

818011-2

농식품연구성과후속지원사업 제2차 연도 최종 보고서

발간 등록번호

11-1543000-003206-01

김치유산균
Weissella
활용
꽃벙이
엑기스의
기능성
향상
기술개발

김치유산균 Weissella 활용 꽃벙이 엑기스의 기능성 향상 기술 개발 최종보고서

최
종
보
고
서

2020. 07. 02.

2020

주관연구기관 / 농업회사법인(주)동의보감
협동연구기관 / 환동해산업연구원

농
림
식
품
기
술
기
획
평
가
원

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

'김치유산균 Weissella 활용 꽃병이 엑기스의 기능성 향상 기술개발'(연구개발 기간 : 2018. 04. 30. ~ 2019. 12. 31.) 과제의 최종보고서 1부를 제출합니다.

2020 . 07 . 02.

주관연구기관명: 농업회사법인(주)동의보감 (대표자) 신 명 화 (인)
협동연구기관명: 환동해산업연구원 (대표자) 김 태 영 (인)



주관연구기관책임자: 농업회사법인(주)동의보감 박 정 철
협동연구기관책임자: 환동해산업연구원 홍 선 미

농림수산식품부훈령 제27조에 따라 최종보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	818011-02	해 당 단 계 연 구 기 간	2018.04.30. ~ 2019.12.31	단 계 구 분	2년/2년
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농식품연구성과후속지원사업			
연구과제명	대 과 제 명	김치유산균 Weissella 활용 꽃병이 엑기스의 기능성 향상 기술 개발			
	세부 과제명	웨이셀라 활용 DHNA 생산 기술 및 발효엑기스 개발			
연구책임자	박 정 철	해당단계 참여연구원 수	총: 9 명 내부: 2 명 외부: 7 명	해당단계 연구개발비	정부: 95,000천원 민간: 25,000천원 계: 120,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 17 명 내부: 4 명 외부: 13 명	총 연구개발비	정부: 160,000천원 민간: 45,000천원 계: 205,000천원
연구기관명 및 소속부서명	세부	농업회사법인(주)동의보급		참여기업명 농업회사법인(주)동의보급	
	위탁	환동해산업연구원			
국제공동연구	상대국명: 해당사항없음			상대국 연구기관명: 해당사항없음	
위탁 연구	연구기관명: 환동해산업연구원			연구책임자: 홍 선 미	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

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

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허 (출원/등록)	보고 서 원문	연구시 설·장 비	기술 요약 정보	소프 트 웨어	화합 물	생명자원		신품종	
								생 명 정 보	생물자원	정 보	실 물
등록· 기탁 번호	<ul style="list-style-type: none"> • BBE (2019) 24 745-753 • 3Biotehc (2018) 9(30) 1-8 	<ul style="list-style-type: none"> • 10-1919770-0000 (등록) • 40-1376141-0000 (상표등록) • 10-2018-0153921 (출원) • 10-2019-0066242 (출원) • 10-2019-0121784 (출원) • 10-2019-0157749 (출원) • 10-2019-0136813 (출원) 						<ul style="list-style-type: none"> • KCCM12299P • KCCM12300P • KCCM12301P • KCCM12472P 			

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

본 연구 사업에서는 식용곤충인 흰점박이꽃무지 추출물 또는 진액 배합물을 원료로 유산균 발효물로서 1, 4-디히드록시-2-나프토산(1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid; DHNA)를 포함하는 조성물을 제조하였다. 흰점박이꽃무지 추출물 또는 진액배합물에서 유산균을 호기상태, 저온 배양하여 얻은 발효물에 장내의 비피도박테리움 균주 등에 대한 증식 또는 성장 촉진 효과 등을 나타낼 수 있어 미생물 성장 촉진용, 항산화용 조성물 또는 염증성 질환 치료용 조성물로서의 가능성을 제시하였다. 연구수행은 성실히 이루어졌으며, 국내기반 식용곤충정책에 따라 잘 진행 된 것으로 판단된다.

보고서 면수

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 웨이셀라활용 최적 발효 및 생산 공정 개발 • DHNA 생산 조건 확립 및 확인 • 식용곤충 활용 Wp 발효물 유효성 확보 • 꽃병이 발효 엑기스 시제품 개발 및 상품화 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 발효 생산시스템 구축 <ul style="list-style-type: none"> - 미생물 안정성 확보를 위한 위생공정 개발(여과, 살균 등) - 유통 및 저장방법(적정 향아리 사용) 확립 • 웨이셀라 활용 조건 확립 및 성분분석 <ul style="list-style-type: none"> - 가수분해 촉진 균주 2종 분리확보 및 균주 기탁(한국미생물균주센터) - 최적의 반응발효 조건(저온, 호기, 질소원 등) 발효시간(48-72) 확립 - 유해미생물(없음), 유효미생물 발육기간, 중금속(안전) 조사 완료 - 일반성분(조단백, 조지방 등), 유리아미노산 등 분석완료 - 산도, pH, 가수분해율 분석 완료 • 안전성 평가 및 대량생산 <ul style="list-style-type: none"> - 유해미생물 살균, 저장 및 색소, 타르 등 안전성 분석 완료 - 3T3L1 세포, Raw세포 등의 안전성 분석 완료 - 기성제품과의 비교분석 완료 - 기술특허3건출원, 상표등록 1건, 기술특허등록1건 • 발효소스 시제품 생산 및 시제품 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 동의보급 플러스 디자인 완료, 품목허가 - 동의보급 플러스 시제품 제작 완료 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 식용곤충의 단순 분말식품에서 새로운 패러다임의 발효기술 제시 • 발효속성에 의한 효능, 기능성 신물질, 소재 제시 기대 • 특허출원, 등록 및 기술이전 등을 통한 레드오션 시장 가능 • 액상 이외의 건조조미료 등 유용소재개발을 통한 산업화 다양화 • 6종의 식용곤충에 적용하여 곤충농가 및 기업의 활성화 • 지역 혹은 국내 곤충 산업의 활성화 및 수출 경쟁력 확보 기대 • 식용곤충 장류산업 지원을 통한 지역 곤충산업 육성 및 활성화 기대 • 한국곤충산업협회와 농업협동조합과 협력하여 지속적 생산라인 마련 • 식용곤충 발효소스 2차 가공식품으로 고부가가치화 기대 • 국내,외 판매를 통한 기업 매출 증진. 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>식용곤충</p>	<p>웨이셀라</p>	<p>발효</p>	<p>DHNA</p>	<p>엑기스</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>edible insect</p>	<p>Weissella sp</p>	<p>fermentation</p>	<p>1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid</p>	<p>extract</p>

<본문목차>

< 목 차 >

제 1 장 연구개발과제의 개요 01
제 1 절 연구개발 목적 01
제 2 절 연구개발의 필요성 01
제 3 절 연구개발 범위 15

제 2 장 연구수행 내용 및 결과 16
제 1 절 연구추진 전략 16
제 2 절 연구수행 방법 18
제 3 절 연구수행 내용 및 결과 25
제 4 절 연구개발 성과 47

제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 53

제 4 장 연구결과의 활용 계획 등 54
제 1 절 활용계획 54
제 2 절 기대효과 55

붙임. 참고 문헌 58

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발 목적

고단백, 고영양, 식약용 소재인 흰점박이꽃무지(꽃뽕이) 진액의 기능성 식품 산업화 활성을 위해 본 제안은 기존의 단순 혼합 진액이 아닌 위염억제 기능을 가진 DHNA 생성 유산균 Weissella를 활용하여 꽃뽕이 엑기스의 기능성과 저장성 향상 기술을 확립하고 그 시제품을 개발하고자 함.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 중요성

1) 곤충 식품산업화 개발의 필요성

- 최근 선진국을 중심으로 국가 간 생물자원 확보차원에서 전체 생물군의 70% 내외를 차지하는 곤충 자원 확보 경쟁이 치열 함.
- 곤충의 활용 범위는 의약, 애완, 관광, 화분매개, 환경정화, 식품, 사료, 화장품 등 유용소재 및 수출 산업으로 부상 가능성 높음
- 또한 곤충산업은 시간적, 공간적, 인력에 있어 투자대비 기대효과가 큰 사업으로 21세기 신성장 동력 산업임
- 국내도 ‘곤충산업의 육성 및 지원에 관한 법률’ 이 2010년 발효 되면서 다양한 각도에서 곤충 자원의 산업화를 위한 연구 및 산업 개발이 요구 되고 있음
- 정부의 친환경 고부가가치 농업 추진을 위한 필수 산업이며 특히 식용 곤충의 다양한 상품개발 및 이용, 영양 및 기능성을 부각함으로써 기존 식품 문화에 대한 인식 변화 요구 됨
- 지구 기후의 변화와 더불어 생긴 식량 수급에 대한 불안감은 곤충을 인류의 새로운 단백질 공급원으로 지목하고 개발 되고 있지만 현재까지 인식이 좋지 않음
- 곤충섭식은 원시적이며 저개발국가 등에서 중요한 생계 수단이 되고있어 저평가 되고있음
- 일부 곤충의 영양적 가치는 육류에 비해 높은 단백질 함량(소고기:55%, 귀뚜라미:80%), 불포화지방산, 필수지방산이 높고 소화 흡수율도 77-98%로 알려져 있지만 곤충 표피의 키틴질은 소화가 잘 되지 않고 식미(食味)를 손상 시킴
- 주요 에너지원인 지방과 탄수화물도 종에 따른 차이는 있으나 일반적으로 높고, 아연, 철분, 칼슘 등의 미네랄과, 비타민 B의 함량도 닭고기와 콩보다 높음
- 육류와 동일양의 단백질을 생산하기 위한 생태적 효율성과 환경비용은 곤충 사육이 5-7배 정도 더 효율적이지만 대량사육 시에 각종 질병에 대한 저항력이 낮고 곤충 자체가 분비하는 물질에 대한 연구가 부족 함

- 동물성 단백질의 가격상승과 온실가스 배출에 의한 환경문제가 대두됨에 따라 친환경적 곤충 사육에 대한 투자 절실 함
- 곤충의 잠재력은 풍부하지만 대량 생산 시스템을 갖추고 생산규모를 공장 수준으로 확대 하기 위한 기반이 부족 함
- 식용곤충 사육 시스템에 대한 매뉴얼과 농민들의 교육과 소통의 장이 부족 하여 더욱 활발한 민간 연구 단체와의 공동 연구 필요 함
- 식품 가능한 곤충 자원은 누에번데기, 누에 백강잠, 메뚜기, 갈색거저리, 흰점박이 꽃무지, 장수풍뎅이 유충, 귀뚜라미 이지만 사육의 매뉴얼이 확립된 것은 누에 정도로 나머지는 각 농가에 의해 전통적 방법으로 사육 되고 있어 체계화 필요 함
- 최근 정부는 식용곤충 조리 적성연구와 소재화 및 가공적성 연구를 발주 하고 있으나 먼저 공급 곤충의 사육 시스템의 확립이 요구 됨
- 곤충산업 활성화를 위해 식용곤충에 대한 개발 및 사육에서부터 식품화하기까지 연구개발 투자와 제도적 뒷받침 요구
- 곤충식품 또는 사료화를 위한 종 등록과 확대 연구뿐 만 아니라 안전한 공급을 위한 시스템 확립 및 연구 투자 필요

2) 유산균 활용 바이오컨버전 기술 도입의 필요성


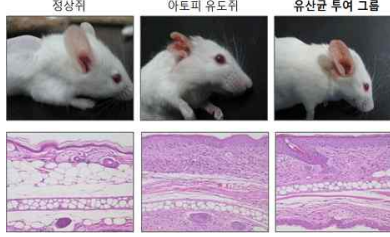

- 유산균과 같은 식품유래 미생물은 오랜 기간 동안 인류가 발효식품과 함께 섭취한 GRAS(generally regarded as safe) 미생물로 안전성이 증명 되어 있음
- 최근 소비자들의 건강에 대한 관심이 집중되면서 식품분야에서 고기능성 건강지향성 소재 들에 대한 관심이 높아지고 있으며 그중 유산균 시장 규모가 꾸준한 상승세를 보이며 관련 제품 판매도 증가
- 유산균의 다양한 용도 개발과 학문적 연구는 활발하게 이루어지고 있으나, 산업화에 필요한 대량생산 배양공정 및 제제화 공정 등에 대한 기술개발은 부족한 실정임
- 유산균의 제품화에 앞서 우선적으로 다양한 기능성을 보유한 유산균을 발굴하여 자원을 확보하는 것이 중요 함
- 특히 최근에 주목되고 있는 면역 기능과 관련하여 면역세포의 기능적 손상 방지 및 면역 증강 효과를 가진 유산균을 발굴하고 이를 대량 생산화 하여 기능성 식품 첨가제, 동물약품 및 백신 등 다양한 제품 개발 필요
- 또한 기능성 유산균을 이용하여 기능성이 강화된 특화 소재로 개발하여 다양한 식품 활용에 이용 가능 함
- 특히 유산균은 포도당으로부터 다량의 유산을 생성하여 사람을 포함한 포유동물의 장내에서 인체에 해로운 물질은 생성하지 않고 식품의 부패를 방지하는데 도움을 주어 개발의 여지 많음
- 또한 장내 부패 억제, 장의 운동을 촉진하여 변비 방지, 면역력 증가, 발암 억제, 비타민 B

균의 생산 등 여러 가지 생리적 기능을 가지고 있어 유효한 제제 임

- 일부 유산균은 신생아나 면역기능이 감소되는 소아기의 면역 증진을 위한 첨가제로 개발 연구 중이며 전신 면역기능 향진에 대한 연구 또한 진행 중임
- 또한 일부 유산균은 아세트산 및 젖산과 같은 유기산 그리고 박테리오신 같은 항균 물질 등 다양한 대사산물을 생산하여 장내 부패균 및 유해한 병원성 세균의 생육을 저해 가능하여 집중 된 연구 필요 함
- 최근 유산균의 박테리오신은 항균물질을 생성하여 병원성 미생물을 사멸시키는데 이는 항생제와는 달리 1차 대사과정에서 만들어지는 단백질로 사람이 섭취하더라도 단백질 분해효소에 의해 분해되기 때문에 무해하여 유효성이 입증되어 식품 활용에 유효 함
- 또한 유산균의 박테리오신은 antimicrobial polypeptides(AMPs)로 기존의 항생제가 2차 대사산물인데 반해 자신의 유전자로 직접 생합성되는 특징을 갖고 있어 생물공학적 응용이 용이하여 산업현장의 소요에 보다 다양하게 반응할 뿐 아니라 단백질이어서 경구 섭취 히 잔류성이 적음
- 또한 유산균의 박테리오신은 종류에 따라 항균범위가 넓은 것도 있으며 내열성의 것도 존재하여 식품 제조 시 새로운 생물학적 천연 보존제로서 효용이 큼
- 항균 유산균은 장내에서 정상 미생물군으로 존재하고 있기 때문에 안전하며 이들이 생산하는 항균 물질은 식품 등의 새로운 생물학적 보존제로 효용이 크나 연구가 미비함
- 최근 유산균은 장내 미생물 군총의 개선에 의한 건강 증진 효과 이외에 생리 활성 물질 생산균으로 새롭게 부상하고 있으며, 저칼로리당, 세포외다당류, 올리고당 등의 기능성 소재 생산에 대한 연구 등은 식품첨가물로 최적임
- 유산균의 다양한 효능은 균주에 따라 상이하기 때문에 우수한 유산균을 분리하고 선발하는 것은 유산균을 이용한 기능 소재 개발에 있어 중요한 부분으로 연구의 기반 연구 임
- 유산균은 인체 건강에 유익한 영향을 주는 살아 있는 미생물로 정의 되는 프로바이오틱스(probiotics)에 속하며, 장내 병원성 세균이 소화관 상피에 부착하는 것을 막아 질병 발생을 감소시키고 유산균으로부터 생성 된 항균 물질이 인체에 유해한 병원성 미생물이나 장내 부패균을 사멸 또는 증식 억제를 도와 기능성 제제임
- 생균제로서 유산균의 과학적 기능은 설사 개선, 알레르기 증상 경감, 정장 작용, 발암 억제, 면역 기능 조절, 알레르기 저감, 혈압 강하, 장내 환경 개선, 식이성 콜레스테롤 저감 등으로 그 역할, 기능 등이 우수성에 비해 적용이 아직 미비한 상태 임
- 최근의 식생활 변화, 노화, 스트레스, 흡연과 음주 환경오염의 노출 등 여러 가지 요인들에 의해 암, 면역부전, 아토피, 자가 면역 등과 같은 면역계와 관련된 질환이 늘어남에 따라 이들의 치료 또는 예방을 위해 식품을 소재로 한 면역 관련 연구가 계속 증가 함
- 유산균의 효능에 대한 연구는 장질환, 성인병 예방, 항암, 콜레스테롤 생성 저하 등 질병 예방 효과 구명 중심의 연구에 집중 되어 있어 면역 또는 항균제 중심의 연구도 필요한 실정 임
- 유산균의 면역활성 능력을 갖는 우수 유산균주에 대한 연구는 혼합 저장시 그 시너지 효과가 기대되지만, 그 면역 활성의 기전연구나 생리활성에 대한 in vitro, in vivo 대한 과학

적인 검증 작업이 필요함

- 유산균의 현재 사회적으로 급속하게 증가하고 있는 면역 활성 기능성 식품의 효과에 대한 과학적 연구 자료의 필요성도 요구 되고 있음
- 유산균의 면역 기능 개선에 도움을 주는 식품과 유산균의 혼합에 의한 시너지 효과를 평가하여 보고한 사례는 많지만 아직까지 식용곤충에 대한 연구는 전무한 상태이며 이에 대한 기전연구 및 과학적 검증작업 필요함

김치에서 분리된 피부 유산균	유산균의 아토피 치료효과	유산균이 피부염 유아에 대한 치료효과
 <p>CJLP-133 유산균 피부면역력에 도움을 줘 아토피성 피부염이나 가려움 개선에 도움을 주는 성분</p>	 <p>정상쥐 아토피 유도쥐 유산균 투여 그룹</p>	 <p>유효 70% 단위: % 효과높음 10% 변화없음 10% 약간효과 10%</p>

3) 식용곤충산업에 대한 정부지원의 필요성

- 정부는 2015년 부처 매년 3억원씩 3년간 연구비를 조성하여 식용곤충 조리 적성 연구와 소재화 및 가공적성 연구 과제를 발주하여 식용곤충의 조리특성 연구, 레시피 개발, 가공 식품 개발연구 등에 투자하고 있으나 식용곤충 건물에 대한 표준 전처리에 대한 연구가 미비함
- 국내에 존재하는 잠재적인 곤충자원에 대한 기초자료 확보를 위한 인프라 구축과 더불어 4차 산업 개발에 맞는 융·복합 연구에 대한 동반 연구 개발 필요
- 곤충 사육 농가는 곤충 종자 시장에 의존한 상태이며 누에 이외의 식용곤충의 사육에 대한 지침서가 아직 확립 되어 있지 않으며 건분말의 보관법에 대한 표준서도 없는 상태 임
- 국내에 곤충산업이 경제 산업적으로 발전하기 위해서는 체계적인 각 식용곤충에 대한 자주적 체계적 효율적인 관리로 식품으로서의 안전성 확보가 가능한 정부 지원이 요구 됨
- 경제적 가치가 높아지고 있는 식용곤충을 이용한 조미료, 프리믹스류 등의 중간소재 식품을 이용한 레시피 개발에 앞서 생산농가와 가공업자 간의 안정성 기반 마련이 필요함
- 경제적 단순한 학습 애완 곤충을 위한 사육은 판매 가격이 낮아 생산농가 또는 업체가 도산할 위험이 있어 식품, 약용, 의약품, 화장품으로의 다양한 개발을 위해서는 곤충의 중간 처리에 관한 표준기준 마련 시급
- 국내의 곤충의 사회문화적 자리 매김을 위해 원재료 생산에서 제조, 가공, 보존, 유통 단계를 거쳐 소비자가 섭취하기까지의 각 단계에서 발생한 우려가 있는 위해요소 규명 할 필요가 있음

2. 국내 기술, 시장 현황

1) 국내 기술 현황

(1) 곤충을 이용한 식품 개발

- KEIL 한국식용곤충연구소 :식용곤충 5종에 대한 분말화, 건조, 조리, 제면, 반죽 특허 보유)
- 미래식량 곤충요리 연구소 (Green Bug Food)
- 누에를 포함한 다양한 곤충으로부터 항생펩타이드(누에신, 엔보신, 코프리신, 파필리오신, 갈리오마이신 등) 분리 및 항균활성 분석(2010, 농촌진흥청)
- 곤충 유래 항생펩타이드를 대장균 등 다양한 발현계를 이용하여 대량생산 연구를 추진 중 이나 경제성의 한계를 극복하지 못하고 있는 실정 임
- 누에의 선천성 면역기전을 이용해 누에 생체 내 항생펩타이드 유도 기초 기반 기술 개발 이 진행 됨(2010, 농촌진흥청)

(2) 곤충자원을 이용한 6차 산업화 모델개발 및 현장적용

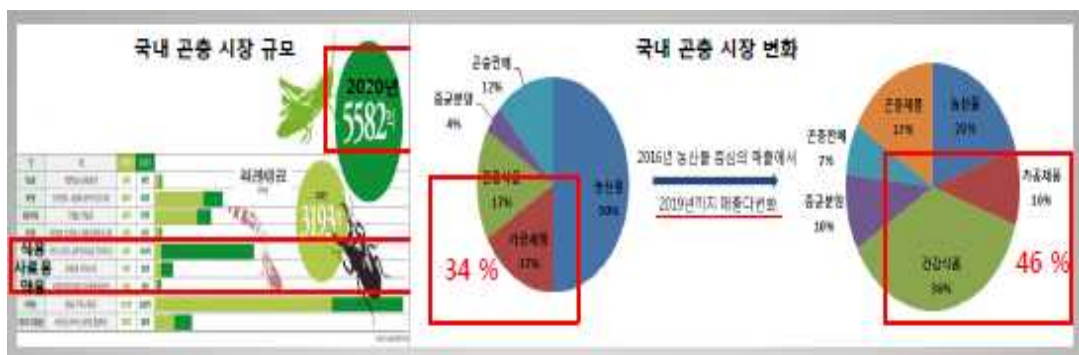
- 농촌진흥청과 연세의료원의 공동연구로 고소애(갈색거저리, mealworm) 햄버거 패티 (hamburger patty)가 개발 됨
- 국내에서 인섹트 비전으로 된장, 쿠키, 양갱, 한방차 등이 시제품으로 제작 되고 있으며 빠 빼용의 키친, 이더블 버그 등의 식용곤충 레스토랑이 생김
- 식용곤충 안전 사육 매뉴얼(<http://bitly/linP9FW>), 농어기술 길잡이, 산업곤충 사육기준 및 규격, 식용곤충 조리법 등에 대한 자료가 온라인 화 됨(농촌진흥청)
- 국내 농가에서 사육하고 있는 곤충의 사육규모는 228농가 이며 장수풍뎅이와 사슴벌레를 비롯한 나비와 꽃무지 등 50여종에 이르고 있으며 대부분 애완곤충이 주를 이루고 있음
- 곤충 유통업체의 용도별 취급 비중은 학습, 애완용이 85% 내외로 압도적으로 많으며 매출 액은 전체의 62 정도로 낮음
- 산업곤충의 사육기준 및 규격설정이 천적곤충, 학습애완곤충, 사료용 곤충의 3개 분야로 나누어 지침서 마련 됨



2) 국내 시장현황

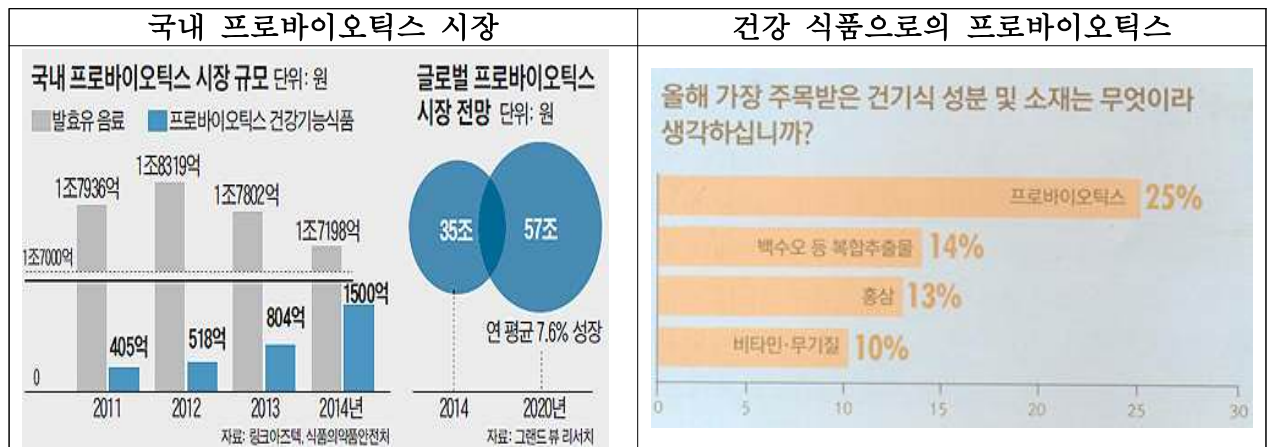
(1) 식용곤충의 식품 소비자를 연계할 수 있는 유통체계 마련

- 현재 우리나라에서 식품의 제조·가공·조리에 사용할 수 있는 식용곤충은 총 7종으로 누에번데기, 벼메뚜기, 백강잠, 쌍별귀뚜라미, 갈색거저리유충, 흰점박이꽃무지유충, 장수풍뎅이유충임. 식용곤충은 전통적으로 벼메뚜기, 누에번데기, 백강잠 등이 이용되고 있으며, 2014년에 갈색거저리, 흰점박이꽃무지 등 2종류가 식품의약품안전처로부터 식용곤충으로 고시되어 이용되고 있으며, 이용방법은 간식거리 및 식품첨가제 형식으로 이용되고 있음
- 국내 식용곤충시장 초보수준이나 정부·민간, 육성 의지 높아' 지난해 국내 전체 곤충시장 규모는 3000억원에 육박하지만 이 가운데 3분의2는 함평나비축제, 무주반딧불축제 등과 같은 지역 행사 용도이며 나머지도 애완용, 화분(花粉)매개용, 신약원료용, 농약 대체품 등을 빼면 식용은 100억원도 채 되지 않는다. 농림축산식품부는 식용 곤충의 범위를 제한한 규제를 핵심 규제개혁 과제로 선정하고 먹을 수 있는 곤충의 대상을 늘려 2020년까지 곤충 시장을 7000억원 규모로 확대한다는 계획이다. 정부는 곤충 식품 규제가 대폭 완화되면 연간 최대 1700억원대 '곤충식품' 시장이 새로 창출될 것으로 전망하고 있다.
- 농촌진흥청(농진청)은 최근 국내 식품업체와 공동으로 고소애(갈색거저리 애벌레)를 이용해 특수의료용 식품인 '고소애 푸딩'을 개발해 특허 출원을 마쳤다. 씹거나 삼키는 데 어려움이 있거나 수술 등 치료로 식욕이 떨어져 영양이 부족한 환자를 위한 균형 영양식으로 만들어진 이 제품은 푸딩 형태로 제작돼 먹기 쉬우며 곤충에 대한 거부감을 없앤 것이 특징이다.
- 농진청은 산업곤충 소재개발과 특화된 곤충자원의 산업화 촉진을 위한 컨트롤 타워 역할을 수행할 '지역곤충자원산업화지원센터' 건립을 위해 총 200억원을 투입했다. 특히 최근에는 산업에 대한 높아지는 관심에 힘입어 곤충식품벤처회사에 대한 민간투자도 확대되고 있다
- 유엔이 뽑은 미래식량 1순위 역시 곤충이다. 곤충은 지구전체 생물 가운데 단일종으로는 유일하게 3분의1을 차지할 정도이며 종류도 다양하고 맛과 영양분도 가지각색이다. 식용곤충은 영양학적으로 축산물에 비해 단백질 함유량이 비슷하거나 2~3배나 높으면서 불포화지방산과 비타민, 무기질 등의 영양소도 많다. 육류 대체제로 최적이라는 평가가 나오는 이유다. 농림축산식품부 곤충산업은 2011년 1680억원에서 2020년 5363억원으로 증가할 것으로 전망하고 있으며, 식용곤충분야는 2015년 60억원에서 2020년 1014억원으로 증가할 것으로 전망하고 있다



