

(옆면)

(앞면)

117008-1

(과제명)

비
지
청
국
장
을

응
용
한

기
능
성

약
선
소
스

개
발

최
종
보
고
서

(건고덕
14p)

2018

(건고덕13p)

농
림
축
산
식
품
부

농
림
식
품
기
술
기
획
평
가
원

(건고덕
17p)

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

발간등록번호

11-1543000-002303-01

(건고덕31p)

비지청국장을 응용한 기능성 약선소스 개발 최종보고서

2018. 04. 20.

(건고덕15p)

주관연구기관 / 대구한의대학교 산학협력단
협동연구기관 / (주)온바이오텍
(건고덕 15.5p)

농 립 축 산 식 품 부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

(건고덕 20p)

제출문

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

‘비지청국장을 응용한 기능성 약선소스 개발’(연구개발 기간 : 2017. 04. 21. ~ 2018. 04. 20.) 과제의 최종보고서 1부를 제출합니다.

2018. 04. 20.

주관연구기관명 : 대구한의대학교 산학협력단 (대표자) 이정희 (인)

협동연구기관명 : (주)온바이오텍 (대표자) 이우락 (인)

주관연구기관책임자: 노성수

협동연구기관책임자: 박해진

000000훈령 제00조에 따라 최종보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	117008-1	해 당 단 계 연 구 기 간	2017.04.21. -2018.04.20	단 계 구 분	(1단계)/ (1단계)
연구사업명	단 위 사 업	농업식품기술개발			
	사 업 명	창업벤처지원 R&D 바우처 사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	비지칭국장을 응용한 기능성 약선(藥膳)소스 개발			
연구책임자	해당단계 참여연구원 수	총: 9명 내부: 4명 외부: 5명	해당단계 연구개발비	정부: 49,000천원 민간: 16,340천원 계: 65,340천원	
	총 연구기간 참여연구원 수	총: 9명 내부: 4명 외부: 5명	총 연구개발 비	정부: 49,000천원 민간: 16,340천원 계: 65,340천원	
연구기관명 및 소속부서명	대구한의대학교 산학협력단 (한의예과)			참여기업명 (주)온바이오텍	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

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

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	1	1									

국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

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

보고서 면수

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 연구의 목적: 비지청국장의 대량 생산 공정을 확립하고, 항산화, 항비만 및 항당뇨 기능성 소재를 첨가한 천연 비지청국장제품을 개발하고자 함 ▶ 연구 내용 <ul style="list-style-type: none"> ◆ 비지 청국장의 기능성 검증 <ul style="list-style-type: none"> - 항산화, 항비만 및 항당뇨 세포실험으로 기초 기능성 평가 ◆ 비지 청국장 소스 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 비지청국장과의 최적 배합비 결정 - 이화학적 특성 분석 (총균수 · ph · 산도 · 당도 측정) - 시제품의 따른 관능검사 및 기호도 조사 - 관능성평가 결과를 통한 개선사항 보완 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 비지청국장의 대량 생산 공정 확립 <ul style="list-style-type: none"> ◆ 비지청국장 제조 공정 확립: 비지 수분함량 측정, 종균 접종, 온도 및 습도설정, 발효 시간에 대한 조건 확립 ▶ 천연물 소재의 항산화, 항당뇨 및 항비만 기초 기능성 평가 <ul style="list-style-type: none"> ◆ DPPH 소거능 평가 ◆ 총 플라보노이드 및 총페놀 함량 분석 ◆ 지방세포에 대한 항비만 기능성 평가 ◆ 근육세포에 대한 당대사 조절 기능성 평가 ▶ 천연 비지 청국장 소스 개발 <ul style="list-style-type: none"> ◆ 비지청국장의 이화학 특성 분석 ◆ 관능검사를 통한 최적 배합비 연구 ▶ 학술대회 발표 1건, 특허 출원 1건, 시제품 개발 1건, KCI급 논문 게재 1건 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 기술적 측면 <ul style="list-style-type: none"> ◆ 산학등과 긴밀한 과제진행으로 기능성 및 개발방향의 차별성 부여를 통한 약선식품 연구의 다양화 및 전문화 ◆ 기능성 및 관능성 개선 연구의 인프라 구축을 통한 응용BT 식품산업의 활성화 및 경쟁력 확보 ◆ 부산물을 응용한 약선식품으로의 기술개발로 소재비 절감으로 인한 기업 및 소비자의 비용 부담절하 ▶ 경제적·산업적 측면 <ul style="list-style-type: none"> ◆ 소스류 시장의 대부분이 수입산 소스류에 의존하므로 국내시장 진출로 내수시장 보호 및 한국산 약선식품(herb-nutraceuticals) 개념으로써의 수출로 외화 누출방지 및 획득기반 마련 ◆ 약선식품 개발 기술력의 축적과 그 기능성의 특허, 제조 특허를 통한 산업재산권 확보 가능 ◆ 기업 직영재배를 통한 소재비 절감과 국내산 천연소재의 활용으로 내수경제 활성화에 이바지 하여 국내 농산물 생산기반 구축 및 활용성 제고가능 ◆ 타 산업대비 고용창출효과가 높은 식품산업의 특성상 고용창출 효과 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	비지	약선	청국장	소스	시제품
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>					

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	1
1-1. 연구개발 목적	
1-2. 연구개발의 필요성	
1-3. 연구개발 범위	
2. 연구수행 내용 및 결과	4
2-1. 비지칭국장 제조	
2-2. 천연 소재 기능성 평가	
2-3. 혼합비지칭국장 물성 연구방법	
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	56
3-1. 목표	
3-2. 목표 달성여부	
3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)	
4. 연구결과의 활용 계획 등	57
4-1. 연구개발 결과의 활용방안	
4-2. 기대성과 및 파급효과	
4-3. 판매 및 활용계획	
4-4. 기술개발 관련 시장 현황	

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

	코드번호	B-04-01
<ul style="list-style-type: none"> ○ 비지로 청국장의 효과적 발효를 위한 기술 및 환경조건 개발 ○ 비지청국장의 기능성 강화를 위한 한방 천연물 배합비율 레시피 개발 ○ 제조된 한방비지청국장에 대한 기능성 검증 ○ 기능성이 검증된 비지청국장의 관능성 및 기호도 평가 ○ 비지청국장의 관능성 개선 		

연구개발 대상 및 기술·제품의 개요

- 연구개발 개요 : 비지를 활용한 청국장을 한방소재를 첨가, 기능성과 관능성을 개선하여 소스형태로 개발함

<제품 개념도>



○ 핵심기술

- 영양성분분석 : 5대 영양소 및 구성비를 공인기관에 의뢰하고, 특히 식이섬유소 함유량 세부 분석의뢰 하여 섬유소의 함량 및 기능성 (대장기능 및 항비만 효능) 예측
- 항산화효능 검증 : 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량, 전자공여능, SOD 유사활성능, ABTS, 등의 항산화능 평가
- 예상 기능성의 세포를 활용한 예비 평가 실시 ; 3T3-L1 지방세포의 분화억제를 및

지질대사 관련 단백질 관련 유전자 발현도 측정. 또는 L6 근육세포의 glucose uptake, α -glucosidase 저해활성도 및 당대사 관련 단백질 관련 유전자 발현도를 측정하여 향후 전임상 동물실험의 기초 자료로 활용함.

- 기능성을 함유한 소스개발 ; 최종적으로 검증된 기능성과 관능 및 선호도 평가를 절충하여 최종 제품 개발

1-2. 연구개발의 필요성

	코드번호	B-04-03
<ul style="list-style-type: none"> • 최근 7년사이 2배로 성장한 1조3천억, 소스 및 드레싱류 시장은 농업의 새로운 미래성장 산업으로서의 가치가 매우 높음. • 국·내외적으로 소스가 가지는 잠재적인 시장 규모는 점차 증가하고 있어 사업 안정성이 높지만, 이에 따른 기술 개발은 현저히 낮은 편으로 소비자의 건강과 기호도를 모두 충족시키는 새로운 개념의 소스류 개발이 절실함. • 소스류는 외식 산업의 성장 및 편의식 지향 니즈로 인한 지속적 성장이 예상되며 이 분야는 다양한 소재 발굴을 통한 신제품 출시가 외식 산업 발전과 더불어 대폭 성장이 예상되므로 건강증진을 위한 천연식품 소재를 활용한 기능성 소스제품 개발이 필수적임. • 세계식품시장이 ‘양’ 과 ‘가격’ 에서 ‘질’, ‘안전’, ‘건강기능성’ 으로 변화되고 있는 시점에서 식품의 건강기능성을 검증하고 소비자들이 안전하게 섭취 할 수 있도록 정부가 주도한 사업의 결과물로서의 소스류의 개발은 그 자체로서 의미가 있음. • 비지는 국민 대다수가 흔히 즐기는 두부 부산물로서 그 자체로서는 시장성이 매우 약하며, 버려지는 양이 상당하여 응용·개발에 성공 시 기능성과 경제성을 모두 잡을 수 있는 기회임. • 따라서 본 기업은 비지소재를 응용한 청국장 제조에 관한 특허기술만을 보유하여 정부 투자 지원으로 이 기술을 활용 및 응용할 수 있는 절호의 찬스임. • 또한 최근, 허브류의 소비가 높아지면서 미국을 중심으로 동양의학 및 천연물의 약리성분에 대한 기능성 연구가 대두되고, 식의동원(食醫同原) 의미를 ‘medicine and food are isogenic’ 으로 인용하면서 아시아 천연물 소재에 높은 관심을 보이고 있어, 본 기업은 대구한의대소속 연구소기업으로써 천연물소재의 정보 확보 및 기능성 검증에 매우 유리한 지점에 있어, 기능성 강화 신제품 개발이 용이함. • 앞으로 식품시장의 화두는 간편성임. 생활패턴이 바뀌면서 장 및 소스를 가정에서 직접 제조하기 보다는 손쉽게 조리할 수 있는 편리한 완성도 높은 식재료로서의 수요가 증가함. • 창업 벤처 연구소기업의 입장에서 소재와 기술만으로 한 가지 제품을 개발하는데 있어서 안전성, 기호성, 편리성 및 기능성을 보장하며 제품의 신뢰도를 상승시키는 데는 현실적 한계가 있어 정부 지원을 통한 성장이 결과적으로 나라 경제발전에 이바지 할 것으로 판단이 됨. 		

1-3. 연구개발 범위

가. 1차년도

① 개발 목표

- 주관연구기관(대구한의대학교) : 비지청국장 및 한방소재의 기능성 검증
- 참여기관 1 ((주)온바이오텍) : 비지청국장 제조기술 이전

② 개발 내용 및 범위

- 주관연구기관(대구한의대학교) :

- ◆ 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량, DPPH 라디칼 소거능 평가
- ◆ 예상기능성의 세포를 활용한 예비 평가 실시

- 3T3-L1 adipocyte ; 분화억제율 (현미경적, 분광학적 분석)

지질대사 관련 단백질 관련 유전자 (SREBP1c, Adiponectin, Leptin, ACC, IGF-1, C/EBP, AMPK α 1, aP2, FAS 등) 발현도 측정

- L6 세포 ; glucose uptake, glycogen 합성도, α -Glucosidase 저해활성도 분석

당대사 관련 단백질 관련 유전자 및 단백질 (GLUT4, IRS-1, Akt, Pik3r 등) 발현도 측정

- 참여기관 1 ((주)온바이오텍)

- ◆ 비지청국장과의 최적 배합비 결정
- ◆ 이화학적 특성 분석 (총균수 · ph · 산도 · 당도 · 색도 측정)
- 첨가물의 종류에 따른 관능검사 및 기호도 조사
- 관능성평가 결과를 통한 개선사항 보완 및 시제품 출시

2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 비지청국장 제조

비지 100중량부에 대하여 탈지대두미세분말을 5-20중량부를 첨가하는 단계; 상기 비지 100중량부에 대하여 클로렐라, 녹차 또는 빵잎을 1-5중량부 첨가하는 단계; 및 상기 단계의 비지와 탈지대두미세분말 및 클로렐라, 녹차 또는 빵잎의 혼합물에 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)를 0.2-5중량부 접종하여 30-50℃에서 10-30시간 발효시키는 단계를 포함함을 특징으로 한다.



2-2. 천연 소재 기능성 평가

1. 항산화 기능성 평가

가. 30가지 시료 DPPH 라디칼 소거능

[실험방법]

시료를 1 mg/mL의 농도로 DW로 녹이고, DW로 10배 희석하여 실험에 사용하였다. 시료 100 μ L와 DPPH용액 100 μ L을 혼합하여 30분간 암소상태에서 반응시킨 후, 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 L-ascorbic acid를 사용하여 동일한 조건으로 실시하였다.

[실험결과]

Sample 30개의 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과, 동일한 농도 100 μ g/mL에서 억제율이 sample은 아래와 같다.

Table 1. 30가지 시료 DPPH 라디칼 소거능

연번	시료	inh.(%)
	L-ascorbic acid	98.25±0.02
1	감초	33.93±1.79
2	자화지정	78.83±0.23
3	인진호	92.63±0.69
4	상황버섯	52.75±1.80
5	천련자	14.56±1.49
6	백선피	18.73±0.51
7	백출	5.67±0.81
8	진피	47.87±3.44
9	두충	39.31±0.67
10	노근	47.98±1.02
11	매실	31.37±2.34
12	박하	80.56±3.25
13	둥글레	9.67±1.09
14	강황	24.70±1.69
15	상주등시	92.51±0.55
16	빈랑	96.99±0.13
17	상엽	91.32±0.12
18	백작약	95.50±0.23
19	다엽	95.21±0.27
20	부추	52.32±1.41
21	대계	39.02±0.58
22	오미자	19.56±3.00
23	포공영	85.87±0.46
24	황련	81.25±2.66
25	마늘	2.77±1.26
26	치자	66.81±0.59
27	천궁	35.28±3.47
28	구기자	19.54±0.89
29	산수유	81.51±0.18
30	삼백초	93.24±0.89

나. 30가지 시료 Total Flavonoid 함량 측정

[실험방법]

총 플라보노이드 함량은 Lister 등의 방법에 의해 구하였다⁹⁾. 1 ml의 diethylene glycol과 시료 추출물 100 µl 및 1 N NaOH 10 µl를 잘 혼합시켜 37 °C의 water bath에서 1시간 동안 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 naringin를 사용하였으며, 표준 검량선을 구하여 시료의 플라보노이드 함량을 구하였다.

[실험결과]

Sample 30개의 Total Flavonoid 함량 측정한 결과, Total Flavonoid 함량이 높은 sample은 아래와 같다.

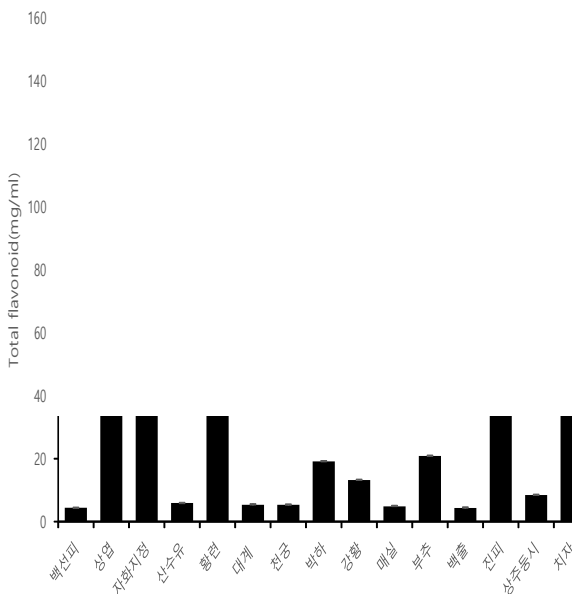


Fig. 1. 30가지 시료 Total flavonoid 함량 측정

다. 30가지 시료 Total phenol 함량 측정

[실험방법]

총 페놀 함량 측정은 FolinDenis법에 의해 측정하였다. 시료 20 μ l 에 증류수 1.58 ml, Folin-Ciocalteu's phenol reagent 100 μ l를 혼합하여 실온에서 1분간 반응시킨 후 300 μ l 의 20% Na₂CO₃를 첨가하였다. 20 $^{\circ}$ C에서 2시간 후 UV spectrophotometer (Infinite M200, 포제한약재의 최종당화산물 생성 억제 활성 및 항산화 효과 65 Tecan, Salzburg, Austria)를 이용하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질 gallic acid를 사용하여 표준 검량선을 구하고, 시료의 총 페놀 함량을 산출하였다.

[실험결과]

Sample 30개의 Total phenol 함량 측정한 결과, Total phenol 함량이 높은 상위 5가지의 sample은 아래와 같다.

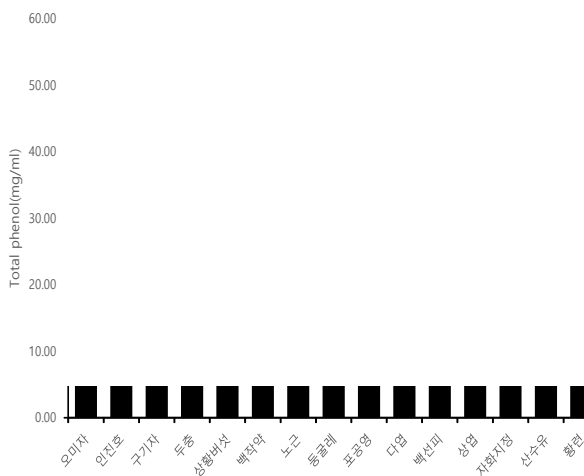


Fig. 2. 30가지 시료 Total phenol 함량 측정

라. DPPH 라디칼 소거능

[실험방법]

시료를 1 mg/mL의 농도로 DW로 녹이고, DW로 농도별로 희석하여 실험에 사용하였다. 시료 100 μ L와 DPPH용액 100 μ L을 혼합하여 30분간 암소상태에서 반응시킨 후, 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 L-ascorbic acid를 사용하여 동일한 조건으로 실시하였다.

[실험결과]

- (A): ascorbic의 농도별 DPPH 라디칼 소거능, IC₅₀ (μ g/ml) 0.84 ± 0.01
- (B): 백작약의 농도별 DPPH 라디칼 소거능, IC₅₀ (μ g/ml) 8.79 ± 0.31
- (C): 다엽의 농도별 DPPH 라디칼 소거능, IC₅₀ (μ g/ml) 3.23 ± 0.12
- (D): 상주동시의 농도별 DPPH 라디칼 소거능, IC₅₀ (μ g/ml) 9.05 ± 0.04
- (E): 삼백초의 농도별 DPPH 라디칼 소거능, IC₅₀ (μ g/ml) 17.59 ± 0.76
- (F): 빈랑의 농도별 DPPH 라디칼 소거능, IC₅₀ (μ g/ml) 3.06 ± 0.09

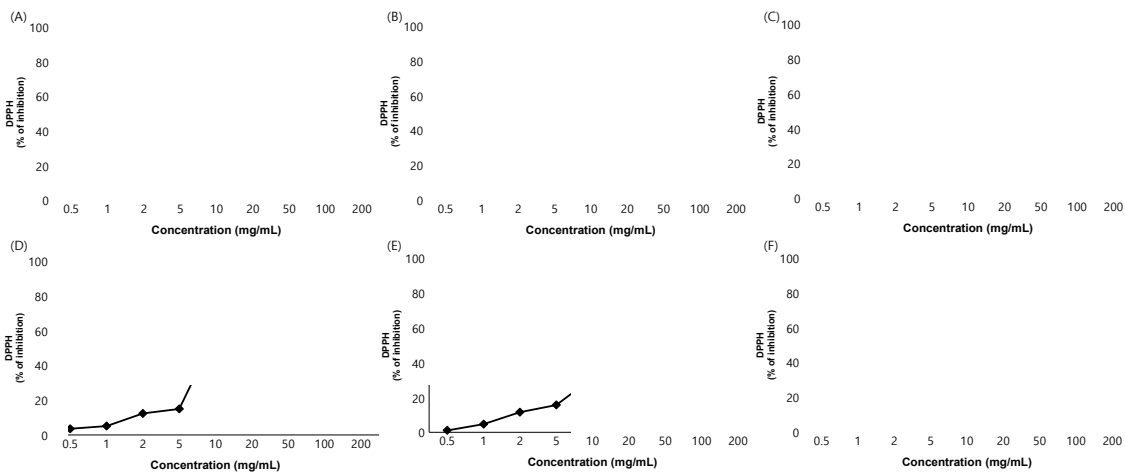


Fig. 3. 상위 5가지 농도별 DPPH 라디칼 소거능

마. ABTS 라디칼 소거능

[실험방법]

7 mM ABTS와 2.45 mM Potassium persulfate를 증류수에 녹인 다음 12시간동안 차광 하여 반응시킨 후, 이 반응액을 734 nm에서 ethanol을 이용 하여 흡광도 0.70 ± 0.02 로 보정하였다. ABTS 용액 95 μ l에 시료 5 μ l를 첨가하고 15분동안 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[실험결과]

- (A): ascorbic의 농도별 ABTS 라디칼 소거능, IC₅₀ (μ g/ml) 4.26 ± 0.06
- (B): 백작약의 농도별 ABTS 라디칼 소거능, IC₅₀ (μ g/ml) $35.22 \pm 0.0.35$
- (C): 다엽의 농도별 ABTS 라디칼 소거능, IC₅₀ (μ g/ml) 7.52 ± 0.22
- (D): 상주둥시의 농도별 ABTS 라디칼 소거능, IC₅₀ (μ g/ml) 68.81 ± 2.82
- (E): 삼백초의 농도별 ABTS 라디칼 소거능, IC₅₀ (μ g/ml) 76.77 ± 0.37
- (F): 빈랑의 농도별 ABTS 라디칼 소거능, IC₅₀ (μ g/ml) 8.11 ± 0.17

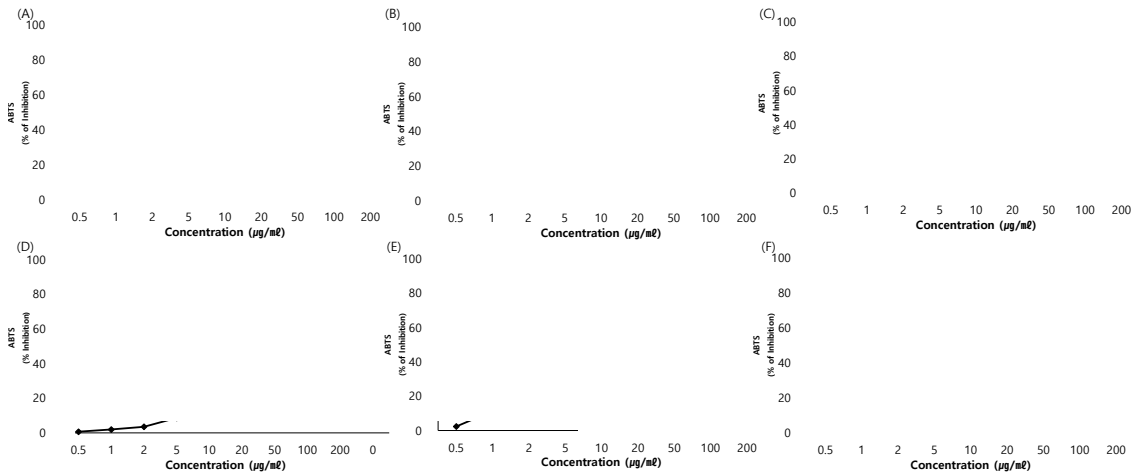


Fig. 4. 상위 5가지 농도별 ABTS 라디칼 소거능

2. 상주등시의 항비만 기능성 평가

가. 실험 재료 및 방법

(1) 재료 및 시약

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), dexamethasone (DEX), insulin, 그리고 Oil Red O (ORO)는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO) 그리고 isopropanol은 Junsei Chemical Co. (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. Formaldehyde는 Bio Basic Inc. (Markham, ON, Canada)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), phosphate-buffered saline (PBS), penicillin-streptomycin, 그리고 bovine calf serum (BCS)은 Welgene Inc. (Daegu, Korea)에서 구입하여 사용하였다. Fetal bovine serum (FBS)는 Gibco BRL. (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

(2) 뚱은감 유래 물질의 세포독성

3T3-L1 전지방세포에서 뚱은감 유래 물질의 세포독성은 MTT 분석법으로 평가하였다. 뚱은감 유래 물질은 confluent 상태의 3T3-L1 전지방세포에 10, 50, 100, 200, 400, 그리고 800 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 24시간 동안 처리하였다. 처리 후 PBS에 용해된 2 mg/ml의 MTT 시약을 200 $\mu\text{g/ml}$ 로 10% BCS와 100 unit/ml의 penicillin-streptomycin이 함유된 DMEM 배지에 희석하여 추가로 37°C incubator에서 1시간 동안 배양하였다. 반응이 끝난 후 배지를 완전히 제거하고 DMSO 300 μl 를 첨가하여 보라색의 formazan을 용해시켰다. Formazan 용액은 96-well plate에 100 μl 씩 넣어 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아무것도 처리되지 않은 3T3-L1 전지방세포의 흡광도를 대조군으로 하여 세포독성 (% of control)을 평가하였다.

(3) 3T3-L1 지방세포분화

3T3-L1 전지방세포가 confluent 상태가 되었을 때를 Day -2라 표기하였으며, 3T3-L1 전지방세포가 confluent 상태가 된 2일 후 분화유도 배지 (Differentiation medium: DM)로 교체하고 Day 0라 하였다. 분화유도 배지는 10% FBS와 100 unit/ml의 penicillin-streptomycin이 함유된 DMEM 배지에 500 μM 의 IBMX, 5.2 μM 의 DEX, 그리고 167 nM의 insulin을 포함하여 Day 0에서 Day 2까지 48시간 동안 사용하였다. Day 2에서 Day 4까지의 분화유도 후 배지 (Post-differentiation medium; Post-DM)는 10% FBS와 100 unit/ml의 penicillin-streptomycin이 함유된 DMEM에 167 nM의 insulin만 포함하여 사용하였으며, 이후 10% FBS와 100 unit/ml의 penicillin-streptomycin이 함유된 DMEM은 Day 4에서 Day 6까지 사용하였으며, 3T3-L1 지방세포의 분화는 Day 6에 종료되었다. 뚱은감 유래 물질은 분화 전기간 (Day -2~6), 분화이전 (Day -2~0), 분화초기 (Day 0~2), 분화중기 (Day 2~4), 그리고 분화후기 (Day 4~6)로 나누어 50, 100, 200, 그리고 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였다.

