양초 고춧가루와 베트남 고추의 고춧가루는 통계적으로 유의미하게 나뉘는 것을 확인함. VIP value와 *p* value를 이용하여 두 그룹간의 유의적으로 차이 나는 대사체를 확인함(그림 3-36). 4 종류의 캡사이신 관련 대사체(dihydrocapsiate, nordihydrocapsaicin, capsaicin, dihydrocapsaicin)과 3가지 luteolin 계열의 대사체(luteolin, luteolin-*C*-hexoside, luteolin-*O*-apiosyl-glucoside)가 태양초 고춧가루에 비하여 많은 함량을 가지고 있음. 베트남 고추의 경우, 일반적으로 청양 고추보다 매운 맛을 가지고 있으며, 특이적으로 luteolin 계열의 대사체들이 많다는 것을 확인하였음. 백미 고추장에서 고춧가루에 따른 항산화 관련 실험 결과(그림 3-37), 다양한 캡사이신과 luteolin 계열의 대사체들이 많은 베트남 고추의 고춧가루를 사용한 백미 고추장에서 높음을 확인함

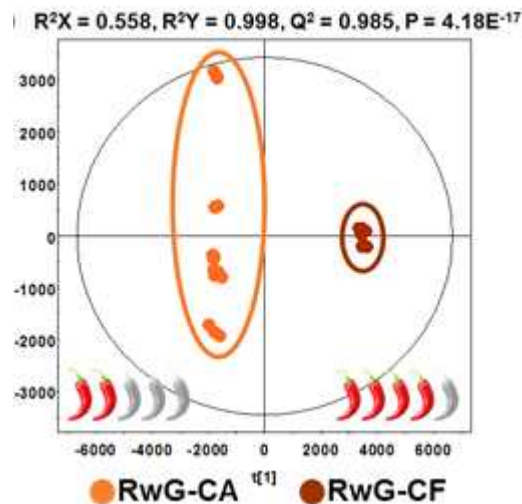


그림 3-35. 고춧가루에 따른 백미 고추장의 다변량 통계분석 결과

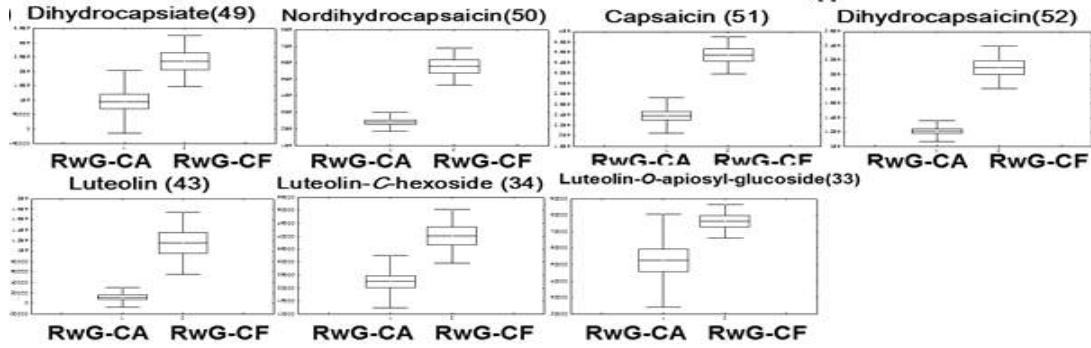


그림 3-36. 고춧가루에 따른 백미 고추장의 차이나는 대사체의 box-whisker plot

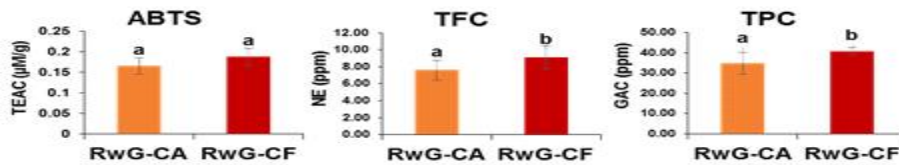


그림 3-37. 고춧가루에 따른 백미 고추장의 이화학적 실험 결과

- 백미대사체 프로파일링을 통하여 18종 시판고추장의 곡물 및 고춧가루에 따른 대사체 차이를 확인하였음. 각각의 다변량 통계분석을 통하여 얻어진 결론을 종합하면, 선정된 그룹간의 유의적으로 차이나는 대사체들은 전통발효식품 중 고추장의 품질관리에 지표 물질로 사용될 수 있음

(6) *Aspergillus* 균주 간 메타-메타볼로믹스 연계분석을 통한 미생물 상호작용 연구

- 전통발효의 경우, 다양한 균주들이 서로 간의 상호작용을 하며 발효가 진행됨. 장류의 핵심균주인 *A. oryzae*의 복합 발효 시 일어나는 휘발성 대사체의 상호작용에 따른 대사체 프로파일링을 수행하고자 함(그림 3-38). 균주 1(*A. oryzae* KACC44967)의 경우, 균주2(*A. oryzae* RIB40)와의 co-culture 스트레스 상황에서 sclerotia를 형성하는 특징을 가지고 있으나 균주 2의 경우 sclerotia(어떤 종류의 균류의 균사가 덩어리진 것)를 형성하지 않음. 균주 1과 균주 2 사이에 필터를 넣고 배양 시 휘발성 물질이 상호작용하며 균주 1의 sclerotia 형성에 어떠한 영향을 끼치는 지를 확인하고자 함

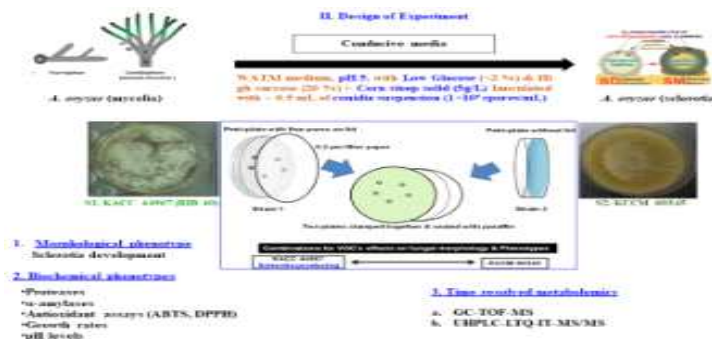


그림 3-38. *Aspergillus* 균주 간 상호작용 실험방법

- Morphology 확인 결과(그림 3-39), 균주 1의 단독 배양 경우, 7일째부터 sclerotia 를 형성됨. 그러나 균주1과 균주2의 co-culture 시, sclerotia 형성이 9일로 늦춰지는 양상을 보임

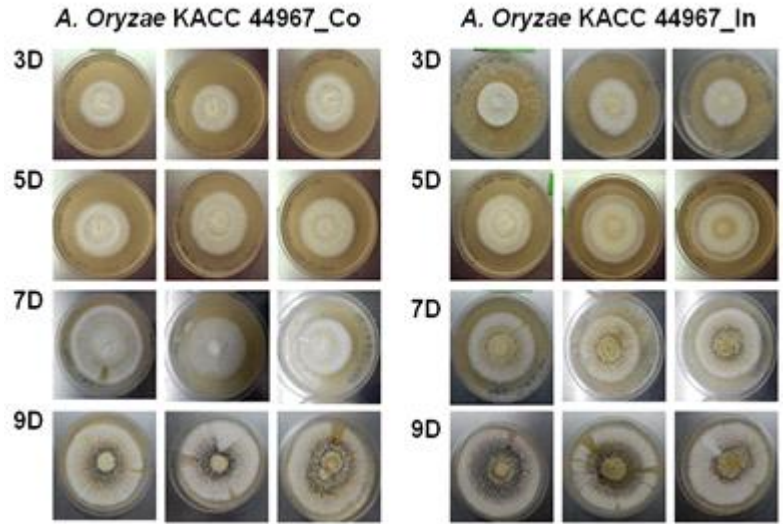


그림 3-39. *Aspergillus* 균주 간 상호작용의 morphology 결과

- 다양한 효소 및 항산화력 측정 결과(그림 3-40), protease와 amylase 효소 활성의 경우 유의적으로 co-culture에서 높은 경향성을 나타냄. ABTS 및 DPPH 항산화 실험 결과도 마찬가지로 7일째의 co-culture에서 유의적으로 높은 경향성을 보임

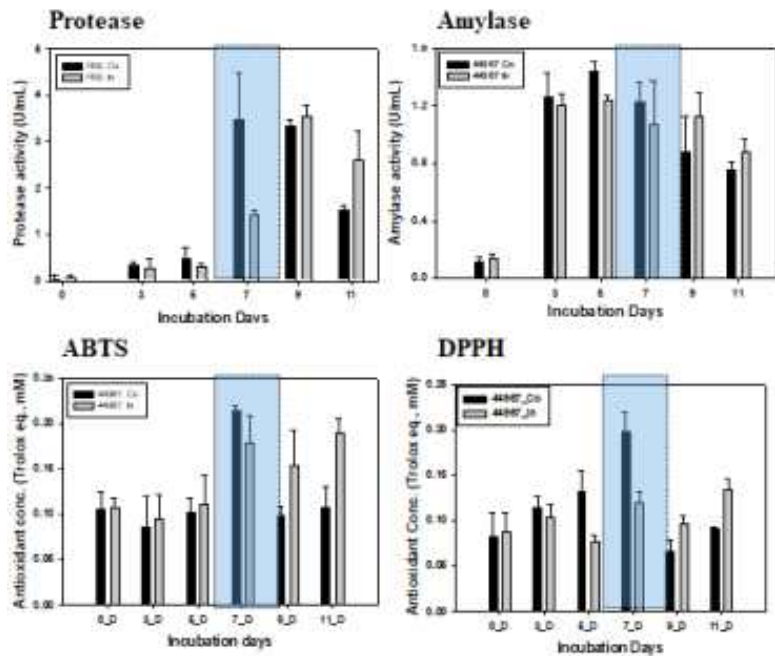


그림 3-40. *Aspergillus* 균주 간 상호작용의 효소 및 항산화 활성 실험 결과

○ *Aspergillus* 균주 간 상호작용의 GC-TOF-MS 및 다변량 통계분석 결과(그림 3-41), 배양 시간에 따른 대사체들의 차이를 보임

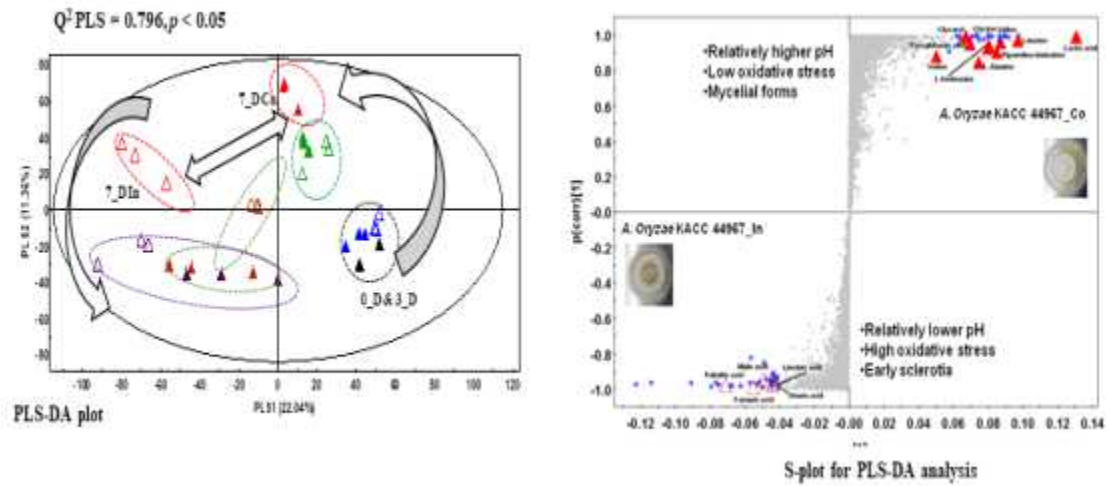


그림 3-41. *Aspergillus* 균주 간 상호작용의 GC-TOF-MS 분석 결과

○ *Aspergillus* 균주 간 상호작용의 heat-map 분석결과(그림 3-42), 다양한 유기산, 아미노산, 당류, 지방산 등이 균주 및 배양 시간에 따른 차이를 보이는 것으로 확인됨. 특히 co-culture 시에는 7일까지 아미노산과 당류가 급증하고 9일차부터 감소되는 경향을 보이며, 균주 1 단독 배양 시 유기산이 7일째에 급증하였다가 그 이후 감소하는 경향을 보임

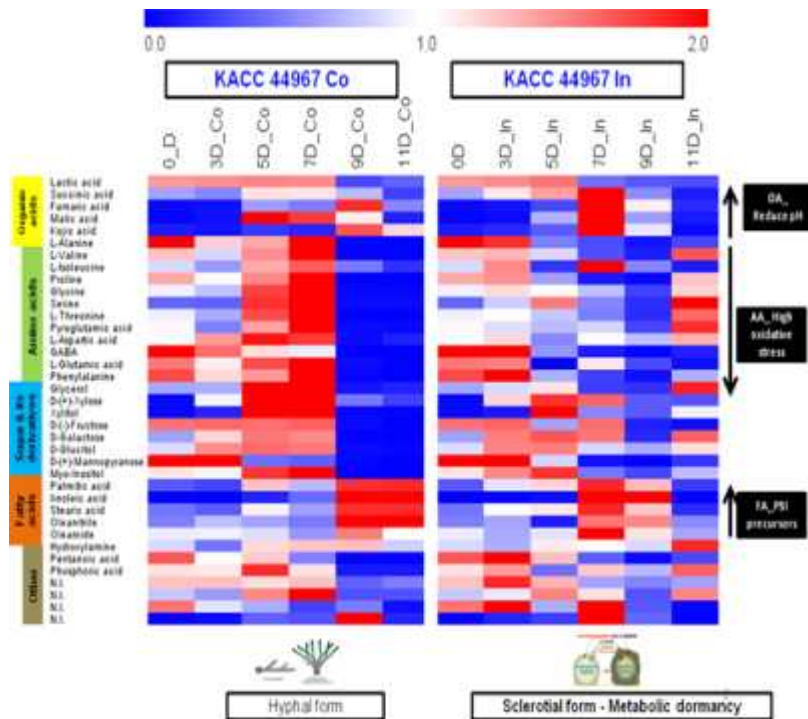


그림 3-42. *Aspergillus* 균주 간 상호작용의 heatmap 분석 결과

(7) 농식품 미생물자원 유래의 발효 대사체 In-house library 구축

- 본 연구진은 식물, 미생물, 천연물, 발효 및 생체 대사체 연구를 통해 다양한 기능 대사체를 In-house library에 구축하였음. 본 과제를 통하여 농식품 미생물자원에서부터 얻어지는 새로운 발효 대사체들에 대한 In-house library를 구축하였음(그림 3-43)
- 미생물 발효 및 발효식품 대사체 연구의 경우, 체계적이고 방대한 양의 In-house library를 가진 연구진만이 상관관계 해석 등의 통합적인 연구를 진행하는데 중요함

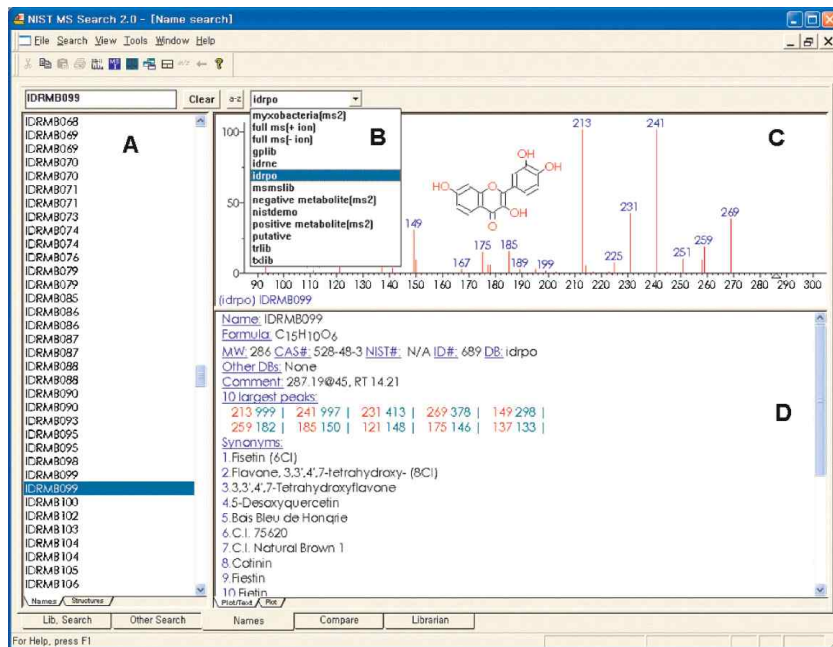


그림 3-43. In-house library 구축의 예

- 농식품 미생물자원에서부터 얻어지는 1차 대사산물(아미노산, 지방산, 당류, 유기산 등)과 향미성분 대사체의 GC-MS 분석을 통하여 In-house library를 구축하였음
- 농식품 미생물자원에서부터 얻어지는 2차 대사산물(활성 및 기능성 관련 성분)의 LC-MS 분석을 통하여 In-house library를 구축하였음
- 본 연구를 통해 확장된 대사체 In-house library의 경우, off-line으로만 확인이 가능함. 따라서 사업단 및 연구팀의 요청 시, 다양한 농식품 미생물자원의 대사체 DB 관련 협력연구를 수행하겠음

<제 1세부위탁(이화여자대학교): 향미대사체 해석 기반 농식품 미생물자원 탐색 >

3-1 연구개발의 내용 및 연구 결과

가. 연구개발 내용 및 결과

(1) 배양조건에 따른 콩/밀 koji의 휘발성 대사체 프로파일링의 비교 분석

(가) 콩/밀 koji의 휘발성 대사체 분석 조건 확립

- 건국대에서 제공한 *A. oryzae*와 *B. amyloliquefaciens*로 접종한 콩/밀 koji의 휘발성 대사체를 solid phase microextraction(SPME) 추출법과 gas chromatography(GC/MS)를 이용하여 분석하였다. 각 샘플의 정보는 아래 표 3-14와 같음

표 3-14. 밀/콩 koji 정보

종류	세부정보	Label	
밀	증자밀	RW	
	밀발효_ <i>A.oryzae</i> 12h	WA12	
	밀발효_ <i>A.oryzae</i> 24h	WA24	
	밀발효_ <i>A.oryzae</i> 36h	WA36	
	밀발효_ <i>B.amyloliquefaciens</i> 12h	WB12	
	밀발효_ <i>B.amyloliquefaciens</i> 24h	WB24	
	밀발효_ <i>B.amyloliquefaciens</i> 36h	WB36	
	콩	증자콩	RS
		콩발효_ <i>A.oryzae</i> 12h	SA12
콩발효_ <i>A.oryzae</i> 24h		SA24	
콩발효_ <i>A.oryzae</i> 36h		SA36	
콩발효_ <i>B.amyloliquefaciens</i> 12h		SB12	
콩발효_ <i>B.amyloliquefaciens</i> 24h		SB24	
콩발효_ <i>B.amyloliquefaciens</i> 36h		SB36	

- SPME 추출법은 시료를 일정 온도로 유지시켜 headspace상으로 휘발성 성분을 이 동시키고 이를 polymer로 코팅된 fiber를 이용해 추출하는 방법으로써, 용매를 사용하지 않고 비교적 적은 양의 시료로 분석할 수 있는 방법으로 알려져 있음. 각 시료를 액체 질소에서 1분간 얼린 후, 막자사발로 갈고 일정 Mesh(25~32mesh)를 통과한 샘플을 취함. 20mL screw vial에 시료 2.5g을 넣고 분석 중 효소반응 진행을 최소화하기 위하여 포화 염화나트륨용액을 4ml 추가하여 screw cap(Ultraclean 18mm, Agilent technologies, Germany)으로 막음. 이 때, 각 시료의 휘발성 성분들을 흡착시키기 위해 CAR/PDMS/DVB SPME fiber(Supelco, Bellefonte, PA, USA)