(2) 국내 유산균 이용 형태의 발전

- 국내 프로바이오틱스 건강 기능 식품 시장 규모 200억원대에 이를 특히 발효 식품을 대상으로 한 한국형 유산균 제품이 대세를 이룸
- 최근 스트레스, 미세먼지 등의 환경영향에 따른 알레르기 증상 억제를 위한 프로바이오틱스 시장이 확대 됨
- 청정 유래 및 바이오테크놀로지 활용 유산균 개발이 활발하며 국내의 경우 김치, 청국장 유산균 또는 발효 식품 또는 부산물을 활용한 기술 개발 연구가 활발



3) 국내경쟁기관현황

(1) 식용곤충의 소비자를 연계할 수 있는 유통체계 마련

- 국내 곤충산업의 지식재산권은 농진청을 중심으로 곤충 생산기술에 대한 지식재산권이 이루어지고 있으나 생산 이후의 수집, 가공, 유통에 대한 연구는 초보단계에 머물고 있으며, 일부 선도 농가와 선도 곤충지식인을 중심으로 다각적인 연구가 진행되고 있는 실정임
- KEIL 한국식용곤충연구소 :식용곤충 5종에 대한 분말화, 건조, 조리, 제면, 반죽 특허 보유)
- 미래식량 곤충요리 연구소 (Green Bug Food)
- (주) 월드웨어 (갈색 거저리, 꽃무지 애벌레의 한시적 식품 승인 취득, 1년~1년6개월간의 식품 판매권 한시적 보유)
- DE 바이오 진 (꽃무지 이용한 식품 개발 및 판매 업체 중)

(2) 곤충자원을 이용한 6차 산업화 모델개발 및 현장적용

- 학습·애완곤충 연구기관 : 곤충자원의 학습·애완용도와 관련한 연구는 국립농업과학원을 중심으로 추진되고 있으며, 일부 대학(고려대, 전북대, 제주대 등)에서도 관련 연구가 일부 수행되고 있는 실정임. 그러나 생산/가공/체험관광을 연계하는 6차 산업화 연계 연구는 아직까지 초기 단계임
- 지자체: 예천곤충연구소, 아산생태곤충원, 인천 나비공원 등이 운영되고 있으며 최근 의령 곤충생태원이 개소했고, 대전곤충생태원 등이 개관을 앞두고 있음.
- 기업 : 학습·애완곤충 또는 관련상품 등은 국내에 ‘만천곤충박물관’, ‘충우’ 등 개인기업의 판매가 주를 이루며 6차산업화가 가능한 기업은 농업회사법인(주)한국유용곤충연구소 및 농업회사법인(주)오상킨섹트 등이 있음

4) 국내 지식재산권현황

(1) 식용곤충 대량 생산과 소비자를 연계할 수 있는 유통체계 마련

- 국내 곤충산업의 지식재산권은 농진청을 중심으로 곤충 생산기술에 대한 지식재산권이 이루어지고 있으나 생산 이후의 수집, 가공, 유통에 대한 연구는 초보단계에 머물고 있으며, 일부 선도 농가와 선도 곤충지식인을 중심으로 다각적인 연구가 진행되고 있는 실정임
- KEIL 한국식용곤충연구소 :식용곤충 5종에 대한 분말화, 건조, 조리, 제면, 반죽 특허 보유)
- 미래식량 곤충요리 연구소 (Green Bug Food)
- (주) 월드쉐어 (갈색 거저리, 꽃무지 애벌레의 한시적 식품 승인 취득, 1년~1년6개월간의 식품 판매권 한시적 보유)
- DE 바이오 진 (꽃무지 이용한 식품 개발 및 판매 업체 중)

5) 표준화현황

(1) 곤충이용 식품 및 사료 개발

- KEIL 한국식용곤충연구소:식용곤충 5종에 대한 분말화, 건조, 조리, 제면, 반죽 특허 보유)
- 미래식량 곤충요리 연구소 (Green Bug Food)
- 반려동물에 필수적인 사료 시장은 매년 급속히 증가하고 있으며 트랜스퍼렌시 마켓 리서치(Transparency Market Research) 자료에 따르면 세계 시장은 2011년 586억 달러에서 2017년 748억 달러 규모로 성장할 것으로 전망
- 국내 시장의 경우 농협경제연구소가 발표한 보고서를 보면 2012년 도매가 기준, 국산 건사료가 584억 원, 수입 건사료가 575.3억 원으로 나타났으며 국산 간식이 44.4억 원, 수입 간식은 296.3억 원으로 조사되었다. 즉 2012년 전체 사료 시장 규모는 1,500억 원 수준으로 추정
- 이는 소매기준으로는 2,500억 원으로 2017년 8,000억 원 규모로 성장할 것으로 전망됨
- 국내 애완동물용 사료의 경우, 2014년 이후 국내 대기업이 본격적으로 진출하기 시작하였으며 대부분의 애완동물용 사료가 수입완제품이라 표본 공정이 확립되지 않은 실정이며 2009년 3월 22일 시행된 축산용 사료 중심의 “사료관리법”에 의존적이므로 제조사별 성분 공개 자료 이외의 표준화 작업 공정은 확보되지 않은 상황임
- 프리미엄급 애완동물 사료의 경우 수입산의 비중이 더 큰 실정이라 국내 사료제조 기술의 고급화를 위한 연구개발 투자가 절실함

6) 기타현황

(1) 식용곤충을 이용한 식품 활용의 이유 및 구체적 현황

- 기아에 시달리는 많은 사람들. 전세계 인구 1/7. 7억명 영양부족으로 만팔천명이 치사. 세계인구증가. 90억명 도달 2048년에는 2배의 식량 필요할것. 지금 대책마련하지 않으면 심각. 최근 기후변화 , 병하, 자원에 대한 압력 심해질것. 2050년 소고기는 사치품 될 것.
- 환경 문제 해결은 위한 미래 식량으로 주목 받음. 적은 온실가스, 고단백. 곤충 다단식 사육가능 백평에서 1톤 .가축비해 10배., 생 마감 기간 수개월로 짧고, 알 수십 수백 생산성

좋은 1키로 고기. 보다 1/6 먹을것 80프로 소 40프로 1키로, 사료양 소는 12배정도 곤충보다 높음. 경제성 높음. 온실가스 18프로 가축. 돼지 67배. 소가 암모니아 돼지 26. 친환경적. 후진국에서 먹는다고 생각함, 선진국에서 식용 움직임. 네덜란드 슬리고에서 고기형태로, 영국에서는. 곤충 들어간 초콜릿, 프랑스, 마이크로 뉴트리사, 월 1톤 생산. 마카롱, 쿠키, 스낵에 구이 곤충말이 마카롱.

- 우리나라 실정 2009년 곤충 산업. 식용 시장 전무. 2020년 7천억원 정부 육성 목표. 곤충 식품연구 방향. 일반식품 특수의료용 식품 건강기능 식품. 연구 기간 부가가치 적은 일반식품으로 시작. 2010년 한시적 인정 제도, 이전까지 30년 이상 식용 근거 있으면 식품공전에 넣고, 제조 가능. 식품위생법 제 7조 제 2항, 식품으로 등록하는 연구 시작할 수 있었음. 2013년 국내 식용 가능 곤충, 벼메뚜기 누에 번데기 누에 백강잠 3종. 한시적 인정 필수. 제조공정 확립, 함량 분석

(2) 식품공전 등록 대상 곤충 선정한 이유

- 국내 대량 사육 시스템 이미 형성 농가 형성, 공급 원활하기 위해. 국내외에서 먹고 있는 사례 있는 갈색 거저리, 굼벵이 약육, 흰점박이꽃무지. 3종. 동결건조 분말 등 사용 최적 제조 조건 확립- 맛 향 위생 최적 조건 확립. 먹기 좋은 조건 확립. 위생적으로 살균, 확립제조 조건으로 제조한 것으로 영양성분 유해물질 분석. 돼지고기보다 높고 소와 유사 단백질. 계란과 유사. 불포화지방 70 식이섬유 있음,

- 인체 안전성 . 중금속 농약 세균 등 불검출, 안정 먹거리임 확인 유전 독성 급성 경구 투여 13주 경구 투여 알리지 분석 섭취 평가 2014년 7월 갈색거저리 유충 식품으로 장수 풍뎅이 유충도 인정. 귀뚜라미도 올해 9월 새로 식품원료로 등록 총 7종 식품으로 이용가능 산가 조단백, 유통기한 설정 실험으로 상온에서 12개월, 다양한 시제품 개발 .기술 이전 총 6종이 판매 중. 한시적 인정은 제한 되는것. 최적 제조 조건으로만 반드시 제조되어야 하고, 제조요청한 사람만 제조 가능. 식품의 기준 및 규격행정예고, 식품공전 등재 방법. 한시적 기준 규격 인정 규격 인정 받은 후. 한시적 규격 인정받은 자가 등재 요청하는 경우. 좀더 어렵게 등록된 곤충의 표준화 사육 기준 규정 마련 벨기에 10종 .

- 곤충사육 가공 유통 국가에서 허가받아야하는 것으로. 식용 곤충 소비 확대 방안 연구, 메뚜기 번데기도 식품이었지만 새로운 곤충 소비확대 위해 방안 연구 시작. 일반식 메뉴, 환자식 메뉴. 특수의료용 개발 갈색 거저리, 건열 조리 시 볶은 새우 깨 견과류 같은 맛, 습열 조리시 찐 옥수수 맛, 영양적 가치 있는 것으로 연구. 단백질 탄수화물만 많은 것일 아니라 고루 분포, 설국열차에서 바퀴벌레로 만든 양갱 하나로 17년 간 생존 가능 일반식품 메뉴 개발. 경민대와 공동. 개발, 조리용 소스 14종, 한식 24종, 양식 21종 일식 중식 12. 후식 18, 제과 8종. 시식회도 개최 기존 먹고 있는 식품에 분말로 들어갈때 드신 후 평가가 긍정적으로 변함. 내년, 국제 심포지엄 개최. 한양일중 요리책자 발간 기술지원팀. 다양 캐릭터 개발 상표 디자인. 환자식 메뉴 개발. 고단백 CA식 고소애 고기 개발 고소애 어묵 개발 특수의료 용도—푸딩 . 단백질 보충 젤리. 내년, 임상영양연구와 개발 제품예정 동의보감. 95종 약용 곤충 수록.

- 세포수준 또는 동물 실험 후, 효능 있으면 임상으로 가지만 이미 95종 곤충은 효능이 있었던 것이기에 역으로 가는 것. 과학적 분석 잘 이루어지지 않은 것, 한의사 처방으로 약용 처리 안 됨. 약용 가능한 것은 약전에 등재 되어 있는 것만 가능 .누에 전분 빼면 8종 정도.

미개발 자원임에도 기능성 활용 위해 ,건강기능 식품을 접근 항산화 염증 비만 치매 암 간 질환 당뇨 등 인슐린 분비촉진. 등 기능성, 특히 출원 산업화, 논문게제로 국내외에 널리 알리고 있음. 가장 큰 점 . 식용 곤충 혐오감. 홍보 갈색.. 고소애. 밀기울 대두바, 수분 공급위해 채소, 굶뎅이는 초가집 지붕 가리에 많이 나옴. 부식된 소재속에 삼. 발효참나무 톱밥을 주 먹이로 하고 있음.

3. 국외 기술, 시장 현황

1) 국외 기술현황

(1) 식용곤충을 이용한 제품 사례

- 일본의 와카야마 지역에서는 콩 대신 곤충단백질(메뚜기)를 이용하여 곤충 발효 조미료 소스 개발 함(inakadss.org)
- 북아메리카 유타주에서는 식용곤충 비즈니스를 귀뚜라미 바(Original Cicket bar)를 출시한 이래 아즈텍, 마차, 타이, 차코 바 4가지의 에너지 바 상품이 판매 중임
- 미국의 Bitty Food사는 식용곤충을 이용해 주로 쿠키를 만들며 현재 초코렛칩 쿠키, 오렌지 생강 쿠키 등이 판매중이며 귀뚜라미 파우더를 함유한 베이킹 반죽용 파우더를 판매중임
- 북아메리카의 Six Foods 사는 칩스(Chips)라는 일종의 칩형태의 귀뚜라미 파우더를 넣어 단백질양을 3배 높인 제품을 출시하였으며 체다, 바비큐, 솔트 3가지 맛이 판매중임.
- 다른 북아메리카에서 출시된 Exo는 귀뚜라미파우더를 넣은 에너지 바를 만들어 시드머 투자 등을 유도 함

(2) 대량 생산과 소비자를 연계할 수 있는 유통체계 마련

- 미국, 유럽연합 등 해외에서도 미생물농약제조법, 식물상과 동물상 관리법 등과 같은 법적 근거를 마련하고, 이에 근거하여 곤충자원을 활용하여 곤충산업에 적극적으로 투자·지원하고 있다. 예를 들어 유럽연합을 비롯한 국제사회는 곤충을 식량자원으로 활용하려는 적극적인 움직임을 보이고 있고, 국제연합식량농업기구(FAO)를 비롯한 전 세계 각국에서 식량부족 해결을 위해 실질적인 대량사육 기술연구에 돌입하였다. 특히 음식의 섭취기준에 있어 선진국인 유럽연합(EU)에서는 식량부족위기 극복을 위해 2012년 곤충먹기 캠페인을 주도적으로 벌이기도 하였다
- 본 사업에서는 대량 생산과 소비자를 연계할 수 있는 유통체계 마련의 잠재성을 평가하고 해외 식용곤충에 대한 기존의 정보를 집약하여 시사점을 제시하는 것을 목표로 한다.
- 네덜란드에서는 Sligro라는 곤충식품 도매 유통회사가 설립되어 매장에서 식용곤충을 판매하고 있으며, 영국에서는 Edible 이라는 회사에서 곤충이 들어간 초콜릿이나 사탕, 술 등을 제조하여 런던의 2대 백화점 중 하나인 Selfridge에서 판매하고 있음. 프랑스에서도 Micronutris사에서 곤충분말이 함유된 마카롱 쿠키, 초콜릿 등이 판매되고 있습니다. 이러한 제품 외에도 곤충식품을 메뉴로 하는 다양한 레스토랑도 지속적으로 생기고 있음. 벨기에에서는 2013년 12월에 식품안전청에서는 갈색거저리, 누에 등 시중에 판매할 수 있는 곤충 10종을 발표한 바 있음.

2) 국외 시장현황

(1) 식용곤충의 대량 생산 및 유통 관련

- 세계 곤충시장 2020년 38조원 추정 . . . 미국 20여개 스타트업 활동 식용곤충 산업은 유럽에서 처음 시작됐지만 상업화에 성공한 곳은 미국이다. 미국과 캐나다에서는 20여개의 스타트업 기업을 중심으로 식용곤충을 활용한 에너지바, 쿠키, 과자 등 가공식품을 만들고 있는데 연 평균 성장률이 200%나 된다. ‘투자의 귀재’로 불리는 김정주 NXC(넥슨의 지주사) 회장이 미래 신성장 분야로 식품 산업을 눈여겨보는 것으로 알려진 가운데 지난 2014년 9월 미국 식품 벤처기업인 ‘엑소 프로테인 바스’ (Exo Protein Bars)에 120만달러를 투자했는데, 바로 ‘귀뚜라미 영양바’를 만드는 업체다. 김 회장은 해외의 친환경 음식체인점에서 곤충으로 만든 메뉴가 늘어나는데 주목해 발빠르게 투자에 나섰다.
- 네덜란드의 경우 연간 100만 달러 이상의 연구비를 투자해 제품을 개발하고 있으며 벨기에에는 공식적으로 곤충 10종을 상용화 해 레스토랑에서도 식용곤충식을 판매하고 있다. 영국은 ‘노벨푸드’라는 새로운 식품군으로 인정하면서 판매처가 증가했으며 런던의 대표 대중 백화점인 셀프리지(Selfridges) 지하 1층에서도 판매하고 있다.
- 중국의 경우 세련된 가공식품은 아니지만 약 4억 명이 식용곤충을 먹고 있는 것으로 알려져 있다. 식용곤충을 포함한 세계 곤충시장 규모는 오는 2020년 38조원 규모의 시장이 형성될 것으로 전망된다.
- 세계 곤충산업의 규모는 2007년 약 11조원에서 2020년에는 약 38조원으로 성장할 것이라 전망되었다.
- 지역별 식용곤충 종(species) 수 추정치를 살펴보면 아프리카 지역에 250여종, 멕시코 지역에 549종, 중국에 170여 종이 서식한다고 조사되었다. 또한 미얀마, 라오스, 태국, 베트남 등에 164종, 아마존 지역에 428종이 식용으로 사용되고 있다고 추정했다
- 멕시코에서는 먹을 수 있는 곤충이 무게단위별로 마을시장에서 판매. 튀긴 메뚜기와, 초콜릿을 씌운 개미가 높은 비율을 차지하며, 멕시코시티의 많은 음식점에서는 아가비웍이라는 곤충이 토르티야 (멕시코의 옥수수빵)와 함께 제공됩니다. 멕시코에는 영양곤충으로 2,300여종이 알려져 있는데 그 중 60여종 곤충은 통조림, 과자, 사탕, 꿀로 가공한 상품 등을 만들어 미국, 프랑스, 베니스 등 나라에 수출
- 미국에서는 주로 메뚜기, 귀뚜라미, 밀웍이 요리에 사용. 몇몇의 음식점에서는 곤충음식을 구체화하여 메뉴를 만들고 조리책에 기술. 곤충을 통째로 넣어 가공한 초콜릿이나 사탕이 있고, 다리와 날개를 제거한 귀뚜라미를 넣어 구워낸 쿠키도 있으며, 또한 밀웍(mealworm, 거저리의 유충)을 이용한 음식도 다양함.
- 일본인들은 다양한 요리에 곤충을 사용하며, 도쿄의 적지 않은 음식점에서 곤충요리 판매. 특히 봉자반이라 하여, 밥을 지을때 꿀벌, 말벌 또는 어리호박벌의 유충을 함께 넣기도 함. 하치노꼬(삶은 말벌 유충), 자자무시(수생 곤충 유충), 이나고(메뚜기), 세미(매미), 상기(누에) 등이 있음
- 중국은 식충절(6월 2일)이 있을 만큼, 매우 많은 종류의 곤충이 식용으로 사용되고 있으며, 다양한 종류의 곤충 꼬치 튀김을 판매. 심지어 고서에도 곤충음식에 대한 언급이 많이 나오는데 특히, 명나라 본초강목에는 ‘하늘소의 유충은 그 맛과 육질이 좋아 동해의 해삼과

같이 식용하면 뼈와 피를 돕는다'라는 내용있음. 또 말벌과 꿀벌의 유충, 번데기 또는 성충을 기름에 볶아서 만든 요리를 계화채라 하고 강정회춘식으로 먹고, 흑룡강성 북부지방에서는 두부에 개미를 넣어 먹으며, 왕개미술, 잠용술 등도 유명한 곤충식품

- 짐바브웨는 80종이 넘는 곤충이 식량으로 꾸준히 이용되고 있으며, 나방의 유충, 개미, 벌뿐만 아니라 비단벌레까지도 식용
- 독일에서는 옥수수 조명나방, 누에 등의 곤충을 화학 처리하여 통조림을 만들고 있는데 연 8000 톤의 곤충통조림을 생산
- 콜롬비아인들은 다양한 곤충을 먹으며, 특히 개미를 갈아 빵에 발라먹음.
- 아프리카의 몇몇 지역에서는 개미, 흰개미, 굼벵이, 메뚜기등을 먹는데 흰개미와 같은 곤충은 잡은자리에서 그대로 생식. 다른 종류는 굽거나 튀겨서 먹음.
- 필리핀에서는 왕풍뎅이, 메뚜기, 개미, 귀뚜라미, 물장군, 방아깨비, 잠자리 유충 등 다양한 곤충을 먹으며, 곤충들을 주로 튀기거나 끓여서 야채와 함께 먹음

세계 식용곤충 시장			해외 식용 곤충 기업	
10년 후 시장예측	유럽	북아메리카	해외 식용 곤충 업체들	
만구(명)	740,909,333	381,518,115	차돌	2015년 설립, 귀뚜라미로 만든 에너지바 '오리지널 크리켓 바'
식용곤충 섭취 예정 인구 비율	80%	80%	엑소	미 브라운대 출신이 창업, 귀뚜라미 단백질바 판매
주요 섭취 대상 연령(15세~44세)	40.3%	39.9%	식스푸드	3명의 여성창업자가 설립, 귀뚜라미와 쌀-콩을 원료로 만든 '침스 침' 개발
현재 식용곤충 섭취 의사가 있는 인구	52%	52%	비타푸드	유명 셰프 참여, 귀뚜라미 파우더 가미한 초콜릿 쿠키 온라인 판매
시장규모(백만달러)	121,727,728	62,059,385	어스파이어푸드 그룹	맥길대 학생 5명이 공동 창업, 멕시코와 케냐 농장 기반 식용 곤충 농장 설립
발간 1인당 식용곤충 소비금액(달러)	15/명	15/명	이더블유니크	영국 식용 곤충 전문 판매회사
시장규모 성장(십억 달러)	21.91	11.17	유럽 엔도모파지	프랑스 식용 곤충 전문 판매회사, 조리 서적도 판매
총 시장규모(십억 달러)	33		그립 키친	영국의 첫 번째 곤충 레스토랑 개업, 식용 곤충과 관련 제품 판매
출처: http://www.kalshook.com/australia/2015/05/05/			자료: 한국식용곤충연구소 자사협동조합	

(2) 국외 유산균 이용과 시장

- 기능성 식음료, 식품보조제, 가축 사료에 프로바이오틱스를 이용하기 위한 개발은 Hansen Holdings A/S (덴마크), Danone (프랑스), Nestlé S.A. (스위스)등의 유럽 회사와 일본의 Yakult Honsha Co. Ltd., 미국의 E. I. DuPont de Nemours 등이 있음
- 프로바이오틱스 재료 시장의 규모는 2015년 기준 약 미화 330억불 (한화 약 36조원)에 달하며, 2020년까지 매년 7%씩 증가하여 470억불 (한화 53조원)에 이를 것으로 예측
- BioGaia AB (스웨덴), Lifeway Foods, Inc. (미국), Probi AB (스웨덴), Nebraska Cultures Inc. (미국) Probiotics International Ltd (영국)과 같은 중소 업체들이 독자적인 엔지니어링을 통해 건강에 유익한 미생물 균주 특허를 확보하고 프로바이오틱스 시장에 진출을 시도

국내의 시장 비교		세계 프리바이오틱스 시장															
국내 프로바이오틱스 시장 규모 단위: 원 ■ 발효유 음료 ■ 프로바이오틱스 건강기능식품 1조7936억, 1조8319억, 1조7802억, 1조7198억 1조7000억, 405억, 518억, 804억, 1500억 2011, 2012, 2013, 2014년 자료: 링크아즈텍, 식품의약품안전처		글로벌 프로바이오틱스 시장 전망 단위: 원 35조, 57조 연 평균 7.6% 성장 2014, 2020년 자료: 그랜드뷰 리서치															
세계 프리바이오틱스 시장 현황 <표 25> 세계 프리바이오틱스 시장 현황 <table border="1"> <thead> <tr> <th>연도</th> <th>시장규모 (백만 달러)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>2006</td><td>351.8</td></tr> <tr><td>2007</td><td>388.4</td></tr> <tr><td>2008</td><td>447.9</td></tr> <tr><td>2009</td><td>612.8</td></tr> <tr><td>2010</td><td>677.2</td></tr> <tr><td>2011</td><td>841.8</td></tr> </tbody> </table> 연평균 시장성장률 12.8% ▶ 자료: Icon Group International, Inc.(2010g)		연도	시장규모 (백만 달러)	2006	351.8	2007	388.4	2008	447.9	2009	612.8	2010	677.2	2011	841.8		
연도	시장규모 (백만 달러)																
2006	351.8																
2007	388.4																
2008	447.9																
2009	612.8																
2010	677.2																
2011	841.8																

3) 국외 경쟁기관현황

(1) 식용 곤충 생산과 유통체계

- 국제연합식량농업기구(FAO)
- 태국 치앙마이 국제워크샵, 식용곤충의 중요성 주목(2008)
- FAO보고서, 총 2천 여종 가까운 식용 가능 곤충 리스트 발표 (2013)
- 네덜란드 와게닝겐 대학. 100만 유로 정부지원받아, 수프로2(SUPRO2)프로젝트출범(2010)
- 수프로2(SUPRO2) 프로젝트 : '인간소비를 위한 지속 가능한 곤충단백질 생산'
- 곤충 단백질 성분을 가공, 식품 및 가축사료로 개발하여 미래 식량자원으로 제안
- 영국 내 소비자 35~46% “메뚜기 먹을 의향 있다“ 약업신문 (14.8.11)/새로운 음식(Nobel Food) 법령 30여 년 만에 개정.
- 유럽연합(EU), 300만 달러 상당의 각종 곤충들이 식재료로 사용되고 있음.
- 미국 식품업체 차풀(Chapul) : 귀뚜라미로 만든 내추럴 에너지 단백질 바(bars) 제품 발매/ 콜리턴 재단 후원, 하버드 대학 졸업생들 주축 식용곤충회사 설립
- 아프리카. 중남미. 아시아 등 90여개국에서 개미. 굼벵이. 메뚜기.전갈 등 1400여종의 곤충식용

4) 지식재산권현황

- 곤충자원의 산업화 관련 특허건수는 한국, 일본, 미국이 비슷하지만 우리의 기술수준은 일본의 80% 수준이며, 국가별 특허 점 유율은 일본 379건(33%), 미국 359건(32%), 한국 314건(28%), 유럽85(7%) 등의 순서이다. 곤충산업 기술수준을 퍼센트로(%) 보았을 때 일본은 100%, 미국은 87%, 한국 80%, 중국은 68%로 보고 있다. (출처:곤충산업 현황과 전망(2013). 한국농촌경제 연구원)

5) 국외 표준화현황

- 네덜란드는 세계적인 곤충산업국으로 고품질 단백질 공급원으로서 곤충의 가치를 연구하며 사육과 관련된 표준 기술도 개발 중임
- 유럽연방 식품안전처(FASFC)와 영국의 Food Standards Agency(FSA) 는 일부 식용곤충의 사료로 쓰이는 식물이 오염된 토지 및 환경에서 흡수 한 중금속 또는 비소등의 유해물질을 곤충이 2차적으로 흡수하여 최종 사 용자인 인간이 섭취하게 될수 있는 여지가 있기에 추가적인 연구가 진행 중임(Kai Kupferschmidt, 2015).