(4) 뚱은감 유래 물질의 3T3-L1 세포에서의 adipogenesis 억제활성

3T3-L1 세포에서 뚱은감 유래 물질이 비만에 있어 중요한 adipogenesis를 효과적으로 억제하는지 확인하기 위하여, 뚱은감 유래 물질을 분화 전체기간 (Day -2~6), 분화이전 (Day -2~0), 분

화초기 (Day 0~2), 분화중기 (Day 2~4), 그리고 분화후기 (Day 4~6)로 나누어 50, 100, 200, 그리고 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 후 세포내 지방축적량을 Oil Red O 염색법을 통해 분석하였다. Oil Red O 염색은 Day 6에 실시하였으며, 분화가 완료된 3T3-L1 지방세포는 PBS 0.5 ml를 넣어 세척한 후 3.7%(v/v)의 formaldehyde로 30분 동안 실온에서 고정시켰다. 세포를 고정시킨 이후 증류수를 이용하여 formaldehyde를 제거해 주었으며, 실온에서 15분 동안 Oil Red O 가하여 염색하였다. 증류수를 이용하여 Oil Red O 염색된 세포를 세척하고 물기를 완전히 제거한 후 300 μl 의 DMSO를 가하여 세포내 Oil Red O를 녹인 후 100 $\mu\text{l/well}$ 씩 96-well plate에 옮겨 microplate reader를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 뚝은감 유래 물질을 처리하지 않은 분화된 지방세포를 대조군으로 하여 지방축적량 (% of control)을 계산하였다.

(5) 지방구의 수 및 크기 관찰

뚝은감 유래 물질 처리가 3T3-L1 세포내 지방구의 수 및 크기에 미치는 영향을 현미경(KI-400; Korealabtech, Seongnam, Korea)을 통해 관찰하였다. 3T3-L1 전지방세포의 지방세포 분화와 뚝은감 유래 물질의 처리는 위에 언급한 방법과 같이 유도 및 처리되었다. 50, 100, 200 그리고 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 뚝은감 유래 물질을 분화 전체기간 (Day -2~6), 분화이전 (Day -2~0), 분화초기 (Day 0~2), 분화중기 (Day 2~4), 그리고 분화후기 (Day 4~6)로 나누어 처리한 뒤 3.7%(v/v)의 formaldehyde를 이용해 실온에서 30분 동안 고정시키고 Oil Red O 염색을 실시하였다. 염색된 3T3-L1 세포는 건조방지를 위해 PBS를 채우고 지방구의 수와 크기를 관찰하였다.

(6) Real-time PCR

당대사 관련 주요 분자들의 유전자 발현량을 평가하기 위하여 L6 myoblast 세포를 4일간 분화하여 glucose 유입을 조절하는 IRS, Akt, Pik3r와 Glut4 유전자를 Real Time PCR로 평가하였다. 짚신나물 열수 추출물 농도별(0~100 $\mu\text{g/ml}$) 또는 1 μM insulin을 처리하여 3시간 동안 배양한 후 차가운 PBS로 2번 세척하여 1 ml Trizol(Invitrogen, CA, USA)을 이용하여 RNA를 분리하였다. 추출한 2 μg RNA는 High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA)를 이용하여 메뉴얼에 따라 합성하였고, mRNA 발현은 TaqMan analysis를 사용하여 Step-One-Plus RT-PCR System (Applied Biosystems)에서 실행하였다. Primer는 IRS (Mm01278327_m1), Akt (Mm01331626_m1), Pik3r (Mm00803160_m1) 와 GLUT4 (Mm00436615_m1)를 사용하였으며, 95°C에서 10분간 denaturing 후, 95°C에서 15초, 60°C에서 60초의 간격으로 40회 반복하여 증폭하였다.

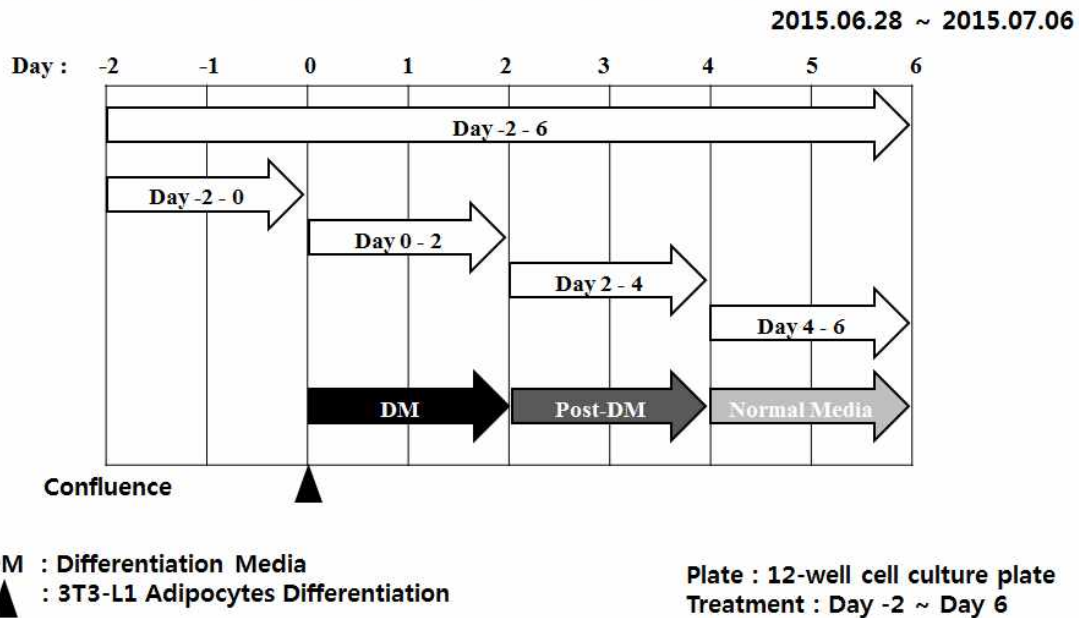
Gene	Primer	Sequence (5'-3')
PPAR- γ	Forward	C C C T G G C A A A G C A T T T G T A T
	Reverse	GGTGATTTGTCTGTTGTCCTTCC
SREBP-1c	Forward	CGGAAGCTGTCGGGGTAG
	Reverse	GTTGTTGATGAGCTGGAGCA
FAS	Forward	GGCCACCTCAGTCCTGTTAT
	Reverse	AGGGTCCAGCTAGAGGGTACA
Adiponectin	Forward	AGCCGCTTATATGTATCGCTCA
	Reverse	TGCCGTCATAATGATTCTGTTGG
Leptin	Forward	AAGAAGATCCCAGGGAGGAA

	Reverse	TGATGAGGGTTTTGGTGTCA
ACC	Forward	TGGAGAGCCCCACACACA
	Reverse	TGACAGACTGATCGCAGAGAAAG
IGF-1	Forward	TGGAATCCTGTGGTCCATGAAAC
	Reverse	GTCACAGTCAGCTGTATAGGG
Adipsin	Forward	CACCATCGACCACGACCTC
	Reverse	AGTGTGGCCTTCTCCGACAG
C/EBP	Forward	TGGACAAGAACAGCAACGAGTAC
	Reverse	CGGTCATTGTCACTGGTCAACT
AMPK α 1	Forward	GGGATCCATCAGCAACTATCG
	Reverse	GGGAGGTCACGGATGAGG
AMPK α 2	Forward	CATTTGTGCAAGGCCCTAGT
	Reverse	GACTGTTGGTATCTGCCTGTTTCC
aP2	Forward	TGGGAACCTGGAAGCTTGTCTC
	Reverse	GAATTCCACGCCCAGTTTGA

(7) 통계분석

데이터는 평균±표준편차로 표현하였으며, 데이터의 통계처리는 Statistical Package for Social Science (SPSS, Chicago, IL, USA)를 이용하여 분석하였다. Student's t-test 방법에 의하여 각 구간의 유의성 차이를 검증하였다 (*p<0.05).

▣ Scheme of extract treatment and 3T3-L1 differentiation



3

Fig. 5. 3T3-L1 세포의 분화와 추출물 처리 스케줄

나. 실험 결과

(1) 뿔은감 유래 물질의 세포독성 평가

뿔은감 유래 물질이 3T3-L1 전지방세포에 독성을 나타내는지 알아보기 위해 MTT 분석법을 이용하여 세포생존율을 평가하였으며, 10, 50, 100, 200, 400, 800 μ g/ml의 농도의 뿔은감 유래 물질을 24 h 동안 처리하였다. 10, 50, 100, 200, 400, 그리고 800 μ g/ml 농도의 뿔은감 유래

물질을 처리한 3T3-L1 세포는 아무것도 처리하지 않은 대조군의 세포생존률(100%)과 비교하였을 때 생존율은 각각 91.66%, 111.55%, 102.92%, 99.96%, 105.19%, 그리고 95.80%로 모든 농도에서 유의적인 세포독성을 나타내지 않았다. 따라서 이후 실험에서는 독성을 나타내지 않은 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도 이하로 실험을 진행하였다. (Fig. 5)

Cell Viability (MTT assay)

Effect of extract mixture with astringent persimmon and citrus peel on the 3T3-L1 cell viability

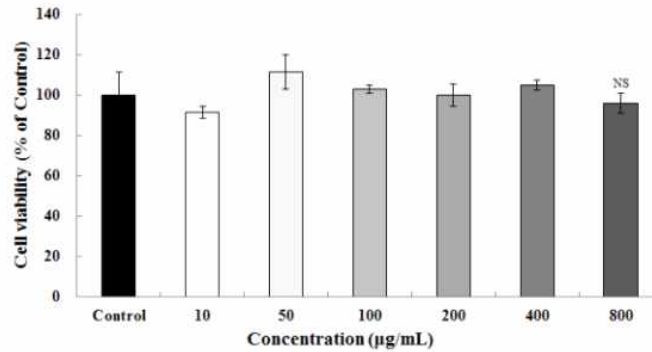


Fig. 6. 뽕은감 유래 물질의 지방세포에 대한 세포독성 평가

(2) 뽕은감 유래 물질의 3T3-L1 세포에서의 adipogenesis 억제활성

3T3-L1 지방세포 분화모델을 이용하여 뽕은감 유래 물질이 3T3-L1 adipogenesis를 억제하는지 확인하고자 하였다. 3T3-L1 전지방세포를 지방세포로 분화시키면서 뽕은감 유래 물질을 분화 전체기간 (Day -2~6), 분화이전 (Day -2~0), 분화초기 (Day 0~2), 분화중기 (Day 2~4), 그리고 분화후기 (Day 4~6)로 나누어 뽕은감 유래 물질을 50, 100, 200, 그리고 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 후, Day 6에 Oil Red O 염색법을 통해 평가하였다. 그 결과, 분화되지 않은 전지방세포에서는 지방구 축적이 거의 이루어지지 않았으며, 뽕은감 유래 물질을 처리하지 않고 분화를 시킨 지방세포 대조군은 다량의 지방구가 형성되었다. 50, 100, 200, 그리고 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 뽕은감 유래 물질을 분화 전체기간 (Day -2~6), 분화이전 (Day -2~0), 분화초기 (Day 0~2), 분화중기 (Day 2~4), 그리고 분화후기 (Day 4~6)에 처리하였을 때 지방축적률은 50, 100, 200, 그리고 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 분화 전체기간 처리군은 108.52%, 93.02%, 81.28%, 그리고 90.72%, 분화초기 처리군은 100.33%, 100.82%, 91.08%, 그리고 90.99%, 분화후기 처리군은 90.25%, 89.46%, 86.47%, 그리고 105.15%로 유의적인 차이를 나타내지는 않았다. 그러나 분화이전 (Day -2~0) 과 분화중기 (Day 2~4)에 뽕은감 유래 물질을 50, 100, 200, 그리고 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하였을 때 각각 분화이전(97.88%, 91.30%, 82.35%, 그리고 83.30%), 분화중기 (81.84%, 76.96%, 80.22%, 그리고 82.91%)에 유의적인 지방축적 억제활성을 나타내었다. 이 결과로 미루어 볼 때 뽕은감 유래 물질은 분화이전과 분화중기에 특이적으로 지방세포 분화를 억제하는 것으로 보여지며, 추후 뽕은감 유래 물질의 분획 및 주요 생리활성 물질의 분리를 통해 분화시기별 억제활성에 대한 연구수행이 추가적으로 요구된다. (그림 6, 7)

▣ Effect of extract mixture on the 3T3-L1 adipogenesis

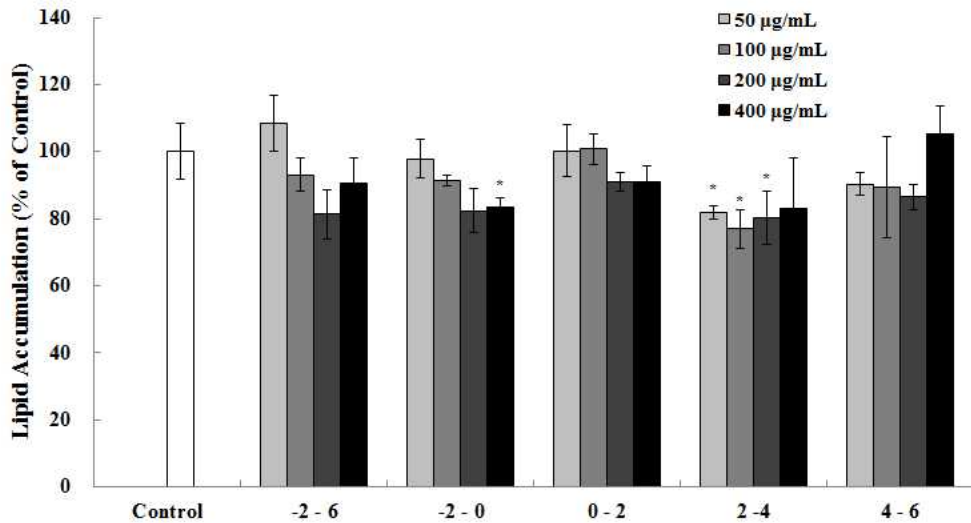


Fig. 7. 뽕은감 유래 물질의 지방세포에서 지질축적 억제능 평가

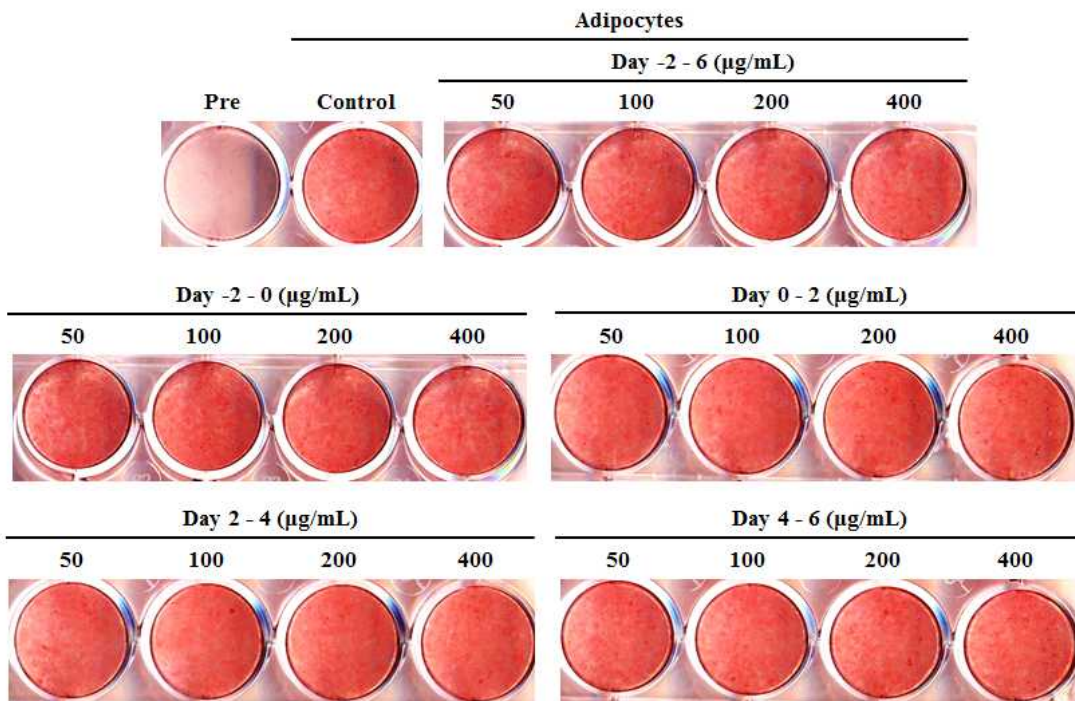


Fig. 8. 뽕은감 유래 물질의 지방세포에서 지질축적 억제능 평가

(3) 지방구의 수 및 크기 관찰

뽕은감 유래 물질 처리가 3T3-L1 지방세포 내 지방구의 수와 크기에 미치는 영향을 알아보기 위해 지방세포 분화과정동안 뽕은감 유래 물질을 기간별로 처리하여 Oil Red O 염색을 실시한

후 현미경으로 관찰하였다. 그 결과 분화시키지 않은 3T3-L1 전지방세포에서는 지방구가 거의 형성되지 않았으며 아무것도 처리하지 않고 분화를 유도한 지방세포 대조군에서는 다량의 지방구가 형성된 것을 확인하였다. 위의 결과와 유사하게, 뚱은감 유래 물질을 50, 100, 200, 그리고 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 분화이전 (Day -2~0) 그리고 분화중기 (Day 2~4)에 처리하였을 때 지방구의 수와 크기가 감소한 것을 관찰하였다. (그림 8)

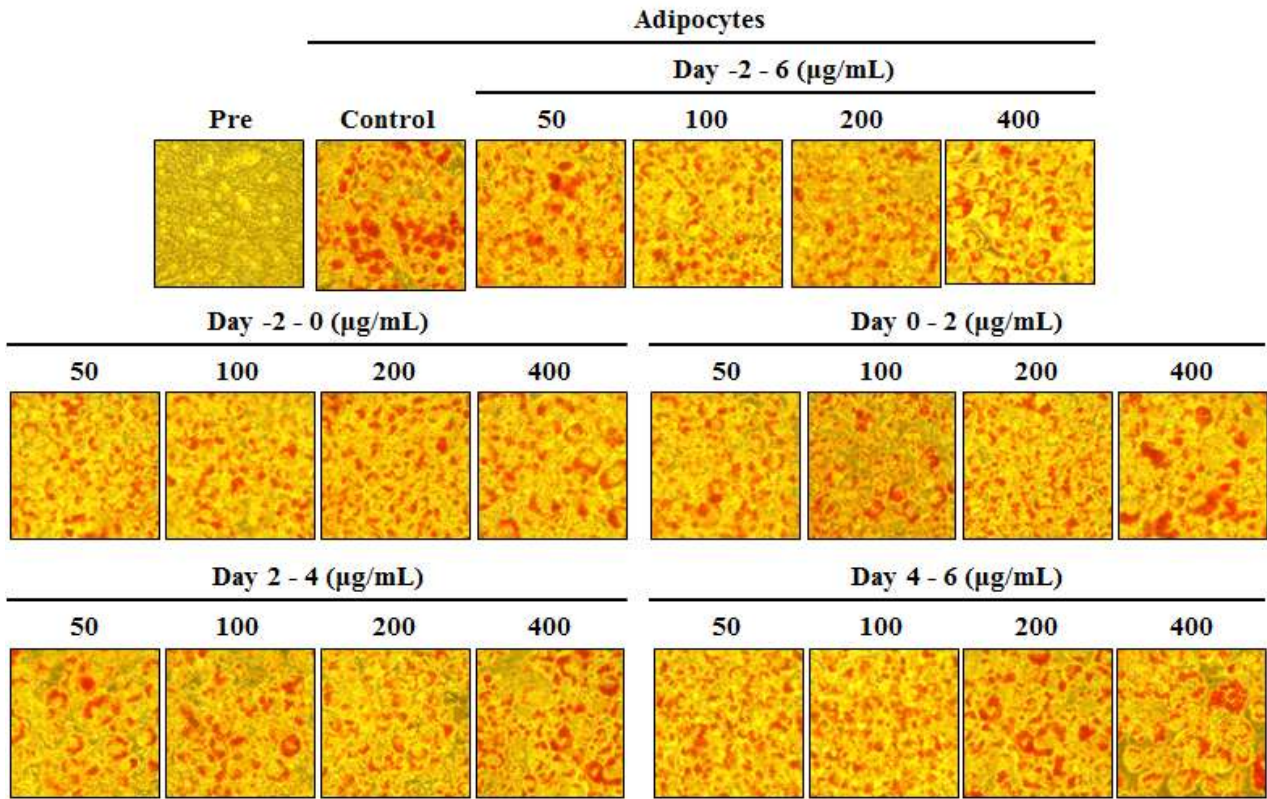
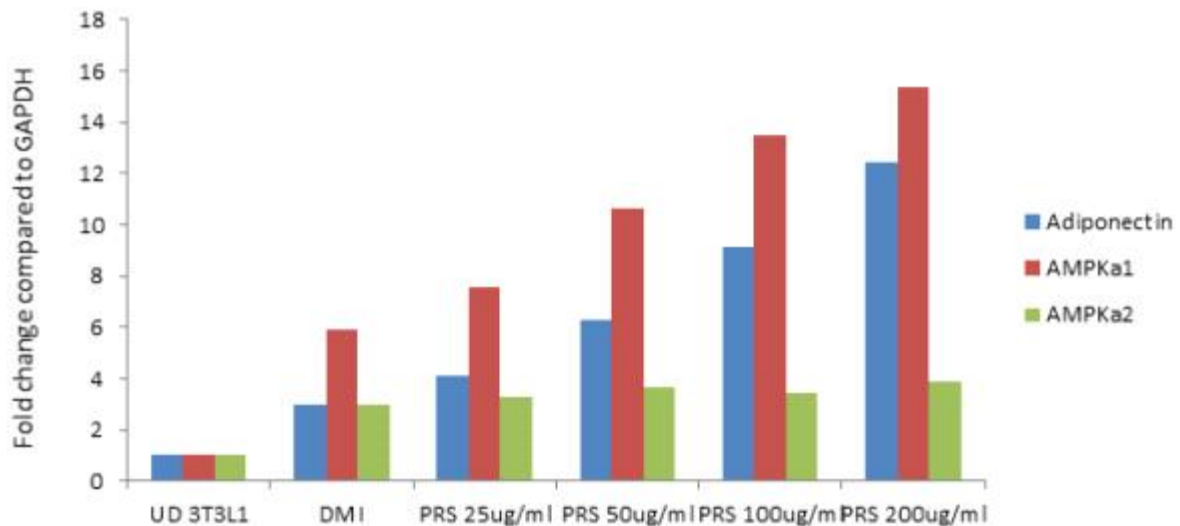


Fig. 9. 뚱은감 유래 물질의 지방세포에 대한 Oil-red O 염색 육안적 관찰

(4) 지질대사 조절 mRNA 발현 분석



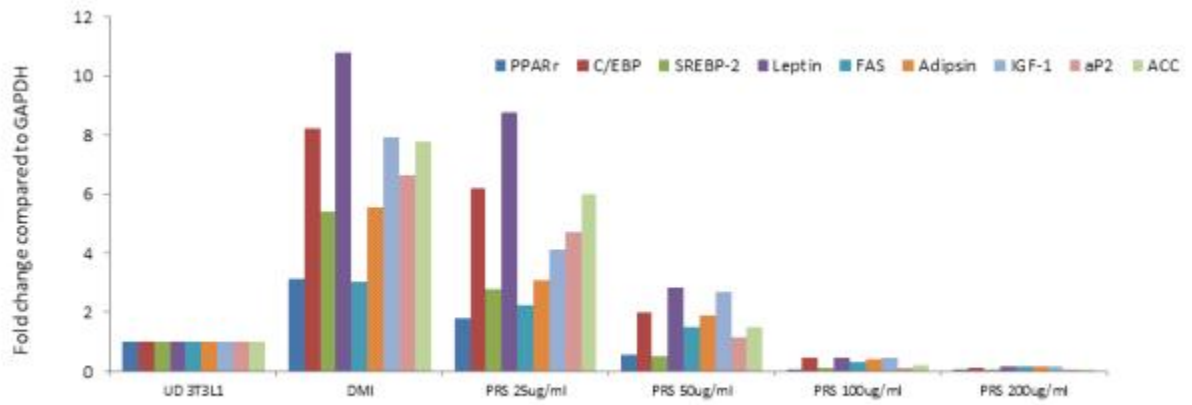


Fig. 10. 지질대사 조절 mRNA 발현

뽕은감 추출물이 지질대사 조절 mRNA 발현을 분석한 결과, 지방세포 분화를 억제시키고, 중성지방 생성을 억제시키는 mRNA 발현이 대조군에 비해 증가됨을 확인할 수 있었으며, 지방산 산화를 조절하는 AMPK mRNA 발현이 증가됨을 확인할 수 있었다.

3. 진피의 항당뇨 기능성 평가

가. 실험방법

(1) 시료

본 실험에 사용된 한방소재는 글로벌허브 (영천, 한국)에서 구입한 것을 생약규격집에 맞춰서 관능검사하여 약전규격에 적합한 것만을 정선하여 사용하였다. 각각 시료 200 g 분량에 물 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 2시간 가열하여 추출액을 얻었다. 그 추출액을 감압 증류 장치로 농축하여, 그것을 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 분말을 얻었으며 실험에 사용하기 직전까지 냉동 (-80°C) 보관 하였다.

(2) 시약

본 실험에 사용된 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 7 mM 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), gallic acid, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, diethylene glycol, sodium hydroxide, naringin은 Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

(3) 약재 추출

열수 추출물은 시료 각 100 g에 증류수 1000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 100°C 조건에서 2 시간동안 추출하였고 그 얻은 액을 각각 감압 추출장치로 농축한 후 동결 건조기를 이용하여

완전 건조시켜 파우더를 얻었으며 이를 냉동 (-80℃) 보관하면서 실험 직전에 증류수에 희석하여 사용하였다.

(4) 항산화 활성 측정

(가) DPPH 라디칼 소거 활성 측정

항산화 활성을 측정하는 방법으로 Blois에 의한 DPPH free radical 소거법을 사용하였다. DPPH 라디칼 소거 활성은 시료 중에 포함된 항산화 물질의 양을 측정하는데 사용되는 대표적인 실험법이다. 일정농도의 시료 100 μ l과 60 μ M DPPH 용액을 100 μ l 넣고 혼합한 후, 암소 상태의 실온에서 30분간 반응시켰다. 이 반응액을 UV spectrophotometer (Infinite M200, Tecan, Salzburg, Austria)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 사용하여 측정하여 산출하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 50% 감소시키는데, 필요한 시료의 양을 IC₅₀으로 하여 나타내었다.