를 사용하였음. SPME법을 통해 추출한 시료의 휘발성 대사체는 7890A GC system 과 5975C mass detector(Agilent technologies, USA)를 이용하여 분석함. Screw vial에 든 시료를 250RPM, 40℃에서 30분간 유지시켜 평형을 이룬 뒤, 30분간 흡착 함. 그리고 230 ℃에서 5분간 유지하며 휘발성 향기성분을 탈착함. Column은 DB-Wax(30m length×0.25mm I.D.×0.25µm film thickness, J&W Scientific, USA)를 사용함

(나) 휘발성 대사체의 동정 및 정량

○ SPME법으로 추출한 휘발성 향기성분의 동정은 mass spectral database(W9N08.L) 및 manual interpretation에 의해 수행됨. 그리고 saturated alkanes(100ppm in hexane)을 외부 표준물질로 사용하여 각 휘발성분의 RI(Retention Index)를 구한 후 문헌에서 보고된 RI값과 비교하였으며, 정량을 위하여 L-borneol 100ppm(w/v, in methanol)을 내부 표준물질로 이용함

(다) 데이터의 다변량 분석

○ 모든 실험은 3반복으로 행하여 평균과 표준편차로 나타내었으며, 군주별로 차이를 비교 분석하기 위해 SIMCA-P software(SIMCA-P version 11.0, Umetric, Umeå, Sweden)을 이용하여 다변량 분석을 실시하였음

(라) 접종 균주를 달리한 밀 koji의 휘발성 대사체 프로파일링 비교 분석

○ *A. oryzae*(WA)와 *B. amylolicheniformis*(WB)를 각각 접종한 밀 koji의 12, 24, 36 시간별 배양 시간별로 샘플링하여 SPME 추출 및 GC/MS로 분석함. 주요 결과는 표 3-15에 나타내었고, 각 koji의 휘발성 대사체의 프로파일링 변화패턴을 확인하기 위하여 partial least square- discriminant analysis(PLS-DA)를 수행함(그림 3-44). PLS-DA는 샘플들의 특성에 따라 분류하거나 모델 시스템을 구축하는데 매우 효율적인 통계기법으로 와인의 포도 품종을 분류하거나 메주의 수용성 대사체를 발효기간에 따라 분류하는 등의 연구들이 활발하게 진행되고 있음

표 3-15. 접종 균주를 달리한 밀 koji의 배양시간별 휘발성 대사체의 프로파일링 비교

No.	Possible compound	RI ¹⁾	Relative peak area ratio ²⁾						
			RW	WA12	WA24	WA36	WB12	WB24	WB36
Acids									
v10 4	Acetic acid	1444	ND ³⁾ a ⁴⁾	3.20±0.6 1a	11.48±0.7 2b	2.27±0.2 6a	1.33±0.30a	0.75±0.0 9a	19.13±4.94 c
v11 7	2-Methylpropanoic acid	1567	NDa	NDa	5.93±0.42 c	1.97±0.1 0b	6.30±0.92c	5.69±0.8 3c	22.88±0.75 d
v12 3	Butanoic acid	1631	NDa	NDa	NDa	3.77±0.8 7b	NDa	NDa	3.73±1.05b
v12 6	3-Methylbutanoic acid	1675	NDa	2.76±0.3 2a	15.29±0.6 3b	20.34±0. 52b	61.78±9.87 c	54.51±6. 47c	167.54±5.3 0d
Aldehydes									
v4	Acetaldehyde	<80 0	NDa	NDa	10.76±3.1 5c	4.98±0.5 3b	NDa	4.32±1.2 4b	6.09±0.91b
v9	2-Methylpropanal	<80 0	NDa	NDa	12.39±2.7 3d	7.17±0.3 4c	NDa	0.45±0.0 8b	0.80±0.18b

v19	2-Methylbutanal	909	1.77±0.4 1a	2.43±0.5 2a	18.00±1.9 0d	13.53±0. 80c	2.52±0.26a	2.61±0.3 2a	5.44±1.85b
v20	3-Methylbutanal	912	1.34±0.2 5a	8.27±0.6 3a	350.41±5 2.63c	126.53±2 .87b	6.52±1.74a	5.36±1.3 3a	10.83±3.85 a
v40	Hexanal	1074	8.34±1.1 7a	14.30±2. 75a	77.31±7.9 8d	66.47±6. 47d	45.66±12.2 5c	13.70±0. 64a	26.27±4.22 b
v52	(E)-2-Methylpent-2-ena l	1138	NDa	NDa	0.71±0.19 c	0.34±0.0 6b	NDa	1.05±0.1 3d	NDa
v61	Heptanal	1177	NDa	NDa	NDa	NDa	6.94±1.58b	NDa	NDa
v63	3-Methylbut-2-enal	1188	NDa	NDa	1.95±0.13 c	1.00±0.1 4b	NDa	NDa	NDa
v80	Octanal	1280	NDa	NDa	0.89±0.17 a	0.53±0.0 9a	5.23±1.77b	NDa	NDa
v82	(E)-Hept-2-enal	1311	0.94±0.1 6a	1.06±0.2 5a	8.06±1.84 c	5.70±0.9 6b	NDa	NDa	NDa
v96	Nonanal	1384	0.51±0.1 3a	0.62±0.1 9a	1.53±0.22 a	0.75±0.1 9a	19.31±5.36 c	7.52±2.0 9b	6.36±0.06b
v99	(E)-Oct-2-enal	1417	NDa	NDa	2.25±0.42 bc	1.83±0.2 0b	2.81±0.63c	1.80±0.3 8b	2.04±0.22b
v11 1	(2E,4E)-Hepta-2,4-diena l	1480	NDa	NDa	NDa	NDa	5.93±1.48c	0.67±0.1 9ab	1.62±0.26b
V13 0	(2E,4E)-Deca-2,4-dienal	>18 00	NDa	NDa	NDa	NDa	3.49±1.10b	0.86±0.1 6a	4.03±1.46b
V14 1	(Z)-5-Methyl-2-phenylh ex-2-enal	>18 00	NDa	NDa	4.61±0.98 b	NDa	NDa	NDa	NDa
Alcohols									
v18	2-Methylpropan-2-ol	905	NDa	NDa	3.17±0.70 b	NDa	NDa	NDa	NDa
v22	Ethanol	931	4.16±1.1 6a	6.02±0.8 8ab	29.47±8.4 5d	6.47±1.8 1ab	12.00±2.94 bc	17.91±0. 67c	15.71±2.86 c
v33	2-Methylbutan-2-ol	1014	NDa	1.01±0.2 7b	2.56±0.15 c	2.89±0.7 5c	1.27±0.31b	3.45±1.0 2c	3.10±0.37c
v42	2-Methylpropan-1-ol	1096	NDa	NDa	5.73±0.56 c	3.90±0.2 0b	NDa	5.48±2.1 4c	2.67±0.05b
v53	Butan-1-ol	1145	NDa	NDa	NDa	NDa	1.71±0.41b	2.30±0.1 2c	2.37±0.19c
v55	Pent-1-en-3-ol	1160	NDa	NDa	0.40±0.10 b	NDa	0.87±0.10d	0.74±0.0 5c	1.28±0.10e
v67	3-Methylbutan-1-ol	1207	1.20±0.3 3a	0.69±0.1 3a	21.33±2.4 3d	23.34±0. 19e	8.67±1.08b	8.09±0.2 2b	12.56±1.39 c
v75	Pentan-1-ol	1250	5.76±1.6 3 bc	1.00±0.1 7a	8.27±1.65 cd	4.12±0.8 3b	11.19±1.85 e	11.99±1. 57 ef	15.46±2.82f
v90	Hexan-1-ol	1352	NDa	NDa	NDa	NDa	188.00± 43.61b	170.39± 39.58b	187.51±30. 34b
v10 5	Oct-1-en-3-ol	1449	1.23±0.2 6a	NDa	11.76±1.1 5c	7.54±1.2 7b	6.14±0.87b	14.01±3. 57c	18.16±0.64 d
v10 8	Heptan-1-ol	1454	1.09±0.2 1a	NDa	NDa	NDa	18.34±3.32 b	16.94±2. 79b	16.67±1.32 b
v10 9	2,5-Dimethylhexan-3-ol	1460	NDa	NDa	NDa	NDa	0.82±0.19a	6.21±1.3 4b	6.78±1.70b
v11 3	2-Ethylhexan-1-ol	1488	1.31±0.0 9a	NDa	NDa	NDa	7.53±1.34b c	7.18±0.9 3b	8.79±1.30c
v11 5	Butane-2,3-diol	1536	NDa	NDa	NDa	NDa	159.84±42. 19b	221.90± 26.91c	422.66±19. 31d
v11 6	Octan-1-ol	1557	NDa	NDa	NDa	NDa	8.28±0.76b	7.06±0.8 2b	7.87±1.54b
v11 8	Butane-1,3-diol	1575	NDa	NDa	NDa	2.97±0.1 8a	4.27±1.40a	14.91±4. 59b	49.26±4.17 c
v12 5	Nonan-1-ol	1661	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	6.84±1.0 8b	9.29±1.79c
v12 7	(Z)-Non-3-en-1-ol	1683	NDa	NDa	NDa	NDa	4.39±0.98c	2.83±0.3 8b	3.65±0.53c
Aliphatic hydrocarbons									
v1	Pentane	<80 0	NDa	NDa	NDa	NDa	1.04±0.11c	0.39±0.1 0b	1.39±0.47d
v2	Hexane	<80 0	6.92±1.4 4c	3.52±1.2 3b	0.95±0.28 a	2.25±0.3 0ab	1.63±0.46a	0.97±0.2 2a	1.93±0.42a
v5	4-Methylheptane	<80 0	183.43± 51.90c	61.26±18 .20b	36.31±16. 02ab	61.08±14 .52b	9.81±1.28a	NDa	22.12±11.5 4ab
v7	Octane	<80	2.85±0.6	2.09±0.9	2.48±0.66	2.34±0.6	3.57±0.51a	3.62±0.8	8.27±2.64b

v8	2,4-Dimethylheptane	0 <80 0	0a 10.61±2.13d	5a 7.41±1.29c	a 5.7±0.66b c	7a 5.47±0.82bc	1.92±0.68a	4a 1.39±0.20a	4.14±1.30b
v11	2,5-Dimethylheptane	<80 0	1.83±0.69c	0.95±0.41b	0.99±0.11b	0.93±0.36b	NDa	NDa	NDa
v13	2,2,4-Trimethylheptane	<80 0	13.68±8.77a	9.53±1.99a	10.76±2.52a	12.00±3.05a	6.64±1.61a	13.67±4.09a	10.11±1.79a
v24	4-Methylnonane	946	1.52±0.40d	0.98±0.15bc	1.35±0.31cd	1.25±0.19bcd	0.79±0.24b	NDa	0.96±0.32bc
v29	3,3,5-Trimethylheptane	993	7.13±1.73a	4.77±0.75a	7.21±1.45a	6.25±0.98a	4.98±0.71a	7.00±1.76a	5.27±1.51a
v30	4-Methyldecane	1000	9.29±2.33a	7.11±0.78a	9.04±2.04a	10.09±2.13a	7.19±1.70a	10.74±2.04a	9.29±2.30a
v65	Dodecane	1193	NDa	NDa	NDa	NDa	0.38±0.1b	0.31±0.03b	1.95±0.05c
v81	Tridecane	1296	NDa	NDa	6.10±2.49b	5.05±0.86b	NDa	4.72±2.45b	NDa
Benzenes & benzen-derivatives									
v35	Toluene	1032	9.89±2.87a	16.23±0.95b	18.27±2.36bc	28.89±3.47d	37.93±5.03e	30.17±2.35d	23.97±4.84cd
v43	Ethylbenzene	1116	1.04±0.28a	1.53±0.09ab	4.42±0.95e	2.35±0.16bc	3.58±0.27de	5.71±1.25f	3.14±0.12cd
v45	1,3-Xylene	1122	NDa	0.68±0.12b	1.16±0.34bc	NDa	1.44±0.17c	2.04±0.65d	NDa
v49	1,4-Xylene	1129	0.48±0.12a	0.72±0.07a	2.40±0.38b	1.21±0.13a	2.68±0.11b	5.14±1.03c	2.16±0.07b
v59	1,2-Xylene	1171	0.20±0.05a	0.35±0.04a	1.87±0.32b	0.66±0.08a	1.85±0.07b	3.32±0.61c	1.51±0.20b
v68	1-Ethyl-2-methylbenzene	1213	NDa	NDa	NDa	NDa	0.99±0.11b	1.13±0.19b	NDa
v72	Styrene	1245	2.02±0.37a	2.26±0.22a	18.04±3.60b	6.22±0.65a	16.31±2.57b	30.76±8.28c	2.96±5.13a
v114	Benzaldehyde	1506	NDa	3.02±0.62a	40.62±5.64d	14.52±1.42b	25.26±6.82c	20.27±4.01bc	14.86±0.95b
v121	2-Phenylacetaldehyde	1627	NDa	NDa	36.9±0.61d	2.27±0.04b	4.84±1.13c	4.86±1.43c	2.03±0.27b
v122	4-Methylbenzaldehyde	1631	NDa	1.70±0.41b	3.37±0.63c	4.82±1.17cd	5.64±1.48d	NDa	4.58±0.50cd
V135	Phenylmethanol	>1800	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	1.16±0.12b	1.69±0.14c
V136	2-Phenylethanol	1807	NDa	NDa	NDa	0.23±0.05a	1.77±0.45b	1.66±0.23b	2.19±0.68b
V137	2-Phenylbut-2-enal	1809	NDa	NDa	18.56±4.41b	0.75±0.02a	NDa	NDa	NDa
Esters									
v12	Methyl acetate	<80 0	NDa	NDa	1.31±0.41c	0.63±0.13b	NDa	1.33±0.10c	0.70±0.14b
v15	Ethyl acetate	<80 0	128.26±45.08c	72.38±10.25b	27.42±0.77a	69.24±21.6b	14.02±3.45a	62.64±2.56b	90.51±7.45b
v21	Methyl 2-methylpropanoate	918	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	1.38±0.34c	0.75±0.35b
v25	Ethyl 2-methylpropanoate	959	NDa	0.25±0.05a	1.83±0.56b	0.44±0.11a	2.73±0.56b	4.08±0.89c	5.66±0.73d
v31	Methyl 2-methylbutanoate	1008	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	4.61±0.68b	NDa
v34	Methyl 3-methylbutanoate	1016	NDa	NDa	NDa	2.52±0.66b	NDa	3.46±0.97c	NDa
v36	Ethyl 2-methylbutanoate	1048	NDa	NDa	1.32±0.16b	NDa	1.57±0.28b	3.66±1.19c	3.91±0.99c
v39	Ethyl 3-methylbutanoate	1063	NDa	NDa	NDa	NDa	2.48±0.46b	NDa	6.19±1.16c
v44	3-Methylbutyl acetate	1118	NDa	NDa	1.26±0.19d	0.54±0.09b	NDa	NDa	0.89±0.11c
v56	Pentyl acetate	1165	NDa	NDa	NDa	NDa	2.27±0.89c	0.76±0.18b	NDa
v57	3-Methylbutyl acetate	1168	NDa	NDa	NDa	NDa	1.01±0.28b	0.89±0.27b	0.85±0.03b
v70	Ethyl hexanoate	1229	NDa	NDa	0.77±0.07a	0.39±0.06a	4.70±0.41b	6.02±0.62c	6.48±1.69c

Furans & furan-derivatives									
v37	2,3,5-Trimethylfuran	1050	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	1.53±0.16b
v48	2-Butylfuran	1126	NDa	NDa	NDa	NDa	0.19±0.09b	0.25±0.03b	0.72±0.09c
v69	2-Pentylfuran	1225	NDa	NDa	0.88±0.19a	0.62±0.11a	22.09±5.95b	22.52±3.30b	24.89±1.46b
Ketones									
v10	Propan-2-one	<800	NDa	3.39±0.76c	NDa	NDa	2.56±0.24b	0.68±0.12a	2.25±0.61b
v26	Butane-2,3-dione	970	NDa	5.73±0.16a	4.54±0.75a	5.39±0.32a	19.82±0.87b	31.89±7.99c	37.59±3.85c
v32	3-Methylpentan-2-one	1011	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	1.25±0.10b	3.19±0.17c
v46	4-Methylpent-3-en-2-one	1123	NDa	NDa	0.73±0.17b	1.34±0.25bc	1.83±0.69c	1.62±0.51c	3.70±0.39d
v60	Heptan-2-one	1174	NDa	NDa	1.07±0.32a	0.77±0.13a	25.05±4.47b	22.38±1.72b	22.58±6.75b
v66	4-Methylheptan-2-one	1199	3.21±0.55a	2.06±0.16a	5.34±2.02ab	3.92±0.83ab	11.91±1.29c	7.82±5.17b	10.88±0.67bc
v71	4,6-Dimethylheptan-2-one	1236	NDa	NDa	NDa	0.31±0.05b	4.50±0.20d	3.8±0.21c	4.61±0.18d
v74	5-Methylheptan-2-one	1247	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	12.51±2.99b
v77	3-Hydroxybutan-2-one	1273	NDa	37.85±5.65a	0.30±0.02a	1.01±0.08a	392.24±39.37d	339.79±3.8b	365.23±13.57bc
v78	Octan-2-one	1276	NDa	NDa	NDa	NDa	13.67±1.46b	17.70±2.71b	30.23±7.30c
v85	Octane-2,3-dione	1319	NDa	NDa	2.08±0.40c	1.27±0.20b	NDa	NDa	NDa
v87	6-Methylhept-5-en-2-one	1323	NDa	NDa	1.00±0.10c	0.70±0.10b	NDa	NDa	NDa
v94	Nonan-2-one	1380	NDa	NDa	NDa	NDa	3.28±0.31b	4.27±0.62c	4.17±0.38c
v31	Methyl 2-methylbutanoate	1008	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	4.61±0.68b	NDa
v112	Decan-2-one	1485	NDa	NDa	NDa	NDa	3.19±0.33c	2.77±0.06b	2.68±0.26b
v124	1-Phenylethanone	1635	1.40±0.13a	1.51±0.19a	5.66±1.47bc	2.56±0.45a	6.91±0.17c	4.69±0.63b	4.41±0.97b
Lactones									
v120	Oxolan-2-one	1608	0.97±0.25a	0.48±0.04a	1.10±0.25a	1.24±0.02a	NDa	NDa	7.46±1.91b
V140	5-Pentylloxolan-2-one	1812	NDa	NDa	NDa	NDa	2.2±0.13b	2.22±0.21b	2.63±0.45c
Pyrazines									
v83	2,5-Dimethylpyrazine	1312	NDa	NDa	NDa	NDa	8.12±0.78b	39.68±6.16d	31.47±8.44c
v84	2,6-Dimethylpyrazine	1319	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	11.80±1.22b	13.24±4.34b
v98	2,3,5-Trimethylpyrazine	1394	NDa	NDa	NDa	NDa	37.08±1.93b	248.07±18.97c	250.75±2.46c
v102	3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazine	1436	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	4.91±0.10c	4.43±0.41b
v110	2,3,5,6-Tetramethylpyrazine	1466	NDa	NDa	NDa	NDa	13.5±0.84b	75.88±6.63d	67.11±7.99c
Phenols									
V133	2-Methoxyphenol	1803	NDa	NDa	0.66±0.26a	1.20±0.16a	8.94±1.45b	11.99±1.35c	18.61±2.58d
V139	Phenol	1811	NDa	NDa	2.74±0.28c	0.40±0.04a	1.81±0.27b	2.50±0.08c	3.28±0.55d
V142	4-Ethenyl-2-methoxyphenol	1814	NDa	16.71±4.22b	8.40±2.56ab	33.53±11.8c	79.87±0.73d	119.5±15.42e	114.52±12.82e
V143	4-Ethenylphenol	1815	NDa	NDa	NDa	NDa	0.32±0.05b	0.33±0.04b	0.45±0.08c
Sulfur-containing compound									
v3	Methanethiol	<800	NDa	NDa	2.29±0.22c	0.49±0.04b	NDa	NDa	NDa
v38	(methyldisulfanyl)Metha	1063	NDa	NDa	21.39±1.0	4.35±0.2	NDa	5.25±1.2	NDa

	ne			8c	1b		7b		
v91	(methyltrisulfanyl)Methane	1360	NDa	NDa	11.26±0.60c	2.26±0.25b	NDa	NDa	NDa
v103	3-Methylsulfanylpropanal	1442	NDa	NDa	164.17±5.61c	18.55±0.54b	NDa	NDa	NDa
V128	3-Methylsulfanylpropan-1-ol	1713	NDa	NDa	3.99±1.00b	5.74±0.65c	0.28±0.09a	NDa	NDa
Miscellaneous compounds									
v14	2,4-Dimethylhept-1-ene	<800	62.63±14.81c	30.10±6.98ab	36.25±27.06ab	41.66±7.40b	18.23±2.22ab	15.13±1.34a	30.13±9.20ab
v28	2-Methyl-2-propan-2-yl oxirane	985	NDa	NDa	4.56±0.31b	5.37±0.47c	NDa	NDa	NDa
v62	1-Methyl-4-prop-1-en-2-ylcyclohexene	1186	NDa	0.92±0.2a	5.98±1.27b	1.06±0.09a	1.75±0.56a	21.64±4.15c	1.38±0.36a
v64	2,4,5-Trimethyl-1,3-oxazole	1192	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	1.99±0.18b	2.01±0.35b
v119	(1R,4E,9S)-4,11,11-trimethyl-8-methylidenebicyclo[7.2.0]undec-4-ene	1582	NDa	NDa	2.51±0.24b	NDa	NDa	NDa	NDa