6) 국외 기타현황

- 세계적인 추세를 살펴보면 곤충을 식의약용으로 개발하기 위한 노력은 국제기구, 국가 간방향성에 있어 다소 차이가 있다. FAO는 2003년부터 세계 여러 국가에서 식용곤충을 주제로 한 연구를 진행해 왔으며 주목적은 기아문제 해결과 농가소득의 증대다. 연구에 참여하는 국가는 전 세계를 망라하고 있으나 주 적용지역은 저개발국 위주로 인도주의적 성격이 강하다. 선진국의 경우는 곤충의 생리활성 물질을 의약용으로 개발하거나 자원 확보, 가축사료 소재개발 등에 주력
- 곤충을 식품으로 활용했던 국가와 그렇지 않았던 국가와의 연구방향에도 차이가 존재한

다. 네덜란드는 세계적인 곤충산업국으로 고품질 단백질 공급원으로서 곤충의 가치를 연구하며 사육과 관련된 기술도 개발 중에 있다. 미국의 경우 곤충을 먹던 습관이 일부 원주민 문화를 제외하면 없기 때문에 자원 확보, 사료소재 개발 등의 연구에 중점을 두고 있고 세계적인 생물, 화학기업이 몰려있기 때문에 천연물 소재의 고가 산업소재 개발에도 활발히 움직이고 있다. 덴마크는 코펜하겐대학을 중심으로 지속가능한 농업, 식품생산 및 가공 등에 대한 광범위한 연구를 수행하면서 식용곤충에 대한 연구를 진행하고 있다. 비영리 연구기관인 북유럽 식품연구소에서는 채소, 해초, 조개, 사냥동물에 대한 연구와 더불어 식용곤충 등의 야생식품 연구에 중점을 두고 있다. 태국, 라오스 등 동남아시아 국가들은 예로부터 손쉽게 얻을 수 있는 단백질 공급원으로서 개미알, 귀뚜라미, 메뚜기 등을 섭취해 왔다. 태국의 콘켄대학에서는 자국 내에서 소비되는 식용곤충의 사육방법을 중심으로 지속가능한 농업시스템과 곤충자원보존을 연구 중이다.

4. 기술개발의 독창성, 차별성 및 혁신성

(1)기술개발의 독창성 및 혁신성

- 3P 분석의 결과(2010 -2017년) 꽃벥이 관련 추출물에 대한 논문(Paper), 특허(Patent), 상품(Product) 본 제안의 식용곤충 발효 소스에 대한 예는 없음
- 국외(일본)의 곤충발효소스 10종 중 꽃벥이에 대한 예는 없음
- 효소 또는 자가소화가 아닌 효소생산, 유효기능성 물질 생산 젖산균 이용 기술개발

(2)기술개발의 차별성

- 발효기간 단축을 위한 단백질 분해효소 생산 균주를 이용하여 초단기 속성 발효기술
- 국내의 꽃벥이 된장은 기존 된장 공정에 꽃벥이가루 20-25%첨가에 의한 단순생산으로 본 과제의 발효 소스와는 차별화 됨
- 국외(일본)의 곤충발효소스는 자연발효숙성법으로 본 과제의 젖산균 활용과 차별화

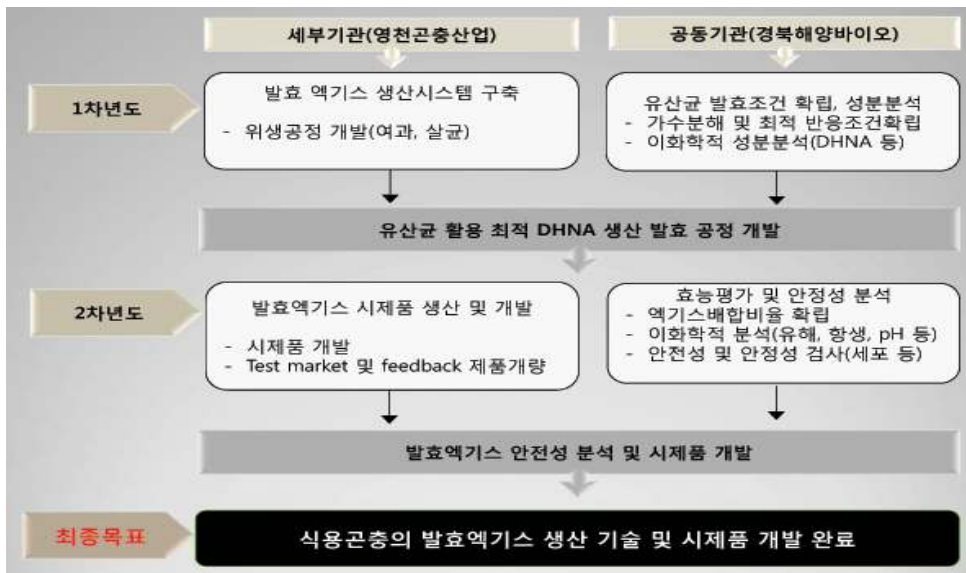
제 3 절 연구개발 범위

1. 꽃벙이 발효 액기스 시제품 개발

- 꽃벙이 발효생산 및 안정 공정 시스템 확립
 - 식품안정성 확보를 위한 위생공정 및 유통법 개발
 - 꽃벙이 발효액기스 시제품 1건 제시(협동공동)
 - 홍보 및 정책활용 1건 이상
 - 마케팅, 시장개척 및 판로개척

2. Weissella 활용 꽃벙이 액기스 발효 및 기능성 향상 기술 개발

- DHNA 생산 단기숙성 조건 확립
 - 최적 생산, 발효 공정 매뉴얼 확립
 - 웨이셀라 활용 꽃벙이 발효 기술 개발 1건
 - 특허출원 및 등록 1건 이상
 - 학술발표 2건 및 논문발표 1건 이상
 - 시제품 개발 1건 이상



제 2장 연구수행 내용 및 결과

제 1 절 연구 추진 전략

1. 연구 추진 방법

1) 참여기관

- 본 연구를 위해 유산균 및 다양한 생물 유래의 유산균 분리, 식용곤충 식품, 사료연구 및 곤충 발현 시스템을 이용한 재조합 단백질 생산에 대한 전문 기술을 보유한 환동해산업연구원(구,경북해양바이오산업연구원) 홍선미 박사팀, 식용곤충의 곤충성분을 이용한 혼합 엑기스, 다양한 건조 분말 제품 개발과 식용곤충 먹이 관련 실험 구현 가능하며 식용곤충 산업화, 기업화를 추진하는 농업회사법인 동의보균(구, 영천곤충산업)의 박정철 이사와 팀을 구성하여 진행하였다.

2) 협업 방법

- 과제의 성공을 위한 참여기관 간의 협업적, 조직적 관리를 위해 정기적인 오프라인 미팅과 워크숍을 가지면서 협업으로 진행하였다.
- 각 기관별 과제 진행사항을 투명하게 공개하였다.

3) 요구사항 수립

- 곤충사육농가, 흰점박이꽃무지 사육농가 그리고 농진청 등 전문가를 구성하여 요구사항을 청취하며 요구 사항을 수립 할 예정 이는 곤충 종자 관련 전문기관인 경상북도 농업기술센터와 타 농가와의 협업 가능.
- 곤충산업협회 및 관련 정부기관등 기자재 국산화에 대한 시장성 및 운영가능성 협의를 검토 등에 대해 제안하였다.

4) 참여기관 추진 방법

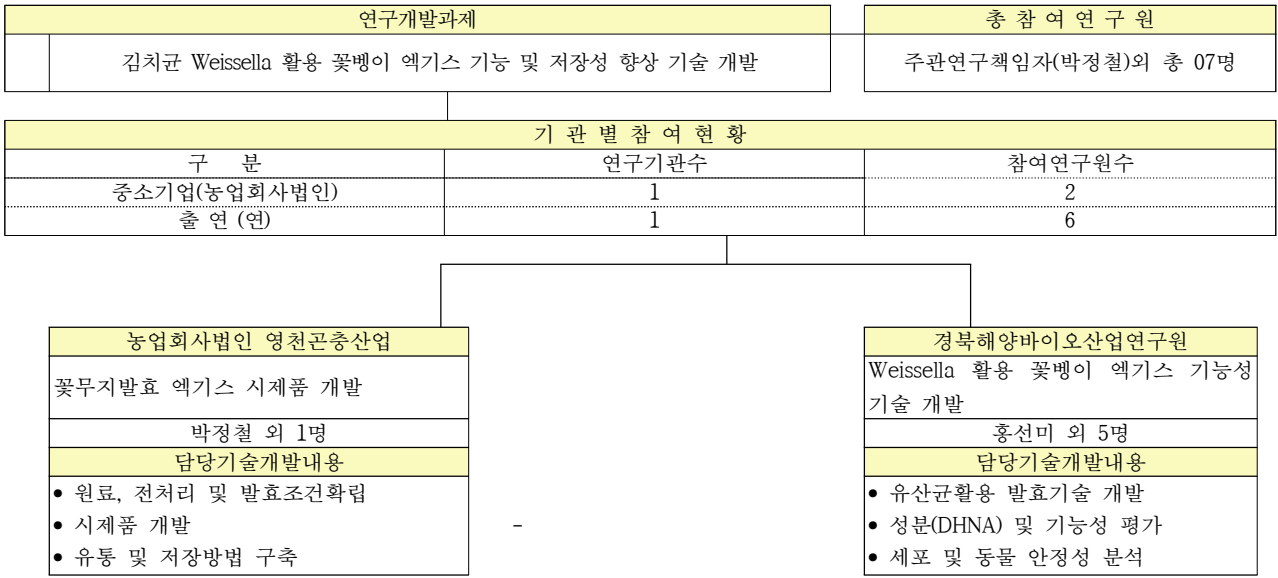
(1) 웨이셀라 활용 꽃벙이 발효물 개발 및 DHNA 생산기술(동의보균)

- 식용곤충(흰점박이꽃무지) 등을 사육하여 열풍, 동결 건조 등을 실행
- 영양성분의 추출을 위한 수세, 건조, 편치 등의 방법으로 전처리 과정 수행
- 이취와 변질 원인 또는 그 해결 방법 제시를 위해 협동기관과 공동 연구 추진
- 다양한 천연 먹이를 이용해 색, 향, 맛의 변화 식품제품으로 가능성 제시

(2) 웨이셀라 활용 꽃벙이 발효물 개발 및 DHNA 생산기술(환동해산업연구원)

- 식용곤충의 장내 미생물에서 분리한 유산균 중 항균 물질을 분비하는 균만을 스크리닝 하여 최적의 발효조건을 규명하여 재유도에 의해 식용곤충 분말의 유해 미생물의 생성을 억제하여 기술 개발
- 웨이셀라의 DHNA 생산 최적발효조건 규명
- 호기, 질소원, 탄소원등의 조검 검노체 따른 유효기능에 따른 공정법 확립
- 식용곤충 진액발효물의 안정성 및 안전성 분석(미생물, 성분, 타르색소, 세포안정성)

2. 연구 추진 체계



3. 연구 추진 일정

1차년도(2018년)																
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	꽃무지 원료 전처리														0	박정철 (영천곤충)
2	김치균활용 발효공정 및 기능평가														85,000	홍선미 (GIMB)
2차년도(2019년)																
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	시제품 생산 및 관능테스트														0	박정철 (영천곤충)
2	발효엑기스 효능, 성분 및 안정성평가														120,000	홍선미 (GIMB)

제 2 절 연구 수행 방법

1. 실험재료

흰점박이꽃무지는 동의보급 및 경북지역의 농가에서 자체 계대사육중인 개체를 대상으로 하였으며, 각 1,000마리씩 플라스틱 사육상자(40*30*30cm)에 밀기울 또는 발효톱밥을 50% 정도 채워 사육하였다. 각 유충단계를 산란기준으로 동일화하였으며, 사육 중 번데기가 만들어지게 되면 다른 사육상자로 옮겼다. 흰점박이꽃무지는 발효톱밥 수분량 유지를 위해 4일 간격으로 스프레이방식으로 사육상자당 20ml씩 공급하였고, 사육온도는 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 $35 \pm 2\%$, 광주기는 L : D = 16 : 8의 실내조건에서 사육하였다. 염장 또는 분말로 사용하기 위한 흰점박이꽃무지 3령유충은 1, 3일 또는 5일간 절식하고 절식기간에 찹쌀가루, 전분 등을 급여하여 유충 장내 이물질을 제거한 후 사용하였다.

2. 유산균 분리 및 확인

항균성 유산균의 분리를 위해 강원도(원주)와 경상북도(영천)의 농가에서 얻어진 3일 절식 된 흰점박이꽃무지와 발효톱밥을 이용하였다. 흰점박이꽃무지 생체와 발효톱밥을 0.75%의 생리 식염수에 10%(w/v)로 희석하고 원심하여 상청액을 MRS-BCP(de Man Rogosa and Shrpe, BD) 아가 배지에 접종하여 37°C 에서 1일 동안 배양했다. 유산균으로 추정되는 노란색 콜로니를 무작위로 골라 MRS broth 배지에 혼합 배양 후 다시 MRS-BCP 아가배지에서 순수 분리 하였다. 순수 분리 된 콜로니는 MRS broth 배지에 배양 후 50% 글리세롤을 더해 -20°C 저장하였다. 선택 된 콜로니는 항박테리아, 항산화 분석 후, 활성이 있는 유산균 콜로니만을 16s rDNA 분석하여 확인하였다. rDNA 분석을 위해 게놈 DNA는 Kozaki 등(1992)의 방법을 이용하였다. 유전자 증폭은 AccPower PCR premix kit(Bioneer, Korea)로 5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3' (27F)와 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' (1492R) 프라이머를 이용하여 증폭하였다. 증폭 된 PCR 산물은 ABI3730 분석기(Applied Biosystem)로 증폭하고 NCBI blast 서치를 통해 종확인하였다.

3. 흰점박이꽃무지의 열수 추출물제조

흰점박이꽃무지 분말을 제조한 후, 열수를 가해 흰점박이꽃무지 열수 추출물을 제조하였다. 흰점박이꽃무지 3령 종령을 30~35일간 키우고 2~3일동안 절식시켰다. 다음으로 죽은 흰점박이꽃무지 유충을 흐르는 물에 세척한 후, 60°C 에서 24 내지 48시간동안 열풍건조시켰다. 이때 열풍건조 방법으로 마이크로웨이브 (Milestone, USA), 동결건조 (PVTFD100R, Ilsin, Korea) 등을 사용한 건조법을 사용 할 수 있다. 건조시킨 흰점박이꽃무지 유충을 식품용 분쇄기를 사용해 1분 분쇄, 3분 휴지(열발생 방지) Cycle을 5회 반복하여 분쇄하여, 흰점박이 꽃무지 분말을 제조하였다. 열수추출물을 제조하기 위해, 흰점박이꽃무지 분말을 사용하거나 -20°C 내지 -70°C 조건에서 6개월 내지 1년간 보관한 흰점박이꽃무지 분말을 사용할 수 있다. 또는, 흰점박이꽃무지 유충을 건조하지 않고 -70°C 에서 냉동보관한 후, 물을 넣고 분쇄한 생

체를 사용할 수 있다. 제조한 흰점박이꽃무지 분말(Pb)을 사용해 열수추출물을 제조하였다. 흰점박이꽃무지 유층 분말(Pb) 100g과 물 900ml을 1 : 9 의 비율로 혼합한 후, 초음파를 750 watt, 10 kHz에서 10초 간격으로 5분간 조사하여 혼합하였다(Sonics Vibra-Cell, USA). 상기 초음파 대신에 볼텍스 챔버를 사용할 수 있다. 다음으로, 혼합물을 60℃의 열수에서 4 내지 6시간 동안 진탕 배양한 후, 배양한 추출물을 원심분리(3,000 rpm, 10분) 하고 0.45 um corning bottle-top(Sigma, USA)를 사용하여 진공 여과(vacuum filter)하여 약 800~900ml(80~90%)의 흰점박이꽃무지 열수추출물(Hotwater Extract of *Protaetia brevitarsis*, HePb)을 제조하였다. 또는, 상기 혼합물을 60℃의 열수에서 4 내지 6시간 동안 진탕 배양한 추출액을 별도의 원심분리 또는 여과과정을 거치지 않고 바로 사용할 수 있다.

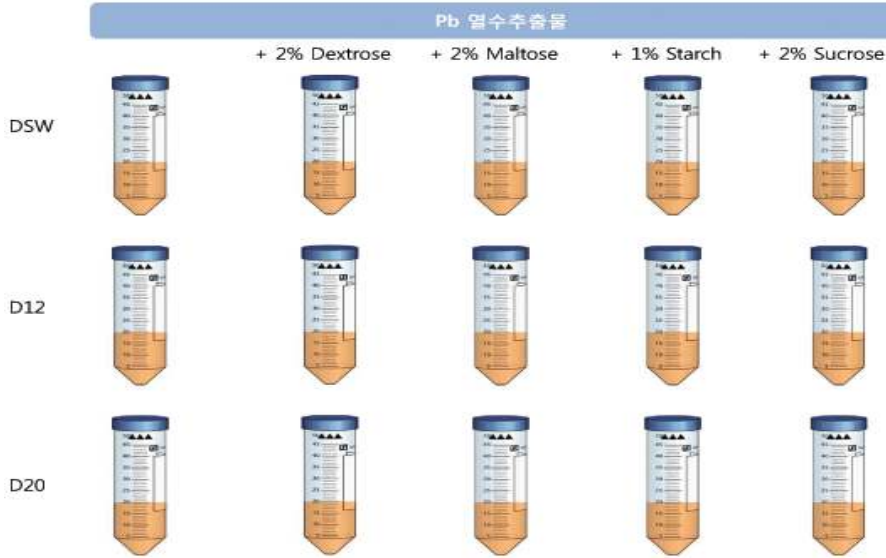
본 발명의 흰점박이꽃무지 열수 추출물은 상기 방법으로 제조한 액상의 흰점박이꽃무지 열수 추출물일 수 있으며, 흰점박이꽃무지 열수 추출물을 동결건조하고 분말화한 흰점박이꽃무지 추출물의 분말을 사용하였다.

4. 흰점박이꽃무지 진액 배합물의 제조

흰점박이꽃무지 진액배합물(PbTea)는 흰점박이꽃무지 액상 추출물 20%, 혼합식물추출액 72.12%, 및 프락토올리고당 7.88%를 추출 용기에 넣고 밀봉하여 98℃에서 6시간 이상 추출한 후, 추출액을 1um 필터로 여과하고 95℃로 예열한 후, 탈기 탱크에서 이취를 제거하여 제조하였다. 상기 혼합식물 추출액은 당귀, 천궁, 황기, 숙지황, 작약, 백출, 백봉령, 건강, 대추, 인진쑥, 헛개나무 열매, 계피, 및 감초를 각각 100g씩 혼합하여 정제수 1L에 넣고 98℃에서 열수 추출하여 제조하였다.

5. 유산균주의 흰점박이꽃무지 열수추출물과 진액의 발효 조건

흰점박이꽃무지 열수추출물과 진액배합물을 포함한 발효 원료의 발효 조건 최적화를 위해 유산균 발효 효과를 높이기 위해 탄소원 첨가 실험을 수행하였다. 유산균 배양액으로는 제조된 흰점박이꽃무지 열수추출물과 진액배합물을 각각 1L이용하였다. HePb 원료에 각각 2%(w/v) 텍스트로스(D-glucose, Sigma, USA) 80mL, 1%(w/v) 전분(starch, Sigma, USA) 80mL, 2%(w/v) 수크로오스(sucrose, Sigma, USA) 80mL, 또는 2%(w/v) 말토오스(maltose, Sigma, USA) 80mL를 첨가하여 각 배지를 제조하고, 대조군으로는 유산균 배양에 일반적으로 이용되는 MRS 배지를 이용하였다. 제조된 각각의 발효 원료에 *L.plantarum* (KCCM12299P), *W.paramesenteroides* (KCCM12300P), *W.paramesenteroides* (KCCM12301P)을 각각 1×10^8 cfu/ml 농도로 1mL씩 접종하고 30℃에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후의 LAB Counts(log cfu/ml)를 측정하여 최적 발효물 배양 조건을 확인하였다. LAB Counts는 각 배양액에 아가로스 (BD Difco, USA)를 첨가하여 제작한 고체 배지에 배양물을 1%(v/v)로 희석하여 1 ml을 LAB 플레이트에 도말 후 30℃에서 24시간 배양하여 형성된 콜로니의 수를 측정하여 수행하였다.



6. 흰점박이꽃무지 진액에서의 유산균 공발효 조건

흰점박이꽃무지 열수추출물을 포함하는 진액 배합물(PbTea) 배양액에서, 다시 전분의 유무에 따른 유산균의 공배양을 위한 최적 발효 시간 조건을 확인하였다. PbTea 또는 PbTea에 전분 1%(w/v) 80mL를 혼합한 배지(PbTea + Starch)에 3종의 유산균 *L.plantarum* (KCCM12299P), *W.paramesenteroides* (KCCM12300P, KCCM12301P)을 각각 1×10^8 cfu/ml 농도로 1mL씩 접종하고 30 °C에서 24시간동안 공배양하였다. 24, 48, 72, 및 96시간 경과 후의 LAB Counts(log cfu/ml)를 측정하여 최적 발효물 배양 조건을 확인하였다.



7. 유산균 발효에 의한 DHNA 생산 확인

흰점박이꽃무지 열수추출물(HePb) 및 상기 열수추출물에 덱스트로스, 전분, 수크로오스 또는 말토오스를 첨가한 배양액에서 3종의 유산균을 배양하여 제조한 발효물에서의 DHNA의 생성 여부를 확인하기 위해, 얇은막 크로마토그래피(Thin layer chromatography, TLC) 분석을 수행하였다. 각 배양액으로는 실시예 2-3에서 사용된 HePb 및 HePb에 덱스트로스, 전분, 수크로오스 또는 말토오스를 첨가한 배양액을 사용하였으며, TLC 수행시 양성대조군으로는 DHNA 표준품(Sigma, USA)을 이용하였다. 각 배양액에는 *L. plantarum*(KCCM12299P), *W. paramesenteroides* (KCCM12300P, KCCM12301P)를 각각 접종하여 26°C에서 호기 상태로 96시간 동안 유산균을 배양(발효)하였고, 96시간의 유산균 배양 완료 후 유산균을 10,000 내지

13,000rpm으로 원심분리하여 상청액만을 수집한 후 TLC 시료로 이용하였다. 각 유산균 배양액에 동량의 에틸아세테이트(ethyl acetate)를 첨가하여 스핀 다운 후 하부의 물을 제거하고, 상청의 에틸아세테이트 부분만을 진공 농축하였다. 농축된 부분을 메틸알코올(Methyl alcohol, MeOH) 500ul에 용해하여 제조하였으며, 상기 용매를 3ul씩 TLC 플레이트에 점적하여 사용하였다. 대조군으로는 DHNA 0.1%(w/v, 1mg/mL, 100ppm) 표준 용액을 Merck TLC silica GEL(TLC silica gel 60 F254, Merck)에 3 ul씩 점적한 후 용매로 분리하여 각 시료 내 DHNA의 유무를 확인하였다. 상기 TLC에서 분리에 사용된 용매는 메탄올(methanol):아세트산(acetic acid):물(water) 비율이 9:1:1의 부피비가 되도록 혼합하여 이용하였다. 용매 분리 후 결과는 UV램프로 발색하여 확인하였다.

8. 유산균 발효에 의한 DHNA 정량 분석

DHNA의 생성이 확인된 발효물 중 흰점박이꽃무지 열수추출물(HePb)에 별도의 탄소원 첨가물 없이 유산균을 배양하여 제조된 발효물과, HePb에 1%(w/v) 전분이 첨가된 배양액에 유산균을 배양하여 제조된 발효물의 2종에 대해 HPLC(high performance liquid chromatography)를 이용해 DHNA의 정량 분석을 실시하였다. 먼저, Lyophilized DHNA (sigma, USA) 표준물질을 이용해 DHNA 표준선을 얻었다. 실험군으로는, 실시예 1-1에서 제조된 흰점박이꽃무지 진액배합물 (PbTea) 또는 상기 PbTea 1L에 1%(w/v) 전분 80mL를 첨가하여 제조된 배양액 (PbTea + Starch) 20 mL에 *L. plantarum*과 2종의 *W. paramesenteroides* 균주를 각각 1×10^8 cfu/ml농도로 1mL씩 접종한 후 26°C에서 호기 조건으로 72 시간 배양하여 제조된 발효물과, 흰점박이꽃무지 열수추출물 (HePb) 또는 상기 HePb 1L에 1%(w/v) 전분 80mL를 첨가하여 제조된 배양액(HePb + Starch) 20 mL에 *L. plantarum*과 2종의 *W. paramesenteroides* 균주를 각각 1×10^8 cfu/ml농도로 1mL씩 접종한 후 26°C에서 호기적인 조건으로 72 시간 배양하여 제조된 발효물을 이용하였다. 상기 발효물에서 상청액 20 mL만을 취하여 30 내지 35°C의 진공회전증발농축기(Eyela, Japan)로 농축하였다. 농축된 각 시료 2 mL에 4 mL 메탄올을 혼합하고 항산화제로 sodium-ascorbate(Sigma, USA)를 최종농도 0.2%(w/v)가 되도록 12 uL 첨가하였다. 상기 혼합물을 10분 정도 볼텍스하고, 3,600 rpm으로 4°C, 10분 동안 원심분리하여 상등액만을 회수하여 30 내지 35°C의 진공회전증발농축기(Eyela, Japan)로 200 uL로 농축하였다. 농축액 200 uL에 메탄올(Methyl alcohol) 400ul를 혼합한 후 주사필터(0.45 um: sartorous, Germany)로 여과하여 그 여액을 HPLC 분석용 시료로 사용하였다. HPLC용 컬럼은 Agilent HC-C18(4.6 x 150 mm, 5 um; Agilent Tech, USA)를 사용하였고 이동상 용액은 아세토니트릴(acetonitrile): 메탄올(methanol): 물(water): 아세트산(acetic acid)의 부피비가 15:25:225:0.1가 되도록 혼합하여 사용하였으며 암모니아수 (ammonium hydroxide: Sigma, USA)를 이용하여 pH 를 5.5로 조정하였다. 컬럼의 온도는 45°C로 유지시켰으며 유속은 1ml/min으로 하였고, 시료 주입량과 검출과장은 각각 20 ul와 254 nm로 하였다.