(나) ABTS 라디칼 소거 활성 측정

한방소재의 항산화 효능을 비교 평가하기 위하여 ABTS 라디칼 소거 활성을 측정하였다. 7 mM ABTS와 2.45 mM Potassium persulfate를 증류수에 녹인 다음 12시간동안 차광하여 반응시킨 후, 이 반응액을 415 nm에서 ethanol을 이용하여 흡광도 0.70 \pm 0.02로 보정하였다. ABTS 용액 95 μ l에 시료 5 μ l를 첨가하고 15분 동안 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(다) 총 페놀 함량 측정

한방소재의 총 페놀 함량 측정은 Folin-Denis법에 의해 측정하였다. 시료 20 μ l에 증류수 1.58 ml, Folin-Ciocalteu's phenol reagent 100 μ l를 혼합하여 실온에서 1분간 반응시킨 후 300 μ l의 20% Na₂CO₃를 첨가하였다. 20℃에서 2시간 후 UV spectrophotometer (Infinite M200, Tecan, Salzburg, Austria)를 이용하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질 gallic acid를 사용하여 표준 검량선을 구하고, 시료의 총 페놀 함량을 산출하였다.

(라) 총 플라보노이드 함량 측정

한방소재의 총 플라보노이드 함량은 Lister 등의 방법에 의해 측정하였다. 890 μ l의 diethylene glycol과 시료추출물 100 μ l 및 1 N NaOH 10 μ l를 잘 혼합시켜 37℃의 water bath에서 1시간 동안 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 naringin을 사용하였으며, 표준 검량선을 구하여 시료의 플라보노이드 함량을 산출하였다.

(마) Real-time PCR

당대사 관련 주요 분자들의 유전자 발현량을 평가하기 위하여 L6 myoblast 세포를 4일간 분화하여 glucose 유입을 조절하는 IRS, Akt, Pik3r와 Glut4 유전자를 Real Time PCR로 평가하였다. 짚신나물 열수 추출물 농도별(0~100 µg/ml) 또는 1 µM insulin을 처리하여 3시간 동안 배양한 후 차가운 PBS로 2번 세척하여 1 ml Trizol(Invitrogen, CA, USA)을 이용하여 RNA를 분리하였다. 추출한 2 µg RNA는 High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA)를 이용하여 메뉴얼에 따라 합성하였고, mRNA 발현은 TaqMan analysis를 사용하여 Step-One-Plus RT-PCR System (Applied Biosystems)에서 실행하였다. Primer는 IRS (Mm01278327_m1), Akt (Mm01331626_m1), Pik3r (Mm00803160_m1) 와 GLUT4 (Mm00436615_m1)를 사용하였으며, 95°C에서 10분간 denaturing 후, 95°C에서 15초, 60°C에서 60초의 간격으로 40회 반복하여 증폭하였다.

Table 2. Probe and Oligonucleotide

Gene		Primer sequence
IRS-1	forward	5' -CAGTCTTCCCTGCACCCTCC-3'
	reverse	5' -AATGCCTGTCCGCATGTGTCAG-3'
Akt	forward	5' -CAAGGACGGGCACATCAAGA-3'
	reverse	5' -TCAGAGGTGACCTGGGGCTT-3'
PIK3R	forward	5' -ACATCCGTCTCCAGTCCAAAA-3'
	reverse	5' -CAGGTTTCTTGTGCGGTGCAA-3'
GLUT4	forward	5' -ACGCCACCATAGGAGCTGGT-3'
	reverse	5' -AGAAGCCAAGCAGGAGGACG-3'
GAPDH	forward	5' -CCAAGGTCATCCATGACAAC-3'
	reverse	5' -TGACAAAGTGGTCGTTGAGG-3'

(바) Western Blotting

분화된 근육세포에 진피 추출물 농도별 (0, 100, 500 µg/ml) 또는 1 µM insulin을 3시간 동안 처리하여 차가운 PBS로 2회 세척한 후, protease inhibitor와 phosphatase inhibitor를 포함한 RIPA lysis buffer (Sigma Aldrich, Louis, MO) 넣고 15분간 얼음에 방치시킨 후, 4°C, 8000×g에서 10분 동안 원심분리하여 얻은 단백질 농도를 측정하였다. 단백질 30 µg과 β-mercaptoethanol를 포함한 sample buffer를 혼합한 후, 90°C에서 2분간 끓여서 단백질의 변성을 유도하였다. SDS-PAGE를 실행하여 단백질을 분리한 후 0.2 µm Trans-Blot Turbo mini PVDF transfer pack (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)으로 단백질을 전이하였다. 비특이적 단백질 결합 부분은 0.1% Tween 20과 5% BSA를 함유한 Tri-buffered saline(TBS)에 1시간 동안 반응시켜 blocking하였다. 제1차 항체 Akt와 Glut4 (Abcam, Cambridge, UK)가 각각 첨가된

용액에서 상온에서 1시간 30분 동안 혼합한 후 TBST (0.1% Tween 20 함유한 TBS)로 5분간 3번 세척하였다. 그런 다음 membrane은 제2차 항체 Goat anti-rabbit IgG conjugates horseradish peroxidase (Abcam, Cambridge, UK)가 첨가된 용액을 상온에서 1시간 30분 동안 결합시켜 반응을 한 후 TBST로 5분 동안 3번 세척하였다. 내부 표준단백질은 GAPDH (Abcam, Cambridge, UK)를 사용하였고, 효소반응에 의한발광을Molecular Imager software system (Bio-Rad Laboratories, USA)을 사용하여 표적 단백질의 발현을 측정하였다 (Lin-Moshier & Marchant 2013).

(사) 통계분석

데이터는 평균 ± 표준편차로 표현하였으며, SPSS (Version 22.0, IBM, Armonk, NY, USA)을 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 실시한 후 Tukey Multiple Comparison test로 사후검증을 실시하여 각 구간의 유의성 차이를 검증하였다 ($p < 0.05$).

나. 소재 개발 및 in vitro 항산화 실험

(1) DPPH 라디칼 소거능 측정

(가) 마늘의 DPPH 라디칼 소거능 측정

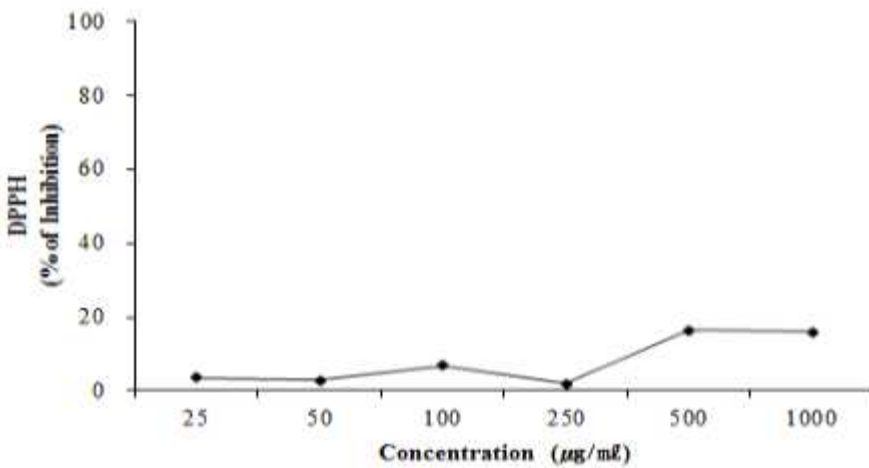


Fig. 11. 마늘 DPPH 라디칼 소거능

마늘의 DPPH 라디칼 소거능 측정 결과, 한방식품 소재인 마늘의 IC₅₀ 값은 ND로 나타났다 (Fig. 11).

(나) 상황버섯의 DPPH 라디칼 소거능 측정

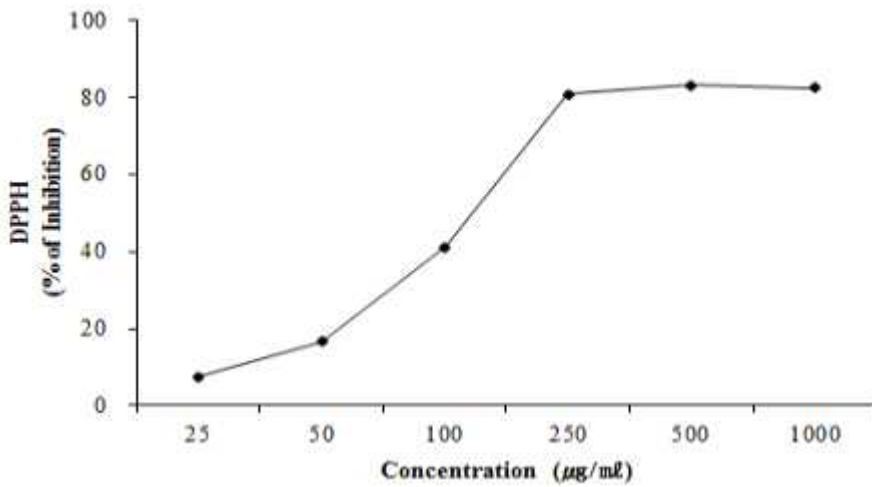


Fig. 12. 상황버섯 DPPH 라디칼 소거능

상황버섯의 DPPH 라디칼 소거능 측정 결과, 한방식품 소재인 상황버섯의 IC₅₀ 값은 134.00±0.51 µg/ml으로 높은 항산화 효과를 나타냈다 (Fig. 12).

(다) 백출의 DPPH 라디칼 소거능 측정

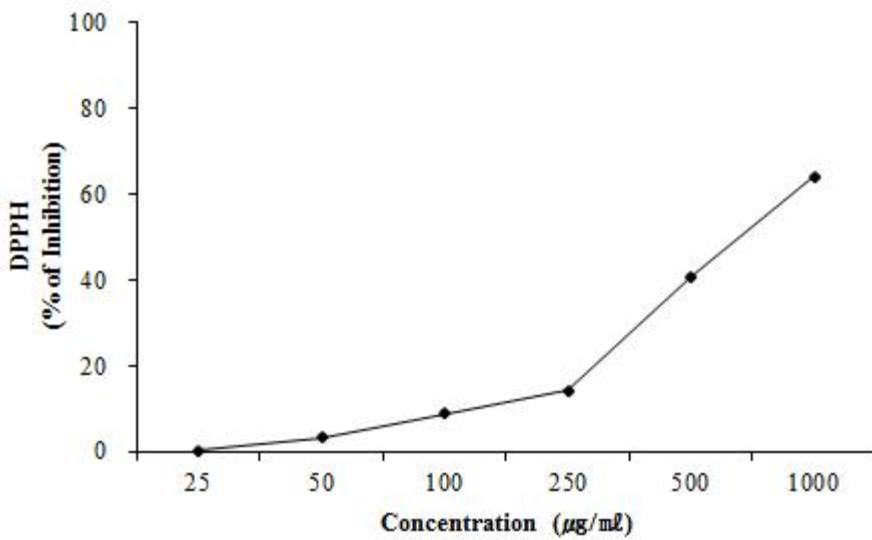


Fig. 13. 백출 DPPH 라디칼 소거능

백출의 DPPH 라디칼 소거능 측정 결과, 한방식품 소재인 백출의 IC₅₀ 값은 699.86±7.04 µg/ml으로 나타냈다 (Fig. 13).

(라) 천련자의 DPPH 라디칼 소거능 측정

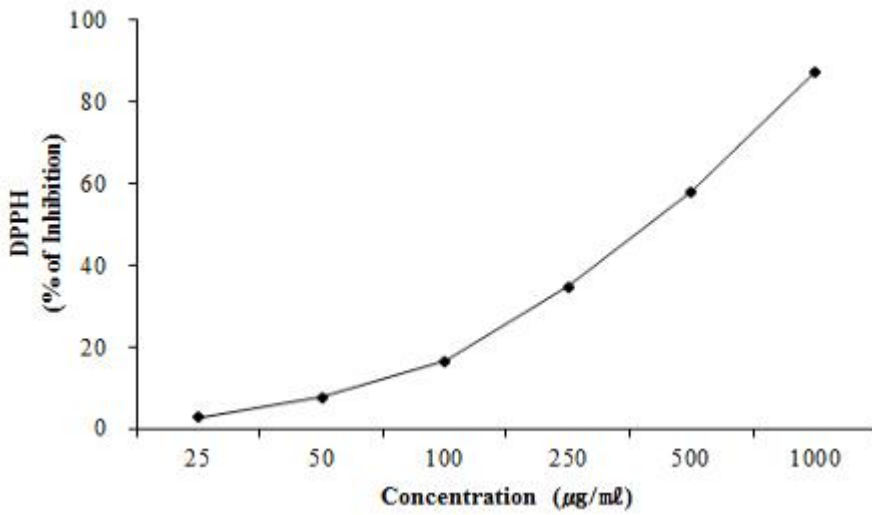


Fig. 14. 천련자 DPPH 라디칼 소거능

천련자의 DPPH 라디칼 소거능 측정 결과, 한방식품 소재인 천련자의 IC₅₀ 값은 413.77±2.08 µg/ml으로 높은 항산화 효과를 나타냈다 (Fig. 14).

(마) 등글레의 DPPH 라디칼 소거능 측정

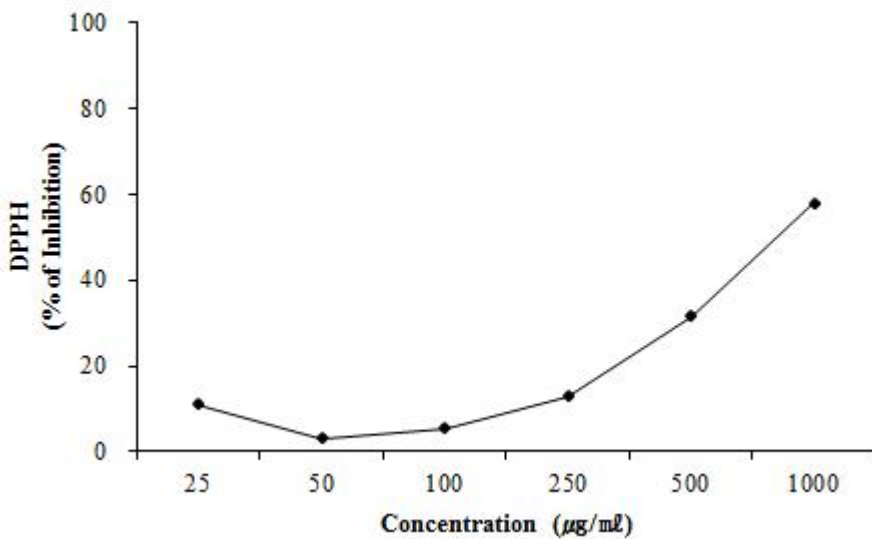


Fig. 15. 등글레 DPPH 라디칼 소거능

등글레의 DPPH 라디칼 소거능 측정 결과, 한방식품 소재인 등글레의 IC₅₀ 값은 848.85±1.13 µg/ml으로 나타냈다 (Fig. 15).

(바) 감초의 DPPH 라디칼 소거능 측정

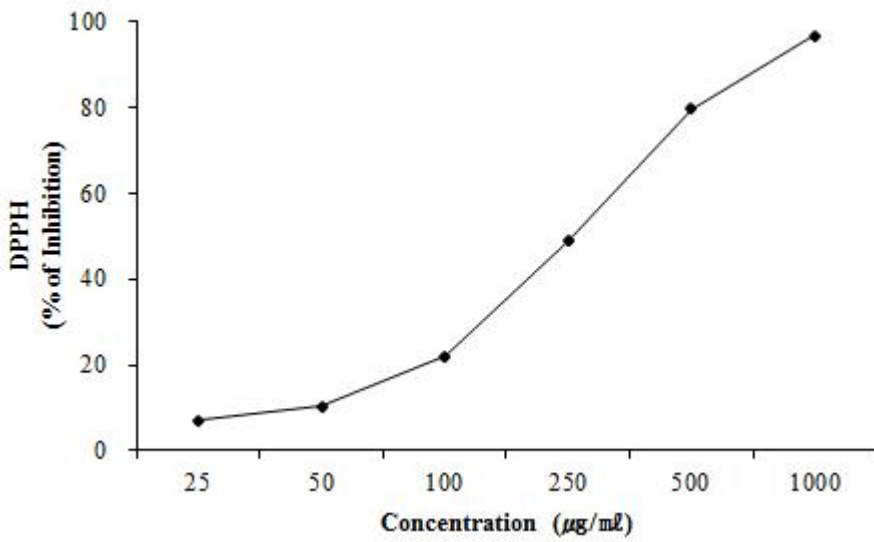


Fig. 16. 감초 DPPH 라디칼 소거능

감초의 DPPH 라디칼 소거능 측정 결과, 한방식품 소재인 감초의 IC₅₀ 값은 259.62±2.60 µg/ml 으로 높은 항산화능을 나타냈다 (Fig. 16).

(사) 천궁의 DPPH 라디칼 소거능 측정

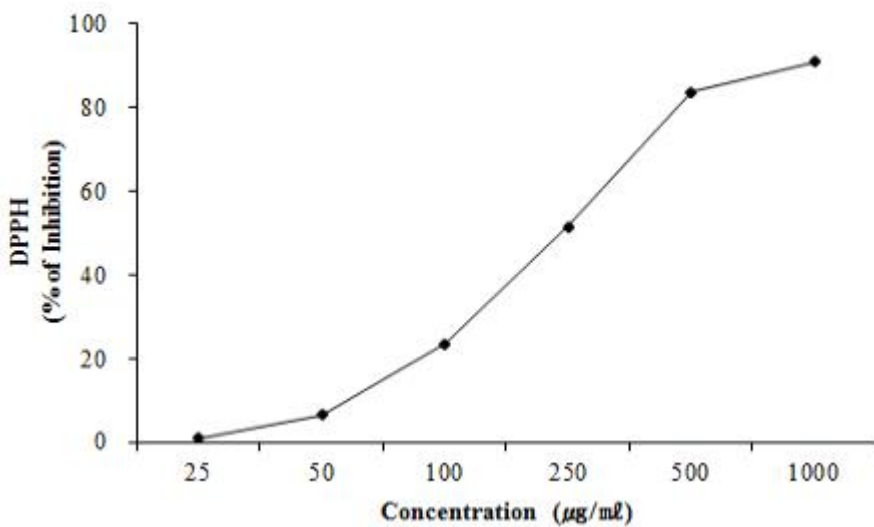


Fig. 17. 천궁 DPPH 라디칼 소거능

천궁의 DPPH 라디칼 소거능 측정 결과, 한방식품 소재인 천궁의 IC₅₀ 값은 242.46±1.94 µg/ml 으로 높은 항산화능을 나타냈다 (Fig. 17).

(아) 두충의 DPPH 라디칼 소거능 측정

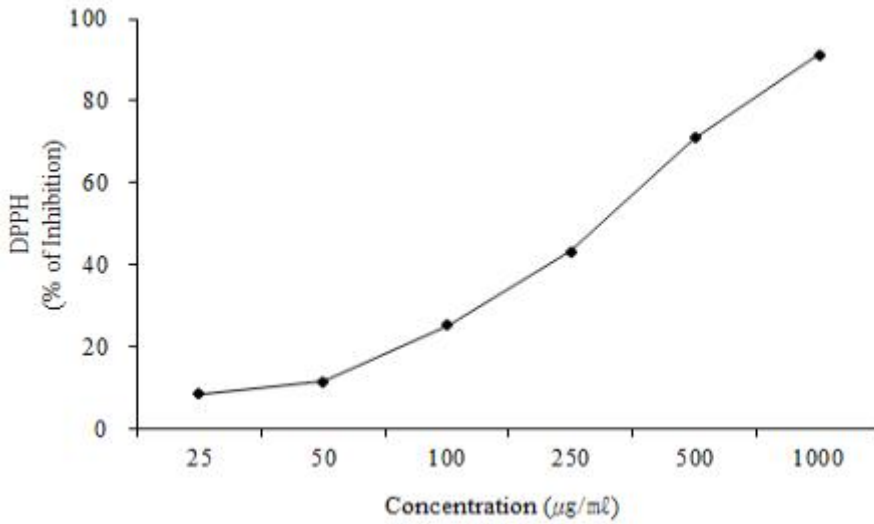


Fig. 18. 두충 DPPH 라디칼 소거능

두충의 DPPH 라디칼 소거능 측정 결과, 한방식품 소재인 두충의 IC_{50} 값은 $310.26 \pm 2.50 \mu\text{g/ml}$ 으로 높은 항산화능을 나타냈다 (Fig. 18).

(자) 강황의 DPPH 라디칼 소거능 측정

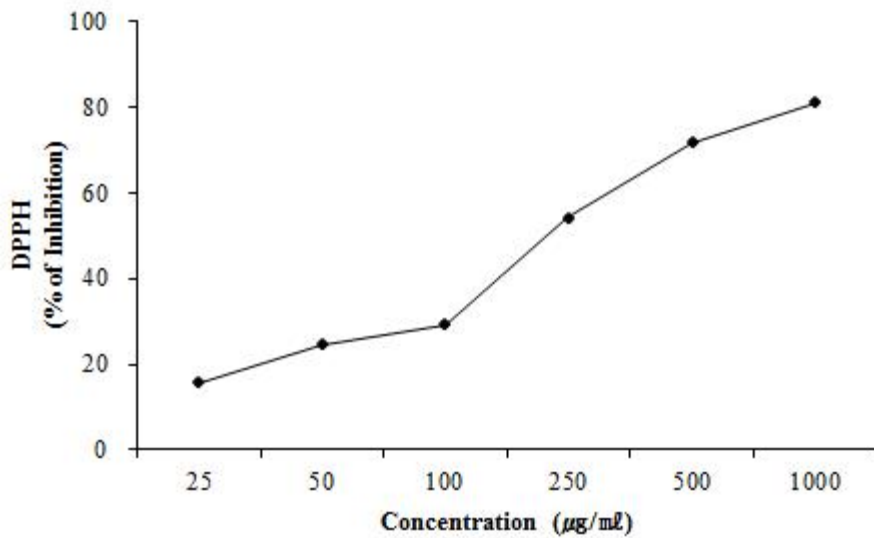


Fig. 19. 강황 DPPH 라디칼 소거능

강황의 DPPH 라디칼 소거능 측정 결과, 한방식품 소재인 강황의 IC_{50} 값은 $225.29 \pm 3.71 \mu\text{g/ml}$ 으로 높은 항산화능을 나타냈다 (Fig. 19).

(차) 진피의 DPPH 라디칼 소거능 측정

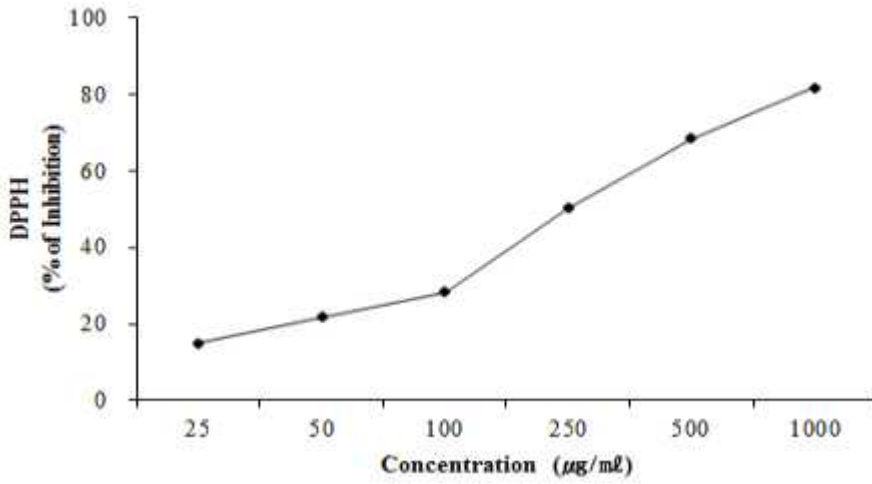


Fig. 20. 진피 DPPH 라디칼 소거능

진피의 DPPH 라디칼 소거능 측정 결과, 한방식품 소재인 강황의 IC_{50} 값은 $249.33 \pm 1.38 \mu\text{g/ml}$ 으로 높은 항산화능을 나타냈다 (Fig. 20).

(카) Ascorbic acid의 DPPH 라디칼 소거능 측정

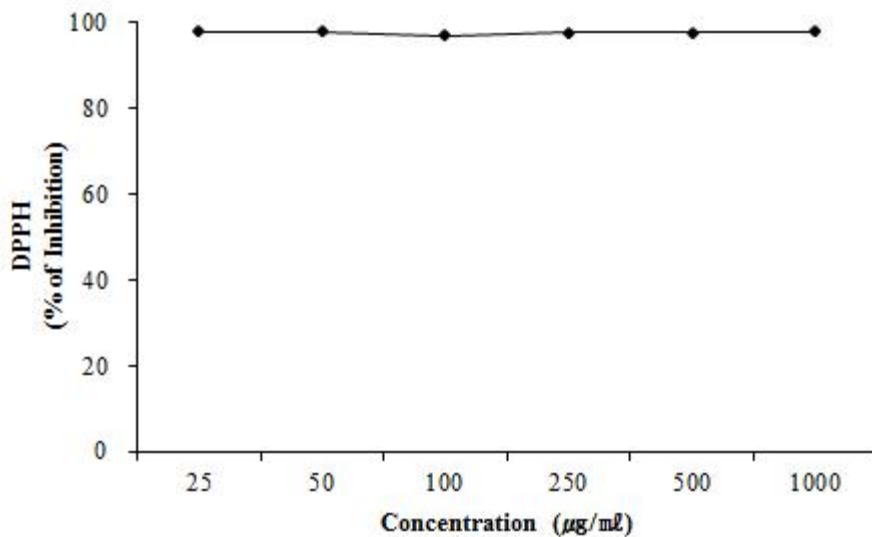


Fig. 21. Ascorbic acid DPPH 라디칼 소거능

양성 대조군인 ascorbic acid의 DPPH 라디칼 소거능 측정 결과, ascorbic acid은 높은 항산화능을 나타냈다 (Fig. 21).