1) Retention indices (RI) were determined using n-paraffins C6-C22 as external standards on DBI-WAX column

2) Average of relative peak area compared to that of the internal standard ± standard

3) ND : not detected

4) Different letters mean significant differences (p<0.05) between samples by Duncan's multiple range test

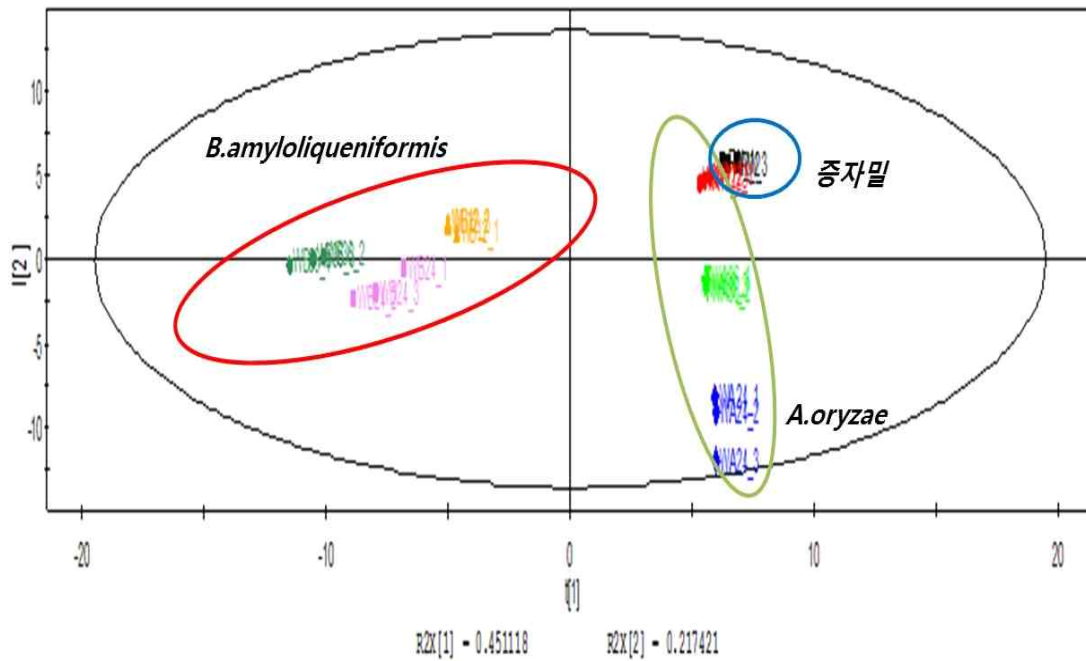


그림 3-44. Partial least square-discriminant analysis(PLS-DA)를 이용 집중균주를 달리한 밀 *koji*의 휘발성 대사체의 배양시간별 프로파일링 변화

- 총 114개의 휘발성 대사체가 검출되었으며, 발효 조건에 따라 표 3-15와 같이 차이를 나타냄. 시료간의 차이를 확인하기 위하여 PLS-DA분석을 실시하였고(그림 3-44), 증자밀에서 집중 균주에 따라 배양시간이 증가하면서 서로 다른 발효패턴을 보임. 증자밀과 WA 샘플들은 PLS 1 component의 양의 방향에 위치하였으며, WB 샘플들은 PLS 1 component의 음의 방향에 위치함. Score plot에 기여하는 VIP가

0.8이상의 변수들을 선별하여 각 변수들의 p value를 확인하였음. PLS component 1 양의 방향에 위치한 주요 휘발성 대사체들은 2,5-dimethylheptane($p=0.12$), 2,4-dimethylheptane(0.10), 4-methyl-nonane(0.09), 4-methylheptane(0.09), (E)-hept-2-enal(0.09) 등의 aliphatic hydrocarbon이 대부분을 차지함. 반면, pentan-1-ol(-0.12), phenyl-methanol(-0.12), 4-methylpent-3-en-2-one (-0.12), nonan-1-ol(-0.12), 3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine(-0.12), 2,4,5-trimethyl-1,3-oxazole(-0.12), butane-1,3-diol(-0.11), 2-methylpropanoic acid(-0.11), methyl-2- methylpropanoate(-0.10), ethyl 3-methylbutanoate(-0.10) 등이 PLS component 1 음의 방향에 위치한 주요 휘발성 대사체로 나타남(그림 3-45)

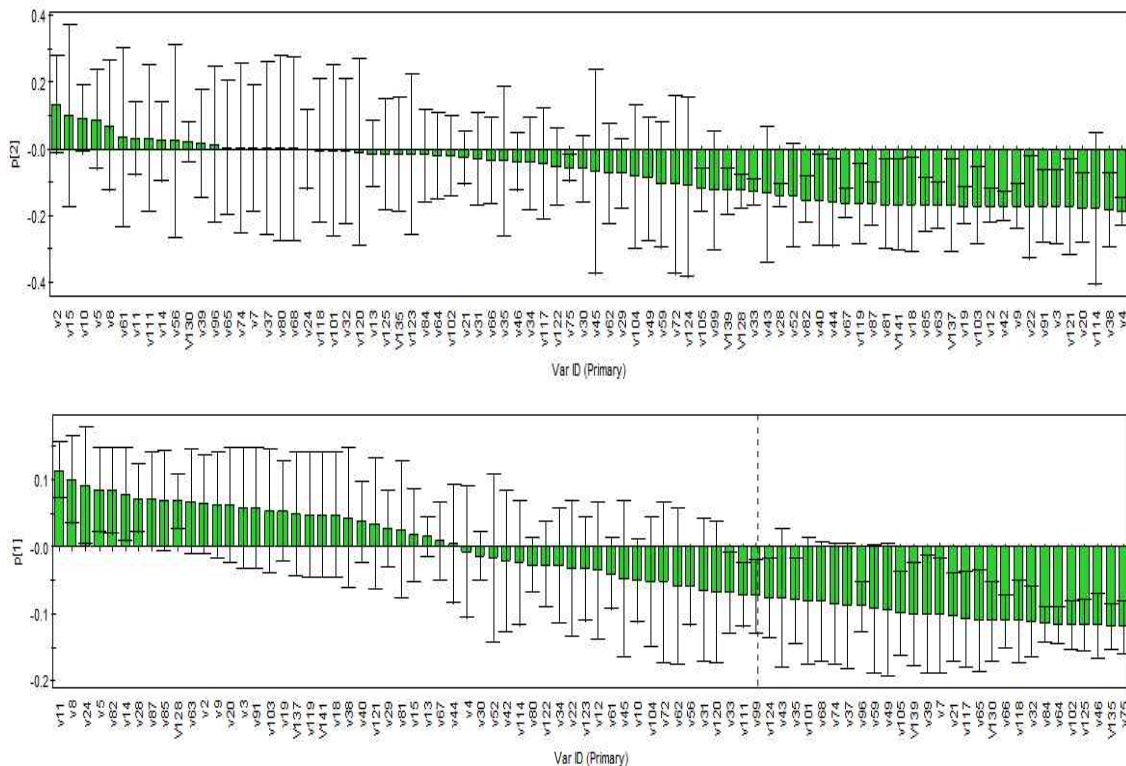


그림 3-45. *koji*의 휘발성 대사체의 PLS-DA의 loading plot

- 탄소 수 4개 이하의 branched chain을 가진 아미노산에서 생성되는 2-methylpropanoic acid, 3-methylbutanoic acid가 WB에서 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 이들 화합물은 낮은 역치값과 독특한 향기 특성을 가져 발효 식품에서 보고된 주요 향기 성분 중 하나임. Malty-cocoa 향미 특성을 가지는 3-methylbutanal은 간장 향미에서도 중요한 성분으로 보고된 바 있음. Branched-chain amino acids의 분해나 endogenous biosynthesis로부터 생성 되는 fusel alcohol 과 fusel aldehyde는 WA와 WB 모두 fusel aldehyde의 생성이 fusel alcohol보다 우세한 것을 확인할 수 있었으며, 특히 WA에서 유의적으로 정량 값이 높은 결과를 보임. Glycolysis 대사경로에서 생성되는 butan-1-ol의 경우 WB에서만 검출되었다. Glycolysis 대사경로 중 하나이며(그림 3-46), 맥주의 이취성분으로 보

고되는 butane-2,3-diol과 butane-1,3-diol도 WB에서 우세한 것을 확인할 수 있었음. 발효시간에 따라 ketone류, pyrazine류, phenol류의 생성이 WB에서 유의적으로 증가되는 반면, aldehyde류와 sulfur-containing compounds의 생성이 WA에서 유의적으로 증가함

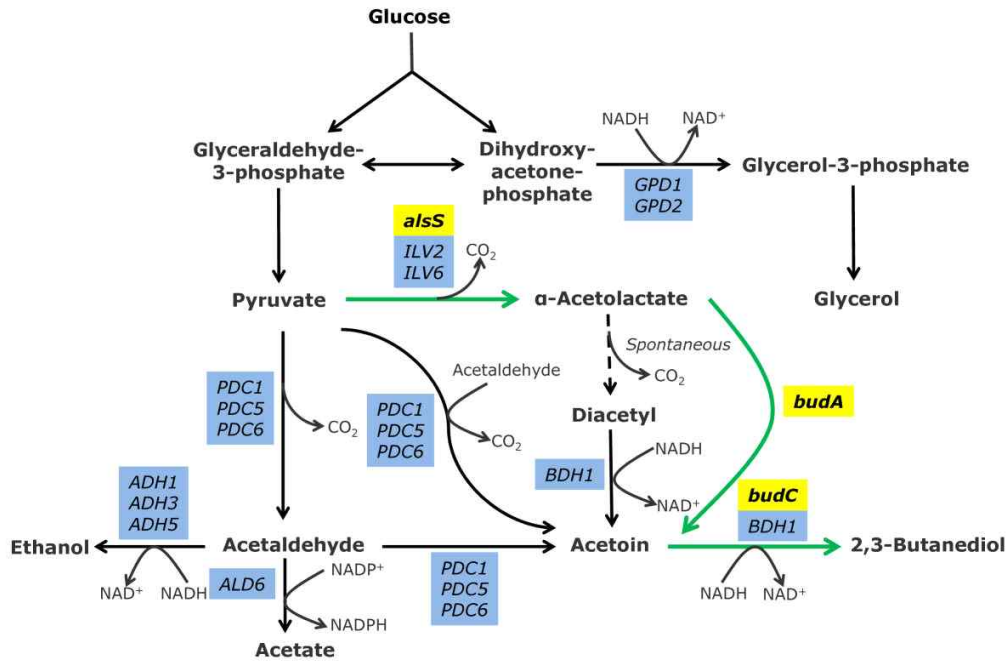


그림 3-46. Butane-2,3-diol의 대사경로

(마) 접종 균주를 달리한 콩 koji의 휘발성 대사체 프로파일링 비교 분석

○ *A. oryzae*(SA)와 *B. amylolicheniformis*(SB)를 각각 접종한 콩 koji의 12, 24, 36시간별 배양 시간별로 샘플링하여 SPME 추출 및 GC/MS로 분석함. 표 3-16은 배양 시간별 휘발성 대사체의 변화에 대해 나타냄

표 3-16. 접종 균주를 달리한 콩 koji의 배양시간별 휘발성 대사체의 프로파일링 비교

No.	Possible compound	RI ¹⁾	Relative peak area ratio ²⁾						
			RS	SA12	SA24	SA36	SB12	SB24	SB36
Acids									
v104	Acetic acid	1444	ND ³⁾ a ⁴⁾	NDa	18.3±4.15c	11.99±1.51b	2.91±0.82a	NDa	NDa
v117	2-Methylpropanoic acid	1567	NDa	NDa	1.19±0.08a	1.73±0.17a	14.1±3.04a	42.24±1.56b	66.16±19.78c
v123	Butanoic acid	1631	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	1.82±0.49c	0.87±0.21b
v126	3-Methylbutanoic acid	1675	2.85±0.38a	2.57±0.95a	161.54±46.13c	6.21±1.2a	93.18±12.15b	74.81±8.35b	58.64±13.21b
V129	3-Methylbut-2-enoic acid	1799	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	14.18±0.54c	4.52±1.37b
V132	4-Methylpentanoic acid	>1800	NDa	NDa	NDa	NDa	0.24±0.05a	3.43±0.91b	6.74±1.76c
V134	Hexanoic acid	>1800	2.26±0.6b	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa
Aldehydes									
v4	Acetaldehyde	<80	NDa	1.77±0.22	3.17±0.3	11.34±3.2	NDa	NDa	NDa

		0		ab	7b	4c			
v6	Propanal	<80 0	NDa	NDa	NDa	0.66±0.13 b	NDa	NDa	NDa
v9	2-Methylpropanal	<80 0	NDa	1.38±0.03 b	1.90±0.2 9b	19.96±1.5 7c	NDa	NDa	NDa
v19	2-Methylbutanal	909	4.09±1.25 a	11.54±0.9 2a	38.6±8.8 6b	108.39± 17.17c	0.85±0.06a	1.43±0.45a	1.38±0.24 a
v20	3-Methylbutanal	912	3.55±0.74 a	64.89±3.7 0b	68.24± 9.24b	356.58± 52.38c	0.96±0.02a	1.23±0.10a	1.33±0.14 a
v27	2-Methylpentanal	985	NDa	NDa	NDa	0.57±0.50 b	NDa	NDa	NDa
v40	Hexanal	1074	41.66±5.8 4c	21.16±3.4 7b	8.76±1.2 8a	21.86±6.6 9b	7.52±0.56a	7.76±0.81a	12.27±3.6 3a
v41	(E)-2-Methylbut-2-enal	1084	NDa	NDa	0.78±0.1 8b	3.19±0.60 c	NDa	NDa	NDa
v63	3-Methylbut-2-enal	1188	NDa	NDa	2.25±0.5 1c	1.14±0.18 b	NDa	NDa	NDa
v80	Octanal	1280	0.56±0.12 c	0.51±0.13 c	0.18±0.0 4b	0.77±0.18 d	NDa	NDa	NDa
v96	Nonanal	1384	1.06±0.14 d	0.87±0.21 cd	0.49±0.0 6b	2.50±0.37 e	0.43±0.21 b	0.62±0.10 bc	NDa
v10 6	Furan-2-carbaldehyde	1452	NDa	NDa	2.54±0.4 6b	NDa	NDa	NDa	NDa
v11 6	Octan-1-ol	1557	0.23±0.04 b	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa
V14 1	(Z)-5-Methyl-2-phenylhex-2-enal	>18 00	NDa	NDa	0.14±0.0 2b	0.36±0.05 c	NDa	NDa	NDa
Alcohols									
v22	Ethanol	931	29.41±4.5 5d	40.88±3.1 5e	6.93±1.4 7ab	8.25±1.35 ab	3.94±0.54a	16.17±2.55 c	11.09±0.6 1b
v33	2-Methylbutan-2-ol	1014	NDa	3.02±0.49 d	1.86±0.1 9c	NDa	1.12±0.27 b	2.84±0.29 d	2.72±0.49 d
v42	2-Methylpropan-1-ol	1096	NDa	NDa	NDa	1.08±0.07 b	NDa	NDa	NDa
v47	Pentan-2-ol	1124	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	1.27±0.20 b	6.12±0.44 c
v55	Pent-1-en-3-ol	1160	0.59±0.11 c	NDa	NDa	NDa	NDa	0.28±0.04 b	1.22±0.12 d
v58	4-Methylpentan-2-ol	1169	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	1.51±0.04 b
v67	3-Methylbutan-1-ol	1207	5.76±0.90 b	8.88±1.14 c	5.22±0.9 2ab	3.18±0.57 a	21.09±2.03 e	9.03±1.37c	17.95±1.0 2d
v75	Pentan-1-ol	1250	3.52±0.57 c	4.15±0.34 c	NDa	NDa	4.07±0.31c	2.25±0.47 b	4.02±0.65 c
v79	5-Methylhexan-2-ol	1280	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	14.29±0.3 7b
v86	Heptan-2-ol	1320	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	2.80±0.1b 2	13.70±0.8 6c
v92	6-Methylheptan-2-ol	1374	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	2.38±0.22 b
v95	(Z)-Hex-3-en-1-ol	1381	1.17±0.16 c	NDa	NDa	NDa	0.87±0.10 b	NDa	NDa
v97	5-Methylheptan-2-ol	1388	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	0.31±0.05 b	2.96±0.33 c
v10 5	Oct-1-en-3-ol	1449	56.88±11c	35.80±7.3 1b	8.79±0.8 2a	NDa	51.44±10.1 5c	32.93±7.12 b	24.61±0.8 0b
v10 9	2,5-Dimethylhexan-3-ol	1460	NDa	NDa	NDa	NDa	4.42±0.68 d	2.40±0.23c	1.41±0.16 b
v11 3	2-Ethylhexan-1-ol	1488	1.30±0.14 bc	0.87±0.06 ab	1.01±0.2 4b	0.46±0.04 a	1.65±0.64c	1.31±0.24 bc	1.36±0.17 bc
v11 5	Butane-2,3-diol	1536	NDa	NDa	NDa	NDa	288.84± 49.69c	197.96± 49.77b	16.03±13. 65a
v11 8	Butane-1,3-diol	1575	NDa	NDa	NDa	NDa	10.76±3.20 a	47.78±23.8 7b	8.48±1.87 a
Aliphatic hydrocarbons									
v1	Pentane	<80 0	1.17±0.19 a	2.03±0.78 abc	2.38±0.3 0bc	2.37±0.6b c	1.71±0.27a b	1.45±0.17a b	2.89±0.96 c
v2	Hexane	<80 0	5.10±0.56 d	7.20±0.76 e	0.84±0.0 7a	1.90±0.19 b	1.79±0.49 b	2.07±0.52 b	3.55±0.16 c
v5	4-Methylheptane	<80 0	11.98±2.8 8a	38.35±1.8 7b	5.19±1.2 1a	10.39±2.6 3a	44.05±12.3 1bc	56.05±10.9 8c	54.59±8.3 6c