흰점박이꽃무지 진액 배합물 (PbTea) 및 상기 배합물에 1%(w/v)의 전분(Starch)가 첨가된 혼합물(PbTea+Starch)의 두 가지 시료에 대해 *L. plantarum* (KCCM12299P) 및 2종의 *W. paramesenteroides* (KCCM12300P, KCCM12301P)를 각각 접종해 배양하여, 발효물을 제조한 후, 각 발효물 내에서의 DHNA 생성 여부를 얇은 막 크로마토그래피(TLC)를 이용해 확인하였다. PbTea 또는 PbTea+Starch에 각각 *L. plantarum* (KCCM12299P) 및 2종의 *W.*

paramesenteroides (KCCM12300P, KCCM12301P)를 개별적으로 접종하여 26°C에서 호기 상태로 72시간 또는 96시간 동안 배양해 발효물을 제조하였다. 발효물은 TLC 분석을 위해 상기 실시예 3-1과 실질적으로 동일한 방법으로 TLC 분석용 시료를 제조하였으며, 대조군으로는 DHNA 0.1%(w/v, 100ppm) 표준 용액을 사용하였다. 각 시료와 대조군은 Merck TLC silica GEL(TLC silica gel 60 F254, Merck)에 3 µl씩 점적한 후 용매로 분리하여 각 시료 내 DHNA의 유무를 확인하였다. TLC 분석 방법은 흰점박이꽃무지 열수추출물과 같은 방법으로 하였다.

다음으로, PbTea 또는 상기 PbTea에 1%(w/v) 전분(Starch)이 첨가된 혼합물(PbTea+Starch)에 3종의 유산균을 공접종하여 발효 배양한 발효물 내에서 발효 시간의 경과(48시간, 72시간 및 96시간)에 따른 DHNA 생성량을 TLC 분석으로 확인하였다. PbTea 및 PbTea+Starch에 *L.plantarum* (KCCM12299P) 및 2종의 *W. paramesenteroides* (KCCM12300P, KCCM12301P)를 함께 접종하여 26°C에서 호기 상태로 48시간, 72시간, 또는 96시간 배양하여 각 발효물을 제조하였다. 대조군으로는 DHNA 표준품(Sigma, USA)의 0.5%(w/v, 500ppm) 용액을 이용하였다. TLC 분석은 상기 실시예 3-3과 실질적으로 동일한 방법으로 수행되었으며, 전개 용매로는 메탄올:물:아세트산 (methanol: water :acetic acid)을 7:3:1의 부피비로 혼합하여 사용하였고, 고정상으로는 TLC(TLC silica gel 60 RP-18 F254, Merck)를 이용하였다.

9. DHNA 함유 발효물의 항산화 기능성 확인

DHNA의 생산능이 확인된 발효 원료 중, HePb에 1%(w/v) 전분(Starch, Sigma, USA) 80ml이 첨가된 혼합물(HePb+Starch), 흰점박이꽃무지 진액 배합물(PbTea), 및 상기 PbTea에 1%(w/v) 전분(Starch, Sigma, USA) 80ml이 첨가된 혼합물(PbTea+Starch)에 각각 *L.plantarum* (KCCM12299P), *W.paramesenteroides* (KCCM12300P, KCCM12301P) 3종의 유산균을 1:1:1의 비율로 공접종하여 발효 배양하여 제조한 발효물의 항산화 기능을 DDPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 자유라디칼 소거 활성 분석을 이용해 확인하였다. 각 발효물은 공접종 후 26°C에서 24, 48, 또는 72시간 동안 유산균 배양을 수행하여 동결건조물로 제조되었으며, 각 제조된 발효물의 동결건조물은 10 mg/mL 농도로 제조하여 0.75%(w/v) NaCl용액에 희석해 1%(v/v) DDPH 분석용 시료로 이용하였다. 저장(Stock) 용액(100mM Tri-HCl, pH 7.4)은 메탄올 1mM에 DPPH를 용해하여 제조하였으며, 분석 실험에서는 100 µM 농도로 희석해 사용하였다. 이어서, 96 웰 플레이트에 앞서 제조한 1%(w/v) 농도의 각각의 시료용액을 10µl씩 분주하고, 대조군으로는 비타민 C(ascorbic acid, sigma)를 사용하였다. 웰 플레이트에 100 µM DPPH를 100 µl씩 첨가하고 차광한 후에 실온에서 10 내지 30 분간 반응을 수행하였다. 이후 517 nm 파장의 빛을 조사해 각 샘플의 흡광도를 측정하였으며, 음성 대조군으로는 메탄올 또는 물에 100uL DPPH를 처리하여 흡광도를 측정하여 영점 처리를 수행하였다. 상기 흡광도를 이용해 하기 수학적 1을 이용해 DPPH 억제율(scavenging activity, %)을 측정하여 발효 시간에 따른 항산화 효과의 변화를 확인하였다.

[수학식 1]

$$\text{DPPH 억제율(scavenging activity, \%)} = (1 - \text{OD sample} / \text{OD blind}) \times 100$$

상기 수학식 1에서, OD sample은 각 시료(샘플)에서의 흡광도 값을, OD blind는 음성 대조군에서의 흡광도 값을 의미한다.

10. 비피도박테리움 균주에 대한 성장 촉진 분석

비피도박테리움 속(*Bifidobacterium* sp.) 균은 대표적인 장내 유익균으로, 주로 대장에 분포하며 대장균의 증식 억제, 배변활동 강화 등에 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 30% 이상의 항산화 효과를 보인 흰점박이꽃무지의 진액 배합물(PbTea)과 1%(w/v) 전분 포함 PbTea(PbTea+Starch)의 각 유산균 발효물이 비피도박테리움 속 균주에 대한 성장 촉진 기능(Bifidogenic Growth Stimulation, BGS)을 갖는 지 여부를 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 상기 각 발효물은 PbTea 또는 PbTea+Starch를 원료로 하여 *L.plantarum* (KCCM12299P) 및 2종의 *W. paramesenteroides* (KCCM12300P, KCCM12301P) 3종의 유산균을 모두 공접종하여 26°C에서 48시간, 72시간, 또는 96시간 동안 발효하여 제조하였다. 각 발효물은 3,600rpm으로 4°C, 10분 동안 원심분리한 후 주사 필터로(0.45 μm, Millipore, USA) 필터링하여 발효에 이용된 유산균을 제거한 필터액을 준비하였다.

시험 대상이 되는 비피도박테리움 속 균주로는 비피도박테리움 롱검(*Bifidoacterium longum*, KCCM11207), 비피도박테리움 비피덤(*Bifidobacterium bifidum*, KCCM3202) 및 비피도박테리움 브레브(*Bifidobacterium breve*, KCCM3220)를 이용하였으며, 각 비피도박테리움 속 균주는 RCM(Reinforced Clostridial Medium, Difco, USA) 배지 20mL에서 1×10^8 cfu/ml 농도로 1mL씩 접종한 후 37°C에서 24시간 동안 전배양(pre-culture)하였다.

RCM 배지 5ml에 상기 준비된 발효물의 필터액 100ul를 첨가한 후, 전배양된 비피도박테리움 속 균주를 각각 2%(v/v, 100ul) 접종하여 37°C에서 10시간 동안 배양하여, 2, 4, 6, 8 또는 10시간 쯤에 각 비피도박테리움 속 균주의 성장(Growth)을 600nm에서 흡광도를 측정하여 (OD600) 조건에 따른 성장도를 비교하였다. 대조군으로는 표준 DHNA 0.01%(w/v) 용액을 RCM 배지에 첨가한 후 각 비피도박테리움 속 균주를 배양하였다.

11. 흰점박이꽃무지 추출물과 진액발효물의 세포주 독성 실험

흰점박이꽃무지 염장 발효물의 안전성을 확인하기 위해, 마우스 세포주인 Raw264.7 cell(ATCC TIB-71), B16F10 세포, 인간 비만 세포 3T3-L1(ATCC CRL-3242) 세포주에서 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 독성 실험을 수행하였다. 구체적으로, 실험에 이용된 Raw264.7 cell 세포주는 10%(v/v) 소태아혈청(fetal bovine serum), 및 1%(w/v) Penicillin-streptomycin이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's Medium(DMEM) 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 구체적으로, 실험에 이용된 Raw264.7 cell 세포주는 10%(v/v) 소태아혈청(fetal bovine serum), 및 1%(w/v) Penicillin-streptomycin이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's Medium(DMEM) 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

12. 흰점박이꽃무지 추출물과 진액발효물의 당도, 염도, 및 pH 분석

흰점박이꽃무지 추출물과 진액발효물의 pH와 염도는 흰점박이꽃무지 염장 발효물 및 대조군 액젓을 1/10으로 물에 희석한 다음, pH meter(Pettler Tolendo, USA) 및 염도측정기 (PTAGO salt meter, USA)를 이용하여 측정하였다. 당도는 희석 과정 없이 원액 그대로를 당도계 (ATAGO Refractometer, USA)로 측정하였다.

13. 흰점박이꽃무지 진액 배합물의 파일릿 배양

흰점박이꽃무지 진액배합물(PbTea)는 흰점박이꽃무지 액상 추출물 20%, 혼합식물추출액 72.12%, 및 프락토올리고당 7.88%를 추출 용기에 넣고 밀봉하여 98℃에서 6시간 이상 추출한 후, 추출액을 1um 필터로 여과하고 95℃로 예열한 후, 탈기 탱크에서 이취를 제거하여 제조하였다. 상기 혼합식물 추출액은 당귀, 천궁, 황기, 숙지황, 작약, 백출, 백봉령, 건강, 대추, 인진쑥, 헛개나무 열매, 계피, 및 감초를 각각 100g씩 혼합하여 정제수 1L에 넣고 98℃에서 열수 추출하여 제조하였다. 대량배양을 위해 3L배양 실험을 통해 발효조건을 확인하고 100L배양하여 시제품을 제작하였다.



제 3 절 연구수행 내용 및 결과

1. 흰점박이꽃무지 열수추출물과 진액에서의 유산균 배양

유산균 배양액(발효 원료)으로는 실시예 1에서 제조된 흰점박이꽃무지 열수추출물(HePb)과 상기 열수추출물과 혼합식물 추출액의 배합물(PbTea)을 각각 1L 이용하였다. 상기 HePb 원료에 각각 2%(w/v) 텍스트로스(D-glucose, Sigma, USA) 80mL, 1%(w/v) 전분(starch, Sigma, USA) 80mL, 2%(w/v) 수크로오스(sucrose, Sigma, USA) 80mL, 또는 2%(w/v) 말토오스(maltose, Sigma, USA) 80mL를 첨가하여 각 배지를 제조하고, 대조군으로는 유산균 배양에 일반적으로 이용되는 MRS 배지를 이용하였다. 각각의 발효 원료에 *L.plantarum* (KCCM12299P), *W.paramesenteroides* (KCCM12300P), *W.paramesenteroides* (KCCM12301P)을 각각 1×10^8 cfu/ml 농도로 1mL씩 접종하고 30°C에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후의 LAB Counts(log cfu/ml)를 측정하여 최적 발효물 배양 조건을 확인하였다. LAB Counts는 각 배양액에 아가로스 (BD Difco, USA)를 첨가하여 제작한 고체 배지에 배양물을 1%(v/v)로 희석하여 1 ml을 LAB 플레이트에 도말 후 30°C에서 24시간 배양하여 형성된 콜로니의 수를 측정하여 수행하였다. 각 배양액에서의 유산균 배양 후 LAB Counts 측정결과를 표 1에 나타냈다.

[표 1] 탄소원 첨가에 따른 유산균 수

배양액	유산균	LAB Counts (log cfu/ml)
MRS (대조군)	<i>L. plantarum</i> KCCM12299P	6.26×10^9
	<i>W. paramesenteroides</i> KCCM12300P	3.0×10^8
	<i>W. paramesenteroides</i> KCCM12301P	1.11×10^9
열수추출물(HePb)	<i>L. plantarum</i> KCCM12299P	8.0×10^3
	<i>W. paramesenteroides</i> KCCM12300P	3.21×10^2
	<i>W. paramesenteroides</i> KCCM12301P	3.21×10^2
HePb + 2% 텍스트로스	<i>L. plantarum</i> KCCM12299P	2.7×10^{11}
	<i>W. paramesenteroides</i> KCCM12300P	5.7×10^9
	<i>W. paramesenteroides</i> KCCM12301P	3.17×10^8
HePb + 1% 전분	<i>L. plantarum</i> KCCM12299P	5.10×10^{11}
	<i>W. paramesenteroides</i> KCCM12300P	8.10×10^9
	<i>W. paramesenteroides</i> KCCM12301P	1.90×10^{11}
HePb + 2% 수크로오스	<i>L. plantarum</i> KCCM12299P	2.10×10^{12}
	<i>W. paramesenteroides</i> KCCM12300P	1.40×10^{13}
	<i>W. paramesenteroides</i> KCCM12301P	1.10×10^{11}
HePb + 2% 말토오스	<i>L. plantarum</i> KCCM12299P	1.90×10^{11}
	<i>W. paramesenteroides</i> KCCM12300P	7.30×10^9
	<i>W. paramesenteroides</i> KCCM12301P	1.20×10^{13}
PbTea	<i>L. plantarum</i> KCCM12299P	2.40×10^{15}
	<i>W. paramesenteroides</i> KCCM12300P	3.50×10^{13}
	<i>W. paramesenteroides</i> KCCM12301P	4.00×10^{14}

MRS 배지에 *L.plantarum*을 접종한 경우, 24시간동안 배양한 후 LAB Counts가 $6.26 \times 10^9/\text{ml}$ ($6.26\text{E}+09$)로 측정되었으나, *W. paramesenteroides* KCCM12301P의 경우 $4.53 \times 10^8/\text{ml}$ ($4.53\text{E}+08$)로 측정되었다. 덱스트로스를 포함하지 않는 HePb 배지에 *L. plantarum*을 접종하고 24시간동안 배양한 배양물의 유산균 수는 $8.0 \times 10^3/\text{ml}$ ($8.0\text{E}+03$)에 불과했으며, *W. paramesenteroides*를 접종한 경우에도 기탁번호 KCCM12300P 및 KCCM12301P 균주 모두 유산균 수가 $3.21 \times 10^2/\text{ml}$ ($3.21\text{E}+02$)정도의 증식에 그쳤다.

반면, 덱스트로스, 전분, 수크로오스, 말토오스와 HePb 를 포함하는 배지에 *L. plantarum* 을 접종하고 24시간동안 배양한 배양물의 유산균 수는 각각 $2.7 \times 10^{11}/\text{ml}$ ($2.7\text{E}+11$), $5.10 \times 10^{11}/\text{ml}$ ($5.1\text{E}+11$), $2.10 \times 10^{12}/\text{ml}$ ($2.1\text{E}+12$), $1.90 \times 10^{12}/\text{ml}$ ($1.9\text{E}+11$)로 증식이 활발히 일어났다. *W. paramesenteroides* KCCM12300P 를 접종한 경우에 덱스트로스, 전분, 수크로오스, 말토오스 첨가한 배양물의 유산균 수는 각각 $3.17 \times 10^8/\text{ml}$ ($3.17\text{E}+08$), $8.1 \times 10^9/\text{ml}$ ($8.1\text{E}+09$), $1.40 \times 10^{13}/\text{ml}$ ($1.4\text{E}+13$), $7.30 \times 10^9/\text{ml}$ ($7.3\text{E}+09$)이고, *W. paramesenteroides* KCCM12301P를 접종하고 덱스트로스, 전분, 수크로오스, 말토오스 첨가한 배양물의 유산균 수는 각각 $5.7 \times 10^9/\text{ml}$ ($5.7\text{E}+09$), $1.9 \times 10^{11}/\text{ml}$ ($1.9\text{E}+11$), $1.10 \times 10^{11}/\text{ml}$ ($1.1\text{E}+11$), $1.20 \times 10^{13}/\text{ml}$ ($1.2\text{E}+13$)으로 탄소원이 첨가되지 않은 흰점박이꽃무지 추출물(HePb) 보다 증식이 활발하였다.

따라서, 덱스트로스, 전분, 수크로오스, 말토오스 등의 탄소원과 흰점박이꽃무지 추출물을 포함하는 배지가 탄소원을 첨가하지 않은 배지보다 유산균의 생장을 현저히 증가시킴을 확인할 수 있었다.

또한, 흰점박이꽃무지 열수추출물과 혼합 식물 추출물의 배합물(PbTea)을 24시간 배양한 후 LAB Counts가 $2.40 \times 10^{15}/\text{ml}$ ($2.40\text{E}+15$)로 측정되었고, *W. paramesenteroides* KCCM12300P, KCCM12301P 의 경우 각각 $3.50 \times 10^{13}/\text{ml}$ ($3.50\text{E}+13$), $4.00 \times 10^{14}/\text{ml}$ ($4.00\text{E}+14$)로 측정되었다. 이에, PbTea의 유산균 발효한 경우, 덱스트로스, 전분, 수크로오스, 말토오스의 탄소원과 HePb 를 포함하는 배지보다 30°C 에서 24시간 동안 유산균 증식이 더 활발하여 유산균 배양에 적절함을 확인할 수 있었다(그림 1).

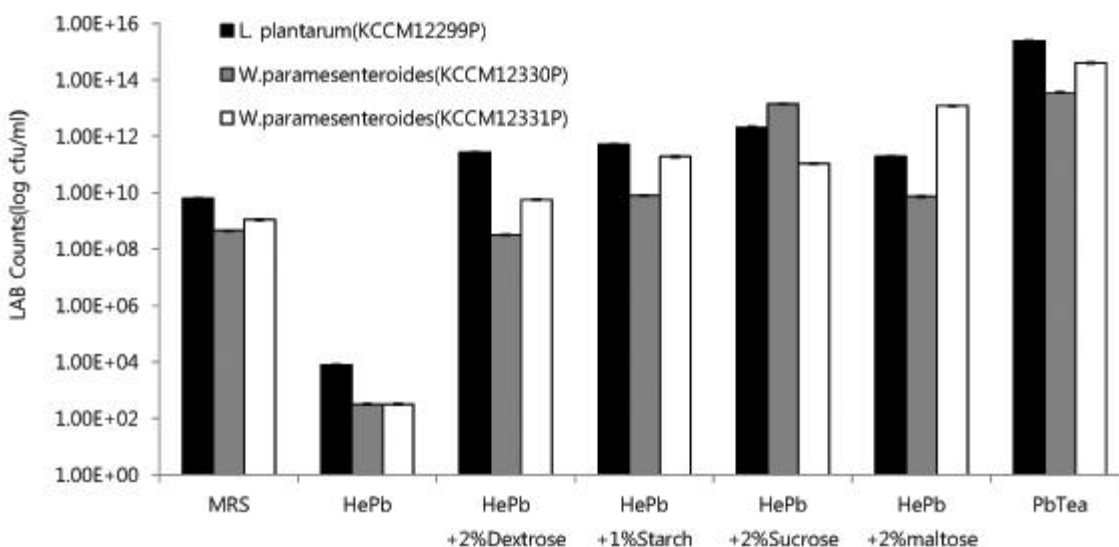


그림 1. 유산균 발효시 유산균 생균수(LAB Counts, log cfu/ml)를 측정. 흰점박이꽃무지의 열수추출물(HePb)과 상기 HePb에 탄소원을 첨가한 경우 및 흰점박이꽃무지 진액 배합물(PbTea)

2. 흰점박이꽃무지 진액에서의 탄소원 첨가 유무에 따른 유산균 배양

상기 PbTea 또는 PbTea에 전분 1%(w/v) 80mL를 혼합한 배지(PbTea + Starch)에 3종의 유산균 *L.plantarum* (KCCM12299P), *W.paramesenteroides* (KCCM12300P, KCCM12301P)을 각각 1×10^8 cfu/ml 농도로 1mL씩 접종하고 30 °C에서 24시간동안 공배양하였다. 24, 48, 72, 및 96시간 경과 후의 LAB Counts(log cfu/ml)를 측정하여 최적 발효물 배양 조건을 확인하였으며, 측정결과를 도 2 및 하기 표 2에 나타냈다.

[표 2] 진액에서의 탄소원 첨가에 따른 유산균 수

배양배지	배양 시간별 LAB Counts (log cfu/ml)			
	24h	48h	72h	96h
PbTea	3.9×10^{14}	1.1×10^{15}	1.8×10^{13}	1.0×10^9
PbTea + Starch	5.1×10^{14}	1.7×10^{15}	1.3×10^{14}	9.3×10^{12}

PbTea 배지에 3종의 유산균을 접종한 경우, 24, 48시간 및 72 시간 동안 배양한 후 LAB Counts가 $3.9 \times 10^{14}/\text{ml}$ ($3.9\text{E}+14$), $1.1 \times 10^{15}/\text{ml}$ ($1.1\text{E}+15$), $1.8 \times 10^{13}/\text{ml}$ ($1.8\text{E}+13$)로 측정되었으나, 96 시간 배양이 이루어진 경우에는 $1.0 \times 10^9/\text{ml}$ ($1.0\text{E}+09$)로 측정되어 생균수가 감소하였다. 녹말이 포함된 PbTea + starch 배지에서는 24, 48, 72 시간 및 96시간동안 $5.1 \times 10^{14}/\text{ml}$ ($5.1\text{E}+14$), $1.7 \times 10^{15}/\text{ml}$ ($1.7\text{E}+15$), $1.3 \times 10^{14}/\text{ml}$ ($1.3\text{E}+14$) 및 $9.3 \times 10^{12}/\text{ml}$ ($9.3\text{E}+12$)로 시료 5의 96시간에 비교하여 더 많은 생균수가 확인 되었다.

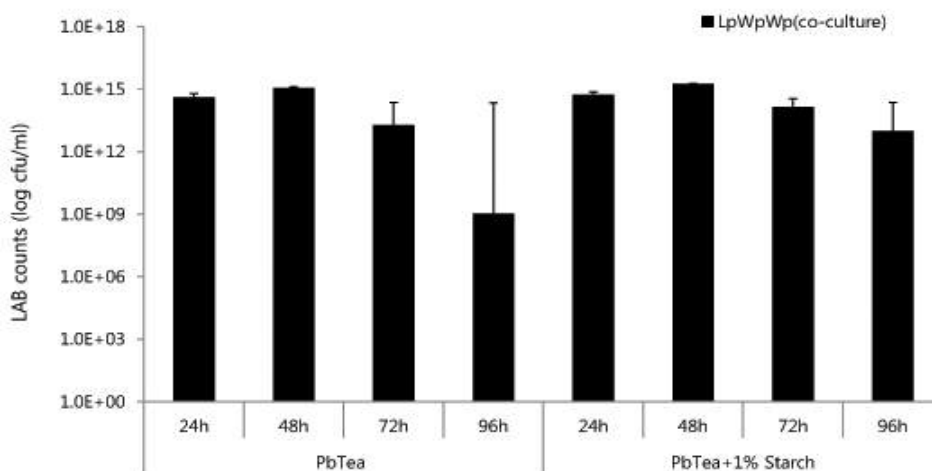


그림 2. 흰점박이꽃무지 진액 배합물(PbTea) 및 상기 PbTea에 전분을 첨가한 발효 원료에 유산균 3종을 접종 후 발효 시간에 따른 유산균 생균수(LAB Counts, log cfu/ml)

3. 흰점박이꽃무지 진액에서 유산균 배양 후 유해미생물 확인

흰점박이꽃무지 진액 배양물의 동결건조 분말을 채용해하여 리스테리아, 황색포도상구균, 대장균, 효모 및 곰팡이에 대해 조사하였다(그림 3). 흰점박이꽃무지 진액 배양물에서는 대장균, 황색포도상구균, 리스테리아, 효모 곰팡이류가 확인되었고 열수추출물에 있어서도 황색포도상구균이 소수 확인되었다. 추출배양물의 경우 기타 미생물의 경우도 확인되지 않았다.






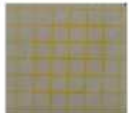














	AC (일반세균)	EL (환경리스테리아)	STX (황색포도상구균)	CC (대장균)	YM (효모&곰팡이)
Pb-Tea +1% starch					
Pb-Tea +1% starch 24h					
Pb-Tea +1% starch 48h					
Pb-Tea +1% starch 72h					

그림 3. 흰점박이꽃무지 진액 배합물(PbTea) 유산균 3종을 접종 후 미생물 확인

4. 흰점박이꽃무지 추출 유산균배양물에서의 DHNA 확인

흰점박이꽃무지 열수추출물(HePb) 및 상기 열수추출물에 덱스트로스, 전분, 수크로오스 또는 말토오스를 첨가한 배양액에서 3종의 유산균을 배양하여 제조한 발효물에서의 DHNA의 생성 여부를 확인하기 위해, 얇은막 크로마토그래피(Thin layer chromatography, TLC) 분석을 수하였다. 각 배양액으로는 실시예 2-3에서 사용된 HePb 및 HePb에 덱스트로스, 전분, 수크로스 또는 말토오스를 첨가한 배양액을 사용하였으며, TLC 수행시 양성대조군으로는 DHNA 표준품(Sigma, USA)을 이용하였다.

각 배양액에는 *L. plantarum*(KCCM12299P), *W. paramesenteroides* (KCCM12300P, KCCM12301P)를 각각 접종하여 26°C 또는 30°C에서 호기 상태로 96시간 동안 유산균을 배양(발효)하였고, 96시간의 유산균 배양 완료 후 유산균을 10,000 내지 13,000rpm으로 원심분리하여 상청액만을 수집한 후 TLC 시료로 이용하였다. 각 유산균 배양액에 동량의 에틸아세테이트(ethyl acetate)를 첨가하여 스핀 다운 후 하부의 물을 제거하고, 상청의 에틸아세테이트 부분만을 진공 농축하였다. 상기 농축된 부분을 메틸알코올(Methyl alcohol, MeOH) 500ul에 용해하여 제조하였으며, 상기 용매를 3ul씩 TLC 플레이트에 점적하여 사용하였다. 대조군으로는 DHNA 0.1%(w/v, 1mg/mL, 100ppm) 표준 용액을 Merck TLC silica GEL(TLC silica gel 60 F254, Merck)에 3 ul씩 점적한 후 용매로 분리하여 각 시료 내 DHNA의 유무를 확인하였다. 상기 TLC에서 분리에 사용된 용매는 메탄올(methanol):아세트산(acetic acid):물(water) 비율이 9:1:1의 부피비가 되도록 혼합하여 이용하였다. 용매 분리 후 결과는 UV램프로 발색하여 확인하였으며, 그림 4와 5에 발색 결과 사진을 나타내었다.