(2) ABTS 라디칼 소거능 측정

(가) 마늘의 ABTS 라디칼 소거능 측정

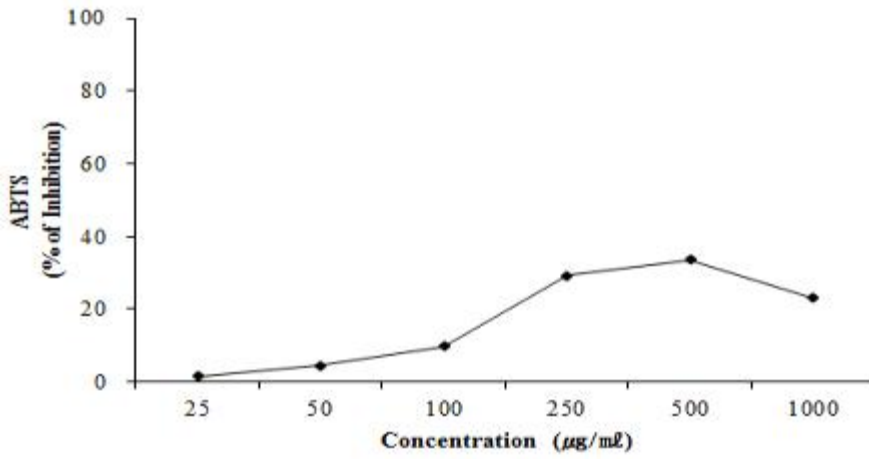


Fig. 22. 마늘 ABTS 라디칼 소거능

마늘의 ABTS 라디칼 소거능 측정 결과, 한방식품 소재인 마늘의 IC₅₀ 값은 ND으로 나타났다 (Fig. 22).

(나) 상황버섯의 ABTS 라디칼 소거능 측정

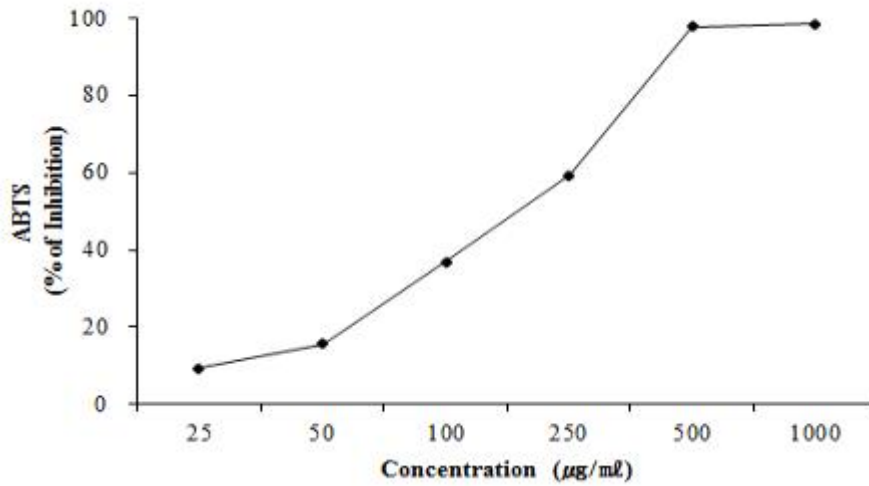


Fig. 23. 상황버섯 ABTS 라디칼 소거능

상황버섯의 ABTS 라디칼 소거능 측정 결과, 한방식품 소재인 상황버섯의 IC₅₀ 값은 187.93±0.89 µg/ml 으로 나타났다 (Fig. 23).

(다) 백출의 ABTS 라디칼 소거능 측정

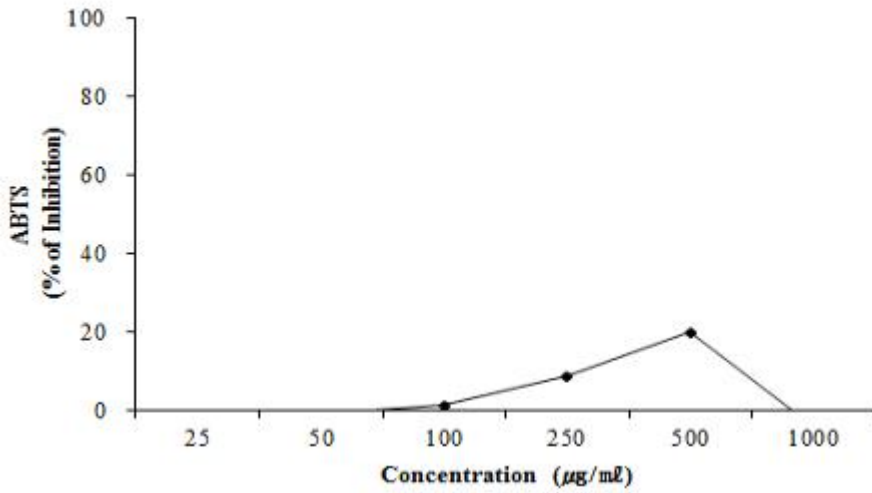


Fig. 24. 백출 ABTS 라디칼 소거능

백출의 ABTS 라디칼 소거능 측정 결과, 한방식품 소재인 백출의 IC_{50} 값은 ND으로 나타났다 (Fig. 24).

(라) 천련자의 ABTS 라디칼 소거능 측정

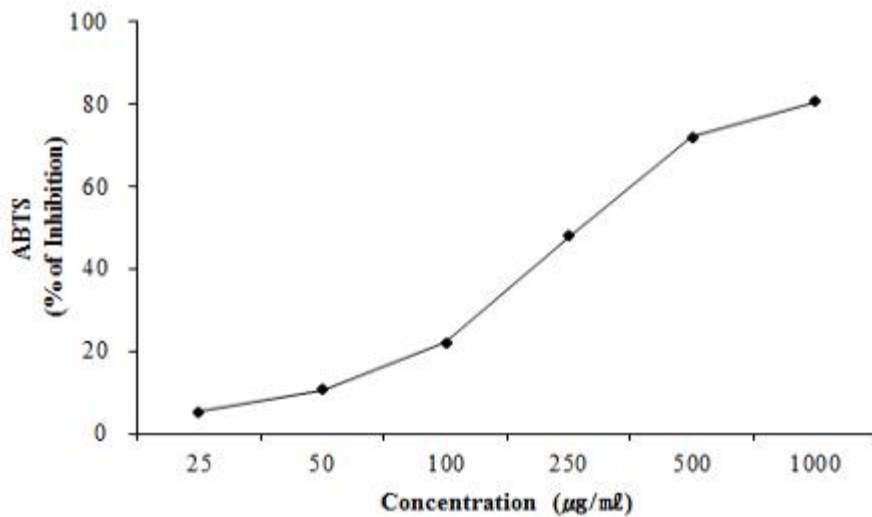


Fig. 25. 천련자 ABTS 라디칼 소거능

천련자의 ABTS 라디칼 소거능 측정 결과, 한방식품 소재인 천련자의 IC_{50} 값은 272.56 ± 3.67 µg/ml으로 나타났다 (Fig. 25).

(마) 등글레의 ABTS 라디칼 소거능 측정

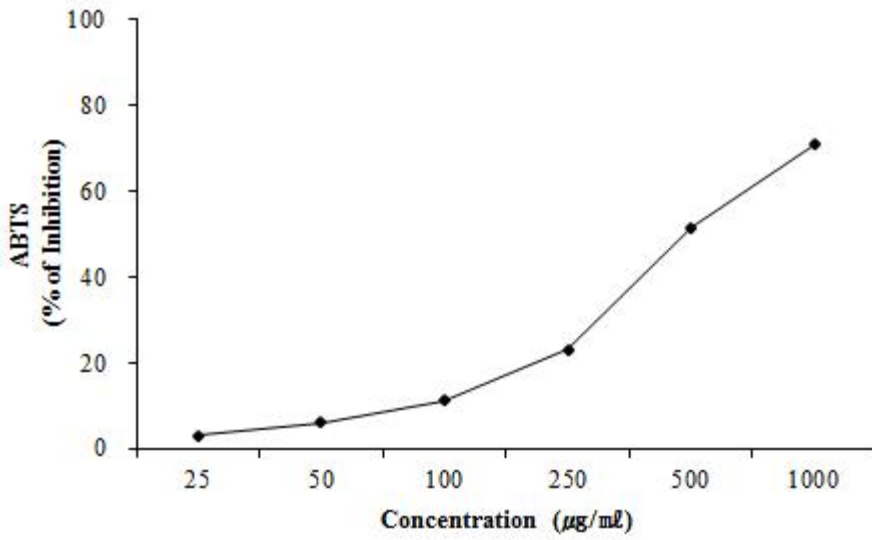


Fig. 26. 등글레 ABTS 라디칼 소거능

등글레의 ABTS 라디칼 소거능 측정 결과, 한방식품 소재인 등글레의 IC_{50} 값은 486.37 ± 1.84 µg/ml 으로 높은 항산화능을 나타냈다 (Fig. 26).

(바) 감초의 ABTS 라디칼 소거능 측정

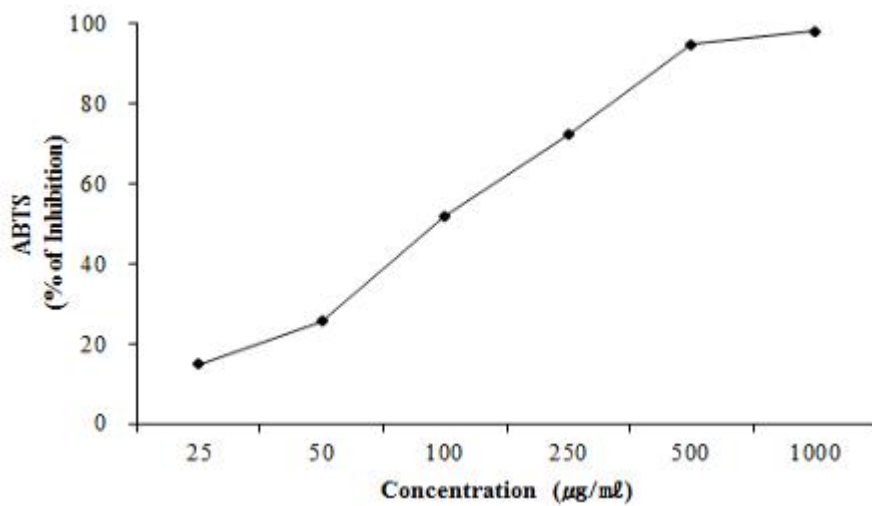


Fig. 27. 감초 ABTS 라디칼 소거능

감초의 ABTS 라디칼 소거능 측정 결과, 한방식품 소재인 감초의 IC_{50} 값은 89.04 ± 3.08 µg/ml 으로 높은 항산화능을 나타냈다 (Fig. 27).

(사) 천궁의 ABTS 라디칼 소거능 측정

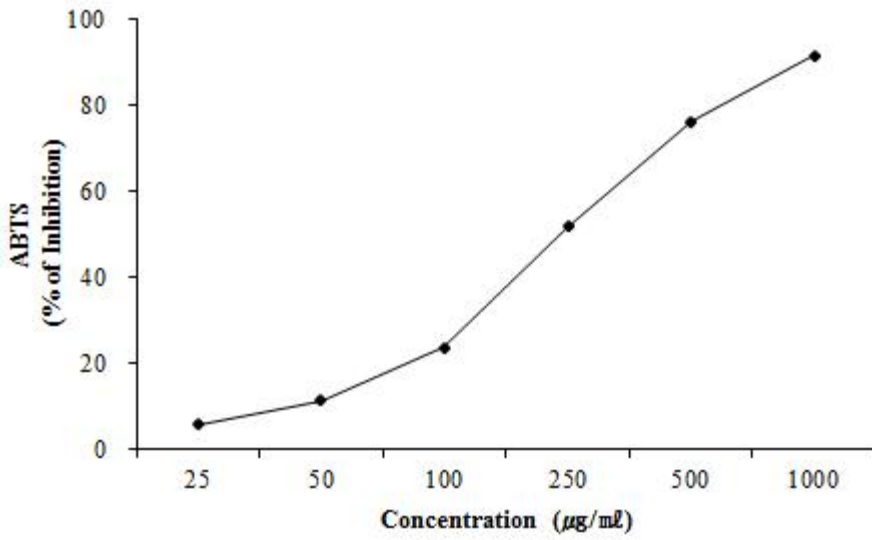


Fig. 28. 천궁 ABTS 라디칼 소거능

천궁의 ABTS 라디칼 소거능 측정 결과, 한방식품 소재인 천궁의 IC₅₀ 값은 $241.16 \pm 0.39 \mu\text{g/ml}$ 으로 높은 항산화능을 나타냈다 (Fig. 28).

(아) 두충의 ABTS 라디칼 소거능 측정

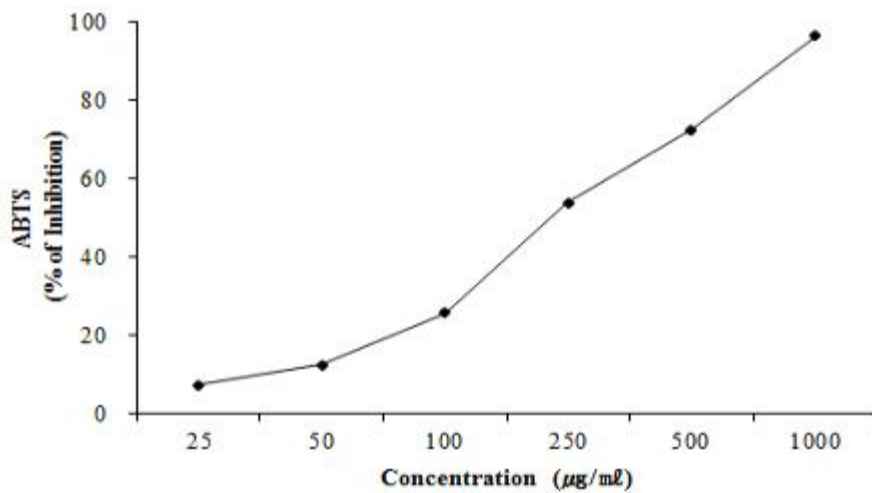


Fig. 29. 두충 ABTS 라디칼 소거능

두충의 ABTS 라디칼 소거능 측정 결과, 한방식품 소재인 두충의 IC₅₀ 값은 $229.28 \pm 1.10 \mu\text{g/ml}$ 으로 높은 항산화능을 나타냈다 (Fig. 29).

(자) 강황의 ABTS 라디칼 소거능 측정

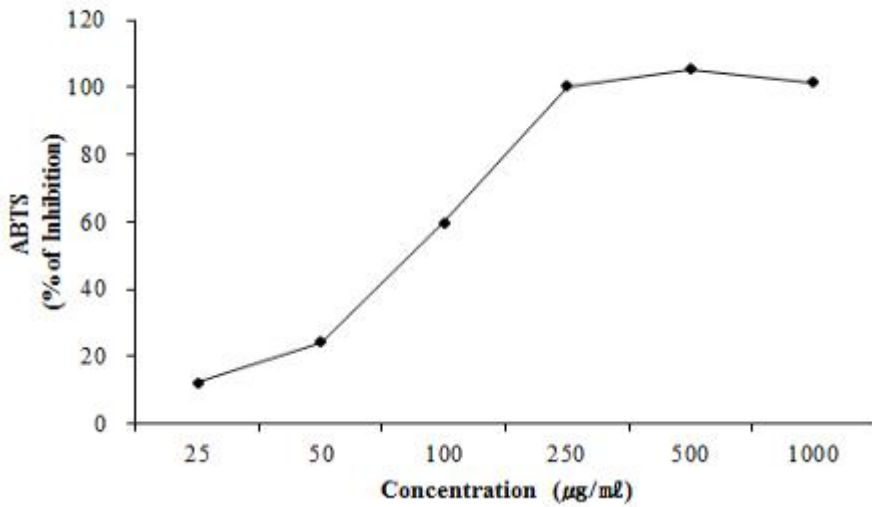


Fig. 30. 강황 ABTS 라디칼 소거능

강황의 ABTS 라디칼 소거능 측정 결과, 한방식품 소재인 강황의 IC₅₀ 값은 86.25±1.48 µg/ml 으로 높은 항산화능을 나타냈다 (Fig. 30).

(차) 진피의 ABTS 라디칼 소거능 측정

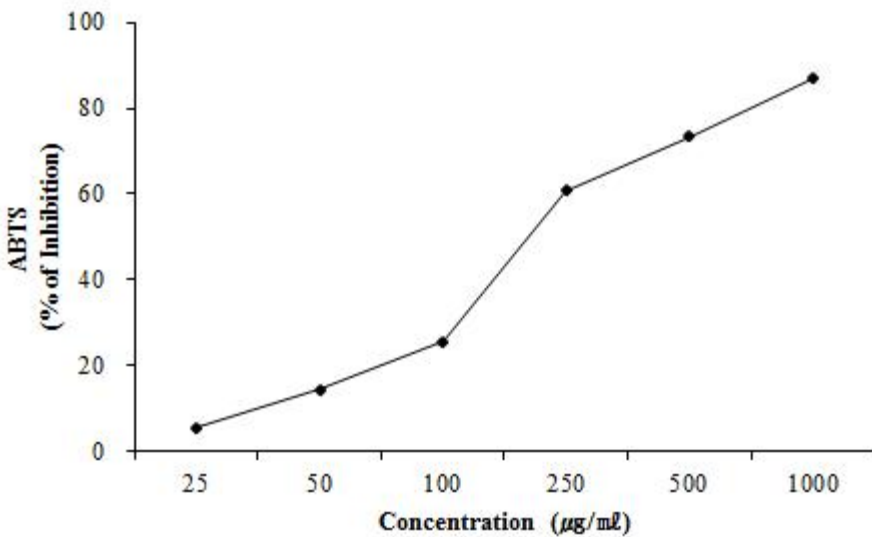


Fig. 31. 진피 ABTS 라디칼 소거능

진피의 ABTS 라디칼 소거능 측정 결과, 한방식품 소재인 진피의 IC₅₀ 값은 204.33±1.44 µg/ml 으로 높은 항산화능을 나타냈다 (Fig. 31).

(카) Ascorbic acid의 ABTS 라디칼 소거능 측정

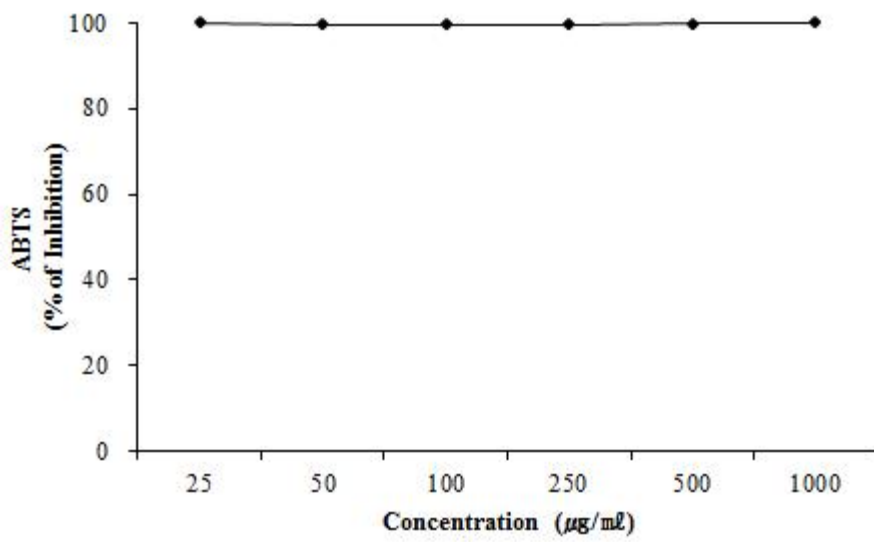


Fig. 32. Ascorbic acid ABTS 라디칼 소거능

양성 대조군인 ascorbic acid의 ABTS 라디칼 소거능 측정 결과, Ascorbic acid은 높은 항산화능을 나타냈다 (Fig. 32).

(3) 한방식품 소재의 총 폴리페놀 함량 측정

Table 3. 10가지 한방식품소재의 총 폴리페놀 함량

	Sample	mg/g
1	마늘	9.86±0.16
2	상황버섯	47.55±0.19
3	백출	13.92±0.20
4	천련자	26.21±0.43
5	등글레	17.26±0.12
6	감초	54.43±0.38
7	천궁	18.27±6.47
8	두충	49.23±0.25
9	강황	30.65±0.66
10	진피	48.14±0.34

천연물에서 분리된 폴리페놀 화합물은 항산화 활성을 판단하는 지표로 알려져 있다. 한방식품 소재의 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과, 마늘은 9.86±0.16 mg/g, 상황버섯 47.55±0.19 mg/g, 백출 13.92±0.20 mg/g, 천련자 26.21±0.43 mg/g, 등글레 17.26±0.12 mg/g, 감초 54.43±0.38 mg/g, 천궁 18.27±6.48 mg/g, 두충 49.24±0.26 mg/g, 강황 30.66±0.66 mg/g, 진피 48.14±0.34 mg/g 으로 나타내어 높은 폴리페놀 함량을 나타냈다 (표 3).

(4) 한방식품 소재의 총 플라보노이드 함량 측정

Table 4. 10가지 한방식품소재의 총 플라보노이드 함량

연번	Sample	mg/g
1	마늘	1.49±0.03
2	상황버섯	9.28±0.09
3	백출	4.28±0.16
4	천련자	3.72±0.09
5	둥글레	2.69±0.01
6	감초	25.66±0.17
7	천궁	5.39±0.05
8	두충	7.88±0.00
9	강황	13.26±0.04
10	진피	36.17±0.52

천연물에서 분리된 플라보노이드 화합물은 항산화 활성을 판단하는 지표로 알려져 있다. 한방식품 소재의 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과, 마늘은 1.50 ± 0.04 mg/g, 상황버섯 9.28 ± 0.09 mg/g, 백출 4.28 ± 0.16 mg/g, 천련자 3.72 ± 0.09 mg/g, 둥글레 2.69 ± 0.01 mg/g, 감초 25.66 ± 0.17 mg/g, 천궁 5.39 ± 0.05 mg/g, 두충 7.88 ± 0.00 mg/g, 강황 13.26 ± 0.04 mg/g, 진피 36.17 ± 0.52 mg/g 으로 나타내어 높은 플라보노이드 함량을 나타냈다 (표 4).

다. *In vitro* 당대사 L6 근육세포 실험

(1) 세포독성 평가

진피 추출물을 농도별로 처리한 결과, L6 근육세포 세포에 대한 세포독성은 모든 농도에서 보이지 않았다 (Fig. 33).

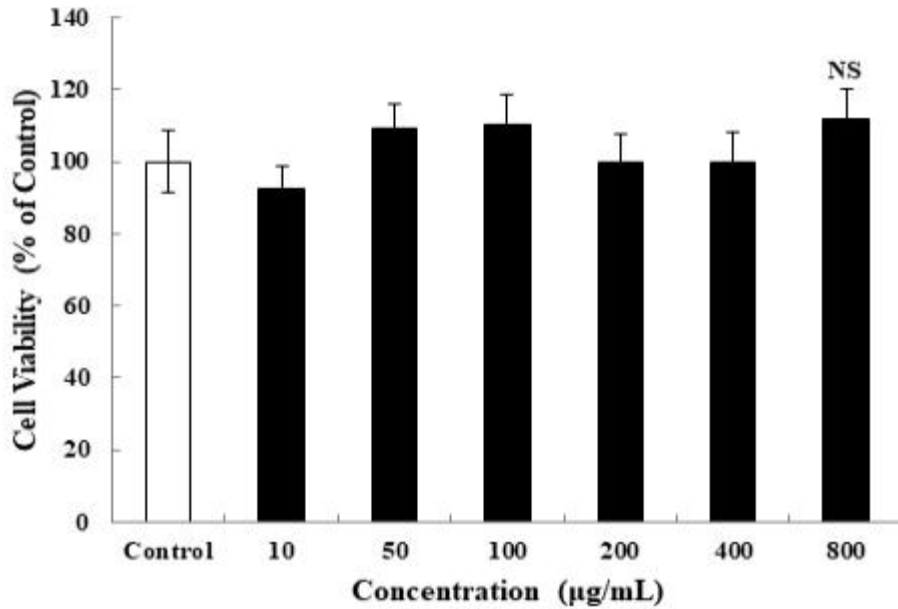


Fig. 33. L6 근육세포에서 진피 추출물의 세포독성 측정

(가) L6 근육세포의 IRS-1 mRNA 발현량 측정

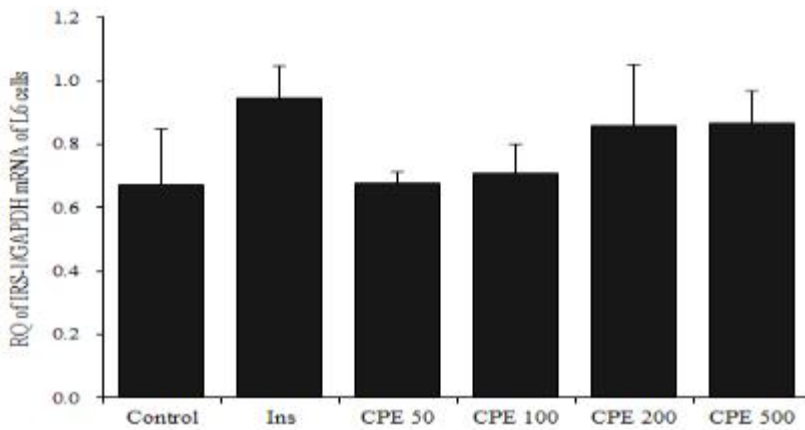


Fig. 34. L6 근육세포의 IRS-1 mRNA 발현량 측정

근육세포 L6에서 RQ PCR을 실시하여 진피 추출물 처리가 당대사 관련 인자인 IRS-1의 mRNA 발현을 측정된 결과, 양성 대조군인 insulin 처리군 (0.67 ± 0.18)은 IRS-1의 발현량을 증가시켰고 CPE 50, 100, 200 그리고 500 µg/ml 처리군에서 또한 증가하는 경향을 나타냈다 (Fig. 34).