v7	Octane	<80 0	4.12±1.57 b	1.98±0.27 a	1.89±0.2 0a	3.41±0.92 ab	2.06±0.60a	2.67±0.40a b	3.58±0.72 b
v8	2,4-Dimethylheptane	<80 0	1.42±0.63 b	4.00±0.61 c	NDa	NDa	5.61±0.31 d	7.24±0.62e	9.34±1.37f
v13	2,2,4-Trimethylheptane	<80 0	2.78±0.54 a	10.45±0.7 3b	33.89± 4.79d	2.72±0.70 a	9.47±1.75 b	15.03±3.90 c	16.88±0.2 8c
v24	4-Methylnonane	946	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	2.24±0.42 b	3.28±0.21 c
v29	3,3,5-Trimethylheptane	993	1.69±0.21 a	4.83±1.43 bc	1.77±0.2 3a	3.55±1.10 ab	6.68±1.53c	13.11±2.35 d	17.79±1.5 5e
v30	4-Methyldecane	1000	5.67±0.94 a	11.58±2.1 4b	7.36±2.6 2ab	8.83±1.73 ab	7.96±1.77a b	20.49±3.62 c	28.25±3.0 4d
Benzenes & benzen-derivatives									
v35	Toluene	1032	25.07±6.9 9b	88.28±3.8 9d	55.29±6. 46c	15.98±4.0 4a	10.22±1.04 a	53.20±1.64 c	25.97±2.0 8b
v43	Ethylbenzene	1116	1.75±0.56 ab	4.73±0.67 d	3.28±0.7 9c	1.05±0.14 a	1.51±0.16a	2.06±0.42 bc	1.82±0.15 ab
v49	1,4-Xylene	1129	0.68±0.04 a	2.36±0.51 d	1.84±0.2 0c	0.60±0.10 a	0.76±0.09a	1.31±0.13 b	0.79±0.16 a
v59	1,2-Xylene	1171	0.36±0.14 b	1.14±0.14 c	1.38±0.4 3c	NDa	0.36±0.04 b	0.54±0.06 b	0.45±0.06 b
v72	Styrene	1245	0.45±0.09 a	9.68±1.44 d	15.41±3. 18e	2.81±0.38 ab	5.91±0.44c	3.01±0.48a b	4.25±1.35 bc
v11 4	Benzaldehyde	1506	5.01±0.36 a	5.66±1.21 a	108.8± 20.11d	17.32±1.0 4ab	13.47±1.91 a	53.79±11.0 2c	32.22±6.8 7b
v12 1	2-Phenylacetaldehyde	1627	NDa	1.69±0.39 bc	2.04±0.7 4c	4.43±0.81 d	NDa	NDa	1.22±0.02 b
v12 2	4-Methylbenzaldehyde	1631	NDa	0.99±0.2c	1.42±0.3 9d	NDa	0.49±0.11 b	NDa	NDa
V13 5	Phenylmethanol	>18 00	0.33±0.07 a	NDa	NDa	NDa	1.55±0.32a	6.85±1.9b	23.51±2.0 8c
V13 6	2-Phenylethanol	>18 00	0.49±0.10 b	NDa	0.67±0.1 1bc	NDa	1.58±0.24 d	0.87±0.09c	0.54±0.08 b
V13 7	2-Phenylbut-2-enal	>18 00	NDa	4.72±1.23 c	2.67±0.2 2b	10.17±1.4 8d	NDa	NDa	NDa
Esters									
v12	Methyl acetate	<80 0	0.79±0.20 a	2.62±0.64 b	3.81±0.7 8c	1.91±0.41 b	2.03±0.38 b	2.4±0.36b	5.00±0.72 d
v15	Ethyl acetate	<80 0	327.14± 27.72b	38.26±2.8 3a	364.01± 54.01b	32.09± 10.41a	7.94±1.86a	16.9±3.49a	4.03±1.05 a
v21	Methyl 2-methylpropanoate	918	NDa	NDa	NDa	NDa	2.11±0.15 b	8.35±2.16c	9.25±0.26 c
v25	Ethyl 2-methylpropanoate	959	NDa	0.87±0.04 b	0.48±0.1 3ab	0.37±0.02 ab	0.90±0.16 b	4.36±1.06 d	2.36±0.29 c
v31	Methyl 2-methylbutanoate	1008	NDa	NDa	NDa	NDa	2.34±0.37 b	4.85±0.78c	4.76±0.80 c
v34	Methyl 3-methylbutanoate	1016	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	2.66±0.35 b	NDa
v44	3-Methylbutyl acetate	1118	NDa	NDa	NDa	NDa	0.48±0.08 b	0.44±0.06 b	NDa
v51	Methyl 4-methylpentanoate	1138	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	1.44±0.30 b	1.27±0.12 b
v70	Ethyl hexanoate	1229	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	9.46±1.16 b	14.02±1.2 5c
V13 1	2-Phenylethyl acetate	>18 00	NDa	NDa	0.92±0.1 5c	0.23±0.03 b	NDa	NDa	NDa
Furans & furan-derivatives									
v16	2-Methylfuran	<80 0	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	2.43±0.56 b	2.99±0.41 c
v23	2-Ethylfuran	945	5.55±0.65 e	2.81±0.16 c	1.57±0.2 8a	2.90±0.47 c	3.59±0.47 d	2.03±0.26a b	2.50±0.21 bc
v37	2,3,5-Trimethylfuran	1050	NDa	NDa	NDa	NDa	0.59±0.10 b	NDa	NDa
v69	2-Pentylfuran	1225	11.58±3.2 3c	13.94±3.3 1c	10.25±3. 35bc	11.83±3.2 6c	4.14±1.06a	5.29±0.95a b	12.72±4.7 5c
Ketones									
v10	Propan-2-one	<80 0	4.61±0.54 b	1.50±0.07 a	5.17±1.7 4b	12.00±1.2 1c	20.38±3.26 d	6.48±0.59 b	14.07±0.7 2c
v17	Butan-2-one	901	NDa	NDa	NDa	5.00±1.26 b	4.36±0.68 b	14.01±3.11 c	16.49±0.3 3c

v26	Butane-2,3-dione	970	3.55±0.47 a	6.58±0.21 b	3.46±0.9 7a	6.08±1.70 b	67.25±1.39 e	34.94±2.48 d	11.32±1.4 3c
v32	3-Methylpentan-2-one	1011	NDa	NDa	NDa	NDa	1.03±0.10a	17.03±2.63 b	20.27±3.8 0c
v50	5-Methylhexan-2-one	1134	NDa	NDa	NDa	NDa	0.94±0.11a	12.84±1.01 b	14.56±2.7 5b
v54	Heptane-2,3-dione	1146	NDa	NDa	1.49±0.2 5b	NDa	NDa	NDa	NDa
v60	Heptan-2-one	1174	1.59±0.25 a	2.36±0.18 a	0.93±0.2 8a	0.74±0.17 a	3.92±0.57a	34.16±2.24 c	26.94±4.1 1b
v66	4-Methylheptan-2-one	1199	1.17±0.39 a	3.12±0.28 bc	1.14±0.2 2a	0.62±0.13 a	1.85±0.19a b	3.64±0.30c	35.82±2.2 6d
v73	Octan-3-one	1246	2.93±2.11 b	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa
v74	5-Methylheptan-2-one	1247	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	12.18±1.51 b	18.14±1.3 2c
v77	3-Hydroxybutan-2-one	1273	2.5±2.66a	7.29±1.15 a	1.06±0.1 1a	3.79±0.35 a	621.34±37. 66c	283.24±20. 84b	29.26±10. 85a
v78	Octan-2-one	1276	0.56±0.12 b	1.00±0.13 c	0.65±0.1 8b	0.51±0.17 b	NDa	NDa	1.38±0.27 d
v87	6-Methylhept-5-en-2-one	1323	0.45±0.17 b	0.78±0.15 c	0.47±0.0 4b	NDa	NDa	NDa	NDa
v88	3-Hydroxypentan-2-one	1330	NDa	NDa	NDa	NDa	18.54±1.06 c	6.83±0.4b	0.8±0.19a
v89	Nonan-2-one	1333	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	2.81±0.76 b	11.06±0.3 0c
v94	Nonan-2-one	1380	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	3.28±0.50 b	4.74±0.06 c
v100	3-Hydroxyhexan-2-one	1422	NDa	1.48±0.06 b	NDa	NDa	1.40±0.14 b	NDa	NDa
v101	2-Methylhexan-3-one	1428	NDa	NDa	NDa	NDa	3.2±0.51c	2.24±0.28 b	NDa
v124	1-Phenylethanone	1635	NDa	0.86±0.12 bc	1.13±0.1 4cd	0.63±0.05 b	1.37±0.27 d	1.14±0.39c d	0.88±0.16 bc
Lactones									
v120	Oxolan-2-one	1608	2.47±0.52 e	1.53±0.12 cd	2.06±0.6 9de	0.64±0.06 b	NDa	2.10±0.24 de	1.40±0.09 c
Pyrazines									
v76	2-Methylpyrazine	1255	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	0.32±0.03 b	0.93±0.06 c
v83	2,5-Dimethylpyrazine	1312	0.63±0.09 a	NDa	NDa	NDa	1.11±0.17a	40.12±4.72 b	149.92±8. 94c
v84	2,6-Dimethylpyrazine	1319	1.09±0.22 a	1.89±0.30 a	2.15±0.1 5a	NDa	1.98±0.18a	10.35±3.29 b	20.86±1.7 9c
v93	2-Ethyl-6-methylpyrazine	1376	NDa	1.59±0.38 c	0.93±0.2 0b	0.26±0.03 a	NDa	NDa	NDa
v98	2,3,5-Trimethylpyrazine	1394	NDa	NDa	NDa	NDa	15.74±2.64 b	82.18±14.0 8c	76.92±1.8 8c
v102	3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazine	1436	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	8.02±1.41c	4.97±0.08 b
v107	2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazine	1452	NDa	NDa	NDa	NDa	NDa	3.88±0.79c	2.96±0.21 b
v110	2,3,5,6-Tetramethylpyrazine	1466	NDa	NDa	NDa	NDa	26.22±6.10 b	104.03± 21.20c	8.55±0.25 a
Phenols									
V133	2-Methoxyphenol	>1800	NDa	NDa	NDa	NDa	0.47±0.10 b	1.12±0.18c	3.82±0.43 d
V139	Phenol	>1800	NDa	NDa	0.47±0.1 1c	NDa	0.25±0.08 b	1.03±0.16 d	2.64±0.12 e
V142	4-Ethenyl-2-methoxyphenol	>1800	0.88±0.23 d	0.59±0.12 bc	0.50±0.0 8bc	0.23±0.05 a	0.67±0.19c d	0.25±0.05a	0.40±0.06 ab
V143	4-Ethenylphenol	>1800	NDa	0.57±0.09 ab	0.88±0.2 3bc	NDa	1.58±0.43c	2.65±0.52 d	10.88±0.8 8e
Sulfur-containing compounds									
v30	Methanethiol	<80	NDa	NDa	0.62±0.1 4c	0.36±0.11 b	NDa	NDa	NDa
v38	(methylsulfanyl)methane	1063	NDa	NDa	42.52± 7.59b	2.53±0.84 a	1.96±0.36a	4.65±0.52a	3.83±0.66 a

v91	(methyltrisulfanyl)Methane	1360	NDa	NDa	11.69±3.73b	NDa	NDa	1.09±0.26a	0.03±0.05a
v103	3-Methylsulfanylpropional	1442	NDa	1.03±0.27b	2.20±0.57c	15.68±0.61d	NDa	Nda	NDa
V128	3-Methylsulfanylpropa n-1-ol	1713	NDa	0.79±0.14d	0.33±0.10b	0.21±0.03b	NDa	0.25±0.04b	0.47±0.07c
Miscellaneous compounds									
v14	2,4-Dimethylhept-1-ene	<800	5.71±1.96a	35.52±5.40cd	5.05±1.39a	13.56±2.76b	34.24±2.13c	40.52±1.76d	51.28±4.83e
v62	1-Methyl-4-prop-1-en-2-ylcyclohexene	1186	1.62±0.31bc	4.82±1.88d	0.42±0.03a	0.77±0.16ab	0.44±0.02a	2.29±0.12c	1.97±0.62bc
v64	2,4,5-Trimethyl-1,3-oxazole	1192	NDa	NDa	NDa	NDa	3.78±0.39c	12.09±1.23d	2.26±0.77b
V138	4-Hydroxy-3-methylpyran-2-one	1810	5.15±1.06ab	6.02±1.73b	11.8±2.53cd	9.37±1.05c	4.24±1.12ab	4.08±0.52ab	2.61±0.44a

1) Retention indices (RI) were determined using n-paraffins C6-C22 as external standards on DBI-WAX column

2) Average of relative peak area compared to that of the internal standard ± standard

3) ND : not detected

4) Different letters mean significant differences ($p < 0.05$) between samples by Duncan's multiple range test

○ 밀 *koji*와 유사하게 branched chain을 가진 탄소 수 4개 이하의 지방산들이 SB에서 상대적으로 SA에 비해 우세한 것을 확인함. Butane-2,3-diol, oct-1-en-3-ol 등도 SB에서 우세하며, SA에서는 감소폭이 큰 것으로 나타냄. 특히 버섯향을 나타내며, linoleic acid나 linolenic acid와 같은 불포화지방산으로부터 생성되는 oct-1-en-3-ol은 lipoxygenases에 의해 10-hydro-peroxylinoleic acid가 생성되며, 뒤이어 hydroperoxide lyase에 의해 1-octen-3-ol을 형성하게 됨(그림 3-47)

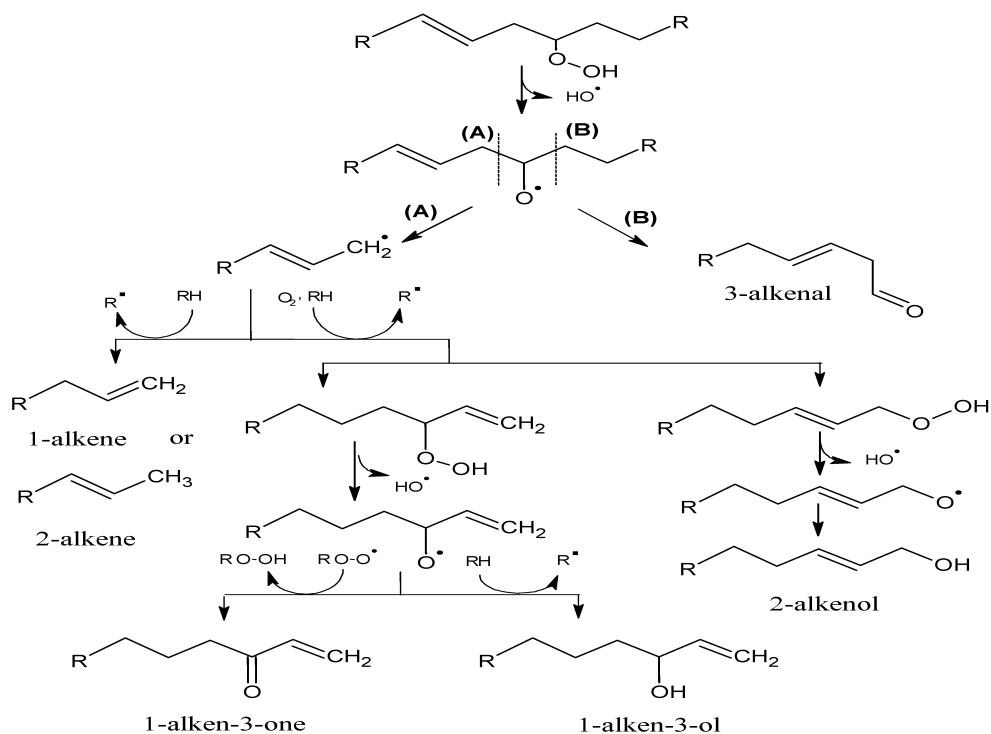


그림 3-47. Oct-1-en-3-ol의 생성경로

○ 총 114개의 휘발성 대사체가 검출되었으며, 발효 조건에 따라 표 3-16과 같이 차이를 나타냄. 시료간의 차이를 확인하기 위하여 PLS-DA분석을 실시하였고, 그림 3-48에서 증자콩에서 접종 균주에 따라 배양시간이 증가하면서 서로 다른 발효패턴을 보임. 증자밀과 SA 샘플들은 PLS 1 component의 양의 방향에 위치하였으며, SB 샘플들은 PLS 1 component의 음의 방향에 위치하였다. Score plot에 기여하는 VIP가 0.8이상의 변수들을 선별하여 각 변수들의 p value를 확인하였다. PLS component 1 양의 방향에 위치한 주요 휘발성 대사체들은 oct-1-en-3-ol($p=0.19$), 3-hydroxypentan-2-one(0.17), 3-hydroxybutan-2-one(0.17), (Z)-hex-3-en-1-ol(0.17), butane-2,3-dione(0.17), butane-2,3-diol(0.17), 2-phenylethanol(0.16), 2-ethylfuran(0.12), 4-ethenyl-2-methoxyphenol(0.12), 3-methylbutan-1-ol(0.11)이 차지하는 반면, 2-phenylacetaldehyde(-0.16), octan-2-one(-0.15), methyl acetate(-0.15), Methanethiol(-0.13), 3-methylbut-2-enal(-0.13), 2-pentylfuran(-0.12) 등이 PLS component 1 음의 방향에 위치한 주요 휘발성 대사체로 나타남(그림 3-49)

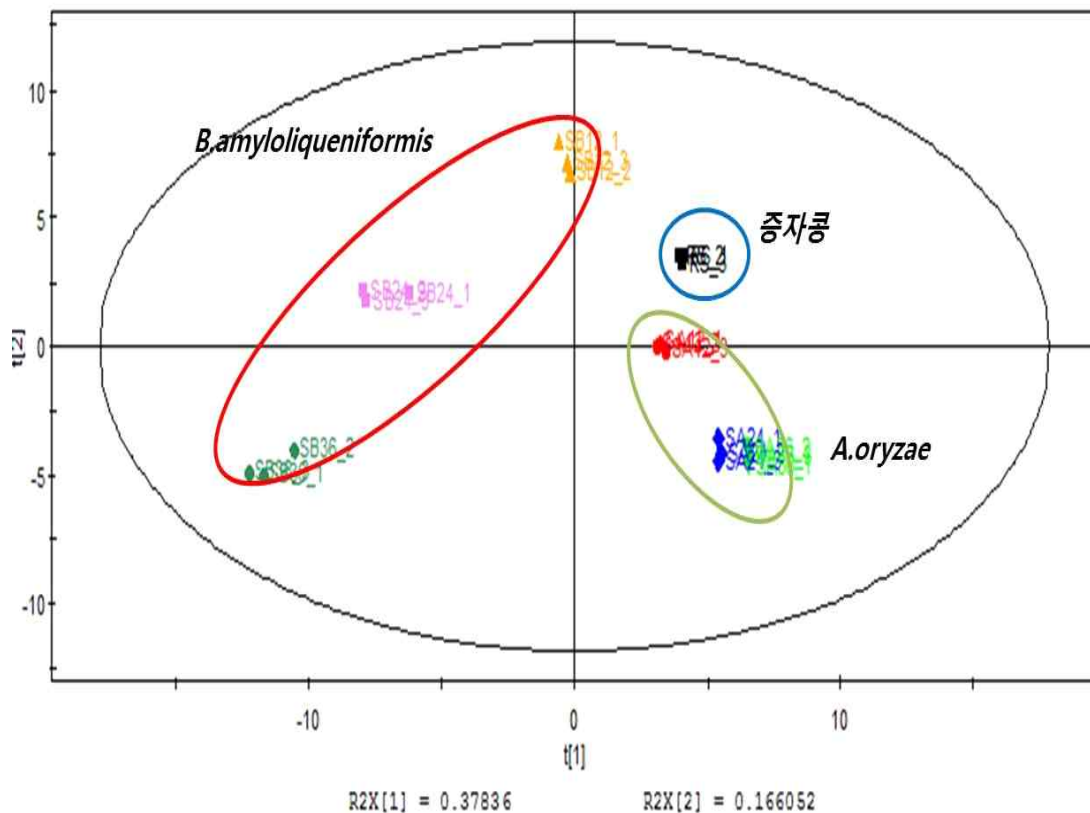


그림 3-48. Partial least square-discriminant analysis (PLS-DA)를 이용한 접종균주를 달리한 콩 *koji*의 휘발성 대사체의 배양시간별 프로파일링 변화