그림 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 덱스트로스가 첨가된 HePb 배양액 및 전분이 포함된 HePb 배양액에서는 *L. plantarum* (KCCM12299P), *W. paramesenteroides* (KCCM12300P), *W. paramesenteroides* (KCCM12301P)의 각 배양액에서 DHNA가 약하게 확인되었으나, 수크로오스와 말토오스를 첨가한 HePb 배양액 시료에서는 DHNA가 확인되지 않았다.

그림 5에서 확인 가능한 바와 같이, 발효 흰점박이꽃무지 추출액의 DHNA 함량과 비교하여, 각각 유산균 배양이 덱스트로스와 전분이 첨가된 상태에서 30°C에서 72, 96시간 26°C에서 48, 72, 96시간 동안 수행하여 얻은 시료에서 DHNA 생성이 정성적으로 확인되었다.

Culture	aerobic/30°C /120h															
Carbon	D H N A	PbHe 1% Starch			PbHe 2% Sucrose			PbHe 2% Dextrose			PbHe 2% Maltose			PbHe		
Strain		Lp	Wp	Wp	Lp	Wp	Wp	Lp	Wp	Wp	Lp	Wp	Wp	Lp	Wp	Wp
TLC Silca gel 60 F254 (Merck)																

그림 4. 흰점박이꽃무지의 열수추출물(HePb)유산균의 탄소원 첨가에 따른 발효물에서 DHNA 크로마토그래피(TLC)

Culture	aerobic/30°C /24h				aerobic/30°C /48h				aerobic/30°C /72h				aerobic/30°C /96h			
LAB	D	Lp	Wp D12	Wp D20	D	Lp	Wp D12	Wp D20	D	Lp	Wp D12	Wp D20	D	Lp	Wp D12	Wp D20
Media	D	M	W	P	D	M	W	P	D	M	W	P	D	M	W	P
TLC Silca gel 60 F254 (Merck)																

Culture	aerobic/26°C /24h				aerobic/26°C /48h				aerobic/26°C /72h				aerobic/26°C /96h			
LAB	D	Lp	Wp D12	Wp D20	D	Lp	Wp D12	Wp D20	D	Lp	Wp D12	Wp D20	D	Lp	Wp D12	Wp D20
Media	D	M	W	P	D	M	W	P	D	M	W	P	D	M	W	P
TLC Silca gel 60 F254 (Merck)																

그림 5. 흰점박이꽃무지의 열수추출물(HePb)유산균 발효물에서 DHNA 크로마토그래피(TLC)
D, DHNA 표준품; M, MRS 배지; W, whey 배지; P, 흰점박이꽃무지 열수추출물

5. 흰점박이꽃무지 진액 유산균배양물에서의 DHNA 확인

제조된 배합물 (PbTea) 및 상기 배합물에 1%(w/v)의 전분(Starch)가 첨가된 혼합물 (PbTea+Starch)의 두 가지 시료에 대해 *L.plantarum* (KCCM12299P) 및 2종의 *W. paramesenteroides* (KCCM12300P, KCCM12301P)를 각각 접종해 배양하여, 발효물을 제조한 후, 각 발효물 내에서의 DHNA 생성 여부를 얇은 막 크로마토그래피(TLC)를 이용해 확인하였다. 구체적으로, PbTea 또는 PbTea+Starch에 각각 *L.plantarum* (KCCM12299P) 및 2종의 *W. paramesenteroides* (KCCM12300P, KCCM12301P)를 개별적으로 접종하여 26°C에서 호기 상태로 72시간 또는 96시간 동안 배양해 발효물을 제조하였다.

발효물은 TLC 분석을 위해 상열수추출물과 실질적으로 동일한 방법으로 TLC 분석용 시료를 제조하였으며, 대조군으로는 DHNA 0.1%(w/v, 100ppm) 표준 용액을 사용하였다. 각 시료와 대조군은 Merck TLC silica GEL(TLC silica gel 60 F254, Merck)에 3 µl씩 점적한 후 용매로 분리하여 각 시료 내 DHNA의 유무를 확인하였다. TLC 분석 방법은 열수추출물과 실질적으로 동일한 방법으로 수행되었다.

그림 6에 UV 램프로 발색 확인한 TLC 결과를 나타내었다. PbTea의 발효물에서도 일부 DHNA가 확인되었으나, PbTea+Starch 발효물에서 유산균의 종류에 관계없이 PbTea 발효물에 비해 보다 높은 DHNA 함량이 확인되었다.

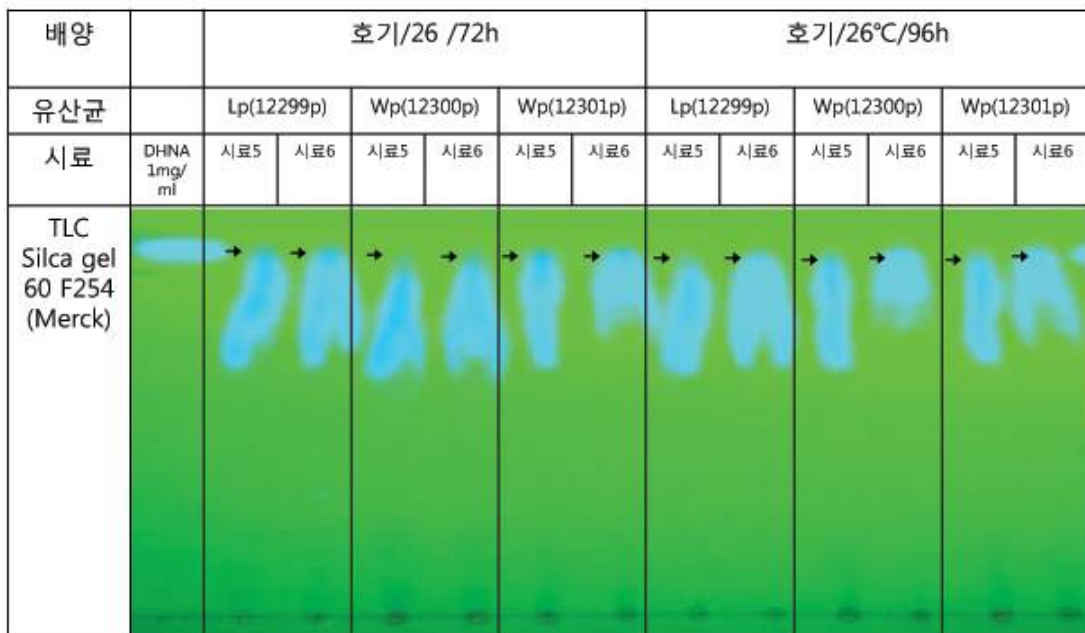


그림 6. 흰점박이꽃무지 진액 배합물(PbTea)에 3종의 유산균을 공접종하여 제조된 각 발효물에서의 발효 시간에 따른 DHNA 함량의 변화를 확인한 TLC 결과

6. 흰점박이꽃무지 추출물과 진액 유산균배양물에서의 DHNA 정량

DHNA의 생성이 확인된 발효물 중 흰점박이꽃무지 열수추출물(HePb)에 별도의 탄소원 첨가물 없이 유산균을 배양하여 제조된 발효물과, HePb에 1%(w/v) 전분이 첨가된 배양액에 유산균을 배양하여 제조된 발효물의 2종에 대해 HPLC(high performance liquid chromatography)를 이용해 DHNA의 정량 분석을 실시하였다.

HPLC용 컬럼은 Agilent HC-C18(4.6 x 150 mm, 5 um; Agilent Tech, USA)를 사용하였고 이 동상 용액은 아세토니트릴(acetonitrile): 메탄올(methanol): 물(water): 아세트산(acetic acid)의 부피비가 15: 25:225:0.1가 되도록 혼합하여 사용하였으며 암모니아수 (ammonium hydroxide: Sigma, USA)를 이용하여 pH 를 5.5로 조정하였다. 컬럼의 온도는 45℃로 유지시켰으며 유속은 1ml/min으로 하였고, 시료 주입량과 검출파장은 각각 20 ul와 254 nm로 하였다. 그림 5에 HPLC 결과 그래프를, 하기 표 3에 각 조건별 DHNA 함량을 나타내었다.

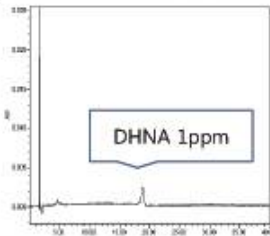
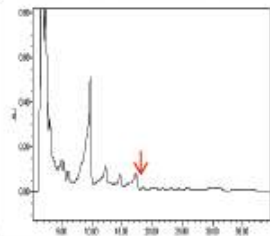
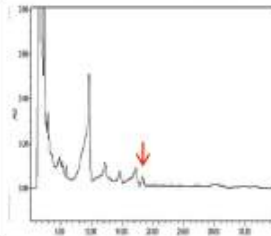
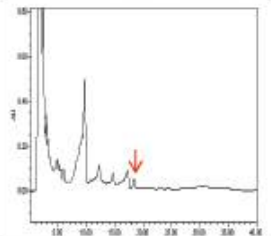
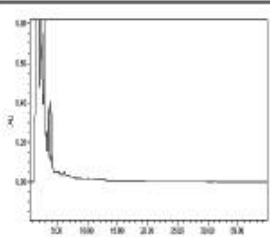
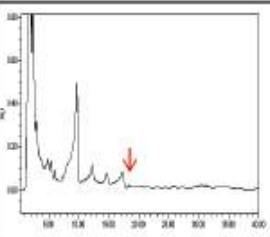
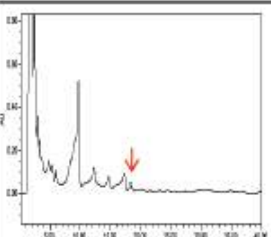
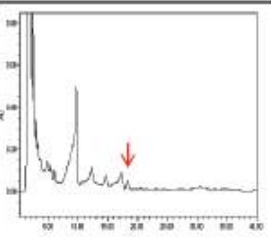
HPLC	표준품	흰점박이꽃무지 진액배합물 + 1% starch(HePbTea + 1%starch)		
	대조시료	시료1	시료2	시료3
유산균	DHNA	L.Plantarum (KCCM12299P)	W.paramesenteroides (KCCM12300P)	W.paramesenteroides (KCCM12301P)
호기 /26°C /72h				
	흰점박이꽃무지열수추출물(HePb)	흰점박이꽃무지 열수추출물(HePb) + 1% starch(HePb + 1%starch)		
	비교시료	시료4	시료5	시료6
호기 /26°C /72h				

그림 7. 탄소원(전분) 첨가에 따른 흰점박이꽃무지 열수추출물(HePb)과 진액배합물 내 DHNA 함량을 분석한 HPLC 결과

대조군 DHNA는 1ppm로 제조되었다. PbTea + Starch, HePb + Starch에 *L. plantarum*(KCCM12299P, 시료1)과 2종의 *W. paramesenteroides*(KCCM12300P, KCCM12301P; 시료2, 3)를 각각 접종하여 72시간 배양한 발효물 내 DHNA는 각각 0.2, 0.7 및 0.7 ppm(0.002 mg/ml, 0.007 mg/ml, 및 0.007 mg/ml)와 0.2, 0.6 및 0.6 ppm(0.002 mg/ml, 0.006 mg/ml, 및 0.006 mg/ml) 였다. 그러나 유산균으로 발효하지 않은 HePb 추출물 내에서는 DHNA가 검출되지 않았다. 따라서 전분의 첨가에 따라 DHNA 생산이 유도되며, 특히 2종의 *W. paramesenteroides*(KCCM12300P, KCCM12301P)에 의한 발효물의 경우, *L. plantarum*(KCCM12299P)보다 높은 DHNA 함량을 보여, DHNA 생산에 있어서는 2종의 *W. paramesenteroides*(KCCM12300P, KCCM12301P)의 발효물의 효율이 보다 높음을 확인하였다(도 4).

[표 3] 진액에서의 탄소원 첨가에 따른 유산균 수

시료	발효 원료 (100mL)	발효 유산균	DHNA/100 mL	
			농도(ppm)	농도(ug)
DHNA (대조군)	-	-	1	
PbTea-Lp	흰점박이꽃무지진액배합물 + 1% starch	<i>L. plantarum</i> (KCCM12299P)	0.2	20
PbTea-Wp1	흰점박이꽃무지진액배합물 + 1% starch	<i>W. paramesenteroides</i> (KCCM12300P)	0.7	70
PbTea-Wp2	흰점박이꽃무지진액배합물 + 1% starch	<i>W. paramesenteroides</i> (KCCM12301P)	0.7	70
HePb-Lp	흰점박이꽃무지열수추출물 + 1% Starch	<i>L. plantarum</i> (KCCM12299P)	0.2	20
HePb-Wp1	흰점박이꽃무지열수추출물 + 1% Starch	<i>W. paramesenteroides</i> (KCCM12300P)	0.6	60
HePb-Wp2	흰점박이꽃무지열수추출물 + 1% Starch	<i>W. paramesenteroides</i> (KCCM12301P)	0.6	60
HePb	흰점박이꽃무지열수추출물	-	-	

7. 흰점박이꽃무지 진액에서의 공배양에 따른 DHNA 확인

PbTea 또는 상기 PbTea에 1%(w/v) 전분(Starch)이 첨가된 혼합물(PbTea+Starch)에 3종의 유산균을 공접종하여 발효 배양한 발효물 내에서 발효 시간의 경과(48시간, 72시간 및 96시간)에 따른 DHNA 생성량을 TLC 분석으로 확인하였다.

PbTea 및 PbTea+Starch에 *L.plantarum* (KCCM12299P) 및 2종의 *W. paramesenteroides* (KCCM12300P, KCCM12301P) 를 함께 접종하여 26°C 에서 호기 상태로 48시간, 72시간, 또는 96시간 배양하여 각 발효물을 제조하였다. 대조군으로는 DHNA 표준품(Sigma, USA)의 0.5%(w/v, 500ppm) 용액을 이용하였다.

TLC 분석은 상기 실질적으로 동일한 방법으로 수행되었으며, 전개 용매로는 메탄올:물:아세트산 (methanol: water :acetic acid)을 7:3:1의 부피비로 혼합하여 사용하였고, 고정상으로는 TLC(TLC silica gel 60 RP-18 F254, Merck)를 이용하였다.

그림 8에 대조군과 각 시료의 TLC 결과를 UV 램프로 발색한 결과를 나타내었다. PbTea의 발효물에서는 DHNA가 발효 시간의 경과에도 불구하고 매우 흐릿하게 관찰된 반면, 전분이 첨가된 PbTea+Starch의 발효물의 경우 모든 발효 시간대에서 PbTea에 비해 선명한(500ppm 이상의) DHNA가 확인되었다.

시료명	시료7 PbTea					시료8 PbTea + 1% starch				
공배양	Lp(12299p)/Wp(12300p)/Wp(12301p)					Lp(12299p)/Wp(12300p)/Wp(12301p)				
표준품/배양시간	DHNA 500ppm	48H	72H	96H	DHNA 500ppm	DHNA 500ppm	48H	72H	96H	DHNA 500ppm
TLC_C ₁₈ Silca gel 60 RP-18 F254s (Merck)										

그림 8. 흰점박이꽃무지 진액 배합물(PbTea)에 3종의 유산균을 공접종하여 제조된 각 발효물에서의 발효 시간에 따른 DHNA 함량의 변화를 확인한 TLC 결과

8. DHNA 함유 발효물의 항산화 분석

DHNA의 생산능이 확인된 발효 원료 중, HePb에 1%(w/v) 전분(Starch, Sigma, USA) 80ml이 첨가된 혼합물(HePb+Starch), 흰점박이꽃무지 진액 배합물(PbTea), 및 상기 PbTea에 1%(w/v) 전분(Starch, Sigma, USA) 80ml이 첨가된 혼합물(PbTea+Starch)에 각각 *L.plantarum* (KCCM12299P), *W.paramesenteroides* (KCCM12300P, KCCM12301P) 3종의 유산균을 1:1:1의 비율로 공접종하여 발효 배양하여 제조한 발효물의 항산화 기능을 DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 자유라디칼 소거 활성 분석을 이용해 확인하였다.

웰 플레이트에 100 μ M DPPH를 100 μ L씩 첨가하고 차광한 후에 실온에서 10 내지 30 분간 반응을 수행하였다. 이후 517 nm 파장의 빛을 조사해 각 샘플의 흡광도를 측정하였으며, 음성 대조군으로는 메탄올 또는 물에 100 μ L DPPH를 처리하여 흡광도를 측정하여 영점 처리를 수행하였다. 상기 흡광도를 이용해 하기 수학적 1을 이용해 DPPH 억제율(scavenging activity, %)을 측정하여 발효 시간에 따른 항산화 효과의 변화를 확인하였다. 그림 9는 각 시료에서 측정된 DPPH 억제율 그래프이다.

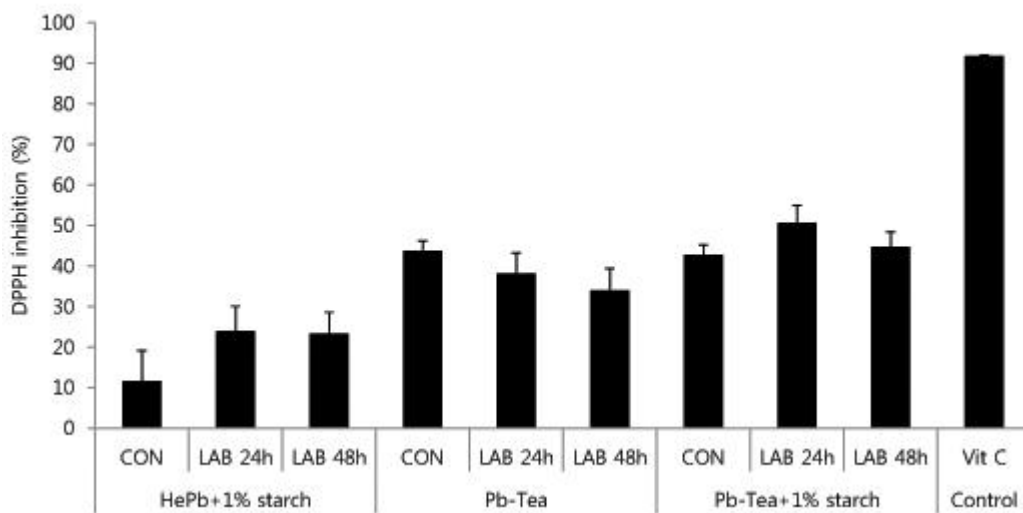


그림 9. 3종의 유산균을 공접종하여 제조된 발효물의 DPPH 억제율(%)을 측정한 실험의 결과

HePb에 유산균 3종을 접종하여 24, 및 48 시간 발효하여 얻어진 발효물의 DPPH 억제율은 각각 23.74%, 및 23.15% 였고, PbTea 발효물의 DPPH 억제율은 배양전에는 43.6%, 24, 및 48 시간 배양물에서는 각각 37.96%, 및 33.82%로 발효 전에 비해 다소 낮은 DPPH 억제율을 나타내었다.

전분이 포함된 흰점박이꽃무지 진액배합물(PbTea+Starch)을 공발효한 발효물의 경우 배양 전 DPPH 억제율은 42.63%이였지만, 24, 및 48시간 배양물의 DPPH 억제율은 각각 50.57%, 및 44.57%로 발효 전에 비해 높은 DPPH 억제율을 나타내었다. 상기 발효물들은 DHNA 생성능이 거의 나타나지 않았던(도 6) PbTea의 경우를 제외하고는 미발효 추출물에 비해 약 2 내지 12%p 높은 DPPH 억제율을 나타내었다. 상기 발효물의 DPPH 억제율은 대조군인 비타민C의 항산화 수치보다는 낮았지만 비교적 높은 항산화 효능을 보였다. 따라서 DHNA를 일정 수준 이상 함유하는 흰점박이꽃무지의 추출물과 진액배합물의 유산균 발효물의 경우, 미발효 추출물과 비교해 항산화 효과가 상승됨을 확인하였다.

[표 4] 산균을 공접종하여 제조된 발효물의 DPPH 억제율(%)

발효물 정보	발효시간	DPPH 억제율 (%)
HePb+Starch 유산균 3종 공배양	0	11.48
	24	23.74
	48	23.15
PbTea 유산균 3종 공배양	0	43.6
	24	37.96
	48	33.82
PbTea+Starch 유산균 3종 공배양	0	42.63
	24	50.57
	48	44.57
비타민C (ascorbic acid, 대조군)	-	91.7

9. DHNA 함유 발효물의 비피도박테리움 균주에 대한 성장 촉진 효과

비피도박테리움 속(*Bifidobacterium* sp.) 균은 대표적인 장내 유익균으로, 주로 대장에 분포하며 대장균의 증식 억제, 배변활동 강화 등에 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 30% 이상의 항산화 효과를 보인 흰점박이꽃무지의 진액 배합물(PbTea)과 1%(w/v) 전분 포함 PbTea(PbTea+Starch)의 각 유산균 발효물이 비피도박테리움 속 균주에 대한 성장 촉진 기능(Bifidogenic Growth Stimulation, BGS)을 갖는 지 여부를 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 상기 각 발효물은 PbTea 또는 PbTea+Starch를 원료로 하여 *L.plantarum* (KCCM12299P) 및 2종의 *W. paramesenteroides* (KCCM12300P, KCCM12301P) 3종의 유산균을 모두 공접종하여 26°C에서 48시간, 72시간, 또는 96시간 동안 발효하여 제조하였다. 각 발효물은 3,600rpm으로 4°C, 10분 동안 원심분리한 후 주사 필터로(0.45 um, Millipore, USA)필터링하여 발효에 이용된 유산균을 제거한 필터액을 준비하였다. 시험 대상이 되는 비피도박테리움 속 균주로는 비피도박테리움 롱검(*Bifidoacterium longum*, KCCM11207), 비피도박테리움 비피덤(*Bifidobacterium bifidum*, KCCM3202) 및 비피도박테리움 브레브(*Bifidobacterium breve*, KCCM3220)를 이용하였으며, 각 비피도박테리움 속 균주는 RCM(Reinforced Clostridial Medium, Difco, USA) 배지 20mL에서 1×10^8 cfu/ml농도로 1mL씩 접종한 후 37°C에서 24시간 동안 전배양(pre-culture)하였다.

RCM 배지 5ml에 상기 준비된 발효물의 필터액 100ul를 첨가한 후, 상기 전배양된 비피도박테리움 속 균주를 각각 2%(v/v, 100ul) 접종하여 37°C에서 10시간 동안 배양하여, 2, 4, 6, 8 또는 10시간 쯤에 각 비피도박테리움 속 균주의 성장(Growth)을 600nm에서 흡광도를 측정하여 (OD600) 조건에 따른 성장도를 비교하였다. 대조군으로는 표준 DHNA 0.01%(w/v) 용액을 RCM 배지에 첨가한 후 각 비피도박테리움 속 균주를 배양하였다.

그림 10에는 *B. longum*의 성장 그래프를, 그림 11에는 *B. bifidum*의 성장 그래프를, 그림 12에는 *B. breve*의 성장 그래프를 각각 나타내었으며, 하기 표 5에 각 그래프에 해당하는 수치를 나타내었다.