(나) L6 근육세포의 Akt mRNA 발현량 측정

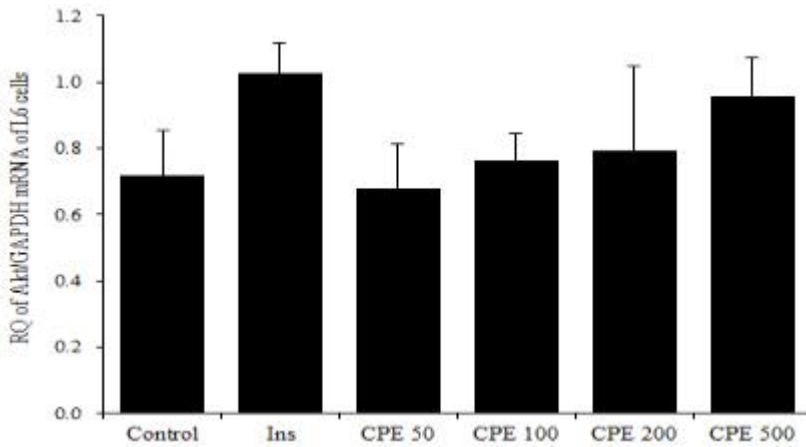


Fig. 35. L6 근육세포의 Akt mRNA 발현량 측정

근육세포 L6에서 RQ PCR을 실시하여 진피 추출물 처리가 당대사 관련 인자인 Akt의 mRNA 발현을 측정된 결과, control군에 비하여 양성 대조군인 insulin 처리군 (1.03 ± 0.09)은 Akt의 발현량을 증가시켰고 CPE 50, 100, 200 그리고 500 $\mu\text{g/ml}$ 처리군 또한 증가하는 경향을 나타냈다 (Fig. 35).

(다) L6 근육세포의 PIK3R mRNA 발현량 측정

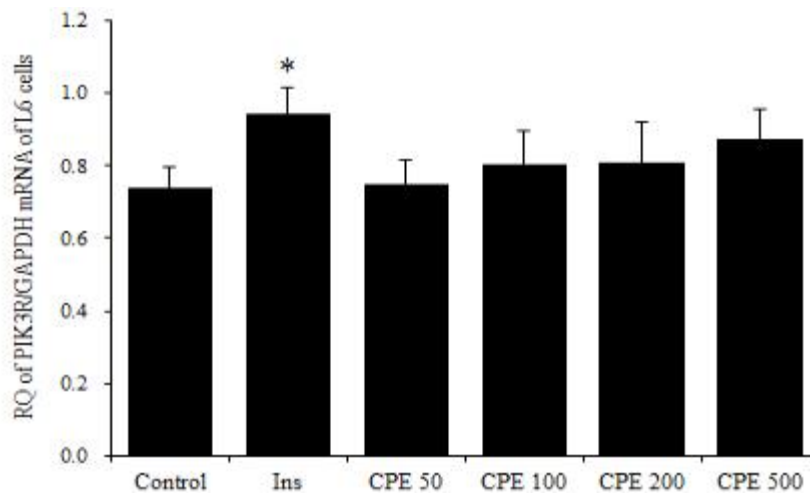


Fig. 36. L6 근육세포의 PIK3R mRNA 발현량 측정

근육세포 L6에서 RQ PCR을 실시하여 진피 추출물 처리가 당대사 관련 인자인 PIK3R의 mRNA 발현을 측정된 결과, control군에 비하여 양성 대조군인 insulin 처리군 $\{0.95 \pm 0.07 (p < 0.05)\}$ 은 PIK3R의 발현을 유의성 있게 증가시켰고 CPE 50, 100, 200 그리고 500 $\mu\text{g/ml}$ 처리군은 유의성은 없었으나 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타냈다 (Fig. 36).

(라) L6 근육세포의 GLUT4 mRNA 발현량 측정

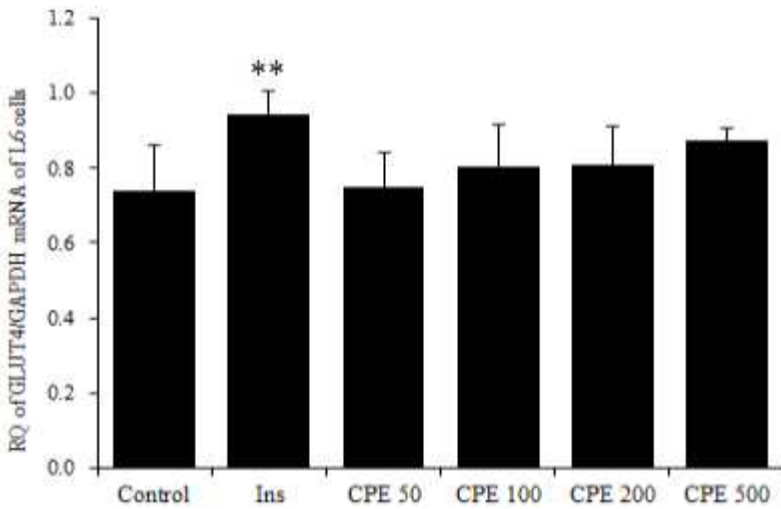


Fig. 37. L6 근육세포의 GLUT4 mRNA 발현량 측정

근육세포 L6에서 RQ PCR을 실시하여 진피 추출물 처리가 당대사 관련 인자인 GLUT4의 mRNA 발현을 측정된 결과, control군에 비하여 양성 대조군인 insulin 처리군 $\{1.04 \pm 0.06 (p < 0.01)\}$ 은 GLUT4의 발현을 유의성 있게 증가시켰고 CPE 50, 100, 200 그리고 500 $\mu\text{g/ml}$ 처리군은 유의성은 없었으나 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타냈다 (Fig. 37).

나. L6 근육세포에서 진피 추출물의 당대사 관련 인자 단백질 발현 측정

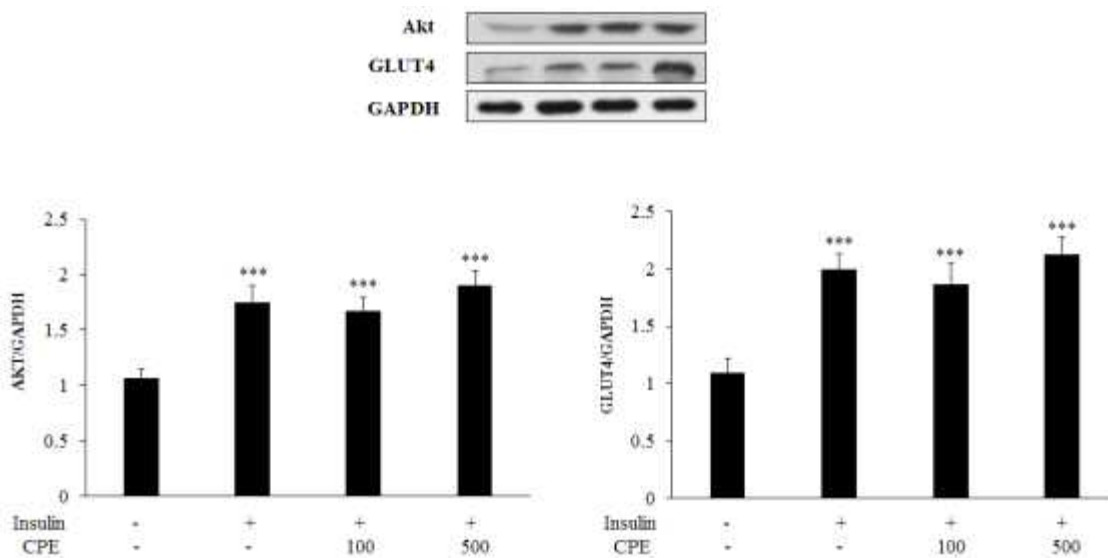


Fig. 38. L6 근육세포의 Akt, GLUT4 단백질 발현량 측정

근육세포 L6에서 western blot을 실시하여 진피 추출물 처리가 당대사 관련 인자인 Akt의 단

백질 발현을 측정된 결과, control군에 비하여 양성 대조군인 insulin 처리군 $\{1.75 \pm 0.15 (p < 0.001)\}$ 은 Akt의 단백질 발현을 유의성 있게 증가시켰고 CPE 100 $\mu\text{g/ml}$ 처리군 $\{1.68 \pm 0.12 (p < 0.001)\}$ 과 CPE 500 $\mu\text{g/ml}$ 처리군 $\{1.91 \pm 0.13 (p < 0.001)\}$ 또한 농도 의존적으로 유의성 있는 증가를 나타냈다.

근육세포 L6에서 western blot을 실시하여 진피 추출물 처리가 당대사 관련 인자인 GLUT4의 단백질 발현을 측정된 결과, control군에 비하여 양성 대조군인 insulin 처리군 $\{1.99 \pm 0.14 (p < 0.001)\}$ 은 GLUT4의 발현을 유의성 있게 증가시켰고 CPE 100 $\mu\text{g/ml}$ 처리군 $\{1.86 \pm 0.19 (p < 0.001)\}$ 과 CPE 500 $\mu\text{g/ml}$ 처리군 $\{2.12 \pm 0.16 (p < 0.001)\}$ 또한 농도 의존적으로 유의성 있는 증가를 나타냈다 (Fig. 38).

4. 뿔은감진피복합물 연구

가. 실험방법

1) Pancreatic lipase inhibition assay

Enzyme buffer (10mM MOPS, 1mM EDTA, pH 6.8)을 준비한다. Porcine pancreatic lipase 를 Enzyme buffer 1mL 에 녹인다. Tris buffer (100mM Tris-HCL, 5mM CaCl₂, pH 7.0) 을 준비한 후 lipase가 들어있는 enzyme buffer 6 μL 와 Tris buffer 169 μL (1+3)를 혼합한다. 시료를 농도별로 희석한 용액 20 μL 와 buffer mixture 175 μL 를 혼합한 후 37°C 15분 shaking incubation 한다. Incubation 후 5 ul의 substrate solution (10mM p-NPB stock: 5.57M in DMF) 첨가 후 37°C 30분 shaking incubation 한다. 405 nm에서 흡광도를 사용하여 측정한다.

2) 3T3-L1 지방세포 배양

3T3-L1 전지방세포가 confluent 상태가 되었을 때를 Day -2라 표기하였으며, 3T3-L1 전지방세포가 confluent 상태가 된 2일 후 분화유도 배지 (Differentiation medium: DM)로 교체하고 Day 0라 하였다. 분화유도 배지는 10% FBS와 100 unit/ml의 penicillin-streptomycin이 함유된 DMEM 배지에 500 μM 의 IBMX, 5.2 μM 의 DEX, 그리고 167 nM의 insulin을 포함하여 Day 0에서 Day 2까지 48시간 동안 사용하였다. Day 2에서 Day 4까지의 분화유도 후 배지 (Post-differentiation medium; Post-DM)는 10% FBS와 100 unit/ml의 penicillin-streptomycin이 함유된 DMEM에 167 nM의 insulin만 포함하여 사용하였으며, 이후 10% FBS와 100 unit/ml의 penicillin-streptomycin이 함유된 DMEM은 Day 4에서 Day 6까지 사용하였으며, 3T3-L1 지방세포의 분화는 Day 6에 종료되었다. 뿔은감 유래 물질은 분화 전기간 (Day -2~6), 분화이전 (Day -2~0), 분화초기 (Day 0~2), 분화중기 (Day 2~4), 그리고 분화후기 (Day 4~6)로 나누어 50, 100, 200, 그리고 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였다.

3) Western Blotting

분화된 지방세포에 뿔은감과 진피 추출물을 배합별 (감 100%, 감50%+진피50%, 진피 100%)로 1 g/ml의 농도로 처리하였다. 24시간 동안 배양후, 차가운 PBS로 2회 세척한 후, protease inhibitor와 phosphatase inhibitor를 포함한 RIPA lysis buffer (Sigma Aldrich, Louis, MO) 넣고

15분간 얼음에 방치시킨 후, 4°C, 8000×g에서 10분 동안 원심분리하여 얻은 단백질 농도를 측정하였다. 단백질 30 µg과 β-mercaptoethanol를 포함한 sample buffer를 혼합한 후, 90°C에서 2분간 끓여서 단백질의 변성을 유도하였다. SDS-PAGE를 실행하여 단백질을 분리한 후 0.2 µm Trans-Blot Turbo mini PVDF transfer pack (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)으로 단백질을 전이하였다. 비특이적 단백질 결합 부분은 0.1% Tween 20과 5% BSA를 함유한 Tri-buffered saline(TBS)에 1시간 동안 반응시켜 blocking하였다. 제1차 항체 AMPK와 p-AMPK (Abcam, Cambridge, UK)가 각각 첨가된 용액에서 상온에서 1시간 30분 동안 혼합한 후 TBST (0.1% Tween 20 함유한 TBS)로 5분간 3번 세척하였다. 그런 다음 membrane은 제2차 항체 Goat anti-rabbit IgG conjugates horseradish peroxidase (Abcam, Cambridge, UK)가 첨가된 용액을 상온에서 1시간 30분 동안 결합시켜 반응을 한 후 TBST로 5분 동안 3번 세척하였다. 내부 표준 단백질은 GAPDH (Abcam, Cambridge, UK)를 사용하였고, 효소반응에 의한 발광을 Molecular Imager software system (Bio-Rad Laboratories, USA)을 사용하여 표적 단백질의 발현을 측정하였다 (Lin-Moshier & Marchant 2013).

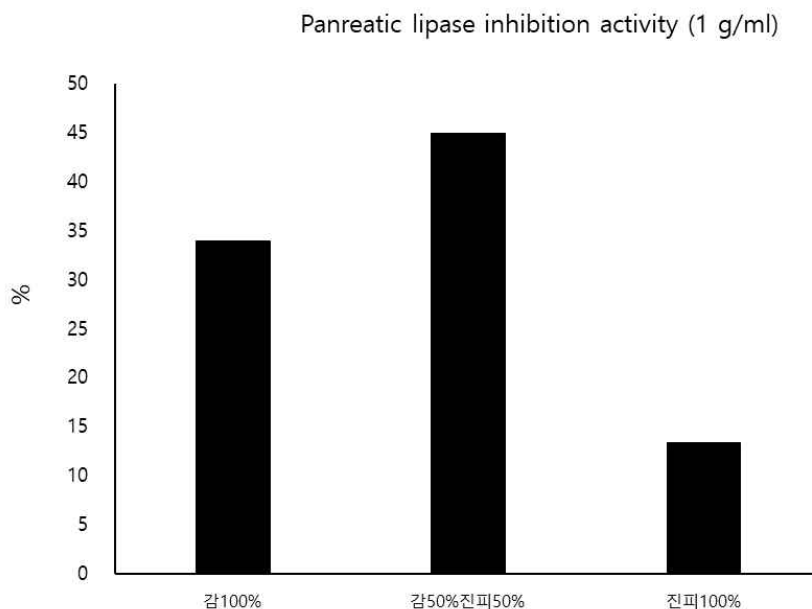
4) ELISA assay

뿔은감과 진피의 일정비율대로 혼합한 시료를 3T3-L1 지방세포에 1 g/ml로 처리한 후, 24시간 배양하였다. 배양후 배양액을 수집하여 Free glycerol 함량을 ELISA kit를 사용하여 TECAN 흡광도 측정기를 사용하여 482 nm 파장에서 측정하였다.

나. 실험결과

1) 췌장라이페이스 억제 효능

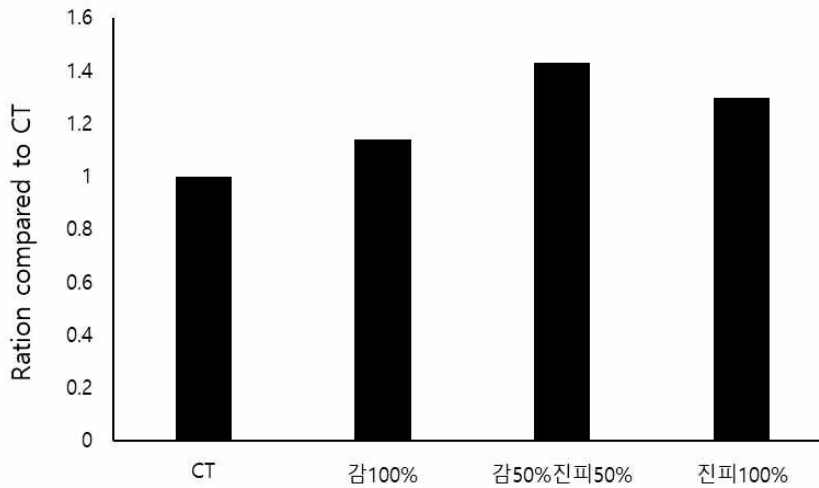
뿔은감과 진피를 단독처리한 것에 비해 1:1로 혼합한 복합물의 췌장 라이페이스 억제능이 상승되는 것으로 나타났다.



2) p-AMPK/AMPK 단백질 발현량 분석

뿔은감과 진피를 단독처리한 것에 비해 1:1로 혼합한 복합물의 지방세포의 p-AMPK/AMPK 단백질 발현량이 상승되는 것으로 나타났다.

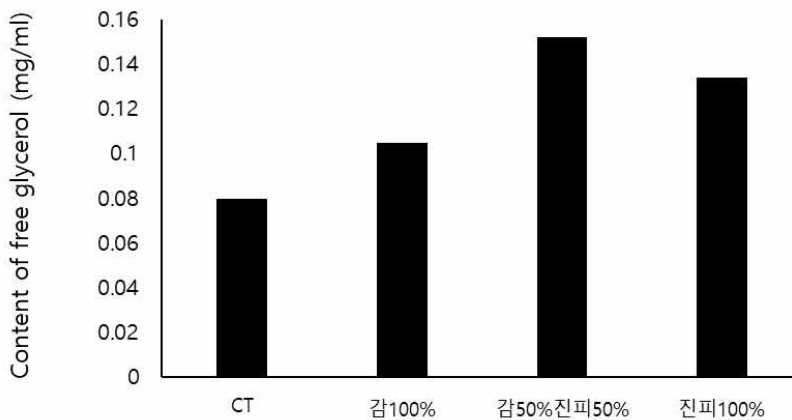
pAMPK/AMPK protein expression in 3T3-L1 cells treated with 1 g/ml



3) Free glycerol 함량분석

뿔은감과 진피를 단독처리한 것에 비해 1:1로 혼합한 복합물의 지방세포의 배양액 내 Free glycerol 함량이 상승되는 것으로 나타났다.

Free glycerol release in differentiated 3T3-L1 cells treated with 1 g/ml



2-4. 혼합비지청국장 물성 연구방법

1. 비지청국장의 일반성분, 염도, pH 측정

비지청국장의 일반성분은 식염은 Mohr법, pH는 시료 10 g을 동량의 증류수로 희석하여 pH-meter (920Aplus, Orion, Beverly, MA, USA)로 직접 측정하였고, 적정산도는 pH를 측정한

시료에 0.1 N NaOH를 가하여 pH 8.3이 될 때까지 적정하여 그 소비 mL수로 표시하였다. 총당과 환원당은 제단백 처리한 후 Somogyi변법, 아미노산성 질소는 Formol적정법, 암모니아성 질소는 Folin법으로 정량하였다. 산가는 식품공전에 준하여 비지청국장 2.5 g을 삼각 flask에 취하고 ether : ethanol 혼합액(1:2) 100 mL를 넣어 자석교반기로 10분간 용출시킨 후 phenolphthalein을 지시약으로 하여 0.1 N ethanol성 KOH용액으로 적정하여 그 소비량으로 계산하였다. 염도는 Mohr법에 따라 간장 10mL에 1 N 크롬산칼륨 (K₂CrO₄) 용액 1 mL를 가하고, 0.1 N 질산은 (AgNO₃) 용액을 가하여 적갈색이 15초간 사라지지 않을 때까지 소요된 질산은 용액의 양으로부터 산출하였다.

2. 수분활성도와 색도, 산화환원전위

수분활성도(A_w)는 Rotronic ag hygroskop(CH-8303, Bassersdorf,Swiss)로, 색도는 색차계(Hunter Lab, Ultrascan VIS, USA)로 측정하여 Hunter scale에 의해 L(lightness), a(redness), b(yellowness)값으로 표시하였다. 산화환원전위(oxidation-reduction potential;ORP)는 비지청국장을 2배 희석한 후 ORP-meter(Orion 525A+, Beverly, MA, USA)를 이용하여 직접 측정하였다.

3. 생균수

비지청국장의 생균수는 호기성 세균은 tryptic soy agar, 통성혐기성 세균은 APT agar를 사용하여 평판도말 한 후 1.5% agar를 덮어 증충하였고, 효모는 rose bengal agar 배지를 사용하여 평판도말법으로 28°C에서 1-3일간 배양한 후 계수하였다.

4. 환원당 및 총당의 정량

비지청국장의 환원당은 Dinitrosalicylic acid (DNS)법(Miller, 1959)에 따라 증류수를 가하여 50배 희석한 시료 추출액 1 mL에 DNS시약 3 mL를 가한 후 100°C의 수욕상에서 15분간 중탕 가열한 다음 냉각하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Glucose (Sigma,USA)를 이용하여 0.2~2.0 mg/mL의 농도범위에서 작성한 표준검량곡선에 따라 환원당 함량을 정량하였다. 총당 함량은 phenol-H₂SO₄법에 따라 간장 0.1 mL를 증류수로 100 mL로 정용한 다음 여과한 시료액 1 mL에 5% 페놀 용액 1mL 및 진한 황산 5 mL를 차례로 가하여 30분간 실온에서 정치시킨 후 470 nm에서 흡광도를 측정하였으며, maltose (Sigma, USA)를 이용하여 작성한 표준 검량선에 의해 계산하였다.

5. 제품의 품질지표 및 유통기한 예측 가능

품질지표 규명 및 유통기한 예측: 시료의 저장온도 및 기간에 따른 품질특성 값을 이화학 검사의 전반적인 기호도와 회귀분석을 실시하여 상관관계가 높은 인자를 샘플의 품질지표로 삼음. 저장기간(t)에 따른 품질특성(A)의 변화량으로서 이 결과를 Kinetic plot으로 변형시키면 품질손상의 반응속도 상수(K)를 얻을 수 있음.

$$-\frac{dA}{dt} = KA^n$$

A : 측정성분의 품질변화량
t : 저장기간
K : 반응속도상수
n : 반응차수
dA/dt : 시간 변화에 따른 성분 A의 변화

또한 아래의 Arrhenius 방정식을 이용함.

$$K = Ae^{-Ea/RT} \text{ (자연로그값(Ln값)으로 전환)} \rightarrow \ln K = -(Ea/R)(1/T) + \ln A$$

A : 아레니우스 상수
Ea : 활성화에너지(cal/mol)
R : 기체상수(1.986 cal/mol)
T : 절대온도(= °C+273)
K : 반응속도상수

6. 위의 공식을 통해 b Value의 반응속도(K)를 산출하여, 온도에 따른 활성화에너지(Ea)를 산출하며, 이 후 실험하지 않은 구간의 반응속도를 산출함.

- 유통기한 산출 근거로서 1년간의 온도별 일수를 계산하여 실온 유통 시 온도별 유통일수를 유통기한 산출근거로 사용하며, 이를 통해 유통기한을 설정함.

- 평균기온 10°C 이하 : 1월, 2월 3월, 11월, 12월(5개월:152일)
 - 평균기온 16~18°C : 4월 13°C, 5월과 10월(2개월:61일)
 - 평균기온 21°C : 6월과 9월(2개월:61일)
 - 평균기온 25~26°C : 7월과 8월은 (2개월:61일)
- 실온유통시 1년간 온도별 유통일수는 10°C(152일), 15°C(30일), 20°C(61일), 25°C(61일), 30°C 61(일), 이를 유통기간 산출의 근거로 사용함.

가. 혼합비지청국장 물성 연구결과

(1) 비지청국장의 숙성과정 중 미생물상의 변화는 Fig.39. - Fig.43.과 같다. 효모는 당류로부터 알코올을 생산하여 숙성과정에서 유기산과 ester화되어 향기성분을 생성하기도 하지만, 지나치게 높은 효모수는 이상발효를 일으켜 비지청국장의 숙성과정에서 가스를 생성하여 괴어 오르거나 용기를 파열시키는 원인이 되기도 한다. 대조군 비지청국장의 효모수는 숙성 2주경에 현저히 증가하여 6-8주에는 10⁶ CFU/g 이상을 유지하였으나, 혼합물첨가구의 효모수는 10⁵ CFU/g로 보다 적은 수준을 유지하였다. 시험구간에는 혼합비지청국장의 함량에 따라 조금씩 차이가 있었으며, 첨가량이 증가할수록 효모수는 감소하는 경향을 보여 주었다.

(2) 호기성 세균은 담금 초기에 비하여 숙성 중에 1-2 log cycle 증가하여 2-4주에 10⁸⁻⁹ CFU/g이나 그 이후에 조금 감소하는 경향이였다. 통성혐기성 세균수는 숙성 4주에 10⁶⁻⁷ CFU/g

수준까지 증가하여 호기성 세균에 비하여 1 log cycle 정도 적었다. 또한 비지청국장의 세균수는 효모수에 비하여 시험구간의 차이는 적었고, 혼합물추출물 첨가 비지청국장에서 숙성 후기에 감소하는 경향이었으며, 비지청국장 제조시 혼합의 첨가는 세균보다 효모의 생육을 조금 억제하는 것을 알 수 있었다.