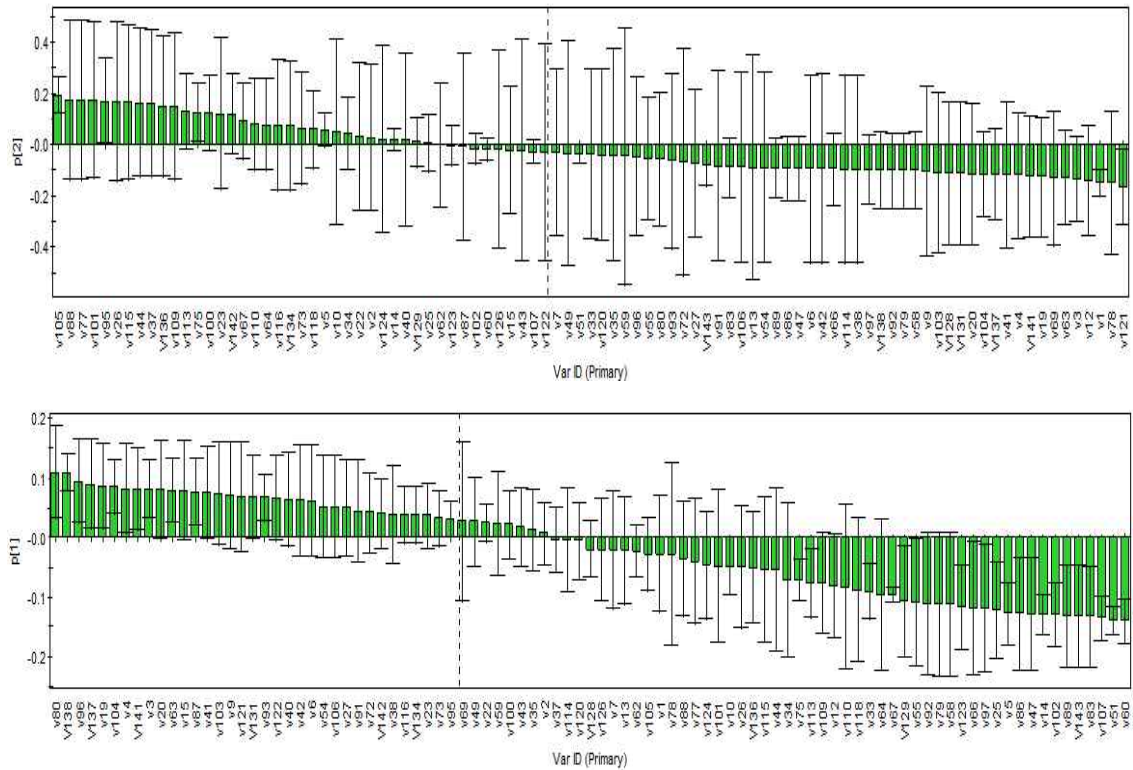


그림 3-49. 콩 *koji*의 휘발성 대사체의 PLS-DA의 loading plot

- 콩 *koji*와 밀 *koji*의 발효시간에 따른 휘발성 대사체의 변화를 비교하였을 때, 같은 접종 균주라도 다른 패턴을 보이는 것을 확인함. 콩과 밀을 구성하는 미량 성분들의 차이가 미생물이 우선적으로 사용하는 substrate의 차이로 이어져 생성하는 휘발성 대사체 프로파일의 변화로 이어진 것으로 사료됨

(2) 향미 생성 우수 균주 및 참조 균주의 배양 환경에 따른 휘발성 대사체의 비교분석

(가) 향미 생성 우수 균주 및 참조 균주 선발 및 배양 조건 확립

- 일본 전통주인 sake에서 분리한 참조 균주(*Aspergillus oryzae* KCTC 6983, AOS)와 한국 전통 누룩에서 분리한 향미 생성 우수 실험 균주(*Aspergillus oryzae* CN1102-08, AOE)를 선발함
- 균주를 배양하는 액체배지는 complete media(CM)를 이용함. CM배지는 증류수 1 L에 yeast extract 1 g, sucrose 30 g, peptone 2.5 g, sodium nitrate 2 g, potassium phosphate 1 g, magnesium sulfate heptahydrate 0.5 g, potassium chloride 0.5 g, trace element solution 0.2 mL, vitamin stock solution 10 mL를 넣어 제조함. Trace element solution에는 citric acid 5 g, zinc sulfate hexahydrate 5 g, Ammonium iron(II) sulfate hexahydrate 1 g, Copper(II) sulfate pentahydrate 250 mg, Manganous(II) sulfate hydrate 50 mg, boric acid 50 mg, Sodium molybdate dihydrate 50 mg, 증류수 95 mL를 넣음. Vitamin stock solution에는 thiamine 100 mg, riboflavin 30 mg, pyridoxine 75 mg, pantothenic acid 200 mg, nicotinamide 75 mg, ascorbic acid 5 mg, p-aminobenzoic acid 5 mg, choline 200 mg, folic acid

5 mg, biotin 5 mg, inositol 4 g, 50% ethanol 1 L를 넣어 만듦. 250 mL screw 삼각 플라스크에 40 mL의 배지를 넣고 30°C에서 180 rpm 조건으로 뚜껑을 닫고 배양을 진행함. 균을 접종하고 난 후 0 시간에서 52 시간 까지 시간별로 sampling을 수행함

- 각 균주의 배양 조건별 휘발성 대사체의 생성을 비교분석 하기 위해 아래와 같은 조건으로 실험하였음(표 3-17)

표 3-17. *Aspergillus oryzae* 배양 환경 조건

탐색조건	pH	온도(°C)	time(hr)
표준	6.0	25	24
Ex.1	6.0	25	32
Ex.2	6.0	37	24
Ex.3	4.0	25	24

(나) 휘발성 향미 대사체 추출법 및 분석법 확립

- Stir bar sorptive extraction(SBSE)는 액상과 기상의 시료에서 volatile 및 semi-volatile 성분들을 흡착 할 수 있고, 용매를 사용하지 않아 간편하고 비교적 쉽게 분석이 가능한 추출법임. 기존에 많이 사용되는 solid phase microextraction(SPME)와 비슷하나 SBSE는 저분자 화합물을 polydimethyl siloxane과 같은 흡착제가 코팅된 stir bar(twister)를 이용하여 추출하는 방법으로 SPME 보다 추출 효율이 좋고 민감도가 좋음. Sample 8 mL를 10 mm length, 32 phase volume ethylene glycol-silicone coated stir bar(EG-silicon twister) (GERSTEL GmbH & Co. KG, Müheim an der Ruhr, Germany)와 함께 10 mL screw vial(CTC Hdspce, Agilent technologies, DE, Germany)에 넣고 screw cap(Ultra clean 18 mm, Agilent technologies, DE, Germany)으로 봉함. Twister를 1000 rpm으로 stir하며 60 분 90 분 흡착시킴. 흡착 후에는 twister를 증류수로 씻은 후 lint free tissue로 닦아 물을 제거함. 시료에 흡착시킨 twister를 tube에 넣어 thermal desorption unit(TDU) (GERSTEL GmbH & Co. KG, Müheim an der Ruhr, Germany) 에서 220°C에서 5분 온도를 유지하여 휘발성 발효 대사산물들을 탈착시킴. 탈착하는 동안에는 액체질소를 이용하여 cooled injection system(CIS)에서 -80°C를 유지하였고, -80°C에서 0.01분, 12°C/s로 온도를 높임
- 휘발성 대사체를 분석하기 위하여 gas chromatography(HP 7890B GC)/mass spectrum(5977A) (Agilent Technologies, USA)을 이용함. Column은 DB-wax(30 m length x 0.25 mm I.D.. x 0.25 µm film thickness, J&B Scientific, Folsom, CA, USA)를 사용하였음. GC oven온도는 40°C에서 5분간 유지하였고, 230°C까지 4°C /min으로 온도를 높인 후 230°C에서 10분간 유지함. Mass scan range는 35-350 a.m.u였으며 mass spectra는 70 eV에서 electron ionization(EI)방식에 의해 얻음. 이동가스로는 helium을 0.8 mL/min의 유속을 유지하였고 splitless모드로 탈착함

(다) 휘발성 향기성분의 동정 및 정량

- 휘발성 향기성분의 동정은 mass spectral database(W9N08.L) 및 manual interpretation에 의해 수행됨. 그리고 saturated alkanes(100ppm in hexane)을 외부 표준물질로 사용하여 각 휘발성분의 RI(Retention Index)를 구한 후 NIST database 자료와 문헌에서 보고된 RI값과 비교하였으며, 보다 정확한 정량을 위해, L-borneol 100ppm(w/v, in methanol)을 내부표준물질로 이용함

(라) 다변량 통계분석

- GC/MS로 분석하여 얻은 휘발성 대사체의 차이 및 변화 양상을 확인하기 위하여 SPSS(version 12.0, U.S.A.)로 t-test를 실시하였음. 또한 배양 환경에 따른 휘발성 대사체의 차이를 확인하기 위하여 R package 를 이용하여 heat map 분석을 수행함

(마) 배양 조건에 따른 향미 생성 우수균주 및 참조 균주의 휘발성 대사체 비교 분석

- 참조 균주 AOS는 총 61개의 휘발성 대사체가 검출 되었으며, acids 7종, aldehydes 8종, alcohols 11종, benzenes & derivatives 9종, esters 5종, furans & derivatives 4종, ketones 7종, phenols 2종, sulfur-containing compounds 1종, 및 miscellaneous compounds 7종이 검출됨. 누룩에서 분리한 향미 우수 균주 AOE는 총 49종의 휘발성 대사체가 검출 되었으며, acids 6종, aldehydes 5종, alcohols 11종, benzenes & benzene-derivatives 5종, esters 5종, furans & furan-derivatives 3종, ketones 6종, phenols 1종, sulfur-containing compounds 1종, 및 miscellaneous compounds 6종이 검출됨(표 3-18)

표 3-18. 향미 생성 우수균주(AOE)와 참조 균주(AOS)의 휘발성 대사체의 비교분석

No.	Possible compound	RI ¹⁾	Relative peak area(mean±SD) ²⁾		t-value ³⁾	p-value ⁴⁾
			AOE	AOS		
Acids						
V36	Acetic acid	1476	1.316±0.194	1.338±0.314	0.103	0.923
V43	Propanoic acid	1555	0.068±0.018	0.155±0.045	3.116	0.036*
V44	2-Methylpropanoic acid	1581	0.659±0.087	2.866±0.527	7.152	0.016*
V47	Butanoic acid	1637	0.566±0.177	1.040±0.168	3.367	0.028*
V52	2-Methylbutanoic acid	1679	0.168±0.061	ND	-4.743	0.009*
V53	3-Methylbutanoic acid	1682	ND ⁵⁾	0.580±0.124	8.076	0.001*
V81	Dodecanoic acid	2492	0.210±0.012	ND	-31.099	0.000*
V86	Tetradecanoic acid	>2600	0.570±0.094	0.987±0.733	0.977	0.429
Aldehydes						
V2	Acetaldehyde	<800	0.512±0.036	0.431±0.058	-2.060	0.108
V3	Butanal	812	0.222±0.023	0.284±0.072	1.439	0.223
V8	2-Methylbutanal	915	0.095±0.011	0.708±0.053	19.698	0.000*
V9	3-Methylbutanal	919	0.267±0.016	ND	-29.207	0.001*
V21	Hexanal	1095	0.028±0.003	ND	-15.431	0.004*
V30	Octanal	1313	0.045±0.002	ND	-37.449	0.000*

V34	Nonanal	1409	0.267±0.030	0.189±0.053	-2.224	0.090
V40	Decanal	1507	0.060±0.002	0.062±0.018	0.229	0.830
Alcohols						
V10	Ethanol	934	31.312±2.305	27.588±3.773	-1.459	0.218
V16	Propan-1-ol	1048	0.537±0.041	0.760±0.148	2.515	0.066
V22	2-Methylpropan-1-ol	1122	0.239±0.009	0.474±0.076	5.327	0.006*
V25	Butan-1-ol	1202	7.055±1.824	11.356±0.680	3.827	0.019*
V26	3-Methylbutan-1-ol	1254	1.345±0.052	4.391±0.874	6.028	0.004*
표 2. (계속)						
No.	Possible compound	RI ¹⁾	Relative peak area(mean±SD) ²⁾		<i>t</i> -value ³⁾	<i>p</i> -value ⁴⁾
			AOE	AOS		
V39	2-Ethylhexan-1-ol	1503	0.365±0.026	0.390±0.075	0.544	0.615
V45	2-(2-ethoxyethoxy)Ethanol	1626	0.062±0.004	0.062±0.011	0.023	0.983
V64	2-(2-hydroxyethoxy)Ethanol	1981	0.202±0.045	1.115±0.855	1.846	0.205
V66	2-[2-(2-ethoxyethoxy)ethoxy]Ethanol	2024	0.050±0.013	0.130±0.012	8.139	0.001*
V77	2-[2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy]Ethanol	2340	0.316±0.011	1.250±0.380	4.251	0.051
V88	2-[2-[2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy]ethoxy]Et hanol	>2600	0.451±0.072	1.437±0.154	10.034	0.001*
Benzenes & benzene-derivatives						
V28	Styrene	1284	0.115±0.148	0.055±0.011	-0.698	0.524
V42	Benzaldehyde	1540	0.748±0.121	1.682±0.266	5.526	0.005*
V59	1-Phenylbutan-2-one	1808	0.064±0.002	ND	-55.010	0.000*
V60	3,5-Dimethylbenzaldehyde	1821	1.131±0.102	0.444±0.129	-7.245	0.002*
V63	2-Phenylethanol	1920	0.081±0.006	0.201±0.029	7.094	0.002*
V78	Diethyl benzene-1,2-dicarboxylate	2382	0.140±0.007	ND	-32.895	0.001*
V82	Diphenylmethanone	2498	0.732±0.138	ND	-9.216	0.012*
V84	Bis(2-methylpropyl) benzene-1,2-dicarboxylate	2554	0.303±0.027	0.410±0.042	2.743	0.052
V85	2-Phenylacetic acid	2580	0.146±0.034	ND	-7.494	0.017*
Esters						
V5	Ethyl acetate	889	0.032±0.009	0.064±0.013	3.475	0.025*
V11	Ethyl 2-methylpropanoate	967	0.023±0.001	0.045±0.007	5.254	0.031*
V13	Methyl 2-methylprop-2-enoate	1010	ND	0.897±0.185	8.412	0.014*
V15	Ethyl butanoate	1044	0.148±0.038	0.575±0.127	5.586	0.005*
V38	2-Ethylhexyl prop-2-enoate	1491	0.148±0.036	0.057±0.016	-4.016	0.016*
V72	Ethyl hexadecanoate	2257	0.259±0.089	ND	-5.041	0.037*
표 2. (계속)						
No.	Possible compound	RI ¹⁾	Relative peak area(mean±SD) ²⁾		<i>t</i> -value ³⁾	<i>p</i> -value ⁴⁾
			AOE	AOS		
Furans & furan-derivatives						
V37	Furan-2-carbaldehyde	1487	0.275±0.066	0.163±0.038	-2.576	0.062
V51	Furan-2-ylmethanol	1667	0.196±0.025	ND	-13.394	0.006*
V55	2H-Furan-5-one	1770	0.094±0.006	0.099±0.022	0.327	0.760
V83	5-(hydroxymethyl)Furan-2-carbaldehyde	2520	1.082±0.338	0.817±0.093	-1.307	0.261
Ketones						
V7	Butan-2-one	904	0.020±0.006	0.140±0.015	12.499	0.000*
V12	Butane-2,3-dione	983	0.026±0.004	0.042±0.009	2.901	0.044*

V27	Octan-3-one	1281	ND	0.018±0.005	6.671	0.022*
V31	3-Hydroxybutan-2-one	1331	0.549±0.039	0.669±0.051	3.273	0.031*
V32	1-Hydroxypropan-2-one	1345	0.546±0.101	0.262±0.081	-3.792	0.019*
V50	1-Phenylethanone	1661	0.140±0.031	0.069±0.013	-3.624	0.022*
V56	2-Hydroxycyclopent-2-en-1-one	1781	0.096±0.023	ND	-7.249	0.002*
V61	2-Hydroxy-3-methylcyclopent-2-en-1-one	1836	0.063±0.005	ND	-23.607	0.000*
Phenols						
V65	Phenol	2017	0.063±0.011	ND	-10.213	0.009*
V76	2,4-Ditert-butylphenol	2320	0.917±0.101	0.521±0.106	-4.677	0.009*
Sulfur-containing compounds						
V1	Methanethiol	<800	0.130±0.018	0.041±0.011	-7.186	0.002*
Miscellaneous compounds						
V41	2-Formyloxyethyl formate	1527	0.351±0.104	0.089±0.014	-4.335	0.046*
V46	2-Hydroxyethyl formate	1633	0.235±0.059	0.335±0.087	1.658	0.173
V48	2-Hydroxyethyl acetate	1643	ND	0.4±0.092	7.570	0.017*
V54	Naphthalene	1750	0.120±0.008	0.073±0.007	-7.519	0.002*

표 2. (계속)

No.	Possible compound	RI ¹⁾	Relative peak area(mean±SD) ²⁾		t-value ³⁾	p-value ⁴⁾
			AOE	AOS		
V69	(2-acetyloxy-3-hydroxypropyl) Acetate	2083	0.048±0.010	ND	-8.428	0.001*
V71	1,1,3-Trimethyl-3-phenyl-2H-indene	2215	0.237±0.028	0.150±0.040	-3.098	0.036*
V74	3,5-Dihydroxy-6-methyl-2,3-dihydropyran-4-one	2281	1.618±0.168	0.480±0.114	-9.699	0.001*

1) Retention indices (RI) were determined using n-paraffins C6-C30 as external standards on Stabil-WAX column

2) Average of relative peak area compared to that of the internal standard ± standard