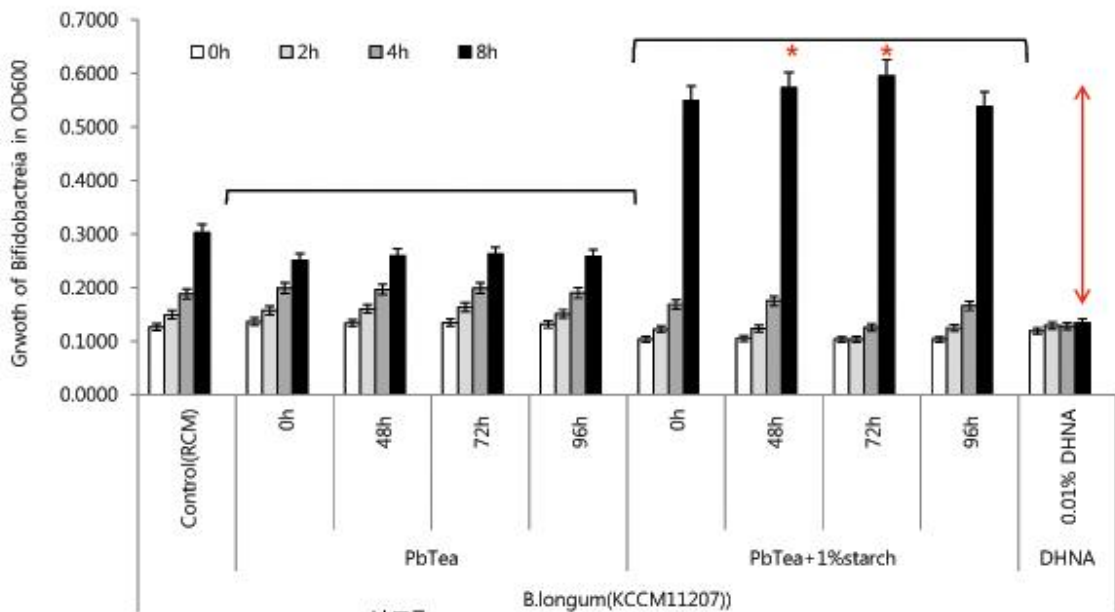


그림 10. 발효 시간 및 비피도박테리움 배양 시간에 따른 비피도박테리움 롱검의 성장

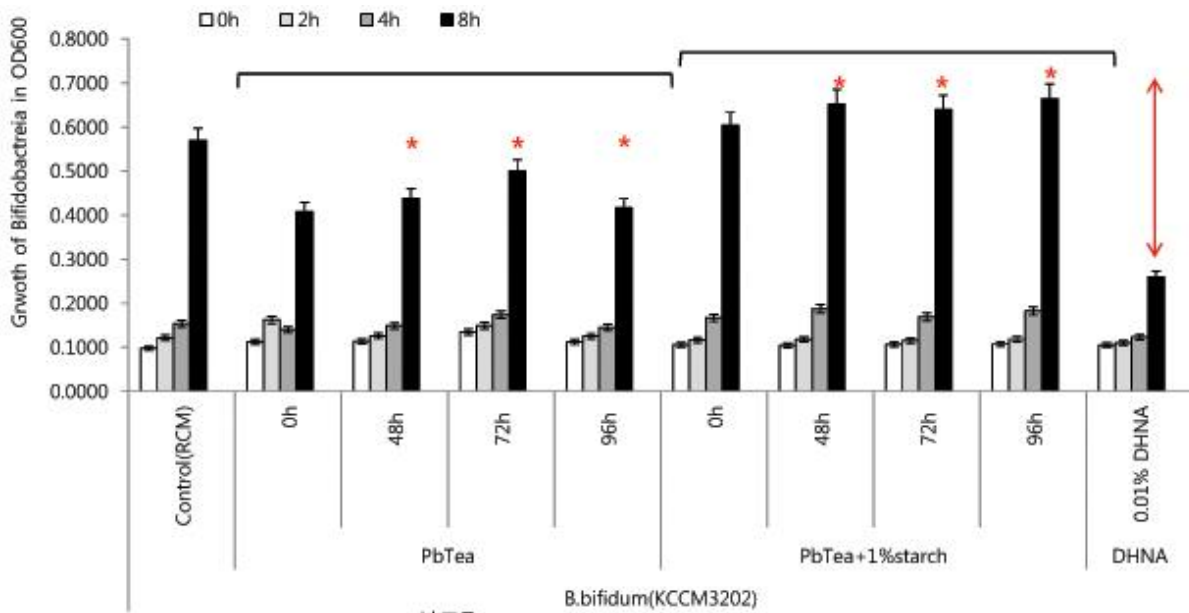


그림 11. 발효 시간 및 비피도박테리움 배양 시간에 따른 비피도박테리움 비피덤의 성장

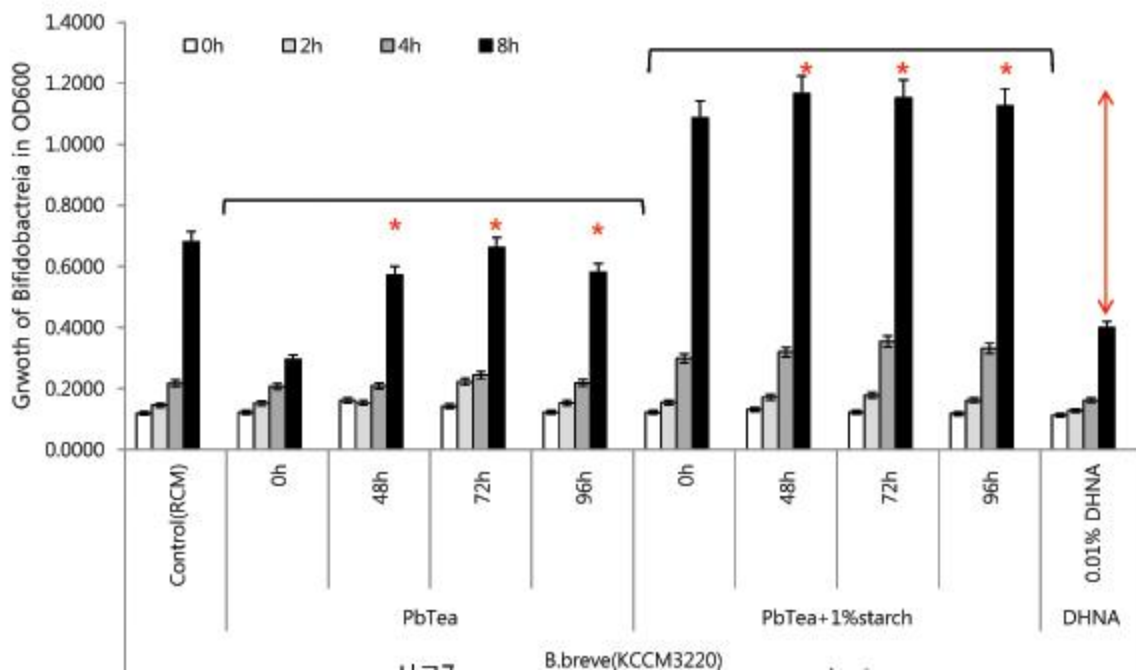


그림 12. 발효 시간 및 비피도박테리움 배양 시간에 따른 비피도박테리움 브레브의 성장

PbTea의 3종 유산균 발효물(공발효물)보다 PbTea+Starch의 3종 유산균 발효물이 비피도박테리움 롱검(*Bifidoacterium longum*, KCCM11207) 성장을 약 2.2배이상 촉진하는 것으로 확인되었다. 또한 0.01% DHNA(10 ppm)를 기준으로 하였을 때 PbTea 3종 유산균 발효물(공발효물)에서 약 1.9배, PbTea+Starch의 3종 유산균 발효물은 약 4.4배 높은 성장을 보였다. 비피도박테리움 롱검은 96시간 발효물을 첨가하였을 때보다 48시간 또는 72시간 발효물을 첨가한 경우에 더 잘 성장하였다. 비피도박테리움 속 균주의 최적 배지로 알려져 있는 RCM 배지와 비교할 때, PbTea의 3종 유산균 발효물은 비슷한 성장 양상을 보였으며, PbTea+Starch 3종 유산균 발효물은 RCM 배지에서의 비피도박테리움 롱검의 성장보다 약 1.9배 높은 성장을 보였다.

비피도박테리움 비피덤(*Bifidobacterium bifidum*, KCCM3202)의 경우, PbTea의 3종 유산균 발효물보다 PbTea+Starch의 3종 유산균 발효물(공발효물)에서 발효 시간이 각각 48, 72, 및 96 시간일 때 비피도박테리움 비피덤 균의 성장을 각각 약 2.0배, 1.7배 및 1.9배 이상 촉진하는 것으로 확인되었다. 0.01% DHNA(10 ppm)을 기준으로, 72시간 PbTea 발효물 첨가시 비피도박테리움 비피덤의 성장이 약 1.9배 증가하였고, PbTea+Starch의 3종 유산균 발효물(96시간 발효) 첨가시에는 약 2.5배 높은 성장이 확인되었다. 발효물의 발효 시간을 달리하여 비피도박테리움 비피덤의 성장 촉진 여부를 확인한 결과, 48시간 또는 72시간 또는 96시간 발효물을 첨가한 경우에 모두 잘 성장하였다. 비피도박테리움 속 균주의 최적 배지로 알려져 있는 RCM 배지와 비교할 때, PbTea의 3종 유산균 발효물은 조금 낮은 성장 양상을 보였으며, PbTea+Starch 3종 유산균 발효물은 RCM 배지에서의 비피도박테리움 비피덤의 성장보다 약 1.2배 높은 성장을 보였다.

비피도박테리움 브레브(*Bifidobacterium breve*, KCCM3220)의 경우, PbTea의 3종 유산균 발효물(공발효물)보다 PbTea+Starch의 공발효물이 48, 72, 및 96 시간 발효시 비피도박테리움 브레브 균의 성장을 각각 약 1.5, 1.3 및 1.6배 이상 촉진하는 것으로 확인되었다. 0.01% DHNA(10 ppm)을 기준으로 비피도박테리움 브레브의 성장을 살폈을 때, PbTea 3종 유산균 발효물 첨가시 성장은 72시간 배양에서보다 약 1.7배, PbTea+Starch의 3종 유산균 발효물 첨가시에는 48시간 배양에서보다 약 2.9배 높은 성장이 확인되었다. 비피도박테리움 속 균주의 최적 배지로 알려져 있는 RCM 배지와 비교할 때, PbTea의 3종 유산균 발효물(공발효물)이 첨가되었을 때에는 RCM 배지에서의 성장과 큰 차이를 보이지 않았으나, PbTea+Starch 3종 유산균 발효물이 첨가되었을 때 48시간 발효물에서 RCM 배지에서도보다 약 1.7배 높은 비피도박테리움 브레브 균의 성장을 보였다. 비피도박테리움 롱검(*Bifidoacterium longum*, KCCM11207), 비피도박테리움 비피덤(*Bifidobacterium bifidum*, KCCM3202) 및 비피도박테리움 브레브(*Bifidobacterium breve*, KCCM3220)균은 인간뿐만 아니라 강아지나 고양이 등 동물의 장내에서 서식하는 유익균으로 알려져 있다. 본 발명의 전분을 포함하는 흰점박이꽃무지 추출물 또는 진액배합물의 유산균 배양물의 경우, 유산균 접종 후 발효단계를 거침으로써, 장내 유산균의 90%를 차지하며 유해균에 대한 항균 및 면역력 향상 염증억제 등의 기능이 있는 비피도박테리움 롱검(*Bifidoacterium longum*), 여성질환 예방, 장내유해균 사멸, 백혈구 증식, 면역력 개선 등에 효능이 있는 비피도박테리움 비피덤(*Bifidobacterium bifidum*), 대장균 억제, 세균성 설사 억제 효능이 있는 비피도박테리움 브레브(*Bifidobacterium breve*)의 성장을 모두 유도할 수 있음을 확인할 수 있었다. 이로써 비피더스균(또는 비피도박테리움 속 균주)이 생성하는 비타민B1, B6, B12, 엽산 등을 통해 칼슘흡수를 촉진하고 배변활동을 원활하게 할 수 있다. 이에, 본 발명의 흰점박이꽃무지 진액배합물(PbTea)의 3종 유산균 공발효물은 인간 또는 인간을 제외한 동물의

장내 환경 개선 또는 치료용 물질로 사용할 수 있음을 확인하였다

[표 5] 산균을 공접종하여 제조된 발효물의 DPPH 억제율(%)

비피도 박테리움	구분	발효 시간	배양 시간에 따른 OD600				
			0h	2h	4h	8h	
B.longum (KCCM11207)	RCM 배지	24h	0.1261	0.1494	0.1879	0.3026	
	PbTea 유산균 공발효물	0h	0.1363	0.1573	0.1988	0.2505	
		48h	0.1330	0.1601	0.1964	0.2594	
		72h	0.1344	0.1632	0.1987	0.2624	
		96h	0.1314	0.1508	0.1898	0.2579	
	PbTea+Starch 유산균 공발효물	0h	0.1035	0.1218	0.1684	0.5489	
		48h	0.1046	0.1236	0.1749	0.5735	
		72h	0.1029	0.1033	0.1254	0.5956	
		96h	0.1030	0.1248	0.1660	0.5381	
	DHNA(10ppm)	-	0.1190	0.1292	0.1280	0.1346	
	B.bifidum (KCCM3202)	RCM 배지	24h	0.0976	0.1219	0.1534	0.5693
		PbTea 유산균 공발효물	0h	0.112	0.1621	0.1402	0.4081
48h			0.1132	0.1258	0.1487	0.4376	
72h			0.1349	0.1489	0.1741	0.5009	
96h			0.1119	0.1255	0.1447	0.4163	
PbTea+Starch 유산균 공발효물		0h	0.1055	0.1165	0.1669	0.6037	
		48h	0.1040	0.1180	0.1873	0.6524	
		72h	0.1065	0.1151	0.1693	0.6394	
		96h	0.1072	0.1183	0.1823	0.6640	
DHNA(10ppm)		-	0.1047	0.1100	0.1230	0.2598	
B.breve (KCCM3220)		RCM 배지	24h	0.1190	0.1463	0.2174	0.6805
		PbTea 유산균 공발효물	0h	0.1213	0.1521	0.2069	0.2957
	48h		0.1605	0.1535	0.2086	0.5718	
	72h		0.1419	0.2220	0.2445	0.6622	
	96h		0.1222	0.1529	0.2187	0.5810	
	PbTea+Starch 유산균 공발효물	0h	0.1219	0.1540	0.2981	1.0874	
		48h	0.1312	0.1713	0.3190	1.1662	
		72h	0.1221	0.1776	0.3540	1.1527	
		96h	0.1182	0.1613	0.3316	1.1263	
	DHNA(10ppm)	-	0.1130	0.1278	0.1613	0.3993	

10. 흰점박이꽃무지 추출물과 진액발효물의 세포 안정성

흰점박이꽃무지 염장 발효물의 안전성을 확인하기 위해, 마우스 세포주인 Raw264.7 cell(ATCC TIB-71), B16F10 세포, 인간 비만 세포는 3T3-L1(ATCC CRL-3242) 세포주 3종에서 흰점박이꽃무지 추출물과 진액발효물의 독성 실험을 수행하였다. 세포 생존율(Cell viability, % of control)은 실시예 7과 실질적으로 동일한 방법으로 측정하여, 그림 13 에 측정 결과를 나타냈다. 그림 13의 시료는 0.1% 시료를 사용하여 분석하였다. 그림 13에 나타낸 바와 같이, 유산균을 첨가하지 않은 천일염 흰점박이꽃무지 추출물과 진액발효물을 제외하고는 유산균을 첨가하여 발효숙성을 수행한 시료 모두에서 세포수가 대조군 대비 100% 정도로 유지되거나 소폭으로 감소하여, 세포가 증식됨을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 발명의 흰점박이꽃무지 추출물과 진액발효물은 Raw264.7 cell(ATCC TIB-71), B16F10, 3T3L1세포주에 대해 독성이 낮고 안전함을 확인하였다.

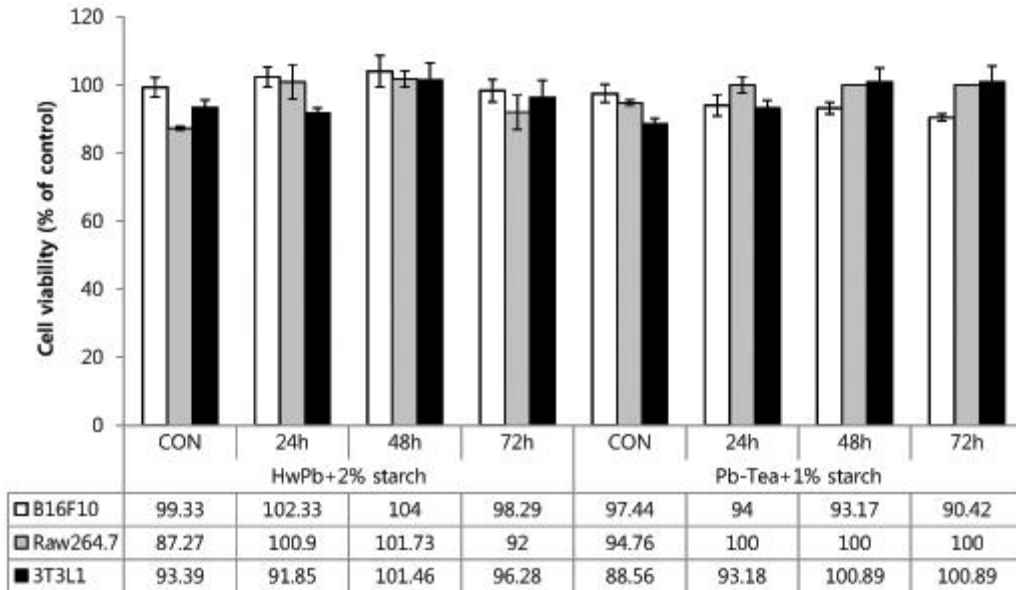


그림 13. 흰점박이꽃무지 추출물과 진액발효물의 Raw264.7 cell(ATCC TIB-71), B16F10, 3T3-L1(ATCC CRL-3242) 세포 안정성

11. DHNA 함유 흰점박이꽃무지 진액발효물의 당도, 염도, 및 pH 분석

제조된 흰점박이꽃무지 진액발효물에 대한 당도, 염도 및 pH를 발효시간별로 조사 하였다 pH와 염도는 흰점박이꽃무지 염장 발효물 및 대조군 액젓을 1/10으로 물에 희석한 다음, pH meter(Pettler Tolendo, USA) 및 염도측정기 (PTAGO salt meter, USA)를 이용하여 측정하였다. 당도는 희석 과정 없이 원액 그대로를 당도계(ATAGO Refractometer, USA)로 측정하였다. 표 5에 각 시료의 당도, 염도 및 pH 분석 결과를 나타내었다

흰점박이꽃무지 진액발효물의 pH는 유산균이 첨가되지 않은 시료는 pH 5.08이고, 유산균이 첨가된 경우에 24시간 발효 시료에서는 pH 3.61, 48, 72시간 시료에서는 각각 pH 3.46, 3.41 로 나타났다. 당도는 유산균 미첨가 시료에서 13.4 brix이나, 유산균을 첨가한 시료에서는 24시간 발효 시료에서는 13, 48, 72시간 시료에서는 각각 12.6과 12.7로 나타났다. 염도는 유산균 미처리군이 0.1% 였으나, 유산균을 투여한 그룹에서는 모두 0.2%로 다소 증가하였다.

흰점박이꽃무지 진액발효물에 1% 전분을 첨가한 것에서의 pH는 유산균을 첨가하지 않은 시료는 pH 3.54 이고, 유산균이 첨가된 경우에 24시간 발효 시료에서는 pH 3.83, 48, 72시간 시료에서는 각각 pH 3.67, 3.59로 나타났다. 당도는 유산균을 첨가하지 않은 그룹에서 12.2 Brix로 나타났으나, 유산균이 첨가된 경우에 24시간, 48, 72시간 시료에서는 모두 9.6 brix로 나타났다. 염도는 유산균 미처리군이 0.2% 였으나, 유산균을 투여한 그룹에서는 모두 0.3%로 다소 증가하였다.

본 발명에 따른 흰점박이꽃무지 진액발효물은 시판되는 동의보감과 염도와 당도가 낮으나, 식품 또는 식품 조성물로서 적합하다.

[표 6] 유산균을 공접종하여 제조된 발효물의 당도, 염도 및 pH

		Brix (%)	Salinity (%)	pH
Pb-Tea	0h	13.4	0.1	5.08
	24h	13.0	0.2	3.61
	48h	12.6	0.2	3.46
	72h	12.7	0.2	3.41
Pb-Tea+1% Starch	0h	12.2	0.2	3.54
	24h	9.6	0.3	3.83
	48h	9.6	0.3	3.67
	72h	9.6	0.3	3.59

12. 흰점박이꽃무지 진액발효물의 일반성분 및 중금속 분석(한국기능식품연구원)

From:건강

To:029632587

09/12/2019 15:06

#814 P.001/002

제 D2019112059 호 문서확인 52SC-94J0-9J8K		시험·검사성적서	
제품명	종류보급	제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업체명	재단법인한동해산업연구원	성명 김대영
	주소	경상북도 울진군 죽변면 해안과학길 22	
제조번호		접수년월일	2019-11-25
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2019112059
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2019-12-06 시험·검사 책임자 : 이정구,이현영 검사관련 총 책임자 : 김천희</p>			
시험·검사항목		시험·검사 결과	시험·검사원
열량(Kcal/100g)		35.71 Kcal/100g	한아름
탄수화물(%)		7.27 %	한아름
조단백질(%)		0.87 %	김경숙
조지방(%)		0.35 %	장재인
나트륨(mg/100g)		23.18 mg/100g	송지은
당류(과당,포도당,자당,엿아당,유당)(mg/g)		55.64 mg/g	최지현
포화지방산(g/100g)		0.01 g/100g	김관영
트랜스지방산(g/100g)		불검출	김관영
콜레스테롤(mg/100g)		불검출	김은지
크롬(µg/100g)		0.28 µg/100g	박상진
카드뮴(mg/kg)		0.0006 mg/kg	정다운
비소(mg/kg)		0.0111 mg/kg	정다운
수은(mg/kg)		불검출	노화영



KHSI



13. 흰점박이꽃무지 아미노산 분석(한국기능식품연구원)

제 D2018080824 호 문서확인				시험·검사성적서	
제품명		꽃뿔이추출물(Pb HwD_C)	제조일자 (유통기한)	2018-07-30	
의뢰인	업체명	재단법인경북래얌바이오산업연구원	상 명	김태영	
	주 소	경상북도 울진군 죽변면 래얌과학길 22			
제조번호			접수년월일	2018-08-09	
검사의의목적		참고용	접수번호	D2018080824	
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2018-08-23 시험·검사 책임자 : 이정구 검사관련 총 책임자 : 김천희</p>					
시험·검사항목		시험·검사 결과		시험·검사원	
구성아미노산(티로신)(mg/g)		41.10mg/g		이주영	
구성아미노산(글리신)(mg/g)		32.41mg/g		이주영	
구성아미노산(세린)(mg/g)		29.46mg/g		이주영	
구성아미노산(알라닌)(mg/g)		24.68mg/g		이주영	
구성아미노산(글루탐산)(mg/g)		59.01mg/g		이주영	
구성아미노산(라이신)(mg/g)		25.17mg/g		이주영	
구성아미노산(로이신)(mg/g)		25.98mg/g		이주영	
구성아미노산(메티오닌)(mg/g)		5.58mg/g		이주영	
구성아미노산(발린)(mg/g)		28.32mg/g		이주영	
구성아미노산(아르기닌)(mg/g)		21.88mg/g		이주영	
구성아미노산(아스파라긴산)(mg/g)		36.27mg/g		이주영	
구성아미노산(이소로이신)(mg/g)		17.11mg/g		이주영	
구성아미노산(트레오닌)(mg/g)		18.83mg/g		이주영	
구성아미노산(페닐알라닌)(mg/g)		18.85mg/g		이주영	
구성아미노산(프롤린)(mg/g)		66.85mg/g		이주영	
구성아미노산(히스티딘)(mg/g)		15.57mg/g		이주영	
유리아미노산(트레오닌)(mg/g)		0.48mg/g		이주영	
유리아미노산(시스틴)(mg/g)		0.31mg/g		이주영	
유리아미노산(티로신)(mg/g)		1.01mg/g		이주영	
유리아미노산(아르기닌)(mg/g)		4.46mg/g		이주영	



13. DHNA 관련 유전자를 통한 선발유산균의 유효성 확인

아래의 그림은 미생물과 식물에서의 DHNA 생산의 메카니즘을 나타낸다. 본 연구에서 선발된 *L.plantarum* 및 2종의 *W. paramesenteroides*에서 관련 유전자를 클로닝하여 단백질 발현 벡터를 통해 효소활성을 확인하고자 하였다(그림 14).

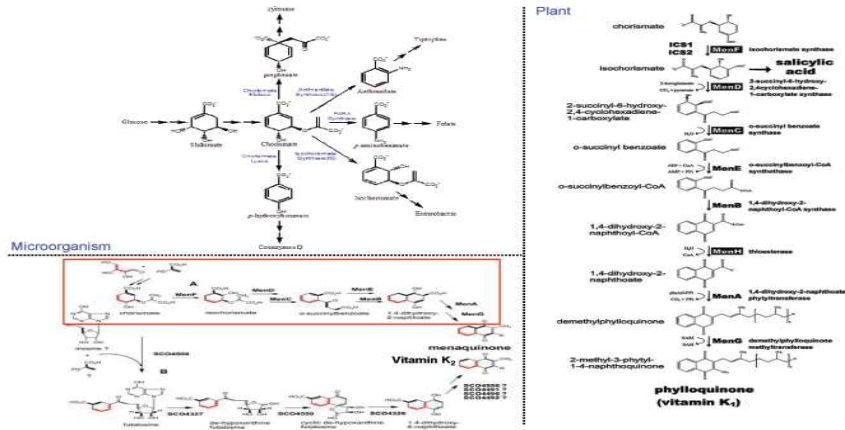


그림 14 미생물의 DHNA의 생산에 관여하는 유전자

L.plantarum (KCCM12299P)에서는 3개의 관련 유전자가 확인되었다. 확인된 유전자는 MenA, MenA1, MenA2 유전자로 명명하였다. 아직까지 밝혀진 바 없는 유전자이며 이들의 전체 유전자서열을 확인하였다. 또한 MRS 배지와 흰점박이꽃무지 열수추출물에서의 배양에 따른 발현 차이로 전사체에서 semi RT-PCR과 real-time PCR로 확인하였다.

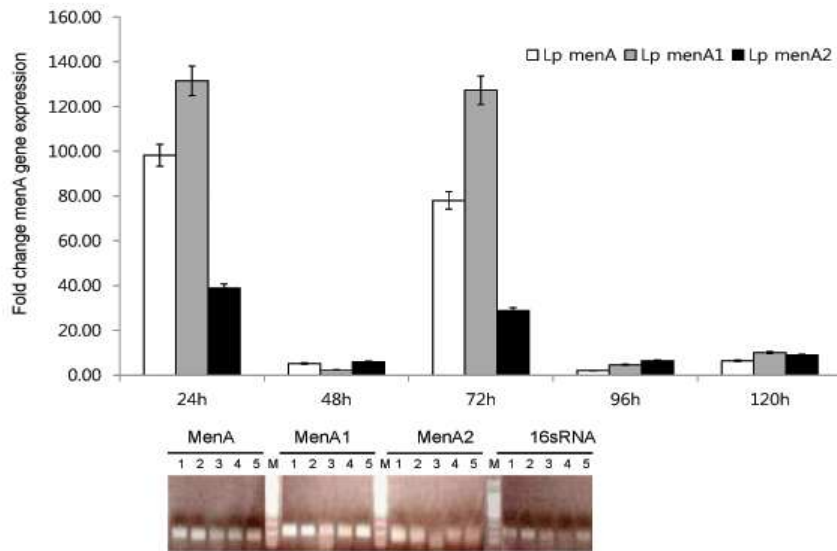


그림 15 *L.plantarum* (KCCM12299P)의 DHNA의 생산에 관여하는 유전자의 전사발현

W. paramesenteroides (KCCM12300P, KCCM12301P) 에서는 3개의 관련 유전자가 확인되었다. 확인된 유전자는 MenA, MenA1, MenA2 유전자로 명명하였다. 아직까지 밝혀진 바 없는 유전자이며 이들의 전체 유전자서열을 확인하였다. 또한 MRS 배지(그림 16)와 흰점박이꽃무지 열수추출물(그림 17)에서의 배양에 따른 발현 차이를 전사체에서 semi RT-PCR과 real-time PCR로 확인하였다.

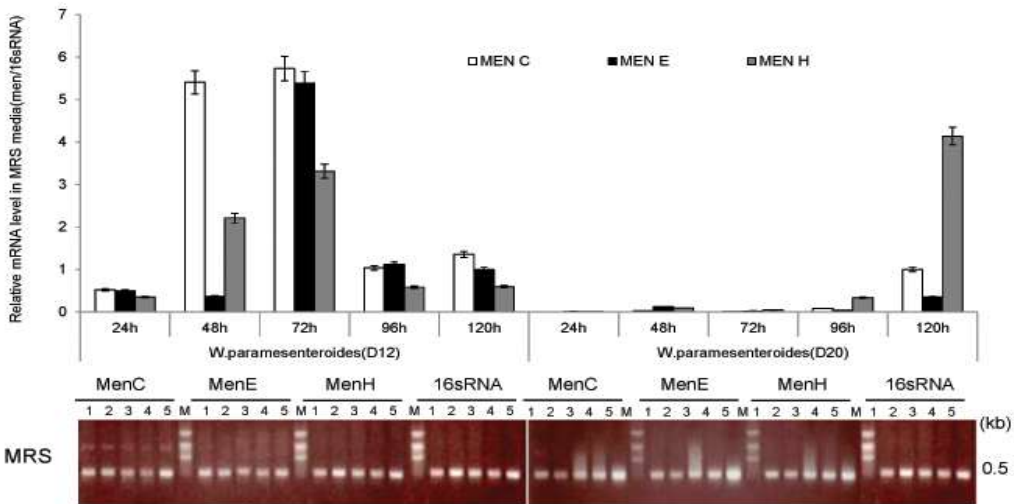


그림 15 W. paramesenteroides (KCCM12300P, KCCM12301P) 의 DHNA의 생산에 관여하는 유전자의 MRS배지에서의 전사발현

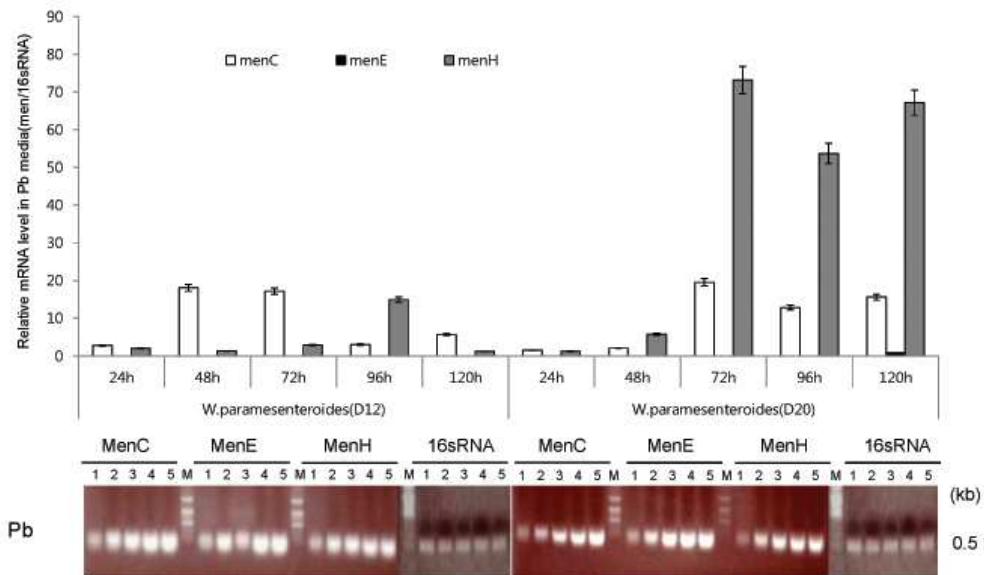


그림 15 W. paramesenteroides (KCCM12300P, KCCM12301P) 의 DHNA의 생산에 관여하는 유전자의 Pb 배지에서의 전사발현

DHNA 발현에 관련된 유전자는 MenA, MenC, MenE, MenH의 발현은 흰점박이꽃무지 배지에서는 W. paramesenteroides (KCCM12301P)의 경우가 72시간에 발현이 높아진 것을 확인하였다. 이들 발현을 활용하여 이후 DHNA 생산능을 높이기 위한 지속적 연구를 계획하고 있다.