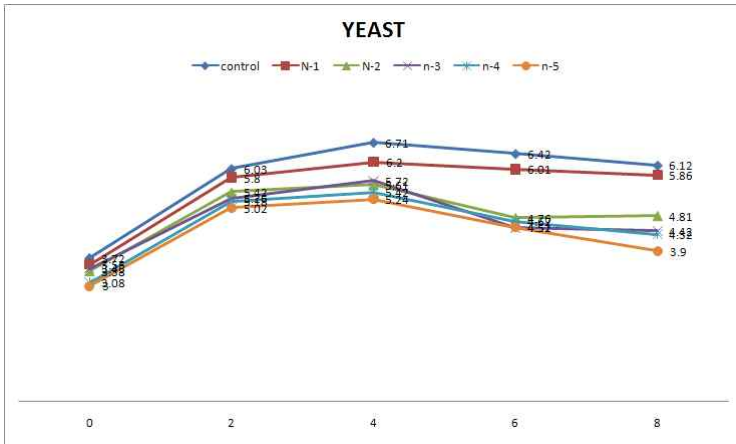


Fig. 39. 기간별 Yeast 함량 변화

N-1 : 혼합비지청국장 0.5%, N-2 : 혼합비지청국장 0.8%, N-3 : 혼합비지청국장 1.0% N-4 : 혼합비지청국장 1.3%, N-5 : 혼합비지청국장 1.5%

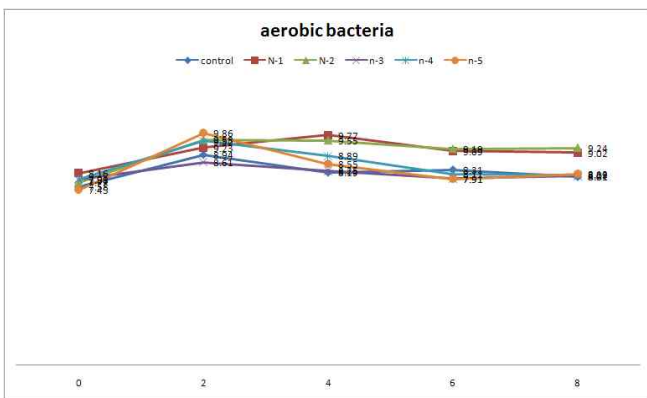


Fig. 40. 기간별 호기성세균 함량 변화

N-1 : 혼합비지청국장 0.5%, N-2 : 혼합비지청국장 0.8%, N-3 : 혼합비지청국장 1.0% N-4 : 혼합비지청국장 1.3%, N-5 : 혼합비지청국장 1.5%

(3) 또한 혼합비지청국장은 대조군에 비하여 세균수는 조금 많았으며, 숙성이 중기 이후에는 Bacillus sp. 등 세균이 생성하는 효소의 영향을 받는 것으로 추정할 때 바람직하다고 판단되었다.

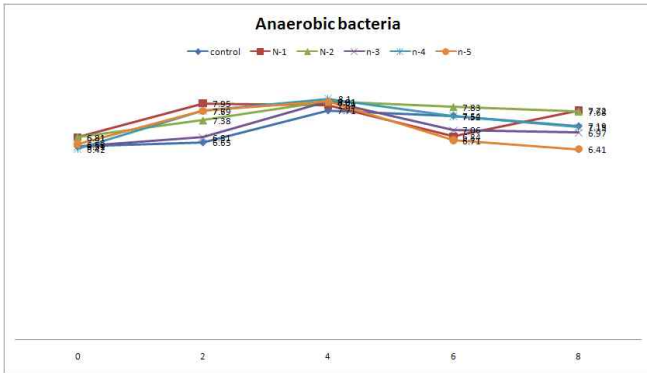


Fig. 41. 기간별 혐기성세균 함량 변화

N-1 : 혼합비지청국장 0.5%, N-2 : 혼합비지청국장 0.8%, N-3 : 혼합비지청국장 1.0% N-4 : 혼합비지청국장 1.3%, N-5 : 혼합비지청국장 1.5%

나. 혼합비지청국장의 산화환원전위와 수분활성도

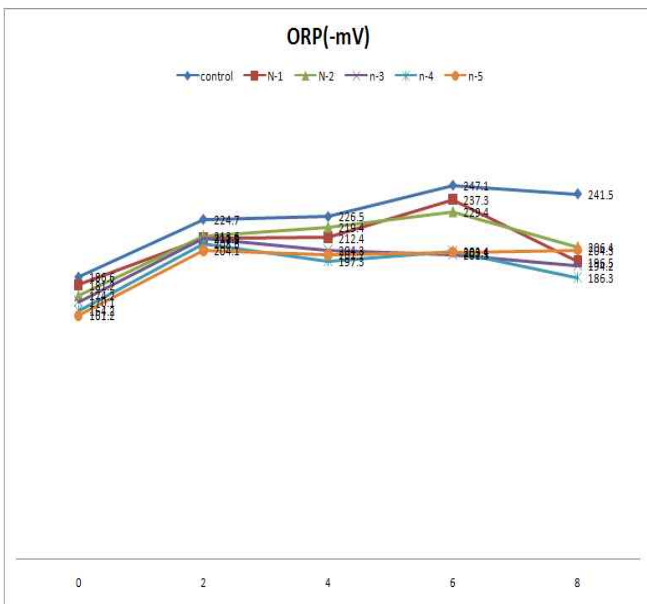


Fig. 42. 발효기간별 산화환원전위의 변화

N-1 : 혼합비지청국장 0.5%, N-2 : 혼합비지청국장 0.8%, N-3 : 혼합비지청국장 1.0% N-4 : 혼합비지청국장 1.3%, N-5 : 혼합비지청국장 1.5%

(1) 혼합비지청국장의 산화환원전위(ORP)는 Fig.46.와 같이 숙성 중에 저하하여 4-6주까지 감소하다가 그 이후에 증가하는 경향이었으며 혼합물추출물을 첨가량이 높은 실험군 비지청국장에서 숙성 2-4주에 급격히 저하 되었다. 8주 숙성 후에는 대조군에 비해 혼합비지청국장이 유의적으로 조금 낮았다. 일반적으로 산화환원전위가 -200 mV 이하로 낮아지면 혐기성 세균의 증식에 유리한 환경이 되어 호기성 세균의 증식은 억제 된다고 보고되어 있다. 혼합비지청국장의 경우, 일반 비지청국장에 비해 호기성 세균의 증식에 불리하다고 볼 수 있으나, 그 유

의차가 큰 수준은 아니었다.

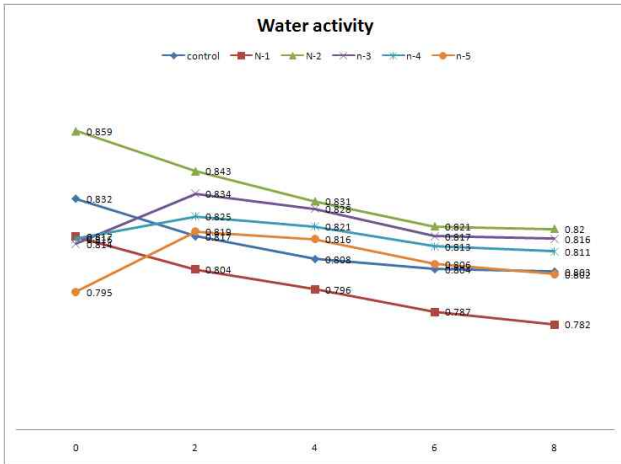


Fig. 43. 발효기간별 수분함량의 변화

N-1 : 혼합비지청국장 0.5%, N-2 : 혼합비지청국장 0.8%, N-3 : 혼합비지청국장 1.0% N-4 : 혼합비지청국장 1.3%, N-5 : 혼합비지청국장 1.5%

수분활성도(Aw)는 숙성 중에 수분함량이 증가함에도 불구하고 원료 성분들이 분해되어 저분자화 됨에 따라 용질의 몰분율이 증가하기 때문에 서서히 저하되었고, 6주 이후에도 혼합비지청국장에서 저하가 심하였다. 특히 가장 함량이 낮은 N-1의 비지청국장에서 수분활성도가 낮아짐을 볼 수 있었으나, 전체적인 타 샘플과 비교시 그 유의차가 크다고는 볼 수 없었다. 비지청국장의 수분활성도는 수분함량 이외에도 소금농도의 영향을 받는 것으로 보여지며, 미생물의 증식정도와 수분활성도와의 상관성은 적었다.

다. 혼합비지청국장의 pH, 적정산도 및 산가

(1) 비지청국장 숙성 중 미생물에 의한 발효산물과 밀접한 관계가 있는 pH와 적정산도의 변화는 Table 5과 같다. pH는 숙성이 진행되면서 저하되었으며, 시험구간에는 대조구에 비하여 혼합비지청국장이 4주 숙성 후 각각 pH 5.47~5.34로 저하되었다. 적정산도는 pH가 저하됨에 따라 증가하였으나 대조구보다는 혼합의 함량이 높은 비지청국장일수록, 숙성 중 증가가 조금 더 발생하였다. 산도는 4주 숙성 후에는 32.9 mL/10 g ~ 33.2 mL/10 g으로 나타났으며, 대조군과 큰 차이가 발생하지는 않았다. 혼합의 첨가는 총세균수 보다는 유기산 생성균의 생육을 촉진하는 것이 아닌가 생각되었다.

(2) 비지청국장의 숙성과정에서 지방이 분해되어 생성되는 유리지방산 함량을 측정한 산가는 숙성 1주에 최고에 달했고 그 이후에는 감소하였다. 시험구간에는 혼합추출물 첨가구가 대조구의 비지청국장보다 조금 높았으나 유의적인 차이는 발생하지 않았다. 혼합 첨가량이 높을수록 산가는 조금 낮았다. 산가가 높을수록 불량한 냄새가 많이 발생하는 것을 미루어 볼 때, 혼합첨가가 비지청국장의 이미나 이취를 줄일 수 있을 것으로 기대 되었다.

Table 5. 저장기간별 산가, pH, 산도

N-1 : 혼합비지청국장 0.5%, N-2 : 혼합비지청국장 0.8%, N-3 : 혼합비지청국장 1.0% N-4 :

Fermentation time(weeks)	비지청국장						
	대조구	N-1	N-2	N-3	N-4	N-5	
pH	0	5.84	5.86	5.82	5.81	5.84	5.82
	1	5.64	5.72	5.63	5.62	5.67	5.62
	2	5.60	5.67	5.58	5.54	5.56	5.57
	3	5.49	5.52	5.43	5.42	5.41	5.37
	4	5.42	5.47	5.41	5.41	5.43	5.46
산도 (0.1N NaOH mL/10g)	0	16.4	16.5	16.7	16.7	16.8	16.5
	1	28.5	28.9	28.8	28.8	28.9	27.6
	2	32.7	32.8	33.0	33.1	33.2	33.4
	3	33.6	33.7	33.9	33.9	34.1	34.7
	4	32.4	32.9	32.7	32.8	33.2	33.2
산가 (mg/g)	0	31.3	31.2	32.6	31.7	31.9	32.6
	1	33.8	34.2	33.5	32.9	33.2	34.1
	2	26.2	27.3	28.1	28.6	27.6	27.8
	3	27.1	26.8	25.9	24.9	23.8	23.8
	4	27.8	27.4	26.4	25.4	24.3	24.1

혼합비지청국장 1.3%, N-5 : 혼합비지청국장 1.5%

라. 혼합비지청국장의 환원당과 알코올

(1) 비지청국장의 단맛 성분으로 중요한 환원당은 Table 6과 같이 숙성 2주까지 증가하나 그 이후에는 감소되었다. 비지청국장 숙성 중의 총당과 환원당의 감소는 전분분해효소의 활성보다는 미생물수와 적정산도가 높았던 비지청국장일수록 심하고 알려져 있으며, 이외에도 알코올의 생성 등 복합적인 요인에 의해 좌우된다고 볼 수 있다.

(2) 비지청국장의 알코올 함량은 숙성 중에 서서히 증가하였다. 숙성 과정에서 알코올의 생성은 대조구와 실험구 모두 큰 차이가 보이지는 않았다. 비지청국장 제조시 혼합물추출물의 첨가가 알코올 발효를 억제한다고는 볼 수 없을 것 같다.

Table 6. 저장기간별 환원당과 알콜

Fermentation time(weeks)	비지청국장						
	대조구	N-1	N-2	N-3	N-4	N-5	
환원당	0	8.54	8.26	8.34	8.21	8.26	8.31
	1	11.72	11.39	11.49	11.53	11.67	11.76
	2	14.32	14.67	14.73	14.92	14.91	14.94
	3	9.67	9.72	9.83	9.86	9.94	9.83

	4	7.34	7.52	7.42	7.38	7.46	7.37
알콜 (Ethanol)	0	0.08	0.07	0.08	0.09	0.08	0.07
	1	0.12	0.14	0.15	0.14	0.16	0.17
	2	0.28	0.31	0.34	0.36	0.35	0.32
	3	0.73	0.72	0.76	0.78	0.75	0.79
	4	1.16	1.21	1.16	1.17	1.24	1.19

N-1 : 혼합비지청국장 0.5%, N-2 : 혼합비지청국장 0.8%, N-3 : 혼합비지청국장 1.0% N-4 : 혼합비지청국장 1.3%, N-5 : 혼합비지청국장 1.5%

마. 혼합비지청국장의 질소성분

(1) 비지청국장은 숙성 중에 단백질이 유리아미노산 형태로 분해되어 구수한 맛을 내나 지나치게 분해되면 암모니아성 질소의 증가로 바람직하지 않은 풍미가 된다. 아미노산성 질소는 Table 7과 같이 숙성 중에 증가하였다. 전체적으로 아미노산성 질소가 조금씩 증가한 것은 protease 활성이 낮아서 그런 것으로 보여진다.

(2) 비지청국장의 바람직하지 않은 풍미와 연관될 수 있는 암모니아성 질소는 2-3주에 최고에 달했으며 그 이후에 감소하였다. 혼합물의 첨가가 효모와 세균의 생육을 조절한다고 보기에 는 무리가 있어 보인다. 이는 혼합추출물이 항균성을 띄지는 않는 것으로 생각되어진다.

Table 7. 저장기간별 아미노산성 질소와 암모니아성 질소의 변화

	Fermentation time(weeks)	비지청국장					
		대조구	N-1	N-2	N-3	N-4	N-5
아미노산 성질소	0	0.21	0.22	0.21	0.24	0.23	0.22
	1	0.36	0.34	0.38	0.37	0.36	0.35
	2	0.45	0.37	0.42	0.41	0.41	0.43
	3	0.51	0.43	0.46	0.43	0.46	0.46
	4	0.54	0.49	0.52	0.48	0.49	0.52
암모니아 성질소	0	1.42	1.46	1.45	1.42	1.49	1.43
	1	1.86	1.89	1.92	1.87	1.93	1.94
	2	2.59	2.61	2.64	2.53	2.48	2.65
	3	2.78	2.42	2.51	2.42	2.16	2.34
	4	1.94	1.52	1.46	1.42	1.48	1.53

바. 혼합비지청국장 분말의 입도분석 (체분석)

혼합비지청국장분말 100 g의 입도에 대하여 체분석을 하는데 굵은 체로부터 가는 체를 위로부터 포개어 놓고 혼합비지청국장분말을 넣어 흔든 다음, 각 체를 통과한 혼합비지청국장분말의 무게를 계산하여 혼합비지청국장분말 전체의 무게로 나눈다. 이렇게 결정된 비율은 어느 체에 남아 있는 혼합비지청국장분말의 입정보다 더 가는 입경의 흙 전체에 대한 중량백분율이 된다.

1) 사용할 체를 결정하고 (38.1mm 25.4mm 19.1mm 9.52mm No.4 No.10 No.20 No.40 No.60 No.100 No.200), 각 체의 무게를 측정한다.

- 2) 공기 중에서 충분히 말린 혼합비지청국장분말을 손으로 잘 부순 다음 골고루 섞어 적절한 양의 시료를 취한다.
- 3) 체눈의 크기 순서로 체를 포갠 다음 No.200체 밑에는 팬을 놓는다.
- 4) 최상단에 있는 체 속으로 시료를 흘리지 않게 붓고 뚜껑을 씌운 다음 진동기를 사용하여 10분 이상 흔든다.
- 5) 각 체를 분리하여 체에 남은 흙의 무게를 측정한다. 이 무게의 합계와 처음에 투입한 흙의 전체무게 사이에 차이가 2 %이상 있을 때에는 시험을 다시 실시해야 한다.
- 6) No.200체에 혼합비지청국장분말이 많이 잔류되어 있다면 그 체에 물을 부어 작은 입자들이 씻겨져 나가도록 해야 한다. 이 때에는 체 밑에 큰 그릇을 받쳐두고 혼합비지청국장분말 용액을 받아서 건조로에서 말려 그 혼합비지청국장분말의 무게를 측정한다.

Table 8. 혼합비지청국장분말의 체 입도 분석결과

체번호	체분석				비고
	체눈크기(mm)	잔유량(g)	통과율(%)	잔유율(%)	
	38.1	0	100	0	
	25.4	0	100	0	
	19.1	0	100	0	
	9.52	0	100	0	
4	4.76	0	100	0	
10	2.00	0	100	0	
20	0.84	0	100	0	
40	0.42	1.9	90.1	1.9	
60	0.25	7.8	92.2	7.8	
100	0.149	89.7	10.3	89.7	
200	0.074	99.2	0.8	99.2	

(1) 혼합비지청국장 최적 배합비 연구결과

홀랜다이즈 소스를 응용하여, 비지청국장분말과 뚝배기추출물을 함유한 드레싱 소스를 개발하였다. 홀랜다이즈 소스는 마요네즈처럼 기름과 난황을 주원료로 하고, 부원료를 식초, 소금, 그 외의 향신료를 사용하여 만든 에멀전 형태의 소스이나, 이번 신제품은 좀 더 가볍게 즐길 수 있는 드레싱소스를 개발하기 위하여, 버터를 사용하지 않고 식물성유지를 사용하여 무게감이 훨씬 가벼운 드레싱 소스타입으로 개발하였다.

난황의 레시틴성분을 활용하여, 친수기와 친유기를 적절히 활용한 유화를 진행하였고, 유화안정제로는 pH 안정성이 높은 잔탄검과 구아검을 활용하였으며, 드레싱소스의 특성을 좀 더 강조하고 제품의 차별성을 두기 위하여, 와사비를 사용하였다.

7. 재료 및 방법

가. 재료

본 실험에 사용한 주재료는 비지청국장분말((주)온바이오텍), 뚝배기추출물(MSC), 구아검(DSM), 잔탄검(DSM), 식물성유지(서강유업), 설탕(CJ), 생와사비(대상), 소비톨액, 발효식초(발효촌), 정제소금(한주소금), 변성전분(삼양제넥스), 향미유(시아스), 난황백(DH푸드)을 사용하였으며, 제조방법은 Fig.44과 같은 방법으로 제조하였으며, 기본 배합비는 Table 9에 나타

내었다.

나. 최적배합비확립

(1) 반응표면설계

요인은 가장 중요 성분인 비지청국장분말, 뽕은감복합추출물, 생와사비의 3가지요인으로 중심합성계획을 설계하였으며, 설정반복수는 1회 기본 런 20회를 기준으로, 실험을 설계하였다.

중심 합성 설계

요인:	3	설점 반복 수:	1
기본 런:	20	전체 런 수:	20
기저값 블록:	1	전체 블록 수:	1

2-수준 요인 설계: 완전 요인 설계

입방체 점:	8
입방체의 중심점:	6
축 점:	6
축의 중심점:	0

알파: 1.68179

총 20회의 실험을 진행하였으며, 기초 실험을 통해 비지청국장분말은 0.8%~1.5%, 뽕은감복합추출물은 0.7%~1.3%, 생와사비는 2%~3%의 구간을 설정하였다. 이를 통해 생성된 각 블록별 배합비는 아래의 Table 10와 같다. 이를 토대로 20회에 걸쳐 관능검사를 실시하였으며, 관능검사의 항목은 맛, 색, 풍미, 종합적기호도의 4가지 항목으로 실시하였으며, 값은 1점이 아주나쁨, 3점이 나쁨, 4점이 보통, 5점이 약간 좋음, 6점이 좋음, 7점이 아주 좋음으로 7점도값으로 표현하였다.

반응의 최적화 도구는 최대값을 목표로 하였으며, 하한의 값은 3, 상한의 값은 7이며, 가중치는 맛이 2, 향과 풍미가 1, 종합적기호도가 3이며, 중요도는 맛이 2, 향과 풍미가 1, 종합적기호도가 3으로 설정하였다. 최적화 도구의 값은 Fig. 45에 나타내었다.

(2) 통계

통계는 MINI TAB 프로그램을 사용하여 처리하였다.

(3) 관능검사

관능검사는 (주)온바이오텍과 대구한의대학교 한의예과 대학원의 연구원과 대학원생 26명을 대상으로 실시하였으며, 그 값은 평균의 값으로 나타내었다.

각 관능검사는 시료의 온도를 동일한 온도에서 실시하였으며, 시료와 시료 사이에 음용수를 두어 입을 행군 후 진행하도록 하였으며, 오차범위를 줄이기 위해 중간 중간 무작위로 동일 배합비의 시료를 두어, 그 값의 차이가 있는지를 확인하였다. 시료는 연속된 숫자나 문자를 사용하지 않고, 연속되지 않는 불특정의 숫자와 기호를 넣어 표시하였다.

관능검사의 값은 Table 11에 나타내었다.

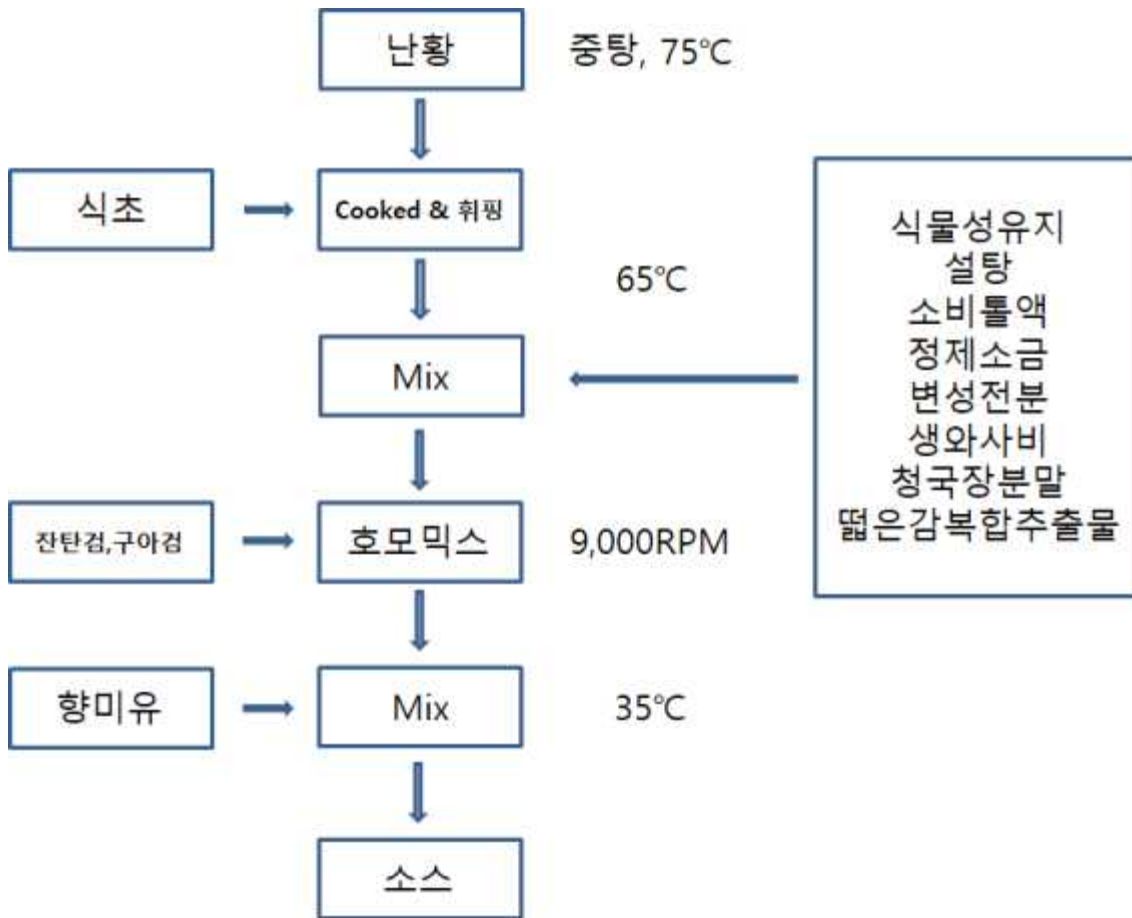


Fig. 44. 제조공정도

Table 9. 비지청국장드레싱 소스 기본배합비

재료명	함량(%)
난황	19.4
식물성유지	43.2
설탕	11.3
소비톨액	2.41
정제소금	2.81
변성전분	6.92
생와사비	2.0~3.0
비지청국장분말	0.8~1.5
뽕은감복합추출물	0.7~1.3
식초	4.92
잔탄검	1.42
구아검	0.75
향미유	1.93
합계	100

Table 10. 비지청국장드레싱 소스의 중심합성계획에 의한 배합비

+	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
	StdOrder	RunOrder	PtType	블록	청국장분말	뽕은감복합추출물	생와사비
1	11	1	-1	1	1.15000	0.49546	2.50000
2	16	2	0	1	1.15000	1.00000	2.50000
3	20	3	0	1	1.15000	1.00000	2.50000
4	7	4	1	1	0.80000	1.30000	3.00000
5	14	5	-1	1	1.15000	1.00000	3.34090
6	10	6	-1	1	1.73863	1.00000	2.50000
7	5	7	1	1	0.80000	0.70000	3.00000
8	6	8	1	1	1.50000	0.70000	3.00000
9	17	9	0	1	1.15000	1.00000	2.50000
10	1	10	1	1	0.80000	0.70000	2.00000
11	13	11	-1	1	1.15000	1.00000	1.65910
12	8	12	1	1	1.50000	1.30000	3.00000
13	3	13	1	1	0.80000	1.30000	2.00000
14	15	14	0	1	1.15000	1.00000	2.50000
15	12	15	-1	1	1.15000	1.50454	2.50000
16	19	16	0	1	1.15000	1.00000	2.50000
17	9	17	-1	1	0.56137	1.00000	2.50000
18	2	18	1	1	1.50000	0.70000	2.00000
19	18	19	0	1	1.15000	1.00000	2.50000
20	4	20	1	1	1.50000	1.30000	2.00000

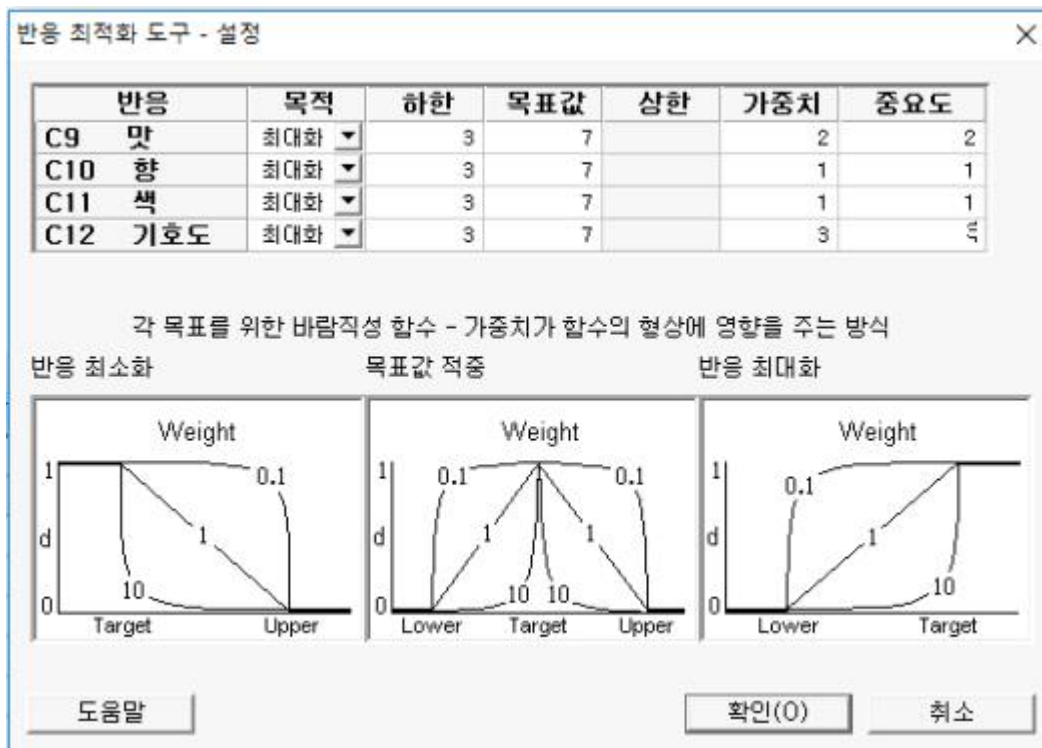


Fig. 45. 반응최적화 도구

Table 11. 비지청국장드레싱 소스의 관능검사 결과

RunOrder	청국장분말	엷은감복합추출물	생와사비	맛	향	색	기호도
1	1.15000	0.49646	2.50000	4	7	4	4
2	1.15000	1.00000	2.50000	5	7	5	6
3	1.15000	1.00000	2.50000	5	7	6	6
4	0.80000	1.30000	3.00000	4	4	4	4
5	1.15000	1.00000	3.34090	6	4	5	5
6	1.73863	1.00000	2.50000	5	5	5	4
7	0.80000	0.70000	3.00000	5	5	5	4
8	1.50000	0.70000	3.00000	6	4	4	5
9	1.15000	1.00000	2.50000	5	7	6	6
10	0.80000	0.70000	2.00000	4	5	7	3
11	1.15000	1.00000	1.65910	4	4	4	4
12	1.50000	1.30000	3.00000	7	4	4	7
13	0.80000	1.30000	2.00000	5	5	7	4
14	1.15000	1.00000	2.50000	6	7	5	6
15	1.15000	1.50454	2.50000	6	7	4	5
16	1.15000	1.00000	2.50000	5	7	5	6
17	0.56137	1.00000	2.50000	5	4	4	4
18	1.50000	0.70000	2.00000	6	4	7	5
19	1.15000	1.00000	2.50000	5	7	5	6
20	1.50000	1.30000	2.00000	4	5	7	5

8. 결과

가. 회귀분석 결과

각 항목별 회귀분석의 결과 값은 Fig.46.에 나타내었다.