3) t-value : Independent two samples of t-test

4) p-value : significant differences; *p<0.05

5) ND : Not detected

- Acids에서는 탄소 수 4개 이하의 branched chain을 가진 fatty acids가 AOS에서 유의적으로 정량 값이 높은 것을 확인함. 특정 아미노산, valine, leucine, isoleucine에서 생성되는 것으로 알려진 propanoic acid, 2-methylpropanoic acid 등은 낮은 역치 값과 독특한 향기 특성을 가져 발효 식품에서 보고된 주요 향기 성분 중 하나임. 반면 valine에서 생성되는 2-methylbutanoic acid는 AOE에서만 검출됨. 특히, leucine에서 transamination 및 몇 단계 oxidation 단계를 거쳐 생성되는 3-methylbutanoic acid는 낮은 역치 수준과 불쾌취를 지니고 있어 발효식품의 품질에 영향을 미칠 수 있는 가능성이 높음
- Aldehydes는 2 & 3-methylbutanal, hexanal, octanal이 AOE에서만 검출되거나 상대적으로 높은 정량 값을 나타냄. 그 중, 2 & 3-methylbutanal은 branched-chain amino acid인 isoleucine과 leucine의 미생물 대사에 의한 생성물로 알려져 있음
- Ethanol이 AOE와 AOS 모두 alcohols에서 가장 높은 비율을 차지하였고 두 균주간의 유의적인 차이는 없었음. 2-methylpropan-1-ol, butan-1-ol, 3-methylbutan-1-ol이 AOE에서 상대적으로 높은 정량 값을 나타냄
- Phenylalanine에서 유래하는 향기성분인 benzaldehyde와 2-phenylethanol은 AOS에

서 상대적으로 높은 정량값을 보임. 그 중, 2-phenylethanol은 fusel alcohol 중 하나로, 장미향을 지니며 맥주, 와인, 녹차 등에서도 생성됨. Almond와 cherry-like odor notes를 가진 benzyl alcohol의 oxidation이나 aromatic amino acids에 대한 미생물의 작용으로 인해 생성되는 것으로 알려져 있음

- 총 Ester류는 AOS에서 높은 비율을 보임. 특히, 과일과 꽃향을 나타내며, 막걸리와 와인의 주된 휘발성 대사체인 ethyl acetate는 AOS에서 높은 비율을 보임

(바) 배양조건별 각 균주의 휘발성 대사체의 생성 비교 분석

- 참조균주 AOS와 향미 우수 생성균주 AOE의 배양 환경에 따른 휘발성 대사체의 생성 변화에 대해 연구함. SBSE 추출법 및 GC/MS 분석에 의해 동정된 휘발성 대사체는 내부 표준물질에 의해 정량됨. 표준배양 방법인 pH 6의 CM 배지에서 25℃에서 24시간 배양조건에서 pH, 배양 시간, 배양 온도를 달리하였을 때의 휘발성 대사체의 변화를 확인하기 위하여 fold change로 나타냄(표 3-19, 3-20). 각 fold change 값은 normalization 하기 위해 log값으로 치환하였으며, HEAT MAP을 이용하여 그림으로 도식화 하였음(그림 3-50, 3-51)

표 3-19. 참조 균주(AOS)의 배양 조건별 FOLD CHANGE 값의 변화

No.	Possible compound	Fold change		
		Ex 1	Ex 2	Ex 3
Acids				
V36	Acetic acid	1.96	1.24	1.21
V43	Propanoic acid	0.15	-1.97	-0.20
V44	2-Methylpropanoic acid	0.14	-14.81	0.27
V47	Butanoic acid	0.25	-3.27	-0.97
V52	2-Methylbutanoic acid	0.00	0.00	12.36
V53	3-Methylbutanoic acid	2.24	-3.30	-12.50
V81	Dodecanoic acid	0.00	11.50	0.00
V86	Tetradecanoic acid	-13.27	-13.27	-13.27
Aldehydes				
V2	Acetaldehyde	0.923	0.205	0.429
V3	Butanal	-0.080	0.100	0.811
V8	2-Methylbutanal	-1.718	-2.498	-1.818
V9	3-Methylbutanal	12.427	12.246	12.581
V21	Hexanal	0.000	0.000	8.406
V30	Octanal	7.635	0.000	0.000
V34	Nonanal	-0.438	-0.330	0.559
V40	Decanal	-9.286	-9.286	-9.286
Alcohols				
V16	Propan-1-ol	0.095	-0.054	-0.319
V22	2-Methylpropan-1-ol	0.768	-0.937	0.863
V25	Butan-1-ol	0.165	-3.393	0.402
V26	3-Methylbutan-1-ol	0.981	-0.724	0.115

V33	Hexan-1-ol	9.230	10.128	0.000
V39	2-Ethylhexan-1-ol	-11.930	-0.314	-0.712
V45	2-(2-ethoxyethoxy)Ethanol	0.281	-0.294	-0.521
V64	2-(2-hydroxyethoxy)Ethanol	-0.890	-0.754	-0.924
V66	2-[2-(2-ethoxyethoxy)ethoxy]Ethanol	0.206	0.024	-1.283
V77	2-[2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy]Ethanol	0.339	-0.177	-0.214
V88	2-[2-[2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy]ethoxy]Ethanol	0.794	-0.319	0.276
<hr/>				
Aliphatic hydrocarbons				
V29	Tridecane	7.071	0.000	0.000
<hr/>				
Benzenes & benzene-derivatives				
V23	Ethylbenzene	0.000	8.242	0.000
V28	Styrene	-0.219	-1.323	-0.254
V42	Benzaldehyde	-1.022	-0.913	-0.216
V58	Ethyl 2-phenylacetate	11.744	9.583	0.000
V59	1-Phenylbutan-2-one	0.000	8.547	0.000
V60	3,5-Dimethylbenzaldehyde	-0.235	-0.096	-0.123
<hr/>				
Benzenes & benzene-derivatives				
V63	2-Phenylethanol	0.881	1.469	1.427
V75	Dimethyl benzene-1,2-dicarboxylate	0.000	0.000	0.000
V78	Diethyl benzene-1,2-dicarboxylate	10.121	10.672	9.652
V82	Diphenylmethanone	11.434	11.733	11.194
V84	Bis(2-methylpropyl)Benzene-1,2-dicarboxylate	-0.012	-12.001	-12.001
V85	2-Phenylacetic acid	11.690	10.905	0.000
V87	Dibutyl benzene-1,2-dicarboxylate	13.864	13.895	13.084
<hr/>				
Esters				
V5	Ethyl acetate	1.517	1.048	1.214
V11	Ethyl 2-methylpropanoate	1.303	-0.816	0.043
V13	Methyl 2-methylprop-2-enoate	-13.132	-13.132	-13.132
V15	Ethyl butanoate	0.481	1.023	-0.513
V17	Ethyl 2-methylbutanoate	9.261	0.000	0.000
V18	Ethyl 3-methylbutanoate	7.984	0.000	0.000
V20	Butyl acetate	8.611	0.000	0.000
V35	Ethyl octanoate	0.000	0.000	0.000
V38	2-Ethylhexyl prop-2-enoate	-9.169	-0.382	-9.169
V67	Ethyl tetradecanoate	0.000	9.559	0.000
V72	Ethyl hexadecanoate	12.139	12.783	12.006
V79	Ethyl octadecanoate	0.000	10.541	0.000
<hr/>				
Furans & furan-derivatives				
V37	Furan-2-carbaldehyde	-0.437	-10.667	1.516
V51	Furan-2-ylmethanol	11.009	10.195	11.456
V55	2H-Furan-5-one	0.078	-9.946	-0.302
V83	5-(Hydroxymethyl)Furan-2-carbaldehyde	-0.429	-12.996	1.756
<hr/>				
Ketones				
V7	Butan-2-one	-10.457	-10.457	-10.457

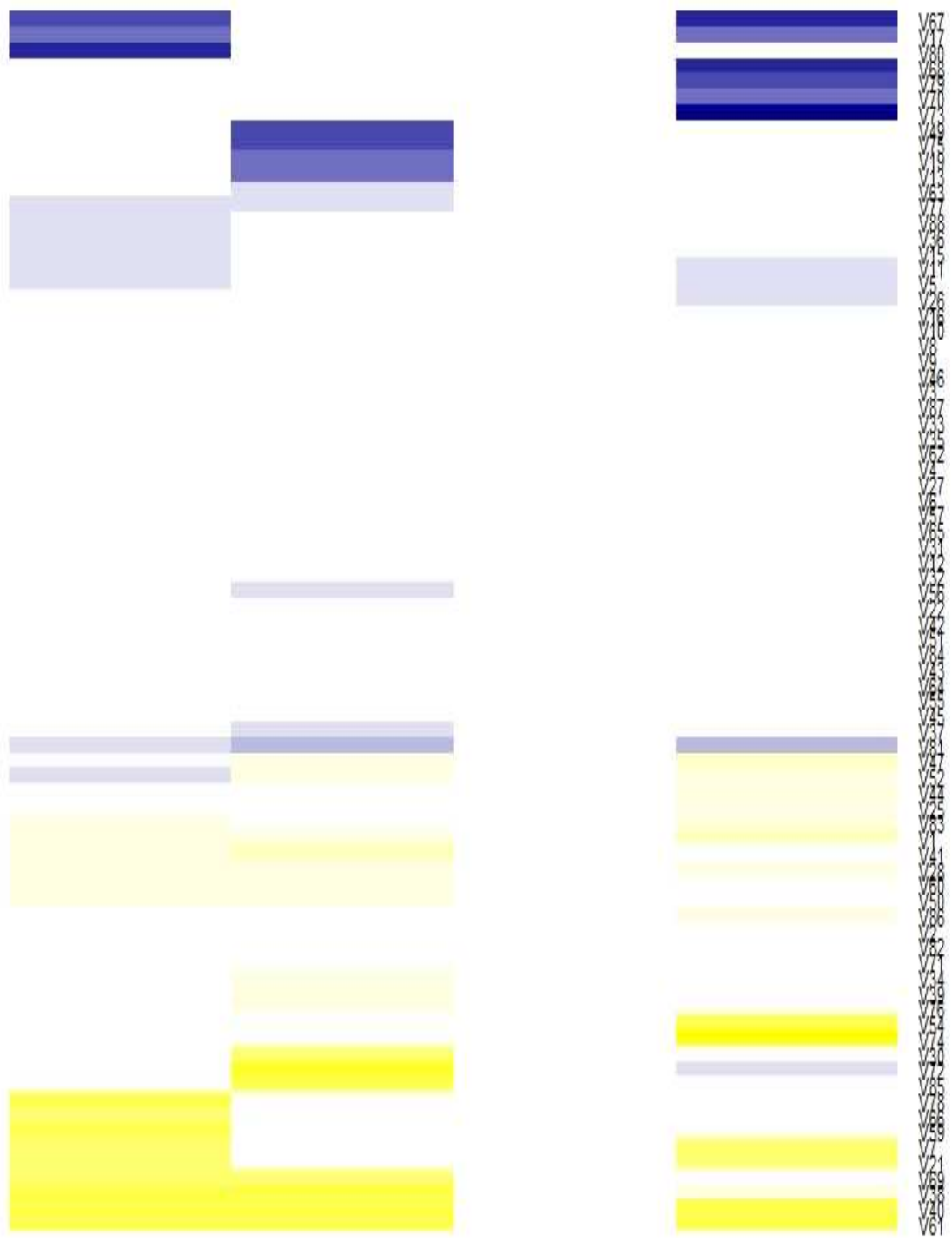
V12	Butane-2,3-dione	-0.406	-0.098	0.175
V27	Octan-3-one	0.898	1.248	0.324
V31	3-Hydroxybutan-2-one	-0.602	0.032	0.535
V32	1-Hydroxypropan-2-one	0.299	0.460	0.512
V50	1-Phenylethanone	-0.216	-0.303	-0.002
V56	2-Hydroxycyclopent-2-en-1-one	9.853	0.000	10.571
V61	2-Hydroxy-3-methylcyclopent-2-en-1-one	0.000	0.000	0.000
Lactones				
V49	Oxolan-2-one	0.000	9.803	0.000
Phenols				
V65	Phenol	8.917	8.652	9.315
V76	2,4-Ditert-butylphenol	-0.369	-0.258	-0.400
Sulfur-containing compounds				
V1	Methanethiol	1.613	-8.665	1.285
Miscellaneous compounds				
V41	2-Formyloxyethyl formate	2.130	-9.794	0.784
V46	2-Hydroxyethyl formate	0.081	-1.312	-0.337
V48	2-Hydroxyethyl acetate	-0.979	-1.269	-11.968
V54	Naphthalene	-9.516	-0.102	0.171
V57	1,4-Dioxan-2-one	10.926	10.484	10.461
V71	1,1,3-Trimethyl-3-phenyl-2H-indene	-10.548	0.343	-0.181
V74	3,5-Dihydroxy-6-methyl-2,3-dihydropyran-4-one	-0.122	-1.533	0.454
V80	1H-Indole	0.000	0.000	0.000

표 3-20. 향미 우수 균주(AOE)의 배양 조건별 FOLD CHANGE 값의 변화

No.	Possible compound	Fold change		
		Ex 1	Ex 2	Ex 3
Acids				
V36	Acetic acid	1.535	0.099	0.786
V43	Propanoic acid	0.868	-0.304	0.321
V44	2-Methylpropanoic acid	0.725	-2.295	0.440
V47	Butanoic acid	0.452	-4.005	-1.399
V52	2-Methylbutanoic acid	1.935	-2.497	-1.045
V68	Octanoic acid	0.000	11.397	0.000
V73	Decanoic acid	0.000	14.994	0.000
V81	Dodecanoic acid	2.913	3.474	3.581
V86	Tetradecanoic acid	-0.288	-1.007	-0.628
Aldehydes				
V2	Acetaldehyde	-0.339	-0.451	-0.359
V3	Butanal	-0.343	0.132	0.224
V8	2-Methylbutanal	-0.012	0.802	-0.138
V9	3-Methylbutanal	-0.021	0.660	-0.047
V21	Hexanal	-8.133	-8.133	-0.843
V30	Octanal	-0.400	-0.230	-8.815

V34	Nonanal	-0.188	-0.433	-1.194
V40	Decanal	-9.229	-9.229	-9.229
Alcohols				
V10	Ethanol	0.121	0.387	-0.623
V16	Propan-1-ol	0.366	0.516	-0.338
V22	2-Methylpropan-1-ol	0.465	0.269	0.335
V25	Butan-1-ol	0.541	-2.192	-0.884
V26	3-Methylbutan-1-ol	0.882	1.089	-0.953
V33	Hexan-1-ol	0.000	0.000	0.000
V39	2-Ethylhexan-1-ol	-0.565	-0.290	-1.129
V45	2-(2-ethoxyethoxy)Ethanol	0.008	-0.520	0.429
V64	2-(2-hydroxyethoxy)Ethanol	0.356	-0.596	0.858
V66	2-[2-(2-ethoxyethoxy)ethoxy]Ethanol	-8.956	0.433	0.437
V77	2-[2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy]Ethanol	1.127	-0.658	1.220
V88	2-[2-[2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy]ethoxy]Ethanol	1.194	-0.697	0.898
Benzenes & benze-derivatives				
V28	Styrene	-1.466	-1.608	-1.398
V42	Benzaldehyde	0.400	0.205	0.238
V59	1-Phenylbutan-2-one	-9.319	-0.263	-0.076
V60	3,5-Dimethylbenzaldehyde	-1.095	-0.825	-1.300
V63	2-Phenylethanol	0.972	-0.401	1.287
V75	Dimethyl benzene-1,2-dicarboxylate	0.000	0.000	9.259
Benzenes & benzene-derivatives				
V78	Diethyl benzene-1,2-dicarboxylate	-10.455	0.302	-0.219
V82	Diphenylmethanone	-0.395	-0.230	-0.727
V84	Bis(2-methylpropyl) Benzene-1,2-dicarboxylate	0.993	-0.195	0.231
V85	2-Phenylacetic acid	0.305	0.001	-10.512
V87	Dibutyl benzene-1,2-dicarboxylate	0.000	0.000	0.000
Esters				
V5	Ethyl acetate	1.809	1.253	0.156
V11	Ethyl 2-methylpropanoate	1.667	1.606	0.873
V13	Methyl 2-methylprop-2-enoate	0.000	0.000	8.003
V15	Ethyl butanoate	1.745	-0.954	0.623
V17	Ethyl 2-methylbutanoate	8.638	7.191	0.000
V35	Ethyl octanoate	0.000	0.000	0.000
V38	2-Ethylhexyl prop-2-enoate	-10.535	-1.449	-10.535
V62	Ethyl dodecanoate	0.000	0.000	0.000
V67	Ethyl tetradecanoate	10.219	11.045	0.000
V72	Ethyl hexadecanoate	0.675	1.237	-11.338
V79	Ethyl octadecanoate	0.000	9.737	0.000
Furans & furan-derivatives				
V4	2-Methylfuran	0.000	0.000	0.000
V37	Furan-2-carbaldehyde	-0.675	-0.566	1.452
V51	Furan-2-ylmethanol	0.575	-0.136	0.541
V55	2H-Furan-5-one	0.030	-0.930	0.896

V83	5-(hydroxymethyl)Furan-2-carbaldehyde	-1.494	-2.081	0.248
Ketones				
V7	Butan-2-one	-7.660	-7.660	-0.215
V12	Butane-2,3-dione	0.684	0.637	0.930
V27	Octan-3-one	0.000	0.000	0.000
V31	3-Hydroxybutan-2-one	-0.822	0.329	-0.269
V32	1-Hydroxypropan-2-one	0.347	0.616	0.731
V50	1-Phenylethanone	-1.605	-0.996	-1.496
V56	2-Hydroxycyclopent-2-en-1-one	0.839	0.416	1.271
V61	2-Hydroxy-3-methylcyclopent-2-en-1-one	-9.297	-9.297	-9.297
Lactones				
V49	Oxolan-2-one	0.000	0.000	9.317
Phenols				
V65	Phenol	-0.601	0.173	-0.090
V70	4-Methylphenol	0.000	7.927	0.000
V76	2,4-Ditert-butylphenol	-0.710	-0.570	-1.311
Sulfur-containing compounds				
V1	Methanethiol	-2.045	-3.825	-1.057
V19	(methyldisulfanyl)Methane (disulfide, dimethyl)	0.000	0.000	8.520
Miscellaneous compounds				
V6	1,1-Diethoxyethane	0.000	0.000	0.000
V41	2-Formyloxyethyl formate	-1.175	-0.041	-3.556
V46	2-Hydroxyethyl formate	-0.202	0.682	0.304
V54	Naphthalene	-0.729	-10.234	-0.129
V57	1,4-Dioxan-2-one	0.000	0.000	0.000
V69	(2-acetyloxy-3-hydroxypropyl) Acetate	-8.899	-0.262	-8.899
V71	1,1,3-Trimethyl-3-phenyl-2H-indene	-0.439	-0.616	-0.752
V74	3,5-Dihydroxy-6-methyl-2,3-dihydropyran-4-one	-0.215	-13.982	0.673
V80	1H-Indole	12.458	0.000	0.000