제 4 절 연구개발 성과

1. 특허등록 및 출원

번호	특허/프로그램명	국가명	출원·등록일	출원·등록순번 / 출원·등록자수	비 고
1	굽벵이를 활용한 기능성 식품의 제조방법	한국	2018.11.13	10-191977-00000	등록
2	동의보급 제[35류]	한국	2018. 07.09	40-137641-0000	상표 등록
3	해방풍 추출물의 유산균 발효물, 그 제조방법 및 용도	한국	2019.05.09	10-2019-0054488	출원
4	흰점박이꽃무지 추출물의 발효물, 이의 제조방법 및 용도	한국	2019.06.04	10-2019-0066242	출원
5	흰점박이꽃무지의 염장발효식품 및 이의 제조방법	한국	2019.10.01	10-2019-0121784	출원
6	갈색거저리 발효물을 포함하는 사료첨가제 및 이를 포함하는 사료 조성물	한국	2019.10.30.	10-2019-0126813	출원
7	흰점박이꽃무지 발효물을 포함하는 미생물의 성장 촉진용 조성물	한국	2019.11.29.	10-2019-0157749	출원

2. 논문게재

No	논문명	학술지명	저 자 명	연도	호	국명	SCI	등 록
1	Preparation and characterization of sericin powder extracted with deep sea water	3Biotech	Hong, Sun M e e et al.	2018	9(1)	France	SCI (1.8)	s13 250 -01 8-1 558 -7
2	Heterologous Production and Glycosylation of Japanese Eel Follitropin sing Silkworm	Biotech Biopro Eng	Hong, Sun M e e et al.	2019. 7.6	24	Korea	SCI (1.8)	doi: 10. 101 6

3. 학술발표

No	회의 명칭	발표제목	발표자	발표 일시	장소	국명
1	일본분자세포생물학회	Potential of the 1,4-Dihydroxy-2-Naphthoic acid producing from <i>Weissella paramesen-teroides</i> as Pb fermenter.	Ju,ES., Kim,TH Kim,JA Hong,sM	2019.12.03	Marine Messe Fukuoka	일본
2	일본분자세포생물학회	Antibacterial activity of their protein extract of LAB against fish pathogens.	Jo Hs Ju,ES., Kim,JA Hong,sM	2019.12.03	Marine Messe Fukuoka	일본
3	일본분자세포생물학회	Role and Application of LAB in Food Presevation of <i>Protaetia brevitarsis</i> .	Kim,JA., Kim,TA. Ju,ES., Hong,sM	2019.12.03	Marine Messe Fukuoka	일본
4	한국영양과학회	roduction of DHNA, a Bifidogenic growth stimulator in Pb Extraction	홍선미, 김태하, 주은신, 김정아	2019.10.23	제주컨벤션 센터	한국
5	한국생물공학회	The GAD genes and GABA production from <i>Protaetia brevitarsis</i> ' s MSG	김정아, 주은신, 박정철, 홍선미	2019.10.10	엑스코, 대구	한국
6	한국생물공학회	Potential of the1,4-Dihydroxy-2-Naphthoic acid producing from <i>Weissella paramesen-teroides</i> as Pb fermenter	주은신, 김정아, 박정철, 홍선미	2019.10.10	엑스코, 대구	한국
7	세계산업미생물학회	Enhancement of 1,4-Dihydroxy-2-Naphthoic Acid Production by <i>Weissella</i> sp Fed-Batch Culture in <i>Protaetia brevitarsis</i> extraction	Hong,sM Ju, ES., Kim,JA., Kim, TH	2019.09.09	피사대학	이탈리아
8	한국식품과학회	Production of Pb's salt-sauce using LAB and qualitative evaluation.	주은신, 김태하, 김정아, 박정철, 홍선미	2019.06.26	송도컨벤션센터	한국

9	한국식품과학회	Potential of LAB for improving storage of PB as food.	김정아, 김태하, 주은신, 홍선미	2019.06.26	송도컨벤션센터	한국
10	한국미생물학회	Application of LAB improving storage of Pb as Food	김태하, 주은신, 김정아, 홍선미	2019.04.17	제주컨벤션센터	한국
11	한국미생물학회	he potential of <i>Glehnia littoralis</i> Fermented by LAB	주은신, 김태하, 김정아, 박정철, 홍선미	2019.04.17	제주컨벤션센터	한국
12	한국생물공학회	Characterization of fermented edible insect, <i>P.brevitarsis</i> , inoculated with lactic acid bacteria.	김태하, 주은신, 홍선미	2019.04.10	제주컨벤션센터	한국
13	한국미생물학회연합국제학회	Isolation and characterization of Lactic acid bacteria from edible insect and the Feed	박현미, 김태하, 최성창, 주은신, 홍선미	2018.10.11	더케이호텔	한국

4. 생명자원(균주기탁)

번호	균주명	국가명	기탁일	기탁번호	기탁기관
1	<i>Weissella paramesenteroides</i> D20	한국	2018.08.10	KCCM12301P	- 한국미생물본존센터
2	<i>Weissella paramesenteroides</i> D12	한국	2018.08.10	KCCM12300P	- 한국미생물본존센터
3	<i>Pediococcus acidilactici</i> D17	한국	2019.03.29	KCCM12472P	- 한국미생물본존센터
4	<i>Lactococcus garvieae</i> B44	한국	2019.03.29	KCCM12473P	- 한국미생물본존센터

5. 고용창출

번호	고용인력	고용기관명	고용창출일	고용형태
1	조현솔	환동해산업연구원	2019.09.03	계약직
2	김정아	환동해산업연구원	2018.10.22	계약직
3	주은신	환동해산업연구원	2018.05.23	계약직

6. 교육 및 컨설팅

번호	교육 및 컨설팅명	교육 및 컨설팅 교재명	주요내용	활용년도
1	경북곤충산업의 발전방향	경북곤충산업의 발전방향	한국곤충산업의 현황과 실제, 발전방향 등 논의	2019
2	곤충식품 산업 성공전략	곤충식품 산업 성공전략	곤충산업 육성 정책 및 스마트 팜 적용 기술 소개	2019

7. 정책활용

번호	정책활용상태	시책명	주관부처	일자	기대효과
1	정책건의	사료용 곤충 산업화	영천시 농정과	2019.02.01	곤충사료화를 통한 수익증대

8. 타연구에 활용

번호	연구사업명	연구제목	연구자	종료년도	활용년도
1	미래형혁신기술 개발사업	생물전환공정 기반 천연비타민 K2 생산	홍선미, 박정철	2019	2019

9. 연구인력활용

번호	인력양성명	학위수	인력양성년도	인력양성대상수
1	경북농업6차산업화과정	기타 1	2018	1
2	사이버(농산물가공) 과정	기타 1	2018	1
3	사이버(곤충사육) 과정	기타 1	2018	1

10. 홍보실적

번호	홍보유형	매체명	제목	일시
1	Internet/PC	이코노미타임21	굶뎡이 식품 특허기술로 식용곤충 시장 진출	2019.06.11
2	중앙TV방송	YTN	식용굶뎡이 부부의 꿈	2019.08.20

11. 전시회 참가(전시회, 박람회 등)

번호	유형	행사명칭	전시품목	장소	활용년도
1	전시회	곤충식품페스티벌	동의보급진액	코엑스 서울	2019.02.01

12. 수상실적

번호	일자	수상명칭	공적내용
1	2018.08.10	경북농업6차산업 공로상	경북농민사관학교 경북농업6차산업화 과정을 이수, 단합
2	2019.06.15	농업인표창장	곤충산업 발전에 이바지한 공로에 대한 표창장

13. 인증(통합)

번호	인증명	인증기관	활용년도
1	농촌융복합산업 사업자 인증	농림축산식품부	2018.12.10

14. 사업화

번호	사업화명	제품명	업체명	년도	매출액(천원)
1	동의보급 환	동의보급 환	동의보급	2018.12.10	60,000
2	동의보급 진액	동의보급 진액	동의보급	2019.03.10	106,298
3	동의보급 진액 플러스	동의보급 진액 플러스	동의보급	2019.12.10	0

15. 시제품(동의보급 플러스)



○ 사업화성과 및 매출실적

- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0억원	
			향후 3년간 매출	1억원	
		관련제품	개발후 현재까지	1.66억원	
			향후 3년간 매출	2억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : - % 국외 : - %	
			향후 3년간 매출	국내 : 1 % 국외 : 1 %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			위

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		2년		
	소요예산(백만원)		10		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			1.66	3	5
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내		1	2
		국외		0.1	0.5
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획					
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)				
	수 출				

제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

- 웨이셀라활용 최적 발효 및 생산 공정 개발
- DHNA 생산 조건 확립 및 확인
- 식용곤충 활용 Wp 발효물 유효성 확보
- 꽃벙이 발효 엑기스 시제품 개발 및 상품화

3-2. 목표 달성여부

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차년 (2018)	세부(동의보급) 꽃벙이 발효 엑기스 시 제품 개발	꽃벙이 진액생산 및 식품생산 위생 시스템 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> • 흰점박이꽃무지 전처리 및 시료제공 • 흰점박이꽃무지 발효를 위한 시스템 준비 • 흰점박이꽃무지 진액 제조를 위한 동의보급 제품 생산 • HACCP 시설 완료
	위탁(한국해산산업연구원) 웨이셀라 활용 꽃벙이 발효 및 기능성 향상 기술개발	웨이셀라 활용 DHNA생산 기술 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> • DHNA 생산균주 3종 선발 및 16sRNA 확인 • 웨이셀라2종 및 락토바실러스 1종활용 DHNA 생산 조건 분석 • 흰점박이꽃무지 열수추출물 및 진액 활용 유 산균 발효적정 조건 확립(생균수, 미생물 검사) • 흰점박이꽃무지 열수추출물 및 진액 발효물 의 DHNA 분석 완료(TLC, HPLC 정량)
2차년 (2019)	세부(동의보급) 꽃벙이 발효 엑기스 시 제품 개발	꽃벙이 진액발효물 시제품 생산	100	<ul style="list-style-type: none"> • 흰점박이꽃무지 진액 동의보급 제품 생산 • 흰점박이꽃무지 진액 동의보급 플러스 제품 생산 • 동의보급 플러스 디자인 완료 및 홍보
	위탁(한국해산산업연구원) 웨이셀라 활용 꽃벙이 발효 및 기능성 향상 기술개발	꽃벙이진액발효 물의 효능 및 안 정성 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> • 흰점박이꽃무지 열수추출물 및 진액발효물 파일럿 및 대량생산 후 DHNA 확인 • 흰점박이꽃무지 열수추출물 및 진액발효물의 이화학분석 완료(일반성분, 당도, 아미노산 등) • 흰점박이꽃무지 열수추출물 및 진액발효물의 세포내 안정성 분석 완료(Raw, 3T3L1) • 흰점박이꽃무지 열수추출물 및 진액발효물의 효능평가 완료(항산화, 장내유효미생물 비피도 박테리엄 3종 유도 효과)

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

- 2 차년도의 목표 달성 완료 됨
- 본 연구에서 제시한 흰점박이꽃무지 추출발효 공정법은 다른 식용곤충에 적용하여 곤충의 식
품으로서의 유효물질의 제시와 식품으로서 소비자에게 다가갈 수 있는 다양한 방법 제시를
위한 후속연구 필요

제 4 장 연구결과의 활용 계획 등

제 1 절. 활용계획

1. 안전한 식용곤충 식품 고품질 및 장기 유통 가능

- 식품으로서 식용 곤충의 향, 색, 맛의 대중화 및 일반화
- 식용곤충 사육, 기업 관련 농상민과 의 소득 증대 및 식품관련 업계 활성화에 기여
- 현재의 제한된 곤충자원 활용 영역을 확대하여 지속적 수요가 있는 신시장 창출
- 곤충 유래의 기능성 검증을 통한 식품 개발은 여타의 곤충에 대한 신소재화의 가능성 증대
- 항균 유산균 포함 식용곤충을 이용한 식품 보존 첨가물 개발은 기존 식·의약소재 이외에 새로운 분야로 기술범위 확대
- 식용곤충 생체 내 면역증강물질(항균 펩타이드) 대량생산을 위한 면역유도 방법 개발
- 국내 등록 된 식용곤충에 적용 가능한 고기능성 면역증강물질 함유 천연 보존 첨가물 개발
- 개발된 항균유산균을 이용한 식용곤충 분말의 조성 및 제조기술을 식품제조 관련 기업에 이전하여 고품질의 다양한 식품이 상품화 될 수 있도록 함
- 식용곤충 건분말의 내성 균주를 제어할 수 있는 천연 항균제제 개발
- 고효율 항생제 대체물질 및 고기능성 보존 유산균 소재 개발 및 산업화
- 식용 곤충사육농가 보급 및 이를 이용한 보존 첨가제 개발
- 항균 유산균으로부터 천연항생제 정제 및 세균병, 바이러스병 치료제로 활용
- 곤충 유래 항균제 대체물질 및 기능성 식품 보존 소재 개발을 위한 기술 확립

2. 식용곤충과 프로바이오틱스 융복합 다양한 제품 개발

- 안전성과 고품질의 식용곤충의 안정적으로 공급가능
- 식품으로 등재된 식용곤충들의 신속하고 다양한 식품 출시 가능
- 천연 항균 유산균 융합을 통한 식용곤충의 식품 산업화 촉진하여 곤충 수요증대에 따른 농가 및 산업체 확대와 소득 증대
- 다양한 곤충의 불포화지방산 및 미량원소 함유 특징을 이용한 노인이나 유아를 위한 식품 개발 가능
- 식용곤충과 천연 항균 유산균을 이용한 다양한 소재 개발로 혐오감을 극복한 다양한 유형의 곤충식소재의 공급
- 연구개발 된 상품과 기술,논문은 학회보고와 특허등록
- 대중성 있는 연구개발로 기업유치와 고용창출 (6차 사업화)

3. 식용곤충과 유산균 유래 항균물질을 이용한 산업화 모델개발

- 지역 농가에 신규 소득원 아이템으로 적용

- 식용곤충을 활용한 지역 관광축제 자원화 육성으로 지역경제 활성화 도모
- 식용 곤충의 유치/초등학교 교과학습연계 상품 개발로 체험학습의 다양화
- 새로운 식용곤충 자원 탐색 및 연구 기대
- 식용 곤충의 유통 및 판매 지침서 개발에 활용

제 2 절. 기대효과

1. 기술적 측면

1) 식용곤충과 프로바이오틱스 융합 제품 개발

- 식용곤충 이용 다양한 소재 개발을 통한 식품 산업에서의 곤충 이용성 증대
- 가정이나 외식업체에서 사용하기 편리한 메뉴 및 조리 중간가공식품 기술 개발
- 곤충섭취시 소화율 증대 기술 개발을 통한 높은 소화용이한 식용곤충 제품 개발 가능
- 건강보충용, 영양취약계층 등 다양한 소비자 층에 접근할 수 있는 다양한 제품 개발을 통해 갈색거저리의 소비 증대를 통한 관련 농가 및 업체 소득 증대
- 프로바이오틱스 제품의 기능성고 안전성에 대한 검증을 통해 식용곤충에 적합한 천연 항균물질 확보하여 브랜드화 가능
- 한국 식품의 세계화가 있어 국내 식용곤충과 우수한 항균 유산균을 발굴하여 새로운 아이템의 제품 개발
- 기능성 유산균과 식용곤충이 조합 된 제품개발은 그 가공품을 활용한 생산 부분의 고용 창출과 더불어 기능성 식품 산업 제약산업, 포장재 산업 등 연관 산업 부분의 고용 창출되어 경제 활성화에 기여
- 식용곤충의 장기 보존과 더불어 항균 기능성 유산균을 생산하여 새로운 가공 기술을 접목하여 다양한 기능성 유산균 제품을 생산
- 식용곤충의 영양학적 우수성과 항균 유산균의 기능이 융합한 고기능성 신규 식품 소재 및 제품화로 새로운 기술 경쟁력 강화가 기대 됨
- 식용곤충 장내 미생물을 활용한 유산균주의 개발은 소비자의 신뢰를 확보
- 식용곤충 사육 시 발생하는 이취의 제거를 통해 식품으로서의 가치를 업그레이드 하여 농가, 기업의 더 많은 이익 창출

2) 안전한 곤충식품 개발

- 천연 항균 유산균을 포함하는 식용곤충(흰점박이꽃무지, 갈색거저리)을 이용한 식품 개발은 식의약소재 이외에 새로운 분야로 기술범위 확대
- 유산균이 만드는 항균 기능성 물질을 통한 식품 첨가제 개발은 여타의 곤충에 대한 새로운 소재화의 가능성을 증대
- 유산균 유래 천연 항생제 대체물질 및 고기능성 식품 소재의 이용효과 및 작용기전 구명

- 고기능성 생리활성물질의 산업적 활용을 위한 기술력 확보 및 관련 기술 제공

3) 식용곤충과 유산균 유래 항균물질을 이용한 산업화 모델개발

- 식용곤충 종류별 유통 및 판매 기준과 규격지침의 산업화 자료 구축
- 기존의 교육프로그램과 차별화된 교보재를 통한 생생한 생태교육 프로그램 구현

2. 경제적·산업적 측면

1) 식용곤충과 프로바이오틱스 융합 제품 개발

- 식용곤충의 고단백 함유의 특징을 활용하여 육류 대체 식품으로 이용도 증대 기대
- 다양한 형태의 식용 곤충과 유산균 유래 항균물질 융합 식품 소재 개발로 혐오감을 극복한 곤충의 식품소재 시장 점유율을 확대하여 곤충 사육 농가의 부가가치 창출 가능
- 본 연구결과를 바탕으로 다양한 형태의 일반식품 혹은 취약집단을 위한 환자식, 유아식, 노인식품 개발을 통해 국민건강증진에 이바지할 것으로 기대됨
- 식용곤충 섭취량 증대 및 사육농가와 협력을 통해 국내 식량 자급률 상승 가능
- 전 세계적으로도 관련 연구 및 제품화가 적고 다양성이 적어 블루오션 산업으로써, 이후 부가가치 창출 가능성이 높음(6차산업)

2) 안전한 곤충식품 혹은 화장품·의약품 소재 개발

- 고부가가치 천연항생제 생산 식용곤충(흰점박이꽃무지, 갈색거저리) 개발에 따른 곤충농가의 소득 증대 및 농가 수 확대
- 식용곤충 자체의 부가가치 상승뿐 만 아니라 식품 또는 사료회사 및 동물의약품 회사 등 관련 산업의 동반 성장으로 인한 경제적·산업적 이득이 예상됨
- 개발된 고기능성 항생 펩타이드 유사체는 항생제 내성문제를 해결할 수 있는 천연 항생물질로 항균제, 항진균제, 항암제, 항바이러스제 및 무공해 항생제 등의 산업화에도 적용 가능하여 높은 부가 가치 창출할 것으로 기대됨
- 면역증가 및 항균효과를 가지는 천연 식품소재 개발을 통한 고품질 안정 축산물 생산
- 면역증강물질 첨가로 고품질의 꽃병이, 갈색거저리 기능성 식품 개발 가능
- 꽃병이와 갈색거저리는 각종 유용물질(다량 단백질) 포함하여 본 연구의 고품질화는 식품 및 가공제품 산업을 가속화
- 면역증강물질 생산 갈색거저리 개발 및 효능분석에 따른 논문게재, 특허출원, 산업체 기술 이전
- 곤충 유래 천연 항균성 유산균은 프로바이오틱스로 인정되어 이를 활용한 제품개발은 신뢰도 기 확보 가능

3) 식용곤충과 유산균 유래 항균물질을 이용한 산업화 모델개발

- 식용곤충과 항균유산균 융합 제품의 다양화, 시장의 활성화로 국내 곤충시장의 변화 모색
- 미래 산업사회의 사업 콘텐츠 확립 및 새로운 환경문화 생성의 초석 마련
- 새로운 수익사업 및 환경교육산업에 이바지

3. 사회문화적 측면

1) 식용곤충과 프로바이오틱스 융합 제품 개발

- 육류의 단백질 제품에 익숙해 있는 사회에 또 다른 미래 기능성 식품으로서의 제품 제시
- 혐오감을 극복한 곤충의 식품소재 시장 점유율을 확대하여 곤충 사육 농가의 부가가치 창출
- 취약집단을 위한 환자식, 유아식, 노인식품 개발을 통해 국민건강증진에 이바지 기대
- 식용곤충 섭취량 증대 및 사육농가와와의 협력을 통해 국내 식량 자급률 상승 가능

2) 안전한 곤충식품 혹은 화장품·의약품 소재 개발

- 곤충농가의 소득 증대 및 농가 수 확대
- 식용곤충 자체의 부가가치 상승과 관련 산업의 동반 성장으로 인한 사회적 인식 개혁
- 무공해 항균제 등의 산업화에도 적용 가능하여 높은 부가 가치 창출할 것으로 기대
- 항균효과를 가지는 천연 변질 저감 물질 개발을 통한 고품질 식용곤충 식품, 화장품, 혹은 의약품 소재 생산
- 다른 식용곤충의 식품으로써 적용범위 확대 가능
- 식용곤충의 각종 유용단백질을 다량 함유하고 있어 식품 첨가물 사용 시 시너지 효과 기대

3) 식용곤충과 유산균 융합으로 인한 곤충산업의 재인식

- 식용곤충 시장의 활성화로 국내 곤충시장의 변화
 - 미래 산업사회의 사업 콘텐츠 확립 및 새로운 환경문화 생성의 초석 마련
- 차세대 미래 단백질 공급원으로서 다가갈 새로운 아이템 제공
- 곤충산물의 안정적인 유통시스템 구축에 필요한 곤충산물 이력관리와 곤충사육에 활용하여 질병 분석자료로도 제시가능하며 곤충 대량사육 생산성 향상에도 기여할 수 있을 것으로 판단

붙임. 참고문헌

1. Armitage SAO, Thompson JJW, Rolff J, Siva-Jothy MT(2003) Examining costs of induced and constitutive immune investment in *Tenebrio molitor*. *J Evol Biol* 16, 1038~1044.
2. Barnes AI, Siva-Jothy MT(2000) Density-dependent prophylaxis in the meal worm beetle *Tenebrio molitor* L.(Coleoptera: Tenebrionidae): cuticular melanization is an indicator of investment in immunity. *Proc R Soc Lond B* 267, 177~182.
3. Jiraphon S, Tasanee J(2001) Industrial mass rearing of mealworm beetle(*Tenebrio molitor* L.). *Kaen Kaset Khon Kaen Agriculture Journal* 29(4), 194~200.
4. Ludwig D, Carl F(1960) Further studies on the relationship between parental age and the life cycle of the mealworm, *Tenebrio molitor*. *Ann Entomol Soc Am* 53(5), 595~600.
5. Tracey SKM(1958) Effects of parental age on the life cycle of the mealworm, *Tenebrio molitor* Linnaeus. *Ann Entomol Soc Am* 51(5), 429~432.
6. Wagner WE Jr., Harper CJ(2003) Female life span and fertility are increased by the ejaculates of preferred males. *Evolution* 57(9), 2054~2066.
7. Worden BD, Parker PG(2001) Polyandry in grain beetles, *Tenebrio molitor*, leads to greater reproductive success: material or genetic benefits? *Behavioral Ecology* 12(6), 761~767.
8. Yang W, Xie ZH, Zhou ZJ, Yang CP(2005) The learning behavior of *Scleroderma sichuanensis* Xiao(Hymenoptera: Bethylinidae) fed on the fictitious hosts *Tenebrio molitor* L.(Coleoptera: Tenebrionidae). *Acta Entomologica Sinica* 48(5), 731~735.
9. Zaniccio, J, Molina-Rugama AJ, Serrao J, Pratisoli D(2001) Nymphal development and reproduction of *Podisus nigrispinus*(Heteroptera: Pentatomidae) fed with combination of *Tenebriomolitor*(Coleoptera: Tenebrionidae) pupae and *Muscadomestica*(Diptera: Muscidae) larvae. *Biocont Sci Technol* 11(3), 331-337.
10. AOAC. 1995. Official methods of analysis. 16th ed. Association of official Analytical Chemists, Washington, DC, USA. 4:17, 32:21, 22, 32. Bukkens, S. G. F. 1997. The nutritional value of edible insects. *Ecol. Food Nutr.* 36:287-319.
11. Cho, P. S. 1969. Illustrated encyclopedia of fauna & flora of Korea, Vol. 10. Insecta(II).