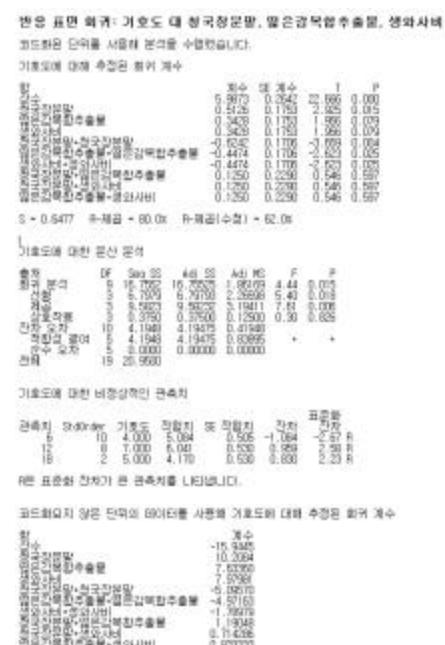
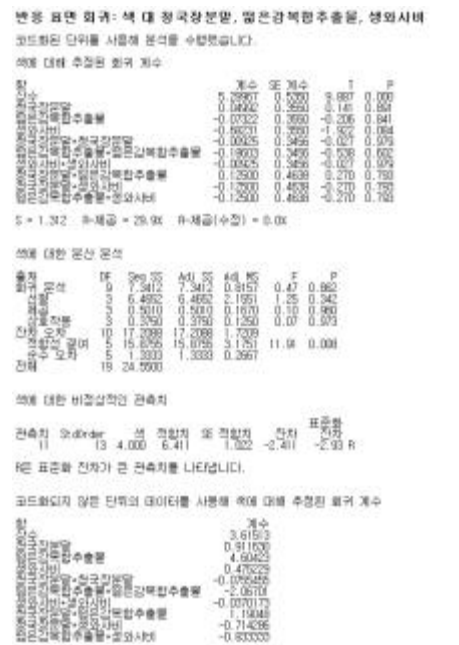


Fig. 46. 각 항목별 회귀분석의 결과

(1) 각 항목별 등고선 플롯과 표면플롯

각 항목별 등고선 플롯과 표면플롯은 Fig.47.에 나타내었다.

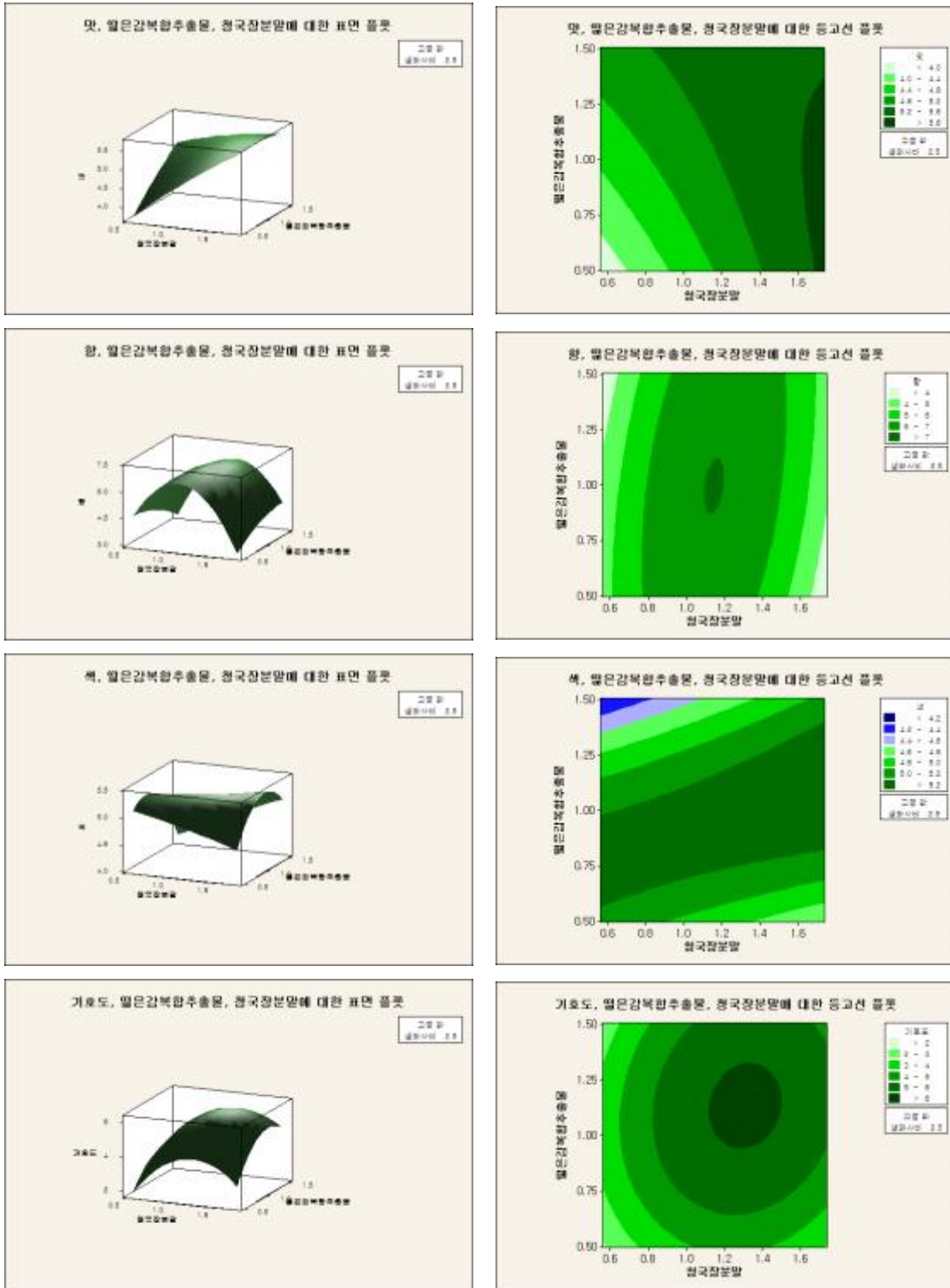


Fig. 47. 각 항목별 등고선플롯과 표면플롯의 결과

(2) 각 항목별 겹쳐진 등고선 플롯

각 항목별 겹쳐진 등고선 플롯은 Fig.48.에 나타내었다.

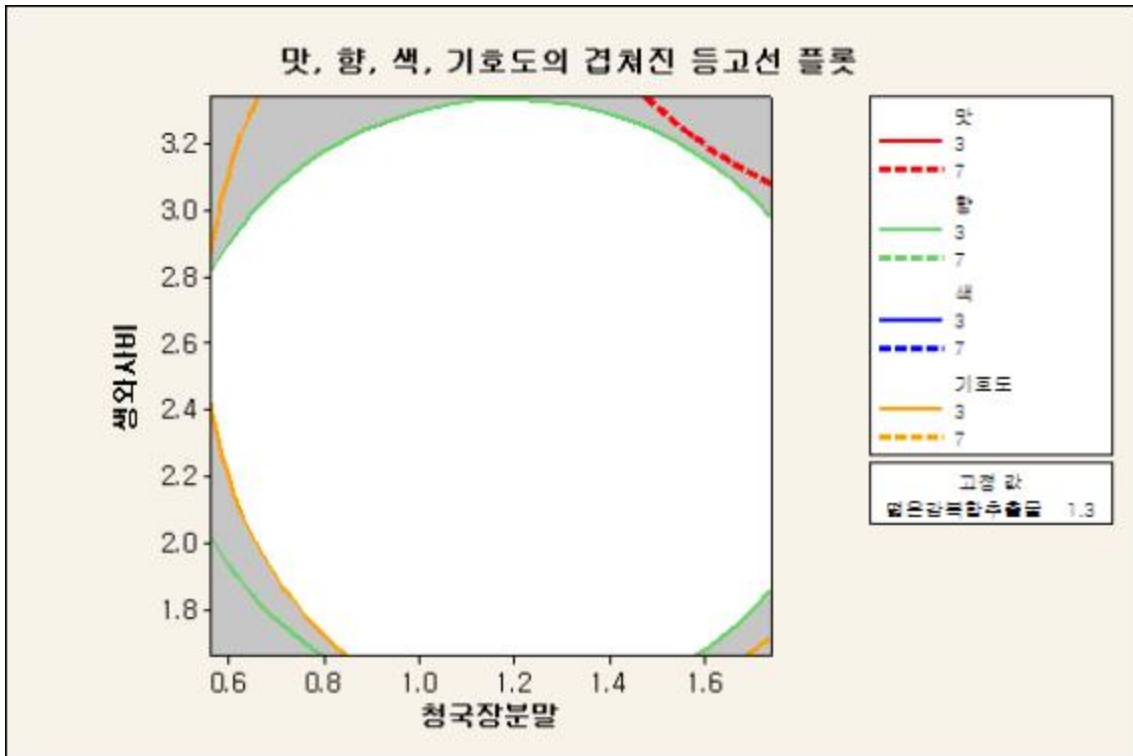


Fig. 48. 각 항목별 겹쳐진 등고선 플롯의 결과 - 고정값 뚫은감복합추출물 1.3%

(3) 최종 최적배합비의 값

반응표면분석을 통한 최적배합비는 Fig.6.에 나타내었다.

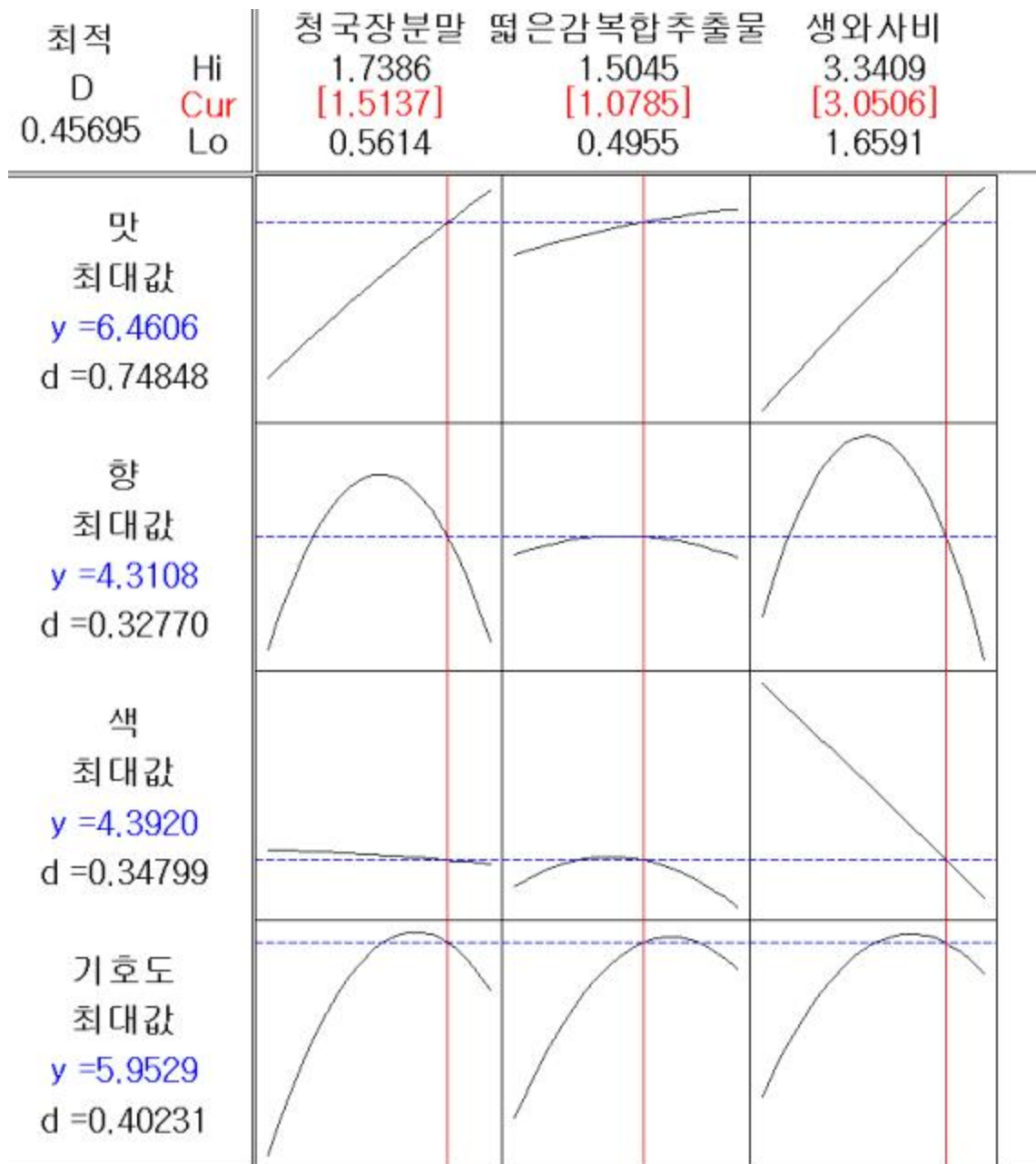


Fig. 49. 반응표면분석을 통한 최적배합비

4. 최종배합비

- 최종 최적배합비

재료명	합량(%)
난황	18.71
식물성유지	43.20
설탕	11.30
소비톨액	2.41
정제소금	2.81
변성전분	6.92
생와사비	3.05
비지청국장분말	1.51
뽕은감복합추출물	1.07
식초	4.92
잔탄검	1.42
구아검	0.75
향미유	1.93
합계	100

5. 제품 사진



Fig. 50. 최적배합 비지청국장 소스 원형



Fig. 51. 혼합비지청국장 시제품

6. 샐러드와의 배합비 연구

비지청국장과 샐러드 혼합에 대한 기호도 평가는 사업 종료 후 진행하고자 함. 소비자기호도 평가를 위한 임상 IRB 계획서를 작성한 후 진행할 예정임.

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

		코드번호	B-05-01
구분	내용		
최종목표	○ 비지청국장을 응용한 기능성 약선(藥膳)소스 개발		
세부목표	<ul style="list-style-type: none"> 비지청국장 기술이전완료 - 비지청국장 제조 가능 대사증후군 질환 감소 한방소재 스크리닝 약선소재의 기능성 검증 <ul style="list-style-type: none"> - <i>In vitro</i> 항산화활성, 항비만 및 항당뇨 소재 평가 소재 배합비율 선정: 관능평가 기호도 및 관능성 검사로, 기호도를 최적화한 약선 소스 제품 출시 		

3-2. 목표 달성여부

성과목표	연구기반지표																		
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건 수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비SCI						
단위	1건	건	건	건	백만원	1건	백만원	백만원	1명	백만원	건	건	1건	1건	명	건	건		
가중치	20					60			10				10						
최종목표																			
1차년도 성과	1					1			1				1						
달성도	20					60			10				10						

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

4. 연구결과의 활용 계획 등

4-1. 연구개발 결과의 활용방안

	코드번호	B-07-01
<ul style="list-style-type: none"> • 기존 청국장과는 차별화된 맛과 검증된 효능으로 소비자들이 쉽게 접근하고 간편하게 섭취 가능한 제품으로 인지도를 상승시키고 고기능, 고부가가치 제품의 소비로 이어지도록 마케팅 활동 진행 • 기존의 오프라인 영업망 (로컬푸드마켓, 하나로마트, 생협, 휴게소 지역상품판매점, 마트등) 및 온라인 영업망 (자사 홈페이지 및 쇼핑몰, 오픈마켓, 소셜커머스등), 지역 시장을 이용한 홍보 및 판매 촉진 • 푸드테라피(약선)를 활용한 차별화된 레시피를 소비자에게 제공하여 소비자 확보 • 국내외 전시회 및 박람회를 통한 제품 홍보 • 라디오 및 신문광고를 이용한 제품 홍보 • 약선과 사상체질에 관련된 교육진행 및 1:1 식단 지도등 교육 프로그램을 활용한 홍보 		

4-2. 기대성과 및 파급효과

	코드번호	B-07-02
<p>○ 기술적 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> ◆ 산학등과 긴밀한 과제진행으로 기능성 및 개발방향의 차별성 부여를 통한 약선식품 연구의 다양화 및 전문화 ◆ 목표상 최종 생산제품은 기존 청국장 제품의 효능을 상향조절한 것으로 식이성 비만· 당뇨등 대사증후군 개선용 식품으로서 관련 질환의 전환률 감소 ◆ 기능성 및 관능성 개선 연구의 인프라 구축을 통한 응용BT 식품산업의 활성화 및 경쟁력 확보 ◆ 효능 검증된 소재를 사용한 제품에 과학적, 체계화된 실증근거 확보로 인한 소비자의 약선제품에 대한 신뢰도 증가 ◆ 부산물을 응용한 약선식품으로의 기술개발로 소재비 절감으로 인한 기업 및 소비자의 비용 부담 절하 ◆ 국내 천연식품소재의 기능성 증대와 공정개선에 대한 원천기술 확립으로 맞춤형 약선건강식품으로써의 글로벌 경쟁력 강화 <p>○ 경제적·산업적 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> ◆ 소스류 시장의 대부분이 수입산 소스류에 의존하므로 국내시장 진출로 내수시장 보호 및 한국산 약선식품(herb-nutraceuticals) 개념으로써의 수출로 외화 누출방지 및 획득기반 마련 ◆ 한식 및 약선의 인식은 전세계적으로 보급되었으나, 조리과정이 복잡하고 표준화 체계가 없어 이용률이 떨어지므로 소스개발을 통한 편이성 제공으로 우리나라 뿐만 아니라 세계화 상품에 유리한 고지 점령이 가능하여 상당한 경쟁력과 시장보급 확대 기대 ◆ 약선식품 개발 기술력의 축적과 그 기능성의 특허, 제조 특허를 통한 산업재산권 확보 가능 ◆ 기업 직영재배를 통한 소재비 절감과 국내산 천연소재의 활용으로 내수경제 활성화에 이바지 하여 국내 농산물 생산기반 구축 및 활용성 제고가 가능 		

- ◆ 타 산업대비 고용창출효과가 높은 식품산업의 특성상 고용창출 효과
- ◆ 낫또의 제형과 효능을 개선한 신펜페리다임 소스류로 일본 낫또시장진출에 유리한입지선정

○ 2020년 신규고용 5명을 포함 상시 고용 총 7명 예상됨.

구 분	(2018)년 (기술개발 해당년)	(2019)년 (개발종료 후 1년)	(2020)년 (개발종료 후 2년)	(2020)년 (개발종료 후 3년)
신규고용(명)	-	생산직(1), 영업직(2)	생산직(2), 영업직(3)	연구직(2), 생산직(2), 영업직(2)
상시고용(명)	1	3	5	6

4-3. 판매 및 활용계획

- 맛의 시각화를 통한 온라인매출 증대 전략 (농식품 E-business 형태 마케팅)
- 추후 제품의 드레싱 소스 개발하여 편의성 / 활용도 확대
- 빠른 매출 연계의 필요성으로 기존 지역 로컬푸드 직매장 중심으로 백화점, 지역 장터 등을 활용할 예정.
- 시제품을 이용한 추가 응용 제품 개발 (비지를 이용한 청국장등)
- 온라인은 기존 자사 홈페이지, 스토어팜, 11번가, 일본온라인 라쿠텐 등을 활용할 예정.



[홈페이지]

[스토어팜, 11번가 등]

[일본온라인_라쿠텐]



[칠곡 로컬푸드]



[칠곡IC 직매장]



[반야울 농부마실]



[문양 로컬푸드 직매장]



[안심 로컬푸드 직매장]



[가창 농협 직매장]



[경산 두레장터]



[대구백화점]



[서울 목동 홈플러스]



[안동 홈플러스]



[성서 하나로마트]



[먼세점_인천,김포,제주도]



[양재 aT 센터]



[서울 장덕한방병원]



[한방임상영양학회]



[대구 MBC 장터]



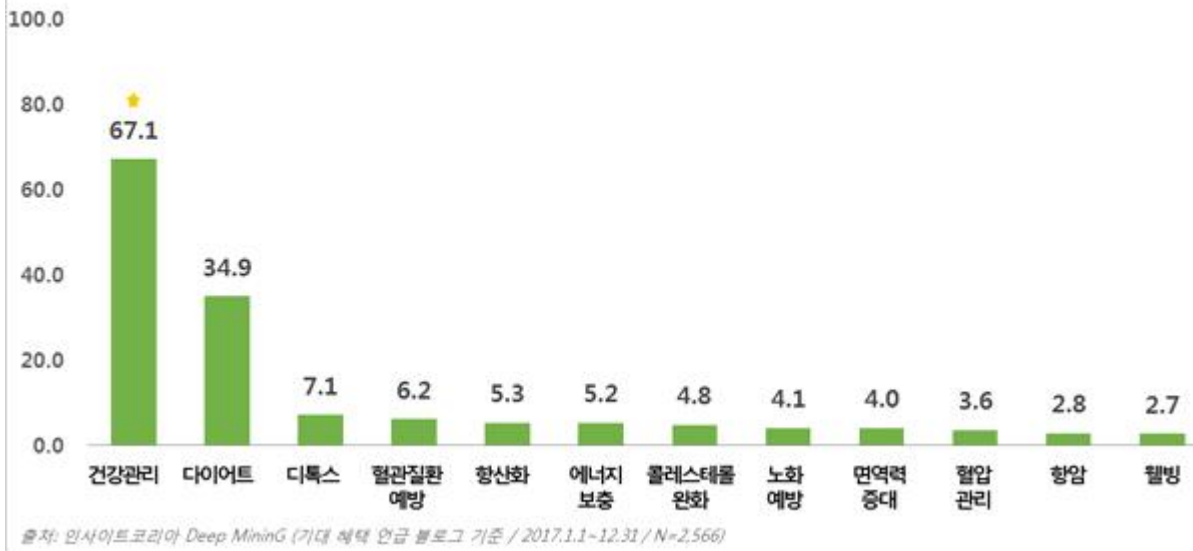
[칠곡군 행사지원]



[사회적기업 장터]

- 타사 샐러드드레싱 소스 대비 홍보마케팅 전략 수립
 - 샐러드에 대한 기대 혜택으로 건강관리에 대한 요구도가 매우 높음.
 - 경쟁제품은 일반적인 식품으로 이에 대한 요구도를 만족하지 못하고 있음.
 - 개발 제품은 건강친화형 소재를 배합한 샐러드 드레싱 소스로, 이를 강조한 마케팅 전략을 수립하여 홍보할 계획임.

샐러드에 대한 기대 혜택 : 2017년 기준



4-4. 기술개발 관련 시장 현황

1. 국내 장류시장 분석

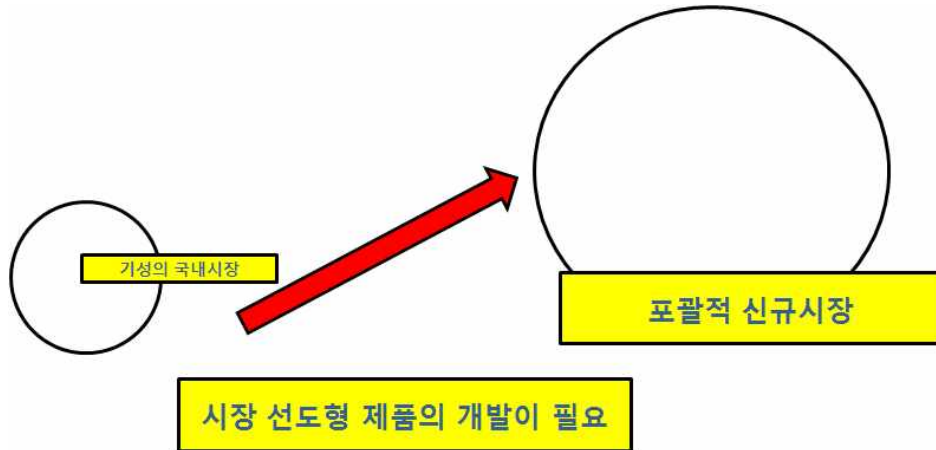
- 한국 전통음식을 대표하는 장류는 영양학적·식품학적 가치뿐만이 아니라 식문화측면에서도 다양한 연구가 진행되어 왔고, 국내는 물론 아시아를 비롯하여 세계시장에서 한국을 대표하는 음식으로 여겨지고 있다.
- 또한, 최근 장류가 각종 암과 성인병 등을 예방할 수 있다는 다양한 생리활성 효과가 밝혀지면서 슬기로운 조상의 지혜가 담긴 건강식이라고 인식되어 소비자의 선호도가 더욱 높아지고 있는 추세이다.