Ex.1 Ex.3 control Ex.2

그림 3-50. 향미 생성 우수 균주(AOE)의 배양조건에 따른 fold change 변화의 heat map 그래프



그림 3-51. 참조 균주(AOS)의 배양조건에 따른 fold change 변화의 heat map 그래프

- 그림 3-50, 3-51의 heat map에서 dark blue는 표준 배양 조건에 비해 증가된 부분이고, yellow는 감소된 부분이며 색상이 진할수록 변화가 큰 것으로 볼 수 있음. Fold change의 변화정도를 관찰한 결과, 발효 온도, 시간 및 초기 pH의 변화에 대해 참조 균주가 향미 우수 생성균주에 비해 휘발성 대사체 프로파일링에 미치는 영향이 큰 것으로 확인함. 향미 우수 균주는 pH, 발효시간, 발효 온도 순으로 표준 배양조건과 유사한 것으로 볼 수 있음. 반면 참조 균주의 경우 표준 배양 조건과 달라졌을 시 휘발성 대사체 프로파일링의 변화가 큰 것을 확인함
- 참조 균주(AOS)는 탄소 수 4개 이하의 fatty acid와 가지를 가진 fatty acids의 정량 값이 조건에 비해 유의적으로 변화하였는데, 온도가 높을수록 2-methylbutanoic acid 외에 감소하는 경향을 보임. 2-methylbutanoic acid는 초기 pH가 낮을수록 증가하는 경향을 보였음. 3-Methylbutanoic acid는 배양 시간이 증가할수록 증가하는 경향을 보임. 3-methylbutanal은 배양 조건이 변화할수록 증가되는 경향을 보였으나, 반면 2-methylbutanal은 표준 배양조건외의 조건에서 모두 감소하는 경향을 보임. 지방산의 분해산물인 hexanal, octanal의 경우는 각각 초기 pH가 변화하거나 배양시간이 증가할수록 증가하는 경향을 보임.
- 2-phenylalcohol, styrene, benzaldehyde 등의 aroma ring 구조를 지닌 benzene derivatives 등은 표준 배양조건에 따라 유의적인 변화를 보임. 그 외 ethyl acetate는 모두 유의적으로 증가하는 경향을 보였으며, 가지 구조를 가진 탄소 수 4개 fatty acid의 ethyl ester는 모두 배양시간에 따라 크게 증가하는 경향을 보임. Furan류는 배양 온도가 증가할수록 감소하는 경향을 보임. Fura-2-ylmethanol은 증가하였으나, 다른 배양 조건에 비해서는 낮은 증가 수치를 보임
- 향미 생산 우수균주(AOE)에서 acetic acid와 2-methylbutanoic acid가 배양 시간에 따라 증가하는 경향을 보였으며, 오히려 배양 온도가 증가할수록 감소하는 경향을 보임. 반면, 고급 지방산의 증가가 배양 온도가 증가할수록 증가하는 경향이 확인됨. 가지 구조를 가진 탄소 수 4개 fatty acid의 ethyl ester는 배양시간이 증가할수록, 배양 온도가 높을수록 유의적으로 증가함. 썩은 달걀, cheesy한 향을 가진 methanethiol은 표준 배양조건에서 가장 높은 정량 값을 보였으며, 배양 조건이 변할수록 증가하는 경향을 보임. 불쾌취를 지닌 1H-indole은 배양 시간에 따라 크게 증가하는 경향을 보였으나, 높은 온도나 pH변화에 의해 감소하는 경향을 보임

3-2 연구개발 성과

가. 논문게재 목표 및 성과

(1) 논문게재 목표: 총 5건(1차년도 2건 및 2차년도 3건)

(2) 논문게재 성과: 총 8건(1차년도 3건 및 2차년도 5건)으로 **초과 달성**

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국 내 / 국외	SCI(E)	게재 연도	비고
1	Metabolomics provides quality characterization of commercial gochujang (Fermented Pepper Paste)	Molecules	Gyu Min Lee and Choong Hwan Lee	21 (7)	국외	O	2016	
2	Perplexing metabolomes in fungal-insect trophic interactions: A terra incognita of mycobiococontrol mechanisms	Frontiers in Microbiology	Digar Singh and Choong Hwan Lee	7	국외	O	2016	
3	Comparative evaluation of microbial diversity and metabolite profiles in Doenjang, a fermented soybean paste, during the two different industrial manufacturing processes	Food Chemistry	Sunmin Lee and Choong Hwan Lee	221	국외	O	2016	분야별 상위 5%이내
4	Time-resolved comparative metabolomes for Koji fermentation with brown-, white-, and giant embryo-rice	Food Chemistry	Da Eun Lee and Choong Hwan Lee	231	국외	O	2017	분야별 상위 5%이내
5	Process specific differential metabolomes for industrial gochujang types (pepper paste) manufactured using white rice, brown rice, and wheat	Food Chemistry	Yu Kyung Jang and Choong Hwan Lee	234	국외	O	2017	분야별 상위 5%이내
6	Effects of schiff base formation and aldol condensation on the determination of aldehydes in rice wine using GC-MS,	Molecules	Ji Hye Han and Young-Suk Kim	22 (4)	국외	O	2017	
7	Effects of maltodextrins with different dextrose-equivalent values	Flavour and Fragrance Journal	Sang Mi Lee and Young-Suk Kim	33	국외	O	2017	
8	Metabolomics for empirical delineation of the traditional Korean fermented foods and beverages	Trends in Food Science & Technology	Digar Singh and Choong Hwan Lee	61	국외	O	2017	분야별 상위 5%이내

나. 지식재산권 목표 및 성과

- (1) 지식재산권 목표: 총 3건(1차년도 특허 출원 1건 및 2차년도 특허 출원 1건, 등록 1건)
 (2) 지식재산권 성과: 총 2건(1차년도 특허 출원 1건 및 2차년도 특허 출원 1건) 달성

번호	특허명	출원번호	출원일자	출원인	발명인	출원국	비고
1	고추장 원료 판별용 대사체 마커 및 이의 용도	10-2016-0080544	2016.06.28	건국대학교 산학협력단	이충환, 정은성, 서동호, 이규민	대한민국	
2	도정도에 따른 쌀 코지의 제조방법	10-2017-0165136	2017.12.04	건국대학교 산학협력단	이충환, 이선민	대한민국	

다. 기술이전 목표 및 성과

- (1) 기술이전 목표: 총 1건(2차년도 기술이전 1건)
 (2) 기술이전 성과: 총 1건(2차년도 기술이전 1건) 달성

번호	계약명	기술료 (천원)	계약체결일	기술실시권 유형	비고
1	“도정도에 따른 쌀 코지의 제조방법”에 관한 기술이전	10,000	2017.12.08	특허양도	

라. 유용유전자원 확보 목표 및 성과

- (1) 유용유전자원 확보 목표: 총 6건(1차년도 2건 및 2차년도 4건)
 (2) 유용유전자원 확보 성과: 총 6건(1차년도 2건 및 2차년도 4건) 달성

번호	유용유전자원명	등록번호	등록일	등록기관	비고
1	<i>P. expansum</i> 의 Metabolome information 데이터	KBRS20161213_000003	16.12.13	국가생명연구자원정보센터(KOBIC)	
2	<i>P. expansum</i> 의 Metabolome information 데이터2	KBRS20161213_000004	16.12.13	국가생명연구자원정보센터(KOBIC)	
3	<i>A. oryzae</i> 고체 배양 특이적 대사산물	KBRS20170831_000001	17.08.30	국가생명연구자원정보센터(KOBIC)	
4	<i>A. oryzae</i> 액체 배양 특이적 대사산물	KBRS20170831_000002	17.08.30	국가생명연구자원정보센터(KOBIC)	
5	<i>Aspergillus oryzae</i> 의 Metabolome information 데이터1	KBRS20171219_000001	17.12.19	국가생명연구자원정보센터(KOBIC)	
6	<i>Aspergillus oryzae</i> 의 Metabolome information 데이터2	KBRS20171219_000002	17.12.19	국가생명연구자원정보센터(KOBIC)	

마. 사업화·실용화 목표 및 성과

- (1) 사업화·실용화 목표: 총 1건
 (2) 사업화·실용화 성과: 총 1건(시제품 개발)

번호	사업화명	사업화형태	업체명	제품용도	비고
1	곡자 koji 시제품 개발	기술이전-공정개선	메타매스	시제품	사업화 예정

바. 학술대회 발표 목표 및 성과

(1) 학술대회 발표 목표: 총 7건(1차년도 3건 및 2차년도 4건)

(2) 학술대회 발표 성과: 총 10건(1차년도 5건 및 2차년도 5건) **초과 달성**

번호	학술대회명	발표자	발표일시	장소	국가	비고
1	(사)한국대사체학회 정기학술대회 및 제 4차 정기총회 2건	이선민, 이규민	16.04.07	건국대학교 새천년관	대한민국	
2	KMB2016 43rd Annual Meeting & International Symposium The Korean Society for Microbiology & Biotechnology	서동호	16.06.22	대전컨벤션센터	대한민국	
3	Metabolomics 2016 2건	이선민, 이다은	16.06.28	Convention Centre Dublin (CCD)	Ireland	
4	2017 한국대사체학회	이미연	17.04.06	건국대학교 새천년관	대한민국	
5	2017 International Symposium and Annual Meeting of yhe KSABC 2건	이선민, 서한솔	17.06.16	부산해운대 그랜드호텔	대한민국	
6	2017 한국식품과학회 국제학술대회	김선아	17.06.22	제주 ICC	대한민국	
7	2017 국제건강기능식품과학회	이선민	17.10.24	군산컨벤션센터	대한민국	

사. 연구인력 양성 목표 및 성과

(1) 연구인력 양성 목표: 총 6건(1차년도 3건 및 2차년도 3건)

(2) 연구인력 양성 성과: 총 6건(1차년도 4건 및 2차년도 2건) 달성

번호	연구인력	해당자	학위수여일	비고
1	박사학위자 2명 및 석사학위자 2명 배출	이미연 박사 정은성 박사 이다은 석사 오동구 석사	17년 02월	건국대학교
2	석사학위자 1명 배출	황영림 석사	17년 08월	이화여자대학교
3	석사학위자 1명 배출	심인선 석사	18년 02월	건국대학교

아. 홍보실적 목표 및 성과

(1) 홍보실적 목표: 총 0건

(2) 홍보실적 성과: 총 3건(1차년도 1건 및 2차년도 2건) **초과 달성**

번호	매체명	내용	홍보일	비고
1	BRIC 농수식품	BRIC 농수식품 식품성과에서 논문의 소개(분야별 상위5%)	우수 16.11.02	
2	BRIC 농수식품	BRIC 농수식품 식품성과에서 논문의 소개(분야별 상위5%)	우수 17.03.27	
3	BRIC 농수식품	BRIC 농수식품 식품성과에서 논문의 소개(분야별 상위5%)	우수 17.04.28	

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

		코드번호	D-06	
4-1. 목표달성도				
번호	연구목표	달성도(%)	개발 내용 및 범위	관련분야 기여도 (%)
1	농식품 유래 미생물 균주의 복합 배양조건 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 환경적 요인에 따른 다양한 균주의 meta-metabolome 프로파일링 - <i>A. oryzae</i> KCCM 12698의 고체 및 액체 배양 비교 - 고체 및 액체 배양환경에 따른 <i>A. oryzae</i> KCCM 12698 균주의 세포 내 대사체 프로파일링 	70
2	다변량 통계분석 및 네트워크 분석을 이용한 통합 대사경로 및 알고리즘 구축	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 전통발효식품의 발효 원물 및 환경에 따른 대사체 및 생리활성 차이 규명 - 전통발효식품(곡자)의 발효 원물에 따른 비교 - 쌀 도정도에 따른 <i>A. oryzae</i> 발효 환경 차이 규명 ○ 균주 별 쌀 코지 대사체 프로파일링 - 전통발효식품(곡자)의 균주에 따른 비교 ○ 전통발효식품(된장)의 산업적 공정에 따른 미생물 및 대사체 분석 - 전통발효식품(된장)의 산업적 공정에 따른 미생물과 발효 대사체 간의 상관관계 규명 	90
3	전통발효식품의 산업적 QC 지표 제공	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 고추장 원물에 따른 특이적 대사체 규명 - 대사체 프로파일링을 통한 18종의 시판 밀, 현미, 백미 고추장의 특이적 바이오마커 선정 	70
4	농식품 미생물자원 유래의 발효 대사체 In-house library 구축	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ GC-MS 분석을 통한 In-house library 구축 - 아미노산, 유기산, 지방산, 당 등의 발효 관련 1차 대사산물과 2차 대사산물인 휘발성 향기성분에 	50

			<p>대한 In-house library 구축</p> <p>○ LC-MS 분석을 통한 In-house library 구축</p> <p>- Flavonoids, anthocyanins, phenolic acids와 관련 aglycone 등 발효 관련 2차 대사산물에 대한 In-house library 구축</p>	
5	환경적 요인에 따른 발효유래의 향미성분 프로파일링	100	<p>○ GC-TOF-MS를 이용한 비휘발성 대사산물과 SPME/SBSE-GC-MS를 이용한 휘발성 향기성분 프로파일링</p> <p>○ PCA 및 PLS-DA를 이용한 발효 균주별 발효유래 휘발성, 비휘발성 대사산물 분석</p>	70
6	전통발효 식품 내 향미 대사체 규명	100	<p>○ GC-TOF-MS를 이용해 막걸리의 비휘발성 대사산물과 SPME-GC-MS를 이용한 휘발성 향기성분을 프로파일링하여 발효에 이용된 균주별 향미 대사체를 동정</p>	70

4-2. 관련분야 기여도

- 연구목표 1번의 ‘농식품 유래 미생물 균주의 복합 배양조건 확립’의 경우, 국내·외에서 약 70%이상의 기여율을 보일 것으로 예상함. 최근 국내·외의 많은 발효미생물 관련한 연구는 활성 증진, 표적 대사체 추적 등의 단편적 연구가 대다수임. 이번 과제를 통하여 발효에서 가장 중요한 미생물의 고체 및 액체 환경에 따른 세포 내외의 1차 및 2차 대사체 차이를 해석함으로써, 다양한 발효환경에 따른 미생물의 생산 대사체 및 활성효소의 변화를 조절하여 발효식품산업에 적용될 수 있음
- ‘다변량 통계분석 및 네트워크 분석을 이용한 통합 대사경로 및 알고리즘 구축’ 연구는 대사체 프로파일링을 통한 발효 기질로 이용되는 원료 및 환경(도정도), 균주에 따른 다양한 변화에 대한 연구를 수행하였음. 더 나아가 된장의 산업적 공정에 따른 미생물 및 발효 대사체간의 상관관계 분석을 통해 복잡한 발효과정의 시스템적 해석의 실마리를 제공하였음. 이는 다른 국내·외 발효 연구에 선도적인 연구로 우월성을 가짐
- ‘전통발효식품의 산업적 QC 지표 제공’ 연구는 시판되고 있는 원료가 서로 다른 여러 종류의 고추장을 대사체학기법을 통해 산업적 QC를 제공하였음. 다른 국내·외 연구의 경우, 특정 지표물질 또는 효소의 생산 증가 및 생리활성의 증진만을 보는 단편적인 연구가 대다수임. 이 연구를 통해 특정 지표물질 뿐만 아니라 존재하는 1차 및 2차 대사체의 전반적인 차이를 해석함으로써 원료와 미생물, 첨가물 등이 포함된 복잡한 발효식품에 대한 총체적 해석의 가능성을 제시하였음

- ‘환경적 요인에 따른 발효유래의 향미성분 프로파일링’ 및 ‘전통발효 식품 내 향미 대사체 규명’ 연구는 원물 및 미생물, 첨가물에 따라 변화되는 발효식품의 향미대사체를 분석하는 연구임. 이를 통해 외국인들에게 기피감을 주는 향의 조절 및 제어가 가능하고, 풍미관련 다양한 향미 대사체의 증진에 대한 기초연구로 작용될 수 있음

5. 연구결과의 활용계획

	코드번호	D-07
○ 본 과제의 meta-metabolome 해석기법을 통해 복잡한 발효식품의 기질, 미생물, 공정 등에 의한 총체적 발효 대사체 연구는 기존연구의 단편적인 효능 증진 및 표적 성분 분석 등의 한계점을 뛰어넘는 국내발효식품을 새롭게 해석하는 방향을 제시하였음		
○ 신규성 및 경제성이 있다고 판단되는 기술의 기술이전을 통한 관련기업의 발전과 국내 발효 식품 산업의 기술력 제고에 도움을 줄 수 있음		
○ 또한, 본 연구를 통해 얻어진 원천기술 및 새로운 해석 방법은 국내 BT 산업의 신규 시장 확보 및 제품 글로벌화에 필수적인 기반기술로 활용될 수 있을 뿐만 아니라 국내 발효식품의 세계화를 위한 초석이 될 수 있음		
○ 기능대사체학 기법을 적용한 발효 식품의 표준화 기술을 확립함으로써 국내 발효식품의 품질관리에 대한 기반 기술을 확보하고, 나아가 다른 식품산업 적용을 통한 다양한 식품 산업 분야 시장 개척에 활용함		

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08
○ 농식품 미생물자원에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는 주요 선진국의 경우, 국가적으로 장기적인 지원 하에 관련센터 설립 및 체계적인 연구를 통하여 대사체 및 미생물 분석과 그에 따른 데이터 처리, DB 구축, 다양한 통계 분석으로 연구의 양적인 측면과 질적인 측면에서 큰 발전 중에 있음. 국내의 경우 현재 농식품 미생물자원의 중요성과 관련 연구의 관심이 증대되고 있는 추세이나, 전반적인 연구가 아닌 특정 대사체 및 미생물에 대한 단편적인 연구가 진행되고 있음		
○ 국외의 경우, 두 가지 효모를 co-inoculation을 통한 단일 균주와의 발효 및 숙성시기에 따른 맛 관여 대사체의 비교(Rossouw et al., <i>Food Microbiol.</i> 2012), 세균과 효모를 co-inoculation을 통한 포도주 발효의 시기별 미생물 및 휘발성 발효대사체 비교(Caroline et al., <i>World J. Microbiol. Biotechnol.</i> 2012), 쌀겨의 효모 발효를 통한 생리 활성 증진 및 그에 따른 대사체 분석(Elizabeth et al., <i>Mole. Cell</i> 2012), 와인의 양조 공정 중 유산균에 의한 알콜 발효 단계의 향 및 맛 성분 분석(Antalick et al., <i>J. Agric. Food Chem.</i> 2012), 치즈의 발효시기별 대사체의 함량변화(Boucher et al., <i>Food Chem.</i> 2013), 쌀 발효 시 변화하는 미생물 다양성 및 그에 따른 당의 증감변화(Kuntal et al., <i>Food Chem.</i> 2015), 여러 나라의 간장 1차 대사체 비교 분석을 통한 지표물질 선정(Yamamoto et al., <i>J. Biosci. Bioeng.</i> 2012), 야쿠파 발효 시 미생물 다양성 및 그에 따른 대사체 변화 확인(Freire et al., <i>World J. Microbiol. Biotechnol.</i> 2014), 코코아의 지역 및 발효에 따른 차이나는 대사체 확인(Augusta et al., <i>Food Chem.</i> 2014), co-culture 또는 단일 균주로 요		

거트 발효 시에 변하는 대사체 및 pH와 산도 변화(Sarn et al., *Int. J. Food Microbiol.* 2014) 등 다양한 환경적 요인들의 대한 미생물 및 대사산물의 비교 분석 및 산업화를 위한 기초연구가 국내에 비해 잘 이루어지고 있는 실정임

7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○ 해당사항 없음		

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

※ 해당사항 없음

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)		

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
<p>○ 연구실 안전환경 조성에 관한 법률 시행에 따른 교내 안전관리팀 구성</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1년 2회 교내 자체 실험실 위험물 안전관리 지도 및 전력시설물 안전점검 관리 실시 <ul style="list-style-type: none"> ① 2016.12.06. 법정 소방시설 작동기능점검 실시 ② 2016.06.25. 전력시설물 정기안전점검 실시 ③ 2017.06.01. 법정 소방시설 종합정밀점검 실시 ④ 2017.10.24. 연구실 법정 안전점검 실시 - 1년 1회 교내 실험실 연구활동종사자 건강검진 실시 <ul style="list-style-type: none"> ① 2016.07.27. 실험실 연구활동종사자 법정 건강검진 실시 ② 2017.11.09. 실험실 연구활동종사자 법정 건강검진 실시 - 1년 2회 교내 자체 실험실 안전관리 교육 실시 <ul style="list-style-type: none"> ① 2016년 전반기/후반기 안전교육 실시 (이수증) ② 2017년 전반기/후반기 안전교육 실시 (이수증) - 1년 1회 교내 생물안전교육 실시 <ul style="list-style-type: none"> ① 2016.10.12. 교내 생물안전교육 실시 (수료증) ② 2017.03.21. 교내 생물안전교육 실시 (수료증) 		