- Samhwa, Seoul. Korea. P. 689, 693. Cho, D. H., Y. M. Cho, and J. I. Lee. 2003. Fruitbody formation of *Cordyceps militaris* in *Allomyrina dichotoma* Linnaeus. *Kor. J. Plant Res.* 16: 1-7.
12. Chung, M. Y., J. S. Hwang, T. W. Goo, and E. Y. Yun. 2013. Analysis of general composition and harmful material of *Protaetia orientalis*. *J. Life Sci.* 23:664-668.
13. Dewanto, V., W. Xianzhong and R. H. Liu. 2002. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J. Agric Food Chem.* 50: 4959-4964.
14. Finke, M. D., 2002. Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. *Zoo Biol.* 21, 286-293.
15. Finke, M. D., 2015. Complete nutrient content of four species of commercially available feeder insects fed enhanced diets during growth. *Zoo Biol.* 34, 554-564.
16. Heo, J. C., D. Y. Lee, M. S. Son, C. Y. Yun, J. S. Hwang, S. W. Kang, T.H. Kim, and S. H. Lee. 2008. Effects of mole crickets (*Gryllotalpaorientalis*) extracts on anti-oxidant and anti-inflammatory activities. *J.Life Sci.* 18, 509-514.
17. Gu, G. 1973. On the agricultural and forestry injurious insects in the Korean Coleoptera, Seoul National Univ. pp. 163.
18. Hwang, S. Y., Y. G. Lee, S. G. Hwang, H. B. Lim, Y. I. Kim, K. H. Jang, B. H. Jeon, D. W. Lee, and H. C. Lee. 2001. Subchronic toxicity of *Protaetia brevitarsis* in rate. *Kor. J. Ori. Med. Physiol Pathol.* 15:703-707.
19. Kang, I. J., H. K. Kim, C. K. Chung, S. J. Kim, and S. H. Oh. 2000. Effects of *Protaetia orientalis* (Gory et Perchlon) larva on the lipid metabolism in ethanol administered rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 29: 479-484.
20. Kang, S. J., C. W. Park, S. C. Han, Y. K. Yi, and Y. G. Kim. 2005. A grub (*Protaetia brevitarsis seulensis*) rearing technique using cellulose-digesting bacteria and natural recycling of rearing byproduct to an organic fertilizer. *Kor. J. Appl. Entomol.* 44(3): 189-197.
21. Kang, M. G. 2011. Study on the effects of fermented Aloe vera mixed diet on the larval growth of *Protaetia brevitarsis seulensis* and protective effects of its larval extracts on rat hepatotoxicity. *Agric. Bio. Kyungbook Nat. Univ.*

22. Kim, C. W. 1978. Distribution atlas of insects of Korea(Seris 2, Coleoptera). Korea University Press, Seoul Korea.
23. Kim, J. I. 1998. Insects' Life in Korea(III) Coleoptera. Korea Univ. Seoul. Korea. pp. 255.
24. Kim, C. H. 2001. Ecological and developmental characteristics of *Protaetia* spp. in Korea. Department of Agricultural Biology Graduate School, Kangwon National University.
25. Kim. C. H., J. S. Lee, M. S. Go, and K. T. PArk. 2002. Ecological characteristics of *Protaetia orientalis submarmorea* (Burmeister) (Coloptera: Cetoniidae). Korean J. Appl. Entomol. 41: 43-47.
26. Kim, H. G. 2005. Bionomical characteristics of *Protaetia brevitarsis* and *Allomyrina dichotoma*. Department of Biology Graduate School Jeonju University.
27. Kim, H. G., K. H. Kang, and C. Y. Hwang. 2005. Effect of some environmental factors on oviposition and developmental characteristic of *Protaetia brevitarsis* and *Allomyrina dichotoma*. Kor. J. Appl. Entomol. 44: 283-286.
28. 정철모, 2007, 농촌관광진흥을 위한 경관 농업의 확대방안, 농촌관광연구지
29. 농업과학기술원, 2006, 유용곤충 산업화를 위한 전국 곤충사육농가 실태조사 보고서
30. 농업과학기술원, 2008, 유용곤충 산업화 발전방안 수립을 위한 심포지엄
31. 농림수산식품부, 2010, 곤충산업의 육성 및 지원에 관한 법률
32. 국립농업과학원, 2012, 국내외 식 • 약용 및 사료화 곤충산업 발전을 위한 심포지엄
33. 농수산식품부, 2012, 곤충사육 매뉴얼

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 김치유산균 Weissella 활용 꽃병이 엑기스의 기능성 향상 기술 개발				
	(영문) Development of Functionality Enhancing Technology of Pb Extract using Kimch LAB, Weissella sp.				
주 관 연구 기관	농업회사법인(주)동의보급	주 관 연 구 책 임 자	(소속) 농업회사법인(주)동의보급		
참 여 기 업	농업회사법인(주)동의보급		(성명) 박 정 철		
총 연구개발비 (천원)	계	205,000	총 연 구 기 간	2018. 04. 30~2020. 12. 31(1년 9월)	
	정부출연 연구개발비	160,000	총 참 연 구 원 수	총 인 원	17
	기업부담금	45,000		내부인원	04
	연구기관부담금	-		외부인원	13

○ 연구개발 목표 및 성과

- 웨이셀라활용 최적 발효 및 생산 공정구축(유산균3종, 탄소원, 향산화, 발효공정 확립)
- DHNA 생산 조건 확립 및 확인(HPLC에 의한 DHNA정량 확인)
- 식용곤충 활용 Wp 발효물 유효성 확보(발효 후 프롤린아미노산, DHNA 등 유효물질 확인)
- 꽃병이 발효 엑기스 시제품 개발 및 상품화 (세포안전성, 일반성분 등 분석 완료)

○ 연구내용 및 결과

- 웨이셀라활용 최적 발효 및 생산 공정구축
 - 흰점박이꽃무지 용매추출물과 진액을 배지에서 유산균 성장은 추출물의 경우 탄소원일 필요함
 - 호기, 혐기, 진탕, 정치배양 및 시간, 온도 등의 발효공정 DoE 시행
 - 탄소원, 질소원 및 향산화제에 의한 생균, pH, brix 등의 특성 분석
 - 유산균주별 MRS배지, wheat 배지, 꽃병이추출물에서의 시간별 생균, DHNA 유무 확인(TLC)
- DHNA 함유 꽃병이 추출배양물과 진액배양물의 특성
 - 탄소원(전분) 첨가 유무에 따른 배양시간별 DHNA 함량 변화(TLC, HPLC)
 - 추출배양물과 진액배양물의 시간별 각 유산균과 공배양시의 생균수 변화에 따른 DHNA 변화
 - 추출과 진액의 배양에 따른 향산화 효능 평가(DPPH)
 - 장내 유효균인 비피도 3종균의 성장 촉진 효과 배양시간별 비교분석(유산균 3종 및 공배양 시행)
 - 추출물, 추출배양물, 진액배양물의 일반성분, 아미노산, 중금속, 산도, 당도 등 비교분석
 - in vitro 세포(Raw, 3T3L1 세포) 내의 세포안전성 및 유해,유효 미생물 확인

- DHNA 관련 유전자를 통한 유산균 유효성 확인

- Weissella sp 2종의 DHNA 합성효소 MenC, MenE, MenH 총 6종 신규유전자 분리
- Lactobacillus sp 1종의 DHNA 합성효소 MenA, MenA1, MenA2 총 3종 신규유전자
- 유산균 발현에 따른 유전자 전사체 확인(RT-PCR, real-time PCR)
- 곤충세포내에서의 유산균 유래의 DHNA 합성효소 발현

- 연구성과 활용실적 및 계획

- 연구성과 활용실적

- 유산균 활용 식용곤충 추출배양물의 대사체(postbiotics) 관련 실험연구 및 제품화
- 흰점박이꽃무지 유충 진액과 환 제품 판매 실적 166백만원(2018-2019년, 연구기간) 달성
- 특허등록 1건, 상표등록 1건, 특허 출원 5건, 학회 발표 13건, SCI 논문 2건, 정책 1건, 홍보 1건, 시제품 1건, 식용곤충산업화 교육 2건, 6차산업 교육이수 등

- 연구성과 활용계획

- 타 식용곤충에 바이오컨버전 기술 접목 후 제품화
- 식용곤충 추출발효공정법 특허등록, 기관 MOU, 기술이전, 및 제품판매
- 정부R&D사업 연계 추진 계획

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	818011-02		
사업구분	농식품연구성과후속지원사업				
연구분야	농림식품융복합		과제구분	단위	
사업명	농식품연구성과후속지원사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	김치유산균 Weissella 활용 꽃병이 엑기스의 기능성 향상 기술 개발		과제유형	개발	
연구기관	농업회사법인 주식회사 동의보급		연구책임자	박 정 철	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2018.04.30.~2018.12.31	65,000	20,000	85,000
	2차연도	2019.01.01.~2019.12.31	95,000	25,000	120,000
	계	2018.04.30.~2019.12.31	160,000	45,000	205,000
참여기업	농업회사법인 주식회사 동의보급(구, 영천곤충산업)				
상대국	-	상대국연구기관		-	

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2020. 02. 29

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
농업회사법인 주식회사 동의보급	대표이사	박 정 철

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	박 정 철
----	-------

I. 연구개발실적

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (**아주우수**, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 흰점박이꽃무지 유충 원료를 Weissell sp 유산균 2종과 Lactobacillus sp 1종의 공배양으로 1, 4-디히드록시-2-나프토산(1,4-dihydroxy-2naphthoic acid; DHNA)를 생산하는 공정법을 확립을 완료 함
- DHNA 함유 흰점박이꽃무지 유충 용매추출물 및/또는 흰점박이꽃무지 유충 진액 배합물 장내의 유효 미생물인 비피도박테리움 속 균주의 성장촉진 기능, 항산화 기능, 및 비타민 합성 및 콜라겐 형성을 돕는 프롤린 유리아미노산의 함량 높아 제품 고도화 완료
- 흰점박이꽃무지 유충 용매추출물 및/또는 흰점박이꽃무지 유충 진액 배합물을 원료로 사용한 유산균 발효물로 DHNA를 조성물 대량생산 완료
- DHNA로 유도 된 장내 유효 비피도박테리움 롱검, 비피덤, 브레브 3종 성장촉진 기능의 흰점박이꽃무지 진액제품인 동의보급 플러스 시제품을 제작하여 기존 진액제품과의 차별화
- 국내외에 있어 식용곤충 추출물을 이용한 유산균 발효 제품에 대한 전례 보고가 없고 식용 곤충 포스트바이오틱스 관련 결과를 제시함으로 창의적 연구 결과로 사료 됨

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (**아주우수**, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 기술적 측면
 - 식용곤충과 프로바이오틱스 새로운 융합 제품 개발 및 제시
 - 흰점박이꽃무지 유충 용매추출물 및/또는 흰점박이꽃무지 유충 진액 배합물은 기존의 진액제품에 비교해 이취저감, 중금속 저감 가능
 - 진액 추출배양물은 포도상구균, 대장균, 리스테리아를 항균효과 높음
 - 단백질, 탄수화물, 지방 분해효소의 영향으로 저분자화 되어 소화흡수율이 높음
 - 장내 유효 비피도유산균 성장촉진 및 염증완화 효과를 가진 흰점박이꽃무지 진액 유산균 배양물로 곤충식품의 일반화 가능
 - 식용곤충 산업 분야의 이취, 저장, 유통에 관련 된 문제 해결과 새로운 식용곤충 식품의 패러다임을 제시
- 경제적, 산업적 측면
 - 식용곤충의 고단백의 저분자화로 소화흡수율을 높여 환자식, 고령자 소비자 확대 가능
 - 소비자의 혐오감, 거부감을 해결할 건강 음료 제품 제시
 - 고부가가치 프로바이오틱스 소재 개발에 따른 곤충농가의 소득 증대 및 농가수 확대
 - 단백질, 탄수화물, 지방 분해효소의 영향으로 저분자화 되어 소화흡수율이 높음
 - 흰점박이꽃무지 이외의 다른 식용곤충에 적용확대하여 곤충산업의 가속화
 - 곤충자원의 식품소재 산업화의 업그레이드 및 신가치 창출
 - 농생명산업인 그린산업과 화이트산업이 동반성장에 다른 국가 경쟁력 제고

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 생물전환기술을 이용하여 흰점박이꽃무지의 유충 용매추출물 및/또는 흰점박이꽃무지 유충 진액 배합물 공정기술 완료
- 장내 유효 비피도균의 성장촉진과 염증완화 기능의 DHNA가 함유 흰점박이꽃무지 진액 제품 개발
- 흰점박이꽃무지의 포도상구균, 대장균, 리스테리아 등의 유해 미생물에 대한 항균성을 가지는 유산균의 적용 확대 가능
- DHNA 생산 흰점박이꽃무지 유충 및/또는 진액의 대량 발효공정법을 확립
- 기존의 식용곤충의 성분을 업그레이드하여 소비자들에게 안정성과 효능을 함께 제공
- 프로바이오틱스 융합 제품에 의해 식용곤충산업 분야의 이취 및 거부감에 관련된 문제해결
- 농민, 기업, 소비자에게 기타 식용곤충 등에 적용확대 기대 높음
- 유산균발효공정 및 효능분석에 따른 특허출원, 기술이전 및 논문게재

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 제시 한 계획 연구개발 목표 및 연구내용을 성실히 수행하였으며 당초 계획에 비하여 정성적 및 정량적 목표를 상회하는 연구 성과를 확보하였음

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 산업재산권(특허출원 5, 특허등록 1, 상표등록 1)
 - 특허출원 5건
 - ① 흰점박이꽃무지 추출물의 발효물, 이의 제조방법 및 용도(10-2018-0153921/2018.12.03.)
 - ② 흰점박이꽃무지 추출물의 발효물, 이의 제조방법 및 용도(10-2019-0066242/2019.06.04.)
 - ③ 흰점박이꽃무지의 염장발효식품 및 이의 제조방법(10-2019-0121784/2019.10.01.)
 - ④ 갈색거저리 발효물을 포함하는 사료첨가제 및 이를 포함하는 사료 조성물 (10-2019-0126813/2019.10.30.)
 - ⑤ 흰점박이꽃무지 발효물을 포함하는 미생물의 성장 촉진용 조성물(10-2019-0157749/2019.11.29.)
 - 특허등록 1건
 - ① 굼벵이를 활용한 기능성 식품의 제조방법(10-191977-00000/2018. 11.13)
 - 상표등록 1건
 - ① 동의보급 제[35류](40-137614-0000/2018. 07.09)

○ 학회발표 13건

- ① Potential of the 1,4-Dihydroxy-2-Naphthoic acid producing from *Weissella paramesenteroides* as Pb fermenter. 2019.12.03. 일본분자세포생물학회(일본, 후쿠오카)
- ② Antibacterial activity of their protein extract of LAB against fish pathogens. 2019.12.03. 일본분자세포생물학회(일본, 후쿠오카)
- ③ Role and Application of LAB in Food Preservation of *Protaetia brevitarsis*. 2019.12.03. 일본분자세포생물학회(일본, 후쿠오카)
- ④ Production of DHNA, a Bifidogenic growth stimulator in Pb Extraction. 2019.10.23. 한국영양과학회(제주컨벤션센터)
- ⑤ The GAD genes and GABA production from *Protaetia brevitarsis*'s MSG/. 2019.10.10. 한국생물공학회(대구엑스코)
- ⑥ Potential of the 1,4-Dihydroxy-2-Naphthoic acid producing from *Weissella paramesenteroides* as Pb fermenter. 2019.10.10. 한국생물공학회(대구엑스코)
- ⑦ Enhancement of 1,4-Dihydroxy-2-Naphthoic Acid Production by *Weissella* sp Fed-Batch Culture in *Protaetia brevitarsis* extraction. 2019.9.9. 세계산업미생물학회 (이탈리아)
- ⑧ Production of Pb's salt-sauce using LAB and qualitative evaluation. 2019.6.26. 한국식품과학회(송도컨벤션센터)
- ⑨ Potential of LAB for improving storage of PB as food. 2019.6.26. 한국식품과학회(송도컨벤션센터)
- ⑩ Application of LAB improving storage of Pb as Food 2019.4.17. 한국미생물학회(제주컨벤션센터)
- ⑪ The potential of *Glehnia littoralis* Fermented by LAB 2019.4.17. 한국미생물학회(제주컨벤션센터)
- ⑫ Characterization of fermented edible insect, *P.brevitarsis*, inoculated with lactic acid bacteria. 2019.4.10. 한국생물공학회(제주컨벤션센터)
- ⑬ Isolation and characterization of Lactic acid bacteria from edible insect and the Feed 2018.10.11. 한국미생물학회연합국제학회(더케이호텔, 서울)

○ 논문발표 2건

- ① Preparation and characterization of sericin powder extracted with deep sea water 2018.12.16. 3Biotech 9(1), 30-38 Hong sunmee
- ② Heterologous Production and Glycosylation of Japanese Eel Follicle Stimulating Hormone in Silkworm 2019.7.06. Biotech Bioeng 24, 30-38 Hong sunmee

○ 생명자원 기탁 4건

- ① *Weissella paramesenteroides* D20 (KCCM12301P)
- ② *Weissella paramesenteroides* D12 (KCCM12300P)
- ③ *Pediococcus acidilactici* D17(KCCM12472P)
- ④ *Lactococcus garvieae* B44(KCCM12473P)

○ 정책건의 1건

- ① 사료용 곤충 산업화: 영천시 농정과/2019. 02.01

○ 홍보실적 2건

- ① 굼벵이 식품 특허기술로 식용곤충 시장에서의 두각. 2019. 06. 11/ 이코노미타임21
- ② 식용굼벵이 부부의 꿈. 2019. 08.20 / YTN

○ 교육 및 컨설팅 2건

- ① 경북곤충산업의 발전방향 2019.2.15. 경북대학교 생태환경대학
- ② 곤충식품산업 성공전략 2019.6.5. 코엑스

○ 박람회 및 전시회 참가 1건

- ① 곤충식품페스티벌. 동의보급 진액 2019. 06. 05/ 코엑스 서울

○ 수상실적 2건

- ① 경북농업6차산업 공로상. 신명화 2018.8.10. 경북농민사관학교 6차산업화과정
- ② 농업인표창장. 박정철 2019.6.5. 국립농업과학원장

○ 인증 1건

- ① 농촌융복합산업 사업자 인증 2018. 12. 10/ 농림축산식품부

○ 인력양성 3건

- ① 경북농업6차산업화과정 2018년
- ② 농산물가공과정(사이버) 2018년
- ③ 곤충사육과정(사이버) 2018년

○ 제품화 및 사업화 2건

- ① 동의보급 환 2018년, 6,000만원 매출
- ② 동의보급 진액 및 환 2019년, 106백만원 매출
- ③ 동의보급 진액 플러스 2019년, 시제품 홍보

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
흰점박이꽃무지 웨이셀라 활용 발효생산 시스템 구축	20	100	웨이셀라 및 락토바실러스 공배양에 의한 생물전환 공정조건 확립
웨이셀라 활용 흰점박이꽃무지 DHNA 생산 조건 확립	20	100	5가지 탄소원에 첨가실험 후 유효 탄소원으로서 전분 확인 완료(HPLC)
유산균 발효 흰점박이꽃무지 진액 성분 분석 및 표준서 작성	20	100	일반성분분석, 아미노산, 및 중금속 분석 완료(한국기능식품연구원)
유산균 발효 흰점박이꽃무지 진액 효능 평가	20	100	장내 유효 3종 비피도균 성장촉진, 항산화기능, 항균기능 확인완료
유산균 발효 흰점박이꽃무지 진액 안전성 평가(세포)	20	100	in vitro(Raw, 3T3L1) 세포 안전성, pH, brix, 일반성분분석, 유해, 유효 미 생물 확인 완료
합계	100점		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 사업은 고영양, 고단백 미래식품으로서의 식용곤충 중 흰점박이꽃무지 유충의 추출물과 진액배합물을 활용하여 위염억제 기능을 가진 DHNA(1,4-dihydroxy-2naphthoic acid) 생산하기 위해, DHNA 생산 가능한 유산균 *Weissella paramesenteroides* 2종(KCCM12300P, 12301P)과 *Lactobacillus plantarum*(KCCM12299P) 1종을 선발하고, 탄소원으로 전분(다당류)을 첨가하여 배지조건을 완성하였다. 또한 호기상태, 48시간 이상 배양, 진탕배양 등의 공정조건을 확립하였다. 이를 통해 유산균을 이용한 DHNA 함유 식용곤충추출배양물 또는 진액배양물이 장내에서만 서식하는 비피도스균 특히 비피도 롱검, 비피도 비피덤, 비피도 브레브의 성장촉진에 유효함과 항산화 효능도 높았다. 이는 기존의 흰점박이꽃무지 진액 상품을 업그레이드하여 이취제거, 맛향상과 더불어 유산균배양에 의한 콜라겐 형성에 관여하는 프롤린 아미노산(311mg/100ml, w/w)과 장내 비피도균 생성, 염증완화, 골다공증 예방효과가 있는 DHNA(1ppm, 0.1%)가 함유된 동의보균 프리미엄 시제품을 제작완료하였다(기술출원, 상품출원).

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

계획된 연구개발 목표 및 연구내용을 성실히 수행하여 당초계획보다 정성적 및 정량적 목표를 상회하여 달성하였으며, 향후 흰점박이꽃무지 외의 식용곤충 또는 유용곤충에 적용하여 식품 이외의 면역증강, 항균기능 외의 기타 대사물 활용 사료 등에 적용할 것으로 기대 됨.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 식용곤충과 프로바이오틱스 새로운 융합 제품 개발 및 적용확대
- 흰점박이꽃무지 유충 용매추출물 및/또는 흰점박이꽃무지 유충 진액 배합물은 기존의 진액제품의 공정고도화에 의한 고부가가치화
- 진액 추출배양물은 포도상구균, 대장균, 리스테리아를 항균효과의 방부 대체 효과
- 단백질, 탄수화물, 지방 분해효소의 영향으로 저분자화 되어 소화흡수율을 높여 고령자 등의 소비자층 확대
- 장내 유효 비피도유산균 성장촉진 및 염증완화 효과를 가진 흰점박이꽃무지 진액 유산균 배양물로 곤충식품의 일반화 유도
- 식용곤충 산업 분야의 이취, 저장, 유통에 관련 된 문제 해결과 새로운 식용곤충 식품의 패러다임을 제시
- 식용곤충의 고단백의 저분자화로 소화흡수율을 높여 환자식, 고령자 소비자 확대 가능
- 소비자의 혐오감, 거부감을 해결할 건강 음료 제품, 화장품에 적용
- 고부가가치 프로바이오틱스 소재 개발에 따른 곤충농가의 소득 증대 및 농가수 확대
- 단백질, 탄수화물, 지방 분해효소의 영향으로 저분자화 되어 소화흡수율이 높음
- 흰점박이꽃무지 이외의 다른 식용곤충에 적용확대하여 곤충산업의 가속화
- 곤충자원의 식품소재 산업화의 업그레이드 및 신가치 창출
- 농생명산업인 그린산업과 화이트산업이 동반성장에 다른 국가 경쟁력 제고

IV. 보안성 검토

○ [국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정] 제 24조의 4 제1항에 해당하지 않음으로 일반으로 분류

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

○ 해당사항 없음

2. 연구기관 자체의 검토결과

○ 해당사항 없음

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	농식품연구성과후속지원사업	
연구과제명	김치유산균 Weissella 활용 꽃병이 엑기스의 기능성 향상 기술 개발			
주관연구기관	농업회사법인 주식회사 동의보균	주관연구책임자	박 정 철	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	160,000	45,000	-	205,000
연구개발기간	2018. 04. 30. ~ 2019. 12. 31			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① DHNA 생산 유산균주 확보 및 특성분석	① DHNA 생산 유산균주 4종 KCCM 등록
② 흰점박이꽃무지(꽃병이) 추출배지 조성 조건 구축	② 꽃병이 배지의 탄소원(전분) 조성확립
③ 꽃병이 추출물과 진액의 발효공정 확립	③ 저온, 호기, 압, 진탕배양조건 확립 특허출원 5건
④ 꽃병이 추출 및 진액발효물의 이화학 분석	④ DHNA, 아미노산, 중금속, 대사물 분석완료
⑤ 진액발효물(시제품)의 안전성, 안정성 및 성분분석	⑤ in vitro(Raw, 3T3L1) 세포 안전성, pH, brix, 일반성분분석, 유해, 유효 미생물 확인 완료 시제품 1건(동의보균 플러스)

* 본 사업은 고영양, 고단백 미래식품으로서의 식용곤충 중 흰점박이꽃무지 유충의 추출물과 진액배합물을 활용하여 위염억제 기능을 가진 DHNA(1,4-dihydroxy-2naphthoic acid) 생산하기 위해, DHNA 생산 가능한 유산균 Weissella paramesenteroides 2종(KCCM12300P, 12301P)과 Lactobacillus plantarum(KCCM12299P) 1종을 선발하고, 탄소원으로 전분(다당류)을 첨가하여 배지조건을 완성하였다. 또한 호기상태, 48시간 이상 배양, 진탕배양 등의 공정조건을 확립하였다. 이를 통해 유산균을 이용한 DHNA 함유 식용곤충추출배양물 또는 진액배양물이 장내에서만 서식하는 비피더스균 특히 비피도 룡검, 비피도 비피덤, 비피도 브레브의 성장촉진에 유효함과 항산화 효능도 높았다. 이는 기존의 흰점박이꽃무지 진액 상품을 업그레이드하여 이취제거, 맛향상과 더불어 유산균배양에 의한 콜라겐 형성에 관여하는 프롤린 아미노산(311mg/100ml, w/w)과 장내 비피도균 생성, 염증완화, 골다공증 예방효과가 있는 DHNA(1ppm, 0.1%)가 함유된 동의보균 프리미엄 시제품을 제작완료하였다(기술출원, 상품출원).

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
												SC I	비 SC I						논 문 평 균 IF	
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	30				30								20			10	10			
최종목표	1				1								2			1	1			
연구기간내 달성실적	5	2			1	166		1			2		2.0	13	2	3	1	2	3	
달성율(%)	500				100								650			100	200			

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	흰점박이꽃무지 유충(꽃병이) 용매 추출물 활용 유산균 배양기술(DHNA 생산)
②	흰점박이꽃무지 유충(꽃병이) 진액 활용 유산균 배양기술(DHNA 생산)
③	DHNA 함유 흰점박이꽃무지추출 또는 진액배양물의 비피도박테리움 성장촉진 조성물

5. 연구결과별 기술적 수준

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

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	곤충특유 이취, 이질감을 감소하고 유산균포함 건강기능식 제시
②의 기술	기존 흰점박이꽃무지 진액의 성분, 기능 및 안전성 향상
③의 기술	장내 유효 미생물 성장촉진으로 염증성 장질환, 유유불내성 환자 치료제 기대

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)	
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시		
												SCI	비SCI							논문평균IF
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명					
가중치	30	10				20	10							20				10		
최종목표																				
연구기간내 달성실적	6	4				1	166					2		2.0	13	2	3	1	2	3
연구종료후 성과창출 계획		<u>1</u>		<u>1</u>		<u>1</u>	<u>200</u>		<u>3</u>			<u>1</u>		<u>1</u>					<u>3</u>	

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	흰점박이꽃무지 발효물을 포함하는 미생물의 성장 촉진용 조성물		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	10,000 천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	종료 후 1년 이내	실용화예상시기 ³⁾	종료 후 2년 이내
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	호기발효기 및 유산균 발효기술 지도 필요		

- 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 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농식품후속지원사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농식품후속지원사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.