- 2012년 장류 시장은 출하액을 기준으로 약 9,800억원 규모로 고추장이 약 30.9%, 간장이 약

28.8%, 된장이 약 15.7% 수준이었고, 연평균 성장률은 출하액을 기준으로 3.3%로 전체 식품군 평균 성장률 9.9% 보다 낮은 수준의 성장률을 보이고 있다.

- 이와 같이 성장률이 낮은 것은 장류 시장이 성숙기에 들어섰기 때문으로 판단되며 이를 극복하기 위한 장류시장의 전환점 마련이 시급한 실정임
- 따라서 전통 장류를 특색 있게 개발하여 고유의 맛을 잃지 않으면서 시대의 흐름에 따른 요구를 맞춰준다면 지속적인 성장을 할 수 있을 것이라 기대한다.



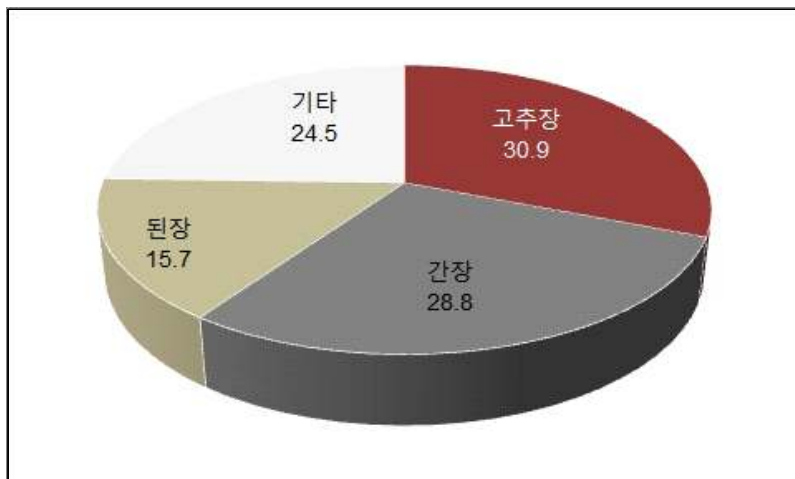
○ 각 지역별 전통 된장

맛 다르고 색 다른 팔도 된장



○ 2012년 장류시장 출하액 규모

(단위 : %)

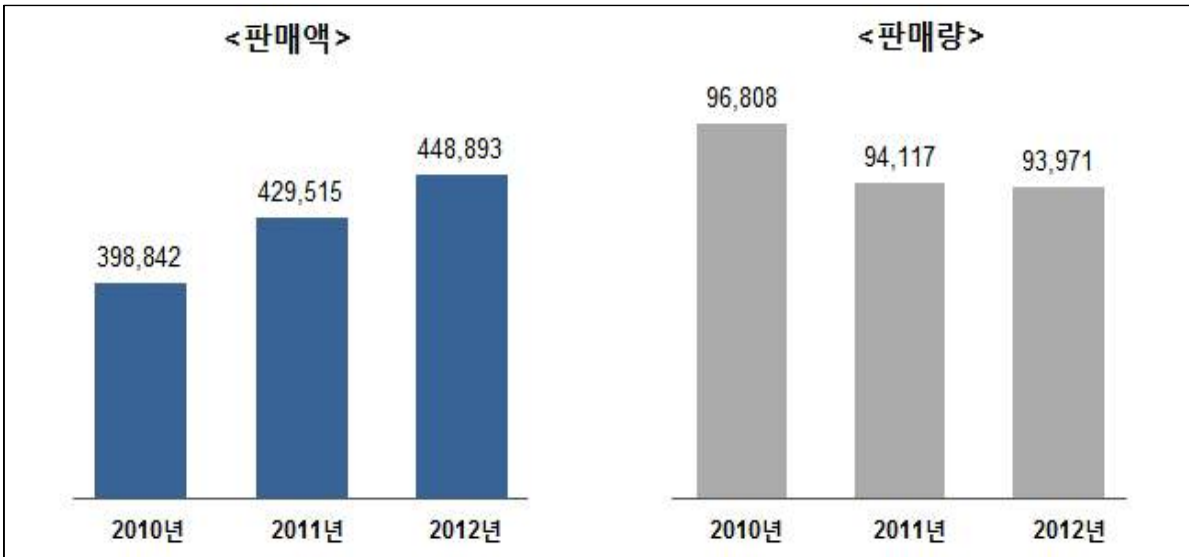


자료출처 : 식품의약처 장류 통계

- 2010년부터 2012년까지 장류의 판매총액은 약 3,988억원에서 4,489억원으로 증가하였으나, 판매량의 경우 96,808톤에서 93,971톤으로 감소하였다. 이는 장류의 가격은 오르고 소비자들의 구매량은 줄어들었음을 의미한다.
- 2012년 기준 장류의 종류별 판매액은 성장세가 둔화된 것으로 나타났으며, 특히 된장의 성장률이 급격히 하락한 것으로 나타났다

○ 장류시장 규모

(판매액 : 백만원, 판매량: 톤)



자료출처 : 식품의약처 장류 통계

○ 장류별 성장률 현황

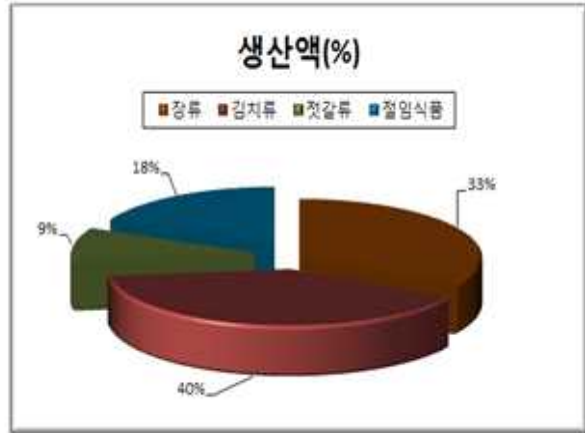
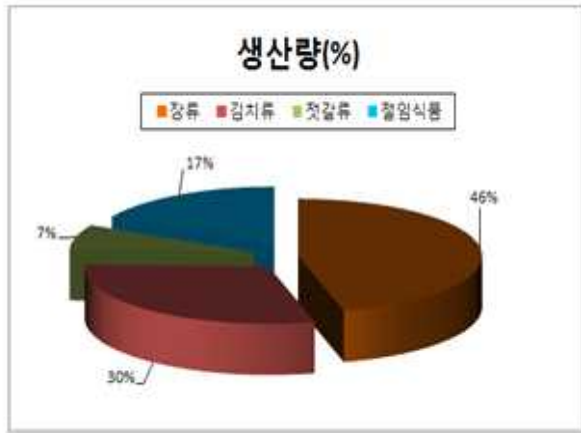
(판매액 : 백만원, 성장률 : %)

구분	판매액				
	2010년	2011년	2012년	10-11년 성장률	11-12년 성장률
간장	193,738	203,729	209,450	5.2	2.8
고추장	152,541	167,949	180,565	10.1	7.5
된장	52,563	57,837	58,879	10.0	1.8
합계	398,842	429,515	448,893	7.7	4.5

자료출처 : 식품의약처 장류 통계

- 식품의약처 장류 통계 상 전통 식품 장류의 생산량 및 생산액 현황에 따르면, 국내 생산량은 2010년을 기준 장류 46%, 김치류 30%, 절임식품 17%, 젓갈류 7%로 장류가 가장 높은 비율을 차지하고 있지만, 생산액은 김치 40%, 장류 33%로 김치에 비해 낮게 나타났다.
- 장류가 생산량에 비해 생산액이 낮은 이유는 각 제품의 가격차, 소비 형태에 의한 차이로 사료된다. 또한 대표적인 한국 음식인 김치는 우수한 기능성이 부각되면서 한류열풍 및 한국음식의 세계화로 인해 수출이 증가하고 있어, 장류 또한 기능성의 검증 및 수출에 대한 전략이 필요하다.

○ 전통식품 생산량 및 생산액



자

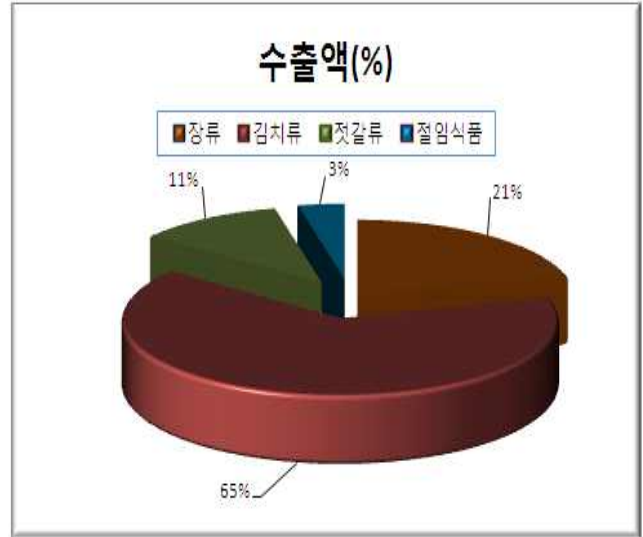
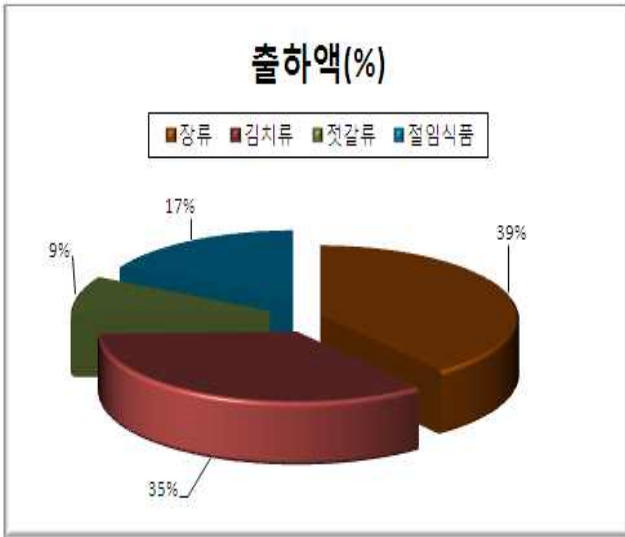
료출처 : 식품의약처 장류 통계

○ 최근 10년간 한류를 통해서 우리나라 문화가 세계에 전파됨으로 인해 외국인들의 한국 음식에 대한 관심과 수요가 증가하면서, 감소하고 있는 국내 장류시장의 성장세와 달리, 한국 전통 음식인 장류의 해외 수요가 증가하고 있는 추세로, 최근 10년 동안 고추장 3배, 간장 2.4배, 된장 1.5배로 수출시장이 확장되었다.

○ 전통 장류의 수출 현황

	2003년	2006년	2009년	2012년	03년 대비 증가율	연평균 증가율
수출량(톤)	12,424	17,795	20,501	24,765	[99.3]	[8.0]
수출액(천불)	17,603	29,479	31,907	43,502	[148.8]	[10.7]
수출대상국(개)	57	65	69	81		

○ 전통 식품 출하액 및 수출액



자료출처 : 식품의약처 장류 통계

○ 전통 장류의 기능성

- 우리나라 전통 조미식품이자 대두 발효 식품의 대표격인 된장은 대두를 주원료로 하여 발효시킨 식품이며 항암, 혈당 강하, 혈전용해능, 돌연변이 억제 등의 다양한 기능성 효과가 보고되어져 왔다. (Park 등 1990, Kim SH 1998, Lim 등 1999)
- 간장은 항암 (Sung, 1996; Wei 등, 1998; Chun 등, 2008), 항산화 (Jackman 등, 2007; Shon 등, 2007), 항균 (Morel 등, 2003; Joo 등, 2004), 항고혈압 (Suh 등, 1996; Ryu 등, 2007), 면역증진 (Jeong 등, 2002) 및 콜레스테롤 저하 (Son & Kwon, 2000) 등 여러 가지 생리 작용이 밝혀지면서 단순 조미식품이 아닌 기능성 식품으로 재조명되어져 각광받게 되었다.
- 청국장은 생리활성 혈전용해능, 혈압 및 지질대사 개선효과(Tanimoto H 등 2001), 항산화 효과(Cheigh HS 등 1993), 면역기능 강화(Lee BK 1999), 항미생물효과(Youn HK 등 2001), 노인성치매 예방 효과, 골다공증 억제 등의 성인병 예방 효과 등이 있음이 보고되어져 왔고, 청국장 제조에 이용되는 콩에는 생리활성 물질로 알려진 trypsin inhibitor, isoflavones, phytic acid, saponins, lignin, vitamin E와 불포화지방산 등의 성분이 포함되어 항 돌연변이 효과 및 항암효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. (Kim SH 등 1999)

<사업화 계획 (5개년도)>

(단위 : 억원)

구분		사업화년도				
년 (사업종료 후)		1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도
사업목표		건강지향 천연 비지청국장 신제품 출시				
사업화과제		소비자 니즈에 부합하는 검증된 소재의 장류 적용제품 개발을 통해 즉석간편식 제품의 국내 및 해외시장 확대를 위한 제품개발				
사업화 품목		1. 혼합비지청국장 액상형 소스 1개 제품 2. 혼합비지청국장 분말 1개 제품				
투자계획	인건비	0.6	1.0	1.2	2.0	2.5
	재료비 및 설비투자비	0.2(재료비) 설비투자없음	0.5(재료비) 설비투자없음	0.8(재료비) 설비투자없음	1.2(재료비) 설비투자없음	1.6(재료비) 0.5(포장기계)
	경상운영비	0.7	1.0	1.3	1.8	2.5
	계	1.5	2.5	3.3	4	6.6
생산계획(Ton)		1	1.5	2	2.4	3
※생산계획 산정내역은 Kg당 판매단가를 기준으로 작성하였으며, 원료비 상승은 제외기준						
판매계획	매출 (천만원)	5	6.4	7.8	12	18
	수출 (천만원)	-	0.5	1.2	2.5	4.3
	계 (천만원)	5	6.9	9	14.5	22.3

2. 매출목표 및 세부 추진내용

- 1) 판매품목 : 비지청국장 소스 및 분말
- 2) 판매형태 : 실온 진공 방식
- 3) 판매단가 : 공장 생산원가 : 2,950원 /200 g; 소비자 가격 : 6,000원 / 200 g

품목단가 (원)/200 g	원재료비 (감, 와사비, 글썽질)	인건비	가공비	포장용기	원가총합
단가	180	1180	1040	550	2,950

4) 해외매출(예상) : 5백만원

5) 수익성 평가

- 200 g 생산원가는 3.950원으로 파악되며, 이는 타사 제품에 비해 높은 편으로 판단됨. 생산원가가 높은 것은 OEM 생산을 기준으로 산출되었기 때문임.
- 초기 단계에서는 소량생산으로 단가가 높기는 하나, 판매를 직거래를 메인으로 하여 소비자에게 판매될 수 있도록 전략을 수립하고자 함. 소비자가격은 6,000원/200 g으로 산출하였으며, 운반비, 인건비를 제외하면 판매수익금은 500원 내외가 될 것으로 판단됨.
- 제품이 시장에 정착된 후에는, 생산량을 증대하여 생산단가와 판매가격을 낮추고, BtoC보

다는 B to B 판매 전략을 수립할 예정임. B to B 제품은 벌크형 포장으로 생산단가를 낮추어 가격 경쟁력을 확보할 계획임. 벌크형 포장 소스는 36,875원/ 5Kg 생산단가하여 판매하고 단위당 판매수익금은 5000원 내외가 될 것으로 판단됨.

【사업종료 후 2차년도기준】

수출국	일본	캐나다, 미국(LA)	동남아 (대만, 베트남, 베트남, 홍콩)	유럽 (영국, 프랑스, 이탈리아)	계
수출금액	2.5백만원	0.5백만원	1.7백만원	0.3백만원	5백만원
판매처	백화점, 온라인 쇼핑몰, 식품/관련 취급 바이어 등				
판매품목	비지청국장 소스 및 분말 제품				
영업전략	<ul style="list-style-type: none"> - 시장성이 큰 지역은 온라인 쇼핑몰에 입점을 하여 주력 품목 위주로 판매하여 재고를 최소화 - 한국산 원료 사용 및 건강식 식품 강조한 영업 포인트 전략 - 기존 제품 대비 품질 이 우수하며, 일괄제조 - 현지에서의 시장개척단 및 해외전시회를 통하여 현지 에이전트 발굴 및 관련 바이어 발굴 - TV 매체 및 현지 전문잡지에 지속적인 홍보 				

3. 국내목표 매출 : 6.4천만원

【사업종료 후 2차년도기준】

국내	농협	마트	식자재 취급업체	장터	계
판매금액	3.2천만원	1.5천만원	0.5천만원	1.2천만원	6.4천만원
판매품목	비지청국장 소스 및 분말 제품				
영업전략	<ul style="list-style-type: none"> 시장성이 큰 농협, 대기업, 학교급식 위주의 적극적인 홍보 - 한국산 원료 사용 및 건강식 식품 강조한 영업 포인트 전략 - 기존대비 품질 이 우수하며, 자체 일괄제조 - 한국경제신문, 지역경제, 중소기업유통센터 행복한 세상 등 지속적인 홍보 - 국내 식품 전문전시회 및 상담회 참석 및 홍보 				

4. 사업화에 따른 수익성 자체분석 결과

가. 당사 생산제조 능력 및 규격인증

- 1) 지역에 유사한 타사 기업은 있으나, 당사는 지속적인 신제품 개발로 기술경쟁력 우위에 있음
- 2) 건강지향 식품개발을 위해 위생관리 및 품질관리를 위해 꾸준히 노력하고 있음
- 3) 당사 품질관리팀 자체에서 제조하여 제품가격 경쟁력이 있음

나. 수익 지속가능성 조사

- 1) 건강소재활용 식품 컨셉으로 경기 침체에도 불구하고 지속적으로 성장 할 수 있도록 대량 생산체제 구축 및 가격 경쟁력으로 국내 판매량이 지속적으로 상승할 것으로 판단되고 특히, 해외에는 한국제품에 대한 인지도 상승으로 판매량이 지속적으로 증가할 예상
- 2) 최근 대가족에서 소가족 등 1인 가구의 증가로 간편 조리 수요가 증가 하고 있으며, 국내 및 해외에도 건강에 대한 관심도가 증가함에 따라 건강지향 식품산업의 지속적인 성장을 예측하고 있음 (한류열풍지역으로 지속성 및 성장성 확보가 가능)
- 3) 판매망 확보를 위해 향후 국내 대형마트 및 전국 농협하나로 마트 납품 추진을 계획하고 있음. 또한 신규 홈쇼핑 채널 입점으로 판매망을 늘리고 있음.

○ SWOT Analysis

SWOT Analysis	내 용	비 고
Strength	뽕은감복합물 및 와사비 첨가로 비지청국장의 효능과 맛의 상승효과가 나타남.	
	탄닌 성분과 항산화 기능성분이 많은 뽕은감과 진피, 와사비의 첨가로 지질대사 및 당대사 개선 건강 친화형 홍보가 가능함.	
	건강기능성원료인 카테킨을 첨가함으로써 청국장의 효능과 마찬가지로	
	다이어트나 장 건강에 상생 효과를 가져옴.	
	연구소기업이 만든 믿을 수 있는 제품의 이미지를 보여줄 수 있음.	
Weakness	기존 전통방식의 '청국장'과 달라 기존 고객층에게 낯설게 다가설 수 있음.	
	실제 고객들이 시식해 보지 않을 경우 그 맛을 홍보하기가 힘이 듦.	
	대기업의 신제품 홍보보다 다소 홍보속도가 느려질 수 있음.	
Opportunity	새로운 맛과 효능을 잘 알릴 경우 아이들부터 노년층이 좋아하는 대표적인 건강한 먹거리로 거듭날 수 있음.	

	낮또의 시장이 넓은 일본 / 대만 / 중국으로 진출할 수 있음.	
Threaten	식품의 경우 유통기한이 정해져 있어 최대한 유통기한을 늘릴 수 있는 방안이 모색됨. 첨가물이 많이 들어갈 경우 관리포인트가 늘어나 제품가격이 추가적으로 상승할 수 있음.	

○ STP Analysis

STP Analysis		구 분	1	2	3	4	5	6
Segmentation	인구통계학적 변수	생애주기	결혼	임신	출산	양육	교육	노후
		성별	남자	여자				
		소득	최상위	상위	중위	하위	최하위	
		직업	자영업	공무원	사업가	예술가	직장인	
		교육수준	최상위	상위	중위	하위	최하위	
	지리적 변수	지방	특별시	광역시	시	군	읍	면
		기후	더움	따뜻함	서늘함	추움		
		인구밀도	도심지	교외	농어촌			
	행동분석적 변수	서비스 편익	기능성	맛과 향 기	편의성	디자인		
		사용량	소량 소비자	대량 소 비자				
사용경험		간편 음식	선물용	휴대용	직접 음식			
Targeting	인구통계학적 변수	양육	두뇌의성장이 중요한시기에 '대두단배질'과 뽕은감의 '지질대사 개선 및 당대사 개선'효능을 강조할 수 있음.					
		20대 ~ 40대	다이어트, 고지혈증, 대사증후군					
		여자	실제 식료품을 주로 구매하는 여자들을 대상					
		소득	기존청국장보다 기능성 원료의 첨가로 가격이 다소 비싼 편이라 소득이 중위권 이상이 적합함.					
		직장인	바쁜 직장인들은 요리할 시간이 부족하기 때문에 간단하게 먹을 수 있어야 함.					
		교육 수준	교육을 많이 받은 사람일수록 식품의 기능성 효능을 잘인지하기 때문에 교육수준이 높은 곳이 적합함.					
	지리적 변수	특별시, 광역시	인구밀도가 높은 지역일 수록 짧은 시간에 많은 이들에게 홍보할 수 있음.					
	행동분석적 변수	기능성	비지청국장 + 뽕은감+진피+와사비					
		맛	와사비 첨가로 비지청국장의 이미, 이취를 마스킹할 수 있었음					
		디자인	소득수준과 교육수준이 높은 사람들 일수록 디자인의 가치를 높이 평가함.					
소량소비자		큰 회사의 납품보다는 우선적으로는 개인소비자들에게 판매활동을 전개함.						
간편 음식		간편하게 야외에서 휴대용으로도 먹을 수 있는 먹거리						
Positioning	인구통계학적 변수	양육	성장기 두뇌활동과 소아 비만 방지라는 제품 컨셉으로 어린아이들에게 친근함을주어 잘 접할 수 있도록 도와줌.					
		20대 ~ 40대	다이어트, 고지혈증, 대사증후군					
		여자	자사홈페이지등재,로컬푸드마켓,페쇄몰,주부체험인스타그램활용					

	소득	백화점, 대형 마트 납품
	직장인	직장인이 간단하게 먹을 수 있도록 통조림 형태로 가공
	교육 수준	제품의 효능에 대해 특허출원을 통하여 교육수준이 높은 고객들에게 더 많은 판매를 유도함.
지리적 변수	특별시, 광역시	전시회, 박람회참가를 통한 도시민들에게 홍보활동을 전개함.
행동분석적 변수	기능성	기능성에 대한 자세한 설명을 홈페이지나 전시회, 박람회에서 설명함.
	맛	기존제품의 택배 발송 시 샘플을 추가하여 맛을 보인 후 구매를 유도함.
	디자인	활기찬 도시의 Fun한 이미지를 살려 도시민들이 친근하게 다가 가게 함.
	소량 소비자	소량 소비자가 쉽게 구매할 수 있도록 제품 크기, 용량을 한끼 식사에 맞게 제작함.
	간편 음식	통조림 형태로 간편하게 유통기한을 늘려서 먹을 수 있음.

○ 전략분석과 기업의 대응

- SW 전략

- : 가격경쟁력을 기반한 높은 성장률을 지속하고 정부의 연구개발 지원을 대학의 연구개발 기술과 연계한 산학협동으로 신제품개발 참여
- : 자브랜드 제품에 기반 한 기술우위의 신 제품개발 집중으로 기술경쟁력을 확보함

- SO 전략

- : 기능성제품의 차별화 전략을 주 전략으로 활용함
- : 가격대비 제품의 우수성을 알여 적극적 대외 시장 진출

- WO 전략

- : 국내 마케팅라인 부족을 인력 충원 등을 통하여 돌파
- : 국내 소규모 중소기업의 한계를, 집중된 기술력으로 극복

- ST 전략

- : 단일 공정라인의 장점을 최대한 활용하여 소비자의 NEED에 맞게 빠른 제품생산 변화를 추구하여 시장에 유연하게 대처함

- WT 위기극복

- : 중저가 및 프리미엄 시장의 차별화로 시장진입 전략 전개
- : 소비자 Needs에 맞는 제품개발

○ 신제품 개발 후 매출 계획 및 STP 마케팅 전략

- STP에 의한 신제품의 마케팅 전략의 수립
- STP 전략을 통해 고객을 세분화하여, 연령별 개층별, 지역별 특성을 고려한 제품의 개발.
주력상품으로 제공할 신제품의 제품 우수성 확립
- 제품의 포지셔닝
 - : 1차적으로 국내 내수용 시장을 진입 대상으로 활용
 - : 경쟁우위는 기능성 소재를 활용한 제품으로 포지셔닝
 - : 자본투자를 탄력적으로 대응하고 최대의 영업이익을 위해 기존 생산라인을 활용전략이 바람직함

뒷면지

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 ‘창업벤처지원 R&D 바우처 사업’의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 ‘창업벤처지원 R&D 바우처 사업’의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.

210mm×297mm[백상지(80g/m²) 또는 중질지(80g/m²)]