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	Perplexing Metabolomes in Fungal-Insect Trophic Interactions: A <i>Terra Incognita</i> of Mycobiocontrol Mechanisms	건국 대학교	교신	Frontiers in Microbiolog y	4.076	2016.10.19	중복	SCI
2	논문	Metabolomics for empirical delineation of the traditional Korean fermented foods and beverages	건국 대학교	교신	Trends in Food Science & Technology	5.191	2017.01.05	중복	SCI/분야 별 상위 5% 이내
3	논문	Time-resolved comparative metabolomes for <i>Koji</i> fermentation with brown-, white-, and giant embryo-rice	건국 대학교	교신	Food Chemistry	4.529	2017.03.23	중복	SCI/분야 별 상위 5% 이내
4	논문	Process specific differential metabolomes for industrial <i>gochujang</i> types (pepper paste) manufactured using white rice, brown rice, and wheat	건국 대학교	교신	Food Chemistry	4.529	2017.04.27	중복	SCI/분야 별 상위 5% 이내
5	논문	Comparative evaluation of microbial diversity and metabolite profiles in <i>doenjang</i> , a fermented soybean paste, during the two different industrial manufacturing processes	건국 대학교	교신	Food Chemistry	4.529	2017.10.31	중복	SCI/분야 별 상위 5% 이내

11. 기타사항

	코드번호	D-13
○ 해당사항 없음		

12. 참고문헌

	코드번호	D-14
○ Rossouw, D., Du Toit, M., & Bauer, F. F.(2012). The impact of co-inoculation with <i>Oenococcus oeni</i> on the transcriptome of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and on the flavour-active metabolite profiles during fermentation in synthetic must. <i>Food microbiology</i> , 29(1), 121-131		
○ Abrahamse, C. E., & Bartowsky, E. J.(2012). Timing of malolactic fermentation inoculation in Shiraz grape must and wine: influence on chemical composition. <i>World Journal of Microbiology and Biotechnology</i> , 28(1), 255-265		
○ Wasmuth, E. V., & Lima, C. D.(2012). Exo- and endoribonucleolytic activities of yeast cytoplasmic and nuclear RNA exosomes are dependent on the noncatalytic core and central channel. <i>Molecular cell</i> , 48(1), 133-144		
○ Antalick, G., Perello, M. C., & de Revel, G.(2012). Characterization of fruity aroma modifications in red wines during malolactic fermentation. <i>Journal of agricultural and food chemistry</i> , 60(50), 12371-12383		
○ Le Boucher, C., Courant, F., Jeanson, S., Chereau, S., Maillard, M. B., Royer, A. L., ... & Lortal, S.(2013). First mass spectrometry metabolic fingerprinting of bacterial metabolism in a model cheese. <i>Food chemistry</i> , 141(2), 1032-1040		
○ Ghosh, K., Ray, M., Adak, A., Dey, P., Halder, S. K., Das, A., ... & Mondal, K. C.(2015). Microbial, saccharifying and antioxidant properties of an Indian rice based fermented beverage. <i>Food chemistry</i> , 168, 196-202		
○ Yamamoto, S., Bamba, T., Sano, A., Kodama, Y., Imamura, M., Obata, A., & Fukusaki, E.(2012). Metabolite profiling of soy sauce using gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry and analysis of correlation with quantitative descriptive analysis. <i>Journal of bioscience and bioengineering</i> , 114(2), 170-175		
○ Freire, A. L., Ramos, C. L., de Almeida, E. G., Duarte, W. F., & Schwan, R. F.(2014). Study of the physicochemical parameters and spontaneous fermentation during the traditional production of yakupa, an indigenous beverage produced by Brazilian Amerindians. <i>World Journal of Microbiology and Biotechnology</i> , 30(2), 567-577		
○ Caligiani, A., Palla, L., Acquotti, D., Marseglia, A., & Palla, G.(2014). Application of ¹ H NMR for the characterisation of cocoa beans of different geographical origins and fermentation levels. <i>Food chemistry</i> , 157, 94-99		
○ Settachaimongkon, S., Nout, M. R., Fernandes, E. C. A., Hettinga, K. A., Vervoort, J. M., van Hooijdonk, T. C., ... & van Valenberg, H. J.(2014). Influence of different proteolytic strains of <i>Streptococcus thermophilus</i> in co-culture with <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> on the metabolite profile of set-yoghurt. <i>International journal of food microbiology</i> , 177, 29-36		

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 기능대사체 해석 기반 농식품 미생물자원 탐색				
	(영문) Functional metabolomics-based interpretation of agrifood microbial resources				
주관연구기관	건국대학교 산학협력단		주 관 연 구 자 책 임 자	(소속) 건국대학교	
참 여 기 업	-			(성명) 이 충 환	
총연구개발비 (300,000천원)	계	300,000	총 연 구 기 간	2016. 02.29~ 2018. 02.28(2년 월)	
	정부출연 연구개발비	300,000	총 참 여 수 연 구 원	총 인 원	19
	기업부담금	-		내부인원	2
	연구기관부담금	-		외부인원	17

○ 연구개발 목표 및 성과

- 연구개발 목표
 - 농식품 미생물발효에서 1, 2차 대사체 및 향미 대사체를 포함한 meta-metabolomics(메타-메타볼로믹스) 통합해석 연구를 통해 미생물 자원 탐색을 위한 발효미생물-기능대사체 간의 총체적인 상관관계 해석시스템을 개발/구축하고자함
- 연구개발 성과
 - 논문게재 총 8건 달성(분야별 상위 5% 이내 4건 포함), 특허출원 2건 달성, 기술이전 1건 달성, 유용유전자원 확보 6건 달성, 사업화 1건 달성(시제품 개발), 학술대회 발표 10건 달성, 연구인력 양성 6건 달성, 홍보실적 3건 달성

○ 연구내용 및 결과

- 농식품 유래 미생물 균주의 복합 배양조건 확립: 환경적 요인에 따른 다양한 균주의 meta-metabolome 프로파일링
- 다변량 통계분석 및 네트워크 분석을 이용한 통합 대사경로 및 알고리즘 구축: 전통발효식품의 원물과 환경에 따른 대사체 및 생리활성 차이 규명, 전통발효식품의 산업적 공정에 따른 미생물 및 대사체 상관관계 분석
- 전통발효식품의 산업적 QC 지표 제공: 18종 시판 고추장 원물에 따른 특이적 대사체 규명
- 전통발효식품 내 향미 성분 프로파일링: 발효 균주별 향미 대사체 분석

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 신규성 및 경제성이 있다고 판단되는 사항의 기술이전을 통한 관련기업의 발전
- 본 연구를 통해 얻어진 원천기술 확보 및 국내발효식품 관련 제품 글로벌화에 필수적 기반기술 제공
- 원물 및 환경에 따른 복잡한 발효식품의 새로운 해석법을 통한 표준화 기술을 확립함으로써 품질 관리에 대한 핵심기술 확보

자체평가의견서

1. 과제현황

			코드번호	D-15	
과제번호					
사업구분	포스트게놈 다부처 유전체사업				
연구분야	농림식품 융복합>농생명 정보·전자>농생명 정보·전자	과제구분	단위		
사업명	포스트게놈 다부처 유전체사업		주관		
총괄과제	기재하지 않음	총괄책임자	기재하지 않음		
과제명	기능대사체 해석 기반 농식품 미생물자원 탐색	과제유형	기초		
연구기관	건국대학교 산학협력단	연구책임자	이충환		
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	16.02~17.02	150,000		150,000
	2차년도	17.03~18.02	150,000		150,000
	3차년도				
	4차년도				
	계		300,000		300,000
참여기업	해당사항 없음				
상대국	해당사항 없음	상대국연구기관	해당사항 없음		

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2018. 02. 23

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
건국대학교	교수	이충환

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약	
----	--

I. 연구개발실적

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구에서는 meta-metabolome 분석을 통하여 전통발효식품의 다양한 기질, 미생물 등의 발효 및 생산 공정에 따른 복잡한 발효과정에 대한 전반적인 연구를 통하여 그 상관관계의 새로운 해석시스템을 제시하였음. 또한 해당 연구를 통해 SCI급 논문 8편 중 분야별 상위 5% 학술지에 4편, 특허출원 2건, 기술이전 1건, 유용유전자원 발굴 6건 등을 통해 연구결과의 우수성 및 창의성을 입증하였음

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구로부터 얻어진 원천기술을 다양한 국내 전통발효식품에 적용하여 역사적, 기능적으로 우수한 우리나라 전통발효식품의 우수성을 체계적 해석을 통해 세계화에 기여할 수 있음

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구의 전통발효식품 내에서 meta-metabolome 분석을 통한 복잡한 발효과정의 전반적 해석 시스템 원천기술에 대한 논문, 특허, 기술이전 등은 기반기술로 활용될 수 있으며, 국내 발효식품 뿐만 아니라 의약품, 화장품 등 다른 산업에 응용 및 적용되어 기존 해석 및 추적연구가 가능함

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

총 연구기간 동안 효소 및 생리활성 증진, 표적 대사체 추적의 단편적인 연구가 아닌 발효식품의 기초가 되는 다양한 원물 및 미생물의 공정 별 변화를 체계적으로 해석하기 위한 총체적 연구를 수행하였음. 또한, 연구계획서 상에 제시한 성과들을 성실히 달성하였고 그 중 논문 게재(5건→8건), 학술대회 발표(7건→10건), 홍보실적(0건→3건)을 초과 달성하였음

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

○ 논문게재 목표 5건 중 8건으로 초과달성: 4편은 분야별 상위 5% 학술지에 게재하였음
○ 국내 특허 출원 2건 및 기술이전 1건을 달성
○ 유용유전자원 발굴 6건 달성
○ 학술대회발표 목표 7건 중 10건으로 초과달성
○ 박사학위자 2명 및 석사학위자 4명 배출
○ 홍보실적 목표 0건 중 3건으로 초과달성: BRIC 농수식품 식품성과에서 우수 논문의 소개(분야별 상위 5%)

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
환경적 요인에 따른 다양한 균주의 meta-metabolome 프로파일링	15	100	발효의 기본이 되는 미생물의 고체 및 액체 배양환경에 따른 대사체 및 효소, 생리활성의 변화 연구를 통해 환경요인에 따른 미생물의 발효 패턴 관련 해석의 필요성을 부각하였음
전통발효식품의 meta-metabolome 프로파일링 통한 식품 내 발효대사체 규명	15	100	된장 및 고추장, 발효의 스타터로 이용되는 코지 등 다양한 전통발효식품의 meta-metabolome 분석을 통해 전반적인 식품 내 발효대사체 규명 연구를 성실히 수행하였음
Meta-metabolome 프로파일링 통한 복합적 배양환경 조건의 선정된 균주 최적화	20	100	발효의 스타터로 이용되는 코지는 다양한 원료에 의해 만들어짐. 본 연구에서는 쌀, 밀, 콩 등의 다양한 원물 발효를 통해 만들어진 koji의 발효 대사체 연구를 수행하였으며, 이를 통한 최적 원물 및 미생물 선정의 가능성을 제시하였음
전통발효식품의 meta-metabolome 프로파일링 통한 발효최적화 해석시스템 확립	30	100	전통발효식품(된장)의 공정에 따른 발효 대사체 및 미생물 변화의 상관관계 분석을 통한 공정 별 주요 미생물 및 대사체를 규명을 통한 관련 분야의 선도적 연구를 수행하였음
신규 농식품 발효시스템 최적화를 통한 산업화 지원 기술 구축	10	100	전통발효식품의 미생물-미생물 상호작용 연구를 통해 발효과정 중 우점종 및 신호전달 관련 기작에 대한 실마리를 제공하였음. 추후 유용 균주 발효 관련 응용 확장 연구가 가능함
농식품 미생물 및 발효식품 별 대사체 In-house DB 구축 및 확장	10	100	본 연구과제의 다양한 전통발효식품 연구를 통해 발굴된 다양한 1차 및 2차, 향미 대사체에 대한 총체적 In-house DB를 구축 및 확장하였음
합계	100		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 본 연구에서는 meta-metabolome 분석을 통하여 전통발효식품의 다양한 기질, 미생물 등의 발효 및 생산 공정에 따른 복잡한 발효과정에 대한 전반적인 연구를 통하여 그 상관관계의 새로운 해석 시스템을 제시하였음. 이러한 원천기술을 여러 국내 전통발효식품에 적용하여 역사적, 기능적으로 우수한 우리나라 전통발효식품을 과학적으로 규명하였으며, 세계화에 기여할 수 있는 기반기술을 정립하였음

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 본 연구는 전통발효식품 내에서 효소 및 생리활성 증진, 표적 대사체 추적의 단편적인 연구가 아닌 다양한 발효원물 및 미생물의 공정 별 변화를 체계적으로 해석하기 위한 총체적 연구를 수행하였음
- 2년의 연구기간 동안 분야별 상위 5% 이내 4편의 우수논문 게재를 포함한 총 8편의 논문 게재를 달성하였고, 특허출원 2건, 기술이전 1건, 유용유전자원 발굴 6건 등의 우수한 연구성과를 도출하였음

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 본 연구를 통해 얻어진 원천기술을 통해 논문, 특허, 기술이전 등의 기반기술로 활용될 수 있으며, 다양한 발효식품, 의약품, 화장품 등의 응용 연구가 가능함
- 얻어진 원천기술 중 신규성 및 경제성이 있다고 판단되는 기술의 관련기업의 기술이전을 통한 기술발전 및 국내 전통발효식품 산업의 기술력 제고에 도움을 줄 수 있음
- 기능대사체학 기법을 적용한 발효 식품의 표준화 기술 확립을 통하여 국내 전통 발효식품의 품질 관리에 대한 기반 기술을 확보하고, 이를 통해 전통발효식품 산업 관련 양질의 신규 일자리 창출 및 기능대사체(품질관리) 관련 전문가 양성이 가능함

IV. 보안성 검토

※해당사항 없음

○ 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

--

2. 연구기관 자체의 검토결과

--

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	농림식품 융복합>농생명 정보·전자>농생명 정보·전자	
연구과제명	기능대사체 해석 기반 농식품 미생물자원 탐색			
주관연구기관	건국대학교 산학협력단		주관연구책임자	이 충 환
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	300,000,000			300,000,000
연구개발기간	2016.02.29-2018.02.28			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(논문 게재 및 기술이전) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 환경적 요인에 따른 다양한 균주의 meta-metabolome 프로파일링	- <i>A. oryzae</i> 균주의 고체 및 액체 배양 비교를 통한 환경별 대사체 바이오마커 발굴 및 동정 - 고체 및 액체 배양환경에 따른 세포 내 대사체 프로파일링 통한 대사경로 구축 - 쌀 도정도에 따른 <i>A. oryzae</i> 균주의 발효 환경 차이 규명(특허출원 1건 및 사업화 1건) - 환경적 요인에 따른 향미 대사체 프로파일링 통한 바이오마커 동정(논문 게재 1건)
② 전통발효식품의 meta-metabolome 프로파일링 통한 식품 내 발효대사체 규명	- 전통발효식품의 스타터 코지의 원료인 곡자(쌀, 밀, 콩)별 발효 대사경로 구축(논문 게재 1건) - 고추장의 대사체 프로파일링을 통한 공정 및 원료 별 바이오마커 및 발효 대사경로 구축(논문 게재 1건) - 막걸리의 향미 대사체 및 발효 관련 기전 규명(논문 게재 1건)
③ Meta-metabolome 프로파일링 통한 복합적 배양환경 조건의 선정된 균주 최적화	- 코지의 발효 균주별 대사체 프로파일링 통한 유용 균주 대사체 바이오마커 발굴 및 동정(논문 게재 1건)

④ 전통발효식품의 meta-metabolome 프로파일링 통한 발효최적화 해석시스템 확립	- 된장의 산업적 공정에 따른 미생물 및 대사체 상관관계 분석을 통한 새로운 해석법 제시(논문 게재 1건)
⑤ 신규 농식품 발효시스템 최적화를 통한 산업화 지원 기술 구축	- 18종 시판 고추장의 대사체 프로파일링을 통한 산업적 QC 가능성 제시(논문 게재 1건 및 특허 출원 1건)
⑥ 농식품 미생물 및 발효식품 별 대사체 In-house DB 구축 및 확장	- 다양한 전통발효식품 및 발효 미생물의 meta-metabolome 분석을 통한 1차 및 2차, 향미 대사체 기반 In-house DB 구축 및 확장

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과목표	전략 미생물 해독	유용 유전자 원 확보	사업화 · 실용화	표준 유전체 해독	메타지놈 분석	유전체 분석기술개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마커개발	병원성 미생물 정보완성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표		6	1							
연구기간 내 달성실적		6	1							
달성율(%)		100	100							

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인 증	학술성과				교육 지도	인 력 양 성	정책 활용-홍보		기 타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문	학 술 발 표	정 책 활 용	홍 보 전 시					
																		SC I	비 SC I	
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치																				
최종목표	2	1		1							5		7	6			0			
연구기간 내 달성실적	2	0		1	10	(시 제 품 1건)					8	3.8	10	6			3			
달성율(%)	100	0		100		100					160		143	100			300			

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	환경적 요인에 따른 다양한 균주의 meta-metabolome 프로파일링을 통한 바이오마커 발굴
②	기능대사체학 기법을 통한 기질에 따른 대사체 프로파일링 및 대사경로 구축
③	미생물 및 대사체 상관관계 분석을 통한 핵심 조절 인자 규명
④	대사체 프로파일링을 통한 식품 내 QC 지표 선정

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장에로 해결	정책 자료	기타
①의 기술					v	v				
②의 기술					v	v				
③의 기술					v	v				
④의 기술					v	v	v			

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	전통발효식품 현장에서 기존 발효 미생물의 대사체 프로파일링을 통한 바이오 마커 발굴 관련 지식재산권 확보 및 기술이전을 통한 관련 기업의 품질관리 지표로 사용이 가능함. 이는 전통발효식품의 우수성을 과학적으로 입증 및 세계화에 도움이 될 수 있음
②의 기술	전통발효식품은 스타터로 이용되는 다양한 원료(쌀, 밀, 콩 등)로부터 복잡한 공정을 통해 만들어짐. 다양한 원료 별 바이오마커 및 대사경로 구축 기술을 통해 기능성 및 향미 관련 대사체들을 조절함으로써 기존 제품 성능의 향상이 가능함
③의 기술	전통발효식품은 원료, 미생물, 공정 등 다양한 과정에 의해 만들어짐. 상관관계 분석을 통해 공정 별 주요 미생물 및 발효 대사체 변화, 조절 인자를 규명함으로써, 비용 및 시간 절약 등 산업적으로 유용한 기술로 이용될 수 있음
④의 기술	현재 전통발효식품 산업에서는 정확한 품질관리가 이루어지고 있지 않은 실정임. 사용하는 원료 및 미생물은 시간과 환경에 따라 변화하기 때문에 품질관리 기술이 필요함. 대사체 프로파일링을 통한 QC 지표 선정 기술은 이에 대한 해결책을 제시할 수 있으며, 일정한 상품의 품질을 유지할 수 있음

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	전략 미생물 해독	유용 유전자 원 확보	사업화 · 실용 화	표준 유전체 해독	메타지 놈 분석	유전체 분석기 술개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마 커개발	병원성 미생물 정보완 성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표		6	1							
연구기간 내 달성실적		6	1							
연구종료 후 성과창출 계획										

성과목표	사업화지표										연구기반지표							
	지식 재산권		기술실 시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교 육 지 도	인 력 양 성	정책 활용-홍보		기 타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논문				학 술 발 표	정 책 활 용	
										SC I		비 SC I	논 문 평 균 IF					
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명			
가중치																		
최종목표	2	1		1		1					5		7		6		0	
연구기간 내 달성실적	2	0		1	10	1(시 제 품)					8		3.8	10		6		3
연구종료 후 성과창출 계획		1																

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

※ 해당사항 없음

핵심기술명 ¹⁾			
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간		실용화예상시기 ³⁾	
기술이전시 선행조건 ⁴⁾			

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행조건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)